



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA  
ALLAN RODRIGO DO ROSÁRIO

CASTRAÇÃO QUÍMICA DE CÃES POR MEIO DO USO DO GLUCONATO DE ZINCO  
ASSOCIADO AO DIMETILSULFÓXIDO

BELÉM – PA  
2015



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA

ALLAN RODRIGO DO ROSÁRIO

CASTRACÃO QUÍMICA DE CÃES POR MEIO DO USO DO GLUCONATO DE ZINCO  
ASSOCIADO AO DIMETILSULFÓXIDO

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da  
Amazônia, como parte das exigências do Curso de  
Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia.

Área de Concentração: Saúde e Meio Ambiente para  
obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nazaré Fonseca de Souza.

BELÉM – PA  
2015

---

Rosário, Allan Rodrigo do

Castração química de cães por meio do uso do gluconato de zinco associado ao dimetilsulfóxido. / Allan Rodrigo do Rosário. - Belém, 2015.

53 f.: Il.

Dissertação (Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia) – Universidade Federal Rural da Amazônia, 2015.

Orientador: Nazaré Fonseca de Souza

1. Cães - controle populacional 2. Cães - avaliação seminal  
3. Cães - castração - estresse 4. Gluconato de zinco - medicação 5.  
Dimetilsulfóxido - medicação I. Souza, Nazaré Fonseca de, Orient.  
II. Título.

---

CDD – 636.089510724

ALLAN RODRIGO DO ROSÁRIO

**CASTRACÃO QUÍMICA DE CÃES POR MEIO DO USO DO GLUCONATO DE  
ZINCO ASSOCIADO AO DIMETILSULFÓXIDO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia. Área de Concentração: Saúde e Meio Ambiente para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em: \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Nazaré Fonseca de Souza - Orientadora

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Adriana Maciel de Castro Cardoso (Membro titular)

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

---

Prof. Dr. Leandro Nassar Coutinho (Membro titular)

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

---

Prof. Dr. Sebastião Tavares Rolim Filho (Membro titular)

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

---

Prof. Dr. Washington Luís Assunção Pereira (Membro Suplente)

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA



Dedico este trabalho a minha mãe Raimunda do Rosário, pelo apoio e incentivo ao estudo, à minha namorada Savilly da Silva Coutinho, a minha irmã que Deus me permitiu escolher Gessiane Pereira.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelo dom da vida, que me permitiu me graduar no curso de Medicina Veterinária, o que me possibilitou hoje fazer aquilo que amo, cuidar dos animais.

A minha mãe Raimunda T. do Rosário que sempre me incentivou nos estudos, que não mediu esforços para que eu tivesse uma educação de qualidade.

Ao PPGSPAA que fiz parte ao longo destes 2 anos e 6 meses, durante a obtenção dos créditos e desenvolvimento do meu experimento.

A minha namorada Savilly que desde a graduação e do início da pós esteve ao meu lado, me apoiando e me auxiliando durante todo o decorrer do experimento que sem o apoio dela, este encontraria muito mais obstáculos dos que houveram e foram ultrapassados.

A Gessi que conheci quando já estava na Pós-graduação e que ao longo destes 2 anos de convivência se tornou uma grande amiga, e que sempre se colocou a disposição para me auxiliar, mesmo durante greves, feriados e fins de semana, sempre esteve presente me auxiliando e dando total suporte na execução do experimento.

Ao Daniel, a Marluce e a ASDEPA que me ajudaram com os animais necessários para o projeto sair do papel, tendo paciência, e sendo prestativos.

A minha orientadora Professora Doutora Nazaré Fonseca de Souza, pelos ensinamentos ao longo da graduação e Pós-graduação, que me permitiram estar aqui defendendo este trabalho.

A Médica Veterinária Mestre Maridelzira Betânia, que me auxiliou desde o início do experimento, e que a partir de sua dissertação, surgiu o tema para a minha, e que com seus conhecimentos me deu total suporte e esclareceu minhas dúvidas a cerca do trabalho.

A Médica Veterinária Mestre Marcia Janete, por me ceder o espaço do Projeto Vida Digna, para a realização do experimento, acondicionamento dos cães, coleta de material e análise do mesmo.

Aos Professores Doutores, Sebastião Rolim e Haroldo que me auxiliaram durante a efetuação do experimento, esclarecendo minhas dúvidas, e dando suporte a efetuação do trabalho. E toda a equipe do setor de reprodução (residentes e estagiários) que sempre que eu ia solicitar qualquer material sempre eram solidários e prestativos

Ao Professor Doutor Washington Pereira, que auxiliou na descrição das lamina das patologias dos testículos. E a toda equipe do setor de Patologia (residentes e estagiários) que sempre foram prestativos quando encaminhava o material para processamento, me auxiliando em todo processo.

Ao Professor Leandro e a equipe de residentes, que realizaram os exames de Ultrassonografia nos animais do experimento, sempre prestativos, mesmo com agenda sempre lotada para a utilização da maquina de US.

A todos aqueles que me ajudaram no decorrer deste trabalho, Dona Mariusa, Wallace, Keity, Lilia, cuidando dos cães, auxiliando nas coletas e análise seminais, meus mais sinceros agradecimentos.

“Recolha um cão de rua, dê-lhe de comer e ele não morderá: eis a diferença fundamental entre o cão e o Homem.”

Mark Twain

## RESUMO

As populações de cães semi-domiciliados, errantes e ou abandonados representam um problema de saúde pública e bem estar animal em todo o mundo. Portanto, o presente trabalho buscou avaliar a ocorrência da redução do tempo na ação do Gluconato de zinco associado ao Dimetilsulfóxido, para que o cão fosse considerado estéril, através da aplicação da medicação na cauda do epidídimo. Foram utilizados 10 cães machos, divididos em dois grupos, controle e teste, os quais passaram por um período de adaptação antes do início das coletas. Foram avaliadas as alterações nos parâmetros seminais, na ultrassonografia e histopatologia testicular e realizada mensuração do cortisol sanguíneo, para avaliação do estresse. Os resultados obtidos foram submetidos aos testes estatísticos de ANOVA e Tukey com  $p < 0,05$ . Dentro do grupo teste, houve redução das características físicas seminais, e aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nas patologias espermáticas. As principais lesões presentes na histopatologia foram edema, hemorragia, degeneração em graus diversos, infiltrados linfoplasmocitários de maneira geral e necrose, caracterizando a irreversibilidade do processo. As alterações observadas no exame ultrassonográfico, a partir do aumento da ecogenicidade no grupo teste, demonstrou diferença estatística entre as médias ( $p < 0,05$ ) em todos os dias, quando comparados o grupo controle, validando esse método como diagnóstico para avaliação de alterações em curto espaço de tempo. Em relação à mensuração dos níveis de cortisol, não foi constatado alterações significativas, estando os valores dentro do intervalo normal. A injeção com solução à base de Gluconato de zinco 2,62% + DMSO 0,5% na cauda do epidídimo, foi eficaz em causar a subfertilidade dos cães, exceto em um dos animais, que aos 21 dias após aplicação retornou aos padrões normais de sêmen.

**Palavra-chaves:** Controle populacional. Avaliação seminal. Estresse.

## ABSTRACT

As semi-domesticated, stray and abandoned dogs populations represent a major problem of Public Health and Animal Welfare Worldwide. Therefore, the present work aimed to evaluate the time reduction occurred while zinc gluconate action to associate when Dimethyl sulfoxide, for that dog was considered sterile, through the application of medication in the epididymis tail. Were used 10 male, divided into two groups, checking and testing that went through a period of adaptation before making the top of the collections. Were evaluated as amendments seminal parameters in testicular ultrasonography and histopathology and carried out measurement of blood cortisol, paragraph evaluation of stress. The results obtained were submitted statistical to testicles ANOVA and Tukey with  $p < 0.05$ . Within the test group, there was reduction of seminal physical characteristics and Significant increase ( $p < 0.05$ ) of the sperm pathologies. As major injuries found in histopathology were edema, bleeding, degeneration degrees in miscellaneous, lymphoplasmacytic departed general way and necrosis, featuring the irreversibility of the process. Were observed changes not ultrasound examination showed difference between how statistics average ( $p < 0.05$ ) in all days, when compared the control group and the test group, validating that half as diagnosis paragraph changes assessment short rhythm space. In relation to the measurement of cortisol levels was not found significant changes, with the values within the normal range. Injection solution with a zinc gluconate base 2.62% + 0.5% DMSO in the epididymis tail, was effective on cause of subfertility dogs, except for hum of animals that was 21 days after application returned to regular patterns semen.

**Key word:** Population control. Seminal assessment. Stress.

## LISTA DE ABREVIATURAS

mL – Mililitro.

GZ – Gluconato de Zinco.

DMSO – Dimetilsulfóxido.

mm<sup>3</sup> – milímetro.

sptz – Espermatozoide.

D0 – Dia da aplicação.

D7 – 7 dias após a aplicação.

D14 – 14 dias após a aplicação.

D21 – 21 dias após a aplicação.

Kg – quilo.

mg – miligrama

IM – Intramuscular

ISPA – Instituto da Saúde e Produção Animal

UFRA – Universidade Federal Rural da Amazônia

LABOPAT – Laboratório de Patologia Animal

CEUA – Comitê de Ética para Uso de Animais

CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal

NaCl – Cloreto de Sódio

Mhz – Megahertz

cm<sup>2</sup> - centímetro quadrado

TD – Testículo direito

TE – Testículo esquerdo

ANOVA – Análise de Variância

IP – Intensidade de Pixel

GT – Grupo Teste

GC – Grupo Controle

GZ + DMSO – Gluconato de Zinco + Dimetilsulfóxido

GZ + ARG – Gluconato de Zinco + Arginina

% - Por cento

Pat. Maior – Patologia Maior

Pat. Menor – Patologia Menor

Concent. – Concentração

LH – Hormônio Luteinizante

FSH – Hormônio Folículo-Estimulante

GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofina

Comp. – Comprimento

Aplic. – Aplicação

mcg/dL – micrograma por decilitro

$p < 0,5$  – Índice de significância menor que 5%

Motil. – Motilidade

Vol. – Volume

RLO – Radicais Livres de Oxigênio

PMN - Polimorfonucleares

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Doses de aplicação do Gluconato de Zinco + Dimetilsulfóxido, após a mensuração do diâmetro medial transversal testicular.....40
- Tabela 2** – Relação diâmetro transversal dos testículos direito e esquerdo (cm) x volume (ml) da solução de Gluconato de zinco + Dimetilsulfóxido, de acordo com os grupos controle e teste.....41
- Tabela 3** – Dosagem de cortisol, antes da aplicação e antes da orquiectomia, no grupo controle e no grupo teste.....44
- Tabela 4** – Média e desvio padrão da ecogenicidade da cauda do epidídimo dos cães do grupo controle e grupo teste.....45
- Tabela 5** – Média e desvio padrão das características do sêmen de cães submetidos à aplicação do Gluconato de Zinco + DMSO de acordo como dia da avaliação.....48

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Coleta de sêmen de cão através de massagem digital.....37
- Figura 2:** Mensuração do testículo de cão com paquímetro, submetido à injeção de Gluconato de zinco + DMSO. Localização do maior diâmetro testicular.....39
- Figura 3:** Aplicação intratesticular da solução de gluconato de zinco+DMSO.....39
- Figura 4:** Imagem Ultrassonográfica do testículo de um do cão Grupo Teste: A) Corte transversal antes da aplicação do Infertile®. B) Corte transversal com 7 dias após a aplicação da droga, formação de fibrose.....43
- Figura 5:** Esfregaço de sêmen de cão do Grupo Teste, com patologias espermáticas após aplicação de Gluconato de Zinco + Dimetilsulfóxido. Coloração: Vermelho Congo e Violeta. Aumento de 1000x.....47
- Figura 6:** Foto do testículo de cão do GC, aos 21 dias após a aplicação de NaCl 0,9%.....49
- Figura 7:** Fotomicrografia do epidídimo. Detalhe do ducto epididimário de cão do grupo controle, após 21 dias de aplicação. Massas de espermatozoides no lúmen tubular (seta). Aumento 100x (A), 400x (B).....50
- Figura 8:** Foto do testículo de cão do GT, após 7 dias da aplicação do Infertile®, apresentando grande área de hemorragia e necrose.....50
- Figura 9:** Fotomicrografia de epidídimo de cão do grupo teste aos 21 dias, A) com presença de macrófagos, necrose de coagulação, cariólise, lipofuscina seróide. B) ausência de spz dentro dos túbulos e presença de vacúolos. Aumento de 100x.....51

# SUMÁRIO

## RESUMO

## ABSTRACT

<b>1 CONTEXTUALIZAÇÃO</b> .....	16
<b>1.1 OBJETIVOS</b> .....	17
1.1.1 Geral.....	17
1.1.2 Específicos.....	17
<b>1.2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
1.2.1 Importância da castração química.....	18
1.2.2 Os Testículos.....	18
1.2.3 Gluconato de Zinco.....	19
1.2.4 Dimetilsulfóxido (DMSO).....	21
1.2.5 Exame Andrológico e Coleta de Sêmen.....	22
1.2.6 Avaliação do estresse através do Cortisol.....	24
1.2.7 Exame ultrassonográfico.....	26
1.2.8 Histopatologia.....	26
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	28
<b>2. CASTRAÇÃO QUÍMICA DE CÃES POR MEIO DO USO DO GLUCONATO DE ZINCO ASSOCIADO AO DIMETILSULFÓXIDO</b> .....	34
<b>2.1. INTRODUÇÃO</b> .....	34
<b>2.2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	35
2.2.1 Aspectos Éticos.....	35
2.2.2 Animais e local da pesquisa.....	35
2.2.3 Exame Andrológico.....	35
2.2.4 Grupos de Animais.....	37
2.2.4.1 Grupo Controle.....	37
2.2.4.2 Grupo Teste.....	37
2.2.5 Aplicação da droga.....	37
2.2.6 Doses aplicadas.....	39
2.2.7 Orquiectomia e Pós Operatório.....	39
2.2.8 Avaliação do Estresse por meio da mensuração do cortisol.....	41
2.2.9 Ultrassonografia Testicular.....	41
2.2.10 Histopatologia.....	42

2.2.11 Análise Estatística.....	42
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
3.1 Avaliação do estresse pela mensuração do cortisol.....	43
3.2 Avaliação ultrassonográfica testicular.....	43
3.3 Avaliação do sêmen.....	44
<b>4 AVALIAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA.....</b>	<b>48</b>
4.1 Grupo controle.....	48
4.2 Grupo Teste.....	49
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>51</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>51</b>

## 1 CONTEXTUALIZAÇÃO

As populações de cães semi-domiciliados, errantes e ou abandonados representam um problema de saúde pública e bem estar animal em todo o mundo (WHO, 1992; WSPA, 1999). Ações para seu controle têm sido centradas em programas de esterilização cirúrgica, posse responsável e legislação específica (CLEVENGER; KASS, 2003; GOMES et. al., 2003).

A condição natural de reprodução pode ser interrompida por diversos motivos. Nos animais de produção, a castração tem sido promovida visando ao ganho de peso, num espaço de tempo mais curto (COSTA et al., 2002) ou a outras vantagens econômicas e de manejo. Nos animais de companhia, a castração pode ser indicada para tratar desvios de comportamento (VINKE et al., 2008), ou para controle populacional, naqueles de vida livre nas áreas urbanas (SHOCHAT et al., 2010). A escolha de uma política que priorize machos ou fêmeas (ou ambos) é determinante para o sucesso da estratégia de controle.

A esterilização cirúrgica apesar de ser uma boa medida para a redução de nascimentos apresenta limitações para a sua execução, como: alto custo, riscos no pós-operatório, ambiente controlado, número reduzido de animais esterilizados por dia e profissionais especializados (SOERENSEN et. al., 2007). Há também rejeição desta técnica por parte de alguns proprietários de cães que a consideram não compatível com o bem estar animal (SOTO, 2003; IMMEGART; THRELFALL, 2000). Estudos também têm destacado a importância para que ocorra a efetividade do programa de esterilização cirúrgica no controle de população animal há necessidade que uma elevada porcentagem de cães seja submetida a este método por um longo período de tempo (AMAKU; FERREIRA, 2009). Tais medidas nem sempre são possíveis de serem efetuadas nos municípios, devido principalmente a elevados custos operacionais, comprometendo assim a sua exequibilidade e eficácia.

Muitas pesquisas estão sendo realizadas na tentativa de tornar os métodos de esterilização mais acessíveis para a população, a fim de reduzir o número de cães que sofrem eutanásia todos os anos.

## **1.1 Objetivos**

### 1.1.1 Geral

Avaliar o tempo e a ação do Gluconato de Zinco associado ao Dimetilsulfóxido com aplicação na cauda do epidídimo, na castração química de cães no município de Belém.

### 1.1.2 Específicos

Avaliar as alterações nos parâmetros do sêmen após a aplicação da droga;

Relatar os níveis de cortisol antes da aplicação e antes da orquiectomia;

Descrever as alterações ultrassonográficas na região da cauda do epidídimo antes e depois da aplicação do produto;

Descrever alterações anatomopatológicas na cauda do epidídimo, causadas pelo tratamento;

## 1.2 Revisão de literatura

### 1.2.1 Importância da castração química

A castração do macho é importante não apenas para o controle de coberturas indesejadas, mas também pela diminuição do comportamento característico, tais como monta, demarcação pela urina e agressividade (OLIVEIRA, 2007).

Técnicas menos invasivas têm sido estudadas, tais como a utilização de agentes esclerosantes no testículo ou epidídimo (FAYRER-HOSKEN et al., 2000). A esterilização química tem sido reportada por vários autores (PINEDA et al., 1977; FAHIM et al., 1993; IMMEGART; THRELFALL, 2000; WANG, 2002).

Pesquisas que envolvem esterilização química de machos são restritas, e um dos fatores está relacionado aos resultados obtidos com a maioria dos agentes esclerosantes, que não resultam em azoospermia e causam irritação ou ulceração do escroto (FAHIM et al., 1993). O zinco tem pH neutro e faz parte da composição do plasma seminal e dos tecidos do trato reprodutor masculino. Além disso, o plasma seminal e os tecidos desta região contêm uma concentração de zinco maior que em qualquer outro órgão (FAHIM et al., 1993). Em baixas concentrações, o zinco é importante para a espermatogênese - incorpora-se ao flagelo das espermátides alongadas e também é encontrado nas fibras densas externas (FAHIM et al., 1993), mas em concentrações elevadas inibe a divisão e replicação das células germinativas e causa fragmentação da membrana celular e do núcleo (FAHIM et al., 1993; BLOOMBERG, 1996).

A castração química com a utilização do gluconato de zinco como princípio ativo, tem sido proposta como mais uma ferramenta para o controle populacional canino em áreas urbanas (TEPSUMETHANON et al., 2005). Dentre as vantagens deste método estão o seu baixo custo, a possibilidade de esterilização de um grande número de animais em um único dia, simplicidade do processo, ausência de pós-operatório e de ambiente controlado para a sua execução. Algumas investigações também têm descrito a elevada aceitabilidade da esterilização química por parte dos proprietários de cães e a compatibilidade com o bem estar animal, pois a estrutura anatômica do testículo é preservada (CEDILLO et al., 2006).

### 1.2.2 Os Testículos

O testículo dos mamíferos é um órgão oval ou arredondado geralmente localizado fora da cavidade abdominal, em uma prega cutânea denominada escroto. Esta localização

testicular é importante na maioria das espécies de mamíferos devido à necessidade de uma temperatura inferior à temperatura abdominal, para a manutenção das funções testiculares (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005). Os testículos apresentam tanto função endócrina quanto exócrina, ambas governadas pelos hormônios gonadotróficos hipofisários. O hormônio folículo estimulante (FSH) está diretamente relacionado com o início e manutenção da atividade gametogênica dos túbulos seminíferos. O hormônio luteinizante (LH) controla a atividade endócrina das células de Leydig, as quais produzem a testosterona, que além de dar suporte à atividade gametogênica, é responsável pelos caracteres sexuais secundários no macho adulto (ASHDOWN; HANCOCK, 1988).

De acordo com alguns autores há correlação positiva entre o peso testicular e a produção espermática (AMANN, 1970; OLAR et al., 1983; FRANÇA; RUSSELL, 1998). Porém, o tamanho testicular não acompanha proporcionalmente o tamanho corporal, ou seja, o investimento somático em massa gonadal é maior em animais de pequeno porte em relação àqueles de maior porte corporal (KENAGY; TROMBULAK, 1986). A quantidade de espermatozoides produzidos é sempre muito maior que o número necessário para a fecundação, e o fato de o tamanho do testículo não necessariamente acompanhar o tamanho corporal é um contribuinte para a economia energética uma vez que animais de grande porte produziram quantidades excessivamente altas de espermatozoides (PAULA, 1999).

Este órgão é revestido externamente por uma cápsula conjuntiva (túnica albugínea) que envia septos para o seu interior, dividindo-o em lóbulos. Nestes lóbulos são encontrados dois compartimentos: o compartimento intersticial ou intertubular, que contém vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, células e fibras de tecido conjuntivo, macrófagos, mastócitos e células de Leydig, e o compartimento tubular onde se encontram os túbulos seminíferos que são constituídos pela túnica própria, epitélio seminífero e lume tubular. Na túnica própria encontram-se as células mióides ou peritubulares, a membrana basal e as fibras colágenas. No epitélio seminífero estão presentes as células de Sertoli e as da linhagem espermatogênica. No lúmen tubular encontra-se o fluido secretado pelas células de Sertoli e os espermatozoides (RUSSEL et al., 1990).

### 1.2.3 Gluconato de Zinco

O zinco tem pH neutro e faz parte da composição do plasma seminal e dos tecidos do trato reprodutor masculino. Além disso, o plasma seminal e os tecidos desta região contêm uma concentração de zinco maior que qualquer outro órgão do corpo (FAHIM et al., 1993).

No sistema imunológico o zinco desempenha papel fundamental, pelo fato das células do sistema imune apresentar altas taxas de proliferação, e o mineral estar envolvido na tradução, transporte e replicação do DNA (BLANC et al., 1991).

A influência direta do zinco no sistema imune acontece devido a este elemento estimular a atividade de enzimas envolvidas no processo de mitose, como a DNA e a RNA polimerase, timidina quinase, desoxiribonucleotidol terminaltransferase e ornitina descarboxilase (DELAFUENTE, 1991; SENA; PEDROSA, 2005). O zinco pode, ainda, afetar o processo de fagocitose dos macrófagos e neutrófilos e interferir na lise celular mediada por células *natural killer* e na ação citolítica das células T (BLANC et al., 1991).

O Gluconato de Zinco provoca uma lesão localizada no testículo com comprometimento do parênquima testicular variando de, diminuição do número de células germinativas à total atrofia, determinando quadro de esterilidade irreversível. Uma aplicação do produto torna totalmente estéreis até 80% dos animais e os 20% restantes tornam-se inférteis, pois apesar de capazes de produzir espermatozóides, o fazem em quantidade e qualidade insuficiente para a fertilização (RHOBIFARMA, 2010 apud DAVID, 2012).

Os produtos utilizando compostos à base de zinco possuem boa tolerância por parte dos animais, sem reações adversas nem efeitos colaterais, afetando somente as células no tecido em que são injetados (TEPSUMETHANON, 2005). Isso se deve à não-toxicidade sistêmica do zinco, tornando processos de intoxicação por excesso raros, sendo mais grave sua deficiência (LEONARD et al., 1987).

A exposição à concentração elevada de zinco leva ao aumento dos leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos estimulados pela presença do mineral (Toxicological..., Atlanta-EUA, 2005). Acredita-se que a injeção intratesticular da solução à base de zinco leva a uma alteração semelhante à observada na orquite auto-imune, processo inflamatório testicular mediado por formação de anticorpos contra os próprios antígenos testiculares do indivíduo. Ocorre lesão no epitélio germinativo com consequente destruição dos espermatócitos, espermátides e espermatozóides o que resulta na esterilidade do animal (MANN & LUTWAK-MANN, 1981).

Em um experimento realizado por Fahim et al. (1993), no qual foi testada a ação de injeção de gluconato de zinco na cauda do epidídimo de cães adultos, foi observada azoospermia aos 90 dias após o tratamento. À avaliação histológica do epidídimo e dos testículos um ano após o tratamento, os mesmos autores observaram atrofia dos túbulos seminíferos, formação de tecido cicatricial e atrofia da rede testicular, além de enrolamento da

cabeça e corpo do epidídimo. Entretanto, a concentração de testosterona plasmática não foi alterada.

Wang (2002), avaliando o efeito de injeção intratesticular de gluconato de zinco em cães com idades entre 2 anos e ½ e 10 meses, observou aspermia, azoospermia ou necrospermia aos 60 dias do início do tratamento em 95% dos animais. O mecanismo de ação da droga foi atribuído ao zinco, que causou atrofia dos túbulos seminíferos com formação de tecido de granulação, o que impediu a migração dos espermatozóides dos túbulos seminíferos para o epidídimo.

#### 1.2.4 Dimetilsulfóxido (DMSO)

Já foram verificadas acima de trinta propriedades farmacológicas e terapêuticas do DMSO as quais resultam da sua capacidade de interagir ou combinar com ácidos nucleicos, carboidratos, lipídeos, proteínas e muitas drogas sem alterar de forma irreversível a configuração molecular (Sojka et al. 1990). Essas propriedades garantem seu reconhecimento como droga das mais versáteis já conhecidas na medicina.

**Penetração e difusão** – A particular habilidade em transpor a pele íntegra, difundindo-se em todos os tecidos e fluídos orgânicos faz do DMSO uma arma poderosa, frequentemente útil no tratamento de lesões localizadas em tecidos densos ou de difícil acesso RAND-LUBY et al., 1996.

**Carreadora** - Devido à intensa capacidade de penetração, muitas substâncias quando associadas ao DMSO podem ser carreadas através das membranas (BRAYTON, 1986; ROSE & HODGSON, 1993; RAND-LUBY et al., 1996. Essa propriedade tem sido utilizada quando as lesões se localizam em tecidos que apresentam dificuldade à penetração.

**Potencializadora** - A propriedade anterior pode ter relações com essa. Ambas devem ser consideradas criteriosamente pelo clínico, antes de administrar a droga, já que podem ser altamente benéficas (BLYTHE et al., 1986; ROSE; HODGSON, 1993) ou maléficas (BRAYTON, 1986).

**Imunomoduladora** - Além de inibir a quimiotaxia de polimorfonucleares (PMN) no espaço pleural, amplia a disponibilidade de receptores na membrana celular, facilitando a interação de antígenos (Sojka et al., 1990).

**Antiinflamatória** - A partir da década de sessenta essa propriedade tem sido considerada miraculosa e vastamente conhecida (BLYTHE, 1986; BRAYTON, 1986), resultando de mecanismos múltiplos (ALSUP; DEBOWES, 1984; SOJKA et al., 1990), entre

os quais são citados: o antagonismo das substâncias originadas da cascata do ácido aracdônico (STONE, 1993) e do fator de agregação plaquetária (BRAYTON, 1986), inibição da infiltração de PMN (ALSUP; DEBOWES, 1984; SOJKA et al., 1990; ROSE; HODGSON, 1993), remoção dos RLO produzidos pelos neutrófilos (BLYTHE et al.1986; SOJKA et al., 1990; HENRY, 1992; PARKS, 1995; MACKAY, 1996; MURRAY, 1996) os quais estão envolvidos na evolução do distúrbio circulatório a caminho da necrose. Apesar dos vários mecanismos citados, o DMSO é mais eficaz na inflamação aguda (ROSE; HODGSON, 1993).

**Vasodilatadora** - É resultante da ação histaminogênica (BRAYTON, 1986; STONE, 1993) e anticolinesterásica (BRAYTON, 1986) somada à vasodilatação no leito capilar subdermal e a desagregação plaquetária que resultam em importante proteção contra lesão isquêmica (BRAYTON, 1986; RAND-LUBY et al., 1996), sendo reconhecida como importante na garantia de enxertos.

**Diurética** - Essa propriedade pode compor o mecanismo pelo qual a droga reverte anomalias neurológicas decorrentes de traumatismos cranianos, sem serem observadas alterações eletrolíticas (BLYTHE et al., 1986; SOJKA et al., 1990) em pacientes normovolêmicos.

**Analgésica** - Deve-se indiretamente à propriedade antiinflamatória, e diretamente ao bloqueio químico da fibra C em nervos aferentes periféricos (STONE, 1993) além da ação central análoga a morfina (ROSENBAUM et al., 1965; WOOD & WOOD, 1975; HAIGLER & SPRING, 1983; BRAYTON, 1986). Por outro lado, essa ação central é postulada não envolver receptores opióides (BRAYTON, 1986).

**Miorrelaxante** - Associado a efeitos tranqüilizante e sedativo, tem sido observado em várias espécies (ROSENBAUM, 1965; BRAYTON, 1986; STONE, 1993). Essa propriedade sem dúvida decorre principalmente do conforto resultante das outras propriedades, ou seja, antiinflamatória e analgésica (STONE, 1993).

### 1.2.5 Exame Andrológico e Coleta de Sêmen

O exame físico completo bem como o trato reprodutivo do cão deve ser avaliado, partindo-se do escroto, testículos, epidídimo, prosseguindo para o pênis e finalmente, examinando-se a glândula prostática e posteriormente as características físicas, morfológicas e microbiológicas do sêmen à fresco (MIES FILHO, 1987; CHRISTIANSEN, 1988; FELDMAN; NELSON, 1996).

Enfermidades nos órgãos reprodutivos de cães têm variados graus de morbidade, mortalidade e sofrem influências do histórico reprodutivo, de tratamentos farmacológicos prévios e de condições ambientais, podendo dessa forma ocorrer variações regionais na incidência de determinadas anormalidades reprodutivas (PREVIATO et al., 2005).

A coleta de sêmen é um procedimento rotineiro na clínica reprodutiva de cães e suas indicações incluem: exame andrológico, inseminação artificial, congelamento ou resfriamento do sêmen e suspeita de afecções prostáticas (JOHNSTON et al., 2001; KUTZLER, 2005). A eleição da técnica de coleta e dos materiais utilizados varia conforme o perfil do cão e a preferência do profissional (KUTZLER, 2005).

O sêmen canino pode ser coletado pelo método da manipulação digital do pênis (ENGLAND, 1999; JOHNSTON et al., 2001; KUTZLER, 2005), que em geral requer condicionamento prévio do cão e/ou presença de uma fêmea em estro. Uma vez que o cão se habitue à coleta por manipulação digital, a presença da fêmea em estro pode ser dispensável (ENGLAND, 1999; JOHNSTON et al., 2001; KUTZLER, 2005). Nos casos em que a coleta de sêmen por manipulação digital não apresenta sucesso, por exemplo, em cães com patologias locomotoras, quadros clínicos dolorosos e ausência de libido, a coleta por eletroejaculação pode ser indicada (JOHNSTON et al., 2001; KUTZLER, 2005).

Comparativamente, a coleta por eletroejaculação apresenta algumas desvantagens em relação à manipulação digital, pois é um procedimento que requer anestesia geral, produz grande volume de fluido prostático, levando a piores resultados para criopreservação (CHRISTENSEN et al., 2011) e resulta em menor número total de espermatozoides no ejaculado, devido ocorrência de ejaculação retrógrada em direção à bexiga (OHL et al., 1994; CHRISTENSEN et al., 2011).

No entanto, alguns estudos apontam que os parâmetros de motilidade, integridade, viabilidade e morfologia espermática dos espermatozoides coletados por eletroejaculação são semelhantes aos observados em coletas por manipulação digital (OHL et al., 1994; CHRISTENSEN et al., 2011), tornando a eletroejaculação uma alternativa viável nos casos em que a coleta por manipulação digital não é possível.

O ejaculado é coletado fracionadamente com o auxílio de um funil de vidro ou plástico que desemboca em tubos graduados (GILL et al., 1970).

O volume é mensurado através da graduação do tubo coletor e a quantidade de ejaculado obtido, pode variar de acordo com a idade, tamanho, frequência de coletas, método e duração das coletas (MIES FILHO, 1987; FELDMAN; NELSON, 1996).

A motilidade é avaliada subjetivamente, colocando-se uma gota de sêmen sobre lâmina aquecida (35-37 °C), sendo esta recoberta por lamínula. O exame é realizado com microscopia óptica, em objetiva de 40x. A avaliação da motilidade espermática é definida como o percentual de espermatozóides móveis de um ejaculado (0-100) (CBRA, 2013).

O vigor também é avaliado subjetivamente, colocando-se uma gota de sêmen sobre lâmina aquecida (35-37 °C), sendo esta recoberta por lamínula e o exame é realizado sob microscopia óptica, em objetiva de 40x e representa a intensidade com a qual as células espermáticas se locomovem. O resultado obtido deve ser expresso em escore de zero a cinco (0-5), conforme o CBRA (2013).

A concentração é determinada por meio de contagem das células espermáticas em Câmara de Neubauer, após diluição de 1:20 em formol salino, e o número de espermatozoides é expresso em  $\text{mm}^3$  (CUNHA, 2008).

Segundo Cunha (2008), uma das metodologias que pode ser utilizada para a avaliação da morfologia espermática é a coloração dos esfregaços de sêmen pelo Vermelho Gongo e Cristal Violeta, e após a coloração, os esfregaços devem ser avaliados em microscopia de campo claro com aumento de 1000x, observando-se as estruturas da cabeça, colo, peça intermediária e cauda (defeitos maiores, relacionados à espermatogênese, de origem testicular e menores, relacionados ao transporte e armazenamento no epidídimo, alteração na técnica, febre, trauma e processo infeccioso). Devem ser avaliadas 200 células espermáticas em cada esfregaço. Os resultados devem ser expressos em porcentagem e registrados individualmente.

Conforme estudo de Cunha (2008), a avaliação de Vivos e Mortos consiste em misturar 1 gota de corante eosina-nigrosina com 1 gota de sêmen *in natura* em uma lâmina pré-aquecida. O esfregaço feito é examinado em microscópio com objetiva de 40x para identificar os espermatozoides vivos (aparecendo sem coloração) e os mortos que absorveram o corante e se tornaram vermelhos (BARTH; OKO, 1989). São contadas 200 células espermáticas de cada amostra.

#### 1.2.6 Avaliação do estresse através do Cortisol

Os seres vivos sobrevivem graças à manutenção de um equilíbrio complexo, dinâmico e harmonioso, denominado homeostase, que é ameaçado quando os organismos são expostos a situações adversas. Nestas situações ocorre uma série de respostas adaptativas que se contrapõem aos efeitos dos estímulos estressantes, na tentativa de restabelecer a homeostasia (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

O estresse pode ser definido como um estado antecipado ou real de ameaça ao equilíbrio do organismo e a reação do mesmo, que visa restabelecer o equilíbrio através de um complexo conjunto de respostas fisiológicas e comportamentais. A manutenção deste estado de equilíbrio, homeostase, é essencial para a vida e é constantemente desafiado por forças internas ou externas. Esses desafios ativam os sistemas sensoriais, através de estímulos interoceptivos, como os produzidos, por exemplo, por mudanças no volume ou osmolaridade do sangue, ou por estímulos exteroceptivos, tais como o cheiro de um predador, desencadeando uma cadeia de respostas que objetivam minimizar os danos para o organismo (ULRICH-LAI; HERMAN, 2009).

É bem conhecido o efeito negativo do estresse sobre o desempenho reprodutivo, mas os exatos mecanismos que controlam esse efeito não estão bem esclarecidos (RAZDAN et al., 2001). Estudos têm demonstrado que estressores ambientais (temperatura, manejo, instalações, social) aumentam a secreção endógena de ACTH que estimula a adrenal produzir cortisol e esteróides sexuais, os quais inibem ou alteram a secreção de hormônios gonadotróficos, causando problemas de infertilidade ou baixa eficiência reprodutiva (HENNESSY; WILLIAMSON, 1983; TSUMA et al., 1996; TSUMA et al., 1998). Por exemplo, estresse causado por privação de alimento, após 48 horas à ovulação, eleva a síntese de cortisol e prostaglandina F<sub>2</sub> $\alpha$  e afeta a motilidade do oviduto e, conseqüentemente, diminui a taxa de clivagem dos embriões e o número de espermatozoides acessórios na zona pelúcida (MBURU et al., 1998; RAZDAN et al., 2001).

As respostas ao estresse são desencadeadas inicialmente pela ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), provocadas pela liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH), pelo hipotálamo, e a subsequente liberação de hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), pela pituitária anterior, e de glicocorticóides pelo córtex da adrenal (VARLEY; STEDMAN, 1994).

A responsividade do eixo HPA ao estresse é, em parte, determinada pela habilidade dos glicocorticóides em regular a liberação de ACTH através de um sistema de retroalimentação negativa. O cortisol exerce um *feedback* negativo sobre a liberação de ACTH, tanto a nível de hipotálamo como da pituitária. No hipotálamo, ele induz a redução do CRH e na hipófise, reduz a quantidade de ACTH em resposta ao CRH. Além da hipófise e de sítios hipotalâmicos, há evidências consideráveis sobre a importância do sistema límbico, do hipocampo, e do córtex frontal na regulação da atividade do eixo HPA. De fato, o hipocampo contém a maior densidade de receptores de corticosteróides no sistema nervoso (SN) (VARLEY; STEDMAN, 1994).

### 1.2.7 Exame ultrassonográfico

A ultrassonografia é um método diagnóstico não invasivo, considerado seguro para o operador, auxiliares e principalmente para os animais, já que não há necessidade de sedação e nem relatos de alterações fisiológicas em função da técnica. Outra vantagem da técnica está na possibilidade de avaliações seriadas e em tempo real (SINGH et al., 2003).

O testículo canino caracteriza-se por ser uma estrutura oval, de ecogenicidade média e ecotextura fina e homogênea e possui túnica albugínea fina, regular e hiperecótica. O mediastino testicular é visualizado como uma estrutura ecogênica linear central, no plano sagital médio, e com um eco central focal, no plano médio transversal. Com frequência, ambos os testículos podem ser visibilizados em um único plano de varredura. A cabeça e a cauda do epidídimo estão localizadas respectivamente nos pólos cranial e caudal do testículo e o corpo pode ser visto dorsal a este. O epidídimo é menos ecogênico que o testículo e às vezes pode parecer anecótico. Sua ecotextura pode se apresentar mais grosseira quando comparada a do testículo (SINGH et al., 2003).

A ecogenicidade e a ecotextura dos testículos de cães é caracterizada por ser homogênea, com padrão regular e ecogenicidade média, semelhante a observada em humanos. Para a execução do exame ultrassonográfico de testículos e epidídimos não é necessária a realização de preparo prévio do paciente, tampouco tricotomia da região testicular. Devem ser obtidas imagens nos planos longitudinal e transversal. Para se realizar as medidas do órgão podem-se utilizar os transdutores de 5,0 ou 7,5 MHz (PUGH et al., 1990).

Vannuchi (2009) efetuou o exame ultrassonográfico dos testículos de cães, decorridos cinco anos do tratamento com a formulação do Infertile® e não constatou a presença de qualquer imagem compatível com neoplasia.

O uso da ultrassonografia como meio diagnóstico vem sendo amplamente estudada visando a determinação de parâmetros confiáveis que determinem a inclusão dos mesmos em programas de reprodução (PECHMAN; EILTS, 1987).

### 1.2.8 Histopatologia

A degeneração do epitélio seminífero constitui a causa mais comum e importante de declínio da fertilidade em machos das espécies domésticas (McENTEE, 1990; NASCIMENTO; SANTOS, 2003). Segundo McEntee (1990) e Nascimento e Santos (2003) existem múltiplas etiologias para a degeneração testicular, dentre as quais se destacam

alterações térmicas, criptorquidismo, edema de bolsa escrotal, dermatite de bolsa escrotal, orquites, deficiência de vitamina A, obstrução epididimária e elevação da temperatura ambiental.

O testículo ou o epidídimo podem se tornar infectados pela via hematogênica, por meio da ascensão de patógenos de qualquer parte do trato urinário ou em consequência de feridas penetrantes. Embora a infecção de um possa ocorrer sem o envolvimento do outro, os microrganismos causadores são os mesmos. A orquite-epididimite é mais comum nos cães do que nos gatos. A infecção bacteriana dos testículos, epidídimos ou escroto causa alterações na espermatogênese, como resultado das propriedades destrutivas dos próprios microrganismos e do edema, inflamação e hipertermia locais (JUBB et al., 1993).

Segundo Oliveira (2007), as alterações histopatológicas testiculares após a aplicação do gluconato de zinco foram caracterizadas como lesão inflamatória aguda, aumento do nível de leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e todos os tipos de linfócitos, edema, necrose, presença apenas de células de sertoli na maioria dos túbulos seminíferos com ausência de espermatogônias, sendo essas alterações maiores em áreas próximas ao local da injeção, o que pode estar relacionado com a concentração da droga no local ou a uma característica físico-química inerente à droga (IMMEGART; THRELFALL, 2000).

Silva et al. (2010) avaliaram o efeito da injeção intratesticular de gluconato de zinco em cães nos primeiros dias subsequentes à injeção, por meio de análise histológica e ultraestrutural. Os achados encontrados por estes autores, associados com os relatados por Oliveira et al. (2007), demonstram que a injeção intratesticular de zinco possui ação mais específica sobre a espermatogênese, seja de forma direta ou por meio do desencadeamento de uma reação inflamatória local e não devido apenas à formação de fibrose que impediria a passagem dos espermatozoides dos túbulos seminíferos para o epidídimo, como sugerido por Wang (2002).

## REFERÊNCIAS

- ALSUP, E.M., DeBOWES, R.M. Dimethyl sulfoxide. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* v.185, p.1011- 1014, 1984.
- AMAKU, M.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F. Dinâmica populacional canina: potenciais efeitos de campanhas de esterilização. *Revista Panamericana de Salud Publica*, v.25, p.300-304, 2009.
- AMANN, R.P. Sperm production rates. In: JOHNSON, A.D., GOMES, W.R., VANDEMARK, N.L. (eds). *The testis*. New York: Academic Press. p. 433-482, 1970.
- ASHDOWN, R.R., HANCOCK, J.L. Anatomia funcional da reprodução masculina, In: *Reprodução Animal*, 4. ed. São Paulo: Manole, cap. 2, p. 7-31, 1988.
- BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames, U.S.A.: Iowa State University Press, p. 285, 1989.
- Blanc P, Wong H, Bernstein MS**. An experimental human model of metal fume fever. *Ann. Intern. Med.*, v. 114, p. 930-936, 1991.
- BLOOMBERG, MS. Surgical neutering and nonsurgical alternatives. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 208, p. 517-519, 1996.
- BLYTHE, L.L., CRAIG, A.M., APPELL, L.H., LASSEN, E.D. Intravenous use of dimethyl sulfoxide (DMSO) in horses: clinical and physiologic effects. *Proceed Annual Conv. Assoc. Equine Pract.* v.32, p. 441-446, 1986.
- BLYTHE, L.L., CRAIG, A.M., CHRISTENSEN, J.M., APPELL, L.H. SLIZESKI, M.L. Pharmacokinetic disposition of dimethyl sulfoxide administered intravenously to horses. *Am. J. Vet. Res.* v.47, p.1739-1743, 1986.
- BRAYTON, C.F. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *Cornell Vet.* v.76-90, 1986.
- CBRA- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte. 2013.
- CEDILLO, V. G.; VARGAS, PINO, F.; MONROY, O.V. Results, of the massive sterilization project using gluconate neutralized with arginine in male dogs living in the States of Hidalgo, Mexico and Puebla, in XVII Rabies in the Americas, Brasília, Brazil, p.15-20, 2006.
- CLEVENGER, J.; KASS, P.H. Determinants of adoption and euthanasia of shelter dogs spayed neutered in the University of California Veterinary student surge: program compared to other shelter dogs. **Journal Veterinary Medical Education**, v.4, p.372-378, 2003.
- CHRISTIANSEN, J. **Reprodução no cão e no gato**. São Paulo: Manole, 1988. 361p.

CHRISTENSEN, B. W.; ASA, C. S.; WANG, C.; et al. Effect of semen collection method on sperm motility of gray wolves (*Canis lupus*) and domestic dog (*C. l. familiaris*). *Theriog.*, v.76, p.975-980, 2011.

COSTA NA, MOURA CARVALHO LOD, LOURENÇO-JÚNIOR JB, TEIXEIRA-NETO JF, SANTOS NFA, MONTEIRO EMM. Ponderal performance of buffaloes chemically castrated, in Belém, Pará State, Brazil. In: Buffalo Symposium of Americas, 1, 2002, Belém, PA. Belém, PA: The American Water Buffalo Association, 2002. Resumo.

CUNHA, I. C. N. JBCA. Exame andrológico do cão. **Jornal Brasileiro de Ciência Animal**. v. 1, n. 1, p. 49-65. 2008.

DAVID, M. B. M., **Avaliação do efeito do gluconato de zinco, na castração química de cães no município de Belém, Pará**. p. 13, 2012. Dissertação (Mestrado em Saúde e Produção animal) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém/PA.

DELAFUENTE, J. C. Nutrients and immune responses. *Rheum. Dis. Clin. North Am.*, v.17, p. 203-212, 1991.

ENGLAND, G. C. W. Semen quality in dogs and the influence of a short-interval second ejaculation. *Theriog.*, v.52, p.981-986, 1999.

FAHIM, M.S; WANG, M; SUTCU M.F.; et al. Sterilization of dogs with intra-epididymal injection of zinc arginine. *Contraception*, v. 47, p. 107-22, 1993.

FAYRER-HOSKEN, RA; DOOKWAH, HD; BRANDON, CI. Immunocontrol in dogs. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 60-61, p. 365-373, 2000.

FELDMAN, E.C., NELSON, R.W. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. Philadelphia: WB Saunders, p.487, 1996.

FRANÇA, L.R., RUSSELL, L.D. The testis of domestic animals. In: Male reproduction. A multidisciplinary overview. Madrid: Churchill Livingstone. p.197-219, 1998.

GILL, H. P.; KANFRAN, C.; FOOTE, R. F.; KIRK, R.W; Artificial insemination of beagle bitches with freshly collected, liquid stored and frozen-stored semen. **American Journal of Veterinary Research**, v.31, p.1807-1813. 1970.

GOMES, H. L.; ALMEIDA, F. M.; PARANHOS, T. N.; GARCIA, C. R. Avaliação de riscos á saúde e intervenção local associadas ao convívio com cães e gatos, Jardim Paraná, Brasilândia. São Paulo, Brasil. **Revista Educação Continuada do CRMV-SP**, v.6, p.83-89, 2003.

HAIGLER, H.J., SPRING, D.D. Comparison of the effects of dimethyl sulfoxide and morphine. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* v.411, p.19-27, 1983.

HENNESSY, D.P. e WILLIANSON, P. The effects of stress and of ACTH administration in hormone profiles, oestrus and ovulation. *Theriogenology*. 20, p.13- 26, 1983.

HENRY, M.M. Hemolytic anemia. In: ROBINSON, N.E. Current therapy in equine medicine. 3. Philadelphia: Saunders. p. 501, 1992.

IMMEGART, H. M.; THRELFALL, W.R. Evaluation of intratesticular injection of glicerol for nonsurgical sterilization of dogs. **American Journal Veterinary Research**, v.5, p.544-549, 2000.

JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V. R.; OLSON, P. N. S. Canine and Feline Therioenology.. Philadelphia: W. B. Saunders, p.592, 2001.

JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N. Pathology of domestic animals. 4.ed. New York: Academic Press, v. 3, p. 747, 1993.

JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO. J. Aparelho Reprodutor Masculino. In: JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO. J. Histologia básica. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 11 ed., cap. 21, p. 323-334, 2005.

KENAGY, G.J., TROMBULAK, S.C. Size and function of mammalian testes in relation to body size. *Journal of Mammalogy*. n.67, v.1, p.1-22, 1986.

KUTZLER, M. A.; Semen collection in the dog. *Theriog.*, v.64, p.747-754, 2005.

LEONARD, A; GERBER, GB; LEONARD, F. Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of zinc. **Mutation Research**, v.168, p.343-348, 1987.

MACKAY, R.J. Endotoxemia. In: SMITH, B.P. Large animal internal medicine. 2oed. St. Louis: Mosby. p.733-742, 1996.

Mann T, Lutwak-Mann C. Male Reproductive Function and Semen. *Themes and Trends in Physiology, Biochemistry and Investigative Andrology*. New York: Springer-Verlag, p. 495,1981.

MBURU J. N.; EINARSSON, S.; KINDAHL, H., MADEJ, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effect of post-ovulatory food deprivation on oviductal sperm concentration, embryo development and hormonal profiles in the pig. *Anim. Reprod. Sci.* 52, p. 221-234, 1998.

McENTEE, K., *Reproductive Pathology of Domestic Mammals*. Academic Press Inc., San Diego, USA, p. 401, 1990.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**, Inseminação artificial nos cães. 6 ed. Porto Alegre: Sulina, p.750, 1987.

MURRAY, M.J. Disorders of the large intestine. In: SMITH, B.P. Large animal internal medicine. 2oed. St. Louis: Mosby. p.723-732, 1996.

NASCIMENTO, E.F.; SANTOS, R.L. *Patologia da reprodução dos animais domésticos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.108, 2003.

OHL, D. A.; DENIL, J.; CUMMINS, C.; MENGE, A. C.; SEAGER, S. W. Electroejaculation does not impair sperm motility in the beagle dog: a comparative study of electroejaculation and collection by artificial vagina. *J. Urol.*, v.152, p.1034–1037, 1994

OLAR, T. T., AMANN, R.P., PICKETT, B.W. Relationships among testicular size, daily production and output of spermatozoa and extragonadal spermatozoa reserves of the dog. *Biology of Reproduction*, v. 29, p. 1114-1120, 1983.

OLIVEIRA, E. C. S. **Esterilização de cães com injeção intratesticular de solução à base de zinco**, p. 21, 2007 (Tese de Doutorado). Escola de Veterinário-Universidade Federal de Minas Gerais-MG.

PARKS, A.H. Postoperative management of horses with colic. In: CICLO INTERNACIONAL DE CÓLICA EQUINA, II, 1995, Jaboticabal. Anais... Jaboticabal: FCAV-UNESP, p.51-53.1995.

PAULA, T.A.R. Avaliação histológica e funcional do testículo de capivaras adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Tese de Doutorado, Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, p. 84, 1999.

PECHMAN, R.D.; EILTS, B.E. B-mode ultrasonography of the bull testicle. *Theriogenology*, v. 27, n. 2, p. 431-441, 1987

PINEDA, AM.H; REIMERS, T.J.; FAULKNER, L.C.; et al. Azoospermia in dogs induced by injection of sclerosing agents into the caudae of the epididymides. *Am. J. Vet. Res.*, v. 38, n. 6, p. 831- 838, 1977.

Previato P. F. G. P, Pinto Neto A, Werner P. R, Acco A, Mota M. F, Silva A. V, et al. Alterações morfológicas nos órgãos genitais de cães e gatos provenientes de Vilas Rurais da região de Umarama-PR. *Arq Ciênc Vet Zool UNIPAR*. v. 8, p.105-10, 2005.

PUGH, C.R. et al. Testicular ultrasound in the normal dog. *Veterinary Radiology*, v. 31, n. 4, p.195-199, 1990.

RAND-LUBY, L., POMMIER, R.F., WILLIAMS, S.T. et al. Improved outcome of surgical flaps treated with topical dimethylsulfoxide. *Ann. Surg.* v.224, n.4, p.583-590, 1996.

RAZDAN, P.; MWANZA, A.M.; KINDAHL, H.; HULTÉN, F.; EINARSSON, S. Impact of postovulatory food deprivation on the ova transport, hormonal profiles and metabolic changes in sows. *Acta Vet. Scand.* 42, p. 15-25, 2001.

ROSE, R.J., HODGSON, D.R. *Manual of equine practice*. Philadelphia: Saunders.1993, 532p.

ROSENBAUM, E.E., HERSCHLER, R.J., JACOB, S.W. Dimethyl sulfoxide in musculoskeletal disorders. *J. Am. Med. Assoc.* v.192, p.309-313, 1965.

RUSSEL, L. D.; ETTLIN, R. A.; SINHAHIKIN, A. P. et al. Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. Clearwater: Cache River Press, p. 286, 1990.

**Sena KCM, Pedrosa LFC.** Efeitos da suplementação com zinco sobre o crescimento, sistema imunológico e diabetes. *Rev. Nutr.*, v.18, n.2, p.251-259, 2005.

**Shochat E, Lerman SB, Anderies JM, Warren PS, Faeth SH.** Invasion, competition, and biodiversity loss in urban ecosystems. *BioScience*, v.60, p.199-208, 2010.

SILVA F.L.M., BRITO, L.T., MULLER P.M., ARAUJO B., SÁ M.J.C., OLIVEIRA E.C.S. Sterilization of dogs with intratesticular injection of a zinc based solution – Histopathological evaluation of acute and chronic phase. **Animal Reproduction**, v.7, p.230, 2010.

SINGH, J.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A. Promise of new image technologies for assessing ovarian function. *Animal Reproduction Science*, v. 78, p. 371-399, 2003.

SOERENSEN, B.; SILVA, P. J. S.; CHRISTHOVÃO, F. G. Vantagens da castração química em comparação com o método tradicional de castração cirúrgica. **Universidade de Marília**, v.1, p.1, 2007.

SOJKA, E.J., KIMMICK, S.V.B., CARISON, G.P. et al. Dimethyl sulfoxide update - New applications and dosing methods. *Proceed. Am. Assoc. Equine Practit.* v.36, p.683-690, 1990.

SOTO, F. R. M. Dinâmica populacional canina no Município de Ibiúna- SP: estudo retrospectivo de 1998 a 2002 referente a animais recolhidos, eutanasiados e adotados. **Dissertação** (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003, 100p.

SOTO, F. R. M.; VIANA, W. G.; SOUSA, A. J; PINHEIRO, S. R; MUCCILOLO, G. B., HOSOMI, F. Y. M; AZEVEDO, S. S; DIAS, R. A. Evaluation of zinc gluconate, either associated or not to dimethyl sulfoxide, as contraceptive method for male dogs. **Animal Reproduction Science**, v.4, n.3/4, p.119-124, Jul./Dec. 2007.

STONE,R.W. Clinical updates on the use of dimethyl silfoxide. *Canine Pract.* v.18, p.16-19, 1993

TEPSUMETHANON, V.; WILDE, H.; HEMACHUDHA, T. Intratesticular injection of a balanced zinc solution for permanent sterilization of dogs. **Journal Medical Association Thailand**, v.88, p.686-689, 2005.

**Toxicological Profiles for Zinc.** Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2005. 307p.

TSUMA, V. T.; EINARSSON, S.; MADEJ, A.; KINDAHL, H.; LUNDEHEIM, N. Effect of food deprivation during early pregnancy on endocrine changes in primiparous sows. *Anim. Reprod. Sci.* 41, p. 267-278, 1996.

TSUMA, V.T.; EINARSSON, S.; MADEJ, A.; FORSBERG, M.; LUNDEHEIN, N. Plasma levels of progesterone and cortisol after ACTH administration in lactating primiparous sows. *Acta Vet. Scand.* 39, p. 71-76, 1998.

Ulrich-Lai YM, Herman J. Neural regulation of endocrine and autonomic stress response. *Nature Reviews – Neuroscience.* v. 10, p.307-409, 2009.

VANNUCHI, C. I. **Laudo de exame ultrasonográfico efetuado no dia 30 de setembro de 2009, na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.** São Paulo: Departamento de Reprodução Animal, 2009.

VARLEY, M.; STEDMAN, R. Stress and reproduction. In: COLE, D.A., Wiseman, J., VALEY, M.A. Eds., Principle of Pig Science. Nottingham University Press, Nottingham, UK. p. 277-296, 1994.

**Vinke CM, van Deijk R, Houx BB, Schoemaker NJ.** The effects of surgical and chemical castration on intermale aggression, sexual behaviour and play behaviour in the male ferret (*Mustela putorius furo*). *Appl Anim Behav Sci*, v.115, p.104-121, 2008.

WANG, M. Neutersol: intratesticular injection induces sterility in dogs. In: Proceedings of the 2002 International Symposium on nonsurgical methods for pet population control. p.62-65, 2002.

WOOD, D.C., WOOD, J. Pharmacologie and biochemical considerations of dimethyl sulfoxide. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* v.243, p.11-12, 1975.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Expert comitee on rabies. Geneva, Switzerland. **WHO**, v. 8, n.87, 1992.

WORLD SOCIETY FOR THE PROTECTION ANIMAL. Stray animal control. USA: **WSPA**, v.53, 1999.

## **2. CASTRAÇÃO QUÍMICA DE CÃES POR MEIO DO USO DO GLUCONATO DE ZINCO ASSOCIADO AO DIMETILSULFÓXIDO**

### **2.1. Introdução**

A Organização Mundial de Saúde aponta que a redução da população canina, especialmente os não domiciliados, pode ser alcançada através da conscientização das pessoas sobre os benefícios da castração (BOGEL, 1990). Diante disso, o estudo de métodos contraceptivos para o controle populacional de cães vem aumentando exponencialmente nos últimos anos, à busca de um método que seja eficaz, rápido, de baixo custo, pouco invasivo, que atenda a toda população e que leve em conta o bem-estar animal (BOGEL, 1990).

Os agentes esclerosantes, quando injetados no parênquima testicular, levam a sua atrofia e decréscimo da espermatogênese, além de promoverem redução da concentração de andrógenos, o que contribui para a diminuição de alterações andrógeno-dependentes, tais como doenças da próstata e alterações de comportamento (OLIVEIRA, 2006). A aplicação da droga no testículo leva a uma resposta sistêmica imune devido à ruptura da barreira de células de Sertoli, além de inflamação local com liberação de antígenos testiculares (JOHNSTON et al., 2001).

Dentre as substâncias utilizadas com essa finalidade, o GZ é a substância que se enquadra nos requisitos de segurança aos animais tratados e para o meio ambiente, eficaz em uma grande porcentagem de animais tratados, e irreversível após um único tratamento (OLIVEIRA et al., 2011). Hawkins (2006) e Levy et al. (2008) relataram a ocorrência de eventos de contracepção nos quais mais de 200 cães são esterilizados em um único dia com Gluconato de zinco, estimulando a pesquisa sobre o uso dessa substância como alternativa aos métodos cirúrgicos de contracepção em cães.

Portanto o presente trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência da redução do tempo na ação do Gluconato de zinco associado ao Dimetilsulfóxido, para que o cão fosse considerado estéril, com a aplicação da medicação na cauda do epidídimo, além de mensurar o estresse do animal através da dosagem de cortisol no sangue, alterações no padrão seminal, na ultrassonografia testicular e na histopatologia.

## **2.2 Material e métodos**

### 2.2.1 Aspectos éticos

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural da Amazônia, sob o número de processo, 23084.016930/2014-10.

### 2.2.2 Animais e local da pesquisa

O experimento foi realizado, no canil experimental do projeto Vida Digna do Instituto de Saúde e Produção Animal (ISPA), no Campus Belém da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), no período de dezembro de 2014 a julho de 2015, sendo fornecido aos animais alimentação à base de ração comercial e água à vontade.

Foram utilizados 10 cães, com idades entre 1 a 5 anos, sem raça definida, porte médio, com peso entre 8 a 16 kg, provenientes dos bairros da Terra Firme e Guamá da cidade de Belém.

Os animais foram selecionados por meio de exame físico criterioso, onde foi dado ênfase à procura de ectoparasitas (pulgas e carrapatos), em razão de comprometer o peso do animal, podendo ocorrer hiporexia (apetite diminuído), doenças venéreas transmissíveis dentre elas Tumor de Sticker, que inviabilizava a participação do mesmo no experimento.

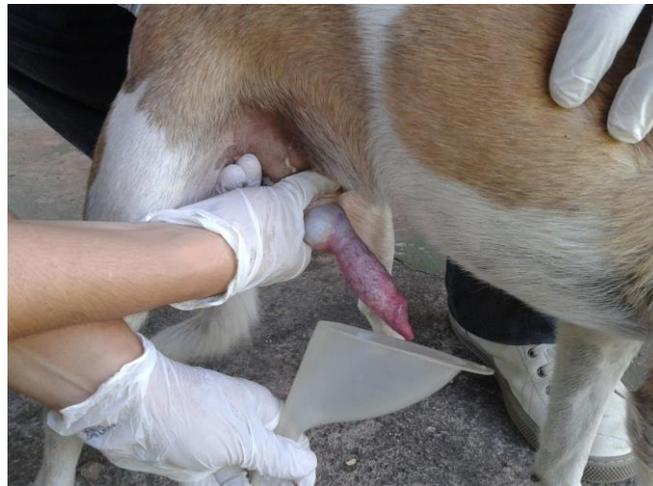
Foi realizado hemograma para detectar possíveis infecções, dentre elas hemoparasitoses, além de anemias. Após obtenção dos resultados laboratoriais e com os animais hígdos, foram realizadas: a vacinação antirrábica e vermifugação (com medicação a base de Pamoato de Pirantel, Praziquantel e Ivermectina). E os animais foram submetidos a um período de duas semanas de adaptação com a nova rotina.

### 2.2.3 Exame Andrológico

Após período de adaptação foram realizadas as coletas de sêmen por meio de massagem digital para avaliação espermática, onde foi massageado o prepúcio do cão na altura do bulbo da glândula, até que o animal atingisse a ereção parcial. O prepúcio foi retraído caudalmente ao bulbo e no pênis foi realizada moderada pressão, posteriormente ao bulbo de acordo com Christiansen, 1988. O ejaculado foi coletado fracionadamente (frações: uretral, rica em espermatozoides e prostática foram divididas com o auxílio de um funil de plástico

que desembocava em tubos graduados (Figura 1). Conforme recomendação do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

Os animais foram submetidos a duas coletas de sêmen em dias diferentes, com intervalo de sete dias, para obtenção de um padrão seminal individual antes da aplicação do (NaCl 0,9% para o GC e GZ + DMSO para o GT), para verificar volume, motilidade, vigor, vivos e mortos, patologias totais (maiores e menores) e concentração, além do aspecto morfológico dos testículos, seguindo as normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).



**Figura 1:** Coleta de sêmen de cão através de massagem digital.

A motilidade foi avaliada, colocando-se uma gota de sêmen sobre uma lâmina pré-aquecida a uma temperatura de (35-37 °C), por uma placa aquecedora, sendo esta recoberta por uma lamínula. O exame foi realizado por meio de microscopia óptica, em objetiva de 40x. A avaliação da motilidade espermática foi definida como o percentual de espermatozoides móveis de um ejaculado (0-100) (CBRA, 2013).

O vigor foi avaliado da mesma forma, porém o resultado foi expresso em uma escala de zero a cinco (0-5), conforme o CBRA (2013).

Foram preparados dois esfregaços em lâminas, para serem corados pelo método de Cerovsky, 1976, para contagem das anormalidades espermáticas, classificadas em menores e maiores, onde foram contabilizadas 200 células.

Para contagem de vivos e mortos, uma gota de sêmen a fresco foi misturada ao corante Eosina-Nigrosina, feito um esfregaço e contabilizando um total de 200 células, sendo observada em microscopia óptica em objetiva de 40x.

A concentração foi determinada através da contagem das células espermáticas na Câmara de Neubauer, após diluição de 1:20 em formol salino e o número de espermatozoides foi expresso em  $\text{mm}^3$ .

#### 2.2.4 Grupos de Animais

Os animais foram divididos em dois grupos: Grupo controle e o Grupo teste, com cinco animais cada, sendo que quatro animais (dois do grupo controle e dois do grupo teste), foram avaliados apenas por 7 dias, através do espermograma e ultrassonografia, antes e após a aplicação da medicação e em seguida realizada a orquiectomia (D7). O restante da amostra foi avaliada por 21 dias, com posterior orquiectomia (D21). Esta divisão dentro dos grupos foi realizada com o objetivo de avaliar a diferença entre as lesões com 7 dias após a aplicação do Infertile® e com 21 dias. Assim como no grupo controle com a administração de NaCl 0,9%.

##### 2.2.4.1 Grupo Controle

Neste grupo foi administrado 1 a 2 ml de solução estéril de NaCl 0,9%, respeitando o tamanho de cada testículo.

A dose de NaCl 0,9% aplicada com profundidade de agulha inteira 13 mm x 0,45 mm, na cauda do epidídimo seguindo o padrão de volume estabelecido pelo Robifarma, fabricante do Infertile®. David (2012), utilizando a dose de saturação de 0,5 mL, obteve melhor resposta em seu experimento, a mesma dose foi utilizada neste trabalho, no qual dois animais foram castrados com 7 dias e o restante com 21 dias após a aplicação da droga.

##### 2.2.4.2 Grupo Teste

Este grupo recebeu a dose que variou de 1,5 ml a 2,5 ml ao estipulado pelo fabricante do Infertile®, a partir da mensuração dos testículos, sendo que foi administrado a mais 0,5 ml como dose de saturação em cada testículo.

#### 2.2.5 Aplicação da droga

Os animais foram submetidos a jejum prévio de 12 horas. Os animais foram tranquilizados utilizando acepromazina 0,2% em sub-dose (0,05mg/kg), para que o paciente permita ser manipulado durante a administração do GZ + DMSO e não ocorra falhas durante

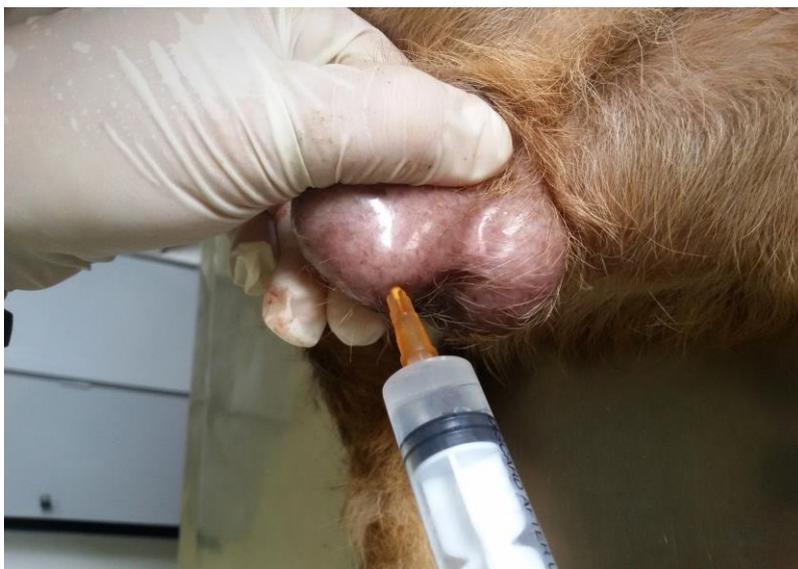
o procedimento. Foi realizada também a aplicação de anti-inflamatório não esteroidal à base de Meloxicam (0,2mg/kg), 30 minutos antes da aplicação do GZ + DMSO, de acordo com a metodologia de David (2012), porém a aplicação do GZ + DMSO foi em uma área diferente da estipulada pelo fabricante.

Os testículos foram previamente mensurados, na sua porção medial transversal com o auxílio do paquímetro (Figura 2), e limpos com solução antisséptica.



**Figura 2:** Mensuração do testículo de cão com paquímetro, submetido à injeção de Gluconato de zinco + DMSO. Localização do maior diâmetro testicular.

A aplicação do fármaco foi realizada na cauda do epidídimo (Figura 3) de cada testículo, utilizando uma seringa e agulha de insulina, para aplicação de NaCl 0,9% para o grupo controle e de Gluconato de zinco + Dimetilsulfóxido para o grupo teste.



**Figura 3:** Aplicação intratesticular da solução de gluconato de zinco + DMSO.

### 2.2.6 Doses aplicadas

O Gluconato de Zinco, na concentração de 26,2 mg + Dimetilsulfóxido 0,05 mg/mL (Infertile®), são recomendados em doses de acordo com o diâmetro medial transversal testicular, até o máximo de 2 mL em cada testículo. A Tabela 1 mostra o diâmetro medial transversal testicular e a dosagem do fármaco que deve ser aplicada, respectivamente.

**Tabela 1** – Doses de aplicação do Gluconato de Zinco + Dimetilsulfóxido, após a mensuração do diâmetro medial transversal testicular.

<b>Tamanho do diâmetro medial transversal testicular (mm)</b>	<b>Volume aplicado (ml)/ Dose Padrão</b>
12-17 (porte pequeno ou filhote até 2 meses)	0,5
18-23 (porte médio)	1,0
24-27 (porte grande)	1,5
27 ou mais (porte grande)	2,0
Dose de saturação testicular	0,5 a 2 acima da dose

Fonte: Rhobifarma modificado

### 2.2.7 Doses aplicadas de acordo com o grupo

Conforme indicação do fabricante, as doses foram calculadas a partir da mensuração do maior diâmetro transversal testicular, sendo este padrão também utilizado para o grupo controle e a dose de 0,5 ml a mais da dose correspondente (Tabela 2).

**Tabela 2** - Relação diâmetro transversal dos testículos direito e esquerdo (cm) x volume (ml) da solução de Gluconato de zinco + Dimetilsulfóxido, de acordo com os grupos controle e teste.

GRUPO CONTROLE				GRUPO TESTE			
		COMP(cm)	APLIC(ml)			COMP(cm)	APLIC(ml)
ANIMAL 1	TD	2,5	2,0	ANIMAL 1	TD	2,0	1,5
	TE	2,6	2,0		TE	2,1	1,5
ANIMAL 2	TD	2,3	1,5	ANIMAL 2	TD	2,6	2,0
	TE	2,1	1,5		TE	2,6	2,0
ANIMAL 3	TD	2,4	2,0	ANIMAL 3	TD	2,5	2,0
	TE	2,3	1,5		TE	2,8	2,5
ANIMAL 4	TD	2,3	1,5	ANIMAL 4	TD	2,3	2,0
	TE	2,1	1,5		TE	2,4	2,0
ANIMAL 5	TD	1,5	1,5	ANIMAL 5	TD	2,0	1,5
	TE	2,0	1,5		TE	2,0	1,5

### 2.2.7 Orquiectomia e pós-operatório

As cirurgias foram realizadas no Bloco Cirúrgico (ISPA/UFRA). Todos os cães foram submetidos à orquiectomia bilateral, com subsequente coleta dos testículos em frasco secos e encaminhados até o LABOPat (ISPA). Os animais foram submetidos a jejum prévio de 12 horas. O protocolo anestésico utilizado foi de acepromazina 0,2% (0,05 mg/kg IM) como medicação pré-anestésica. Na indução e manutenção anestésica, foi utilizado a Ketamina (10mg/kg) associado ao Diazepan (1 mg/kg) por via endovenosa. Posteriormente foi infiltrado na região subcutânea pré-escrotal, cloridrato de lidocaína (5 mg/mL), para evitar a necessidade de um reforço anestésico. A técnica utilizada foi a pré-escrotal (BOOTHE, 2003), pelo método fechado (sem abertura da túnica vaginal). O tecido subcutâneo foi suturado com catgut cromado 2.0, e a pele com fio de nylon 2.0. No pós-operatório, utilizamos cefalexina (20mg/kg) por via oral, durante sete dias, Meloxicam (0,2 mg/kg) por três dias e sulfadiazina de prata pomada no local, por 10 dias. O pós-operatório foi acompanhado por dez dias até a retirada dos pontos e devolução dos animais para os respectivos donos.

### 2.2.8 Avaliação do Estresse por meio da mensuração do cortisol

Este foi avaliado, por meio da coleta de sangue por venopunção da veia cefálica, e enviado para um laboratório humano em Belém, para dosagem dos níveis de cortisol no sangue através do método de quimioluminescência, antes da aplicação do produto e no dia que foi realizada a castração do animal. Com o objetivo de avaliar se a técnica causaria um grau de estresse elevado no animal, ou se respeitaria o bem estar do mesmo.

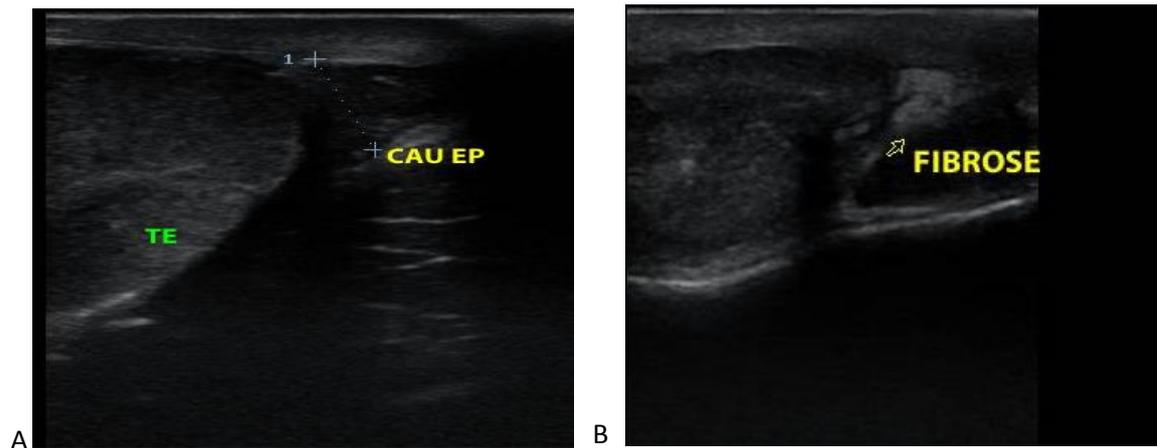
### 2.2.9 Ultrassonografia Testicular

Os exames ultrassonográficos foram realizados com o auxílio do aparelho Mindray Diagnostic Ultrasound System Modelo: Z6 Vet, com transdutor linear transversal e frequência de 7 - 12 Mhz. Foram feitas imagens nos planos longitudinal e transversal (CARVALHO, 2004) avaliando: tamanho, contornos, ecotextura e ecogenicidade dos testículos e epidídimos.

Os valores de escala de cinza do parênquima testicular de cada testículo foram determinados a partir das imagens digitais, e expressos em unidades de intensidade pixel. O alcance total das intensidades de pixel foi definido por valores numéricos de 0 a 255, em que o valor zero representa a cor preta anecóica e o valor de 255 representa o branco, característicos de imagens hiperecóicas. A partir destas imagens foi determinado a ecodensidade testicular, expressa em quantidade de pixels/área. Utilizamos o Programa Imagem J, que é um software de domínio público, baseado em um programa de processamento de imagem, desenvolvido no National Institutes of Health, que calcula a área e estatísticas de pixel de valor definido pelo usuário (RASBAND, 1997).

As análises da ecogenicidade em pixel dos epidídimos foram feitas tomando-se uma região pré-determinada em cada imagem do testículo direito e esquerdo. Para se avaliar a homogeneidade da ecotextura testicular e a área respectiva de pixels, cada região das imagens selecionadas foi delimitada, com um quadrado de meio cm<sup>2</sup> (Figura 4). Posteriormente, com os valores dos dois testículos foi obtida a média da ecogenicidade testicular por animal.

Os exames foram realizados antes da aplicação e posteriormente no D7, D14 e D21 com o objetivo de realizar a avaliação comparativa das imagens.



**Figura 4:** Imagem Ultrassonográfica do testículo de um do cão Grupo Teste: A) Corte transversal antes da aplicação do Infertile®. B) Corte transversal com 7 dias após a aplicação da droga, formação de fibrose.

#### 2.2.10- Histopatologia

Após a orquiectomia, os testículos coletados, foram fixados em solução de Bouin (SLATTER, 2003) por 24 horas, sendo posteriormente lavado e preservado em álcool 70% até o momento do processamento, no Laboratório de Patologia Animal - LABOPAT da UFRA.

Posteriormente, foram clivados com cortes longitudinais de 0,5 cm, colocados em cassetes histológicos e submetidos à desidratação, diafanização e incluso em Paraplast®. Os blocos foram cortados em micrótomo rotativo com cerca de cinco micrômetros de espessura e as lâminas coradas pela hematoxilina e eosina para análise em microscópio óptico de luz, com aumento de 100x e 400x para verificar a ocorrência de alterações no parênquima testicular.

#### 2.2.11 Análise Estatística

Os dados foram catalogados em planilhas eletrônicas submetidas ao teste estatístico ANOVA (Análise de variáveis) através de software especializado (SAS, 2009). As médias dos grupos foram comparadas através do Teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

Foram comparadas as médias e desvio padrão de volume espermático, motilidade, vigor, concentração, vivos e mortos, patologias espermáticas maiores e menores e a intensidade de pixel (IP), antes e depois da aplicação do produto para avaliar se a aplicação na cauda do epidídimo causaria a redução de tempo preconizada pelo fabricante, para que o animal fosse considerado estéril.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Avaliação do estresse pela mensuração do cortisol

A partir da mensuração dos níveis de cortisol (Tabela 3), não foi constatado alterações significativas, estando os valores dentro do intervalo normal para cães, que corresponde a 0,5 µg/dL – 6 µg/dL (FELDMAN; NELSON, 1996), o que demonstra que os animais estavam completamente adaptados ao manejo após as duas semanas iniciais, portanto, não sofrendo qualquer tipo de ameaça ou estresse que desencadeassem a resposta de luta e/ou fuga.

**Tabela 3** – Dosagem de cortisol, antes da aplicação e antes da orquiectomia, no grupo controle e no grupo teste.

GRUPO CONTROLE			GRUPO TESTE		
	Antes da aplicação	Antes da orquiectomia		Antes da aplicação	Antes da orquiectomia
ANIMAL 1	2,7mcg/dL	2,5 mcg/dL	ANIMAL 1	0,5 mcg/dL	0,6 mcg/dL
ANIMAL 2	1,0 mcg/dL	1,0 mcg/dL	ANIMAL 2	1,6 mcg/dL	1,5 mcg/dL
ANIMAL 3	1,0 mcg/dL	1,1 mcg/dL	ANIMAL 3	0,9 mcg/dL	1,0 mcg/dL
ANIMAL 4	1,2 mcg/dL	1,1 mcg/dL	ANIMAL 4	2,6 mcg/dL	1,0 mcg/dL
ANIMAL 5	1,5 mcg/dL	1,3 mcg/dL	ANIMAL 5	1,1 mcg/dL	1,0 mcg/dL

#### 3.2 Avaliação ultrassonográfica testicular

Os valores do padrão da ecogenicidade antes e depois da aplicação de NaCl 0.9%, apresentaram certa diminuição  $21,36 \pm 10,42$  e  $21,24 \pm 10,22$  antes da aplicação e  $13,36 \pm 4,08$  e  $14,17 \pm 5,04$ ;  $10,89 \pm 1,47$  e  $14,48 \pm 3,91$ ;  $16,22 \pm 2,70$  e  $11,90 \pm 7,57$ ; no D7, D14 e D21 respectivamente para o grupo controle. Já no grupo teste ocorreu aumento na ecogenicidade  $21,13 \pm 6,35$  e  $23,25 \pm 3,56$  antes da aplicação,  $20,30 \pm 2,85$  e  $28,67 \pm 8,48$ ;  $27,31 \pm 11,18$  e  $23,72 \pm 4,04$ ;  $28,90 \pm 6,28$  e  $28,41 \pm 4,61$ ; no D7, D14 e D21 respectivamente, após a aplicação do Infertile® (Tabela 4), obtendo diferença estatística entre as médias ( $p < 0,05$ ) em todos os dias, quando comparados o grupo controle e o grupo teste. Provavelmente devido ao processo inflamatório e a lesão causada pela droga, além de formação de fibrose em um dos animais notada no exame de ultrassom.

**Tabela 4** - Média e desvio padrão da ecogenicidade da cauda do epidídimo dos cães do grupo controle e grupo teste.

	Testículo Direito		Testículo Esquerdo	
	GC	GT	GC	GT
<b>Antes</b>	21,36±10,42 <sup>a</sup>	21,13±6,35 <sup>a</sup>	21,24±10,22 <sup>a</sup>	23,25±3,56 <sup>a</sup>
<b>D7</b>	13,36±4,08 <sup>a</sup>	20,30±2,85 <sup>b</sup>	14,17±5,04 <sup>a</sup>	28,67±8,48 <sup>b</sup>
<b>D14</b>	10,89±1,47 <sup>a</sup>	27,31±11,18 <sup>b</sup>	14,48±3,91 <sup>a</sup>	23,72±4,04 <sup>b</sup>
<b>D21</b>	16,22±2,70 <sup>a</sup>	28,90±6,28 <sup>b</sup>	11,90±7,57 <sup>a</sup>	28,41±4,61 <sup>b</sup>

Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente. ANOVA; Teste de Tukey (p<0,05)

O aumento da ecogenicidade encontrada no GT, referente ao período de estudo, discordam dos dados obtidos por David (2012), com relação aos grupos que fizeram uso do Infertile®, sendo que para o grupo controle, nossos resultados concordam, pois ocorreu uma diminuição na ecogenicidade, provavelmente devido ao aumento de líquido causado pela aplicação e as doses de NaCl 0,9% diferem da utilizada na metodologia de David (2012), pois o grupo controle do presente trabalho seguiu o padrão de dose estipulado pela laboratório do Infertile® utilizando uma dose de 0,5 ml a mais de volume, como dose de saturação, tanto para o grupo controle como para o grupo teste.

### 3.3 Avaliação do sêmen

Nossos resultados apresentaram diminuição significativa da concentração espermática quando observamos o GT 105,35±28,08 antes da aplicação, 1,8 ±4,02; 6,38 ±9,29; 9,66 ±16,31, no D7, D14 e D21 respectivamente, estando de acordo com os de David (2012) e Mazzei et al (2012) que encontraram na concentração dos animais tratados com GZ+ DMSO, valores abaixo dos níveis necessários para a fertilização(Tabela 5), assim como Wang (2002), Oliveira (2007) e Motta ( 2008).

Não ocorreu alteração significativa de volume no grupo teste, após aplicação de Gluconato de zinco + Dimetilsulfóxido.

Os resultados encontrados em nosso estudo (Tabela 5) coincidem com David (2012), após aplicação de GZ + DMSO, na região cranial do testículo, sendo avaliado posteriormente por 35 dias e com Fahim et al (1993) após aplicação GZ + Arginina, na cauda do epidídimo de cães, onde ambos não observaram nenhuma mudança significativa no volume, em

avaliações mensais por um ano, enquanto Soto et al (2007), observaram um decréscimo significativo do volume no grupo tratado com GZ + DMSO, ficando abaixo inclusive dos outros grupos tratados.

Ocorreu diminuição significativa de vigor no grupo teste, após a aplicação da droga, sendo estes os seguintes valores:  $3,5 \pm 0,70$  antes da aplicação,  $0,6 \pm 1,34$ ;  $1 \pm 1$ ;  $1,33 \pm 1,52$ , no D7, D14 e D21 respectivamente, (Tabela 5), em comparação aos parâmetros estimados pelo CBRA (2013) para a fertilização, os animais apresentaram valores bem abaixo, dos considerados normais.

Porém um dos animais do GT ao chegar no 21º dia após a aplicação teve seu vigor normalizado para os níveis aceitos, onde não ocorreu formação de fibrose na cauda do epidídimo para que fosse evitado assim a passagem de sptz viáveis.

Dentro do grupo controle houve alteração de motilidade, porém não significativa ao ponto de os animais serem considerados inférteis ou sub-férteis (Tabela 5), já no grupo teste houve alteração em 80% dos animais, onde os valores se apresentaram da seguinte maneira:  $82,5 \pm 8,29$ , antes da aplicação da droga,  $14 \pm 31,30$ ;  $36,66 \pm 32,14$ ;  $30 \pm 51,96$ , no D7, D14 e D21 respectivamente, onde o decréscimo ocorrido, foi bem mais acentuado no sétimo dia após a aplicação, no entanto os valores se mantiveram abaixo do que é preconizado pelo CBRA, como um padrão aceitável.

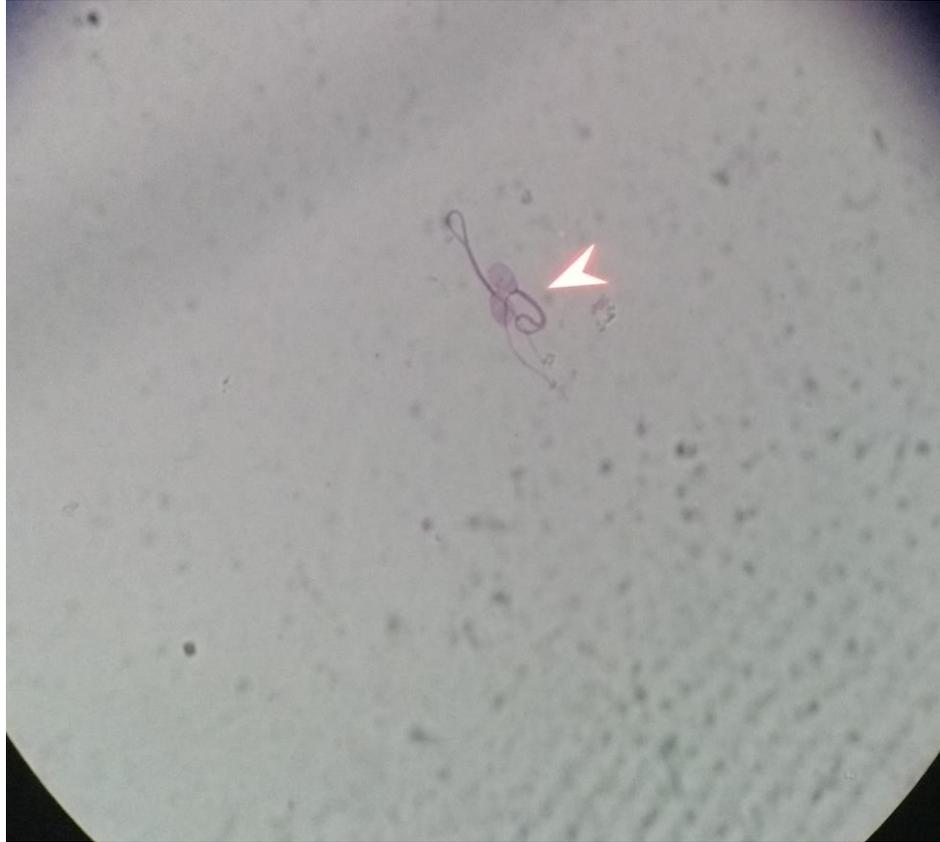
No entanto um dos animais teve sua motilidade significativamente diminuída ao sétimo dia após a aplicação, mas ao chegar no 21º dia, estava com sua motilidade dentro dos padrões aceitáveis pelo CBRA (2013).

Dentro da contagem de vivos e mortos (Tabela 5) ocorreu uma pequena alteração dentro do grupo controle, no sétimo e 14º dia, porém não significativa para causar infertilidade ou sub-fertilidade nos mesmos. Agora no grupo teste a mudança foi significativa ( $p < 0,05$ ), com os seguintes resultados obtidos:  $15,05 \pm 6,98$  antes da aplicação,  $85 \pm 33,54$ ;  $68,66 \pm 27,30$ ;  $58,83 \pm 47,73$ , no D7, D14 e D21 respectivamente, ocorrendo um aumento significativo na média, concordando com os achados de David (2012).

Entretanto um dos animais do GT ao alcançar o 21º dia, encontrava-se com os valores aceitáveis pelo CBRA para um cão fértil.

Observamos um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nas patologias espermáticas (Figura 5), no Grupo teste (Tabela 5), ficando ambos acima do parâmetro normal que seria de até 20%, conforme recomendação do CBRA (2013), assim como David (2012). Mazzei et al.(2012) observaram aumento nas patologias espermáticas ( $24,05\% \pm 1,4$ ), após 5 meses de avaliações e Soto et al. (2007) que observaram aumento significativo no grupo em que foi

aplicado a associação do GZ(26,2 mg) + DMSO (0,05 mg) a partir de 45 dias da aplicação, assim como um aumento no grupo tratado apenas com GZ isolado, comprovando o efeito do Gluconato de Zinco na espermatogênese.



**Figura 5:** Esfregaço de sêmen de cão do Grupo Teste, com patologias espermáticas após aplicação de Gluconato de Zinco + Dimetilsulfóxido. Coloração: Vermelho Congo e Violeta. Aumento de 1000x.

**Tabela 5** – Média e desvio padrão das características do sêmen de cães submetidos à aplicação do Gluconato de Zinco + DMSO de acordo como dia da avaliação.

	ANTES		D7		D14		D21	
	GC	GT	GC	GT	GC	GT	GC	GT
<b>CONCENT</b>	91,25 ±13,15	105,35 ±28,08	73,2 ±50,13 <sup>a</sup>	1,8 ±4,02 <sup>b</sup>	78,33 ±19,69 <sup>a</sup>	6,38 ±9,29 <sup>b</sup>	74,33 ±23,90 <sup>a</sup>	9,66 ±16,31 <sup>b</sup>
<b>MOTIL.</b>	86 ±4,18	82,5 ±8,29	76 ±11,40 <sup>a</sup>	14 ±31,30 <sup>b</sup>	78,33 ±7,63 <sup>a</sup>	36,66 ±32,14 <sup>b</sup>	76,66 ±5,77 <sup>a</sup>	30 ±51,96 <sup>b</sup>
<b>VIGOR</b>	3,8 ±0,44	3,5 ±0,70	3,40 ±0,89 <sup>a</sup>	0,6 ±1,34 <sup>b</sup>	3,66 ±0,57 <sup>a</sup>	1 ±1 <sup>b</sup>	3,66 ±0,77 <sup>a</sup>	1,33 ±1,52 <sup>b</sup>
<b>VOL.</b>	1,98 ±0,35	2,52 ±1,12	1,74 ±0,70	2,34 ±1,46	1,76 ±0,58	2,33 ±1,52	1,5 ±0,17	2,26 ±1,96
<b>VIVOS E MORTOS</b>	14,35 ±4,74	15,05 ±6,98	23,5 ±13,08 <sup>a</sup>	85 ±33,54 <sup>b</sup>	20,5 ±5,67 <sup>a</sup>	68,66 ±27,30 <sup>b</sup>	19,66 ±2,51 <sup>a</sup>	58,83 ±47,73 <sup>b</sup>
<b>PAT. MAIOR</b>	15,25 ±3,26	14,75 ±1,63	20,07 ±9,72 <sup>a</sup>	39,5 ±0 <sup>b</sup>	18,5 ±9,64 <sup>a</sup>	53,75 ±9,54 <sup>b</sup>	12,83 ±4,48 <sup>a</sup>	46,25 ±32,88 <sup>b</sup>
<b>PAT. MENOR</b>	11,4 ±4,46	5,1 ±3,39	13,6 ±11,13	12,5 ±0	9 ±3,12	11,25 ±4,59	9,16 ±6,44	15,75 ±1,06

Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente. ANOVA, Tukey (p<0,05).

Foram observadas alterações no padrão seminal, a partir de sete dias após a aplicação do Infertile®, coincidindo com o trabalho de David (2012), porem um dos animais após a aplicação não produziu a segunda fração (CBRA, 2013), rica em espermatozoides, apenas observando-se pequenas quantidades, presentes na primeira fração do ejaculado, no entanto 100% mortos, enquanto Soto et al. (2007), somente a partir dos 30 dias, ressaltando que em cães que receberam uma injeção as alterações ocorreram em 72% dos animais.

Mazzei et al. (2008) também utilizando o Gluconato de zinco + Dimetilsulfóxido apenas com uma aplicação, definindo que apenas 27% foram considerados inférteis (azoospermia ou aspermia), enquanto os demais (73%) desenvolveram um quadro de subfertilidade. Oliveira (2007), utilizando o GZ+ARG, observou azoospermia dos cães jovens e adultos aos 60 dias após a injeção de zinco, entretanto, em nosso experimento, por se tratar de uma zona de aplicação diferente do que preconiza o fabricante do produto, o decréscimo e manutenção dos parâmetros abaixo do padrão, são provavelmente devido as lesões na cauda do epidídimo, ocasionando alteração nos parâmetros preconizados pelo CBRA (2013), com exceção de um dos animais do grupo teste que ao chegar no D21 seus padrões seminais

havam voltado para normalidade, quando se refere a vigor, motilidade, vivos e mortos e concentração.

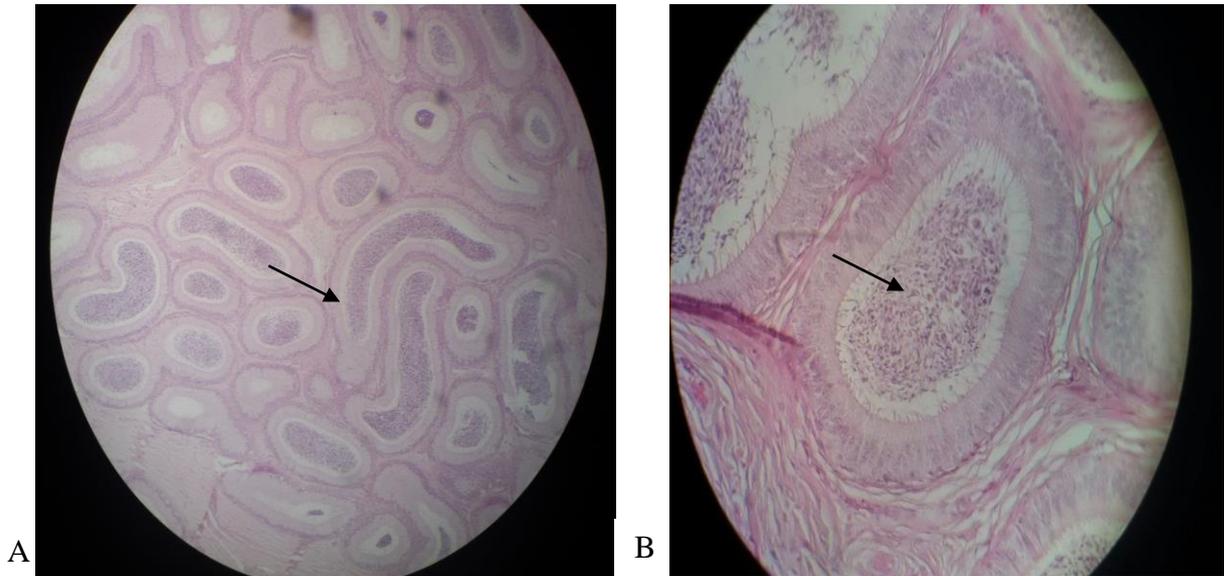
## 4 AVALIAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA

### 4.1 Grupo controle

No grupo controle, a avaliação macro (Figura 6), não apresentou alteração em estrutura, e as lesões encontradas ao corte, na avaliação micro, foram as seguintes: em alguns segmentos do túbulo epididimário, não foi observado epitélio tubular, presença de grandes lagos preenchidos por sptz (Figura 7 A e B). Discreta presença de células linfocitárias observada na margem da alteração, esta compatível com granuloma espermático, que pode ter sido causada pelo trauma da aplicação. No demais a maioria dos cortes encontravam-se dentro da normalidade tanto com 7 dias após aplicação do NaCl 0,9%, quanto com 21 dias.



**Figura 6:** Foto do testículo de cão do GC, aos 21 dias após a aplicação de NaCl 0,9%.



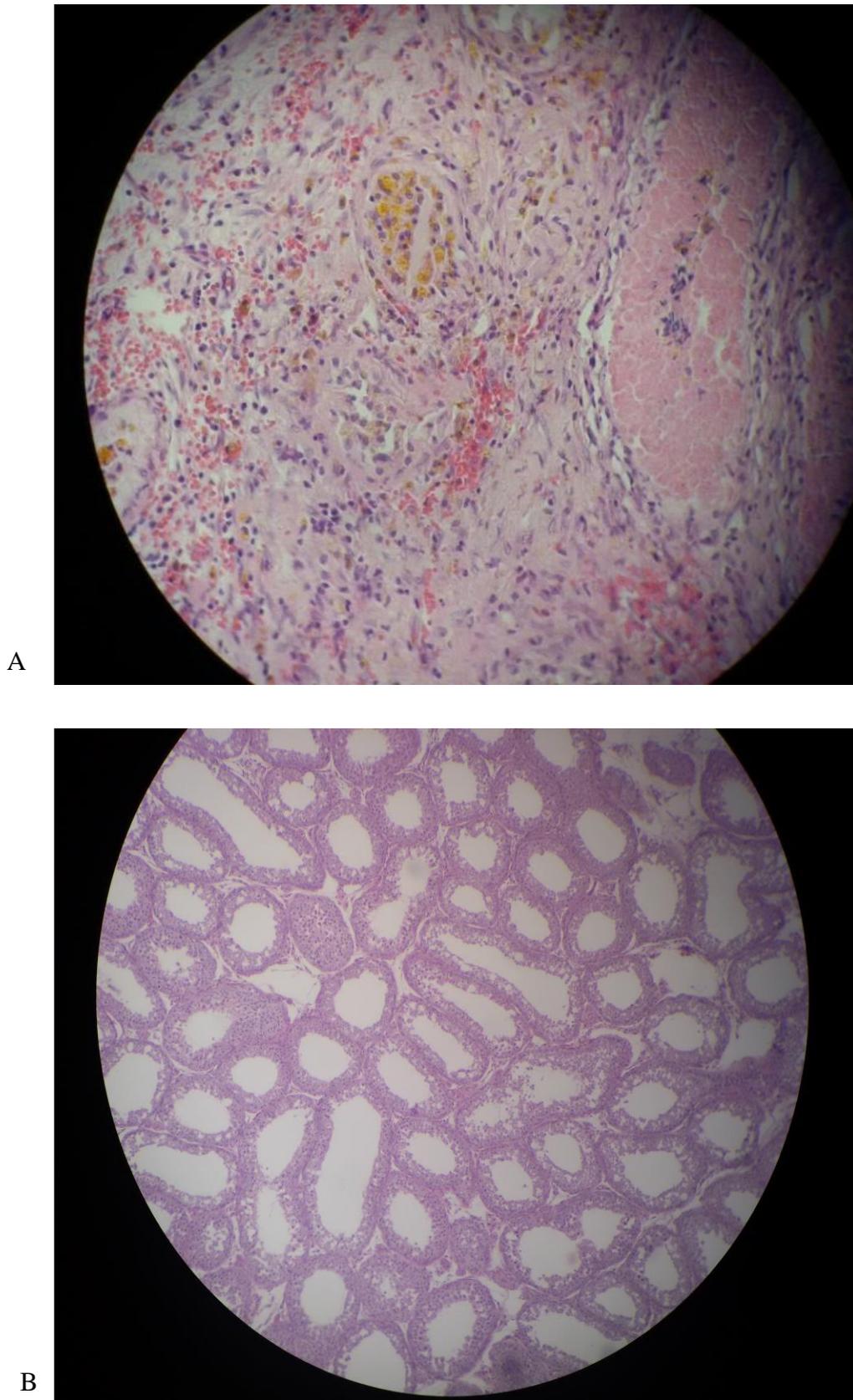
**Figura 7:** Fotomicrografia do epidídimo. Detalhe do ducto epididimário de cão do grupo controle, após 21 dias de aplicação. Massas de espermatozoides no lúmen tubular (seta). Aumento 100x (A), 400x (B)

#### 4.2 Grupo Teste

As alterações observadas na parte macro (Figura 8), foram principalmente hemorragia e necrose, já na parte micro além destas já citadas foram observadas: edema, necrose de túbulos, reabsorção tubular, degeneração, reação linfoplasmocitária, presença de macrófagos, alguns com coloração amarelo ouro, característico de lipofucsina seróide e ausência de espermatozoides nos túbulos, vacuolização e fibrose tubular (Figura 9 A e B).



**Figura 8:** Foto do testículo de cão do GT, após 7 dias da aplicação do Infertile®, apresentando grande área de hemorragia e necrose.



**Figura 9:** Fotomicrografia de epidídimo de cão do grupo teste aos 21 dias, A) com presença de macrófagos, necrose de coagulação, cariólise, lipofuscina seróide. B) ausência de sptz dentro dos túbulos e presença de vacúolos. Aumento de 100x.

## 5 CONCLUSÕES

A injeção com solução à base de Gluconato de zinco 2,62% + DMSO 0,5% na cauda do epidídimo, foi eficaz em causar a sub-fertilidade dos cães.

No exame ultrassonográfico ocorreu aumento da ecogenicidade no GT, validando esta ferramenta diagnostica como um grande auxilio, para descoberta de alterações em um curto intervalo de tempo.

Dentro do grupo teste, ocorreu redução das características físicas seminais, o que caracterizou um quadro de subfertilidade. Os resultados dos espermogramas demonstraram que a solução de GZ+DMSO, foi eficaz ao que se propos, porem com maior significância na obstrução da passagem de sptz viáveis, pois na avaliação histopatológica foi observado espermioestase, característico de um processo obstrutivo, impedindo a passagem dos sptz viáveis, causando quadros de oligospermia e até azoospermia, as principais lesões presentes na histopatologia foram: edema, hemorragia, degeneração em graus diversos, infiltrados linfoplasmocitários de maneira geral e necrose, caracterizando a irreversibilidade do processo e a eficácia do tratamento.

## REFERÊNCIAS

BOGEL, C. Guidelines for dogs population management. Geneva: World Health Organization. World Society for the Protection Animals, 1990. 116p. Disponível em: <[http://whqlibdoc.who.int/hq/1990/WHO\\_ZOON\\_90.166.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/1990/WHO_ZOON_90.166.pdf)>. Acesso em: 24 mar 2015.

BOOTHE, H.W. Testes and Epididymides In: SLATTER, D. **Textbook of Small Animal Surgery**. 3.ed: St. Louis, Saunders, p. 1521-1530, 2003.

CBRA- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte. 2013.

CHRISTIANSEN, J. **Reprodução no cão e no gato**. São Paulo: Manole, p. 361,1988.

DAVID, M. B. M., **Avaliação do efeito do gluconato de zinco, na castração química de cães no município de Belém, Pará**. p. 13, 2012. Dissertação (Mestrado em Saúde e Produção animal) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém/PA.

FAHIM, M.S; WANG, M; SUTCU M.F.; et al. Sterilization of dogs with intra-epididymal injection of zinc arginine. *Contraception*, v. 47, p. 107-22, 1993.

HAWKINS, S. **Case study: outreach in the U.S. and Mexico.** In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NONSURGICAL CONTRACEPTIVE METHODS FOR PET POPULATION CONTROL, 3, 2006. **Proceedings...** Alexandria: ACC&D, 2006. Disponível em: <<http://www.acc-d.org/2006%20Proceedings>>. Acessado em: 30 maio 2015.

GILL, H. P.; KANFRAN, C.; FOOTE, R. F.; KIRK, R.W; Artificial insemination of beagle bitches with freshly collected, liquid stored and frozen-stored semen. **American Journal of Veterinary Research**, v.31, p.1807-1813. 1970.

JOHNSTON, S. D.; KUSTRIZ, M. V. R., OLSON, P. N. S. Canine and Feline Theriogenology. Philadelphia: W.B.Saunders Company, p. 592, 2001.

LEVY, J. K.; CRAWFORD, P. C.; APPEL, L. D. Comparison of intratesticular injection of zinc gluconate versus surgical castration to sterile male dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v.69, n.1, p.140-143, 2008.

MAZZEI, C.P.; EYHERABIDE, A.R.; LUCIO, C.F.; SILVA, L.C.G.; HOSOMI, F.Y.M.; MAIORKA, P.C., VANNUCCHI, C.I. 2012. **Effects of two intratesticular injections of a zinc gluconate-dimethyl sulphoxide solution for chemical sterilization of Dogs.** International Symposium on Canine and Feline Reproduction, Reprinted in IVIS with the permission of the Organizers. 7., Whistler, Canada, jul. 2012. Disponível em: [www.ivis.org](http://www.ivis.org). 2012. Acesso em: 26 out. 2014. p. 26-29.

MOTTA, D. S. **Esterilização química em cães com gluconato de zinco associado ao MSO.** 2008.68 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)- União Pioneira de Integração Social - Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Brasília, Distrito Federal, 2008.

OLIVEIRA, E. C. S. **Esterilização de cães com injeção intratesticular de solução à base de zinco,** p. 21, 2007 (Tese de Doutorado). Escola de Veterinário-Universidade Federal de Minas Gerais-MG.

OLIVEIRA, E. C. S. OLIVEIRA, F. L. M. SILVA, P. M., MÜLLER, L.T., BRITO, A.K.F. FAGUNDES, M. J. C. SÁ, C. C. S., MELO, V. A., SILVA J. R. E. C. S. Castração química de caninos e felinos por meio de injeção intratesticular de gluconato de zinco- Quebrando paradigmas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.262-265, abr./jun. 2011.

RASBAND, W. **Image J,** U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 1997-2009. Disponível em: <<http://rsb.info.nih.gov/ij/>> Acessado em: 30 maio 2015.

SEAGER, S.W. J., FLETCHER, W. S. Collection, storage and insemination of canine semen. **Laboratory Animal Science**, v.22, p. 177 - 182. 1972.

SETCHELL B.P., MADDOCK S. S., BROOKS D.E. Anatomy, vasculature, innervation and fluids of the male reproductive tract. In: KNOBIL, E; NEILL, J. D. **The physiology of reproduction.** 2 ed. New York, NY: Raven Press, p.1063-1075, 1994.

SLATTER, D. **Textbook of small animal surgery.** 3. ed. v.2. Philadelphia: W. B. Saunders, p.1427, 2003.

SOTO, F. R. M. Utilização de esterilizante químico para cães machos no Município de Ibiúna, SP. In: Congresso Nacional de Saúde Pública Veterinária, 3., 2009, Bonito. **Anais...** Bonito: Unesp.br, 2009.

TEPSUMETHANON, V.; WILDE, H.; HEMACHUDHA, T. Intratesticular injection of a balanced zinc solution for permanent sterilization of dogs. **Journal Medical Association Thailand**, v.88, p.686-689, 2005.

WANG, M. Neutersol: intratesticular injection induces sterility in dogs. In: Proceedings of the 2002 International Symposium on nonsurgical methods for pet population control. p.62-65, 2002.