



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

CRISTIANE SELLA PARANZINI

**AVALIAÇÃO TERMOGRÁFICA DA REAÇÃO  
INFLAMATÓRIA NOS TESTÍCULOS DE GATO APÓS A  
APLICAÇÃO DO CLORETO DE CÁLCIO A 20% ASSOCIADO  
A LIDOCAÍNA OU DMSO INTRATESTICULAR**

CRISTIANE SELLA PARANZINI

**AVALIAÇÃO TERMOGRÁFICA DA REAÇÃO  
INFLAMATÓRIA NOS TESTÍCULOS DE GATO APÓS A  
APLICAÇÃO DO CLORETO DE CÁLCIO A 20% ASSOCIADO  
A LIDOCAÍNA OU DMSO INTRATESTICULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Isabel Mello Martins.

Londrina  
2016

### **Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

P223a Paranzini, Cristiane Sella.

Avaliação termográfica da reação inflamatória nos testículos de gato após a aplicação do cloreto de cálcio a 20% associado a lidocaína ou DMSO intratesticular / Cristiane Sella Paranzini. Londrina, 2016.  
95 f.: il.

Orientador: Maria Isabel Mello Martins.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2016.  
Inclui bibliografia.

1. Termografia Infravermelha - Teses. 2. Castração Química - Teses. 3. Cloreto de Cálcio - Teses. 4. Gato - Teses. I. Martins, Maria Isabel Mello. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós- Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 615:636.8

CRISTIANE SELLA PARANZINI

**AVALIAÇÃO TERMOGRÁFICA DA REAÇÃO INFLAMATÓRIA NOS  
TESTÍCULOS DE GATO APÓS A APLICAÇÃO DO CLORETO DE  
CÁLCIO A 20% ASSOCIADO A LIDOCAÍNA OU DMSO  
INTRATESTICULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Isabel M. Martins  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Guilherme Schiess Cardoso  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiana Ferreira de Souza  
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Londrina, 19 de fevereiro de 2016.

Dedico este trabalho aos animais abandonados e as batalhas diárias dos protetores dos animais

## AGRADECIMENTOS

Sempre, em primeiro lugar, ao bom e grande Deus, e não menos importante minha mãe e meu pai...

... irmãos, sobrinhos e agregados...

... orientadora, Maria Isabel Mello Martins, que teve papel importante nessa caminhada, dando suporte e apoio, dividindo seus conhecimentos...

... prof. Dr. Guilherme Schiess Cardoso e a minha amiga Anne Kemmer, por essa grande ajuda. A realização desse trabalho, seria impossível sem vocês...

... ao Luiz Guilherme Trautwein também, valeu pela força no labs e ilustrações...

... ao Gabriel Torres e Ana Paula Vieira, pela ajuda...

... a Srta. Láiza Camargo, ao amigos de longa data e curta data, residentes atuais, ex residentes, estagiários, a equipe fogo, pessoal da TAC e do ReproA. Todos que contribuíram tecnicamente para esse estudo, e aqueles que contribuíram dividindo sua amizade fazendo o meu dia melhor...

... ao parça, Marcos César Sant'anna que foi onde tudo começou...

À profa. Dra. Ana Paula F. L. Bracarense, meu grande obrigada pela leitura das lâminas de histologia.

Ao prof. Dr. Selwyn Arlington Headley, a profa. Dra. Fabiana Ferreira de Souza e novamente ao prof. Dr. Guilherme Schiess Cardoso, por terem aceito participar da banca, contribuindo para o enriquecimento deste trabalho.

... à Capes pela concessão da bolsa e ao programa de Pós Graduação em Ciência Animal, especialmente a Helenice, que salva a vida de todos pós-graduandos, sempre, com carinho e amor pelo que faz...

... ao HV/UEL, pela estrutura...

J.A. Saúde Animal e UNOPAR pelo fornecimento do CaCl<sub>2</sub>, apoiando esta pesquisa.

**“A árvore só cresce para o alto, depois de crescer para dentro...”**

*Autor desconhecido*

PARANZINI, Cristiane Sella. **Avaliação termográfica da reação inflamatória nos testículos de gato após a aplicação do cloreto de cálcio a 20% associado a lidocaína ou dmso intratesticular.** 2016. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

## RESUMO

A termografia é um método simples, objetivo, não invasivo, eficiente na detecção das alterações da temperatura superficial da pele em decorrência de processos patológicos nos tecidos subjacentes. Acredita-se que esta técnica, pode ser eficiente na detecção da reação inflamatória testicular, ocasionada por agentes esclerosantes intratesticulares, utilizados como método alternativo a orquiectomia em programas de controle de natalidade em massa. O objetivo deste estudo foi avaliar a reação inflamatória ocasionada pela aplicação intratesticular de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) para castração química de gatos utilizando a termografia, e a ação desse composto no sistema reprodutivo por meio do exame andrológico e avaliação histológica do testículo. Foram utilizados 18 gatos, machos, semidomiciliados divididos em três grupos. Grupo NaCl (n=6), que recebeu a aplicação de 0,25 mL de solução de NaCl 0,9% em cada testículo, grupo  $\text{CaCl}_2$ 1 (n=6), que 0,25 mL  $\text{CaCl}_2$  20% com lidocaína 1% e  $\text{CaCl}_2$ 2 (n=6) que receberam 0,25mL de  $\text{CaCl}_2$  20% com DMSO 0,5%. Os gatos foram anestesiados e realizada biometria testicular, eletroejaculação, análise espermática e aplicação das substâncias nos testículos. Sessenta dias após a aplicação para o grupo NaCl e  $\text{CaCl}_2$ 1, e oitenta após a aplicação para o grupo  $\text{CaCl}_2$ 2, os gatos foram novamente anestesiados, e realizado a biometria testicular, eletroejaculação, análise espermática, orquiectomia e histologia. As medidas termográficas foram realizadas antes da aplicação (M0), 10 minutos (M1) 1 hora (M2) e 6 horas (M3) após a aplicação, por 7 dias consecutivos (M4-10), aos 15 (M11), 30 (M12) e 60 ou 80 dias (M13). O VTT do grupo NaCl no M0 foi 1,6 e M13 1,33  $\text{cm}^3$ , do grupo  $\text{CaCl}_2$ 1 foi 1,29 no M0 e 0,83 no M13. 70% dos gatos do grupo  $\text{CaCl}_2$ 1 apresentaram parâmetros seminais de subfertilidade. Os gatos do grupo  $\text{CaCl}_2$ 2 tiveram redução de 50% do VTT e azoospermia no M13. Em todos os tratamentos, foram identificados diferentes tipos e graus de alterações histológicas testiculares em todos os animais. As medidas termográficas detectaram discreta variação da temperatura, mostrando que os gatos sofreram leve reação inflamatória testicular, que não comprometeu seu bem-estar. Concluiu-se que a termografia é eficiente para monitorar o processo inflamatório nos testículos dos gatos. O  $\text{CaCl}_2$  é eficiente em interromper a fertilidade dos gatos tratados por pelo menos 60/80 dias. A reação inflamatória ocorre pelo ato mecânico em se inserir substâncias químicas no testículo, porém o  $\text{CaCl}_2$  ajuda acentuar o dano do tecido testicular, sem intensificar a reação inflamatória.

**Palavras-chave:** Termografia infravermelha. Testículo. Castração química. Programa de Controle de Natalidade. Eletroejaculação.

Paranzini, Cristiane Sella. **Infrared thermography to evaluate the inflammatory reaction after testicular injection of calcium chloride 20% associated to lidocaine 1% or DMSO in tomcats.** 2016. 102 p. Dissertation (Master Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

## ABSTRACT

Infrared thermography is a simple, objective, non invasive and effective method detecting temperature variation in the skin surface due to pathological processes on its underlying tissue. It is believed that this technique is effective to detect testicular inflammation, caused by intratesticular injection of sclerosing agents used as an alternative method to orchiectomy in animal's birth control programs. The aim of this study is to evaluate the inflammatory reaction caused by intratesticular injection of 20% calcium chloride ( $\text{CaCl}_2$ ) used as chemical castration in tomcats, by thermographic image, and its effect on reproductive system by andrologic exam and testes histology. 18 stray male cats, divided into three groups. Group NaCl (n=6), which received a 0.25mL intratesticular injection 0.9% NaCl solution, and Group  $\text{CaCl}_2$ 1 (n=6) , 0.25 mL of 20%  $\text{CaCl}_2$  with 1% lidocaine and Group  $\text{CaCl}_2$ 2 (n=6) which received 0.25 mL of 20%  $\text{CaCl}_2$  with 0.5% DMSO. The cats were anaesthetized and testis measurement, electroejaculation, sperm analysis and the substances injection were performed. 60 days after testicular injection to NaCl and  $\text{CaCl}_2$ 1 groups, and 80 days to  $\text{CaCl}_2$ 2 group, it was also performed testis measurement, electroejaculation, sperm analysis, orchiectomy and histology. Thermographic measurements were performed before the application (M0), 10 minutes (M1), 1 hour (M2) and 6 hours (M3) after application, for 7 consecutive days (M4-10) at 15 (M11) 30 (M12) and 60 or 80 days (M13). Testicular total volume (TTV) for NaCl group was 1.6 at M0 and 1.3 at M13. For  $\text{CaCl}_2$ 1 group, VTT was 1.29 at M0 and 0.83 at M13. 70% of the cats of  $\text{CaCl}_2$ 1 showed subfertility semen parameters. The cats in  $\text{CaCl}_2$ 2 group had 50% of VTT reduction and azoospermia 80 days after the injection. All animals had different types and degrees of histological changes. Thermographic measures had discrete variation of temperature, showing that the animals suffered mild inflammatory reaction that does not compromise the welfare. It can be concluded that the  $\text{CaCl}_2$  is effective causing infertility 60/80 days after the intratesticular injection and has an acceptable inflammatory reaction. Thermography is efficient to monitor inflammatory processes in cats testes. Inflammatory reaction occurs by mechanical act of substances injection into the testis, but  $\text{CaCl}_2$  helps accentuate the damage of testicular tissue without intensifying the inflammatory reaction .

**Keywords:** Infrared Thermography. Testis. Chemical castration. Birth control. Electroejaculation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO I

- Figura 1** - Exemplos de probes utilizadas no laboratório de reprodução da Universidade Estadual de Londrina, para eletroejaculação em gatos.....27

### CAPÍTULO II

**1. Artigo 1: AVALIAÇÃO TERMOGRÁFICA DA REAÇÃO INFLAMATÓRIA DOS TESTÍCULOS DE GATO APÓS A APLICAÇÃO DE NaCl 0,9% E CaCl<sub>2</sub> 20%**

- Quadro 1** - Momentos das aferições termográficas do grupo NaCl e grupo CaCl<sub>2</sub>, antes e após a aplicação das substâncias esclerosantes nos testículos dos gatos. ....51
- Figura 2** - Figura ilustrativa da sequência de séries, quantidade e voltagem dos estímulos utilizados no protocolo de eletroejaculação para colheita de sêmen dos gatos. ....52
- Quadro 2** - *Setup* utilizado para espécie felina no CASA.....53
- Gráfico 1** - Média da temperatura em graus celsius da área testicular do grupo NaCl e CaCl<sub>2</sub>, nos diferentes momentos, antes e após a aplicação dos agentes esclerosantes intratesticulares. ....55
- Figura 3** - Ilustração fotográfica das medidas térmicas nos momentos M0 (A), M1 (B) e M3 (C) na paleta de cores quentes do termógrafo e M0 (D), M1 (E) e M3 (F), do mesmo animal, na paleta médica do software, utilizadas para localizar, quantificar e mapear a lesão. ....56
- Tabela 1** - Volume testicular total em cm<sup>3</sup> observado, antes e aos 60 dias após a aplicação do NaCl 0,9% (n=6) e CaCl<sub>2</sub> 20% com lidocaína 1% (n=6) intratesticular e a porcentagem de redução. ....57
- Tabela 2** - Parâmetros cinéticos avaliados pelo CASA, e índices de movimento antes (M0) e 60 dias (M13) após aplicação das substâncias esclerosantes intratesticular do grupo NaCl e CaCl<sub>2</sub>. ....58
- Tabela 3** - Frequência absoluta das lesões histológicas encontradas para o Grupo NaCl e Grupo CaCl<sub>2</sub>, 60 dias após a aplicação das substâncias esclerosantes.....59

**2. Artigo 2:** EFEITOS DA CASTRAÇÃO QUÍMICA COM  $\text{CaCl}_2$  20% ASSOCIADO AO DMSO 0,5% EM GATOS: AVALIAÇÃO DA REAÇÃO INFLAMATÓRIA COM TERMOGRAFIA

<b>Quadro 1</b> - Momentos das aferições termográficas antes e após a aplicação do $\text{CaCl}_2$ 20% com DMSO 0,5% intratesticular.....	75
<b>Figura 1</b> - Figura ilustrativa da sequência de séries, quantidade e voltagem dos estímulos utilizados no protocolo de eletroejaculação para colheita de sêmen dos gatos.. .....	76
<b>Quadro 2</b> - <i>Setup</i> utilizado para espécie felina no CASA.....	76
<b>Gráfico 1</b> - Média da temperatura em graus celsius da área testicular dos seis gatos, medidas nos 18 momentos avaliados durante o experimento. ....	79
<b>Figura 2</b> - Ilustração fotográfica da área testicular de gatos, aferidos nos momentos M0 (A), M1 (B) e M3 (C) na paleta de cores quentes do termógrafo.....	79
<b>Tabela 1</b> - Volume testicular total (VTT) em $\text{cm}^3$ , nos diferentes momentos (M0, M12 e M13) e a porcentagem de redução 80 dias após a aplicação de $\text{CaCl}_2$ 20% com DMSO 0,5% intratesticular em seis gatos .....	80
<b>Tabela 2</b> - Frequência absoluta das lesões histológicas encontradas 80 dias após a aplicação de $\text{CaCl}_2$ 20% com DMSO 0,5% intratesticular.....	81

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALH	Amplitude de Deslocamento Lateral da Cabeça
BCF	Frequencia de Batimento de Cauda
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de Cálcio
Conc.	Concentração
DMSO	Dimetilsulfoxido
EEJ	Eletroejaculação
FDA	US Food and Drug Administration
GnRH	Hormônio Liberador da Gonadotrofina
LIN	Linearidade
M/mL	Milhões por mL
Mot.	Motilidade
MP	Motilidade Progressiva
NaCl	Cloreto de Sódio
SMI	Índice de Motilidade
SPTZ	Espermatozóide
STR	Retilinearidade
SVI	Índice de Velocidade
TS	Túbulo Seminífero
V	Volts
VAP	Velocidade de Trajeto
VCL	Velocidade Curvelinear
VSL	Velocidade Linear
VT	Volume Testicular
VTT	Volume Testicular Total
WOB	Índice de Oscilação Espermática
HE	Hematoxilina e Eosina
C	Comprimento do Testículo
L	Largura do Testículo
E	Espessura do Testículo
CASA	<i>Computer Assisted Sperm Analyzer</i>
µL	Micro Litros
µg	Micro Gramas
CNR	<i>Catch, Neuter and Release</i>

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I</b> .....	11
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
<b>2.1. Controle Populacional</b> .....	14
2.1.1. <i>Castração química</i> .....	16
2.1.2. <i>Lesões histológicas testiculares produzidas por agentes esclerosantes</i> .....	20
<b>2.2. Termografia infravermelha</b> .....	22
<b>2.3. Avaliação da Dor Testicular em Felinos</b> .....	24
<b>2.4. Eletroejaculação em Felinos Domésticos</b> .....	25
<b>2.5. Avaliação Espermática</b> .....	28
<b>3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	31
<b>4. HIPÓTESES</b> .....	43
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	44
5.1. <b>Objetivo Geral</b> .....	44
5.2. <b>Objetivos Específicos</b> .....	44
<b>CAPÍTULO II</b> .....	45
<b>1. ARTIGO 1: AVALIAÇÃO TERMOGRÁFICA DA REAÇÃO INFLAMATÓRIA DOS TESTÍCULOS DE GATO APÓS A APLICAÇÃO DE NA<sub>2</sub>CO 0,9% E CA<sub>2</sub>CL<sub>2</sub> 20%</b> .....	46
<b>RESUMO</b> .....	46
<b>ABSTRACT</b> .....	47
<b>1.1. INTRODUÇÃO</b> .....	48
<b>1.2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	49
<b>1.3. RESULTADOS</b> .....	54
<b>1.4. DISCUSSÃO</b> .....	59
<b>1.5. CONCLUSÃO</b> .....	64

<b>1.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	66
<b>2. ARTIGO 2: EFEITOS DA CASTRAÇÃO QUÍMICA COM CaCl<sub>2</sub> 20% ASSOCIADO AO DMSO 0,5% EM GATOS: AVALIAÇÃO DA REAÇÃO INFLAMATÓRIA COM TERMOGRAFIA</b> .....	
<b>RESUMO</b> .....	70
<b>ABSTRACT</b> .....	71
<b>2.1. Introdução</b> .....	72
<b>2.2. Materiais e Métodos</b> .....	73
<b>2.3. Resultados</b> .....	79
<b>2.4. Discussão</b> .....	82
<b>2.5. Conclusão</b> .....	86
<b>2.6. Referências</b> .....	87
<b>ANEXO</b> .....	91
ANEXO A: Parecer do Comitê de Ética.....	91
<b>APÊNDICES</b> .....	92
APÊNDICE A: Volume aferido de cada testículo em cm <sup>3</sup> do experimento 1; Grupos NaCl e CaCl <sub>2</sub> ; e do experimento 2; CaCl <sub>2</sub> com DMSO 0,5%, antes e após a aplicação intratesticular, e a porcentagem de redução de cada testículo. ....	92
APÊNDICE B: Ficha utilizada para classificação histológica das lesões testiculares após a aplicação intratesticular de substâncias esclerosantes.....	93
APÊNDICE C: Escore da avaliação histológica dos testículos dos gatos 60 dias após aplicação intratesticular de NaCl 0,9%, CaCl <sub>2</sub> 20% com lidocaína 1% e 80 dias após a aplicação de CaCl <sub>2</sub> 20% com DMSO 0,5%. ....	94
APÊNDICE D: Dose do CaCl <sub>2</sub> (mL/cm <sup>3</sup> ) aplicado e a porcentagem de redução do volume testicular. ....	95



## CAPÍTULO I

## 1. INTRODUÇÃO

O número crescente de animais abandonados é uma grande preocupação mundial. Em vista da necessidade do manejo de populações errantes devido ao risco de zoonoses, contaminação ambiental e controle populacional visando o bem-estar animal, vários métodos de controle de natalidade em animais, estão sendo pesquisados e implementados.

Em muitos países, a eutanásia é aplicada como medida de controle populacional de animais abandonados (TASKER, 2006). A orquiectomia é uma alternativa irreversível para machos, e apresenta como vantagem a esterilização permanente e supressão dos hormônios andrógenos, porém é dispendiosa, maior risco anestésico, necessita de treinamento técnico, possui os riscos de complicação cirúrgica como dor, hemorragia, herniação, deiscência de pontos, e necessita de maior tempo de recuperação (KOGER, 1978).

Em contrapartida, agentes esclerosantes intratesticulares, são de fácil aplicação, provocam reações adversas mínimas, tempo de recuperação reduzido, exige pouco treinamento técnico, baixo custo e estão disponíveis no mercado. Esta técnica que tem o intuito de simplificar a rotina veterinária, e em vista disso, ganhou popularidade nesta última década (LISSNER, 2013; LEOCI, 2013; 2014b; LOPES; SILVA, 2014).

As substâncias esclerosantes mais utilizadas atualmente como castradores químicos são o cloreto de cálcio e o gluconato de zinco. Esses agentes prometem promover a interrupção da espermatogênese e androgênese por meio de lesões degenerativas e peroxidação lipídica dos túbulos seminíferos, das células germinativas e das células intersticiais ou de Leydig (JANA; SAMANTA, 2011).

Dentre as reações adversas mais comumente citadas está a intensa reação inflamatória e a fístula testicular. Na tentativa de minimizar esses efeitos indesejáveis, tem sido associado ou utilizado como veículo, substâncias químicas como a arginina, lidocaína, etanol e o DMSO (FAHIM et al., 1993; JANA, SAMANATA, 2011; LEOCI et al., 2014a; VANUCCI et al., 2015).

Com o objetivo de monitorar e quantificar a reação tecidual é indicado o uso da termografia infravermelha, que consiste em uma tecnologia que há muito tempo é empregada como auxílio no diagnóstico médico de afecções que produzem

alteração da vascularização, interferindo na temperatura regional como, tumores de mama, lesões inflamatórias musculares e varicocele testicular. É um método rápido, fácil, não invasivo, indolor e sem emissão de radiação nociva (DIAKIDES et al., 2012; MEIRA et al., 2014). Consiste em uma ferramenta objetiva e eficiente para diagnóstico da inflamação da área testicular (TIKTINSKIÍ et al., 1989).

Por não existir ainda estudos que utilizam o a termografia infravermelha na avaliação da reação inflamatória nos testículos de gatos e que institua protocolo clínico para o uso, este trabalho tem como objetivo avaliar a reação inflamatória ocasionada pela aplicação intratesticular de  $\text{CaCl}_2$  20% pela termografia, e adicionalmente a ação e eficácia desse composto no sistema reprodutivo pelo exame andrológico e avaliação histológica do testículo.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Controle populacional

A superpopulação animal é um problema mundial preeminente. Os gastos com programas de controle de natalidade e os prejuízos econômicos causados a sociedade são altos (BOWEN, 2008). A quantidade de animais abandonados em Londrina, entre cães e gatos, ultrapassa 30 mil animais (ANDA, 2012). Estima-se que a população global de gatos esteja em 600 milhões dos quais 100 milhões são ferais (McLAMB, 2013). De acordo com o IBGE (2013) e a OMS (2014), a população no Brasil é de 22 milhões de gatos domiciliados e 10 milhões abandonados.

No mundo, os animais são classificados em categorias de forma semelhante: domiciliado, aquele cujo guardião provém abrigo, alimentação e cuidados de saúde; animal da comunidade (ou semi-domiciliado), aquele que é cuidado por várias pessoas; e abandonado, aquele que foi abandonado ou nunca possuiu um guardião (ICAM, 2011). Muitos dos animais domiciliados são criados livres e perambulam pela cidade causando os mesmos transtornos que animais semi-domiciliados e abandonados.

A necessidade do controle da população de gatos surge em várias situações, quando o bem estar está comprometido no qual se apresentam como risco de saúde pública a humanos por transmissão de doenças ou contaminação ambiental, quando causam a perturbação de ordem pública (ex. lixões, acidentes automobilísticos, ataque a humanos, comportamento sexual e vocalizações noturnas), quando apresentam riscos a outros animais por meio de transmissão de doenças e quando representam ameaça à vida selvagem pela predação, principalmente à espécies ameaçadas de extinção (ICAM, 2011). Para redução dessas situações, é necessário um gerenciamento de controle populacional, vacinação e guarda responsável.

Nas Américas e na maioria dos países europeus, a eutanásia ainda é utilizada como forma de controle populacional, porém políticas vêm sendo implementadas na tentativa de manter o bem-estar animal (TASKER, 2006). O Brasil, República Tcheca, Grécia e Itália já proibiram a eutanásia de animais saudáveis, e estão realizando o CNR (*catch, neuter and release*; TASKER, 2006). Embora a expressão não tenha sido traduzida, significa captura dos animais que

perambulam pela cidade, implantação de uma medida que impeça a reprodução e soltura.

A escolha de um método de controle da fertilidade para o manejo de animais errantes é uma decisão complexa, pois inclui a aceitação social, o bem-estar animal, a eficácia, a legalidade, a viabilidade e a sustentabilidade (MASSEI; MILLER, 2013). Entre as alternativas de controle populacional, o método cirúrgico é o mais utilizado, embora haja outros como, hormonais (progestágenos e andrógenos), imunológicos (vacinas anti-GnRH e antígenos espermáticos), químicos que utiliza agonistas (deslorelina, nafarelina e acetato de leuprolida) e antagonistas do GnRH e agentes esclerosantes de aplicação testicular e epididimária (ACC&D, 2013; BUTTLER, 2015).

Dentre as vantagens da orquiectomia, ressalta-se a esterilização permanente e prevenção contra afecções como câncer testicular e hiperplasia prostática (JOHNSTON; RHODES, 2015), porém exige treinamento técnico, é dispendiosa e há necessidade de cuidados pós-operatórios.

Pesquisas atuais focam as atenções em um agente contraceptivo não cirúrgico, ideal por ser de fácil aplicação, baixo custo e reduzidas complicações pós cirúrgicas (ACC&D, 2013; LISSNER, 2013). A castração química com agentes intratesticulares esclerosantes, vem com a promessa de ser segura, permanente, efetiva, viável financeiramente, de aplicação única, podendo ser realizada em diversas espécies e nas campanhas de castração em massa (ACC&D, 2013; LISSNER, 2013; OLIVEIRA et al., 2013). Este agente pode seguramente ser utilizado no “CNR”, pois não há necessidade de cuidados pós cirúrgicos e os animais podem ser liberados logo após a recuperação anestésica.

No entanto, a abordagem de controle populacional e o método devem variar de acordo com a espécie e a situação, principalmente em se tratando de reduzir a fertilidade masculina, pois apesar das castrações químicas serem eficientes, alguns compostos podem causar respostas inflamatórias inaceitáveis e dolorosas (BOWEN, 2008).

O epitélio seminífero é muito sensível às influências adversas, e a degeneração testicular, geralmente, progride para atrofia e fibrose. A aplicação de substâncias irritantes nos testículos pode levar a inflamação e, conseqüentemente, a

subfertilidade, infertilidade ou esterilidade, condições que podem ser temporárias ou irreversíveis (JONES et al., 2000a; 2000b; NASCIMENTO; SANTOS, 2003).

### *2.1.1. Castração química intratesticular*

A castração química intratesticular é definida como a aplicação de substâncias químicas, via injeção, diretamente nos testículos ou epidídimo, causando degeneração testicular e esterilidade permanente (ACC&D, 2013). Estudos que relatam a eficiência, indicação, espécie alvo, local de aplicação (intra epididimária ou intratesticular) desses agentes esclerosantes, se iniciaram há mais de 30 anos.

Dentre os primeiros agentes utilizados descreve-se a clorexidina a 4,5% e clorexidina 3% associado ao DMSO 50% (PINEDA; HEPLER, 1981), gluconato de zinco em cães (FAHIM et al. 1993), em gatos (OLIVEIRA et. al., 2013; FAGUNDES et. al. 2014) e em urso (BRITO et al. 2011),  $\text{CaCl}_2$  em cães (JANA; SAMANTA, 2007), em gatos (JANA; SAMANTA, 2011), em coelhos (MORAES et al., 2011), em cabras (JANA et al., 2005) e em bovinos (KOGER, 1978), solução hipertônica de cloreto de sódio (20%) em bovinos (ANDRADE NETO, 2014), em ratos (KWAK; LEE, 2013) e cloreto de cádmio em cordeiros (LYMBEROPOULOS et al., 1999). Todos esses agentes possuem o mesmo propósito, causar lesão tecidual a ponto de interferir na espermiogênese e androgênese, causando azoospermia e diminuição da produção de hormônios andrógenos.

O primeiro fármaco a ser comercialmente produzido, foi o gluconato de zinco. Nos Estados Unidos é comercializado como Zeuterin™ e Testoblock®; no México, Colômbia, Bolívia, Panamá como Esterilsol®; e no Brasil como Infertile® (Rhubifarma Indústria Farmacêutica; MASSEI; MILLER, 2013). Em gatos, o Testoblock® causa azoospermia 60 dias após a administração intratesticular. Entretanto, foi notado que alguns animais voltaram a apresentar espermatozoides no ejaculado aos 120 dias (OLIVEIRA et. al., 2013). Em relação a testosterona, foi detectado queda de 94% da concentração sérica 120 dias após a sua aplicação (FAGUNDES et. al., 2014). Diante de uma possível reversibilidade da espermatogênese e a necessidade de uma segunda aplicação deste fármaco (VANUCCI et al., 2015), assim como os efeitos adversos indesejáveis e a indisponibilidade da medicação em muitos países do oriente, a solução de cloreto de

cálcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) está sendo amplamente pesquisada (JANA, 2005; 2006; 2007; 2011; BARAN et. al., 2010; MORAES et al., 2011; SILVA, 2012; LEOCI et. al., 2014a; 2014b) em diferentes espécies.

O  $\text{CaCl}_2$  é um agente esclerosante capaz de promover lesões degenerativas testiculares que levam a necrose e fibrose dos túbulos seminíferos, das células germinativas e das células intersticiais (Leydig), além da produção de radicais livres que promovem a peroxidação lipídica, acarretando em azoospermia permanente (SILVA, 2012; KUTZLER, 2015). Ainda que controversa, a diminuição da produção de testosterona (JANA; SAMANTA, 2007; 2011; LEOCI et. al., 2014a; 2014b). Essas alterações testiculares associadas a manutenção da testosterona a níveis basais causa queda da motilidade espermática, oligoespermia, necrospermia ou azoospermia (LEOCI et al. 2014b).

Nos cães e gatos, é importante manter a concentração de testosterona sérica em níveis basais para inibir a libido, o comportamento territorialista e a espermatogênese. Estudos com  $\text{CaCl}_2$  observaram que a diminuição da testosterona sérica e intratesticular a níveis basais é dose-dependente, e está correlacionada com as diminuições graduais da atividade testicular (JANA; SAMANTA, 2007). A manutenção da testosterona a níveis basais é considerada benéfica, pois a privação de hormônios andróglicos foi correlacionada com o aumento relativo de doenças em animais gonadectomizados como osteossarcomas, hemangiossarcomas, mastocitomas, displasia coxo femural e ruptura do ligamento cruzado cranial (COOLEY, et. al., 2002; SLAUTERBECK, et. al., 2004; VAN HAGEN, et. al., 2005; BRYAN, et. al., 2007; LA RIVA, et al., 2013).

Com uma única aplicação intratesticular e bilateral, o  $\text{CaCl}_2$  é efetivo, econômico e fácil de ser aplicado. Trata-se de um método de esterilização permanente, que não causa estresse crônico é uma alternativa simples a castração cirúrgica para os programas de controle de natalidade, podendo ser aplicado nas diversas espécies de mamíferos (JANA et al., 2005; JANA; SAMANTA, 2006; 2007; 2011; BARAN et. al., 2010; SILVA, 2012; LEOCI et. al., 2014a; 2014b).

O  $\text{CaCl}_2$  é uma substância de baixo custo e fácil manipulação. Muitos profissionais não se sentem seguros ao uso de novos fármacos devido a política e regulamentação de medicamentos tornarem a disponibilidade complicada, sendo que muitos processos são interrompidos pela falta de recursos (LISSNER, 2013).

Pesquisas têm explorado o uso do  $\text{CaCl}_2$  em cães e gatos, fornecendo base científica e segurança para o seu uso (BARAN et. al., 2010; JANA; SAMANTA, 2011; JANA, 2013; SILVA, 2012; LEOCI et. al., 2013; LEOCI et. al., 2014a; 2014b). E foi após Leoci et al. (2014a), comprovar a eficiência do  $\text{CaCl}_2$  20% diluído em etanol 96%, que esta substância conquistou a preferência das organizações promotoras de campanhas de controle populacional em massa e ganhou incentivo fiscal para seu registro. Há 8 meses, uma empresa canadense começou a disponibiliza – lo para o mundo todo, comercialmente conhecido como CaClCa<sup>®</sup>, (Alberta Inc., Alberta, Canada) garantindo seu baixo custo (U\$3,00 por cão de 20 Kg). Este produto é vendido apenas para veterinários e instituições de pesquisas (CaCLCa, 2016).

Quanto maior a concentração de  $\text{CaCl}_2$ , maior o dano tecidual, interrupção da produção de espermatozoides (BARAN et. al., 2010; LEOCI et. al., 2014b) e diminuição de testosterona, porém maior é a intensidade das reações adversas. Na concentração de 30 e 60%, pode ser observado desconforto no local da aplicação, marcada inflamação local e fístula testicular. Portanto, o uso de concentrações acima de 20% é contraindicado, pois na maioria das vezes as complicações requerem a remoção dos testículos e são difíceis de serem manejadas em animais errantes, tornando-se inviável (LEOCI et. al., 2014b).

A infertilidade causada pelo  $\text{CaCl}_2$  a 10 e 20% veiculado em solução de NaCl 0,9% ou em lidocaína 1% comprovadamente perdura por seis meses. Aos 12 meses, foi notado o reestabelecimento das concentrações séricas de testosterona e das atividades testiculares. Embora não tenha sido a concentração espermática suficiente para a reprodução, não foi possível assegurar a infertilidade (LEOCI et al., 2014a; 2014b).

A aplicação pode ser efetuada utilizando uma agulha 27G ½” acoplada a uma seringa de 1 mL. São descritos dois métodos para administração intratesticular em felinos (JANA; SAMANTA, 2011). O primeiro consiste na inserção da agulha diretamente no aspecto ventro-caudal, através do eixo longitudinal do testículo, 0,5 cm da cauda do epidídimo, em direção a porção cranial do órgão. A substância deve ser administrada cuidadosamente ao longo do testículo, por infiltração linear, conforme a agulha vai sendo retirada (JANA; SAMANTA, 2011). O segundo método é descrito por Oliveira et al. (2013), com a agulha inserida pelo eixo longitudinal do

testículo, sendo a injeção feita na parte cranial do testículo, próximo à cabeça do epidídimo.

O veículo utilizado nos castradores químicos também são alvos de pesquisas, pois sabe-se que o mesmo pode diminuir a quantidade de reações adversas e potencializar a ação do fármaco, conferindo melhor mecanismo de ação e infertilidade permanente (LEOCI et al., 2014a).

O etanol 95% como veículo para o  $\text{CaCl}_2$  20% é efetivo em conferir infertilidade por pelo menos 1,5 anos, inibir o comportamento sexual, não possui efeitos colaterais adversos, exceto reação inflamatória local e temporária, que pode ser notada em até 48 horas após a aplicação. Além de ser de fácil obtenção e financeiramente viável (LEOCI et al., 2013; 2014a).

O DMSO já foi estudado como veículo para o  $\text{CaCl}_2$  e também para o gluconato de zinco (SOTO et al., 2008; VANNUCCHI et al., 2015) por ser um ótimo solvente, e frequentemente utilizado em estudos biológicos. Devido as características físico-químicas da sua molécula  $[(\text{H}_3\text{C})_2\text{SO}]$ , apresenta grande capacidade de penetração e transporte de membranas (WILLSON et al., 1965; SANTOS, 2003). Também, possui potente ação anti-inflamatória, analgésica, e bacteriostática, interfere na deposição de colágeno nos tecidos, potencializa a ação de fármacos associados e promove vasodilatação (JACOB; HERSCHLER, 1986). Há relatos do uso deste composto de maneira tópica, intravenosa, subcutânea, intraperitoneal, oral, tópica, oftálmica, na vesícula urinária, nas mais diferentes espécies, por ser bem tolerado e apresentar baixa toxicidade (JACOB, 1967; 1986).

Reações adversas como reação inflamatória testicular intensa e dermatite escrotal, não são observadas quando o gluconato de zinco é associado ao DMSO, entretanto, estes animais permanecem com comportamento reprodutivo (libido) e há aumento da testosterona sérica, devido proliferação compensatória das células de Leydig após lesão testicular (VANNUCCHI et al. 2015). Esta associação promove uma profunda mudança morfológica e histológica do tecido testicular (OLIVEIRA et al., 2013; VANNUCCHI et al., 2015). Nos estudos em que o DMSO foi associado ao gluconato de zinco como veículo, não foram relatadas fístulas testiculares (SOTO et al., 2008; VANNUCCHI et al., 2015).

### 2.1.2. Lesões histológicas testiculares produzidas por agentes esclerosantes.

Os testículos são as gônadas masculinas responsáveis pela produção de espermatozoides pelos túbulos seminíferos (TS) durante a espermatogênese, sob estímulo da testosterona, produzidas pelas células de Leydig. Geralmente são órgãos ovais e o tamanho varia conforme a espécie. Na maioria dos animais estão localizados fora do abdome, na região inguinal, abrigados pelo escroto (COLVILLE, 2010) e em felinos, ventralmente ao ânus. As dimensões médias em gatos domésticos são de 1,5 cm de comprimento, 1 cm de largura e 1 cm de espessura (CARDILLI; MOSTACHIO, 2015).

A inflamação é a reação dos tecidos a um estímulo irritante. Trata-se de um processo dinâmico que tem início após uma lesão subletal ao tecido, a qual desencadeia uma série de eventos aleatórios e termina com a cura completa. Os sinais clínicos que caracterizam a inflamação são: calor, rubor, tumor, dor e perda da função (RINGLER, 2000).

O parênquima testicular é constituído de numerosos TS que abrigam vários estágios das células germinativas e espermatozóides (espermatogônia, espermatócito e espermátide) que são sustentadas pelas células de Sertoli. Entre os TS, há tecido conectivo frouxo chamado de tecido intersticial, e as células de Leydig (CUI, 2011). É um tecido muito sensível a agressões de organismos patogênicos, substâncias tóxicas, lesões mecânicas, térmicas e reações imunes (NASCIMENTO; SANTOS, 2003).

O efeito irritante dos produtos também tem grande importância, pois determina o grau de severidade e extensão da lesão (RINGLER, 2000). A intensidade e distribuição das lesões varia de acordo com a irritabilidade do agente promotor, as alterações iniciais consistem em edema e quantidades variáveis de necrose parenquimatosa. A fase de cura dos processos inflamatórios nos testículos é, invariavelmente, acompanhada por graus variáveis de fibrose e de infiltração por células inflamatórias mononucleares que, geralmente, resulta em oclusão e atrofia dos túbulos. Assim, promove-se a subfertilidade, infertilidade ou esterilização do animal. As células de Leydig proliferam em substituição as células destruídas, a fim de reestabelecer a produção da testosterona (JONES et al., 2000).

A atrofia testicular pode ocorrer como sequela de qualquer inflamação aguda ou crônica dos testículos (JONES et al., 2000).

Uma única aplicação de  $\text{CaCl}_2$  nas diferentes concentrações (5, 10 e 20%) promove diminuição gradual, dose dependente, do tamanho testicular. Quanto maior a concentração, maior a porcentagem de redução do tamanho testicular. Este composto causa lesões degenerativas severas tanto no TS como nas células intersticiais de Leydig (JANA; SAMANTA, 2011). Também foi relatado diminuição do volume testicular nos animais tratados com solução hipersaturada de Cloreto de Sódio (NaCl 20%) (EMIR et al., 2011) e gluconato de zinco (13,1 mg/mL) (OLIVEIRA et al., 2013).

Estudos que utilizaram solução de Cloreto de Sódio 0,9% no grupo controle não relataram alteração na histologia testicular (LYMBEROPOULOS et al., 1999; JANA; SAMANTA, 2007; 2011; EMIR, 2008; 2011; LEOCI et al., 2014 ab; FAGUNDES et al., 2014).

A administração de  $\text{CaCl}_2$  a 5% foi capaz de causar dano no tecido de forma desigual, como atrofia dos túbulos seminíferos e dissolução das células germinativas. Alguns túbulos apresentaram eliminação de todas as células germinativas, restando apenas as espermatogônias e células de Sertoli (JANA; SAMANTA, 2011). Entretanto, nesta concentração, pode ser notada regeneração dos TS dois meses após a aplicação (LEOCI et al., 2014a).

O cloreto de cádmium causou degeneração da maioria das células dos TS de maneira não uniforme no parênquima, foram notadas regiões de TS normais, levemente degenerados a desorganização da estrutura arquitetônica e necrose, houve edema do tecido intersticial, porém as células de Leydig não sofreram alterações evidentes (LYMBEROPOULOS et al., 1999).

O gluconato de zinco (26,2 mg/mL) associado a DMSO 0,5% causa atrofia da maioria dos TS com poucas ou ausência células das germinativas basais no epitélio seminífero. O tecido intersticial apresenta formações tubulares hialinizadas, células degeneradas encapsuladas e células inflamatórias. As células de Leydig formaram aglomerados cercados de colágeno (VANNUCCHI et al., 2015). Quando injetado na cauda do epidídimo provocou a atrofia dos túbulos seminíferos e rede testicular, formação de tecido cicatricial além de provocar enrolamento da cabeça e corpo do epidídimo (FAHIM et al. 1993). É possível que o gluconato de zinco cause lesões mais severas nos túbulos seminíferos de felinos que de caninos (OLIVEIRA et al., 2013).

Pesquisas que utilizaram  $\text{CaCl}_2$  a 10% e  $\text{NaCl}$  20% relatam necrose coagulativa no epitélio seminífero e espaço intersticial com degeneração e coagulação das células germinativas em combinação com a presença de tecido tubular e intersticial fibrosado em cães e gatos (JANA; SAMANTA, 2007; 2011). Já na concentração a 15%, promoveu necrose total dos túbulos seminíferos e células de Leydig e a substituição do tecido por uma banda fibrocolágena, com completo desarranjo da arquitetura tubular e infiltração leucocitária (JANA; SAMANTA, 2007).

A concentração de 20% de  $\text{CaCl}_2$  foi capaz de produzir necrose testicular completa de todo epitélio germinativo, com fibrose e hialinização do tecido. Também provoca desarranjo da arquitetura tubular com a perda da diferenciação entre os tecidos testiculares nas espécies canina e felina (JANA; SAMANTA, 2007; 2011). Necrose massiva cercada de tecido conectivo fibroso e calcificação periférica ocorreu com  $\text{CaCl}_2$  a 30%. Adicionalmente, houve deposição dispersa de cálcio na periferia do testículo, enquanto no tecido remanescente ocorreu degeneração tubular severa. A concentração máxima testada foi de 60%, na qual foi possível verificar muitas áreas necrosadas rodeadas por granulomas espessos. O parênquima restante foi constituído de túbulos seminíferos severamente degenerados cercado por fibrose intersticial difusa, também houve depósitos abundantes de cálcio e áreas hemorrágicas (LEOCI et al., 2014b).

## **2.2. Termografia Infravermelha**

A imagiologia médica começou com a aplicação do raio-X na visualização interna de partes do corpo, em especial, a estrutura óssea. Com os avanços da ciência e da tecnologia, muitas técnicas de diagnóstico por imagem, foram descobertas, incluindo a imagem termográfica ou termografia por infravermelhos, uma técnica digital que gera imagens bidimensionais referentes a dados fisiológicos, os quais tornam possível a localização da área afetada, extensão de uma lesão ou estado patológico (MEIRA et al., 2014).

Infravermelho são ondas de comprimento muito curto (0,8 a 1000  $\mu\text{m}$ ), e, portanto, não visíveis aos olhos humanos. No espectro de luz, está localizada após a luz vermelha. Não pode ser vista, mas pode ser notada em forma de calor. É classificada como fótons (radiação eletromagnética) na mesma categoria que as visíveis, microondas, ultravioleta, raio-X e raios gama (BOSCHETTI, 2000).

Estes e demais métodos espectroscópicos modernos como a ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia na região do ultravioleta–visível (UV-VIS) e espectrometria de massas (EM) constituem os principais recursos para a identificação e elucidação estrutural de substâncias orgânicas (LOPES; FASCIO, 2004).

Todos os objetos com a temperatura acima de zero absoluto (0 Kelvin = -273,15°C) emitem radiação infravermelha de sua superfície (BOUZIDA et al., 2009). Para o registro da temperatura, a termografia utiliza essencialmente a radiação infravermelha natural emitida pela superfície da pele, e fornece medidas objetivas da mudança de temperatura que são clinicamente significativa (RING; AMMER, 2012). Quanto mais alta a temperatura do objeto maior será a radiação infravermelha emitida. As câmeras termográficas permitem a visualização não possíveis aos olhos. Os sensores geram imagens de alta resolução e permitem definir, por meio de mapeamento térmico, o estado fisiológico do tecido ou órgão examinado, a qual pode contribuir para o diagnóstico médico com medições precisas (PRASAL et al., 2010; RING; AMMER, 2012; MEIRA et al., 2014).

A termografia consiste em um método de avaliação objetiva com abordagem não invasiva, indolor, sem contato físico, não ionizante, segura tanto para o paciente quanto para o avaliador. Pode ser usada para o diagnóstico e acompanhamento de muitos distúrbios (JIANG et al., 2005; LEE et al., 2007; MEIRA et al., 2014). É a técnica mais efetiva para o estudo da distribuição da temperatura da pele, principalmente para o diagnóstico de distúrbios inflamatórios (RING; AMMER, 2012), por se tratar de uma alteração onde há variação do fluxo sanguíneo (JIANG et al., 2005).

Pesquisas conduzidas em humanos e animais, há mais de 50 anos, tem demonstrado a correlação entre os padrões de temperatura e condições médicas. Em vista disso, termografia infravermelha foi aprovada em 1982 pelo *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) como técnica suplementar na detecção de neoplasias mamárias (AKSENOV et al., 2003).

Na medicina, iniciou-se com a investigação do câncer de mama, e hoje em dia é também empregada no diagnóstico de outras neoplasias (ZHANG et al., 2014), de doenças articulares e musculares (RING; AMMER, 2012), na avaliação de pacientes com risco de doenças do sistema circulatório (HUANG et al., 2011),

diagnóstico de afecções testiculares (GAROLLA, et al.,2015; KULIS, et al., 2011), entre outras inúmeras aplicações. Na medicina veterinária, é utilizada para localização, diagnóstico e prognóstico de lesões de músculos e tendões, e doenças inflamatórias articulares de equinos e injúrias em animais atletas (ARRUDA, 2010; ÇETİNKAYA, M. A.; DEMİRUTKU, 2012), na correlação da temperatura testicular em bovinos e produção espermática (LUSTRA; COULTER, 1993; RUEDIGER et al., 2014), na detecção do cio em porcas (SCOLARI et al., 2010), neoplasia mamária em cadelas (REIS et al., 2010), entre outros.

Apesar de existir a décadas, seu uso está sendo reconsiderado pela classe médica nos últimos anos, devido aos avanços tecnológicos no processamento das imagens (DIAKIDES et al., 2012), ao desempenho dos novos equipamentos, a padronização da técnica e ao estabelecimento de protocolos clínicos (RING; AMMER, 2012).

O interesse das áreas médicas pela termografia é justificado pelo fato de que tal técnica poder ter uma aplicação para fins de diagnósticos, prognósticos e monitoramento (ARTHUR, 2011). Em perspectivas futuras, é uma técnica adicional de grande utilidade na área biomédica (MEIRA et al., 2014).

A temperatura emitida pela pele depende de fatores analisados, como a temperatura ambiente, contato prévio com superfícies, variação individual da temperatura e oscilação diária de cada animal (AGARWAL-KOZLOWSKI et al., 2014). Em animais, é muito importante considerar para essa emissividade, a presença e comprimento dos pelos. Não há um padrão definido para temperatura da área testicular de um gato.

Os sinais clínicos de orquite e epididimite estão associados a intensidade da assimetria térmica medidos na termografia infravermelha, e podem ser precocemente detectadas por estas imagens em humanos. A acurácia da termografia para diagnóstico de inflamação testicular é de 100% (TIKTINSKIĬ et al, 1989).

### **2.3. Avaliação da dor testicular em felinos**

Em vista do questionamento da sociedade a esta técnica e a manutenção do bem-estar animal após a administração de substâncias intratesticulares, a sensação dolorosa e outras reações adversas são exaustivamente exploradas em estudos de

castração química (JANA; SAMANTA, 2007; 2011; OLIVEIRA et al., 2013; LEOCI et al., 2014a).

Devido a localização das terminações nervosas na pele do escroto, na capsula testicular e no parênquima epididimário, a dor referida neste procedimento é pelo ato de atravessar a pele e a cápsula, e variável conforme o aumento da pressão nas terminações nervosas testiculares. Dessa maneira, visando minimizar o estímulo, recomenda-se que a aplicação seja feita lentamente, para que esse “gatilho não seja disparado” (JANA; SAMANTA, 2011; LEOCI et al., 2014a).

Estudos em cães, e outras espécies com  $\text{CaCl}_2$ , relataram leve desconforto do animal logo após a aplicação do agente químico, relacionado ao volume injetado. Após a aplicação, foi observado aumento da consistência do tecido testicular e edema em até 48 horas após o procedimento, com remissão progressiva (JANA et al., 2005; JANA; SAMANTA, 2007; LEOCI, 2014b).

A dor é uma experiência multidimensional e envolve componentes sensoriais e emocionais (ROBERTSON, 2005). Trata-se de uma experiência individual, o que a torna difícil de ser avaliada. Em pacientes que não verbalizam, é utilizado a análise do comportamento, o que é complexo, pois há variações espécie-específicas para resposta da dor e até mesmo variação individual (ROBERTSON, 2005; MATHEWS et al, 2014). A mensuração do cortisol e catecolaminas plasmáticas está correlacionada com dor aguda em felinos, porém os mesmos podem ser influenciados por outros fatores como ansiedade, estresse, medo e alguns fármacos (MATHEWS et al, 2014).

A despeito das pesquisas, a mensuração de dor em felinos pode ser feita utilizando escalas dinâmicas e interativas que são baseadas na observação do comportamento e palpação do local cirúrgico/lesionado é considerada técnicas clínicas simples, porém valiosas (ROBERTSON, 2005; BRONDANI et al., 2012).

#### **2.4. Eletroejaculação em felinos domésticos (EEJ)**

A colheita do sêmen permite obter material para análise da fertilidade do macho, inseminação artificial, congelamento para preservação do material genético e pesquisa (HERRON et al., 1986; ZAMBELLI; CUNTO, 2006).

Em felinos, a colheita de sêmen pode ser realizada por vagina artificial, porém, a eletroejaculação (EEJ) é o método de escolha para essa espécie. Outras

técnicas tais como a farmacológica, a lavagem vaginal pós coito e a recuperação da cauda do epidídimo após orquiectomia são descritas (ZAMBELLI; CUNTO, 2006; ZAMBELLI et al., 2010; FILLIERS et al., 2010; MARTINS et al., 2015).

A função ejaculatória normal é um fenômeno primariamente simpático. Consiste em uma complexa e coordenada sequência de contrações musculares estriadas e não estriadas que leva à emissão e à expulsão dos espermatozoides em sentido anterógrado (UTIDA et al., 2004). Em felinos, a ejaculação retrógrada é um componente do processo ejaculatório, que embora seja comum, pode haver perda parcial ou total do ejaculado (ZAMBELLI; CUNTO, 2006).

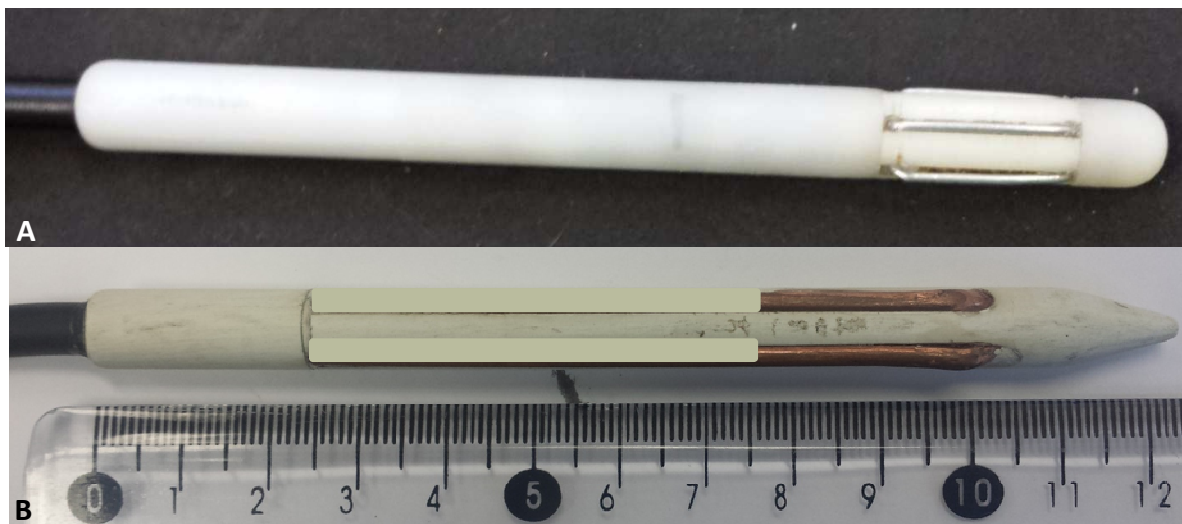
A EEJ é o método de obtenção de sêmen por estímulos elétricos produzidos pelo eletroejaculador e conduzidos por eletrodos (Figura 1) inseridos no reto. A eletroejaculação é uma palavra consagrada pelo uso. Nesse processo, o sêmen raramente ou nunca é ejaculado, uma vez que não há contrações dos músculos estriados da uretra. Nesse método, o sêmen é emitido pelo meato urinário externo e uretra (BRINDLEY, 1981).

As vantagens desse método são que não precisa do estímulo de uma fêmea no cio ou de treinamento prévio do animal, podendo ser aplicado em qualquer macho em idade reprodutiva. Possui como desvantagem, o custo alto da aparelhagem (RIJSSELAERE; VAN SOOM, 2010), a necessidade de submeter o animal a anestesia geral, a contaminação com urina e a retroejaculação (MARTINS et al., 2015).

A técnica da EEJ consiste na introdução de uma probe composta por eletrodos na porção caudal do reto do animal, os quais são posicionados sobre a próstata (UTIDA et al., 2004; MARTINS, et al. 2015), onde a aplicação da estimulação elétrica sequencial ocorre diretamente nas fibras eferentes simpáticas do nervo hipogástrico, pela parede do reto. A técnica deve ser bem aplicada para que haja estimulação das fibras nervosas corretas (UTIDA et al., 2004).

As probes utilizadas para os estímulos elétrico são muito semelhantes dentre as espécies, variando principalmente o comprimento e diâmetro, de acordo com o porte do animal (ZAMBELLI; CUNTO, 2006; MARTINS et al., 2015). Para felinos domésticos a probe utilizada tem 12 cm de comprimento, 1 cm de diâmetro e três eletrodos longitudinais (1,5 mm x 5 cm) dispostos ventralmente (AXNÉR et al., 1996).

Figura 1: Probes utilizadas para eletroejaculação de gatos. (A) Probe com 3 eletrodos ventrais de aproximadamente dois cm de comprimento e 0,3 cm de espaço entre si; (B) Probe com 2 eletrodos ventrais de 8 cm de comprimento, com 0,5 cm de espaço entre si.



Há uma variação na quantidade de estímulos elétricos e na voltagem utilizada. Os estímulos podem variar de 1 (9-12 mA) a 8 Volts (90-150 mA), conforme descrito na literatura (DOOLEY et al, 1983; CARTER, et al., 1984; HOWARD et al., 1990). Estímulos de 4 e 8 Volts, apresentam maior quantidade de espermatozoides no ejaculado, porém estímulos acima de 5 v podem resultar em contaminação por urina (ZAMBELLI; CUNTO, 2006). O protocolo mais utilizado foi proposto por Howard et al. (1990), que consiste em três séries de 30, 30 e 20 estímulos variando de 2 a 5 V. Cada série é intervalada por dois a três minutos de descanso. Para cada estímulo, o gato responde com uma extensão rígida dos membros pélvicos. Caso esta reação não seja notada com estímulos de 2 V ou maiores, é possível que a probe não esteja na posição correta ou que haja interferência de fezes (AXNÉR; LINDE-FORSBERG, 2002).

O uso do cateter na uretra facilita a manipulação e colheita de pequenos volumes de sêmen (HERRON et al., 1986). Em gatos, o volume varia de 30 a 300  $\mu$ L e de 3 a 160 milhões de espermatozoides por ejaculado (AXNÉR; LINDE-FORSBERG, 2007). Há uma relação com o aumento do volume (JOHNSTONE, 1984), concentração, quantidade de espermatozoides normais, integridade de

membrana e motilidade, na estação de acasalamento (verão e outono) (NUÑEZ FAVRE et al., 2012).

Na literatura estão descritos diferentes protocolos anestésicos utilizados na EEJ de felinos, e o fármaco mais comumente utilizado é o cloridrato de cetamina (PLATZ JR; SEAGER, 1978) associada a outros fármacos como medetomidina (RIJSSELAERE; VAN SOOM, 2010), xilazina (MORAIS et al., 2002), diazepam e derivados de fenotiazínicos (SILVA et al., 2002) ou não. Ainda há descrito protocolos que utilizam tiletamina e zolazepam (MORAIS et al., 2002; TEBET et al., 2006) associação com butorfanol, morfina, acepromazina ou não (TEBET et al., 2006), propofol e buprenorfina (CHATDARONG et al., 2006) ou anestesia inalatória também já foram descritos (SILVA et al., 2004). Uma analgesia inadequada, não permite que o protocolo de EEJ seja realizado, comprometendo a colheita.

A combinação da cetamina com um  $\alpha$ -adrenérgico tem efeito sedativo e analgésico, agindo no sistema nervoso central, promovendo relaxamento muscular (SILVA et al., 2002). Altas doses de  $\alpha$ -adrenérgicos promovem ereção peniana e ejaculação em algumas espécies devido a contração do ducto deferente induzida pelos  $\alpha$ -adrenoceptores (MACDONALD; MCGRATH, 1980; ZAMBELLI, et al., 2008). Estes fármacos, também participam da contração do trígono e esfíncter urinário durante ejaculação (MACDONALD; MCGRATH, 1980). Devido a esse potencial, a colheita de sêmen após a administração de medetomidina permite obter ejaculados com maior concentração de espermatozoides, que os anestesiados apenas com cetamina (ZAMBELLI et al., 2007).

Souza et al. (2009) e Jiménez et al. (2011) relatam variação significativa da motilidade do sêmen fresco frente aos diversos protocolos anestésicos.

Após a colheita, as características do sêmen devem ser imediatamente analisadas, como concentração, morfologia e parâmetros cinéticos. As características do eletroejaculado diferem de animal para animal (HOWARD et al., 1990).

## **2.5. Avaliação espermática**

Para o estudo dos parâmetros cinéticos espermáticos tem-se utilizado principalmente a análise espermática computadorizada (Computer-Assisted Sperm Analysis - CASA), reduzindo a subjetividade da avaliação (STACHECKI et al., 1993;

BORYSHPOLETS et al., 2013; AMANN; WABERSK, 2014). Para análise morfológica, são descritos na literatura vários métodos de fixação e coloração da lâmina. Mesmo assim, a análise do ejaculado de gatos é complicada devido ao seu baixo volume (AXNÉR; LINDE–FORSBERG, 2007).

A teratospermia (>60% espermatozoides anormais por ejaculado) é relativamente comum entre as várias espécies da família dos felídeos. Animais teratospérmicos são mais sensíveis a criopreservação, possuem a reação de capacitação acrossômica comprometida e, conseqüentemente, a capacidade de penetrar na zona pelúcida (PUKAZHENTHI et al., 2006), por isso, apresentam uma taxa menor de penetração na zona pelúcida quando comparados com normospérmicos (HOWARD et al., 1993). Em contrapartida, devido ao comportamento reprodutivo desta espécie, com diversas cópulas e ovulação induzida, compensa-se a baixa porcentagem de espermatozoides normais (AXNÉR; LINDE–FORSBERG, 2007).

Dentre os fatores que influenciam a qualidade do ejaculado, cita-se a nutrição (PUKAZHENTHI et al., 2006), a sazonalidade e a família/raça do animal (AXNÉR; LINDE–FORSBERG, 2007). O número de espermatozoides normais é relativamente maior na estação reprodutiva. Nos animais da mesma família/raça, a teratospermia ocorre devido a endogamia (AXNÉR; LINDE–FORSBERG, 2007). Em geral, e entre as várias espécies de felinos, o problema estrutural das células espermáticas mais observado é da peça intermediária dobrada com ou sem gota citoplasmática. Altas proporções de defeitos de cabeça, acrossoma e defeitos de cauda também são citados (AXNÉR; LINDE–FORSBERG, 2007; PUKAZHENTHI et al., 2006).

Estudos indicam a correlação entre os diferentes parâmetros seminais do gato e a fertilidade. Devido aos diferentes usos de fixação e coloração, e pela avaliação morfológica ser subjetiva, é difícil fazer uma comparação significativa entre as publicações (AXNÉR; LINDE–FORSBERG, 2007).

Não há um consenso que determine os valores mínimos dos parâmetros avaliados para uma fertilidade normal em condições naturais em gatos (AXNÉR; LINDE–FORSBERG, 2002), entretanto, há diversos relatos na literatura dos parâmetros variáveis encontrados nas análises do sêmen felino obtido pela eletroejaculação. Para o volume, há relatos de 30 até 700  $\mu\text{L}$ ; para concentração, 9

a  $319 \times 10^6$  espermatozoides por ejaculado e 168 a  $361 \times 10^6$  espermatozoides/ mL; motilidade de 56 a 84%; motilidade progressiva de 58 a 84% (PLATZ; SEAGER, 1978; AXNER; LINDE-FORSBERG, 2002; 2007; ZAMBELLI; CUNTO, 2006; PUKAZHENTHI et al., 2006). Para espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo a literatura cita 287,7 e 300.66 para o índice de motilidade; 281 e 327.71 para o índice velocidade (PARANZINI et al., 2014; 2015); 71% para o índice de oscilação (PARANZINI et al., 2015).

A fertilidade está diretamente relacionada com a quantidade de defeitos espermáticos. Interferências na espermiogênese/espermatogênese, podem ser temporárias, ou definitivas, dependendo da agressão sofrida pelos testículos. (AXNÉR; LINDE-FORSBERG, 2007).

A motilidade do ejaculado pode ser afetada por espermatozoides morfologicamente alterados (LUVONI et al, 2003). Outros parâmetros de cinética fornecidos pelo CASA são sub utilizados para avaliação da fertilidade devido à falta de padronização dos valores para o ponto de corte e falta de referência dos intervalos aceitáveis (RANGANATHAN et al., 2001).

### 3. REFERÊNCIAS\*

ACC&D ALIANCE FOR CONTRACEPTION IN CATS AND DOGS. Contraception and Fertility Control in Dogs and Cats. Informação e documentação eletrônica. 2013. Disponível em <<http://www.acc-d.org/docs/default-source/Resource-Library-Docs/accd-e-book.pdf?sfvrsn=0>> Acesso em: 22 nov. 2015.

AGARWAL-KOZLOWSKI, K., LANGE, A.; BECK, H. Contactfree Infrared Thermography for the Determining “Normal Skin Temperature” in 50 Healthy Proband. Pan American Journal of Medical Thermology, Brasil, v.1, n.1, p. 43-49, 2014.

AKSENOV, P.; CLARK, I.; INMAN, A.; VARTIKOVSKI, L.; NEBEL, J. C. 3D Thermography for the quantification of heatgeneration resulting from inflammation. Proceedings 8th 3D Modelling Symposium, Paris, France, 2003.

AMANN, R. P.; WABERSKI, D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. Theriogenology, v.81, n.1, p.5-17, jan. 2014.

ANDA – AGÊNCIA DE NOTÍCIAS DOS DIREITOS DOS ANIMAIS. Vítimas da indiferença: Cerca de 30 mil animais estão abandonados nas ruas de Londrina (PR), segundo ONG. Informação e documentação eletrônica. 2012. Disponível em <<http://www.anda.ior.br/07/01/2012/cerca-de-30-mil-animais-estao-abandonados-nas-ruas-de-londrina-pr-segundo-ong>> Acesso em: 31 jan. 2016.

ANDRADE NETO, O. A. Intratesticular hypertonic sodium chloride solution treatment as a method of chemical castration in cattle. Theriogenology, v.82, n. 7, p. 1007 – 1011, out. 2014.

Arruda, T.Z. Avaliação termográfica de selas usadas em cavalos de salto. 2010. 43f. Dissertação de mestrado - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria RS. 2010.

ARTHUR, D. T.; KHAN, M. M. Thermal infrared imaging: toward diagnostic medical capability. [set.2011]. Boston: Publisher IEEE. In Engineering in Medicine and Biology Society, EMBC, 2011 Annual International Conference of the IEEE, vol., no., pp.6146-6149, set. 2011

AXNÉR, E.; LINDE–FORSBERG, C. Semen collection and assessment, and artificial insemination in the cat. In: CONCANNON, P.W.; ENGLAND, G.; VERSTEGEN, J.; LINDE-FORSBERG, C. Recent Advances in Small Animal Reproduction. International Veterinary Information Service, Ithaca, New York, USA. Jul. 2002.

AXNÉR, E.; LINDE-FORSBERG, C. Sperm Morphology in the Domestic Cat, and its Relation with Fertility: A Retrospective Study. *Reproduction in Domestic Animal*, v.32, n.3, p. 282-291, jun. 2007.

AXNÉR, E.; STRÖM, B.; LINDE-FORSBERG, C. Sperm morphology is better in the second ejaculate than in the first in domestic cats electroejaculated twice during the same period of anesthesia. *Theriogenology*, v.47, n.4, p.929-934, mar. 1997.

BARAN, A.; OZDAS, O. B.; HAMZAOGLU, A. I.; TONGUC, M. Pilot Study: Intratesticular Injection Induces Sterility in Male Cats. In: *International Symposium on Non-Surgical Contraceptive Methods of Pet Population Control*. 4. Dallas, TX. 2010.

BORYSHPOLETS, S.; KOWALSKI, R.K.; DIETRICH, G. J.; DZYUBA, B.; CIERESZKO, A. Different computer-assisted sperm analysis (CASA) systems highly influence sperm motility parameters. *Theriogenology*, v.80, n.7, p.758-765, out. 2013.

BOSCHETTI, C. Detectores de infravermelho: Princípios e Caracterização. LAS – Laboratório Associado de Sensores e Materiais, INPE – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, 2000. Disponível em: <http://www.las.inpe.br/~cesar/Infrared/detedor/detectores.pdf> Acesso em: 12 dez. 2015

BOUZIDA, N.; BENDADA, A.; MALDAGU, X. P. Visualization of body thermoregulation by infrared imaging. *Journal of Thermal Biology*, v.34, n.3, p.120-126, abr. 2009.

BOWEN, R. A., Male contraceptive technology for nonhuman male mammal. *Animal Reproduction Science*, Colorado, USA, v.105, n.1-2, p.139 -143, abr. 2008.

BRINDLEY, G. S. Electroejaculation: its technique, neurological implications and uses. *J Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, v.44, n.1, p.9-18, jan. 1981.

BRITO, L. F. C.; SERTICH, P. L.; RIVES, W.; KNOBBE, M., DEL PIERO, F.; STULL, G. B. Effects of intratesticular zinc gluconate treatment on testicular dimensions, echodensity, histology, sperm production, and testosterone secretion in American black bears (*Ursus americanus*). *Theriogenology*, v.75, n.8, p.1444 –1452, mai. 2011.

BRONDANI, J.T.; LUNA, S.P.L.; MINTO, B.W.; SANTOS, B.P.R.; BEIER, S.L.; MATSUBARA, L.M.; PADOVANI, C.R., Validade e responsividade de uma escala multidimensional para avaliação de dor pós-operatória em gatos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.64, n.6, p.1529-1538, dez. 2012.

BRYAN JN, KEELER MR, HENRY CJ, BRYAN ME, HAHN AW, CALDWELL CW. A population study of neutering status as a risk factor for canine prostate cancer. *Prostate*, v.67, n.11, p.1174-1181, ago. 2007.

BUTTLER, E. A. P. Métodos contraceptivos. In: APPARÍCIO, M.; VICENTE, W. R. R. Reprodução e obstetrícia em cães e gatos. São Paulo: Ed. MedVet, 2015. Cap 26. p. 333 - 344.

CaCLCa. Calcium Chloride Castration. 2016. Disponível em: <<http://www.calciumchloridecastration.com/>> Acesso em: 08 jan. 2016

CARDILLI, D. J.; MOSTACHIO, G. Q. Anatomia do sistema genital masculino. In: APPARÍCIO, M.; VICENTE, W. R. R. Reprodução e obstetrícia em cães e gatos. São Paulo: Ed. MedVet, 2015. Cap 5. p. 31.

CARTER, K. K.; CHAKRABORTY, P. K.; BUSH, M.; WILDT, D. E. Effects of electroejaculation and ketamine-HCl on serum cortisol, progesterone, and testosterone in the male cat. *Journal of Andrology*, v.5, n.6, p.431-437, nov. 1984.

ÇETİNKAYA, M. A.; DEMİRUTKU, A. Thermography in the assessment of equine lameness. *Turkey Journal of Veterinary Animal Science*, v.36, n.1. p.43-48, 2012.

CHATDARONG, K.; PONGLOWHAPAN, S.; MANEE-IN, S.; PONGPHE, K. The use of propofol for electroejaculation in domestic cat. *Theriogenology*, v.66, n.6-7, p. 1615-1617, out. 2006

COLVILLE, T. O sistema reprodutivo. In: COLVILLE, T.; BASSERT, J. M. Anatomia e Fisiologia clínica para medicina veterinária. Rio de Janeiro: Elsevier. 2010. Cap 17. p. 387-404.

COOLEY DM, BERANEK BC, SCHLITTLER DL, GLICKMAN NW, GLICKMAN LT, WATERS DJ. Endogenous gonadal hormone exposure and bone sarcoma risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, v.11, n.11, p.1434–40, nov. 2002.

CUI, D. Male reproductive system. In: \_\_\_\_ Atlas of histology : with functional and clinical correlations. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2011. Cap 18, p. 344-368.

DIAKIDES, M.; BRONZINO, J. D.; PETERSON, D. R. Medical Infrared Imaging: Principles and Practices. Livro. CRC press. Boca Raton, FL, 448p. 2012.

DOOLEY, M.P.; MURASE, K.; PINEDA, M. H. An electroejaculator for the collection of semen from the domestic cat. *Theriogenology*, v. 20, n.3, p. 297-310, set. 1983.

EMIR, L.; DADALI, M.; SUNAY, M.; EROL, D.; CAYDERE, M.; USTÜN, H. Chemical castration with intratesticular injection of 20% hypertonic saline: A minimally invasive method. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, v.26, n.4, p.392-396. 2008.

EMIR, L.; SUNAY, M.; YALBUZDAĞ, O.; KARAKAYA, Y.; EROL, D. Hormonal and pathologic changes after chemoablation of testes with hypertonic saline solution as a treatment method alternative to orchiectomy in patients with hormone sensitive

metastatic prostatic cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, v.29, n.2, p.212-217. 2011.

FAGUNDES, A. K. F.; OLIVEIRA, E. C. S.; TENÓRIO, B. M.; MELO, C. C. S.; NERY, L. T. B.; SANTOS, F. A. B.; ALVES, L. C.; DOUGLAS, R. D.; SILVA JR, 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*, v.81, n.2, p. 230–236, jan. 2014.

FAHIM, M.S.; WANG, M.; SUTCU, M.F.; FAHIM, Z.; YOUNGQUIST, R.S. Sterilization of dogs with intra-epididymal injection of zinc arginine. *Contraception* v.47, n.1, p.107– 122, jan.1993.

FILLIERS, M.; RIJSSELAERE, T.; BOSSAERT, P.; ZAMBELLI, D.; ANASTASI, P.; HOOGEWIJS, M.; VAN SOOM, A. In vitro evaluation of fresh sperm quality in tomcats: A comparison of two collection techniques. *Theriogenology*, v.74, n.1, p.31-39, jul. 2010.

GAROLLA, A.; TORINO, M.; MIOLA, P.; CARETTA, N.; PIZZOL, D.; MENEGAZZO, M.; BERTOLDO, A.; FORESTA, C. Twenty-four-hour monitoring of scrotal temperature in obese men and men with a varicocele as a mirror of spermatogenic function. *Human reproduction*, v.30, n.5, p.1006-1013, mai. 2015.

GERSHON-COHEN, J.; HABERMAN-BRUESCHKE, J. D.; BRUESCHKE, E. E. Medical thermography: A summary of current status. *The Radiologic Clinics of North America*, v. 3, n. 3, p. 403-431, dec.1965.

HERRON, M. A.; BARTON, C. L.; APPLGATE, B. A modified technique for semen collection by electroejaculation in the domestic cat. *Theriogenology*, v.26, n.3, p. 357 – 364, jul. 1986.

HOWARD, J. G. Semen collection and analysis in nondomestic carnivores. In: FOWLER, M. E. *Zoo and Wildlife Medicine III*. Philadelphia: WB Saunders Co., 1993. pp. 390–399.

HOWARD, J. G.; BROWN, J. L.; BUSH, M.; WILDT, D. E. Teratospermic and Normospermic Domestic Cats: Ejaculate Traits, Pituitary-Gonadal Hormones, and Improvement of Spermatozoal Motility and Morphology After Swim-Up Processing. *Journal of Andrology*, v.11, n. 3, mai. 1990.

HUANG, C. L.; WU, Y. W.; HWANG, C. L.; JONG, Y. S.; CHAO, C. L.; CHEN, W. J.; WU, Y. T.; YANG, W.S. The application of infrared thermography in evaluation of patients at high risk for lower extremity peripheral arterial disease. *Journal of vascular surgery*, v.54, n.4, p. 1074-1080, out. 2011.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa Nacional de Saúde 2013. Informação e documentação eletrônica. 2013. Disponível

em:<[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/pns/2013\\_vol2/default.shtm](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/pns/2013_vol2/default.shtm)>  
Acesso em: 31 jan. 2016

ICAM, 2011. International Companion Animal Management Coalition. 2011. Humane cat populationmanagement guidance. Disponível em:  
<<http://www.ifaw.org/international/resource-centre/humane-cat-population-management-guidance>> Acesso em: 16 nov. 2015.

JACOB, S. W.; HERSCHLER, R. Pharmacology of DMSO. *Cryobiology*, v.23, p.14 - 27, fev. 1986.

JACOB, S. W.; WOOD, D. C., Dimethyl sulfoxide (DMSO) toxicology, pharmacology, and clinical experience. *The American Journal of Surgery*, V.114, n.3, p.414 – 426, set.1967.

JANA, K. 5<sup>th</sup> International Symposium on Non-Surgical Contraceptive Methods of Pet Population Control “Target: The gonads – Inactivation and/or destruction of gonadal stem cells”. 2013. Disponível em:  
<<http://www.authorstream.com/Presentation/ACCandD-1867631-slide-rec/>> Acesso em: 11 out. 2015.

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.39, p.1746 – 6148, jul. 2011.

JANA, K.; SAMANTA, P. K., Evaluation of single intratesticular injection of calcium choride for nonsurgical sterilization in adult albino rats. *Contraception*, v.73, n.3 p.289 – 300, mar. 2006.

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

JANA, K.; SAMANTA, P. K.; GHOSH, D. Evaluation of single intratesticular injection of calcium chloride for nonsurgical sterilization of male Black Bengal goats (*Capra hircus*): a dose-dependent study. *Animal Reproduction Science*, v.86, n.1-2, p.89 – 108, mar. 2005.

JIANG, L.; NG, EYK.; YEO, A.C.B.; PAN, F.; YAU, W.; CHEN, J.; YANG, Y. A perspective on medical infrared imaging. *Journal of medical engineering*, v.29, n.6, p.257 -267, nov. 2005.

JIMÉNEZ, E.; PÉREZ-MARÍN, C. C.; MILLÁN, Y.; AGÜERA, E. Influence of anaesthetic drugs on the epididymal sperm quality in domestic cats. *Animal Reproduction Science*, v.123, n.1-4, p.265-269, fev. 2011.

JOHNSTON, S.; RHODES, L. No surgery required: the future of feline sterilization: An overview of the Michelson Prize & Grants in Reproductive Biology. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v.17, n.9, p.777-782, set. 2015.

JOHNSTONE, I. Electroejaculation in the domestic cat. *Australian Veterinary Journal*, v.61, n.5, p.155-8, mai. 1984.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. Células: morte das células e dos tecidos. In: \_\_\_\_\_ *Patologia Veterinária*. 6ª ed. São Paulo: Ed. Manole. 2000. Cap.25, p. 1169 – 1244.a.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. Sistema genital. In: \_\_\_\_\_ *Patologia Veterinária*. 6ª ed. São Paulo: Ed. Manole. 2000. Cap.25, p. 1169 – 1244.b.

KOGER, L. M. Calcium chloride castration. *Modern Veterinary Practice*, v. 59, n.2, p. 119-121, fev. 1978.

KULIS, T.; DARKO, K.; KARLOVIĆ, K.; KNEZEVIC, M.; SAMARDŽIĆ, J. BITUNJAC, M. The value of scrotal infrared digital thermography in detection of varicocele – initial results. *Periodicum biologorum*, v.113, n.4, p.449-452, nov. 2011.

KUTZLER, M.; WOOD, A. Non-surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology*, v.66, n.3, p.514–525, ago. 2006.

KWAK, B. K.; LEE, S. Intratesticular Injection of Hypertonic Saline: Non-Invasive Alternative Method for Animal Castration Model. *Development & Reproduction*, Korea, v.17, n.4, p. 435-440, dez. 2013.

LA RIVA, G. T.; HART, B. L.; FARVER, B. T.; OBERBAUER, A. M.; MESSAN, L. L. M.; WILLITS, N.; HART, L. A. Neutering dogs: effects on joint disorders and cancers in Golden retrievers. *Plos one*, v.8, n. 2, p. 1-7. 2013. Disponível em: <[www.plosone.org](http://www.plosone.org)> Acessado em: 08 dez. 2015.

LEE, J. G.; KIM, S. G.; LIM, K. J.; CHOI, K. C. Thermographic assessment of inferior alveolar nerve injury in patients with dentofacial deformity. *Journal Oral Maxillofacial Surgery*, v.65, n.1, p. 74-8, jan. 2007.

LEOCI, R.; AIUDI, G.; SILVESTRE, F.; LISSNER, E. A.; LACALANDRA, G. M.: Alcohol diluent provides the optimal formulation for calcium chloride non-surgical sterilization in dogs. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.56, n.62, p.1-7, out. 2014.a

LEOCI, R.; AIUDI, G.; SILVESTRE, F.; LISSNER, E. A.; MARINO, F.; LACALANDRA, G.M. 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.63, p.1-8, out. 2014.b.

LEOCI, R.; AIUDI, G.; SILVESTRE, F.; LISSNER, E.; LACALANDRA, G. M. Intratesticular injection of a calcium chloride tincture in the dog. International Symposium on Non-Surgical Contraceptive Methods of Pet Population Control.5. 2013. <<http://www.acc-d.org/resource-library/symposia/5th-symposium>> Acesso em: 17 nov. 2015

LISSNER, E. Calcium Chloride in male dogs and cats. 2013. Disponível em: <<http://www.acc-d.org/research-innovation/products-under-development/calcium-chloride>> Acesso em: 11 out. 2015.

LOPES, K. R. F.; SILVA A. R. Castração química de mamíferos machos: Revisão. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 38, n.1, p. 49-53, jan. 2014.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. Química Nova, v.27, n.4, p.670-673, 2004.

LUNSTRA, D. D.; COULTER, G. H. Scrotal Termography as a Tool for Predicting Semen Quality and Natural-Mating Fertility in Young Beef Bulls. Beef Research Program Progress Report, v.4, n.1, p.86-89, 1993.

LUVONI, G. C.; KALCHSCHMIDT, E.; LEONI, S. RUGGIERO, C. Conservation of feline semen. Part I: cooling and freezing protocols. Journal of Feline Medicine and Surgery, v.5, n.4, p.203-208, Ago. 2003.

LYMBEROPOULOS, A.G.; KOTSAKI-KOVATSI, V. P.; TAYLOR, A. Effects of cadmium chloride administration on the macroscopic and microscopic characteristics of ejaculates from chios ram-lambs. Theriogenology, v.54, n.7, p. 1145-1157, out. 2000.

MACDONALD, A.; MCGRATH, J. C. The distribution of adrenoceptors and other drug receptors between the two ends of the rat vas deferens as revealed by selective agonists and antagonists. British Journal of Pharmacology, v.71, n.2, p.445-458. 1980.

MARTINS, M. I. M.; SOUZA, F. F.; ACKERMANN, C. L. Biotécnicas do Sêmen In: APPARÍCIO, M.; VICENTE, W. R. R. Reprodução e obstetrícia em cães e gatos. São Paulo: Ed. MedVet, 2015. Cap 29. p. 373 - 374.

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, nov. 2013.

MATHEWS, K.; KRONEN, P. W.; LASCELLES, D.; NOLAN, A.; ROBERTSON, S.; STEAGAL, P. V. M.; WRIGHT, B.; YAMASHITA, K., Guidelines for recognition, assessment and treatment of pain. 2014. Disponível em <[http://www.wsava.org/sites/default/files/jsap\\_0.pdf](http://www.wsava.org/sites/default/files/jsap_0.pdf)> Acesso em: 08 nov. 2015.

McLAMB, E. Born in the Streets: The Global Impact of Feral Cats. *Real Ecology*. 2013. Disponível em: < <http://www.ecology.com/2013/08/27/global-impact-feral-cats/> > Acesso em: 8 jan. 2016.

MEIRA, L. F.; KRUEGER, E.; NEVES, E. B.; NOHAMA, P.; SOUZA, M. A. Termografia na Área Biomédica. *Pan American Journal of Medical Thermology*, v.1, n.1. p. 31-41, jun. 2014.

MORAES, A. N.; MARTINS, A. L.; OLESKOVICZ, N.; BEIER, S. L.; FARIAS, F. H. Castração química de coelhos com cloreto de cálcio associado ou não ao cloridrato de bupivacaína. *Seminário de Iniciação Científica*, 21., Santa Catarina. Anais... Santa Catarina: Universidade de Santa Catarina. 2011. Disponível em: / <[http://www.udesc.br/arquivos/portal\\_antigo/Seminario21/anais\\_ic\\_cav.pdf](http://www.udesc.br/arquivos/portal_antigo/Seminario21/anais_ic_cav.pdf)>. Acesso em: 07 jul. 2015

MORAIS, R.N.; MUCIOLO, R.G.; GOMES, M.L.F.; LACERDA, O.; MORAES, W.; MOREIRA, N.; GRAHAM, L.H.; SWANSON, W. F.; BROWN, J.L. Seasonal analysis of semen characteristics, serum testosterone and fecal androgens in the ocelot (*Leopardus pardalis*), margay (*L. weidii*) and tigrina (*L. tigrinus*). *Theriogenology*, v.57, p. 2027-2041, mai. 2002.

NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. Patologia da bolsa escrotal e do testículo. In: \_\_\_\_\_ Patologia da reprodução dos animais domésticos. 2. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. Cap.8. p.91-104.

NUÑEZ FAVRE, R.; BONAURA, M. C.; TITTARELLI, C. M.; MANSILLA HERMANN, D.; DE LA SOTA, R. L.; STORNELLI, M. A. Effect of natural photoperiod on epididymal sperm quality and testosterone serum concentration in domestic cat (*Felis catus*). In: *International Symposium on Canine and Feline Reproduction*, 7., 2012, Canadá. Anais eletrônicos... Whistler: IFSCAR, 2012. Disponível em: <<http://www.ivis.org/proceedings/iscfr/2012/117.pdf?LA=1>> Acesso em: 18 jan. 2016.

OLIVEIRA, E.C.S.; FAGUNDES, A.K.F.; MELO, C.C.S.; NERY, L.T.B.; RÊVOREDO, R.G.; ANDRADE, T.F.G.; OLIVEIRA-ESQUERRE, D. E. B .K.; KASTELIC, J.P.; SILVA JR, V.A. 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, Ago. 2013.

OMS – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. In: JUSBRASIL – Maus tratos animais: Brasil tem 30 milhões de animais abandonados. Informação e documentação eletrônica. 2014. Disponível em: < <http://anda.jusbrasil.com.br/noticias/100681698/brasil-tem-30-milhoes-de-animais-abandonados> > Acesso em: 31 jan. 2016.

PARANZINI, C. S.; BLASSIOLI JR, J. L.; MELANDA, C. A. A.; JUSTINO, R. C.; MARTINS, M. I. M. Comparación de dos técnicas de congelación de espermatozoides epididimarios de gato. In: *Simposio Latinoamericano De Reproducción Animal*, 2, 2014, Santiago, Chile. *Resumos...* Santiago: Il Simposio Latinoamericano De Reproducción Animal, 2014.

PARANZINI, C. S.; CARDOSO, G. S.; SOUZA, A. K.; VIEIRA, A. P.; MARTINS, M. I. M. Scrotal thermography to evaluate the inflammatory reaction after chemical sterilization method in cats. European Veterinary Society for Small Animal Reproduction Congress, 19, 2015, Hannover, Alemanha. *Anais ... Hannover: EVSSAR, 2015.a.*

PARANZINI, C. S.; VIEIRA, A. P.; MELANDA, C. A.; DESSUNTI, G. T.; MARTINS, M. I. M. Efeito da técnica de congelamento, manual e automatizada, nas alterações morfológicas de espermatozoides epididimários de felinos. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 21, 2015, Belo Horizonte, MG. *Anais... Belo Horizonte: CBRA, 2015. p. 230.b.*

PINEDA, M. H.; HEPLER, D. I. Chemical vasectomy in dogs. long-term study. *Theriogenology*, v.16, n.1, p.1-11, jul. 1981.

PLATZ JR, C. C.; SEAGER, S. W. Semen collection by electroejaculation in the domestic cat. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v.15, n.10, p. 1353 – 1355, nov. 1978.

PRASAL, M.; SAWICKA, K. M.; WYSOKINSKI, A. Thermography in cardiology. *Kardiologia Polska*, v.68, n.9, p.1052-6, set. 2010.

PUKAZHENTHI, B. S.; NEUBAUER, K.; JEWGENOW, K.; HOWARD, J.; WILDT, D. E. The impact and potential etiology of teratospermia in the domestic cat and its wild relatives. *Theriogenology*, v.66, n.1, p. 112-121, jul. 2006.

RANGANATHAN, L.; MOYETT, D. R.; NELSON, A. AGARWAL. Sperm motion kinetics: a new perspective in evaluating infertility. *Fertility and Sterility*, v.73, n.3. p.442, set. 2001.

REIS, F. R.; BARREIRA, A. P. B.; CASTRO, V. CASTRO, J. L. C.; SUZANO, S. M. C.; ROCHA, A. A. Índícios sobre a correlação entre diferentes métodos diagnósticos em casos de tumor de mama em cadelas. *Revista Eletrônica Novo Enfoque*, v.9, n.9, p.14-31, jan. 2010.

RIJSSELAERE, T.; VAN SOOM, A. Semen collection, assessment and artificial insemination in the cat. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, v.79, n., p.467 – 470, 2010.

RING, E. F. J., AMMER, K. The Technique of Infra red Imaging in Medicine. *Thermology international*, v.10, n.1, p.7-14, 2000.

RINGLER, D. J. Inflamação e reparo. In: JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. *Patologia Veterinária*. 6ª ed. São Paulo: Ed. Manole. 2000. Cap.5, p. 119 – 165.

ROBERTSON, S. A. Assessment and management of acute pain in cats. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, v.15, n.4, p 261-272, dez. 2005.

RUEDIGER, F. R.; CHACUR, M. G. M.; OBA, E.; AMORIM, A. R.; SOUZA, C. D. Termografia digital por infravermelho do escroto e qualidade do sêmen em touros nelore (*bos taurus indicus*). *Colloquium Agrariae*, v.10, n.2, (2014)

SANTOS, N. C.; FIGUEIRA-COELHO, J.; MARTINS-SILVA, J.; SALDANHA, C. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochemical Pharmacology*, v.65, n.7, p.1035 – 1041, abr. 2003.

SCOLARI, S. A.; CLARK, S. G.; KNOX, R. V.; TAMASSIA, M. A. Vulvar skin temperature changes significantly during estrus in swine as determined by digital infrared thermography. *Journal of Swine Health and Production*, v.19, n.3, p.151-155, abr. 2010.

SILVA, C. A. Avaliação do cloreto de cálcio como método de esterilização intratesticular em cães. 2012. 66f. Dissertação de mestrado – Universidade de Franca, Franca, SP. 2012.

SILVA, C. L. S. P.; GUERRA, C. R. S. B.; COELHO, W. M. D.; CARIS, C. C. P.; APOLINÁRIO, J. C. Chemistry restraint of wild animals. *Ciências Agrárias E Da Saúde Da Fundação Educacional De Andradina*, v.2, n.2, p.96-99, jul. 2002.

SILVA, T. F. P.; DIAS, C. G. A.; BRAGA, A. C. P.; UCHOA, D. C.; CARDOSO, J. F. S.; ACKERMANN, C. L.; THOMÁS, L. A.; SILVA, L. D. M. Anestesia inalatória associada à opióide para eletroejaculação em gatos domésticos: resultados preliminares. In: SEMANA UNIVERSITÁRIA DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ, 9, 2004. Fortaleza, Brasil. *Proceedings...* p1, 2004.

SLAUTERBECK, JR.; PANKRATZ, K.; XU, K. T.; BOZEMAN, S. C.; HARDY, D. M. Canine ovariohysterectomy and orchiectomy increases the prevalence of ACL injury. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, v.429, n., p.301–5, dez. 2004.

SOTO, F. R. M.; VIANA, W. G.; MUCCIOLO, G. C. B.; HOSOMI, F. Y. M.; VANNUCCHI, C. I.; MAZZEI, C. P.; EYHERABIDE, A. R.; LÚCIO, C. F.; DIAS, R. A.; AZEVEDO, S. S. Evaluation of Efficacy and Safety of Zinc Gluconate Associated with Dimethyl Sulphoxide for Sexually Mature Canine Males Chemical Neutering. *Reproduction in Domestic Animals*, v.44, n.6, p.927-031, dez. 2009.

SOUZA, A. L. P. ; CASTELO, T. S.; QUEIROZ, J. P. A. F.; BARROS, I. O.; PAULA, V. V.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R. Evaluation of anesthetic protocol for the collection of semen from captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*) by electroejaculation. *Animal Reproduction Science*, v.116, n.3-4, p.370–375, dez. 2009.

STACHECKI, J. J.; GINSBURG, K. A.; LEACH, R. E.; ARMANT, D. R. Computer-assisted semen analysis (CASA) of epididymal sperm from the domestic cat. *Journal of Andrology*, v.14, n.1, p.60-65, jan. 1993.

- TASKER, L. Stray Animal Control Practices (Europe): A report into the strategies for controlling stray dog and cat populations adopted in thirty-one countries. 2006. WSPA/RSPCA Disponível em: [http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/animalwelfare/WSPA\\_RSPCA%20International%20stray%20control%20practices%20in%20Europe%202006\\_2007.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/animalwelfare/WSPA_RSPCA%20International%20stray%20control%20practices%20in%20Europe%202006_2007.pdf) Acesso em: 22 nov. 2015.
- TEBET, J. M.; MARTINS, M. I. M.; CHIRINEA, V. H.; SOUZA, F. F.; CAMPAGNOL, D.; LOPE, M. D. Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus electroejaculated spermatozoa. *Theriogenology*, v.66, n. 6–7, p. 1629–1632, out. 2006.
- TIKTINSKIĬ, O.L.; MELNIKOVA, V.P.; MOSHKALOV, A.A.; NOVIKOV, I.F. The role of thermography in the diagnosis of testicular diseases. *Urologiia i nefrologiia*, Moscou, v.1, n.23, p.6, jan-fev. 1989.
- UTIDA, C.; TRUZZI, J. C.; BRUSCHINI, H.; SIMONETTI, R.; CEDENHO, A.; SROUGI, M. Infertilidade masculina no trauma raquimedular: Male infertility in spinal cord injury. *Coluna/coluna*, v.3, n.3, set. 2004.
- VAN HAGEN, M. A.; DUCRO, B. J.; VAN DEN, B. J.; KNOL, B. W. Incidence, risk factors, and heritability estimates of hind limb lameness caused by hip dysplasia in a birth cohort of boxers. *American Journal of Veterinary Research*, v.66, n.2, p.307–12, fev. 2005.
- VANNUCCHI, C. I.; ANGRIMANI, D.S.R.; EYHERABIDE, A.R.; MAZZEI, C.P.; LUCIO, C.F.; MAIORKA, P.C.; SILVA, L.C.G.; NICHI, M. Effects of intratesticular administration of zinc gluconate and dimethyl sulfoxide on clinical, endocrinological, and reproductive parameters in dogs. *Theriogenology*, v.84, n.7, p. 1103 – 1110, out. 2015.
- WILLSON, J. E.; BROWN, D. E.; TIMMENS, E. K. A toxicologic study of dimethyl sulfoxide. *Toxicology and applied pharmacology*, v.7, n.1, p.104 – 112, jan. 1965.
- ZAMBELLI, D.; CUNTO, M. Semen collection in cats: Techniques and analysis. *Theriogenology*, v.66, n.2, p.159-65, jul. 2006.
- ZAMBELLI, D.; CUNTO, M.; PRATI, F.; MERLO, B. Effects of ketamine or medetomidine administration on quality of electroejaculated sperm and on sperm flow in the domestic cat. *Theriogenology*, v.68, n.5, p.796-803, set. 2007.
- ZAMBELLI, D.; PRATI, F.; CUNTO, M.; IACONO, E.; MERLO, B. Quality and in vitro fertilizing ability of cryopreserved cat spermatozoa obtained by urethral catheterization after medetomidine administration. *Theriogenology*, v.9, n.4, p.485-490, mar. 2008.
- ZAMBELLI, D.; RACCAGNI, R.; CUNTO, M.; ANDREANI, G.; ISANI, G. Sperm evaluation and biochemical characterization of cat seminal plasma collected by electroejaculation and urethral catheterization. *Theriogenology*, v.74, n.8, p.1396 – 1402, nov. 2010.

ZHANG, H.; CHO, E.; KIM, Y. Thermographic Findings of Spinal Cord Tumor. Pan American Journal of Medical Thermology, v.1, n.1, p.55-67, 2014.

#### 4. HIPÓTESES

1. A termografia é um método indicativo da reação inflamatória local.
2. O  $\text{CaCl}_2$  20%, associado a lidocaína 1% ou ao DMSO 0,5%, quando aplicado intratesticular causa lesão tecidual e conseqüentemente reação inflamatória local, azoospermia, redução do volume testicular e diminuição das espículas penianas testosterona dependente.
3. O NaCl 0,9% quando aplicado intratesticular não causa alterações no parênquima testicular, podendo ser utilizado como controle nos estudos sobre castração química.

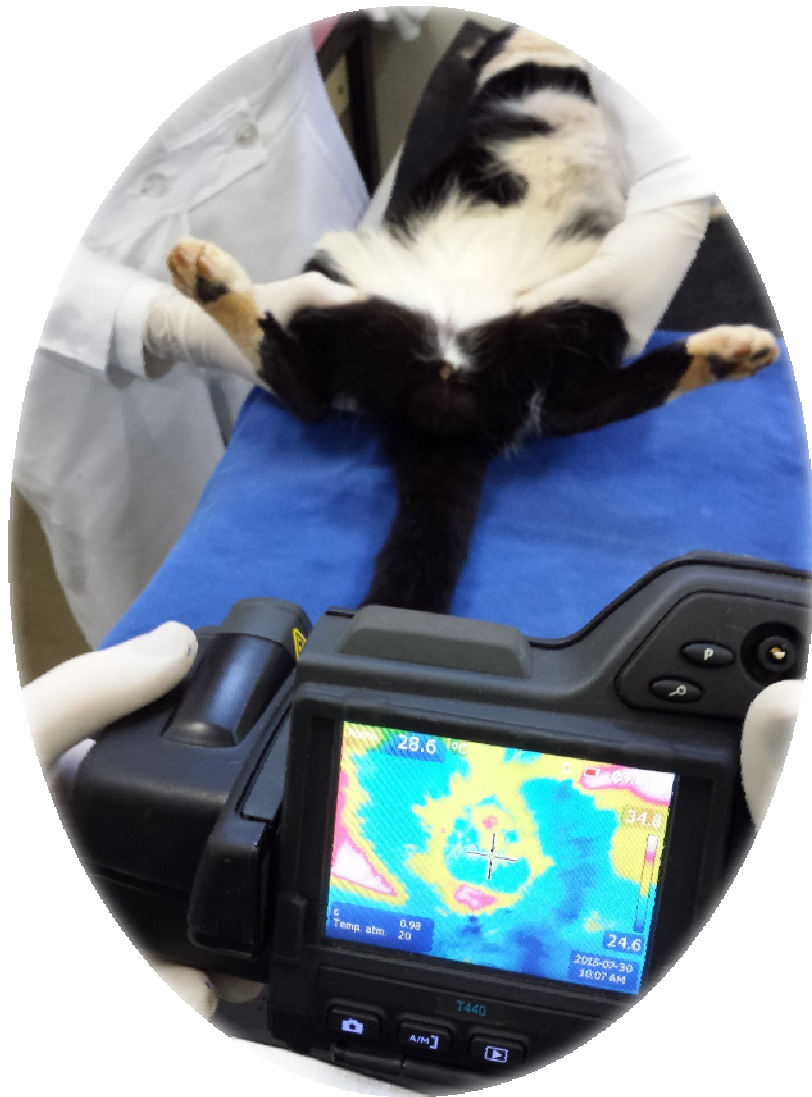
## **5. OBJETIVOS**

### **5.1. Objetivo Geral**

Avaliar a persistência e intensidade da reação inflamatória ocasionada pela aplicação de cloreto de cálcio, associado a lidocaína 1% ou ao DMSO 0,5%, intratesticular em gatos, utilizando a termografia, e os efeitos sobre a espermiogênese.

### **5.2. Objetivos Específicos**

- Avaliar a reação inflamatória escrotal após a aplicação intratesticular do  $\text{CaCl}_2$  20%, associado a lidocaína 1% ou ao DMSO 0,5%, por meio da avaliação termográfica.
- Avaliar a eficácia da castração química do  $\text{CaCl}_2$  20% por meio da análise espermática.
- Avaliar as alterações ocasionadas pela aplicação intratesticular de  $\text{CaCl}_2$  20% no sistema reprodutivo por meio da avaliação andrológica e histologia testicular 60/80 dias após a aplicação.



## CAPÍTULO II

## 1. ARTIGO 1

### **INFRARED THERMOGRAPHY TO EVALUATE INFLAMMATORY REACTION IN CATS TESTIS AFTER 0,9% NaCl AND 20% CaCl<sub>2</sub> INJECTION**

### **AVALIAÇÃO TERMOGRÁFICA DA REAÇÃO INFLAMATÓRIA DOS TESTÍCULOS DE GATO APÓS A APLICAÇÃO DE NaCl 0,9% E CaCl<sub>2</sub> 20%**

#### **RESUMO**

A castração química em gatos pode ser uma opção econômica, rápida e segura para o controle populacional, porém muitas dessas substâncias utilizadas podem causar reação inflamatória indesejável. A termografia infravermelha é um método não invasivo utilizado para monitorar injúrias que altere a vascularização e consequentemente interfira na temperatura da pele. Com isso, o objetivo deste estudo foi utilizar a termografia infravermelha para avaliar a reação inflamatória dos testículos de gatos, após a aplicação de solução de Cloreto de Sódio (NaCl) a 0,9% e Cloreto de Cálcio (CaCl<sub>2</sub>) 20% com lidocaína 1% e compara-las. As alterações provocadas no tecido testicular por essas substâncias e as consequências sobre a produção espermática, foram avaliadas por meio da avaliação andrológica e histologia testicular. Foram utilizados 12 gatos machos, com peso médio  $3,8 \pm 0,7$  Kg, adultos, peridomiciliados. Os gatos foram separados aleatoriamente em dois grupos, os quais receberam 0,25 ml de NaCl 0,9% (n=6) e CaCl<sub>2</sub> 20% com lidocaína 1% (n=6). Os gatos foram anestesiados para mensuração testicular, eletroejaculação, análise espermática e posterior aplicação da substância esclerosante. Sessenta dias após a aplicação, os gatos foram novamente anestesiados e realizada mensuração testicular, eletroejaculação, análise espermática e orquiectomia. Os testículos foram avaliados pela histologia. As medidas termográficas foram realizadas antes da aplicação (M0), 10 min (M1), 1 e 6 horas após a aplicação (M2 e M3), por 7 dias consecutivos (M4 - 10), aos 15, 30 e 60 dias (M11, M12 e M13). Houve diminuição na média da temperatura no M1 para ambos os grupos, com diferença estatística apenas para o grupo NaCl. Essa queda foi correlacionada com a temperatura das substâncias aplicadas. Nenhum outro momento apresentou aumento significativo da temperatura. Houveram diferentes lesões e diferentes graus de acometimento do tecido testicular. Foi possível concluir que a imagem termográfica é útil no diagnóstico, monitoramento e prognóstico das lesões inflamatórias da área testicular dos gatos, pois detectou com eficiência a variação temperatura escrotal dos gatos do experimento, sendo um método complementar rápido, eficiente e fácil de ser aplicado.

**Palavras chaves:** Imagem termográfica. Degeneração testicular. Eletroejaculação. Felinos. Histologia testicular

## ABSTRACT

Chemical castration in cats can be fast, cost-effective and safe option for population control, but the substances used for this procedure can cause undesirable inflammatory reaction. Infrared thermography is an effective method to monitor tissue injury that modify vascularity that interfere on skin temperature. Thereby, the aim of this study was to use infrared thermography to evaluate the inflammatory reaction caused by intratesticular injection of 0.9% Sodium Chloride (NaCl) and Calcium Chloride (CaCl<sub>2</sub>) 20% with 1% lidocaine, and compare. Changes on the testicular tissue and effects over spermatogenesis were evaluated by reproductive system exam and testicular histology. Twelve stray cats, weighing  $3.8 \pm 0.7$  kg, adults were used. The cats were randomly divided into two groups: six cats received 0.25mL intratesticular injection of NaCl 0.9% (NaCl group) and six 0.25mL intratesticular injection of CaCl<sub>2</sub> 20% with lidocaine 1% (CaCl<sub>2</sub> group). The cats were anaesthetized and testicular measurement, electroejaculation, sperm analysis and injection of the substance were made. 60 days after the injection, the cats were submitted again to testicular measurement, electroejaculation, sperm analysis, orchiectomy and testicular histology. Thermographic measurements were taken before injection (M0), 10 min (M1), 1 and 6 hours after injection (M2 and M3), for seven consecutive days (M4 - 10) at 15, 30 and 60 days (M11, M12 and M13). A temperature drop was noted at M1 for both groups, with statistical significance only for the NaCl group. This decrease is correlated with the temperature of the substances injected (ambient temperature). No other time had a significant increase in temperature. Both groups had and different types and different degrees of injuries in the testicular tissue. It was concluded that the thermographic imaging is a useful tool to monitor and for prognosis of cats testicular area inflammatory lesions being efficient, easy and quick method to apply as complementary diagnostic method.

**Key words:** Infrared thermography. Testicular degeneration. Electroejaculation. Cats. Testicular histology.

## 1.1. INTRODUÇÃO

A termografia é um método de auxílio diagnóstico por imagem, empregado no monitoramento das alterações da temperatura da pele, decorrente de alterações nos tecidos subjacentes que envolvam modificações na vascularização local (MEIRA et al., 2014). Auxilia na localização e no grau de acometimento dos tecidos, pois proporciona análise quantitativa dos dados aferidos (PEREIRA, 2012).

Devido aos avanços tecnológicos simplicidade de aplicação, objetividade, sensibilidade, rapidez, segurança para o paciente e operador, com ótima relação custo benefício esse método de auxílio diagnóstico vem ganhando destaque na área biomédica (PEREIRA, 2012). Na medicina veterinária, a termografia foi uma ferramenta empregada principalmente no diagnóstico de lesões de tecidos moles nos equinos (TUNNER, 2001), como indicador de estresse térmico reprodutivo em bovinos (MENEGASSI et al., 2015) e no diagnóstico imediado da reação inflamatória dos testículos de gato (PARANZINI et al., 2015). Em humanos, foi utilizado como adjuvante no diagnóstico de neoplasias mamárias, distúrbios da vascularização, na medicina do esporte (FERNÁNDEZ-CUEVAS et al., 2015) e também como técnica a promissora na área emocional (IOANNOU et al., 2014).

Devido a necessidade de controle populacional e manutenção do bem-estar de animais errantes, tem-se pesquisado métodos alternativos a castração cirúrgica, que seja menos onerosa, economize tempo do veterinário e mínimos efeitos adversos. Existe como métodos contraceptivos em machos, disponível no mercado mundial, além da orquiectomia, métodos hormonais, imunológicos e os químicos, como os agonistas do GnRH e substâncias de aplicação intratesticular (ACC&D, 2013; BUTTLER, 2015).

Compostos químicos, quando aplicados no testículo, causam inflamação que pode progredir para degeneração testicular, e constitui uma causa da redução da fertilidade nos machos (NASCIMENTO; SANTOS, 2003). O cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) já foi testado em bovinos (KOGER, 1978), ratos (JANA; SAMANTA, 2002; 2006), cabra (JANA; SAMANTA, 2005); cães (SILVA, 2012) e gatos (JANA; SAMANTA, 2011), em concentrações variadas. Embora possa causar infertilidade, ainda é questionável a interrupção da androgênese (SILVA, 2012; JANA; SAMANTA, 2011; LEOCI, 2014ab). Já o NaCl 0,9%, por ser considerado isotônico, tem sido a solução de escolha a ser aplicada intratesticular e em grupos controle de estudos de

soluções utilizadas como castradores químicos intratesticulares (JANA, 2006; 2007; 2011; OLIVEIRA, 2007; 2012; ABSHENAS et al., 2013; FAGUNDES et al., 2014).

Diante da necessidade em se obter um castrador químico que não interfira no bem-estar dos animais, este trabalho tem como objetivo avaliar por meio da imagem termográfica, a reação inflamatória ocasionada pela aplicação intratesticular de  $\text{CaCl}_2$  20% com a lidocaína 1% e NaCl 0,9%, e adicionalmente os efeitos sobre a espermatogênese por meio do exame andrológico e avaliação histológica dos testículos.

## 1.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 1.2.1. Aspectos éticos

Trata-se de um estudo prospectivo, aleatório, que foi realizado de acordo com os princípios éticos da pesquisa em animais e sob a anuência da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UEL) da Universidade Estadual de Londrina – PR, circular 075/2014, conforme anexo A.

### 1.2.2. Preparação da solução de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ )

A solução de  $\text{CaCl}_2$  em concentração de 20% com lidocaína 1% foi preparada pelo laboratório da Farmácia de Universidade Norte do Paraná – UNOPAR (Campus Araçongas, PR, Brasil).

### 1.2.3. Animais

Foram utilizados 12 gatos machos, de idade desconhecida, porém que já apresentavam espículas penianas, sem raça definida, com peso médio de  $3,8 \pm 0,7$  Kg, semidomiciliados, após autorização de seus guardiões. Os animais foram alojados em gatil por 7 dias, com acesso livre a ração *premium* e água.

O experimento foi realizado de março a junho de 2015, no Paraná, Brasil ( $23^\circ 08'47''$  sul e  $51^\circ 19'11''$  oeste), período de outono. Em clima subtropical úmido mesotérmico, com chuvas o ano todo e temperatura média anual de  $20^\circ\text{C}$ , com a máxima registrada para esse período de  $31,6^\circ\text{C}$  e a mínima de  $4,8^\circ\text{C}$  (Fonte: IAPAR, 2015).

#### 1.2.4. Grupos experimentais

Os gatos foram divididos aleatoriamente em dois grupos: grupo NaCl (n=6) gatos tratados com NaCl 0.9% e grupo CaCl<sub>2</sub> (n=6) gatos tratados com CaCl<sub>2</sub> 20% com lidocaína 1%.

Primeiramente os animais foram anestesiados, e submetidos a termografia e biometria testicular, avaliação das espículas penianas, eletroejaculação e a aplicação de 0,25 mL de NaCl 0,9%, ou CaCl<sub>2</sub> 20% associado a lidocaína 1%. Sessenta dias após a aplicação, os gatos foram submetidos novamente a termografia, biometria testicular, avaliação das espículas peninas, eletroejaculação e orquiectomia. Os testículos foram encaminhados para histologia.

A aplicação da substância foi realizada com uma seringa de 1 mL e agulha de 27G<sup>1/2</sup>", introduzindo a agulha cuidadosamente na região ventro caudal do testículo, 0,5 cm distante da cauda do epidídimo, pela região medial do órgão. A substância foi depositada lentamente na porção cranial do testículo.

#### 1.2.5. Protocolo Anestésico

Os gatos foram anestesiados com cetamina (12 mg/Kg - Dopalen®, Ceva, Brasil) associado a medetomidina (30 µg/Kg - Dormitor®, Pfizer, França) intramuscular. Como no dia da aplicação do NaCl e CaCl<sub>2</sub> os procedimentos eram mais rápidos, a anestesia foi revertida com ioimbina (1mg/Kg, farmácia de manipulação, Drogavet, Brasil). Devido a realização da orquiectomia, ou seja, necessitava de um período anestésico maior, foi deixado o animal se recuperar lentamente. Sempre que necessário, eram feitas doses complementares com um terço da dose inicial de cetamina, intravenosa. Foi realizada a aplicação de meloxicam (0,2mg/Kg, Maxican®, Ourofino, Brasil) nos animais anestesiados, previamente aos procedimentos.

Os parâmetros vitais como frequência cardíaca, frequência respiratória, coloração de mucosa, tempo de perfusão capilar e intensidade de pulso, foram monitorados durante todo procedimento, o qual teve duração de 40 a 60 minutos.

#### 1.2.6. Biometria testicular

Foram mensurados o comprimento (C), largura (L) e espessura (E) de cada testículo, pré aplicação (D0) e aos 60 dias (D60), utilizando paquímetro digital de aço

inox (Kobalt®, modelo 53247, Carolina do Norte, EUA). Para o cálculo do volume testicular de cada testículo, foi aplicada a fórmula: volume testicular (VT) =  $\frac{3}{4} \times \pi \times C/2 \times L/2 \times E/2$ , sendo  $\pi = 3,14$ . O cálculo do volume testicular total (VTT) foi realizado pela soma das medidas do testículo direito com esquerdo e o resultado apresentado em  $\text{cm}^3$ , conforme Tebet (2004).

#### 1.2.7. Termografia Infravermelha

As medidas termográficas (Quadro 1) foram realizadas com aparelho termográfico (Flir® modelo T440, Boston, EUA), com os animais em decúbito dorsal, após contenção física, exceto nos M0 e M13, que as medidas foram realizadas após contenção farmacológica. As medidas do M0 ao M10 e M13, foram realizadas pela manhã, entre 9 e 10 horas. Para realização dessas medidas, os animais foram mantidos em sala climatizada a 23°C. Já, as medidas M11 e M12, foram realizadas na casa dos protetores desses animais, em variados períodos do dia. Para aferição das imagens, foi mantida uma distância de 60 cm entre a câmera termográfica e os testículos. Para o cálculo da média da temperatura testicular, as imagens foram processadas no *Flir quick report software*® (2009).

Quadro 1. Momentos das aferições termográficas do grupo NaCl e grupo  $\text{CaCl}_2$ , antes e após a aplicação de substâncias esclerosantes nos testículos dos gatos.

FASE 1							FASE 2
Antes Aplicação	10 min	1 hora	6 horas	Dia 1 <sup>o</sup> ao 7 <sup>o</sup>	Dia 15	Dia 30	Dia 60
<b>M0</b>	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M4 - 10</b>	<b>M11</b>	<b>M12</b>	<b>M13</b>

#### 1.2.8. Colheita de sêmen

Para eletroejaculação, foi inserido cateter venoso 24G, pela uretra do animal, acoplado a um microtubo de polipropileno, com tampa de superfície plana de 1,5 mL. O eletroejaculador (Eletrogen SA200®, Santa Lydia, SP-Brasil) foi acoplado a um transdutor retal de 12 cm de comprimento e 1 cm diâmetro com três eletrodos longitudinais de 2 cm de comprimento, dispostos ventralmente, com 0,5 cm de distância entre eles, e com eletrodo central posicionado logo acima da próstata e sínfise pélvica. O protocolo utilizado foi o descrito por Howard et al. (1990) modificado. A sequência dos estímulos, quantidade e a voltagem dos estímulos

utilizados, foram descritas na Figura 2. Cada estímulo tinha duração de 10 segundos.

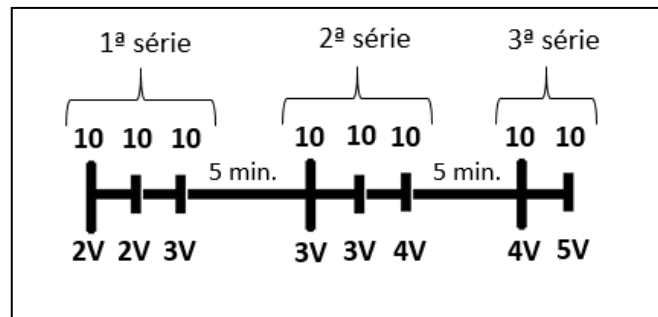


Figura 2: Sequência de séries, quantidade e voltagem dos estímulos utilizados no protocolo de eletroejaculação para colheita de sêmen dos gatos.

#### 1.2.9. Análise do sêmen

Os ejaculados foram avaliados quanto a concentração, cinética e morfologia espermática. A concentração e os parâmetros cinéticos foram analisados pelo CASA (Computer Assisted Sperm Analyzer, Hamilton-Thorne IVOS, Beverly, MA, USA), utilizando o *setup* para avaliação de sêmen felino (Quadro 2) e as alterações morfológicas em esfregaços de sêmen corados (POPE et al., 1991) pela leitura de 100 células em microscópio óptico no aumento de 1000x. As alterações foram classificadas em defeitos maiores e menores. Após a avaliação cinética do ejaculado (velocidade do trajeto – VAP; velocidade curvilinear – VCL; velocidade linear – VSL; amplitude do deslocamento lateral da cabeça – ALH; a linearidade – LIN; e retilinearidade – STR), foram calculados: índice de oscilação (WOB) =  $(VAP/VCL) \cdot 100$ , índice de velocidade espermática (SVI) =  $(VCL \cdot 0,87) + (VSL \cdot 0,76) + (VAP \cdot 0,90) + (ALH \cdot 0,92)$  e índice de movimento espermático (SMI) =  $(VSL \cdot 0,59) + (VAP \cdot 0,37) + (LIN \cdot 0,95) + (STR \cdot 0,89) + (WOB \cdot 0,83)$ , segundo Nuñez-Martínez et al. (2006).

Quadro 2: *Setup* utilizado para espécie felina no CASA\*.

<b>Parâmetro</b>	<b>Unidade</b>	<b>Parâmetro</b>	<b>Unidade</b>
Fotos por segundo (Hz)	60	Motilidade Progressiva (%)	50
Número de fotos	30	VAP ( $\mu/s$ )	70
Contraste min.	40	STR (%)	80
Tamanho min. celular (pix)	4	VAP de corte ( $\mu/s$ )	30
Tamanho celular (pix)	5	VSL de corte ( $\mu/s$ )	20
Intensidade celular	50	Temperatura ( $^{\circ}C$ )	35
Motilidade (%)	70	Câmara utilizada	Cell- VU**

\* Hamilthon – Thorne Computer – Aided Semen Analyser (CASA), Versão 10 Ivos (HTR – IVOS Analyser, Hamilthon Thorne Research, Bervely, MA, USA) \*\* DRM-650 Cell-VU slides, Millennium Sciences Inc., Nova York, EUA.

#### 1.2.10. Avaliação comportamental relacionada a dor

Os gatos foram mantidos em um gatil institucional por sete dias para avaliação clínica e termográfica. Para melhor conforto dos animais e minimizar interferência na termografia testicular, a temperatura da sala foi mantida em aproximadamente 23°C. Por se tratar de animais de difícil manejo, pois não eram acostumados com cativeiro e pessoas, foi mantido na tomada um difusor Feliway® (Ceva, Paulínea, SP), que é um análogo sintético de ferormônios facias do gato, indicado para dar segurança e tranquilidade aos animais.

Durante esse período, foram avaliados atitude geral, capacidade de interagir com o ambiente, apetite, característica da pele escrotal, e a palpação dos testículos. Mesmo não pontuando, os itens comportamentais foram avaliados conforme sugerido pela escada validada para dor em felinos de Brondani et al. (2012).

#### 1.2.11. Orquiectomia

Após 60 dias da administração intratesticular do NaCl e CaCl<sub>2</sub>, todos os gatos foram submetidos a orquiectomia. A técnica realizada foi de incisão escrotal com a utilização de duas pinças, e ligadura do cordão espermático com fio inabsorvível 3-0.

Os animais receberam aplicação de 30 mg/Kg de cefazolina por via intravenosa durante o procedimento cirúrgico, e 25mg/Kg de dipirona, a cada 8 horas, por via oral durante 3 dias. O curativo na ferida cirúrgica foi realizado uma vez ao dia, por 7 dias, com clorexidina spray.

### 1.2.12. Análise histológica dos testículos

Após orquiectomia, os testículos foram seccionados longitudinalmente e fixados em formol tamponado por 24 horas, mantidos em etanol 70%, após processadas e coradas pelo método hematoxilina e eosina (HE).

Foram analisados nas lâminas histológicas presença de degeneração, necrose, calcificação, substituição por tecido conjuntivo e presença e tipo de infiltrado inflamatório (monomorfonuclear, polimorfonuclear, mastócito, eosinófilo, linfócito e misto). Para constituição do score, foram considerados túbulos seminíferos com as células de Sertoli e tecido intersticial com as células de Leydig baseado na metodologia proposta por Gerez et al. (2015), modificada. Utilizou-se 4 classificações para graduar a intensidade lesional do tecido testicular: Escore 0, para tecidos normais (sem alteração); escore 1, para alterações leves (<20% de tecido testicular acometido); escore 2, para moderado (de 20% a 50%); e escore 3, para lesão intensa (>50%).

### 1.2.13. Análise Estatística

Para avaliação das temperaturas, a análise estatística foi realizada de duas formas: comparação dos momentos entre os grupos utilizando ANOVA, e para comparação de cada momento com o controle (M0) de seu grupo. A análise entre os momentos com o controle, a biometria testicular e parâmetros de cinética do sêmen, antes e após a aplicação, foi utilizado teste de Shapiro Wilk para homogeneidade da amostra. Para amostras com distribuição homogênea, utilizou-se o teste T, e para amostras com distribuição não homogênea, o teste de Wilcoxon, com nível de significância ( $p < 0,05$ ) no programa R versão 3.2.2. As alterações histológicas foram relatadas conforme a frequência dos achados.

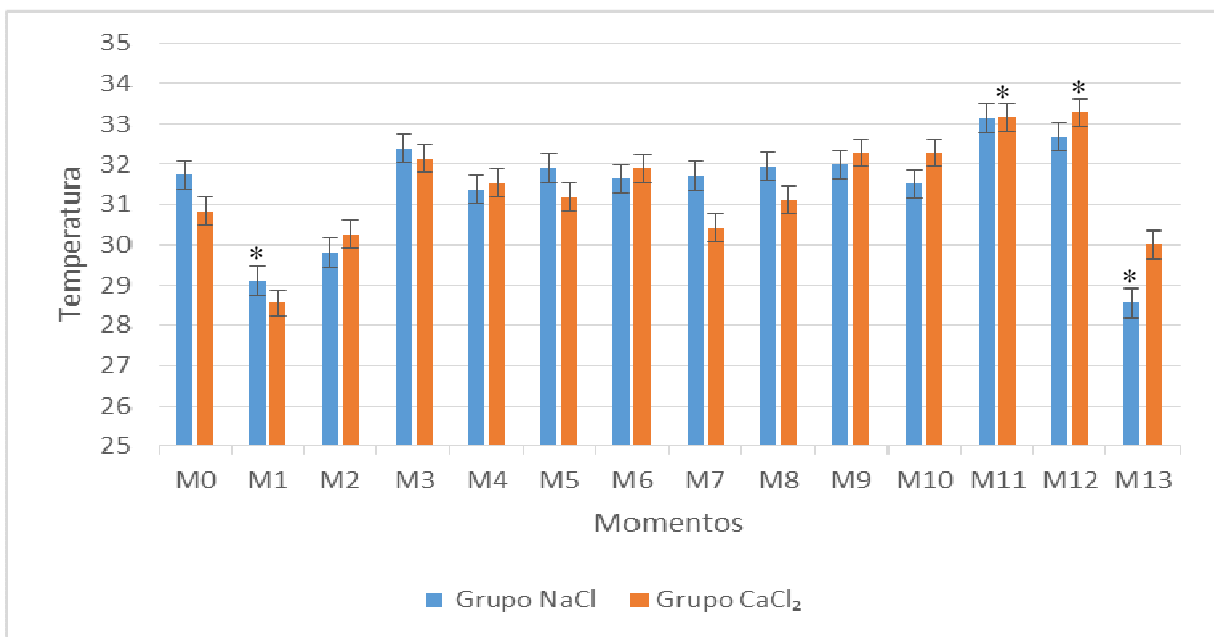
## 1.3. RESULTADOS

### 1.3.1. Termografia

As médias das temperaturas testiculares aferidas para o grupo NaCl e CaCl<sub>2</sub>, estão dispostas no Gráfico 1. Na comparação do momento aferido com o controle (M0), o grupo NaCl apresentou diferença estatística nos momentos M1

(29,11°C) e M13 (28,55°C), e o grupo CaCl<sub>2</sub>, no M11 (33,17°C) e M12 (33,28°C) (p<0,05).

Na avaliação da reação inflamatória causada pelo NaCl e CaCl<sub>2</sub>, as medidas tomadas para cada momento foram comparadas entre os grupos, que não apresentou diferença estatística, mostrando que a manifestação clínica da reação inflamatória causada pela aplicação de NaCl e CaCl<sub>2</sub> no testículo dos gatos, foram de mesma intensidade.



\* Importância estatística avaliada entre os momentos do mesmo grupo (p<0,05).

Gráfico 1: Média da temperatura em graus Celsius com representação do erro padrão da área testicular dos 12 gatos, aferida por termógrafo, do grupo NaCl e CaCl<sub>2</sub>, nos diferentes momentos, antes e após a aplicação dos agentes esclerosantes intratesticulares.

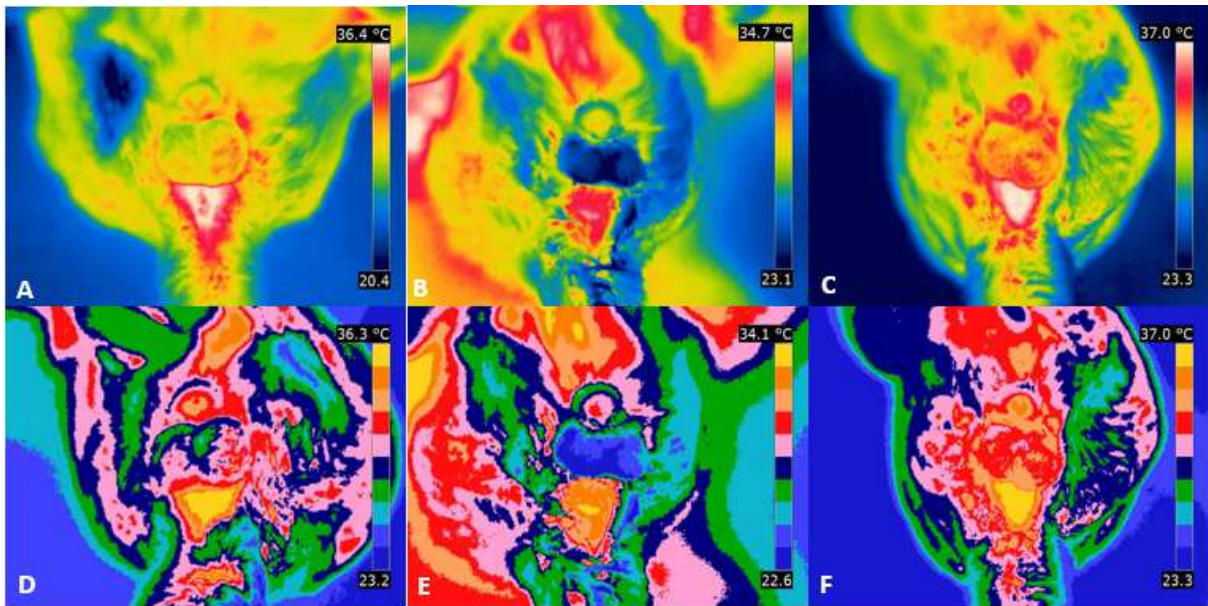


Figura 3: Imagem térmica nos momentos M0 (A), M1 (B) e M3 (C) na paleta de cores quentes do termógrafo e M0 (D), M1 (E) e M3 (F), do mesmo animal, na paleta médica do software, utilizadas para localizar e mapear a lesão inflamatória.

### 1.3.2. Avaliação clínica

Duas a três horas após retorno da anestesia, os animais já estavam se alimentando e ingerindo água. A palpação testicular foi realizada durante sete dias consecutivos, e todos os animais (100%), mostraram-se bem tolerantes e calmos a esse procedimento, embora, imediatamente após a aplicação intratesticular, tenha sido detectado que os testículos estavam mais firmes. Notou-se aumento de volume e consistência testicular nos primeiros sete dias e diminuição gradual até o 15º dia após aplicação. Nos animais que receberam aplicação do NaCl 0,9%, após 15 dias, os testículos voltaram a ter consistência fibroelástica. Nenhum animal apresentou dermatite escrotal. Não houve redução das espículas penianas, testosterona dependente, nos animais avaliados.

Durante 7 dias, notou-se que os animais se apresentavam relaxados e confortáveis, alimentando-se normalmente. Quando as gaiolas eram abertas, circulavam tranquilamente no gatil. Adicionalmente, permitiam palpação em outras partes do corpo, brincavam com bolinhas e fitilhos, entravam em caixas, e interagiam e permitiam serem acariciados pelos cuidadores.

### 1.3.3. Biometria Testicular

A média do VTT, as porcentagens de redução testicular nos dois grupos foram sumarizados nas Tabela 1. Não houve diferença estatística na redução do VTT dos dois grupos. Os testículos que apresentaram mais de 40% de redução de tamanho após 60 dias da aplicação intratesticular apresentaram consistência mais firme.

Tabela 1: Volume testicular total em cm<sup>3</sup> observado, antes e aos 60 dias após a aplicação do NaCl 0,9% (n=6) e CaCl<sub>2</sub> 20% com lidocaína 1% (n=6) intratesticular, e a porcentagem de redução.

ANIMAL	Grupo NaCl			Grupo CaCl <sub>2</sub>		
	VTT M0	VTT M13	% red	VTT M0	VTT M13	% red
1	1,73	1,50	13,28%	2,08	1,11	46,0%
2	3,42	1,60	53,24%	1,09	0,826	24,0%
3	0,94	1,21	-27,50%	1,94	0,56	28,8%
4	0,66	0,9	-35,74%	0,66	0,61	7,1%
5	1,82	1,36	24,86%	0,94	0,39	58,6%
6	1,57	1,43	9,00%	1,07	1,6	-49,4%
<b>Média ± DP</b>	<b>1,6 ± 0,96</b>	<b>1,33 ± 0,52</b>	<b>6,19%</b>	<b>1,29 ± 0,53</b>	<b>0,83 ± 0,40</b>	<b>19,18%</b>

### 1.3.4. Análise do sêmen.

O sêmen foi avaliado para cinética e morfologia espermática antes da aplicação das substâncias esclerosantes e 60 dias após. As médias dos resultados para os parâmetros cinéticos antes e após a aplicação, e os índices WOB, e SMI e SVI encontram-se descritos na Tabela 2. A concentração, parâmetros e índices de cinética e morfologia não apresentaram diferença estatística, exceto BCF no grupo NaCl ( $p < 0,05$ ).

Tabela 2: Parâmetros cinéticos avaliados pelo CASA, e índices espermáticos antes (M0) e 60 dias (M13) após aplicação das substâncias esclerosantes intratesticulares do grupo NaCl e CaCl<sub>2</sub>.

	Grupo NaCl			Grupo CaCl <sub>2</sub>		
	M0	M13	Diferença %	M0	M13	Diferença %
<b>CONC. M/mL</b>	498,85 ± 384,14	219,99 ± 169,65	<b>55,90%</b>	399,79 ± 503,55	169,03 ± 176,69	<b>57,72%</b>
<b>MOT. %</b>	60 ± 28,64	48,33 ± 28,67	<b>19,45%</b>	58,33 ± 31,58	29,66 ± 37,6	<b>49,15%</b>
<b>MP. %</b>	43,66 ± 22,93	28,83 ± 21,56	<b>33,97%</b>	36 ± 25,72	21,333 ± 27,2	<b>40,74%</b>
<b>VAP μm/s</b>	131,1 ± 20,86	105,78 ± 25,74	<b>19,31%</b>	131,6 ± 57,68	69,65 ± 63,83	<b>47,07%</b>
<b>VSL μm/s</b>	116,6 ± 17,78	92,23 ± 24,31	<b>20,90%</b>	115,8 ± 48,89	61,25 ± 56,99	<b>47,11%</b>
<b>VCL μm/s</b>	181,46 ± 22,16	153,73 ± 29,87	<b>15,28%</b>	167,45 ± 65,18	96,71 ± 91,74	<b>42,25%</b>
<b>ALH μm/s</b>	5,21 ± 0,86	5,56 ± 1,82	<b>-6,29%</b>	5,466 ± 1,18	2,56 ± 2,85	<b>53,06%</b>
<b>BCF Hz</b>	39,46 ± 3,05	34,43 ± 5,57*	<b>12,75%</b>	30,7 ± 6,65	22,43 ± 20,33	<b>26,94%</b>
<b>STR %</b>	86,5 ± 2,25	85 ± 4,89	<b>1,73%</b>	86,83 ± 3,6	56,55 ± 44,05	<b>34,87%</b>
<b>LIN %</b>	63,5 ± 7,44	60,5 ± 11,04	<b>4,72%</b>	69,16 ± 3,31	43 ± 33,4	<b>37,83%</b>
<b>WOB (%)</b>	73,26 ± 6,84	69,18 ± 10,98	<b>5,58%</b>	76,99 ± 5,99	49,99 ± 39,34	<b>35,07%</b>
<b>SVI</b>	371,09 ± 48,61	304,17 ± 59,73	<b>18,03%</b>	357,15 ± 145,9	195,74 ± 183,04	<b>45,20%</b>
<b>SMI</b>	316,10 ± 27,97	282,44 ± 43,51	<b>10,65%</b>	323,9 ± 51,44	194,68 ± 153,12	<b>39,90%</b>

CONC – concentração, MOT – motilidade total, MP – motilidade progressiva, VAP – velocidade média da trajetória, VSL - velocidade linear progressiva, VCL – velocidade curvelínea, ALH – amplitude lateral de cabeça, BCF - frequência de batimento, STR – retilinearidade, LIN – linearidade, WOB - wobble, SVI – índice de velocidade espermática, SMI – índice de motilidade espermática. \* p<0,05

### 1.3.5. Histologia testicular

Durante a orquiectomia, foi notado que todos os animais do grupo CaCl<sub>2</sub> e 4/12 testículos do grupo NaCl, apresentaram aderência a túnica vaginal.

Na avaliação microscópica foram identificadas diferentes lesões e graus de severidade no testículo o que permitiu estabelecer escores por tecido avaliado (testículo direito e esquerdo), e frequência absoluta dessas lesões testiculares, as quais estão sumarizadas no Tabela 3. O escore total para o grupo NaCl foi 30 e grupo CaCl<sub>2</sub> foi 70. Valores individuais para os escore histológico estão listados no Apêndice C.

Dois testículos do grupo NaCl e dois do grupo CaCl<sub>2</sub>, apresentaram hiperplasia das células de Leydig.

Tabela 3. Frequência absoluta das lesões histológicas encontradas para o Grupo NaCl e Grupo CaCl<sub>2</sub>, 60 dias após a aplicação das substâncias esclerosantes intratesticulares.

	Grupo NaCl						Grupo CaCl <sub>2</sub>							
	TS e Sertoli			Tec. Intersticial			TS e Sertoli							
	Deg	Nec	Calc	Conj	Infla	Deg	Nec	Conj	Deg	Nec	Calc	Conj	Infla	Deg
<b>Normal</b>	0	6	12	12	12	11	10	10	0	2	5	4	10	0
<b>&lt; 20%</b>	3	5	0	0	0	1	2	2	4	6	3	4	0	4
<b>20-50%</b>	7	1	0	0	0	0	0	0	5	1	4	3	2	5
<b>&gt;50%</b>	2	0	0	0	0	0	0	0	3	3	0	1	0	3

TS – túbulo seminífero, Subs. tec. conj. – substituição do tecido normal por tecido conjuntivo, Infil. inflam. – infiltrado inflamatório.

#### 1.4. DISCUSSÃO

Ao que se tem conhecimento, este é o primeiro estudo da avaliação termográfica da área escrotal de gatos com o objetivo de avaliar a reação inflamatória imediata nos testículos, após a aplicação de NaCl e CaCl<sub>2</sub> 20%, validada pela avaliação clínica e andrológica.

Houve dificuldade, em conduzir esse trabalho, pelo fato dos gatos serem semi-domiciliados. Após 7 dias de avaliação, os animais eram devolvidos a seus guardiões, e no momento dos retornos (M11, M12 e M13), nove animais haviam desaparecido ou haviam ido à óbito. O estudo foi conduzido com um total de 21 animais, e apenas 12 estavam presentes na avaliação do M13, ou seja, uma perda de 60% dos animais em apenas dois meses.

Esse estudo encontrou limitações na padronização do protocolo para aferição das medidas termográficas. No intuito de evitar o stress do transporte, tentou-se realizar as aferições dos momentos M11 e M12 na casa dos guardiões, porém houveram interferências de fatores climáticos, dificuldade de captura do animal, e a não possibilidade de realização das medidas no mesmo horário.

Não se tem conhecimento de estudo publicado que defina uma metodologia para aplicação da técnica de termografia infravermelha, ou a média para temperatura da área testicular de gatos, porém, através de pesquisa em humanos, sabe-se que são muitos os fatores que podem interferir na medida térmica, dentre os quais podem ser citados alguns exemplos como fatores ambientais (relacionados

com o ambiente em que o exame é realizado); fatores individuais (características individuais específicas que podem influenciar na temperatura da pele – espécie, metabolismo, idade, esforços físicos); e fatores técnicos (relacionados aos equipamentos utilizados e metodologia de análise) (FERNÁNDEZ-CUEVAS et al., 2015). Como não é possível o controle de todos os fatores que possam influenciar nos resultados do exame termográfico, é necessário a instituição de um protocolo a ser seguido como modelo de conduta.

Para redução de interferências ambientais, a temperatura do gatil foi mantida a 23°C do M0 ao M10. Baseado nas recomendações de Ring e Ammer (2000) e Fernández-Cuevas et al., (2015) de temperatura ambiental para aferição de extremidades ser entre 22 e 24°C, e nas características climáticas da região de Londrina (subtropical e temperatura média anual de 20°C) (Fonte: IAPAR, 2015), acreditou-se que 23°C seria uma temperatura confortável para manter os gatos. Ainda há a necessidade que o animal permaneça nesse ambiente por pelo menos 15 minutos para aclimação (ZAPROUDINA et al., 2006).

No M11 e M12, em que a aferição termográfica foi realizada na casa dos guardiões, sem climatização ambiental e muitas vezes no período da tarde ou após tentativas de captura do animal, houve aumento da média da temperatura da área testicular desses momentos, nos dois grupos com importância estatística apenas para o grupo CaCl<sub>2</sub>. Essa fase do experimento foi realizada entre março e junho de 2015, onde foram registradas temperaturas máximas ambientais de 31,6°C durante esse período (Fonte: IAPAR, 2015). No M13, devido a climatização da sala de cirurgia ser 20°C, nota-se queda na temperatura testicular de ambos os grupos, com diferença estatística para o grupo NaCl.

A redução da temperatura em M1 foi provavelmente devido a temperatura da substância injetada ser a mesma da temperatura ambiente (23°C), ou seja, em torno de 7,8°C abaixo da temperatura média da área testicular dos gatos desse experimento que foi de 30,2°C. Em outro experimento realizado por essa mesma equipe com a aplicação de CaCl<sub>2</sub> 20% com DMSO 0,5% intratesticular (manuscrito em preparo), também pode-se notar queda significativa em M1.

Uma hora após a aplicação (M2) as temperaturas voltaram a aumentar, nos dois grupos, tendo pico no M3. A temperatura oscila durante os próximos momentos aferidos, devido a variação individual da temperatura, mas não ultrapassa a

temperatura do M3. Como descrito na literatura, a reação dos tecidos a agentes químicos ocorre algum tempo após a lesão inicial, atinge um pico em 2 a 4 horas, e em seguida, vai se restabelecendo gradualmente ao longo de 6 a 8 horas após a lesão inicial (RINGLER, et al., 2000). Foi realizado a aplicação do anti-inflamatório meloxicam, antes da aplicação intratesticular. Este antiinflamatório contribuiu para o controle da reação inflamatória nas primeiras 24 horas e a dor testicular. OLIVEIRA et al. (2012), relatou que a administração de um antiinflamatório após a aplicação de um castrador químico, não interfere em sua eficácia.

Apesar dos animais terem sido manipulados da mesma forma, pela mesma pessoa, em ambiente controlado (M0-10), nota-se que há diferença da média das temperaturas testiculares entre os grupos. Este fato é devido a diferença da temperatura individual, índole do animal, e a densidade e comprimento dos pelos. Alguns animais, a contenção era mais difícil, portanto para diluir os fatores individuais, optou-se para que cada animal fosse controle dele mesmo para as medidas termográficas (M0).

Imediatamente após a aplicação da substância intratesticular, todos os animais do grupo NaCl e grupo CaCl<sub>2</sub> apresentaram consistência testicular mais firme, devido ao volume injetado, pois causa distensão na capsula testicular. Mesmo havendo esta distensão, os animais não se demonstraram incomodados com a palpação local. Essa consistência tenra foi gradualmente diminuindo até o 7º dia.

Os resultados desse estudo mostram que o grupo NaCl e grupo CaCl<sub>2</sub>, embora sem significância estatística, promoveu uma diminuição do VTT, queda na qualidade dos espermatozoides produzidos (mais intensa no grupo CaCl<sub>2</sub>) e ao aumento da temperatura testicular no M3 (+2,6°C), com diminuição gradual até M13. A redução do volume testicular para o grupo NaCl foi de 6%, e para o grupo CaCl<sub>2</sub> foi de 19%. Mesmo não havendo diferença estatística, sabe-se que a redução do VTT é clinicamente importante, quando é feita a análise andrológica dos animais que apresentam problemas reprodutivos (APPARÍCIO, 2015). Quatro animais do grupo CaCl<sub>2</sub> apresentaram redução do tamanho das espículas penianas. Nenhum apresentou ausência.

Mesmo utilizando o mesmo volume e concentração das soluções para todos animais, foi possível notar que um mesmo animal, responde de maneira diferente para cada testículo. O mecanismo de ação dos tecidos é independente, pois

depende da reação local de cada indivíduo, e pode ser variável. Mesmo que o mecanismo de lesão tenha sido originado por um irritante primário, envolve em sequência, resposta por mediadores locais (RINGLER, 2000). Este fenômeno pode ser observado no anexo C, onde estão dispostos o volume de cada testículo independentemente no M0 e M13.

Ainda é possível notar aumento do VTT em dois animais no grupo NaCl e um do grupo CaCl<sub>2</sub>, representado pelo sinal negativo na Tabela 1. Nesse caso, há duas justificativas: 1) por se tratarem de animais semi-domiciliados, a idade é desconhecida. Mesmo apresentando produção espermática, poderiam ser animais que ainda estavam em crescimento; 2) sessenta dias após a aplicação, os animais ainda apresentavam aumento de volume testicular, devido necrose asséptica.

O CaCl<sub>2</sub> 20% com lidocaína 1% promoveu oligoespermia em 1/6 animal e necrospermia em 3/6 animais. O NaCl promoveu queda na motilidade total espermática em 4/6 animais (abaixo de 45%). Apesar de não apresentar significância estatística, a motilidade teve queda nos dois grupos. No grupo CaCl<sub>2</sub>, a queda foi maior, pois três animais não apresentaram motilidade (MT=0%).

Dentre os parâmetros seminais avaliados, nota-se uma variação muito grande na concentração de espermatozoides entre os dois grupos no M0. A literatura cita a sazonalidade, raça do animal (endogamia) (AXNÉR; LINDE-FORSBERG, 2007) e a nutrição (PUKAZHENTHI et al., 2006) os fatores que mais influenciam na qualidade do ejaculado. Por se tratarem de animais semi-domiciliados, a dieta é desconhecida, haja vista que durante o confinamento, os animais tiveram alimentação com ração premium, e 90% dos animais, tiveram aumento do peso, além de redução das atividades físicas, manutenção em ambiente calmo com enriquecimento ambiental, sem a interferência dos diversos tipos de fatores estressantes que sofrem nas ruas.

Quanto as alterações morfológicas encontradas antes e após a aplicação das substâncias, no grupo NaCl, intensificaram-se os defeitos de cauda enrolada e acrossoma, no grupo CaCl<sub>2</sub>, intensificaram os defeitos na peça intermediária e defeitos de acrossoma.

Embora a degeneração do tecido testicular tenha ocorrido de forma semelhante nos dois grupos, a necrose foi mais intensa no grupo CaCl<sub>2</sub>, que

também apresentou calcificação tecidual e substituição do parênquima testicular por tecido conjuntivo.

No presente estudo, 2/12 tecidos analisados no grupo NaCl e 2/12 do grupo CaCl<sub>2</sub> apresentaram hiperplasia das células de Leydig (++) aos 60 dias, resultante provavelmente, de uma proliferação compensatória das células em resposta a injúria testicular. Em um estudo semelhante realizado por esta mesma equipe (manuscrito em preparação), 7/12 tecidos analisados 80 dias após a injúria testicular, com CaCl<sub>2</sub> 20% com DMSO 0,5% apresentaram intensa hiperplasia (+++) das células de Leydig.

Através deste trabalho, foi possível comprovar que o NaCl 0,9% e o CaCl<sub>2</sub> 20% com lidocaína 1% causa reação inflamatória testicular a ponto de diminuir a qualidade espermática e causar alterações histológicas teciduais. Corroborando com esses achados, Moraes et al. (2011) pesquisou a ação do CaCl<sub>2</sub> associado a bupivacaína em lagomorfos, e relata degeneração testicular também no grupo controle. Contraditoriamente, Jana (2006; 2007; 2011), Oliveira et al. (2012) Abshenas et al., (2013), Fagundes et al. (2014) e Leoci et al. (2014) relatam não haver alteração histológica no grupo controle após a aplicação de NaCl 0,9% no testículo desses animais. Diante da possibilidade de promover alterações histológicas, mesmo que transitórias, o uso do NaCl 0,9% como controle, não é aconselhável.

Os resultados dessa pesquisa estão de acordo com o publicado por Jana e Sananta (2011) e Leoci et al. (2014) em relação a alteração clínica desses animais após a aplicação do CaCl<sub>2</sub>, na queda da concentração espermática e na diminuição do volume testicular total. Leoci et al., (2014) ainda acrescenta que a fertilidade é interrompida por pelo menos 6 meses nos animais que recebem aplicação intratesticular com CaCl<sub>2</sub> 20% com lidocaína 1%, mas que não é possível excluir a hipótese em que esses animais voltem a ser férteis 1 ano após a aplicação do CaCl<sub>2</sub> 20%, devido a volta da atividade testicular.

É importante conhecer a dinâmica das substâncias que podem ser aplicadas no tecido testicular. Dessa maneira é possível entender melhor os mecanismos de defesa desse tecido, podendo intervir com resgates analgésicos e interrupção da fertilidade dos animais de maneira reversível ou irreversível, quando necessário.

Acredita-se que o  $\text{CaCl}_2$  20% é um fármaco seguro a ser aplicado como castrador químico pois causou reação inflamatória local, porém, nenhum animal apresentou sinais clínicos sistêmicos, nem lesão escrotal cutânea.

Foi possível observar através desse estudo que a termografia, biometria e histologia testicular associados a análise do sêmen, são bons indicadores para o entendimento das injúrias causadas pela administração de substâncias esclerosantes no testículos, principalmente nos primeiros 7 dias após a aplicação. A temperatura do ambiente interfere na temperatura da pele que será aferida. Estudos termográficos seguindo protocolos clínicos é uma técnica promissora como auxílio diagnóstico de patologias que interferem na temperatura da pele. O protocolo clínico instituído nesse trabalho dos momentos M0 ao M10, para realização do exame termográfico, foi eficiente em reduzir as interferências das medidas das imagens.

Através desse experimento, foi possível observar que não é o sal de  $\text{NaCl}$  ou  $\text{CaCl}_2$  em si o grande causador reação inflamatória local, e sim o ato mecânico de introduzir uma agulha no testículo e também a distensão da cápsula testicular em consequência dessa injeção. Diferentemente do gluconato de zinco em gatos, onde autores relatam incômodo após aplicação, em que muitas vezes, é necessário resgate analgésico (OLIVEIRA et al., 2013), ou em cães, onde há manifestação de reações adversas até 6 dias após a aplicação, comprovando que o sal de gluconato de zinco tem maior potencial irritativo quando comparado com o  $\text{CaCl}_2$ , mas mesmo assim, apresenta vantagens sobre castração cirúrgica (LEVY et al., 2008). O sal de  $\text{CaCl}_2$  potencializa a destruição tecidual e não a reação inflamatória local constatado pela diferença de escore histológico entre os grupos  $\text{NaCl}$  (30) e  $\text{CaCl}_2$  (70).

Mesmo utilizando o mesmo volume e mesma concentração de  $\text{CaCl}_2$  em um mesmo animal a resposta tecidual é diferente para cada testículo;

## 1.5. CONCLUSÃO

Diante dos resultados encontrados nesse experimento conclui-se que a termografia da área testicular é um método eficiente na avaliação da temperatura da área escrotal de gatos, indicada para diagnóstico, monitoramento e prognóstico de orquites e epidimites. Este método capta as alterações da temperatura de forma

eficiente e qualitativa, adicionalmente é um método preciso, seguro e traz conforto a rotina do médico veterinário.

O  $\text{CaCl}_2$  20% com lidocaína 1% causa reação inflamatória local, porém não compromete o bem-estar dos animais e interferiu na espermatogênese em 70% dos gatos tratados.

## 1.6. REFERÊNCIAS

ABSHENAS, J.; MOLAEI, M. M.; DERAKHSHNFAR, A.; GHALEKHANI, N. Chemical Sterilization by Intratesticular Injection of Eugenia Caryophyllata Essential Oil in Dog: A Histopathological Study. *Iranian Journal of Veterinary Surgery*, v.8, n.2, p.9-16, out. 2013.

ACC&D ALIANCE FOR CONTRACEPTION IN CATS AND DOGS. Contraception and Fertility Control in Dogs and Cats. Informação e documentação eletrônica. 2013. Disponível em <<http://www.acc-d.org/docs/default-source/Resource-Library-Docs/accd-e-book.pdf?sfvrsn=0>> Acesso em: 22 nov. 2015.

APPARÍCIO, M. Afecções do sistema genital masculino. In: APPARÍCIO, M.; VICENTE, W. R. R. Reprodução e obstetrícia em cães e gatos. São Paulo: Ed. MedVet, 2015. Cap 10. p. 93 - 104.

AXNÉR, E.; LINDE-FORSBERG, C. Sperm Morphology in the Domestic Cat, and its Relation with Fertility: A Retrospective Study. *Reproduction in Domestic Animal*, v.32, n.3, p. 282-291, jun. 2007.

BRONDANI, J.T.; LUNA, S.P.L.; MINTO, B.W.; SANTOS, B.P.R.; BEIER, S.L.; MATSUBARA, L.M.; PADOVANI, C.R., Validade e responsividade de uma escala multidimensional para avaliação de dor pós-operatória em gatos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.64, n.6, p.1529-1538, dez. 2012.

BRONDANI, J.T.; LUNA, S.P.L.; MINTO, B.W.; SANTOS, B.P.R.; BEIER, S.L.; MATSUBARA, L.M.; PADOVANI, C.R., Validade e responsividade de uma escala multidimensional para avaliação de dor pós-operatória em gatos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.64, n.6, p.1529-1538, dez. 2012.

BUTTLER, E. A. P. Métodos contraceptivos. In: APPARÍCIO, M.; VICENTE, W. R. R. Reprodução e obstetrícia em cães e gatos. São Paulo: Ed. MedVet, 2015. Cap 26. p. 333 - 344.

EVENÄS, J.; MALMENDAL, A.; FORSÉN, S. Calcium. *Current Opinion in Chemical Biology*, v.2, n.2, pp.293-302, abr. 1998.

FAGUNDES, A. K. F.; OLIVEIRA, E. C. S.; TENÓRIO, B. M.; MELO, C. C. S.; NERY, L. T. B.; SANTOS, F. A. B.; ALVES, L. C.; DOUGLAS, R. D.; SILVA JR, 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*, v.81, n.2, p. 230–236, jan. 2014.

FERNÁNDEZ-CUEVAS, I.; MARINS, J. C. B.; LASTRAS, J. A.; CARMONA, P. M. G.; CANO, S. P.; GARCÍA-CONCEPCIÓN, M. A.; SILLERO-QUINTANA, M.

Classification of factors influencing the use of infrared thermography in humans: A review. *Infrared Physics & Technology*, v.71, p. 28 – 55, jul. 2015.

GEREZ, JULIANA R. ; Pinton, Philippe ; CALLU, PATRICK ; GROSJEAN, FRANÇOIS ; Oswald, Isabelle P. ; BRACARENSE, ANA PAULA F.L. .  
Deoxynivalenol alone or in combination with nivalenol and zearalenone induce systemic histological changes in pigs. *Experimental and Toxicologic Pathology*, v.67, n.2, p. 89-98, fev. 2015.

HOWARD, J. G.; BROWN, J. L.; BUSH, M.; WILDT, D. E. Teratospermic and Normospermic Domestic Cats: Ejaculate Traits, Pituitary-Gonadal Hormones, and Improvement of Spermatozoal Motility and Morphology After Swim-Up Processing. *Journal of Andrology*, v.11, n. 3, mai. 1990.

HUNG, Y. C.; CHEN, C. C.; WANG, G. K.; GERNER, P. Calcium chloride prolongs the effects of lidocaine in rat sciatic nerve: 8AP10-3. *European Journal of Anaesthesiology*, v.24, n. , p.105-106, jun. 2007.

IOANNOU, S.; GALLESE, V.; MERLA, A. Thermal infrared imaging in psychophysiology: Potentialities and limits. *Psychophysiology*, v. 51, n.10, p. 951 – 963, jun. 2014.

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.39, p.1746 – 6148, jul. 2011.

JANA, K.; SAMANTA, P. K., Evaluation of single intratesticular injection of calcium choride for nonsurgical sterilization in adult albino rats. *Contraception*, v.73, n.3 p.289 – 300, março. 2006.

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

JANA, K.; SAMANTA, P. K.; GHOSH, D. Dose-dependent response to an intratesticular injection of calcium chloride for induction of chemosterilization in adult albino rats. *Veterinary Research Comunication*. v. 26, n.8, p.651-673, dez. 2002.

JANA, K.; SAMANTA, P. K.; GHOSH, D. Evaluation of single intratesticular injection of calcium chloride for nonsurgical sterilization of male Black Bengal goats (*Capra hircus*): a dose-dependent study. *Animal Reproduction Science*, v.86, n.1-2, p.89 – 108, mar. 2005.

KOGER, L. M. Calcium chloride castration. *Modern Veterinary Practice*, v. 59, n.2, p. 119-121, fev. 1978.

LEOCI, R.; AIUDI, G.; SILVESTRE, F.; LISSNER, E. A.; LACALANDRA, G. M.: Alcohol diluent provides the optimal formulation for calcium chloride non-surgical sterilization in dogs. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.56, n.62, p.1-7, out. 2014.a

LEOCI, R.; AIUDI, G.; SILVESTRE, F.; LISSNER, E. A.; MARINO, F.; LACALANDRA, G.M. 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.63, p.1-8, out. 2014.b.

LISSNER, E. Calcium Chloride in male dogs and cats. 2013. Disponível em: <http://www.acc-d.org/research-innovation/products-under-development/calcium-chloride>. Acesso em: 11 outubro 2015.

MEIRA, L. F.; KRUEGER, E.; NEVES, E. B.; NOHAMA, P.; SOUZA, M. A. Termografia na Área Biomédica. *Pan American Journal of Medical Thermology*, v.1, n.1. p. 31-41, jun. 2014.

MENEGASSI, S. R.; BARCELLOS, J. O.; DIAS, E. A.; KOETZ JR, C.; PEREIRA, G. R.; PERIPOLLI, V.; MCMANUS, C.; CANOZZI, M. E.; LOPES, F. G. Scrotal infrared digital thermography as a predictor of seasonal effects on sperm traits in Braford bulls. *International Journal of Biometeorology*, v.59, n.3, p. 357 – 364, mar. 2015.

MORAES, A. N.; MARTINS, A. L.; OLESKOVICZ, N.; BEIER, S. L.; FARIAS, F. H. Castração química de coelhos com cloreto de cálcio associado ou não ao cloridrato de bupivacaína. Seminário de Iniciação Científica, 21, Santa Catarina. Anais... Santa Catarina: Universidade de Santa Catarina. 2011. Disponível em: /<[http://www.udesc.br/arquivos/porta\\_antigo/Seminario21/anais\\_ic\\_cav.pdf](http://www.udesc.br/arquivos/porta_antigo/Seminario21/anais_ic_cav.pdf)>. Acesso em: 07 jul. 2015

NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. Patologia da bolsa escrotal e do testículo. In: \_\_\_\_\_ Patologia da reprodução dos animais domésticos. 2. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. Cap.8. p.91-104.

NÚÑEZ-MARTÍNEZ, I.; MORAN, J. M.; PEÑA, F. J. A three-step statistical procedure to identify sperm kinematic subpopulations in canine ejaculates: changes after cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 41, n.5, p. 408 – 415, out. 2006.

OLIVEIRA, E. C.; MOURA, M. R.; DE SÁ, M. J.; SILVA JR, V. A.; KASTELIC, J. P.; DOUGLAS, R. H.; MARQUES JR., A.P. Permanent contraception of dogs induced with intratesticular injection of a Zinc Gluconate-based solution. *Theriogenology*, v. 77, n. 6, p. 1056 – 1063, abr. 2012.

OLIVEIRA, E.C.S.; FAGUNDES, A.K.F.; MELO, C.C.S.; NERY, L.T.B.; RÊVOREDO, R.G.; ANDRADE, T.F.G.; OLIVEIRA-ESQUERRE, D. E. B .K.; KASTELIC, J.P.; SILVA JR, V.A. 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, Ago. 2013.

PARANZINI, C. S.; CARDOSO, G. S.; SOUZA, A. K.; VIEIRA, A. P.; MARTINS, M. I. M. Scrotal thermography to evaluate the inflammatory reaction after chemical sterilization method in cats. *European Veterinary Society for Small Animal Reproduction Congress*, 19, 2015, Hannover, Alemanha. *Anais ... Hannover: EVSSAR*, 2015.

PEREIRA, V. H. A termografia como auxílio diagnóstico na medicina veterinária. 2012. 58 f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, 2012.

PUKAZHENTHI, B. S.; NEUBAUER, K.; JEWGENOW, K.; HOWARD, J.; WILDT, D. E. The impact and potential etiology of teratospermia in the domestic cat and its wild relatives. *Theriogenology*, v.66, n.1, p. 112-121, jul. 2006.

PUROHIT, R. C.; MCCOY, M. D. Thermography in the diagnosis of inflammatory processes in the horse. *American Journal of Veterinary Research*, v. 41, n.8, p. 1167-1174. 1980.

RINGLER, D. J. Inflamação e reparo. In: JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. *Patologia veterinária*. 6. São Paulo: Ed Manole, 2000. Cap 5. P. 119 – 165.

SILVA, C. A. Avaliação do cloreto de cálcio como método de esterilização intratesticular em cães. 2012. 66f. Dissertação de mestrado – Universidade de Franca, Franca, SP. 2012.

TEBET, J. M. Efeitos da criopreservação sobre a célula espermática em três espécies de felinos : o gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus* – Schreber, 1775), a jaguatirica (*Leopardus pardalis*- Linnaeus, 1758 ) e o gato doméstico (*Felis catus*). 2004. 145f. Tese de doutorado - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu. 2004.

ZAPROUDINA, N.; MING, Z.; HÄNNINEN, O. O. Plantar infrared thermography measurements and low back pain intensity. *Journal of Manipulative & Physiological Therapeutics*, v. 29, n. 3, p. 219 – 223, mar. 2006.

## 2. ARTIGO 2

### **EFFECTS OF 20% $\text{CaCl}_2$ ASSOCIATED TO 0.5% DMSO CHEMICAL CASTRATION IN TOMCATS: INFLAMMATORY REACTION EVALUATION BY INFRARED THERMOGRAPHY**

### **EFEITOS DA CASTRAÇÃO QUÍMICA COM $\text{CaCl}_2$ 20% ASSOCIADO AO DMSO 0,5% EM GATOS: AVALIAÇÃO DA REAÇÃO INFLAMATÓRIA COM TERMOGRAFIA**

#### **RESUMO**

Compostos químicos quando aplicados no testículo causam reação inflamatória local que pode progredir para degeneração testicular causando redução da fertilidade nos machos. Atualmente, a termografia infravermelha pode ser utilizada com eficiência para monitorar a inflamação dos testículos de gatos após a aplicação de substâncias esclerosantes intratesticulares utilizadas como castradores químicos. O objetivo deste estudo foi comprovar a eficácia e viabilidade clínica do cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) 20% associado ao dimetilsulfoxido (DMSO) 0,5% como castrador químico, após aplicação intratesticular em gatos pelas alterações no exame andrológico e histologia testicular, e avaliar por meio da termografia infravermelha a intensidade da reação inflamatória. Neste estudo, seis animais receberam uma aplicação de solução de  $\text{CaCl}_2$  a 20% associado DMSO a 0,5%, por via intratesticular. Os animais foram submetidos à termografia, mensuração testicular, eletroejaculação, análise espermática e a aplicação 0,25mL de  $\text{CaCl}_2$  20% associado ao DMSO 0,5% em cada testículo. Oitenta dias após a aplicação, os gatos foram submetidos novamente a termografia, mensuração testicular, eletroejaculação, análise espermática e orquiectomia. Posteriormente, foi realizada a análise histológica dos testículos. As medidas térmicas da área testicular foram realizadas antes (M0) e após a anestesia (M0A), após eletroejaculação (M0E), 10 minutos (M1), 1 (M2) e 6 horas (M3) após a aplicação da substância, durante 7 dias consecutivos (M4-10), aos 15 (M11), 30 (M12) e aos 80 dias, antes (M13), após a anestesia (M13A) e após a eletroejaculação (M13E). Foi constatada azoospermia e redução de 50% do volume testicular após os 80 dias. No exame histológico, os testículos apresentaram diferentes graus de degeneração, necrose, calcificação e substituição por tecido conjuntivo, além de hiperplasia das células de Leydig em 7/12 testículos avaliados. Nenhum gato apresentou aumento significativo da temperatura testicular ou mudança comportamental. Pode -se concluir que uma única aplicação intratesticular da solução de  $\text{CaCl}_2$  20% associado ao DMSO 0,5% promoveu azoospermia aos 80 dias com mínimas reações adversas, não interferindo no bem-estar animal; e que a termografia é uma técnica fácil, rápida, objetiva, não invasiva e efetiva na detecção e monitoração das mudanças da temperatura testicular de gatos.

**Palavras-chave:** Termografia infravermelha. Testículo. Castração Química. Azoospermia. Controle de natalidade

## ABSTRACT

Chemical compounds when inject into the testes may cause inflammation which can lead to testicular degeneration and reduce male fertility. Infrared thermography can be used effectively to monitor testicular inflammation after intratesticular injection of sclerosing substances used as chemical castration. The aim of this study was to prove the efficacy and clinical viability of 20% calcium chloride ( $\text{CaCl}_2$ ) associated with 0.5% dimethyl sulfoxide (DMSO) as chemical castration after intratesticular injection in tom cats by andrologic exam and testicular histology, and evaluate inflammatory reaction by infrared thermography. For this, six animals received an intratesticular injection of  $\text{CaCl}_2$  20% associated with 0.5% DMSO. Thermographic image, testicular measurement, electroejaculation, sperm analysis and 0.25 ml injection of 20%  $\text{CaCl}_2$  with DMSO 0.5% in each testis was perform. 80 days after the injection, the cats were submitted again to thermography, testicular measurement, electroejaculation, sperm analysis and orchiectomy and subsequently, histological analysis. Testicular area infrared thermography were performed before (M0) and after anesthesia (M0A) after electroejaculation (M0E), 10 minutes (M1) a (M2) and 6 hours (M3) after the application of the substance during 7 consecutive days (M4-10) to 15 (M11), 30 (M12) and after 80 days, before and after anesthesia and after electroejaculation (M13, M13A and M13E). None of the cats had a significant increase in testicular temperature or behavioral change. All animals were azoospermic and had 50% reduction of the total testicular volume after 80 days. Histologically, the testes showed different degrees of degeneration, necrosis, calcification and replacement by connective tissue, as well as Leydig cells hyperplasia in 7/12 of the testes. It can be concluded that a single intratesticular injection with  $\text{CaCl}_2$  20% solution with DMSO 0.5% cause azoospermia after 80 days with minimal adverse reactions and do not interfere on animal welfare; thermography is an easy technique, fast, objective, non-invasive and effective in detecting and monitoring the changes in cats testicular temperature.

**Keywords:** Infrared Thermography. Testes. Chemical Castration. Azoospermia. Birth Control.

## 2.1. Introdução

A preocupação com a superpopulação com animais errantes é mundial, em vista dos maus tratos, riscos de zoonoses, vocalizações do comportamento reprodutivo e multiplicações indesejadas ocasionando aumento populacional.

Diante dessa realidade, observa-se a necessidade de um programa de controle populacional eficiente, com um método de castração simples e humanitário. A castração química, pela aplicação de agentes esclerosantes intratesticulares, é um método promissor e é uma alternativa à orquiectomia, por ser menos invasiva, mais econômica e de mínimos riscos para o animal (OLIVEIRA et al., 2013).

A aplicação de agentes intratesticulares esclerosantes pode promover infertilidade por meio da reação inflamatória local e peroxidação lipídica (JANA; SAMANTA, 2011).

Pesquisas que relatam a eficiência, indicação, local de aplicação da droga (intra epididimária ou intratesticular) e a espécie alvo da castração química, se iniciaram há mais de 30 anos, com o uso da clorexidina (PINEDA; HEPLER, 1981), zinco em cães (FAHIM et al., 1993; OLIVEIRA et al., 2007), em gatos (OLIVEIRA et al., 2013), e em urso (BRITO et al. 2011), o  $\text{CaCl}_2$  em cães (JANA; SAMANTA, 2007; SILVA, 2012; LEOCI, 2014ab), em gatos (JANA; SAMANTA, 2011), em coelhos (MORAES et al., 2011), em cabras (JANA et al., 2005) e em bovinos (KOGER, 1978), solução hipertônica de cloreto de sódio (20%) em bovinos (ANDRADE NETO, 2014) e em ratos (EMIR et al., 2008), o cloreto de cádmium em cordeiros (LYMBEROPOULOS et al., 1999), e o óleo de cravo em cães (ABU-AHMED, 2013).

Há disponível no mercado, várias apresentações de gluconato de zinco, porém diversos países não possuem regulamentação para comercialização deste produto (LISSNER, 2013), diferentemente do  $\text{CaCl}_2$  que é um sal, disponível em diversos países. Leoci et al. (2014a) constataram a duração a longo prazo da ação do  $\text{CaCl}_2$  20% diluído em etanol 96% e desde então ganhou popularidade e a preferência das organizações promotoras de campanhas de controle populacional em massa como a *Parsemus Foundation*, California, EUA.

Devido a alteração no fluxo sanguíneo causado pela reação inflamatória, secundária a castração química, há alteração da temperatura superficial escrotal, e a termografia infravermelha, é eficiente para monitorização da reação inflamatória

testicular imediata causada pela aplicação intratesticular de  $\text{CaCl}_2$  em gatos (PARANZINI et al., 2015).

O objetivo deste estudo foi avaliar e monitorar a reação inflamatória ocasionada pela aplicação intratesticular do cloreto de cálcio 20% associado ao DMSO 0,5% utilizando a termografia, e comprovar sua eficácia como castrador químico por meio do exame andrológico e avaliação histológica das reações testiculares 80 dias após a aplicação.

## **2.2. Material e Métodos**

### **2.2.1. Aspectos éticos**

Trata-se de um estudo prospectivo realizado de acordo com os princípios éticos de pesquisa em animais e sob a anuência da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UEL) da Universidade Estadual de Londrina – PR, circular 075/2014, conforme anexo A.

### **2.2.2. Solução de cloreto de cálcio**

A solução do cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) em concentração de 20% em 0,5% dimetilsulfóxido (DMSO) 0,5% foi preparada por laboratório comercial (JA Saúde Animal Ltda, Patrocínio Paulista, SP, Brasil).

### **2.2.3. Animais e Local**

Foram utilizados seis gatos machos, adultos, sem raça definida, com peso variando de 3,2 a 4 Kg ( $3,6 \pm 0,41$  Kg), provenientes de ONGs. Os animais foram alojados em gatil por 15 dias, alimentados com ração *premium* duas vezes ao dia, com água a vontade.

O experimento foi realizado de julho a outubro de 2015, no Paraná, Brasil ( $23^\circ 08'47''$  sul e  $51^\circ 19'11''$  oeste), período de inverno e primavera, em clima subtropical úmido mesotérmico, com chuvas o ano todo e temperatura média anual de  $20^\circ\text{C}$ , com a máxima registrada para esse período de  $37,4^\circ\text{C}$  e a mínima de  $9^\circ\text{C}$  (Fonte: IAPAR, 2015).

#### 2.2.4. Grupo experimental

Os animais foram submetidos a termografia, mensuração testicular, análise das espículas penianas, eletroejaculação e a aplicação de 0,25mL de CaCl<sub>2</sub> 20% associado ao DMSO 0,5% em cada testículo. Oitenta dias após a aplicação, os gatos foram submetidos novamente a termografia, mensuração testicular, análise das espículas penianas, eletroejaculação e orquiectomia. Os testículos foram fixados em formol tamponado durante 24 horas e preservados em álcool 70°.

Para realização dos procedimentos, os animais foram submetidos a jejum sólido de 8 horas e hídrico de 6 horas. A anestesia foi realizada com cetamina (12 mg/Kg - Dopalen<sup>®</sup>, Ceva, Brasil) associado a medetomidina (30µg/Kg – Dorbene vet<sup>®</sup>, Zoetis, França), intramuscular. Quando necessário, foram realizadas doses complementares com cetamina (4 mg/Kg - Dopalen<sup>®</sup>, Ceva, Brasil), intravenosa. No dia da aplicação do castrador químico, as anestésias foram revertidas com ioimbina (1mg/Kg, farmácia de manipulação, Drogavet, Brasil), após o procedimento. A analgesia, nas duas fases do experimento, foi realizada com a aplicação do meloxicam (0,2mg/Kg, Maxican<sup>®</sup>, Ourofino, Brasil).

Os parâmetros vitais como frequência cardíaca, frequência respiratória, coloração de mucosa, tempo de perfusão capilar, intensidade de pulso e pressão arterial, foram monitorados durante todo procedimento, que teve duração de 40 a 60 minutos.

#### 2.2.5. Termografia Infravermelha

As avaliações termográficas foram realizadas com termógrafo Flir<sup>®</sup> (modelo T440, Boston, EUA) após contenção física e/ou química dos animais.

A avaliação termográfica foi realizada sempre a mesma distância dos testículos (60 cm). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada a 23°C e repouso em gatil, por pelo menos 10 horas antes de cada aferição termográfica, seguindo recomendações de Ring e Ammer (2000).

As avaliações fotográficas da área testicular foram realizadas com os animais em decúbito dorsal em 18 momentos, sempre no mesmo horário (entre 9 e 10 horas da manhã) e conforme os momentos especificados na Quadro 1.

Quadro 1. Momentos das aferições termográficas antes e após a aplicação do CaCl<sub>2</sub> com DMSO 0,5% intratesticular.

DIA 0			10 min	1 hora	6 horas	Dia 1 <sup>o</sup> ao 7 <sup>o</sup>	Dia 15	Dia 30	DIA 80		
Antes Anest.	Após Anest.	Após EEJ							Antes Anest.	Após Anest.	Após EEJ
<b>M0</b>	<b>M0A</b>	<b>M0E</b>	<b>M1</b>	<b>M2</b>	<b>M3</b>	<b>M4 - 10</b>	<b>M11</b>	<b>M12</b>	<b>M13</b>	<b>M13A</b>	<b>M13E</b>

\* Anest. – anestesia; EEJ – eletroejaculação; min – minuto.

Para comparação da temperatura da área testicular após a aplicação do fármaco intratesticular, cada animal foi seu próprio controle, por meio da temperatura aferida antes da anestesia (M0). As imagens termográficas foram armazenadas em computador e avaliadas no *Flir quick report software*® (2009).

#### 2.2.6. Biometria testicular

Foram medidos o comprimento (C), largura (L) e espessura (E) de cada testículo, antes da aplicação (M0), aos 30 dias (M12) e aos 80 dias após (M13), utilizando paquímetro digital de aço inox (Kobalt®, modelo 53247, Carolina do Norte, EUA).

Para o cálculo do volume testicular de cada animal, foi aplicada a fórmula: volume testicular (VT) =  $\frac{3}{4} \times \pi \times \frac{C}{2} \times \frac{L}{2} \times \frac{E}{2}$ . O cálculo do volume testicular total (VTT) foi realizado pela somatória das medidas do testículo direito com esquerdo e o resultado apresentado em cm<sup>3</sup>, conforme Tebet (2004).

#### 2.2.7. Colheita de sêmen

A colheita de sêmen foi realizada por eletroejaculação. Após a anestesia, e previamente aos estímulos, o pênis foi exposto para cateterização uretral com cateter 24G acoplado a um microtubo de polipropileno, com tampa de superfície plana de 1,5 mL. Os estímulos elétricos foram produzidos por um eletroejaculador digital (Eletrojet®, Eletrovect® - Brasil) acoplado a uma probe transretal (1 cm de diâmetro e 12 cm de comprimento) com dois eletrodos longitudinais de 3 cm de comprimento, dispostos ventralmente separados por 0,5 cm de distância que foram posicionados no reto logo acima da próstata. O protocolo de estímulos elétricos

aplicado foi sugerido por Howard et al., (1990), modificado, conforme Figura 1. A duração de cada estímulo elétrico foi de 10 segundos.

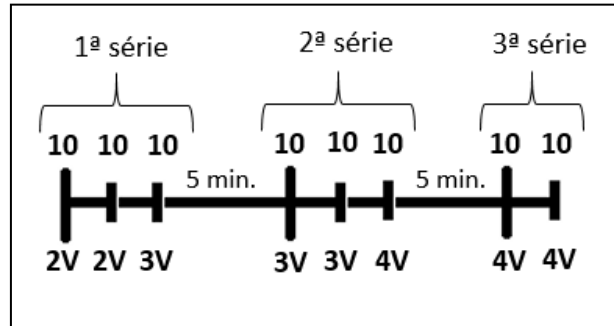


Figura 1: Sequência de séries, quantidade e voltagem dos estímulos utilizados no protocolo de eletroejaculação para colheita de sêmen dos gatos.

#### 2.2.8. Avaliação do sêmen

Os ejaculados foram avaliados para volume, parâmetros cinéticos e morfologia espermática. Os parâmetros cinéticos e concentração, foram avaliados pelo CASA (Computer Assisted Sperm Analyzer, Hamilton-Thorne IVOS, Beverly, MA, USA), previamente ajustado para sêmen felino de acordo com o *setup*, e tipo de câmara evidenciado na Quadro 2. As alterações morfológicas foram avaliadas em esfregaços corados (POPE et al.,1991) pela leitura de 100 células em microscópio óptico no aumento de 1000x e classificadas em defeitos maiores e menores.

Quadro 2: *Setup* utilizado para espécie felina no CASA\*.

Parâmetro	Unidade	Parâmetro	Unidade
Fotos por segundo (Hz)	60	Motilidade Progressiva (%)	50
Número de fotos	30	VAP ( $\mu/s$ )	70
Contraste min.	40	STR (%)	80
Tamanho min. celular (pix)	4	VAP de corte ( $\mu/s$ )	30
Tamanho celular (pix)	5	VSL de corte ( $\mu/s$ )	20
Intensidade celular	50	Temperatura ( $^{\circ}C$ )	35
Motilidade (%)	70	Câmara utilizada	Cell- VU**

\* Hamilthon – Thorne Computer – Aided Semen Analyser (CASA), Versão 10 Ivos (HTR – IVOS Analyser, Hamilthon Thorne Research, Bervely, MA, USA) \*\* DRM–650 Cell–VU slides, Millennium Sciences Inc., Nova York, EUA.

#### 2.2.9. Aplicação intratesticular do cloreto de cálcio

A aplicação foi realizada com seringa de 1 mL e agulha hipodérmica de 27G½. A agulha foi inserida pela região distal (ventro caudal) do testículo, lateralmente a cauda do epidídimo, até a região cranial do testículo. A substância foi vagorosamente depositada, por toda extensão longitudinal testicular, conforme a retirada da agulha, de modo infusional. O volume administrado foi de 0,25mL em cada testículo (JANA e SAMANTHA, 2011). Para aplicação da solução, foi feita antisepsia prévia do escroto, com clorexidina alcoólica.

#### 2.2.10. Avaliação comportamental relacionada a dor

Todos os animais foram mantidos em um gatil institucional por 15 dias para avaliação clínica e termográfica. Diariamente foi realizada palpação dos testículos para sinais de desconforto e avaliação da dor. Durante esse período, foram avaliados atitude geral, postura, vocalização, capacidade de interagir com o ambiente, apetite, característica da pele escrotal, e alterações do tegumento escrotal. Mesmo não pontuando, os itens comportamentais foram avaliados conforme sugerido pela escada validada para dor em felinos de Brondani et al. (2012).

#### 2.2.11. Orquiectomia

Após 80 dias da administração intratesticular do CaCl<sub>2</sub>, todos os gatos foram submetidos a orquiectomia. Foi realizada a técnica de incisão escrotal e utilização das duas pinças, com ligadura do cordão espermático com fio inabsorvível 3-0.

Todos os animais receberam aplicação de 30 mg/Kg de cefazolina por via intravenosa durante o procedimento cirúrgico, e 25mg/Kg de dipirona, a cada 8 horas, por via oral durante 3 dias. O curativo na ferida cirúrgica foi realizado uma vez ao dia, por 7 dias, com clorexidina spray.

### 2.2.12. Avaliação histológica dos testículos

Os testículos foram seccionados longitudinalmente e fixados em formol 10% tamponado por 24 horas. Após, foram imersos em etanol 70% e processados por laboratório comercial. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina e avaliadas em microscópio ótico.

Para esta avaliação, foi considerado degeneração, atrofia e necrose tecidual, a substituição por tecido conjuntivo e o grau de inflamação, do espaço intersticial, células de Leydig e túbulos seminíferos/Sertoli. Para avaliação, foi desenvolvido um escore de lesão tecidual para o testículo, conforme Tabelas no anexo 3. As lesões receberam escores de acordo com sua extensão, que variou 0 a 3 com valor máximo de 30 por tecido avaliado (0: sem alteração; 1: <20%; 2: 20 a 50%; 3: >50%) metodologia proposta por Gerez et al. (2015), modificada.

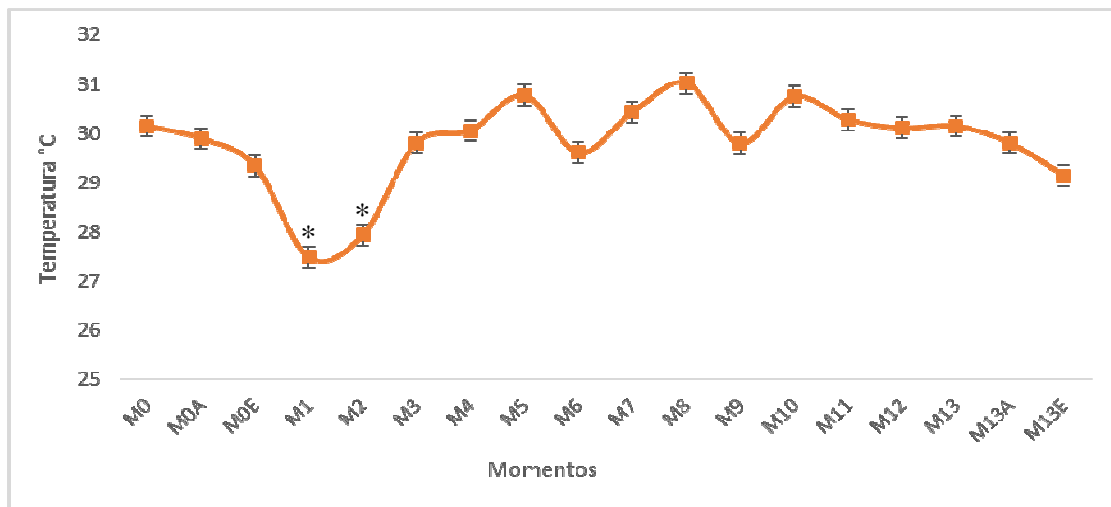
### 2.2.13. Análise estatística

Os dados foram analisados no programa R versão 3.2.2, foi aplicado teste de normalidade Shapiro – Wilk. Foi utilizado o teste T para amostras com distribuição homogênea, e Wilcoxon para amostras com distribuição não homogênea, com nível de significância de 5%,  $p < 0,05$  considerado para o volume testicular e avaliação termográfica antes e após as aplicações intratesticulares. Os resultados da avaliação histológica foram descritos de acordo com a frequência dos achados.

## 2.3. Resultados

### 2.3.1. Avaliação termográfica

A temperatura média aferida dos testículos no M0, M1 e M3 foram 30,15°C, 27,48°C e 29,81°C respectivamente (Figura 2). Os resultados das aferições encontram-se dispostos na Gráfico 1. Não houve aumento significativo da temperatura da área testicular, porém houve queda da temperatura com diferença estatística nos M1 e M2 ( $p=0,03$ ).



\*Importância estatística no momento avaliado em relação ao controle M0 ( $p<0,05$ ).

Gráfico 1: Média da temperatura em graus celsius da área testicular dos seis gatos medida nos 18 momentos avaliados antes e após a aplicação intratesticular de  $\text{CaCl}_2$  20% e 5% DMSO

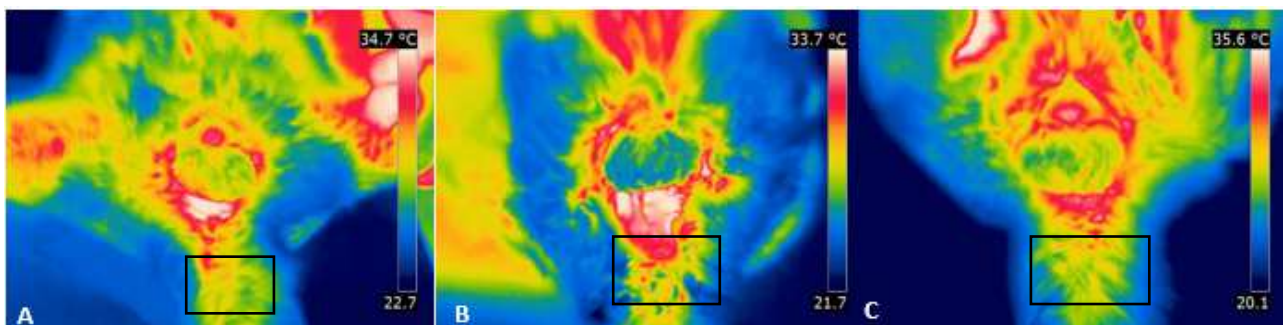


Figura 2: Imagem térmica da área testicular de gatos, aferidos nos momentos M0 (A), M1 (B) e M3 (C) na paleta de cores quentes do termógrafo.

### 2.3.2. Biometria Testicular

Os resultados encontram-se dispostos na Tabela 1. Além de redução do VTT no M13, também foi constatada maior consistência tecidual.

Tabela 1: Volume testicular total (VTT) em cm<sup>3</sup>, nos diferentes momentos (M0, M12 e M13) e a porcentagem de redução 80 dias após a aplicação de CaCl<sub>2</sub> 20% com DMSO 0,5% intratesticular em seis gatos.

<i>ANIMAL</i>	<i>VTT M0</i>	<i>VTT M12</i>	<i>VTT M13</i>	<i>Diferença Entre M0 e M13</i>	<i>% redução</i>
<b>1</b>	1,02	0,68	0,6	0,42	41,0%
<b>2</b>	1,19	0,59	0,53	0,66	55,5%
<b>3</b>	1,13	0,62	0,49	0,64	56,6%
<b>4</b>	2,17	1,31	1,22	0,95	43,8%
<b>5</b>	1,68	0,88	0,81	0,87	51,8%
<b>6</b>	1,3	0,78	0,58	0,72	51,4%
<b>VTT Médio</b>	<b>1,4 ± 0,43<sup>a</sup></b>	<b>0,81 ± 0,26<sup>b</sup></b>	<b>0,7 ± 0,27<sup>b</sup></b>	<b>0,7</b>	<b>50,0%</b>

Letras diferentes indicam diferença estatística entre os dois parâmetros medidos.

### 2. 3.3. Avaliação do sêmen

O volume médio de ejaculado produzido em µL M0 foi 15±10 e em M13 6,2±2,0. Essa diferença, não apresentou importância estatística (p=0,07). No M0 a concentração do ejaculado foi 56,3 ± 21,4 x10<sup>6</sup> de espermatozoides/mL, motilidade total de 65,2±32,6% e motilidade progressiva 44,3±23,2. Ao M13, todos os ejaculados foram azoospérmicos.

Nenhuma amostra de sêmen foi contaminada por urina.

### 2.3.4. Avaliação da clínica geral e da dor

Duas a três horas após retorno da anestesia, os animais já estavam se alimentando e ingerindo água. A palpação testicular foi realizada durante sete dias consecutivos (M4-10), aos M11, M12 e M13, e os animais mostraram-se bem tolerantes e calmos durante o procedimento. Todos os gatos apresentaram testículos firmes a palpação após a aplicação intratesticular com retorno da consistência fibroelástica após três a cinco dias. Atrofia testicular começou a ser notada a partir do décimo dia de forma progressiva até 80 dias.

Durante 15 dias consecutivos, os animais foram avaliados para alterações comportamentais que indicassem dor. Todos os animais apresentavam-se responsivos ao ambiente, ativos, sem alterações de atitude/agressividade, ou perda de apetite. Após retornarem para seus cuidadores, alguns relataram que os gatos estavam mais calmos e caseiros.

Durante todo experimento, não foram observadas alterações no escroto, como sensibilidade a compressão manual ou dermatite.

### 2.3.5. Análise histológica do testículo

Na avaliação histopatológica foram identificadas diferentes lesões e graus de severidade nos testículos, tanto direito quanto esquerdo. Sete testículos avaliados apresentaram hiperplasia das células de Leydig, sendo que em cinco, nenhuma outra alteração no tecido intersticial foi observada. Os resultados, conforme a frequência absoluta dos achados histológicos para os testículos analisados, encontram-se na Tabela 2.

Os escores obtidos entre os tecidos avaliados foi variável e não foi correlacionado com o tamanho do VTT. Em um mesmo animal, a mesma dose e volume, induziram a respostas teciduais diferentes. O escore total para o grupo foi 75. Escores individuais estão listados no Apêndice C.

Tabela 2. Frequência absoluta dos escores das lesões histológicas encontradas 80 dias após a aplicação de CaCl<sub>2</sub> 20% com DMSO 0,5% intratesticular em gatos.

	TS e Sertoli				Tec. Intersticial e Leydig		
	Deg	Nec	Calc	Conj	Infla	Calc	Conj
<b>Normal</b>	0	1	2	2	9	6	6
<b>&lt; 20%</b>	2	5	10	5	3	6	6
<b>20-50%</b>	2	6	0	5	0	0	0
<b>&gt;50%</b>	8	0	0	0	0	0	0

## 2.4. Discussão

Este é o primeiro estudo que utiliza o DMSO 0,5% associado ao CaCl<sub>2</sub> 20% como castrador químico em gatos, que se mostrou eficiente em causar azoospermia em 100% dos animais tratados, 80 dias após sua aplicação. A escolha do CaCl<sub>2</sub> se deu devido a disponibilidade e acesso no mercado, a facilidade em manipulação e custos, já que o intuito é utilizar em programas de controle populacional em massa. A associação com DMSO foi devido a experiência prévia deste grupo de estudo (manuscrito em preparação), em que a associação com lidocaína não foi eficiente em promover azoospermia em gatos e a relatos atuais em que a associação com esclerosantes intratesticulares reduzem reações locais indesejáveis. O DMSO além de ser um ótimo solvente (SANTOS, 2003), possui características como a habilidade em penetrar membranas biológicas e, ação anti-inflamatória e analgésica (JACOB e HERSCHLER, 1986; JACOB e WOOD, 1967). Autores tem explorado a castração química com CaCl<sub>2</sub> em diferentes mamíferos e obtido variados graus de sucesso. Os veículos utilizados normalmente na formulação destas soluções de CaCl<sub>2</sub> é a solução salina (JANA et al., 2005; JANA; SAMANTA, 2006), lidocaína (JANA; SAMANTA, 2011; LEOCI et al., 2014b), bupivacaína (MAORAIS et al, 2011) e etanol 96% (LEOCI et al., 2014a).

Após a aplicação do CaCl<sub>2</sub> 20% com DMSO 0,5% intratesticular, houve aumento da consistência deste órgão por até 24 horas, devido ao aumento da pressão causada pela injeção do líquido no testículo. Esse aumento imediato da consistência também é citado em estudos com a aplicação de CaCl<sub>2</sub> 5, 10 e 20% em gatos (JANA; SMANTA, 2011), 10, 20 e 40% em cabras (JANA et al., 2005), em cães 10, 20, 30 e 60% (LEOCI et al., 2014b); comprovando sua relação com o volume injetado e não ao tipo ou concentração da substância. Neste estudo, em menos de 24 horas, os testículos haviam voltado ao tamanho anterior, porém com consistência mais tenra.

Mesmo relatado na literatura que o edema testicular pode ser notado dentro das 24 horas após a aplicação intratesticular, resultando em dor secundária a distensão, e pode perdurar por 7 a 15 dias (KUTZLER e WOOD, 2006), nesse experimento os animais não exibiram comportamento que denotasse dor, após retorno da anestesia e durante os 15 dias de avaliação, provavelmente, devido a ação antiinflamatória e analgésica do meloxicam, e do DMSO, apresenta meia vida de

24 horas, porém sua ação perdura devido a produção de seu metabólito dimetil-sulfona ( $\text{DMSO}_2$ ), que demora em torno de 96 horas para ser eliminado (LAYMAN; JACOB, 1985). Adicionalmente, através da termografia, não foi verificado aumento significativo da temperatura testicular que ocorre em reação inflamatória.

Foi feita avaliação comportamental diária desses animais para detectar sinais de dor; como alimentação, interação com ambiente, postura, movimentação, agressividade, palpação do local, entre outros. Nenhum animal apresentou sinais de dor. Quanto a palpação dos testículos, os animais se mostraram confortáveis e tranquilos ao procedimento, diferentemente de Moraes et al. (2011) que relataram que coelhos tratados com  $\text{CaCl}_2$  40% com bupivacaína 0,75% não apresentaram alteração comportamental que denotassem dor, analisado por vídeo, porém, alguns manifestaram dor a palpação.

Para realização do exame termográfico com intuito de minimizar interferências e evitar erros de interpretação foi necessário estabelecer protocolo clínico. Para isso, os animais foram recebidos no gatil climatizado a  $23^\circ\text{C}$ , 24 horas antes do início e mantidos por 15 dias. Para a tomadas das medidas em M12 e M13, os animais foram recebidos no gatil a  $23^\circ\text{C}$ , 12 horas antes, para aclimação, e estabelecido horário (entre 9 e 10 horas da manhã), para minimizar a interferência da oscilação da temperatura diária de cada animal, sobre a medida termográfica. Os animais ficaram confinados em gaiolas por pelo menos 40 minutos antes das aferições para evitar que fossem feitos esforços físicos no momento da captura, o que poderia ativar o metabolismo do animal, elevando sua temperatura corporal, e para evitar contato com superfícies frias, como o chão.

A queda da temperatura no M1 ocorreu, devido a temperatura da substância injetada estar em temperatura ambiente ( $23^\circ\text{C}$ ). No M2, a temperatura diminuída foi devido a potencialização do  $\text{CaCl}_2$  pelo DMSO que levou a constrição temporária das arteríolas. Embora não seja comum esse tipo de resposta a lesão tecidual, quando ocorre, muitos capilares que antes transportavam o sangue, entram em colapso, em decorrência de uma diminuição do fluxo e da pressão hidrostática capilar ocasionando lesão tecidual por anóxia (RINGLER, 2000). Em estudo semelhante realizado por essa mesma equipe, essa queda também é notada em M1, com importância estatística, após a aplicação de  $\text{NaCl}$  0,9% e  $\text{CaCl}_2$  20% com lidocaína 1% nos testículos dos gatos, porém, neste mesmo experimento, a

temperatura no M2 (1 hora após a aplicação das substâncias) voltou a subir, não apresentando importância estatística (manuscrito em preparação).

No exame físico não foram notados sinais clínicos de inflamação (dor, rubor, calor, aumento de volume) nos momentos aferidos, comprovando e validando a eficiência da termografia infrevermelha que não acusou aumento significativo das temperaturas aferidas da área testicular. Esta técnica foi eficiente em detectar as oscilações das temperaturas locais, que se mantiveram praticamente estáveis entre M5 – 13, e proporcionou uma avaliação mais objetiva da reação inflamatória.

Na biometria testicular, notou-se redução de 50% do tecido testicular. Resultados semelhantes foram obtidos por Leoci et al. (2014a; 2014b) em cães tratados com CaCl<sub>2</sub> 10, 20, 30 e 60% associado a lidocaína 1% e CaCl<sub>2</sub> 20% com etanol 96%. Adicionalmente, foi observada redução das espículas penianas testosterona dependente em todos os animais, sugerindo que houve redução da testosterona sérica, como o comprovado em estudo com uso de CaCl<sub>2</sub> 20% com lidocaína 1% em gatos (JANA; SAMANTA, 2011).

Na orquiectomia, foi notado que nenhum animal apresentou aderência do testículo na túnica vaginal. Em um estudo realizado por essa mesma equipe (manuscrito em preparação), os animais que receberam injeção intratesticular de CaCl<sub>2</sub> 20% associado a lidocaína 1%, tiveram aderência do testículo a túnica, notado no momento da orquiectomia, 60 dias após a aplicação. A ação anti-inflamatória e analgésica do DMSO e, a capacidade de interferir na síntese de colágeno (JACOB e HERSCHLER, 1986; JACOB e WOOD, 1967), contribuiu para diminuição das reações adversas indesejáveis como edema, dor, e provavelmente para que não houvesse aderência do testículo a túnica vaginal. Outras reações adversas que poderiam ser causadas pelo uso do DMSO foram minimizadas, devido à baixa concentração (0,5%) utilizada.

Ao exame histológico do testículo foram observadas alterações severas dos TS em todos os testículos e lesões no tecido intersticial e células de Leydig de 50% dos animais tratados. Jana e Samanta (2011) descrevem resultados semelhantes para as alterações histopatológicas encontradas nos testículos dos gatos tratados com CaCl<sub>2</sub> 5, 10 e 20%. Também, foi notado hiperplasia das células de Leydig 80 dias após a aplicação intratesticular do CaCl<sub>2</sub> 20% com DMSO 0,5% em sete testículos avaliados, embora cinco não tenham apresentado qualquer alteração no

tecido intersticial visível a microscopia ótica, todos apresentaram diferentes graus de lesão no TS e células de Sertoli. Justifica-se que após a lesão testicular, há proliferação compensatória das células de Leydig (VANNUCCHI et al., 2015) devido alteração das relações parácrinas entre as células de Sertoli e Leydig, pela perda das células germinativas e atrofia testicular (FOSTER et al., 2001), a fim de reestabelecer a produção da testosterona (JONES et al., 2000).

Para aplicação do  $\text{CaCl}_2$  com DMSO, foi realizada anestesia como método de contenção, para facilitar a aplicação e evitar extravasamentos, e para colheita de sêmen por eletroejaculação (EEJ). Mesmo a dose de medetomidina ( $30\mu\text{g/Kg}$ ) sendo menor que a relatada na literatura ( $100\mu\text{g/Kg}$ ) (FILLIERS et al., 2010) em associação com a cetamina, foi efetiva em proporcionar relaxamento adequado e analgesia permitindo realizar o protocolo de eletroejaculação, que durou aproximadamente entre 40 a 60 minutos por animal. O protocolo anestésico instituído foi seguro, sem alteração dos parâmetros fisiológicos aferidos, exceto vasoconstrição temporária, minutos após a sua aplicação o que levou a coloração arroxeada da mucosa peniana.

Embora o experimento tenha sido realizado no final do inverno e início da primavera, pode-se observar na avaliação seminal antes da aplicação do  $\text{CaCl}_2$  com DMSO que cinco dos animais apresentaram parâmetros de fertilidade dentro do considerado normal para espécie (PUKAZHENTHI et al., 2006), sendo que apenas um animal apresentou teratospermia. Aos 80 dias, notou-se acentuada queda do volume seminal produzido, e a avaliação espermática revelou azoospermia em todos os animais do grupo experimental comprovando a influência do  $\text{CaCl}_2$  20% e DMSO 0,5% na produção espermática. Jana; Samanta (2011), relatam diminuição na contagem de células espermáticas em gatos 60 dias após a aplicação de  $\text{CaCl}_2$  (5, 10 e 20%) com lidocaína 1%. Leoci et al. (2014b) relatam queda no volume espermático em cães tratados com  $\text{CaCl}_2$  10, 20, 30 e 60% com lidocaína 1%, sem importância estatística, oligoespermia em animais tratados com  $\text{CaCl}_2$  10% e azoospermia nas concentrações 30 e 60%. Todos os cães tratados com as diferentes concentrações de  $\text{CaCl}_2$ , tiveram redução de 50% do VTT. Com relação a diminuição da testosterona, todos os animais voltaram a aumentar 12 meses após a aplicação, exceto no grupo tratado com  $\text{CaCl}_2$  60%.

Leoci et al. (2014a) sugerem que  $\text{CaCl}_2$  nas concentrações de 10, 20 e 30% associado com lidocaína 1% tem caráter reversível, 6 meses após a aplicação intratesticular, e que quando  $\text{CaCl}_2$  associado a outra substância que potencializa sua ação, como o etanol 96%, a destruição causada no parênquima testicular é irreversível, conferindo esterilização permanente nesses animais. As alterações causadas pelo DMSO nesse experimento, foram tão intensas como a do etanol no estudo citado acima, porém, este experimento teve duração de 80 dias. Comparando os resultados de Leoci et al. (2014a; 2014b), acredita-se que o DMSO pode causar lesões testiculares duradouras, levando os animais tratados a esterilidade permanente.

Não foi notada dermatite escrotal em nenhum animal, após a aplicação intratesticular do  $\text{CaCl}_2$  20%, contraditoriamente ao que tem sido notado quando utilizado gluconato de zinco (OLIVEIRA, et al., 2012). Adicionalmente, os animais não apresentaram sinal clínico sistêmico após a administração do fármaco.

A castração não cirúrgica em cães e gatos, tanto permanente como a reversível, é uma opção que merece atenção do mercado pet, com grande potencial devido ao grande número de animais existente no mundo. As pesquisas em castração química são destinada principalmente as ONG e Agências Governamentais comprometidas com o controle de animais errantes, porém, proprietários de animais de estimação cada vez mais esperam novas opções do mercado para o controle da fertilidade de seus animais.

## **2.5. Conclusão**

O  $\text{CaCl}_2$  20% com DMSO 0,5%, em uma única aplicação, quando administrado intratesticular, é eficiente em interromper a fertilidade em machos ocasionando azoospermia e suprimindo a produção da testosterona sérica por 80 dias. Por isso é considerado uma excelente alternativa a orquiectomia, a ser empregada nos programas de controle de população em massa.

Pelo método da termografia, foi possível concluir que esse composto químico causa mínimas reações inflamatórias, não comprometendo o bem estar animal.

## 2.6. Referências

ABU-AHMED, H. M. Chemical Sterilization of Dogs using Single Bilateral Intratesticular Injection of Calcium Chloride or Clove Oil. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*, v.45, n.1, p.26-32, 2015.

ANDRADE NETO, O. A. Intratesticular hypertonic sodium chloride solution treatment as a method of chemical castration in cattle. *Theriogenology*, v.82, n. 7, p. 1007 – 1011, out. 2014.

BRITO, L. F. C.; SERTICH, P. L.; RIVES, W.; KNOBBE, M., DEL PIERO, F.; STULL, G. B. Effects of intratesticular zinc gluconate treatment on testicular dimensions, echodensity, histology, sperm production, and testosterone secretion in American black bears (*Ursus americanus*). *Theriogenology*, v.75, n.8, p.1444 –1452, maio. 2011.

BRONDANI, J.T.; LUNA, S.P.L.; MINTO, B.W.; SANTOS, B.P.R.; BEIER, S.L.; MATSUBARA, L.M.; PADOVANI, C.R., Validade e responsividade de uma escala multidimensional para avaliação de dor pós-operatória em gatos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.64, n.6, p.1529-1538, dez. 2012.

EMIR, L.; DADALI, M.; SUNAY, M.; EROL, D.; CAYDERE, M.; USTÜN, H. Chemical castration with intratesticular injection of 20% hypertonic saline: A minimally invasive method. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, v.26, n.4, p.392-396. 2008.

FAHIM, M. S.; WANG, M.; SUTCU, M. F.; FAHIM, Z.; YOUNGQUIST, R. S. Sterilization of dogs with intra-epididymal injection of zinc arginine. *Contraception* v.47, n.1, p.107– 122, jan.1993.

FILLIERS, M.; RIJSSELAERE, T.; BOSSAERT, P.; ZAMBELLI, D.; ANASTASI, P.; HOOGEWIJS, M.; VAN SOOM, A. In vitro evaluation of fresh sperm quality in tomcats: A comparison of two collection techniques. *Theriogenology*, v.74, n.1, p.31-39, jul. 2010.

FOSTER, P. M.; MYLCHREEST, E.; GAIDO, K. W. & SAR, M. Effects of phthalate esters on the developing reproductive tract of males rats. *Human Reproduction Update*, v.7, n.3, p. 231–235, mai. 2001.

GEREZ, JULIANA R. ; Pinton, Philippe ; CALLU, PATRICK ; GROSJEAN, FRANÇOIS ; Oswald, Isabelle P. ; BRACARENSE, ANA PAULA F.L. . Deoxynivalenol alone or in combination with nivalenol and zearalenone induce systemic histological changes in pigs. *Experimental and Toxicologic Pathology*, v.67, n.2, p. 89-98, fev. 2015.

JACOB, S. W.; HERSCHLER, R. Pharmacology of DMSO. *Cryobiology*, v.23, p.14 - 27, fev. 1986.

JACOB, S. W.; WOOD, D. C., Dimethyl sulfoxide (DMSO) toxicology, pharmacology, and clinical experience. *The American Journal of Surgery*, v.114, n.3, p.414-426, set.1967.

JANA, K. 5<sup>th</sup> International Symposium on Non-Surgical Contraceptive Methods of Pet Population Control “ Target: The gonads – Inactivation and/or destruction of gonadal stem cells ”. 2013. Disponível em: <http://www.authorstream.com/Presentation/ACCandD-1867631-slide-rec/>. Acesso em: 11 outubro 2015.

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.39, p.1746-1648, jul. 2011.

JANA, K.; SAMANTA, P. K., Evaluation of single intratesticular injection of calcium choride for nonsurgical sterilization in adult albino rats. *Contraception*, v.73, n.3 p.289 – 300, março. 2006.

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

JANA, K.; SAMANTA, P. K.; GHOSH, D. Evaluation of single intratesticular injection of calcium chloride for nonsurgical sterilization of male Black Bengal goats (*Capra hircus*): a dose-dependent study. *Animal Reproduction Science*, v.86, n.1-2, p.89 – 108, março 2005.

KOGER, L. M. Calcium chloride castration. *Modern Veterinary Practice*, v. 59, n.2, p. 119-121, fev. 1978.

KUTZLER, M.; WOOD, A. Non-surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology*, v.66, n.3, p.514–525, ago. 2006.

LAYMAN, D. L.; JACOB, S. W. The absorption, metabolism and excretion of dimethyl sulfoxide by rhesus monkeys. *Life Science*, v. 37, n. 25, p. 2431 – 2437, dez. 1985.

LEOCI, R.; AIUDI, G.; SILVESTRE, F.; LISSNER, E. A.; LACALANDRA, G. M.: Alcohol diluent provides the optimal formulation for calcium chloride non-surgical sterilization in dogs. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.56, n.62, p.1-7, out. 2014a.

LEOCI, R.; AIUDI, G.; SILVESTRE, F.; LISSNER, E. A.; MARINO, F.; LACALANDRA, G.M. 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.63, p.1-8, out. 2014b.

LISSNER, E. Calcium Chloride in male dogs and cats. 2013. Disponível em: <http://www.acc-d.org/research-innovation/products-under-development/calcium-chloride>. Acesso em: 11 outubro 2015.

LYMBEROPOULOS, A.G.; KOTSAKI-KOVATSI, V. P.; TAYLOR, A. Effects of cadmium chloride administration on the macroscopic and microscopic characteristics of ejaculates from chios ram-lambs. *Theriogenology*, v.54, n.7, p. 1145-1157, out. 2000.

MORAES, A. N.; MARTINS, A. L.; OLESKOVICZ, N.; BEIER, S. L.; FARIAS, F. H. Castração química de coelhos com cloreto de cálcio associado ou não ao cloridrato de bupivacaína. Seminário de Iniciação Científica, 21., Santa Catarina. Anais... Santa Catarina: Universidade de Santa Catarina. 2011. Disponível em: /<[http://www.udesc.br/arquivos/porta1\\_antigo/Seminario21/anais\\_ic\\_cav.pdf](http://www.udesc.br/arquivos/porta1_antigo/Seminario21/anais_ic_cav.pdf)>. Acesso em: 07 julho 2015.

OLIVEIRA, E. C. S.; MOURA, M. R.; SILVA JR., V. A.; PEIXOTO, C. A.; SARAIVA, K. L. A.; SÁ, M. J. C.; DOUGLAS, R. H.; MARQUES JR., A.P. Intratesticular injection of a zinc-based solution as a contraceptive for dogs. *Theriogenology* v.68, n.2, p.137–145, jul.2007.

OLIVEIRA, E. C.; MOURA, M. R.; DE SÁ, M. J.; SILVA JR, V. A.; KASTELIC, J. P.; DOUGLAS, R. H.; MARQUES JR., A.P. Permanent contraception of dogs induced with intratesticular injection of a Zinc Gluconate-based solution. *Theriogenology*, v. 77, n. 6, p. 1056 – 1063, abr. 2012.

OLIVEIRA, E.C.S.; FAGUNDES, A.K.F.; MELO, C.C.S.; NERY, L.T.B.; RÊVOREDO, R.G.; ANDRADE, T.F.G.; OLIVEIRA-ESQUERRE, D E B K.; KASTELIC, J.P.; SILVA JR, V.A. 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, ago. 2013.

PARANZINI, C. S.; CARDOSO, G. S.; SOUZA, A. K.; VIEIRA, A. P.; MARTINS, M. I. M. Scrotal thermography to evaluate the inflammatory reaction after chemical sterilization method in cats. European Veterinary Society for Small Animal Reproduction Congress, 19, 2015, Hannover, Alemanha. *Anais ... Hannover: EVSSAR*, 2015.

PINEDA; M. H.; HEPLER, I. Chemical vasectomy in dogs. long-term study. *Theriogenology*, v.16, n.1, p.1-11, jul. 1981.

POPE, C.E., ZHANG, Y.Z., DRESSER, B.L. A simple staining method for evaluating acrossomal status of cat spermatozoa. *Journal Zoo Wildlife Medicine*, v.22, n.1, p.87-95, 1991.

PUKAZHENTHI, B. S.; NEUBAUER, K.; JEWGENOW, K.; HOWARD, J.; WILDT, D. E. The impact and potential etiology of teratospermia in the domestic cat and its wild relatives. *Theriogenology*, v.66, n.1, p. 112-121, jul. 2006.

R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RING, E. F. J., AMMER, K. The Technique of Infra red Imaging in Medicine. *Thermology international*, v.10, n.1, p.7-14, 2000.

RINGLER, D. J. Inflamação e reparo. In: JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. *Patologia Veterinária*. 6ª ed. São Paulo: Ed. Manole. 2000. Cap.5, p.133.

ROE, F. J. C.; DUKES, C. E.; CAMERON, K. M.; PUGH, R. C. B.; MITCHLEY, B. C. V. Cadmium Neoplasia: Testicular Atrophy and Leydig Cell Hyperplasia and Neoplasia in Rats and Mice Following the Subcutaneous Injection of Cadmium Salts. *British Journal of Cancer*, v. 18, n.4, p. 674 – 681, dez. 1964.

SANTOS, N. C.; FIGUEIRA-COELHO, J.; MARTINS-SILVA, J.; SALDANHA, C. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochemical Pharmacology*, v.65, n.7, p.1035 – 1041, abr. 2003.

SILVA, Renata Cristina Alves. Avaliação do cloreto de cálcio como método de esterilização intratesticular em cães. 2012. 66f. Dissertação de mestrado – Universidade de Franca, Franca, SP. 2012.

TEBET, J. M. Efeitos da criopreservação sobre a célula espermática em três espécies de felinos : o gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus* – Schreber, 1775), a jaguatirica (*Leopardus pardalis*- Linnaeus, 1758 ) e o gato doméstico (*Felis catus*). 2004. 145f. Tese de doutorado - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu. 2004.

# ANEXO

Anexo A: Parecer do comitê de ética.



Universidade  
Estadual de Londrina

## COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 075/2014

Londrina, 26 de Maio de 2014

Prezada Pesquisadora,

A CEUA/UEL reunida em 11 de Dezembro de 2013 avaliou o protocolo do projeto de pesquisa intitulado "Avaliação termográfica da reação inflamatória ocasionada pela administração intratesticular do cloreto de cálcio como método de esterilização em gatos", registrado sobre o processo CEUA nº 29850.2013.38, pesquisa do Centro de Ciências Agrárias, desenvolvido sob sua responsabilidade. Após termos recebido e analisado os aspectos metodológicos solicitados, bem como a documentação referente ao processo ter sido devidamente assinada pela coordenadora do projeto, a CEUA/UEL aprovou o projeto para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 12 gatos machos de 2-6 anos de idade e 1-6 kg. O objetivo deste projeto é investigar através da termografia as alterações ocasionadas pela castração química por cloreto de cálcio intratesticular em gatos. Os gatos serão divididos em dois grupos, os que receberão cloreto de cálcio e os que receberão salina como controle do procedimento. Em específico, será verificada a eficácia da injeção intratesticular de cloreto de cálcio na concentração de 40%; a reação inflamatória imediata induzida pela castração química através da termografia testicular; os níveis de testosterona antes e após a aplicação do cloreto de cálcio; e alterações histológicas do testículo, após 60 dias da castração química. Os protocolos experimentais estão aprovados para execução em 24 meses.

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo de pesquisa aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente,

*Waldiceu Ap. Verri Junior*  
Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior  
Coordenador da CEUA/UEL

Ilma. Sra.

**Profa. Dra. Maria Isabel Mello Martins**

Coordenadora do Projeto

Departamento de Clínicas Veterinárias

Centro de Ciências Agrárias

Com cópia para Sra Égle Maria de Sousa (Chefe da DCA/PROPPG), Diretor(a) do Centro de Ciências Agrárias e Diretor(a) do Hospital Veterinário

# APÊNDICES

Apêndice A: Volume aferido de cada testículo em cm<sup>3</sup> do experimento 1; Grupos NaCl e CaCl<sub>2</sub>; e do experimento 2; CaCl<sub>2</sub> com DMSO 0,5%, antes e após a aplicação intratesticular, e a porcentagem de redução de cada testículo.

Grupo NaCl						
ANIMAL	VT DIREITO			VT ESQUERDO		
	M0	M13	% red	M0	M13	% red
1	0,93	0,53	43	0,80	0,97	- 21,3
2	1,23	0,75	39	2,1	0,85	60
3	0,40	0,52	- 30	0,54	0,68	- 26
4	0,31	0,30	-3,2	0,34	0,59	- 73,5
5	0,91	0,62	31,9	0,90	0,74	18
6	0,86	0,58	32,5	0,71	0,85	- 19,7

Grupo CaCl <sub>2</sub> e Lidocaína 1%						
ANIMAL	VT DIREITO			VT ESQUERDO		
	M0	M13	% red	M0	M13	% red
1	1,02	0,58	43,2	1,06	0,53	50
2	0,49	1	- 50	0,60	1,05	- 75
3	1	0,27	73	0,94	0,29	69,2
4	0,29	0,29	0	0,36	0,31	13,9
5	0,45	0,24	47	0,49	0,14	71,5
6	0,60	0,68	-13,4	0,46	0,92	- 100

Grupo CaCl <sub>2</sub> e DMSO 0,5%						
ANIMAL	VT DIREITO			VT ESQUERDO		
	M0	M13	% red	M0	M13	% red
1	0,54	0,32	41	0,50	0,30	40
2	0,53	0,25	53	0,67	0,28	59
3	0,58	0,26	55	0,55	0,23	59
4	1,22	0,58	53	0,95	0,64	33
5	0,64	0,54	15	1,04	0,27	74
6	0,69	0,29	58	0,69	0,28	60

Apêndice B: Ficha utilizada para classificação histológica das lesões testiculares após a aplicação intratesticular de substâncias esclerosantes.

<b>ARQUITETURA TECIDUAL</b>
<b>TÚBULOS SEMINÍFEROS / SERTOLI INTERSTÍCIO / LEYDIG</b>

<u>DEGENERAÇÃO</u>	0	0
	1	< 20%
	2	20-50%
	3	> 50%

<u>NECROSE</u>	0	0
	1	< 20%
	2	20-50%
	3	> 50%

<u>CALCIFICAÇÃO</u>	0	0
	1	< 20%
	2	20-50%
	3	> 50%

<u>SUBSTITUIÇÃO POR TEC. CONJ.</u>	0	0
	1	< 20%
	2	20-50%
	3	> 50%

<u>INFILTRADO INFLAMATÓRIO</u>	0	0
	1	< 20%
	2	20-50%
	3	> 50%

<u>TIPO INFILTRADO</u>	Monomorfo
	Polimorfo
	Mastocito
	Eosinofilo
	Misto

ID. ANIMAL		
TESTÍCULO	<b>D</b>	<b>E</b>
<b>TS / SERTOLI</b>		
DEGENERAÇÃO		
NECROSE		
CALCIFICAÇÃO		
TEC. CONJ		
INF. INFLAMA		
TIPO INFILT		
<b>INTERS/LEYDIG</b>		
DEGENERAÇÃO		
NECROSE		
CALCIFICAÇÃO		
TEC. CONJ		
INF. INFLAMA		
TIPO INFILT		

Apêndice C: Escore da avaliação histológica dos testículos dos gatos 60 dias após aplicação intratesticular de NaCl 0,9%, CaCl<sub>2</sub> 20% com lidocaína 1% e 80 dias após a aplicação de CaCl<sub>2</sub> 20% com DMSO 0,5%.

EXPERIMENTO 1	GRUPO NACL												GRUPO CACL <sub>2</sub>											
	1		2		3		4		5		6		1		2		3		4		5		6	
ID / ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E
<b>TESTÍCULO</b>	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E
<b>TS/SERTOLI</b>																								
DEGENERAÇÃO	2	2	2	1	3	2	3	2	2	2	1	1	2	1	1	1	2	3	3	2	2	3	1	2
NECROSE	0	0	1	0	1	0	1	1	1	2	0	0	1	1	1	1	0	1	3	2	3	3	0	1
CALCIFICAÇÃO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	2	2	2	0	1
TEC. CONJ.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	3	2	2	2	0	1
INF. INFLAM.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0
<b>TEC. INTERST/LEYDIG</b>																								
DEGENERAÇÃO	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NECROSE	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TEC. CONJ.	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HIPERP. CÉLS. DE LEYDIG							++	+									++			++				
ESCORE INDIVIDUAL	2	2	3	1	4	2	4	3	3	4	1	1	5	4	2	2	2	5	13	12	9	10	1	5
ESCORE GRUPO	30												70											

EXPERIMENTO 2	GRUPO CACL <sub>2</sub> 20% COM DMSO 0,5%											
ID / ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS	1		2		3		4		5		6	
TESTÍCULO	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E	D	E
<b>TS/SERTOLI</b>												
DEGENERAÇÃO	3	2	3	3	3	3	3	3	1	1	2	3
NECROSE	2	2	1	2	2	1	2	1	1	1	2	0
CALCIFICAÇÃO	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1
TEC. CONJUNTIVO	2	2	0	2	2	0	2	1	1	1	1	1
INFILT. INFLAMATÓRIO	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1
<b>TECIDO INTERSTICIAL/LEYDIG</b>												
CALCIFICAÇÃO	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
TEC. CONJUNTIVO	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0
HIPERP. CÉL. DE LEYDIG	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	+	-
ESCORE TOTAL	8	7	4	9	8	4	8	6	4	4	7	6
SOMA DOS ESCORES	75											

Apêndice D. Dose do  $\text{CaCl}_2$  ( $\text{mL}/\text{cm}^3$ ) aplicado e a porcentagem de redução do volume testicular.

<b><math>\text{CaCl}_2</math> 20% + Lidocaína 1%</b>		<b><math>\text{CaCl}_2</math> 20% + DMSO 0,5%</b>	
<b>Dose: <math>\text{ml}/\text{cm}^3</math></b>	<b>% de redução</b>	<b>Dose: <math>\text{ml}/\text{cm}^3</math></b>	<b>% de redução</b>
0,24	<b>50</b>	0,20	<b>53</b>
0,25	<b>-50</b>	0,25	<b>74</b>
0,25	<b>50</b>	0,26	<b>33</b>
0,27	<b>69,2</b>	0,36	<b>58</b>
0,42	<b>- 75</b>	0,36	<b>60</b>
0,42	<b>47</b>	0,37	<b>59</b>
0,50	<b>43,2</b>	0,39	<b>53</b>
0,51	<b>71,5</b>	0,43	<b>55</b>
0,54	<b>- 100</b>	0,45	<b>59</b>
0,56	<b>0</b>	0,46	<b>41</b>
0,69	<b>13,9</b>	0,47	<b>53</b>
0,86	<b>73</b>	0,5	<b>40</b>

Não houve correlação entre a dose injetada e a porcentagem de redução ( $p>0,05$ ).