



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

MARIDELZIRA BETÂNIA MORAES DAVID

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO GLUCONATO DE ZINCO ASSOCIADO AO DMSO,
NA CASTRAÇÃO QUÍMICA DE CÃES NO MUNICÍPIO DE BELÉM, PARÁ**

BELÉM 6 PA
2013



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

MARIDELZIRA BETÂNIA MORAES DAVID

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO GLUCONATO DE ZINCO ASSOCIADO AO DMSO,
NA CASTRAÇÃO QUÍMICA DE CÃES NO MUNICÍPIO DE BELÉM, PARÁ**

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^a. Dr^a. Nazaré Fonseca de Souza.

Co-orientador: Prof.Dr .Haroldo F. LobatoRibeiro.

BELÉM 6 PA
2013

MARIDELZIRA BETÂNIA MORAES DAVID

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO GLUCONATO DE ZINCO, NA CASTRAÇÃO
QUÍMICA DE CÃES NO MUNICÍPIO DE BELÉM, PARÁ**

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^a. Dr^a. Nazaré Fonseca de Souza - Orientadora
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

Prof. Dr. Milton Begeres de Almeida (Membro titular)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ

Profa. Dra. Rosa Maria Cabral (Membro titular)
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

Prof. Dr. Sebastião Rolim Filho (Membro titular)
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

Prof. Dr. Washington Pereira Assunção (Membro Suplente)
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA

FICHA CATALOGRÁFICA

David, Maridelzira Betânia Moraes

Avaliação do efeito do Gluconato de zinco associado ao DMSO, na castração química de cães no município de Belém, Pará/ Maridelzira Betânia Moraes David- Belém, 2013.

78;il.

Dissertação (Mestrado em Saúde e Produção Animal na Amazônia) ó Universidade Federal Rural da Amazônia, 2013.

1. Controle populacional de cães
2. Gluconato de zinco
3. Castração química I. Título.

CDD ó 639.93

Dedico este trabalho a meus pais José Maria e Horacilda (in memorian) e a meus filhos Luciana, Júnior e Beatriz, por exemplos e incentivos constantes.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pelos dons recebidos.

Aos meus pais José Maria e Horacilda (in memorian), aos meus filhotes Lu, Júnior e Bia, presentes de Deus para mim e para o mundo;

Aos professores:

À professora e orientadora Nazaré Fonseca pela orientação, incentivo, apoio e amizade;

Ao professor e Co-orientador Haroldo Ribeiro, pela aceitação mesmo sendo em pequenos animais, pelo tempo, orientação e disponibilidade dos recursos do seu laboratório;

Ao professor e agora amigo Sebastião Rolim Filho, pela disponibilidade sem medidas, paciência, e pelo abuso de seus talentos científicos e estatísticos;

Ao Professor Washington pela leitura e explicações da histologia do experimento;

Ao Professor Luiz Fernando Rodrigues pela disponibilidade dos recursos laboratoriais;

Ao Professor Edilson Matos e ao Professor Souza da UFPa, pelo apoio técnico;

Ao Laboratório Rhobifarma, através do Dr. Ricardo Lucas, que confiou e apoiou esse experimento;

Ao Centro de Zoonoses, aos abrigos da Asdepa e da Ufpa (Warley), pela ajuda na seleção e cuidados com os animais que participaram do experimento;

Ao projeto Vida Digna, pela recepção e apoio para a execução desse projeto;

Ao representante da ração Premier, Pippa Gonzáles pelo apoio no fornecimento aos nossos cães durante o experimento;

À minha estagiária e guerreira Natália, pelo apoio, paciência, persistência, e amizade fortalecida por tantas horas de sufoco;

Aos estagiários do canil da Ufra, principalmente à Lílian e as demais que foram fundamentais durante as avaliações; aos estagiários da Reprodução Animal principalmente ao Anderson que iniciou esse projeto comigo e os estagiários do Projeto Vida Digna (Suelen, Natasha e Luciana) e aos servidores João e João Carlos pela disponibilidade e compreensão;

Aos amigos do Hovet : Luís Fernando, Gilvando, Mário, Railene, Danielli e Keiti pela ajuda a cada solicitação ou apenas pela compreensão;

À todos que tenha esquecido por serem tantos braços que me ajudaram

À tudo que seria obstáculo e se tornou caminho durante essa jornada.

õUm homem só é nobre quando consegue sentir
piedade por todas as criaturasõ.

Buda

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo avaliar o efeito de três posologias diferentes do Gluconato de Zinco associado ao Dimetilsulfóxido (Infertile®) na castração química de cães. Foram avaliados trinta cães adultos, sem raça definida, porte médio, com idades variando de 1 a 3 anos. Antes da aplicação do produto os animais foram submetidos a duas coletas de sêmen para estabelecer uma média do padrão espermático normal, bem como a exame ultrassonográfico testicular para avaliação comparativa posterior à aplicação do produto, sendo analisada a ecodensidade testicular. Os cães foram divididos em cinco grupos experimentais, com 5 animais em quatro grupos, e um com 10 animais. A aplicação do produto foi feita com a introdução de meia agulha de insulina, tamanho de 0,3x13 mm nos grupos controle, 1, 2 e 3, que foram constituídos por cinco animais em cada grupo. O grupo 4 foi submetido à introdução de uma agulha inteira de insulina, tamanho de 0,3x13 mm e constituído por 10 animais. O período de observação após a aplicação do produto foi até 65 dias, e semanalmente foram analisados o padrão espermático de um animal de cada grupo, bem como realizada a castração de um animal por grupo para análise histopatológica.

Ao exame ultrssonográfico, houve diminuição da ecogenicidade em todos os grupos.

A análise do padrão espermático demonstrou que houve alterações em todos os parâmetros nos grupos tratados, à exceção do volume e concentração ($p < 0,05$).

No exame histopatológico não houve alterações significativas no grupo controle, e nos demais grupos as lesões observadas foram de processo inflamatório, degeneração testicular em graus variáveis, necrose e reabsorção de túbulos seminíferos próximo ao local de aplicação.

Portanto constatamos nesse estudo a eficiência do Gluconato de zinco associado ao DMSO (Infertile®) na redução da função espermática, por alterações na estrutura testicular, sem interferência significativa no padrão comportamental dos animais tratados, sendo uma alternativa mais econômica e simples que o procedimento cirúrgico, e viável para o controle populacional de cães.

Palavras-chave: Cães, Gluconato de zinco, Castração Química.

ABSTRACT

This research conducted in the city of Belém do Pará, evaluated the effect of three different doses of Zinc Gluconate associated with dimethyl sulfoxide (Infertile ®) on chemical castration of dogs. We assessed thirty adult dogs, mongrel, midsize, aged 1-3 years. Before applying the product, the animals were submitted to two semen collections to establish a standard average sperm normal and also the testicular ultrasound for benchmarking after application of the product being analyzed echodensity testicular expressed in units of pixel intensity. The groups were divided into five groups: a control. Application of the product was made with the introduction of insulin needle half size, 0.3 x13 mm in control groups 1, 2 and 3, which were five animals in each group. Group 4 had a different application form with an insulin needle full size, 0.3 x13 mm, consisting of 10 animals. The observation period was up to 65 days, and were analyzed weekly standard sperm of one animal of each group as well as the castration of an animal per group for histopathological analysis weekly.

The average pixel before and after application of the product was 20.60 ± 6.36 and 16.42 ± 10.22 with a significant difference between them.

The pattern analysis showed that sperm were no changes in all parameters in the treated groups, except for the volume and concentration.

Histopathology no significant changes in the control group and the other groups the lesions were inflammatory degeneration to varying degrees, necrosis and resorption of seminiferous tubules near the application site.

So we see in this study the efficiency of zinc gluconate associated with DMSO (Infertile ®) in reducing sperm function by changes in testicular structure without significant interference in the behavior of the treated animals, being a simple and economical alternative to the surgical procedure and feasible to control dog population.

Keywords: Dogs, Zinc Gluconate, Chemical Castration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Imagem histopatológica de testículo.....	11
Figura 2- Coleta de sêmen de cão através de massagem digital.....	32
Figura 3- Mensuração testicular do cão com paquímetro.....	34
Figura 4 - Aplicação intratesticular da solução de gluconato de zinco + DMSO.....	35
Figura 5 - Ultrassonografia testicular em cão	36
Figura 6 - Imagem ultrassonográfica de testículo de cão	37
Figura 7 - Imagem ultrassonográfica de testículo de cão, com marcação aleatória pelo Programa Image J	38
Figura 8 - Imagem ultrassonográfica de testículo de cão do Grupo controle.....	42
Figura 9 - Imagem ultrassonográfica de testículo de cão do Grupo 1	43
Figura 10 - Imagem ultrassonográfica de testículo de cão do Grupo 2	44
Figura 11 - Imagem ultrassonográfica de testículo de cão, do Grupo 3	45
Figura 12 - Imagem ultrassonográfica de testículo de cão do Grupo 4	46
Figura 13 - Esfregaço de sêmen de cão do Grupo 3.....	52
Figura 14 - Esfregaço de sêmen de cão do Grupo 4	53
Figura 15.A - Aspectos da superfície corte longitudinal de testículo de cão do Grupo controle após 35 dias de aplicação do Gluconato de zinco+ DMSO.....	55
Figura 15.B - Achados histológicos de testículo do Grupo controle após 35 dias de aplicação do Gluconato de zinco+ DMSO	55
Figura 16- Achados histológicos de testículo do Grupo 1, após 7 dias de aplicação do Gluconato de zinco+ DMSO.....	56
Figura 17.A - Aspectos da superfície corte longitudinal de testículo Grupo1 após 35 dias de aplicação do Gluconato de zinco+ DMSO.....	57
Figura 17.B - Achados histológicos de testículo do Grupo 1, após 35 dias de aplicação do Gluconato de zinco+ DMSO.	57
Figura 18 - Aspectos da superfície corte longitudinal de testículo Grupo 1, após 35 dias de aplicação do Gluconato de zinco+ DMSO	57
Figura 19.A - Aspectos da superfície corte longitudinal de testículo Grupo 2, após 44 dias de aplicação do Gluconato de zinco+ DMSO	58
Figura 19.B - Achados histológicos de testículo do Grupo 2, após 44 dias de aplicação do Gluconato de zinco + DMSO.....	58

Figura 20.A - Aspectos da superfície corte de testículo Grupo 2 após 65 dias de aplicação do Gluconato de zinco+ DMSO.....	59
Figura 20.B - Achados histológicos de testículo do Grupo 2, após 65 dias de aplicação do Gluconato de zinco + DMSO.....	59
Figura 21.A - Aspectos da superfície corte de testículo Grupo 3 após 7 dias de aplicação do Gluconato de zinco+ DMSO.....	60
Figura 21.B - Achados histológicos de testículo do Grupo 3, após 7 dias de aplicação do Gluconato de zinco + DMSO.....	60
Figura 22.A - Aspectos da superfície corte de testículo Grupo 3 após 35 dias de aplicação do Gluconato de zinco+ DMSO.....	60
Figura 22.B - Achados histológicos de testículo do Grupo 3, após 35 dias de aplicação do Gluconato de zinco + DMSO.....	60
Figura 23.A - Aspectos da superfície corte de testículo Grupo 4, após 7 dias de aplicação do Gluconato de zinco + DMSO	61
Figura 23.B - Achados histológicos de testículo do Grupo 4, após 7 dias de aplicação do Gluconato de zinco + DMSO	61
Figura 24.A - Achados histológicos de testículo do Grupo 4, após 14 dias de aplicação do Gluconato de zinco + DMSO.....	62
Figura 24.B - Achados histológicos de testículo do Grupo 4, após 21 dias de aplicação do Gluconato de zinco + DMSO	62
Figura 25.A - Aspectos da superfície corte de testículo Grupo 4, após 35 dias de aplicação do Gluconato de zinco + DMSO	62
Figura 25.B - Achados histológicos de testículo do Grupo 4, após 35 dias de aplicação do Gluconato de zinco + DMSO	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Doses de aplicação do produto.....	35
Tabela 2- Relação diâmetro transversal dos testículos direito e esquerdo (mm) x volume (ml) da solução de gluconato de zinco + DMSO , de acordo com os grupos.....	40
Tabela 3- Média geral e desvio padrão da ecogenicidade do parênquima testicular de cães submetidos à castração química	41
Tabela 4- Média e desvio padrão da ecogenicidade do parênquima testicular de cães submetidos a castração química de acordo com os dias de avaliação e a dosagem de aplicação (Grupo controle)	42
Tabela 5- Média e desvio padrão da ecogenicidade do parênquima testicular de cães submetidos à aplicação do Gluconato de Zinco + DMSO de acordo com os dias de avaliação e a dosagem de aplicação (Grupo 1)	43
Tabela 6- Média e desvio padrão da ecogenicidade do parênquima testicular de cães submetidos à aplicação do Gluconato de Zinco + DMSO de acordo com os dias de avaliação e a dosagem de aplicação (Grupo 2)	44
Tabela 7- Média e desvio padrão da ecogenicidade do parênquima testicular de cães submetidos à aplicação do Gluconato de Zinco + DMSO de acordo com os dias de avaliação e a dosagem de aplicação (Grupo 3)	46
Tabela 8- Média e desvio padrão da ecogenicidade do parênquima testicular de cães submetidos à aplicação do Gluconato de Zinco + DMSO, de acordo com os dias de avaliação e a dosagem de aplicação (Grupo 4)	47
Tabela 9- Média e desvio padrão da ecogenicidade do parênquima testicular de cães submetidos à aplicação do Gluconato de Zinco + DMSO de acordo com o dia de avaliação, independente do tratamento	47
Tabela 10- Média e desvio padrão da ecogenicidade do parênquima testicular de cães submetidos à aplicação do Gluconato de Zinco + DMSO de acordo com a dosagem (grupo)	48
Tabela 11- Média e desvio padrão de concentração espermática em todos os grupos antes e depois dos tratamentos	49

Tabela 12- Média e Desvio Padrão de Volume (ml) em todos os grupos antes e depois dos tratamentos	49
Tabela 13- Média e desvio padrão de vigor espermático em todos os grupos antes e depois dos tratamentos	50
Tabela 14- Média e desvio padrão de Motilidade (%) em todos os grupos antes e depois dos tratamentos	51
Tabela 15- Média e desvio padrão de vivos e mortos de todos os grupos antes e depois dos tratamentos	51
Tabela 16- Média e Desvio Padrão de Patologias maiores e menores (%) de todos os grupos antes e depois dos tratamentos	52
Tabela 17- Média e desvio padrão das características do sêmen de cães submetidos à aplicação do Gluconato de Zinco + DMSO, de acordo com o grupo.....	54

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

ISPA	Instituto de Saúde e Produção Animal
SRA	Setor de Reprodução Animal
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
GZ	Gluconato de zinco
TD	Testículo Direito
TE	Testículo Esquerdo
US	Ultrassonografia
DMSO	Dimetilsulfóxido
C.E.	Circunferência escrotal
D0	Dia Zero. Dia da aplicação do produto.
D-5	Cinco dias antes da aplicação do produto
D7	Sete dias após aplicação do produto
D14	14 dias após aplicação do produto
D21	21 dias após aplicação do produto
D28	28 dias após aplicação do produto
D30	30 dias após aplicação do produto
D35	35 dias após aplicação do produto
D37	37 dias após aplicação do produto
D44	44 dias após aplicação do produto
D51	51 dias após aplicação do produto
D58	58 dias após aplicação do produto
D65	65 dias após aplicação do produto
US. TEST.	Ultrassonografia Testicular
LH	Hormônio luteinizante
FSH	Hormônio Folículo-estimulante
HOVET	Hospital Veterinário
DHT	Diidrotestosterona
LABOPAT	Laboratório de Patologia Animal
ECO _t	Ecodensidade testicular
IP	Intensidade Pixel
ml	mililitros

μL	microlitro
CBRA	Congresso Brasileiro de Reprodução Animal
Pat. Maiores	Patologias maiores
Pat. Menores	Patologias maiores
Pat. Total	Patologia total
CONCt	Concentração
HE	Hematoxilina e Eosina
GZ+ DMSO	Gluconato de Zinco associado ao Dimetilsuldóxido
GZ+ARG	Gluconato de Zinco associado à arginina

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1 CONTEXTUALIZAÇÃO	7
1.1 OBJETIVOS.....	8
1.1.1 Objetivo Geral.....	8
1.1.2 Objetivos específicos.....	8
1.2 REVISÃO DE LITERATURA.....	9
1.2.1 Histórico e importância da castração química.....	9
1.2.2 Morfologia e fisiologia testicular do cão.....	10
1.2.3 Esterilizantes com Gluconato de Zinco.....	11
1.2.4 Controle reprodutivo do macho	12
1.2.4.1 Castração química.....	12
1.2.4.1.1 GLUCONATO DE ZINCO POR VIA INTRATESTICULAR	13
1.2.5 Dimetilsulfóxido (DMSO)	16
1.2.6 Coleta de sêmen e exame andrológico	17
1.2.7 Ultrassonografia testicular	19
1.2.8 Histopatologia	20
REFERÊNCIAS	20
2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO GLUCONATO DE ZINCO + DMSO, NA CASTRAÇÃO QUÍMICA DE CÃES NO MUNICÍPIO DE BELÉM, PARÁ	30
2.1 INTRODUÇÃO	30
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	31
2.2.1 Aspectos éticos	31
2.2.2 Animais e local da pesquisa	31
2.2.3 Etapas do experimento	31
2.2.3.1 Exame andrológico	31

2.2.3.2 Grupos e dias	33
2.2.3.3 Aplicação da droga	34
2.2.3.4 Doses aplicadas	35
2.2.3.5 Orquiectomia	36
2.2.3.6 Ultrassonografia Testicular	36
2.2.3.7 Histopatologia.....	38
2.2.3.8 Análise Estatística	39
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
2.3.1 Avaliação clínica	39
2.3.2 Doses aplicadas de acordo com os Grupos.....	40
2.3.3 Avaliação ultrassonográfica testicular em Intensidade Pixel	41
2.3.3.1 Média geral e desvio padrão da ecogenicidade antes e depois da aplicação do Gluconato de zinco+DMSO em todos os grupos.....	41
2.3.3.2 Média e Desvio Padrão antes e depois da aplicação do GZ+ DMSO de acordo com os dias de avaliação x Grupo.....	42
2.3.3.2.1 GRUPO CONTROLE.....	42
2.3.3.2.2 GRUPO 1.....	43
2.3.3.2.3 GRUPO 2.....	44
2.3.3.2.4 GRUPO 3.....	46
2.3.3.2.5 GRUPO 4.....	47
2.3.3.3 Média antes e depois da aplicação do Gluconato de zinco + DMSO de acordo com os dias de avaliação.....	48
2.3.3.4 Média antes e depois da aplicação do Gluconato de zinco + DMSO de acordo com os grupos	49
2.3.4 Avaliação do Sêmen.....	49
2.3.4.1 De acordo com o Grupo.....	49
2.3.4.1.1 CONCENTRAÇÃO.....	49
2.3.4.1.2 VOLUME (ML).....	50
2.3.4.1.3 VIGOR.....	51
2.3.4.1.4 MOTILIDADE (%)......	51

2.3.4.1.5 VIVOS E MORTOS.....	52
2.3.4.1.6 PATOLOGIAS MAIORES E MENORES (%).	53
2.3.4.2 De acordo com os dias de avaliação.....	54
2.3.5 Avaliação Histopatológica.....	55
2.3.5.1 Grupo controle	56
2.3.5.2 Grupo 1	56
2.3.5.3 Grupo 2.....	59
2.3.5.4 Grupo 3.....	60
2.3.5.5 Grupo 4.....	62
2.4 CONCLUSÕES.....	64
REFERÊNCIAS.....í	65

1 CONTEXTUALIZAÇÃO

O cão é uma espécie cosmopolita, que vive sempre nas proximidades de aglomerados humanos e a reprodução descontrolada desses animais, principalmente os errantes, podem causar sérios problemas de saúde animal e pública (MASCARENHAS, 2003). Segundo Costa (2004), as zoonoses mais comuns transmitidas pelos cães são a raiva, leptospirose, leishmaniose, larva migrans cutânea e toxoplasmose.

Soto (2003) observou que a eutanásia e recolhimento não são eficientes dentre as medidas para controle populacional, inclusive Rowan (1994) ressalta que a eutanásia de cães com saúde é inaceitável numa sociedade que busca animais de companhia. Como segundo aspecto, este autor considerou a eutanásia foco central de uma sociedade consumista que vê o animal como objeto descartável.

A Organização Mundial de Saúde (WHO, 1990) recomenda que a proporção ideal seja de 1 cão para cada 8 habitantes. Segundo Reichman (2010), a proporção habitantes/cães em São Paulo é 1:4. Okamoto (2004), refere a proporção de 1:2 na cidade de Pinhais, Paraná. Em Belém, não há o cálculo proporcional, porém o Centro de Zoonoses de Belém estimou uma população de 240.000 cães vacinados em 2010, o que não nos permite avaliar a população total, uma vez que os animais de rua não são levados à campanha, e muitos não são levados por motivos diversos (IBGE, 2010). Já em São Paulo, Magnabosco (2006) e Canatto (2010) observaram a prevalência de cães machos domiciliados, demonstrando a necessidade de um controle populacional específico para esse sexo.

A ovariosalpingehisterectomia (OSH) e a orquiectomia, são os métodos mais indicados para o controle populacional de cães e gatos. Já Soto (2009) concluiu que a castração química em cães é uma alternativa viável e com possibilidade de atingir uma população de cães em tempo e custo inferior ao de um procedimento cirúrgico. Em alguns países, os produtos esterilizantes a base de zinco já são amplamente utilizados em campanhas de contracepção masculina de cães (LEVY et al., 2008). Hawkins (2006) e Levy et al. (2008) relataram que nos Estados Unidos da América ocorrem eventos de contracepção nos quais mais de 200 cães são esterilizados em um único dia com Gluconato de zinco.

Diante do exposto, este estudo se propôs a avaliar a eficácia do Gluconato de zinco (26,2 mg) associado ao Dimetilsulfóxido (0,05 mg) como uma alternativa para o controle populacional de cães.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral

Avaliar o efeito do Gluconato de zinco (26,2 mg) associado ao Dimetilsulfóxido (0,05 mg) na castração química de cães no município de Belém, Pará.

1.1.2 Específicos

- Avaliar e comparar a eficácia das diferentes posologias recomendadas;
- Avaliar e comparar as alterações nos parâmetros do sêmen entre os grupos antes e após os tratamentos;
- Descrever as modificações ultrassonográficas no parênquima testicular antes e depois da aplicação do produto;
- Observar e comparar as alterações histopatológicas do parênquima testicular, causadas pelo tratamento.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 Histórico e importância da castração química

Aguiar (2007) refere que a castração química era usada como punição desde a Antiguidade para impor humilhações a vencidos em guerras e, na primeira metade do século XX, com o objetivo de "purificar a raça", tornando vários tipos de criminosos estéreis, registrando também a castração por motivos religiosos, como no caso dos *castrati*, destinados a ter voz aguda para cantarem em igrejas.

O primeiro relato utilizando o Dietilestilbestrol para redução da testosterona como alternativa à prisão perpétua ou pena de morte data de 1944 (MILLER, 1998). A partir de 1966, começou a utilização dos derivados da medroxiprogesterona nos Estados Unidos para tratamento de pedófilos (SCOTT; HOLMBERG, 2003). A substância base do produto químico usado nunca foi aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) (SPALDING, 1998).

O primeiro país a utilizar a castração química como método de punição em humanos foi o Canadá em 1997. Atualmente, nos Estados Unidos da América, nove estados tem realizado estudos demonstrando a eficiência na utilização do regime de injeções semanais (CABRAL, 2010). Os outros países que já utilizam esse método são Polônia, Argentina, Coreia do Sul, Israel, Itália, Suécia, Alemanha e Dinamarca. Está em fase de implantação na França, Espanha e Índia (MELO, 2011).

No Brasil desde 1988 há projetos de lei e uma proposta de emenda constitucional apresentadas no Congresso Nacional com a finalidade de inserir pena de castração química no Código Penal (DA ROSA, 1988).

Em animais, é um processo estudado há mais de cinco décadas, sendo Freund (1953, apud NUNES, 2012), o primeiro a testar esse método em *Cavia porcellus* (porquinhos-da-índia) com ácido acético por via intratesticular.

Essa alternativa é testada desde a década de 70 em cães de maneira oposta à intenção em humanos, pois a esterilização química em cães é um método ligado à compaixão, como alternativa para o controle populacional, evitando sofrimento de ninhadas e maus tratos aos animais abandonados, sendo a primeira solução utilizada para esse fim, composta por nitrato de prata, formaldeído e permanganato de potássio, diluídos em etanol absoluto (DIXIT et al., 1975; IMMEGART; THRELFALL, 2000).

Fahim et al. (1993) foram os primeiros a testar e comprovar a eficiência de soluções à base de zinco associada à Arginina em um procedimento de castração química em cães.

1.2.2 Morfologia e fisiologia testicular do cão

De forma geral, os testículos se localizam no escroto, definitivamente na cavidade albugínea que reveste os testículos, epidídimos e o funículo espermático (DYCE et al., 2010). Esta túnica emite septos conjuntivos contendo vasos sanguíneos, linfáticos e nervos, dividindo o parênquima testicular em lóbulos (SLATTER, 2003). Estes possuem três compartimentos funcionais, dos quais o primeiro é o compartimento intersticial, que contém vasos sanguíneos, células de Leydig responsáveis por produzir a testosterona, estradiol e outros hormônios, e tecido conjuntivo de suporte (NELSON; COUTO, 2006). O segundo compartimento é o compartimento basal dos túbulos seminíferos, que contém espermatogônias e células de Sertoli. O terceiro é o compartimento adluminal dos túbulos seminíferos, que contém espermátócitos e espermátides (Figura 1). Os compartimentos basal e adluminal, são separados pela barreira hematotesticular, constituída pelas células de Sertoli e seus complexos juncionais (JOHNSTON et al., 2001; NELSON; COUTO, 2006).

As duas principais funções do testículo são a espermatogênese e a produção e secreção de andrógenos (JOHNSTON et al., 2001).

A espermatogênese, consiste em uma sequência de eventos divididos em duas fases (Figura 1): a espermatocitogênese, em que há formação de espermátides a partir de espermatogônias, e a espermiogênese, em que há diferenciação de espermátides em espermatozóides (JOHNSTON et al., 2001).

Estes processos ocorrem por mitose e meiose (JOHNSTON et al. (2001); SLATTER (2003); HAFEZ;HAFEZ (2004), além de metamorfose (SLATTER, 2003).

A espermatogênese tem duração média de 62 dias no cão (JOHNSTON et al., 2001).

A maturação epididimária dos espermatozóides é dependente de testosterona (JOHNSTON et al., 2001). Durante a passagem no epidídimo, o desenvolvimento da habilidade fertilizante está relacionado com modificações em vários aspectos da integridade funcional dos espermatozóides: desenvolvimento do potencial para manter a motilidade progressiva, alteração dos padrões metabólicos e a situação estrutural de organelas específicas da cauda, modificações na cromatina nuclear, modificações na natureza da superfície de membrana plasmática, movimentação e perda da gota protoplasmática (JOHNSTON et al., 2001). O principal local de armazenamento de espermatozóides do aparelho reprodutivo

masculino (GARNER; HAFEZ, 1982) é a cauda do epidídimo, que apresenta 70% do número total de espermatozóides.

Segundo Arthur et al.(2001), o trânsito epididimário leva 8-14 dias e intervalo entre o estágio mais sensível ó prófase meiótica ó e a ejaculação é de, aproximadamente, 30 dias. Então, o intervalo entre uma injúria causada no testículo e o surgimento de espermatozóides anormais no ejaculado é geralmente de 35 dias, dependendo do sítio da injúria.



Figura 16 Imagem histopatológica de testículo normal. 1-Células mioepiteliais. 2- Espermatogônia. 3- Espermatócito. 4- Espermátide. 5- Espermátide alongada. 6- Células de Sertoli 7- Células de Leydig.

Fonte:fabiomizote.wordpress.com/espermatogênese.

1.2.3 Esterilizantes com Gluconato de Zinco

Nunes (2012) refere que no ano de 2003, ocorreu a entrada do Neutersol® no mercado, sendo este o primeiro agente esterilizante não cirúrgico permanente a receber aprovação regulatória da FDA (ANON, 2003; WIEBE; HOWARD, 2009). O produto utiliza Gluconato de Zinco (13,1 mg/ml) sendo neutralizado pela adição de L-arginina na mesma concentração e é recomendado para cães entre 3 e 10 meses de idade. Ficou indisponível no mercado entre 2005 e 2007, e em 2008 foi lançado no México, pela empresa Ark Science, LLC, e obteve o nome modificado para Zeuterin®(EUA), Esterilsol® (fora dos EUA) e encontra seu uso regulado nos EUA, México, Colômbia, Bolívia e Panamá, podendo ser usado com uma autorização especial de forma limitada, em alguns países em que não possui a aprovação regulamentar (ALLIANCE FOR CONTRACEPTIONS IN CATS & DOGS, 2011)

Conforme o Sumário para regulamentação do Neutersol®, no experimento oficial (FDA, 2003) 224 cães entre 3 e 10 meses de idade completaram o estudo num período de 6 meses. Uma aplicação em cada testículo produziu esterilização química em 99,6% cães, conforme análise de sêmen em série. A testosterona não foi completamente eliminada. Dentre os efeitos colaterais, pode ocorrer irritação e ou ulceração do escroto no local da injeção, vocalização, vômito, dor à palpação, irritação ou dermatite escrotal, inchaço leve e temporário, aumento no número de glóbulos brancos, anorexia, letargia e diarreia, por até uma semana. E ainda, há a observação que os animais continuam férteis por 30 dias após a aplicação.

No Brasil, há relato do uso de dois produtos utilizando o Gluconato de zinco: Testoblock® (BioRelease Technologies) que contém 0,1M de zinco sendo a concentração final de 13,1 mg de zinco/ml de solução, neutralizado em veículo à base de L- arginina na mesma concentração, e é liberado pela FDA para cães a partir 3 a 10 meses de idade. A dose varia de 0,2 a 1 ml de acordo com o diâmetro testicular. E, mais recentemente, em 2009, foi registrado o Infertile® (Rhobifarma), sob o nº 9.427/2008 no MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), que apresenta o Gluconato de Zinco (26,2 mg) associado ao DMSO (5 mg), e a dose varia de 0,5 a 2 ml de acordo com o diâmetro testicular.

1.2.4 Controle reprodutivo do macho

O bloqueio reprodutivo permanente do macho pode ser obtido por meio de intervenção cirúrgica (orquiectomia, vasectomia), terapia medicamentosa ou da utilização de agentes esclerosantes no testículo ou epidídimo (OLIVEIRA, 2007).

Os agentes esclerosantes que têm sido utilizados incluem glicerol (IMMEGART; THRELFALL, 2000), tanato de zinco, gluconato de zinco (FAHIM et al., 1993), clorexidina, dimetilsulfóxido (PINEDA et al., 1977; PINEDA; DOLEY, 1984) e ácido láctico (NISHIMURA et al., 1992).

1.2.4.1 Castração Química

Segundo Müller et al. (2010), para que a esterilização química seja considerada tão eficaz quanto à esterilização cirúrgica, ela deve preencher alguns requisitos como: ser eficaz em uma grande porcentagem de animais tratados, segura para os animais tratados e para o

meio ambiente e finalmente, ser irreversível após um único tratamento. O primeiro produto que preencheu estes requisitos foi o Gluconato de zinco (OLIVEIRA et al., 2011).

As 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). Entretanto, em alguns países os produtos esterilizantes a base de zinco já são amplamente utilizados em campanhas de contracepção masculina de cães (LEVY et al., 2008).

Existem diversos relatos na literatura da utilização de agentes esclerosantes no testículo, epidídimo e ducto deferente (PINEDA et al., 1977; NISHIMURA et al., 1992; IMMEGART; THRELFALL, 2000). Esses autores demonstraram que ao serem injetados no parênquima testicular, os agentes esclerosantes levam à atrofia testicular 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 (demarcação pela urina, monta, agressividade).

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). Observaram esses autores também, que se estes agentes são injetados no ducto deferente ou epidídimo, ocorrerá azoospermia pela indução de oclusão fibrosa, contudo a possibilidade do surgimento de alterações andrógeno-dependentes não pode ser descartada.

1.2.4.1.1 GLUCONATO DE ZINCO POR VIA INTRATESTICULAR

O Gluconato de Zinco (GZ) 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).

A ação do produto é irreversível, entretanto Silva et al. (2011), analisam que parte do mecanismo de ação do gluconato de zinco sobre os testículos baseia-se no desencadeamento de uma resposta inflamatória exacerbada, que leva à interrupção da espermatogênese e

consequente azoospermia dos animais, então que a administração de uma droga com ação anti-inflamatória, mesmo que secundária, poderia comprometer a eficácia da esterilização.

A administração do medicamento à base de Gluconato de Zinco, segundo Harper (2004), deve ser feita o mais próximo possível da cabeça do epidídimo, pois coincide com a proximidade da *rete testis*, o que facilita a difusão da solução por todo o testículo e epidídimo. Essa localização também foi de eleição para Oliveira (2007) e Mazzei et al.(2012).

Immegart; Threlfall (2000) em estudos anteriores utilizando-se injeção intratesticular de Gluconato de zinco + Arginina (GZ+Arg) em cães, mostraram eficácia apenas em cães entre 3-10 meses de idade e que segundo os autores, provavelmente, a razão para se restringir a utilização da droga a apenas animais jovens tenha sido devido ao volume testicular, que é menor em animais pré-púberes quando comparado aos animais adultos e a distribuição da droga no testículo tenha sido facilitada por esta característica anatômica, e o grau de difusão da droga que depende da solubilidade e das propriedades de ligação dos seus componentes.

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., 1986).

Acredita-se que a injeção intratesticular da solução à base de zinco leva a uma alteração semelhante à observada na orquite autoimune, processo inflamatório testicular mediado por formação de anticorpos contra os próprios antígenos testiculares do indivíduo, nesse caso, ocorre lesão no epitélio germinativo e destruição dos espermatócitos, espermátides e espermatozóides o que resulta na esterilidade do animal (MANN; LUTWAK-MANN, 1981).

Fahim et al.(1993), foram os primeiros a testar e comprovar a eficiência de soluções à base de zinco em um procedimento de castração canina com agente esclerosante. Foi testada a ação de injeção de GZ+ARG na cauda do epidídimo de cães adultos. A azoospermia induzida apareceu três meses após a injeção da solução, e perdurou por um ano após a aplicação. Histologicamente, esses 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 concluíram que, a concentração de testosterona plasmática não foi alterada.

Wang (2002), avaliando o efeito de injeção intratesticular de GZ+ ARG em cães com idades entre 2½ a 10 meses, observou aspermia, azoospermia ou necropermia aos 60 dias do

início do tratamento em 95% dos animais. Segundo o autor, o mecanismo de ação da droga foi atribuído ao zinco que causou atrofia dos túbulos seminíferos com formação de tecido de granulação que impediu a migração dos espermatozóides dos túbulos seminíferos para o epidídimo.

Em outro experimento, foi relatado que a concentração de testosterona plasmática reduziu até em 52% nos cães tratados com injeção com GZ+ARG, entretanto, alguns animais do experimento mantiveram a concentração do andrógeno semelhante ao do grupo controle (FDA, 2003; HARPER, 2004). Ainda Harper (2004), concluiu que a injeção de Gluconato de zinco não deve ser utilizado para correção de alterações andrógeno-dependentes.

Tepsumethanon et al. (2005), utilizando o GZ+ ARG em 5 cães observaram ausência de sinais de desconforto durante a aplicação, e edema até 7 dias após a aplicação do produto, reduzindo este após até 6 semanas. Um dos cães apresentou uma úlcera escrotal superficial após uma semana. Aos 21 dias os cães começaram a apresentar ausência de ejaculação e aspermia. Após 60 e 75 dias, histopatologicamente os autores observaram fibrose nos túbulos seminíferos.

Oliveira (2007), demonstrou que a injeção intratesticular da solução à base de zinco induziu a alterações testiculares em animais jovens e adultos, apesar do volume testicular ser diferente. Sua eficácia foi avaliada em animais entre oito meses e 10 anos de idade por um período de seis meses, e indicam que a solução GZ+ ARG é eficaz em bloquear a espermatogênese. A autora observou azoospermia aos 60 dias após a injeção de zinco, e o grau de dano celular encontrado à avaliação histológica e ultraestrutural dos testículos sugeriu a irreversibilidade do processo.

Levy et al. (2008), usando o GZ+ ARG, comparou a castração de cães pelo uso da injeção intratesticular em 103 cães com os procedimentos cirúrgicos tradicionais em 58 cães. Observaram deiscência em 3,4% nos animais operados, e reações de necrose no local da injeção em 3,9% dos animais tratados 6 dias após a aplicação, demonstrando que os dois métodos apresentam um pequeno percentual de complicações semelhantes, entretanto no grupo que utilizou a castração química essas complicações foram menores, uma vez que havia quase o dobro de animais tratados.

Soto et al. (2007) avaliando o gluconato de zinco em cães, dividiram em 5 grupos, sendo o Grupo 1 (solução salina); Grupo 2 (GZ-13,1 mg); Grupo 3 (GZ-26,2 mg); Grupo 4 (GZ-13,1 mg + DMSO-0,5mg); Grupo 5 (GZ- 26,2 mg + DMSO- 0,5 mg), observando por seis meses. Foram realizadas avaliações quinzenais através de espermograma, assim como

ultrassonografia testicular e análise histopatológica no final do experimento. Os autores observaram alterações principalmente nos grupos 3, 4 e 5, entretanto, segundo os autores o grupo 5 apresentou o maior número de alterações quando comparados aos demais tratados, com quadro mais significativo de subfertilidade. Não observaram azoospermia em nenhum grupo tratado.

Motta (2008), utilizando formulação manipulada composta por GZ+DMSO, em cães adultos, com avaliações semanais, e a partir de 35 dias, o autor começou a observar necrospermia, oligospermia e/ou azoospermia em 80% dos animais. Após 160 dias, foram colhidos os testículos para exame histopatológico, concluindo então o autor, que o fármaco não foi plenamente eficaz em bloquear a espermatogênese de cães na fase adulta, pois só apresentavam lesões próximas ao local de aplicação.

Soto et al. (2009) avaliaram o efeito do GZ+DMSO em cães por seis meses, através de espermograma quinzenal e uma ultrassonografia testicular e histopatologia ao final do experimento, e após 3 meses de tratamento, os animais que apresentavam 60% de motilidade, receberam mais uma aplicação do fármaco. Segundo os autores, na avaliação posterior a motilidade reduziu para menos de 20%.

Em estudo realizado por um período de um ano, Muller et al. (2010) relataram que a azoospermia dos cães observada aos 60 dias foi mantida durante todo o período de monitoramento dos animais, confirmando a irreversibilidade e a eficácia do medicamento em longo prazo.

Mazzei et al. (2012), observaram o efeito do GZ+ DMSO em cães em cinco meses de experimento, com avaliações mensais de espermograma, alocados em grupo controle e tratado. Os animais tratados receberam duas injeções intratesticulares de 1ml de GZ+ DMSO e o grupo controle 1,0 ml de solução de NaCl 0,9%, ambos em intervalo mensal. Segundo os autores, foi detectada queda na qualidade espermática, porém, apenas 27% foram considerados inférteis (azoospermia ou aspermia), enquanto os demais (73%) desenvolveram um quadro de subfertilidade.

1.2.5 Dimetilsulfóxido (DMSO)

Já foram verificadas mais de 30 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 (SOYKA et al., 1990).

Essas propriedades garantem seu reconhecimento como uma das drogas mais versáteis utilizadas tanto em seres humanos como em animais há mais de 60 anos segundo Adamson et al.(1966).

Dentre as principais ações do DMSO, Alves (1997) ressalta:

Penetração e difusão nos tecidos e fluidos animais (SOYKA et al., 1990);

Carreadora - Devido à intensa capacidade de penetração, muitas substâncias quando associadas ao DMSO podem ser carreadas através das membranas (BRAYTON, 1986; BLYTHE et al.,1986; ROSE; HODGSON,1993; RAND-LUBY et al., 1996);

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

Antiinflamatória- A partir da década de 60 do século XX, o DMSO tem sido considerado miraculoso e vastamente conhecido (BLYTHE et al., 1986; BRAYTON,1986), resultando de mecanismos múltiplos (ALSUP; DEBOWES, 1984; SOYKA et al.,1990). O DMSO é bastante eficaz na inflamação aguda (ROSE; HODGSON, 1993);

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, 1965; HAIGLER; SPRING, 1983; BRAYTON, 1986). Por outro lado, essa ação central é postulada por não envolver receptores opióides (BRAYTON, 1986);

Toxicidade - É reconhecida como baixa, segundo Brayton (1986) e Stone (1993)

Vias de excreção - A principal via de excreção é urinária. Para ocorrer efeitos colaterais como hemólise, hemoglobinúria, cólica e diarreia, são necessárias concentrações acima de 20% de DMSO, o que é incomum na sua utilização como fármaco. Evidências indicam que o DMSO não é cancerígeno (BRAYTON, 1986);

Vias de administração - O DMSO pode ser administrado em animais pela vias: tópica, oral, auditiva, ocular, intravenosa, intramuscular, intratesticular, intraarticular, intraperitoneal, intravesical e intrauretral (RAND-LUBY et al., 1996; ALVES, 1997).

1.2.6 Coleta de sêmen e Exame andrológico

O exame físico completo bem como o trato reprodutivo do cão deve ser completamente 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). Diversos métodos foram descritos para a coleta de sêmen nesta espécie, tais como: massagem digital, uso de vagina artificial, vibrador elétrico e eletroejaculação (CHRISTIANSEN, 1988). Segundo Boucher et al. (1958), a massagem digital permite a obtenção de um ejaculado de qualidade superior ao ser obtido por vagina artificial, sendo que o primeiro método é especialmente confiável mesmo para cães não condicionados .

A massagem digital consiste em massagear o prepúcio do cão na altura do bulbo da glândula, até que o animal atinja a ereção parcial. O prepúcio é então retraído para trás do bulbo e o pênis é apertado com moderada pressão, posteriormente ao bulbo (SEAGER; FLETCHER, 1972; CHRISTIANSEN, 1988). 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 podem variar de acordo com a idade, tamanho, frequência de coletas, método e duração das coletas. O volume normal vai de 1 a 40 ml por ejaculado (MIES FILHO,1987; FELDMAN; NELSON,1996). Aguiar et al. (1994), citaram valor de $5,98 \pm 2,3$ ml para ejaculado total de cães de até 20 kg.

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 sob 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,1996). Aguiar et al. (1994) observaram valores médios de $68,91 \pm 12,38\%$ para motilidade espermática em cães com peso corpóreo de, no máximo 20 kg.

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 (1996). Aguiar et al. (1994), verificaram o valor de $3,19 \pm 0,76$ para o vigor espermático em cães com peso corpóreo de, no máximo 20kg.

A concentração é determinada através da contagem das células espermáticas em Câmara de Neubauer, após diluição de 1:20 em formol salino, e o número de espermatozóides é expresso em mm^3 (CUNHA, 2008). Aguiar et al. (1994), observaram que o normal para cães

de até 20 kg de peso corpóreo, uma concentração espermática de $47,73 \pm 12,20 \times 10^6$ / ml de ejaculado.

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 ó 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.

Feldman; Nelson (1996) e Johnston et al. (2001) referem que, reprodutores normais devem apresentar 70% de células espermáticas com morfologia normal com no máximo 20% de defeitos menores e 10% de defeitos maiores em seus ejaculados.

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 aumento de 40x para identificar os espermatozóides vivos (aparecendo sem coloração) e os mortos que absorveram o corante e se tornaram vermelhos, segundo metodologia de Barth; Oko (1989). São contadas 200 células espermáticas de cada amostra.

1.2.7 Ultrassonografia Testicular

Gonzales (2004) orienta que para a realização de exame ultrassonográfico dos testículos de cães, geralmente não é necessário a tricotomia na maioria dos casos, pois a superfície da pele do escroto é relativamente sem pêlos. O mesmo autor, adverte que é mais conveniente examinar os testículos com o cão em decúbito lateral para reduzir o movimento do paciente, e que também pode ser realizado com o cão em decúbito dorsal e o transdutor de (de 5 a 7,5 MHz) colocado diretamente sobre a pele do escroto após aplicação do gel (CARVALHO, 2004).

Testículos normais são de média ecogenicidade e têm uma ecotextura bem homogênea e são hiperecóticos, quando comparados com a maioria dos órgãos abdominais, exceto o baço (PUHG et al., 1990). A borda do testículo é caracterizada por uma túnica albugínea fina, lisa e hiperecótica. Na imagem sagital é visível uma linha hiperecótica central que representa o

mediastino do testículo, e em vista transversal, o mediastino testicular aparece como um foco hiperecótico localizado centralmente. Em cães muito jovens, os testículos são pequenos, mas homogêneos, e o mediastino pode ser identificado. Em outros cães, pequenos focos hiperecogênicos, representando área dos septos testiculares ocasionalmente são visíveis. O tamanho dos testículos está diretamente relacionado com o peso corporal (HECHT et al., 2001; HECHT et al., 2003).

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.

Pastore (2008) apud Pinho (2010), registrou diferença entre animais púberes e impúberes da mesma idade, onde os púberes apresentavam ecogenicidade maior que os impúberes, sugerindo esse método diagnóstico como parâmetro indicador de precocidade sexual em bovinos.

Evans et al. (1996), estudando o desenvolvimento sexual em touros de corte, interpretaram avaliações de ecogenicidade testicular, concluindo que esta, aumentou durante a fase mais ativa de crescimento dos túbulos seminíferos, com mais células germinativas potencialmente maduras. Chandolia et al. (1997), descrevem que a redução inicial na intensidade de pixel entre o nascimento e 8 semanas de idade, isso provavelmente reflete a produção de líquido nos testículos ou explicada pelo aumento significativo no volume dos túbulos comumente vista antes do início da espermatogênese e que, por sua vez, o aumento nos valores numéricos de pixel entre 8 e 22 semanas de idade poderia ter sido devido à formação gradual dos tipos de célula mais madura da espermatogênese, e que depois de estabelecida a espermatogênese, a intensidade de pixel(IP) estagnou.

Arteaga et al. (2005) afirmam que a ultrassonografia é melhor associada com padrões seminais futuros do que com a qualidade seminal no momento da avaliação em bovinos, uma vez que os autores só observaram correlação da IP com a qualidade seminal 2 a 4 semanas após o exame ultrassonográfico e não com a qualidade seminal no momento do exame.

1.2.8 Histopatologia

Dentre as alterações histopatológicas mais comuns observadas nos testículos, temos a degeneração do epitélio seminífero que se constitui a causa mais comum e importante de declínio da fertilidade em machos das espécies domésticas. A etiologia é multifatorial, o

processo pode ser uni ou bilateral e não envolve necessariamente o testículo como um todo (JUBB et al., 1993; NASCIMENTO; SANTOS, 1997; ACLAND, 1998).

A atrofia testicular pode decorrer de influências sistêmicas ou ambientais (JONES et al., 2000). Orquite e epididimite ocorrem com frequência na maioria das espécies animais (JONES et al., 2000), podendo a primeira resultar de traumas, agentes infecciosos, granulomas espermáticos ou compor extensão de cistites, uretrites, prostatite e epididimite (KENNEY, 1971; FELDMAN; NELSON, 1987; NASCIMENTO; SANTOS, 1997). De outra parte, neoplasias primárias do epidídimo são extremamente raras (JUBB et al., 1993), enquanto que tumores testiculares são comuns em cães e incomuns em outras espécies domésticas.

Segundo Oliveira (2007), as alterações histopatológicas testiculares após a aplicação do gluconato de zinco foram caracterizadas como uma 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).

Soto (2007), observou um decréscimo de células germinativas em todos os grupos, sendo mais evidente no grupo que utilizou a associação GZ(2,62%) + DMSO (0,5%) apresentando degeneração testicular e decréscimo de células germinativas, áreas com intensa atrofia, alterações da arquitetura de túbulos seminíferos, calcificação intratubular, vasculites e diminuição de células de Sertoli, enquanto no epidídimo houve diminuição da arquitetura tubular e diminuição do conteúdo intraluminal.

Soto et al. (2009), observaram que 12 meses após a injeção intratesticular da droga, na avaliação histológica dos testículos, houve degeneração testicular, diminuição do número de células germinativas, atrofia, ruptura da arquitetura dos túbulos seminíferos e perda das células de Sertoli.

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).

Portanto os efeitos do Gluconato de Zinco no parênquima testicular restringem-se ao desordenamento nas células germinativas promovendo alterações desde um decréscimo dessas células, mais evidente próximo ao local da aplicação promovendo atrofia e conseqüentemente a infertilidade. Tal processo pode ser de maneira direta ou indireta devido a uma reação inflamatória causada pelo Gluconato de Zinco.

REFERÊNCIAS

ACLAND, H. M. Sistema reprodutor do macho. In: CARLTON, W. C.; MACGAVIN, M. D. **Patologia veterinária especial**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 1998. p. 573-589.

ADAMSON, J. E.; HORTON, C. E.; CRAWFORD, H. H.; AYERS JR., W. T. The effects of dimethylsulfoxide on the experimental pedicle flap: a preliminary report. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 37, p. 105-110, 1966.

AGREN, M.S.; KRUSELL, M.; FRANZEN, L. Release and absorption of zinc from zinc oxide and zinc sulfate in open wounds. **Acta Dermatologica Venereologica**, v. 71, p.330-333, 1991.

AGUIAR, A. M. F. M. O "direito" do condenado à castração química. **Jus Navigandi**, Teresina, ano 12, n. 1593, 11 nov. 2007. Disponível em: <<http://jus2.uol.com.br/doutrina/texto.asp?id=10613>>. Acesso em: 10 maio 2011.

AGUIAR, P.H.P.; COSTA, M.E.L.T.; ABREU, J.J.; ABREU, C.P. Coleta e avaliação de sêmen canino. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 46, n. 5, p.537-544,1994.

ALSUP, E.M.; DEBOWES, R. M. Dimethyl sulfóxide. **Journal of the American Veterinary Medical Association**.v.185, p.1011-1014, 1984.

ALVES, G. E. S. **Tratamento da peritonite experimental de equinos com uma associação de dimetilsulfóxido, heparina e enrofloxacina**: estudo clínico, cirúrgico e da patologia. 1997. 180p. Tese (Doutorado). Belo Horizonte: UFMG, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, Minas Gerais, 1997.

ANON. FDA approves first injectable solution for dog sterilization. FDA Consumer; 2003.p. 3.

ARTEAGA, A. A, BARTH A. D., BRITO L. F. Relationship between semen quality and pixel-intensity of testicular ultrasonograms after scrotal insulation in beef bulls. **Theriogenology**.v.64, p.408-415, 2005.

ARTHUR, G. H.; NOAKES, D. E.; PEARSON, H. **Veterinary Reproduction e Obstetrics**. 8 ed. Philadelphia: WB Saunders, 2001. 868 p.

ALLIANCE FOR CONTRACEPTIONS IN CATS & DOGS. **Esterilsol[®] /Zeuterin[®] : Injectable Sterilization For Male Dogs**. Disponível em <<http://www.acc-d.org/Esterilsol>>. Acesso em 26 abr. 2012.

BARNET, B. D. Chemical vasectomy of domestic dogs in the Galapagos Islands. **Theriogenology**, 23, p. 499-510. 1985.

BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames, U.S.A.: Iowa State University Press, 1989. 285p.

BLYTHE, L. L.; CRAIG, A.M.; CHRISTENSEN J. M.; APPEL, L. H.; SLIZESKI, M. L. Pharmacokinetic disposition of dimethylsulfoxide administered intravenously to horses. **American Journal of Veterinary Research**. v. 47, p.1739-1743, 1986.

BOUCHER, J.; FOOTE, R. H., KIRK, R. W. The evaluation of semen quality in the dog and the effects of frequency of ejaculation upon semen quality, libido and depletion of sperm reserves. **Cornell Veterinary**. v.48, 67, 1986.

BRAYTON, C. F. Dimethylsulfoxide (DMSO): a review. **Cornell Veterinary**. v.76-90, 1986.

CABRAL, B. F. Discussão sobre a Constitucionalidade da Castração Química de Criminosos Sexuais no Direito Norte-Americano. **Revista Jusvi**. 31 mar. 2010. Disponível em: <<http://jusvi.com/artigos/43525>>. Acesso em: 10 jun 2011.

CBRA- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte. 1996.

CANATTO, B. D. **Caracterização das populações de cães e gatos domiciliados na população de São Paulo**. 2010. 92 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

CARVALHO, F. C. **Ultrassonografia em pequenos animais**. 1. ed., Rio de Janeiro: Rocca, 2004. 214 p.

CHANDOLIA, R. K.; et al. Ultrasonography of the developing reproductive tract in ram lambs: effects of a gnRH agonist. **Theriogenology**, v. 48, p. 99-117, 1997.

CBRA. COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed., Belo Horizonte-MG, 1998. p.52.

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

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

DA ROSA, D. T. D. **A legalização da pena de castração química a condenados por crimes sexuais frente à Constituição da República Federativa do Brasil de 1988**. 2011. Disponível em: <<http://www.buscalegis.ccj.ufsc.br/revistas/index.php/buscalegis/article/viewFile/33695/32764>>. Acesso em: 12 maio 2012.

DIXIT, V.P.; LOHIYA, N.K.; ARYA, M. The effects of chemical occlusion of vas deferens on the testicular function of dog: a preliminary study; **Acta Europaeafertilitati**. v. 6, p. 348-353, 1975.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de anatomia veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 813 p.

EVERSON, D. P.; EMERICK, R J.; JOST, L. K. Zinc-silicon interactions influencing sperm chromatin integrity and testicular cell development in the rat as measured by flow cytometry. **Journal of Animal Science**, v. 71, p.955-962, 1993.

EVANS. H.E.; DELAHUNTA, A. Abdome, pelve e membro pélvico. In: **Guia para a dissecação do cão**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001

FAHIM, M. S.; FAHIM, Z.; HARMAN, J. M. Chemical sterilant for dogs. **Archives of Andrology**. 9, 13-15. 1982.

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

FDA.FDA approves first injectable solution for sterilization in dogs. **FDA Veterinarian newsletter** ,v.18, n.44,jul./ ago. 2003. Disponível em: <[htm.www.arksciences.com /... /fda_summary_report](http://www.arksciences.com/.../fda_summary_report)> . Acesso em: 8 maio 2012.

FDA. Freedom of Information Summary.NADA.Neutersol® Injectable Solution for dogs. **Technology Transfer**, Columbia, Missouri, v.17, p. 141-217, mar. 2003.

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

FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. Philadelphia: W. B. Saunders Co., 1987. 785 p.

FREUND, J.; LIPTON, M. M.; THOMPSON ,G. E. A spermatogenesis in the guinea pig induced by the testicular tissue and adjuvants. **The Journal of Experimental Medicine**.v.97, p.711-726, 1953.

GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozóides.In: HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. São Paulo: Manole. 1982. Cap. 9, p.187-211.

GERMAN, A. J. The growing problem of obesity in dogs and cats.**Journal of Nutrition**, Liverpool, v. 136, n. 7, p. 1940-1946, Julho, 2006.

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.

GONZALES, G. Ecografia del aparato reproductor. In: COBELLO, C. Temas de reproducción em canino y felinos por autores latinoamericanos. **Auspicio Intervet Argentina S.A.**, local, 2004.p.27-42.

HAIGLER, H.J.; SPRING, D. D. Comparison of the effects of dimethyl sulfoxide and morphine. **Annals of the New York Academy of Science** . v. 411, p.19-27, 1983.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. 513 p.

HARPER, C. Neutersol: Chemical sterilization for dogs. In: **Proceedings of the Caribbean Animal Welfare Conference**. Best Practices in Humane Control Stray and Feral Dog and Cat Population. p. 20-25. 2004. Disponível em:<>. Acesso em: 25 maio 2012.

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>>. Acesso em: 8 maio 2012.

HECHT, S.; KING, R.; TIDWELL, A. S.; GORMAN, S. C. Ultrasound diagnosis: Intra-abdominal torsion of a non-neoplastic testicle in cryptorchid dogs. **Veterinary Radiology Ultrasound**. 43. p 58-61. 2001.

HECHT, S.; MATIASEK, K.; KOESTLIN, R. Die sonographische Untersuchung des Skrotalinhaltendes beim Hund unter besonderer Berücksichtigung testikularer Neoplasien. **Tierarztl Prax** 31. p. 199-210. 2003.

IBGE. **Dados do Censo 2010**. Brasília: Diário Oficial da União: Dados do Pará. Disponível em:<<http://www.censo2010.ibge.gov.br>> Acesso em: 10 jan. 2012.

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.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. Sistema genital. In: _____. **Patologia veterinária**. 6. ed. São Paulo: Manole, 2000. p. 1169-1244.

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

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

KENNEY, R. M. Selected diseases of the testicle and epididymis of the bull, 1971. In: International Conference on cattle. DISEASES, 6., 1971, Oklahoma, USA. Proceedings...Oklahoma, USA: American Association of Bovine Practitioners, 1971. p. 295-314.

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

LEVY, J. K.; CRAWFORD, P. C.; APPEL, L. D. et. al. 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.

MAGNABOSCO, C. **População domiciliada de cães e gatos em São Paulo: perfil obtido através de um inquérito domiciliar multicêntrico**. 2006. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/6/6132/tde-06032007-104453/>>. Acesso em: fev 2012.

MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. C. **Male reproductive function and semen: themes and trends in physiology, biochemistry and investigative andrology**. New York, NY: Springer-Verlag, 1981. 495p.

MASCARENHAS, N. M. F., Controle de natalidade de cães e gatos em Londrina e região. **Revista Científica de Medicina Veterinária- Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v.1,n.4, p.229-304. 2003.

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. 2012. Acesso em: 26 out. 2012. p. 26-29.

MELLO, J.O. Castração química para pedófilo volta a agitar o mundo. **Revista Consultor Jurídico**, 24 de julho de 2011. Disponível em <<http://www.conjur.com.br>> Acesso em: Jun. 2011.

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

MILLER R. D. Forced administration of sex-drive reducing medication to sex offenders: treatment or punishment? **PsycholPublicPolicy Law**. v. 4, p.175-699, 1998.

MOTTA, D.S. **Esterilização química em cães com gluconato de zinco associado ao DMSO**. 2008. 68p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)- União Pioneira de Integração Social - Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Brasília, Distrito Federal, 2008.

MÜLLER, P. M.; OLIVEIRA, E. C. S.; SILVA, F. L. M., SILVA, L. G., CARVALHO, D. S., FAGUNDES, A. K. F., MELO, S. K. M. Castração química de cães machos: aspectos clínicos, bioquímicos, reprodutivos e comportamentais. In: JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 10, 2010, Recife. **Resumos...** Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2010. Disponível em: <http://www.sigeventos.com.br/jepex/inscricao/resumos/0001/R0170-1.PDF>>. Acesso em: 10 nov. 2012.

NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. **Patologia da reprodução dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 108 p.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina interna de pequenos animais**. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 1324 p.

NISHIMURA, N.; KAWATE, N., SAWADA, T., MORI, J. Chemical castration by a single injection of lactic acid in rats and dogs. **Journal of Reproductive Development** **38**, 263-266. 1992.

NUNES, R. J. M. **Avaliação de potencial genotóxico de esterilizante químico canino a base de gluconato de zinco**. 2012. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas- Modalidade Produção Químico-Biológica)- Centro Universitário Estadual da Zona Oeste. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012 .

OLIVEIRA, E.C.S. **Esterilização de cães com injeção intratesticular de solução à base de zinco**. 2007. Tese (Doutorado em Ciência Animal) ó Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2007.

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 JR 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.

OKAMOTO, J. **População Canina e felina do Município de Pinhais**. PIBIC. Paraná , 2004.

PASTORE, A. A. **Ultrassonografia na avaliação andrológica de bovinos da raça Nelore**. 2008. 81f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) ó Universidade Estadual Paulista óJúlio Mesquita Filho ó Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2008.

PINEDA, M. H.; REIMERS, T. J.; FAULKNER, L. C.; HOPWOOD, M. L.; SEIDEL J. R. G. E. Azoospermia in dogs induced by injection of sclerosing agents into the cauda e of the epididymides. **American Journal of Veterinary Research**, v.38, p.831-838. 1977.

PINEDA, M. H; DOOLEY, M. S. Surgical and chemical vasectomy in the cat. **American Journal of Veterinary Research**, v.45, n. 2, p. 291-300, 1984.

PINHO, R. O. **Ultrassonografia testicular na avaliação andrológica em touros da raça Nelore e Composto Montana Tropical**. 2010. 109p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 2010.

PUGH, C. R.; KONDE, L. J.; PARK, R. D. Testicular ultrasound in the normal dog. **Veterinary Radiology and Ultrasound**.v.31, p. 195-199. 1990.

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

REICHMAN, M. L. A. B. **Estudo de Populações de cães e gatos no Estado de São Paulo**. São Paulo: Instituto Pasteur, 2010.

RHOBIFARMA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA LTDA. **Estatística**, 2010.

ROSENBAUM, E. E.; HERSCHEL, R. J.; JACOB, S.W. Dimethylsulfoxide in musculoskeletal disorders. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.192, p. 309-313, 1965

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

ROSENBAUM, E. E.; HERSCHLER, R. J.; JACOB, S.W. Dimethyl sulfoxide in musculoskeletal disorders. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 192, p. 309-313, 1965.

ROWAN, N.A. Companion animal demographics and unwanted animals in the United States. **Anthrozoös**, v. 5, n. 4, p. 222- 225, abr.1994.

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

SCOTT ,C. L., HOLMBERG,T. Castration of Sex Offenders: Prisoners' Rights Versus Public Safety **The Journal of the American Academy of Psychiatry and the Law**. v. 31, n. 4, p. 502-509, 2003.

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

SILVA F. L. M., MÜLLER P. M., BRITO L. T., PEIXOTO C. A., SÁ M. J. C., SILVA JR V. A., OLIVEIRA E. C. S. Ultrastructural analysis of dog testis after permanent contraception with intratesticular injection of a zinc gluconate solution. In: Testis Workshop, 21, 2011, Montreal, Canada. **Proceedings...** Montreal: American Society of Andrology, 2011.

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 ó Histopathological evaluation of acute and chronic phase. **Animal Reproduction**, v.7, p.230, 2010.

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

SOJKA, E.J.; KIMMICK, S.V.B.; CARISON, G.P. Dimethylsulfoxide update - New applications and dosing methods. **Proceedings...** American Associated 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**. 2003. 165 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

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

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

SOTO, F. R. M.; VIANA, W. G.; MUCCIOLO, G. C. B.; HOSOMI, F. Y. M.; VANNUCCHI, C. I.; MAZZEI, C. P.; EYHERABIDE, A. R.; DE FÁTIMA L. C.; 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**, n. 44, p. 927-931, 2009.

SPALDING, L. **Florida's 1997 chemical castration law: a return to the dark ages**. Disponível em <:http://www.law.fsu.edu/journals/lawreview/frames/252/spalfram.html.> Acesso em : 12 out 2011 .

STONE, R. W. Clinical updates on the use of dimethylsulfoxide. **Canine Practice**, 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, n. 5, p.686-689, 2005.

TOXICOLOGICAL PROFILE FOR ZINC. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2005. 307 p.

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.

VOLTARELLI, J.C. Febre e inflamação. **Medicina**. Ribeirão Preto, v. 27, p. 7-48, jan./jun1994.

WANG, M. Neutersol: intratesticular injection induces sterility in dogs. In: International Symposium on Nonsurgical Methods for Pet Population Control, 2002, Callaway Gardens, GA. **Proceedings** Callaway Gardens, GA: ACC&D, 2002. p.62-65.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION; **Guidelines for dog population management**. Genova: WHO, 1990. 116 p.

2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO GLUCONATO DE ZINCO + DMSO, NA CASTRAÇÃO QUÍMICA DE CÃES NO MUNICÍPIO DE BELÉM, PARÁ

2.1 INTRODUÇÃO

A superpopulação de cães é um problema de saúde pública comum nos centros urbanos, entretanto observamos que as ações para o controle dessa situação, se encontra em desvantagem perante a velocidade reprodutiva desses animais. Se um casal de cães pode produzir em 10 anos 80.000.000 de animais de acordo com a Sociedade de Proteção Animal Internacional, percebemos que o controle precisa ser rápido, porém eficiente. Rodaski et al. (2001) demonstraram que os principais problemas que dificultam o controle reprodutivo pela maior parte da população é a burocracia, tempo, transporte e os custos.

Dessa forma, Soto (2003) observou que a eutanásia e recolhimento não são eficientes dentre as medidas para controle populacional, inclusive Rowan (1994) ressalta que a eutanásia de cães com saúde é inaceitável numa sociedade que busca animais de companhia.

No Brasil, foi observado que a dinâmica da população canina apresenta uma maioria de machos, em torno de 60 e 70%, enquanto as fêmeas constituem 30 a 40% no total da população (DIAS, 2001; PARANHOS, 2002; SOTO, 2003).

Dentre os métodos contraceptivos, a cirurgia demonstra ser o procedimento mais indicado, (SOTO, 2003), entretanto inviável em algumas regiões por necessitar de ambiente e equipamentos cirúrgicos, assim como medicações pós- operatórias. A castração química em cães é uma alternativa para essas regiões, por ser um procedimento mais simples, com custo inferior ao de um procedimento cirúrgico e que não demanda de material e ambiente adequado (SOTO et al., 2009).

Dentre as substâncias utilizadas com essa finalidade, o Gluconato de Zinco 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 objetivo desse trabalho foi avaliar as alterações testiculares promovidas pelo Gluconato de Zinco a 2,62% associado ao DMSO a 5% em cães, através dos exames ultrassonográfico, andrológico e histopatológico.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Aspectos Éticos

Esta pesquisa foi submetida à apreciação e aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural da Amazônia conforme a Resolução N° 879 do CFMV, sob o número 003/2012- CEUA- 7.641-2012.

2.2.2 Animais e local da pesquisa

O experimento foi realizado em Belém, no Campus da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA), no canil do projeto Vida Digna do Instituto de Saúde e Produção Animal na Amazônia, no período de Agosto a Novembro de 2012, sendo fornecido aos animais alimentação à base de ração comercial e água a vontade.

Foram utilizados 30 cães inteiros, pesando entre 8 a 14 kg, com idades entre 1 a 5 anos (baseados na análise da arcada dentária), sem raça definida, porte médio, provenientes do Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), canil da UFRA, canil da UFPA e do abrigo ASDEPa.

Após a adaptação e avaliação clínica dos animais por um período de 2 semanas, coletou-se o sangue para os exames de hemograma e pesquisa de hemoparasitas, sendo posteriormente realizada vacinação anti-rábica e vermifugação com medicação para o combate de endo e ectoparasitas.

2.2.3 Etapas do experimento

2.2.3.1 Exame Andrológico

Após o período de adaptação, as coletas de sêmen foram realizadas por meio de massagem digital para avaliação espermática, conforme recomendação do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1996).

Os animais foram submetidos a duas coletas de sêmen em dias diferentes (Figura 2A), para obtermos o padrão seminal individual antes da aplicação do produto. Posteriormente as coletas foram semanais para observação das alterações. Cada ejaculado após a separação em frações (Figura 2B) foi submetido a uma avaliação físico-morfológica para determinação de:

volume (ml), concentração (milhões/ml), motilidade individual progressiva (MIP, 0-100%), vigor (0-5), patologias espermáticas (%) e contagem de vivos e mortos, onde os resultados são expressos em unidades, através da contagem de vivos e mortos (CBRA,1996).

O volume foi calculado após a coleta do ejaculado em tubos graduados, separando as três frações: uretral, rica em espermatozóides, e prostática (HEIDRICH, 1977) conforme a Figura 2B.

Em um tubo contendo 0,5 ml de solução de formol-salino foi adicionado 20 μ L de sêmen para análise de concentração espermática.

Para avaliação da motilidade, foi colocada uma gota de sêmen em lâmina sob uma lamínula, ambas pré-aquecidas, e foi observada em microscopia óptica com objetiva de 40x.

O vigor foi avaliado através da avaliação de uma gota de sêmen a qual foi observada o movimento retilíneo progressivo dos espermatozóides.

Além desta avaliação em microscópio óptico de luz, foram preparados dois esfregaços finos em lâminas, para serem coradas pelo método de Cerovsky (CEROVSKY, 1976) para contagem das anormalidades espermáticas, classificadas em patologias maiores e menores.

Para avaliar a contagem de vivos e mortos, uma gota de sêmen à fresco foi misturada ao corante Eosina/ Nigrosina, sendo observada em microscopia óptica em objetiva de 40x.

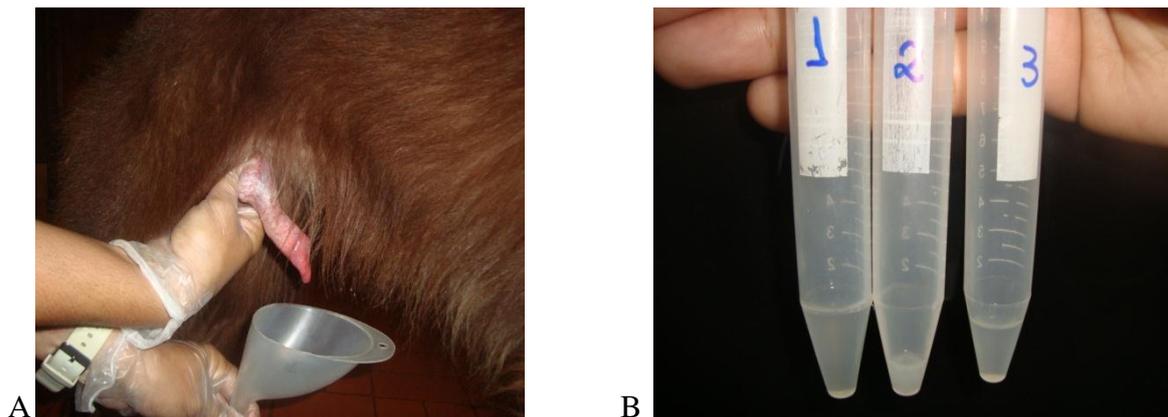


Figura2 - Coleta de sêmen de cão através de massagem digital (A) e separação das três frações do ejaculado de cão (B), sendo: 1- Fração uretral, 2- Fração rica em espermatozóides, 3- Fração prostática (HEIDRICH, 1977).

Fonte: Arquivo Pessoal.

2.2.3.2 Grupos e dias (APÊNDICE 1)

Os animais foram divididos em cinco grupos, e o período de avaliação durante 35 dias após a medicação foi selecionado para confirmar a indicação do produto, que refere após 30 dias a incapacidade reprodutiva dos animais tratados.

Grupo C (Controle) ó Uma aplicação.

Este grupo, com cinco animais, recebeu apenas uma aplicação de soro fisiológico, na dose de 1 ml para cada testículo, na profundidade de meia agulha de insulina. Foi castrado um animal nos dia 7, 14, 21, 28,35.

Grupo 1- Uma aplicação.

Este grupo, com cinco animais, recebeu apenas uma aplicação intratesticular do GZ+DMSO, de acordo com o maior diâmetro transversal testicular, respeitando-se o padrão estabelecido pelo fabricante, ou seja, as doses variam de acordo com o diâmetro mensurado, na profundidade de meia agulha de insulina. Foi castrado um animal nos dia 7, 14, 21, 28,35.

Grupo 2- Duas aplicações.

Este grupo, com cinco animais, recebeu duas aplicações do GZ+DMSO, de acordo com o maior diâmetro transversal testicular, respeitando-se o padrão estabelecido pelo fabricante, ou seja, as doses variam de acordo com o diâmetro mensurado. A segunda aplicação foi realizada 30 dias após a primeira, na profundidade de meia agulha de insulina. Foi castrado um animal nos dia 37, 44, 51, 58,65 (os dias serão contados para avaliação a partir da reaplicação).

Grupo 3 ó Uma aplicação.

Este grupo, com cinco animais, recebeu apenas uma aplicação do GZ+DMSO, entretanto esta dose foi até a saturação testicular, que variou de 0,5 a 2 ml acima do padrão estabelecido pelo fabricante, na profundidade de meia agulha de insulina.

Grupo 4 ó Uma aplicação.

Este grupo com 10 animais, por ser um grupo diferente dos outros devido a forma de aplicação, recebeu apenas uma aplicação do GZ+DMSO, entretanto esta dose foi até a saturação testicular, que variou de 0,5 a 2 ml acima do padrão estabelecido pelo fabricante. Esse grupo recebeu aplicação com uma agulha inteira de insulina, diferindo do grupo anterior devido à profundidade, portanto a porção testicular afetada foi diferente.

2.2.3.3 Aplicação da droga

No dia da aplicação, previamente aplicamos uma tranquilização com Acepromazina em sub-dose (0,025mg/kg) e uma aplicação de AINE à base de Meloxicam (0,2mg/kg), 30 minutos antes da aplicação do Gluconato de zinco+ DMSO de acordo com a metodologia de Lorena et al (2008), o que ficou demonstrado pelos autores ser suficiente para abolir a analgesia após o procedimento. Em seguida o escroto foi limpo com solução antisséptica.

Mensuramos o testículo na sua porção medial transversal, com a utilização de paquímetro (Figura 3). Utilizamos uma seringa e agulha de insulina (0,3x13 mm), onde introduzimos apenas a metade da agulha de insulina nos grupos controle, 1, 2 e 3, uma para cada testículo, para injetar o volume da solução à base Gluconato de zinco+ DMSO. No Grupo 4, foi aplicada apenas uma dose com a introdução total de uma agulha de insulina.



Figura 3 - Mensuração testicular do cão com paquímetro, submetido à injeção de Gluconato de zinco + DMSO. Localização do maior diâmetro testicular. **Fonte:** Arquivo Pessoal.

A aplicação foi realizada na região dorso-cranial de cada testículo, ao lado da cabeça do epidídimo (o mais próximo possível do ducto eferente) e a agulha foi inserida num plano paralelo em relação ao testículo, imobilizando o animal na posição dorso ventral conforme Figura 4.

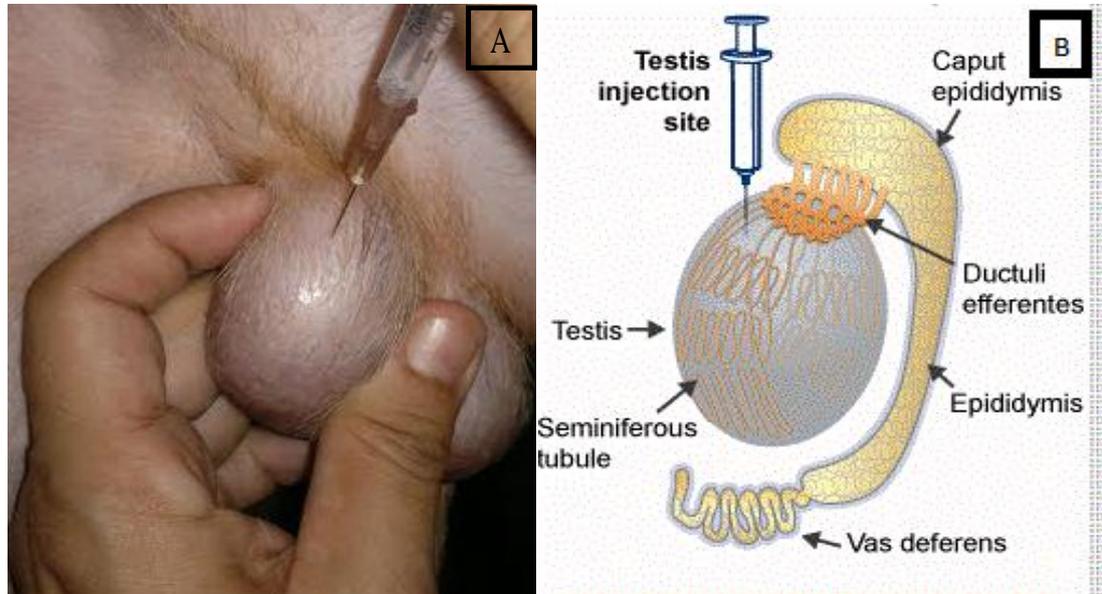


Figura 4 - A) Foto mostrando a aplicação intratesticular da solução de gluconato de zinco + DMSO. **Fonte:** Arquivo Pessoal. B) Desenho esquemático mostrando o correto posicionamento da aplicação. **Fonte:** Ark Science.

2.2.3.4 Doses aplicadas

O Gluconato de Zinco, na concentração de 26,2 mg + DMSO 0,05 mg/ml (Infertile®), são recomendados em doses de acordo com o maior diâmetro transversal testicular, até o máximo de 2ml em cada testículo.

A Tabela 1 mostra o maior diâmetro transversal testicular e a dosagem do fármaco que deve ser aplicada, respectivamente.

Tabela 1- Tabela de doses de aplicação do Gluconato de Zinco +DMSO, após a mensuração testicular.

Tamanho do maior diâmetro transversal testicular (mm)		Volume aplicado (ml)/ Dose padrão
12-17	(porte pequeno ou filhote ate 2 meses)	0,5
18-23	(porte médio)	1,0
24-27	(porte grande)	1,5
27 ou mais	(porte gigante)	2,0
Dose de saturação testicular		0,5 a 2 acima da dose padrão

Fonte: Rhobifarma modificado.

2.2.3.5 Orquiectomia

As cirurgias foram realizadas no departamento de cirurgia do Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural da Amazônia. Todos os cães foram submetidos à orquiectomia bilateral, com subsequente coleta dos testículos. Os animais foram submetidos a jejum sólido e líquido por 12 horas. O protocolo anestésico constou da administração da Acepromazina 0,2% (0,05 mg/kg IM) como medicação pré-anestésica. Na indução anestésica, foi utilizado a Ketamina (10mg/kg) associado ao Diazepan (1 mg/kg) por via endovenosa. Foi infiltrado na região subcutânea pré escrotal, Cloridrato de Lidocaína (5 mg/ml). A técnica utilizada foi a pré-escrotal (BOOTHE, 2003), nesse caso, optamos 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 a Enrofloxacina (5mg/kg) por via subcutânea, durante 7 dias, Meloxican (0,2mg/kg) por 3 dias e álcool iodado no local. O pós-operatório foi acompanhado por 8 dias até a retirada dos pontos e devolução dos animais.

2.2.3.6 Ultrassonografia Testicular

Os exames ultrassonográficos foram realizados com auxílio de um aparelho ChisonUltrasound® D 600 VET(Figura 5), com transdutor linear transretal - 7,0 MHz. Foram feitas imagens nos planos longitudinal e transversal (CARVALHO, 2004) avaliando: tamanho, contornos, ecotextura e ecogenicidade dos testículos (Figura 6A e 6B).

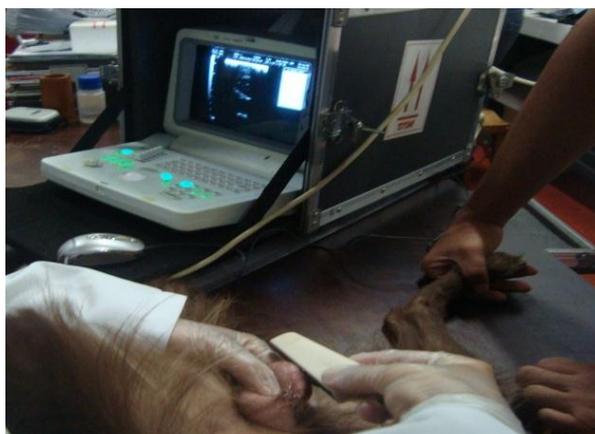


Figura 5- Ultrassonografia testicular em cão. **Fonte:** Arquivo Pessoal

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 0 (zero) representa a cor preta anecóica e o valor de 255 representa o branco hiperecóica. A partir destas imagens determinamos a ecodensidade testicular, expressa em quantidade de pixels/área.

Utilizamos o Programa Image 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 testículos 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 1cm^2 (Figura7). Posteriormente, com os valores dos dois testículos foi obtida a média da ecodensidade testicular por animal.

Os exames foram realizados antes da aplicação e no dia da cirurgia de acordo com o grupo, fazendo uma avaliação comparativa das imagens.

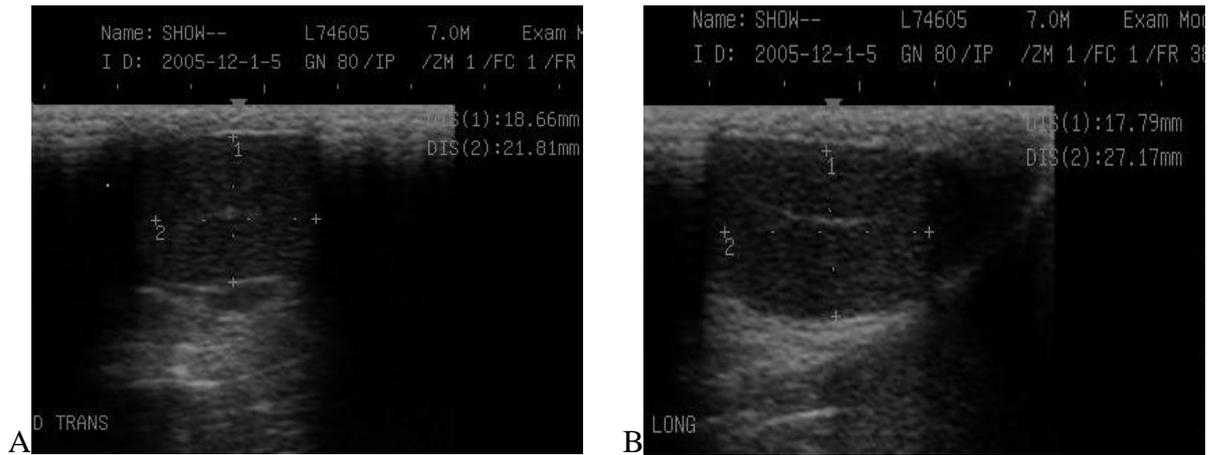


Figura 6- Imagem ultrassonográfica de testículo de cão: A) Imagem longitudinal; B) Imagem transversal. Notar posicionamento do mediastino na parte central do parênquima, com ecogenicidade homogênea.

Fonte: Arquivo Pessoal.

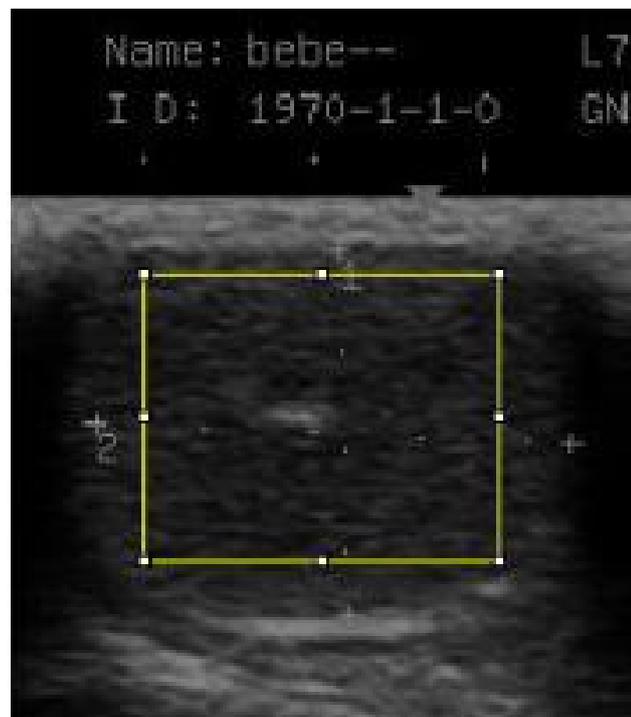


Figura 7 - Foto mostrando imagem ultrassonográfica de testículo de cão, do grupo controle antes da aplicação, com marcação aleatória pelo Programa Image J, de um quadrado de 1 cm², para cálculo das unidades pixels.

Fonte: Arquivo Pessoal.

2.2.3.7 Histopatologia

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

Posteriormente, foram crivados 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 5 micrômetros de espessura e as lâminas coradas pela hematoxilina e eosina para análise em microscópio óptico de luz, com aumento de 10x e 40x para verificar a ocorrência de alterações no parênquima testicular.

2.2.3.8 Análise Estatística

Os dados foram catalogados em planilhas eletrônicas submetidas ao teste estatístico ANOVA (Análise de variáveis) através de software especializado (SAS, 2001). 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 o efeito da dose (de acordo com o grupo) e dos dias de tratamento.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Avaliação Clínica

No presente estudo não foram observados sintomas de vocalização, provavelmente devido a provavelmente à seditação prévia, corroborando com os achados de SETCHELL et al. (1994) uma vez que as terminações nervosas deste órgão estão localizadas no escroto, assim como não houve alteração no consumo de alimento, fato observado igualmente por Soto et al. (2007).

Foi observado vômito em dois animais do grupo tratado (0,08%), enquanto Oliveira (2007) por 150 dias e Tepsumethanon et al. (2005) por 75 dias, não observaram desconforto ou reações adversas para o animal, evidenciado pela ausência de alterações clínicas significativas e nenhuma mudança de comportamento dos cães durante o período observado.

Ocorreu edema testicular em todos os animais, inclusive no grupo controle, por um período de até 10 dias, sintoma constatado por Motta (2008) e Tepsumethanon et al. (2005), discordando de Soto et al. (2007), que também utilizaram a associação GZ+ DMSO não observando essa alteração em seu experimento.

Observamos reação no local de aplicação por até 35 dias nos grupos tratados, e apenas um animal do Grupo 3 ó 14 dias (5 %) apresentou vermelhidão, e irritação local provavelmente por lambedura ou extravazamento da solução entre o parênquima e o escroto, entretanto esse animal recebeu o triplo da dose que seria padrão conforme a mensuração testicular, enquanto Cedillo et al. (2006) encontraram 3,1% de cães tratados com o GZ+ ARG com úlceras ou fístulas na dose padrão, e Wang (2002), utilizando GZ+ ARG, relatou irritação escrotal em apenas 2% dos cães, após 3 dias da aplicação, sem necessidade de tratamento, por não haver agravamento das lesões. Oliveira (2007) relatou que apenas um cão do grupo tratado adulto (10%) com GZ+ ARG desenvolveu irritação do escroto e dermatite após 30 dias do tratamento enquanto Soto et al.(2009) avaliando o GZ+ DMSO durante 7 meses, não observou alterações no local de aplicação nos animais tratados.

Em nosso trabalho observamos reação no local de aplicação em 5% dos animais tratados, sendo que Levy et al. (2008), utilizando GZ+ ARG, observaram reações de necrose após a aplicação em 3,9 % dos procedimentos de 161 cães, demonstrando a probabilidade da ocorrência de problemas no pós-aplicação, devido provavelmente a contaminação no local de aplicação ou reação individual ao Gluconato de Zinco.

2.3.2 Doses aplicadas de acordo com os Grupos

Conforme indicação do fabricante, as doses foram calculadas a partir da mensuração do maior diâmetro transversal testicular.

Nos Grupos 3 e 4 , foram aplicadas doses até a saturação testicular, por isso estes grupos possuem doses maiores quando comparadas aos animais dos outros grupos com a mesma medida testicular, conforme a Tabela 2.

Tabela 2 - Tabela da relação diâmetro transversal dos testículos direito e esquerdo (mm) x volume (ml) da solução de gluconato de zinco + DMSO , de acordo com os grupos.

Grupo/Testículo	Dias/Diâmetro transversal (mm)					Dias/Volume aplicado (ml)				
	D7	D14	D21	D28	D35	D7	D14	D21	D28	D35
GC - Test. D	2.5	2.3	2.6	2.3	2.3	1	1	1	1	1
GC - Test. E	2.4	2.2	2.7	2.2	2.3	1	1	1	1	1
G1 - Test. D	2.6	2.2	2.3	2.1	2.0	1,5	1	1	1	1
G1 - Test. E	2.4	2.3	2.3	2.3	2.0	1,5	1	1	1	1
G2 - Test. D	2.5	2.2	2.4	2.1	2.5	1,5	1	1,5	1	1,5
G2 - Test. E	2.5	2.3	2.5	2.1	2.7	1,5	1	1,5	1	1,5
G3 - Test. D	2.2	2.4	2.0	2.0	2.0	1,5	3	2,5	1,5	2
G3 - Test. E	2.1	2.4	2.1	2.0	2.1	1,5	3	2,5	1,7	3
G4 - Test. D	2.2	2.3	2.0	2.2	2.0	1,7	2,8	2,7	1,6	2,2
G4 - Test. E	2.1	2.4	2.0	2.1	2.2	1,5	3	2,3	1,7	3

Fonte: Arquivo Pessoal

2.3.3 Avaliação ultrassonográfica testicular em Intensidade Pixel

2.3.3.1 Média geral e desvio padrão da ecogenicidade antes e depois da aplicação do Gluconato de zinco + DMSO em todos os grupos.

A média e o desvio padrão da ecogenicidade dos animais estudados foi de $20,60 \pm 6,36$ e $16,42 \pm 10,22$ pixel, antes e depois da aplicação do GZ+ DMSO respectivamente, sendo observada diferença estatística entre as médias ($p < 0,05$), conforme tabela 3.

Tabela 3- Média geral e desvio padrão da ecogenicidade do parênquima testicular de cães submetidos à aplicação do Gluconato de Zinco + DMSO.

Dias	Média \pm DP (Pixel)	Mínimo	Máximo
Antes da aplicação	21,51 \pm 4,56	7,38	30,99
Depois da aplicação	11,48 \pm 5,8	3,98	28,92

(F=9,52; P=0,0028)

Esta diferença no presente estudo, ocorreu devido ao processo inflamatório e degeneração causada após os tratamentos, o que causou uma diminuição da ecogenicidade por acúmulo de líquido promovido pelo edema, corroborando os resultados encontrados por Mazzei et al.(2012) que observaram em todos os animais tratados, alterações na arquitetura, ecotextura e ecogenicidade testicular após a aplicação da droga.

2.3.3.2 Média e Desvio Padrão antes e depois da aplicação do GZ+ DMSO de acordo com os dias de avaliação x Grupo.

2.3.3.2.1 GRUPO CONTROLE

A média e o desvio padrão da ecogenicidade antes e depois da aplicação de soro fisiológico (Tabela 4), no dia sete foi de $20,50 \pm 3,47$ e $12,92 \pm 0,68$, no dia 21 foi de $23,32 \pm 4,04$ e $9,23 \pm 3,20$ e no dia 35 foi de $26,42 \pm 5,85$ e $14,08 \pm 2,05$, sendo observada diferença estatística entre as médias ($p < 0,05$) em todos os dias, provavelmente pelo aumento de líquido promovido pela aplicação (Figura 8A e 8B).

Tabela 4- Média e desvio padrão da ecogenicidade do parênquima testicular de cães submetidos à aplicação de solução fisiológica de acordo com os dias de avaliação e a dosagem de aplicação (Grupo controle).

Dias de avaliação	Média ± DP(Pixel) antes da aplicação	Média ± DP(Pixel) depois da aplicação	F	P
7Dias	$20,50 \pm 3,47$	$12,92 \pm 0,68$	18,27	0,0057
21Dias	$23,32 \pm 4,04$	$9,23 \pm 3,20$	29,74	0,0021
35Dias	$26,42 \pm 5,85$	$14,08 \pm 2,05$	15,80	0,0077

DP-Desvio Padrão .

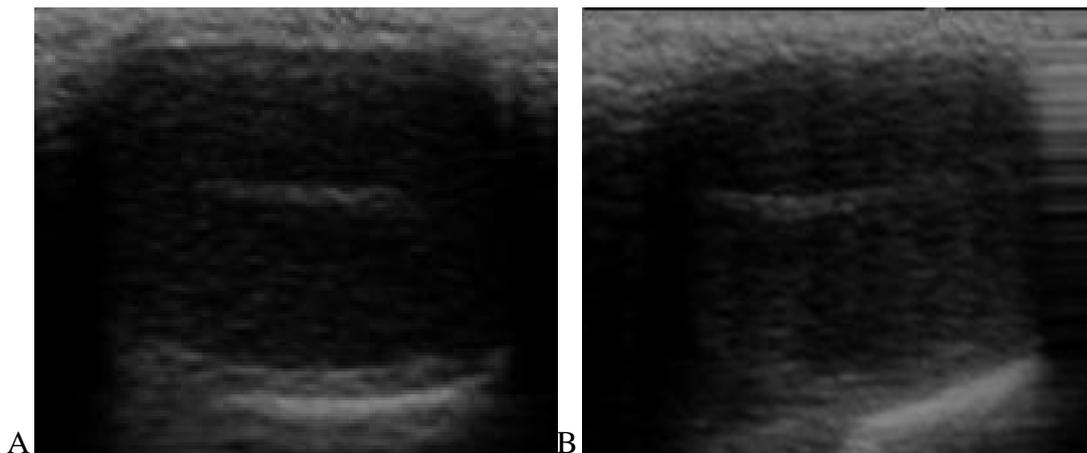


Figura 8 - Imagem ultrassonográfica de testículo de cão do grupo controle, em posição longitudinal, antes (A) e após 35 dias (B) da aplicação da solução fisiológica. A e B ó Parênquima testicular com ecogenicidade heterogênea após aplicação de soro fisiológico.

Esta diferença estatística em todos os dias, difere dos resultados encontrados por Mazzei et al. (2012) que observaram alterações apenas em 28% dos animais do grupo controle, apesar dos autores utilizarem duas doses de soro fisiológico com intervalo de 1 mês entre as aplicações, entretanto suas avaliações eram quinzenais, por um período de 5 meses, com 7 animais.

2.3.3.2.2 GRUPO 1

No Grupo 1 (uma aplicação do GZ+DMSO) a média e o desvio padrão da ecogenicidade antes e depois da aplicação do GZ+ DMSO, foi no dia $7,27,38 \pm 1,1$ e $10,67 \pm 1,44$; no dia 14 foi de $13,19 \pm 4,23$ e $7,43 \pm 2,67$; no dia 28 foi de $27,38 \pm 4,89$ e $12,13 \pm 2,01$ e no dia 35 foi de $13,65 \pm 0,76$ e $25,27 \pm 3,37$ respectivamente sendo observada diferença estatística entre as médias ($p < 0,05$) em todos os dias, à exceção do dia 21. Provavelmente esse aumento da ecodensidade nas duas avaliações iniciais deve ser pelo edema causado pelo Gluconato de Zinco, e cuja reação diminuiu aos 21 dias, e aos 35 dias ocorre elevação demonstrando ainda o efeito da substância no parênquima testicular (Figura 9A e 9B) conforme tabela 5.

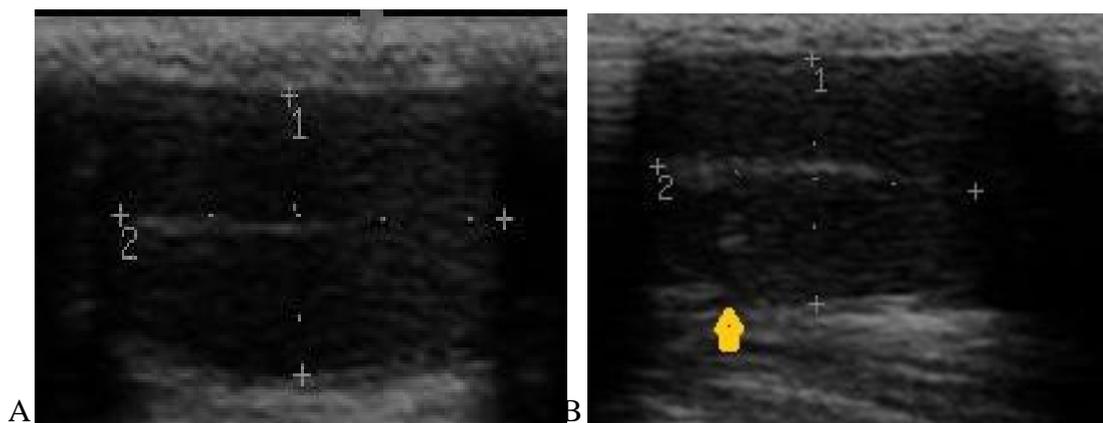


Figura 9 - Imagem ultrassonográfica de testículo de cão do Grupo 1, em posição longitudinal, antes (A) e após 21 dias (B) da aplicação do GZ+ DMSO. A- Parênquima testicular normal (homogêneo). B- Parênquima testicular com aumento de ecogenicidade(seta).

Tabela 5- Média e desvio padrão da ecogenicidade do parênquima testicular de cães submetidos à aplicação do Gluconato de Zinco + DMSO de acordo com os dias de avaliação e a dosagem de aplicação (Grupo 1).

Dias de avaliação	Média \pmDP(Pixel) antes da aplicação	Média \pmDP(Pixel) depois da aplicação	F	P
7Dias	27,38 \pm 1,1	10,67 \pm 1,44	338,14	< 0.0001
14Dias	13,19 \pm 4,23	7,43 \pm 2,67	17,37	0,023
21Dias	18,73 \pm 4,63	17,92 \pm 2,67	0,08	0,77
28Dias	27,38 \pm 4,89	12,13 \pm 2,01	34,80	0,0027
35Dias	13,65 \pm 0,76	25,27 \pm 3,37	45,26	0,0009

DP-Desvio Padrão .

Essas alterações em todos os dias, foram constatadas por Soto et al. (2009) e Mazzei et al. (2012), que também observaram alterações no exame ultrassonográfico de todos os animais tratados com o Gluconato de Zinco 26,2 mg + DMSO 0,05 mg, quando comparados ao Grupo Controle.

2.3.3.2.3 GRUPO 2

No Grupo 2 (duas aplicações do GZ+ DMSO com intervalo de 30 dias) a média e o desvio padrão da ecogenicidade antes e depois da aplicação do fármaco, no dia 37 foi de 10,62 \pm 1,38 e 4,35 \pm 3,69 ; dia 44 foi de 20,70 \pm 5,28 e 1,10 \pm 8,48; no dia 51 foi de 24,30 \pm 5,21 e 39,49 \pm 4,10; no dia 58 que foi de 23,32 \pm 4,04 e 16,28 \pm 0,79 e no dia 65 foi de 18,78

$\pm 1,48$ e $32,31 \pm 3,28$ respectivamente sendo observada diferença estatística entre as médias ($p < 0,05$) em todos os dias, ocorrendo uma diminuição significativa logo na primeira avaliação (Dia 37), seguida de uma ligeira elevação, e em seguida mantendo-se baixa no último dia de avaliação, provavelmente devido a alterações no parênquima testicular (Figura 10A e 10 B), conforme Tabela 6.

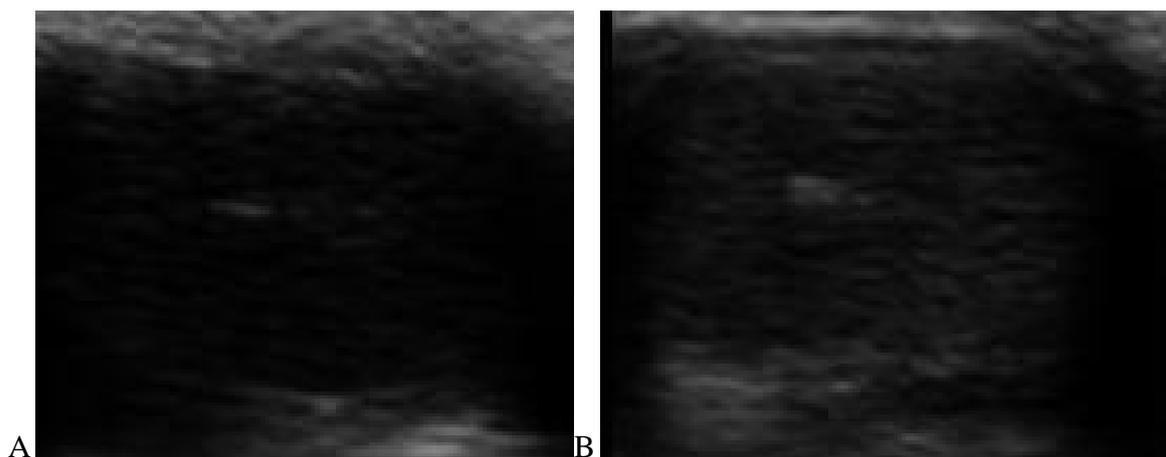


Figura 10- Imagem ultrassonográfica de testículo de cão do Grupo 2 em posição transversal, antes (A) e após 58 dias (B) da aplicação do GZ + DMSO. A- Parênquima normal (homogêneo). B- Parênquima testicular com ecogenicidade heterogênea.

Tabela 6- Média e desvio padrão da ecogenicidade do parênquima testicular de cães submetidos à aplicação do Gluconato de Zinco + DMSO de acordo com os dias de avaliação e a dosagem de aplicação (Grupo 2).

Dias de avaliação	Média \pmDP(Pixel) antes da aplicação	Média \pmDP(Pixel) depois da aplicação	F	P
7Dias	10,62 \pm 1,38	4,35 \pm 3,69	10,07	0,019
14Dias	20,70 \pm 5,28	8,48 \pm 1,10	20,48	0,004
21Dias	39,49 \pm 4,10	24,30 \pm 5,21	20,94	0,004
28Dias	23,32 \pm 4,04	16,2 \pm 0,79	11,65	0,0143
35Dias	32,31 \pm 3,28	18,78 \pm 1,48	56,41	0,0006

DP-Desvio Padrão.

Provavelmente, esta diferença ocorreu devido as alterações na arquitetura, ecotextura e ecogenicidade testiculares após a aplicação do fármaco, semelhante aos resultados encontrados por Mazzei et al.(2008), que utilizaram duas doses do GZ+DMSO e duas doses de soro fisiológico com intervalos mensais observando essa alteração em todos os animais tratados, e a dose utilizada foi semelhante à do nosso experimento no Grupo 2.

2.3.3.2.4 GRUPO 3

No Grupo 3 (uma aplicação do GZ+DMSO até a saturação testicular- meia agulha), a média e o desvio padrão da ecogenicidade antes e depois da aplicação do GZ+DMSO no dia 7, foi de $24,73 \pm 3,78$ e $8,22 \pm 3,34$; dia 14 foi de $14,03 \pm 2,47$ e $3,27 \pm 7,90$; no dia 21 foi de $20,78 \pm 4,58$ e $14,45 \pm 3,18$; no dia 28 foi de $29,72 \pm 2,29$ e $10,96 \pm 0,81$ e no dia 35 foi de $30,72 \pm 3,39$ e $16,13 \pm 1,91$ respectivamente, sendo observada diferença estatística entre as médias ($p < 0,05$) em todos os dias. Esse resultado é inferior ao Grupo 2 no último dia de avaliação, com diminuição da ecodensidade de forma mais intensa, provavelmente devido à quantidade do fármaco aplicada alterando de forma significativa o parênquima testicular (Figura 11A e 11B), conforme Tabela 7.

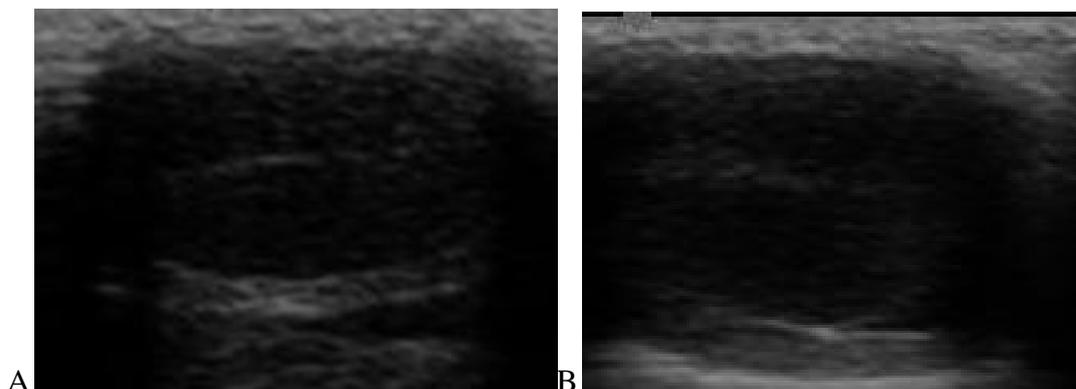


Figura 11 - Imagem ultrassonográfica de testículo de cão, do Grupo 3 em posição longitudinal, antes (A) e após 28 dias (B) da aplicação do GZ+ DMSO. A- Parênquima normal (homogêneo). B- Parênquima testicular com ecogenicidade heterogênea.

Tabela 7-Média e desvio padrão da ecogenicidade do parênquima testicular de cães submetidos à aplicação do Gluconato de Zinco + DMSO de acordo com os dias de avaliação e a dosagem de aplicação (Grupo 3).

Dias de avaliação	Média±DP(Pixel) antes da aplicação	Média±DP(Pixel) depois da aplicação	F	P
7Dias	$24,73 \pm 3,78$	$8,22 \pm 3,34$	42,77	0,001
14Dias	$14,03 \pm 2,47$	$7,90 \pm 3,27$	8,89	0,0241
21Dias	$20,78 \pm 4,58$	$14,45 \pm 3,18$	49,54	0,0049
28Dias	$29,72 \pm 2,29$	$10,96 \pm 0,81$	237,98	< 0,0001
35Dias	$30,72 \pm 3,39$	$16,13 \pm 1,91$	56,03	0,0006

DP-Desvio Padrão

2.3.3.2.5 GRUPO 4

No Grupo 4 (uma aplicação do GZ+DMSO até a saturação testicular - agulha inteira), a média e o desvio padrão da ecogenicidade antes e depois da aplicação do GZ+DMSO no dia 7 foi de $22,73 \pm 1,69$ e $6,22 \pm 1,34$; dia 14 foi de $13,03 \pm 1,47$ e $6,90 \pm 2,27$; no dia 21 foi de $18,07 \pm 5,11$ e $11,07 \pm 0,7$; no dia 28 foi de $28,69 \pm 1,18$ e $9,91 \pm 0,78$ e no dia 35 foi de $29,65 \pm 4,35$ e $15,11 \pm 1,86$ respectivamente, sendo observada diferença estatística entre as médias ($p < 0,05$) em todos os dias, bem como uma diminuição significativa logo no primeiro dia de avaliação e posterior elevação porém em valores correspondentes à metade da avaliação antes do tratamento, demonstrando uma diminuição da progressão das alterações no parênquima testicular, conforme Tabela 8.

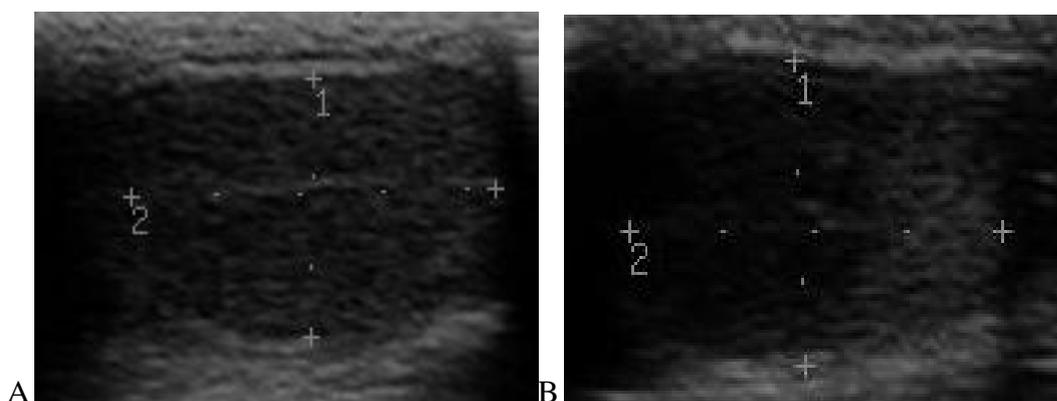


Figura 12- Imagem ultrassonográfica de testículo de cão do Grupo 4, em posição longitudinal, antes(A) e após 28 dias(B) da aplicação do GZ+ DMSO. A- Parênquima normal (homogêneo). B- Parênquima testicular com ecogenicidade heterogênea.

Tabela 8- Média e desvio padrão da ecogenicidade do parênquima testicular de cães submetidos à aplicação do Gluconato de Zinco + DMSO, de acordo com os dias de avaliação e a dosagem de aplicação (Grupo 4).

Dias de avaliação	Média \pm DP(Pixel) antes	Média \pm DP(Pixel) depois	F	P
7Dias	$22,73 \pm 1,69$	$6,22 \pm 1,34$	40,56	0,001
14Dias	$13,03 \pm 1,47$	$6,90 \pm 2,27$	7,89	0,0239
21Dias	$18,07 \pm 5,11$	$11,07 \pm 0,7$	11,01	0,0104
28Dias	$28,69 \pm 1,18$	$9,91 \pm 0,78$	235,96	$< 0,0001$
35Dias	$29,65 \pm 4,35$	$15,11 \pm 1,86$	55,05	0,0006

Os Grupos 3 e 4 apresentaram redução significativa dos parâmetros logo na primeira avaliação, inferior aos demais grupos tratados, justificado por utilizarem uma dose maior do

GZ+ DMSO, entretanto, convém ressaltar que o Grupo 4 apresentou resultados inferiores inclusive ao Grupo 3, demonstrando uma alteração maior que a causada pela aplicação com meia agulha de insulina, constatando a observação de Pinho (2010) que a diminuição da IP representa uma futura diminuição dos parâmetros seminais, nesse caso, será evidente uma diferença entre os parâmetros seminais entre os Grupos 3 e 4.

2.3.3.3 Média antes e depois da aplicação do Gluconato de zinco + DMSO de acordo com os dias de avaliação.

Ocorrem alterações em todos os dias observados, devido provavelmente à alteração promovida pela injeção e introdução de substâncias externas ao testículo, e o processo agudo inflamatório vai reduzindo até o período de 21 dias, levando à restauração no grupo controle e manutenção da diferença nos grupo 2, 3 e 4 (Tabela 9).

Tabela 9- Média e desvio padrão da ecogenicidade do parênquima testicular de cães submetidos à aplicação do Gluconato de Zinco + DMSO de acordo com o dia de avaliação, independente do tratamento.

	Dias de Avaliação									
	7 dias		14 dias		21 dias		28 dias		35 dias	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
Média	21,76 ^a	7,63 ^b	14,46 ^a	7,42 ^b	19,67 ^a	17,75 ^a	27,73 ^a	11,03 ^b	27,62 ^b	16,92 ^a
DP	7,01	4,03	5,14	2,32	4,98	12,31	4,50	3,21	7,87	5,71
Mín	9,26	1,75	8,54	3,18	13,55	11,28	18,22	4,86	12,55	12,98
Máx	28,79	13,52	27,80	11,26	31,54	42,73	32,34	17,43	34,62	32,67

Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente. Anova, Tukey (P<0,05).

Os resultados demonstram uma diminuição da ecogenicidade testicular logo após a aplicação em todos os grupos tratados, provavelmente devido ao processo inflamatório desencadeado pelo Gluconato de zinco, levando a um processo degenerativo, semelhante aos resultados de Soto et al.(2007), que observou diminuição das células espermáticas em todos os grupos, reduzindo a ecogenicidade testicular.

2.3.3.4 Média antes e depois da aplicação do Gluconato de zinco + DMSO de acordo com os grupos

Houve redução da ecogenicidade em todos os grupos, comparando antes e depois da aplicação do fármaco, devido ao processo inflamatório produzido pela invasão do parênquima testicular por substâncias externas, e observamos nos grupos tratados a maior diferença desse parâmetro no Grupo 4 e a menor diferença no Grupo 2 (Tabela 10).

Tabela 10- Média e desvio padrão da ecogenicidade do parênquima testicular de cães submetidos à aplicação do Gluconato de Zinco + DMSO de acordo com a dosagem (Grupo).

	Dias de tratamento									
	GC		G1		G2		G3		G4	
	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois	Antes	Depois
Média	23,41	13,96 ^b	19,74 ^a	14,51 ^b	20,18 ^a	19,55 ^a	21,08 ^a	14,45 ^b	22,43 ^a	9,84 ^b
DP	4,84	6,84	7,15	6,89	14,18	6,07	6,49	9,08	2,76	1,39
Mín	6,48	4,86	8,54	5,05	1,75	9,26	10,48	3,18	13,03	6,22
Máx	32,67	30,40	32,13	29,39	42,73	31,54	32,34	34,49	29,65	15,11

Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente. Anova, Tukey (P<0,05).

Verificamos uma diminuição significativa nos grupos tratados, e mais expressiva nos Grupos 3 e 4 devido ao aumento na dose aplicada, conforme os resultados encontrados por SOTO et al. (2009).

2.3.4 Avaliação do Sêmen

Os valores mínimos referenciais no espermograma dos cães, para considerar a possibilidade satisfatória de fertilidade dos animais foram de 85 % de motilidade, número de espermatozoides de $0,3 \times 10^9$ /ml e números de células espermáticas normais de 80% de acordo com a metodologia de Morrow (1988) e Christiansen(1988).

2.3.4.1 De acordo com o Grupo

2.3.4.1.1 CONCENTRAÇÃO (CONCT X10⁶)

Houve redução da concentração em todos os grupos comparando os valores antes e depois da aplicação, sendo no Grupo controle de $38,7 \pm 82$ e $40,4 \pm 112$, no Grupo 1 de $38,6 \pm 25$ e $32,4 \pm 10$, no Grupo 2 de $37,5 \pm 35$ e $29,9 \pm 76$, no Grupo 3 de $39,5 \pm 86$ e $27,8 \pm 10$

e no Grupo 4 de $39,4 \pm 27$ e $13,7 \pm 37$ respectivamente, ocorrendo diferença estatística nos Grupos 2 e 4 (Tabela 11).

Tabela 11 Média e desvio padrão de concentração espermática em todos os grupos antes e depois dos tratamentos.

Parâmetro		GC	G1	G2	G3	G4
CONCt $\times 10^6$	Antes	$38,7 \pm 82$	$38,6 \pm 25$	$37,5 \pm 35^a$	$39,5 \pm 86$	$39,4 \pm 27^a$
	Depois	$40,4 \pm 112$	$32,4 \pm 10$	$29,9 \pm 76^b$	$27,8 \pm 10$	$13,7 \pm 37^b$

Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente. Anova, Tukey (P<0,05).

Esses resultados estão de acordo com os de Mazzei et al. (2012) que encontraram na concentração dos animais tratados com GZ+ DMSO, valores abaixo dos níveis necessários para a fertilização, assim como Wang (2002), Oliveira (2007) e Motta (2008). Apenas Fahim et al. (1993) não observaram alteração da concentração de cães que foram tratados com GZ+ ARG, durante 1 ano em avaliações mensais.

2.3.4.1.2 VOLUME (ml)

Não houve variação de volume significativo em nenhum grupo após a aplicação do GZ+DMSO (Tabela 12).

Tabela 12 Média e Desvio Padrão de Volume (ml) em todos os grupos antes e depois dos tratamentos.

Parâmetro		GC	G1	G2	G3	G4
Volume(ml)	Antes	$0,7 \pm 0,27$	$1,2 \pm 0,27$	$1,66 \pm 1,43$	$1,17 \pm 0,23$	$1,41 \pm 0,48$
	Depois	$1,15 \pm 0,54$	$3,5 \pm 2,78$	$2,91 \pm 2,63$	$1,53 \pm 0,91$	$1,35 \pm 0,4$

Os resultados encontrados em nosso estudo, estão de acordo com os achados por Fahim et al. (1993) que não observaram nenhuma mudança significativa no volume após aplicação GZ + ARG na cauda do epidídimo de cães, em avaliações mensais por 1 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, quando comparado ao controle, enquanto Mazzei et al. (2012), observaram a média de 1,56 ml nos grupos tratados.

2.3.4.1.3 VIGOR

Em nosso experimento, o vigor antes e depois da aplicação foi no Grupo controle de $3,6 \pm 0,89$ para $4,07 \pm 1,18$, no Grupo 1 de 4 ± 1 para $3,5 \pm 1,21$, no Grupo 2 de $4 \pm 0,7$ para $2,83 \pm 1,26$, no Grupo 3 de $4,25 \pm 0,95$ para $2,57 \pm 0,85$ e no Grupo 4 de $4,3 \pm 0,82$ para $0,9 \pm 0,57$ sendo significativo ($p < 0,05$) nos grupos 2,3 e 4 (Tabela 13).

Tabela 136 Média e desvio padrão de vigor espermático em todos os grupos antes e depois dos tratamentos.

Parâmetro		GC	G1	G2	G3	G4
Vigor	Antes	$3,6 \pm 0,89$	4 ± 1	$4 \pm 0,7^a$	$4,25 \pm 0,95^a$	$4,3 \pm 0,82^a$
	Depois	$4,07 \pm 1,18$	$3,5 \pm 1,21$	$2,83 \pm 1,26^b$	$2,57 \pm 0,85^b$	$0,9 \pm 0,57^b$

Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente. Anova, Tukey ($P < 0,05$).

Apesar de haver diminuição significativa nos grupos 2, 3 e 4, destacamos que o Grupo 4 ficou abaixo dos valores apropriados para a fertilização assim como Soto et al. (2009), que foi de 0,7, após 6 meses. Mazzei et al. (2012), também obtiveram valores impróprios para a fertilização nos grupos tratados que foi de $2 \pm 0,1$, após 5 meses de aplicação do GZ+ DMSO. Essa diminuição foi devido às lesões no parênquima, promovendo alterações na espermatogênese.

2.3.4.1.4 MOTILIDADE (%)

O percentual de motilidade variou no Grupo controle de $81 \pm 9,61$ para $80 \pm 19,68$, no Grupo 1 de $86 \pm 6,51$ para $72,3 \pm 5,21$, no Grupo 2 de $85 \pm 9,35$ para $71,11 \pm 5,1$, no Grupo 3 de $88,75 \pm 6,29$ para $56,07 \pm 27,6$ e no Grupo 4 de $84,5 \pm 8,95$ para $19,25 \pm 12,5$, sendo significativa nos grupos 2, 3 e 4, onde $p < 0,05$, e a motilidade diminuíram devido as alterações causadas no parênquima testicular, conforme a Tabela 14.

Tabela 146 Média e desvio padrão de Motilidade (%) em todos os grupos antes e depois dos tratamentos

Parâmetro		GC	G1	G2	G3	G4
Motilidade(%)	Antes	81 ± 9,61	86 ± 6,51	85 ± 9,35 ^a	88,75 ± 6,29 ^a	84,5 ± 8,95 ^a
	Depois	80 ± 19,68	72,3± 5,21	71,11± 5,1 ^b	56,07 ± 27,6 ^b	19,25±12,5 ^b

Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente. Anova, Tukey (P<0,05).

Fahim et al. (1993), também observaram a diminuição da motilidade após 90 dias da aplicação do GZ + ARG, confirmando a diminuição inclusive no Grupo controle que voltou à normalidade após 2 meses da aplicação, enquanto Soto et al. (2009) utilizando o GZ+ DMSO obteve o valor de 14,54% de motilidade após 6 meses de avaliações, e após 3 meses de experimento reavaliando essa variável, os cães que ainda apresentavam motilidade de 60% foram submetidos a mais uma aplicação do fármaco, e na avaliação seguinte, a motilidade reduziu para menos de 20%, diferindo de Mazzei et al. (2012), que utilizaram o GZ+ DMSO e constataram resultados de 48.88% ± 2,22 para a motilidade após 5 meses de tratamento, resultado bem acima do encontrado em nosso experimento.

2.3.4.1.5 VIVOS E MORTOS

A contagem de vivos e mortos (Figura 12), demonstra que houve diferença (p<0,05) apenas no Grupo 3 que foi de 10 ± 5,59 para 33,07 ± 24,14 e no Grupo 4 de 9,7 ± 7,37 para 60,3 ± 40,27, provavelmente devido a esses grupos serem os que utilizaram maior dose do Gluconato de Zinco, ocasionando lesão no parênquima testicular e morte de diversos espermatozoides (Tabela 15).

Tabela 15 Média e desvio padrão de vivos e mortos de todos os grupos antes e depois dos tratamentos.

Parâmetro		GC	G1	G2	G3	G4
Vivos/ mortos	Antes	20,2± 13,60	8,4± 6,18	26,2± 8,39	10± 5,59 ^a	9,7±7,37 ^a
	Depois	15,15±13,06	13,1± 6,72	38,06± 2,67	33,07±24,14 ^b	60,3±40,27 ^b

Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente. Anova, Tukey (P<0,05).

Essa alteração na contagem de vivos e mortos também foi avaliada por Motta (2008), em um cão que utilizou o GZ+DMSO manipulado para cães a partir de 35 dias, entretanto o autor não realizava a contagem dessas alterações.



Figura 13- Esfregaço de sêmen de cão tratado com GZ + DMSO, do grupo 3, após 21 dias de aplicação. Eosina+Nigrosina, Objetiva de 1000x. **Fonte:** Arquivo Pessoal.

2.3.4.1.6 PATOLOGIAS MAIORES E MENORES (%)

As patologias espermáticas maiores e menores foram agrupadas representando um total de patologias, sendo significativa ($p < 0,05$) nos Grupo 2 que foi de $11,07 \pm 9,4$ para $21,42 \pm 19$, no Grupo 3 de $7,65 \pm 5,75$ para $33,86 \pm 23,09$ e no Grupo 4 de $13,85 \pm 13,79$ para $25,5 \pm 7,95$. Essas alterações foram devidas provavelmente as alterações no parênquima testicular, conforme Tabela 16.

Tabela 16 Média e Desvio Padrão de Patologias maiores e menores (%) de todos os grupos antes e depois dos tratamentos.

Parâmetro/Grupo		GC	G1	G2	G3	G4
P. Maiores (%)	Antes	$6,3 \pm 4,62$	$12,6 \pm 3,83$	$5,8 \pm 5$	$7,02 \pm 5^a$	$6,5 \pm 5,4^a$
	Depois	$7,46 \pm 7,33$	$10 \pm 6,96$	$16,15 \pm 13,65$	$20 \pm 12,98^b$	$17,28 \pm 2,81^b$
P. Menores (%)	Antes	$0,7 \pm 0,8$	$1,2 \pm 1,15$	$3,3 \pm 4,4$	$0,63 \pm 0,75^a$	$7,35 \pm 8,39$
	Depois	$1,4 \pm 1,46$	$2,54 \pm 2,06$	$5,27 \pm 6,39$	$13,86 \pm 10,11^b$	$8,22 \pm 5,14$
P. Total (%)	Antes	$7 \pm 5,42$	$13,8 \pm 4,98$	$11,07 \pm 9,4$	$7,65 \pm 5,75$	$13,85 \pm 13,79$
	Depois	$8,86 \pm 8,79$	$12,54 \pm 9,02$	$21,42 \pm 19$	$33,86 \pm 23,09$	$25,5 \pm 7,95$

Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente. Anova, Tukey ($P < 0,05$).

Observamos um aumento significativo ($p < 0,05$) nas patologias espermáticas, nos Grupos 3 e 4 (Figura 14), ficando ambos acima do parâmetro normal que seria de até 20%, conforme recomendação do CBRA, assim como 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.



Figura14-Esfregaço de sêmen de cão do Grupo 4 no dia 21, com patologias espermáticas após aplicação de Gluconato de Zinco+DMSO. Coloração Vermelho Congo e Violeta. Objetiva de 1000x. **Fonte:** Arquivo Pessoal.

2.3.4.2 De acordo com os dias de avaliação

Podemos observar uma redução significativa dos parâmetros até 35 dias, devido a avaliação dos Grupos 3 e 4, onde a redução de parâmetros foi mais rápida, e a partir dos 35 dias, temos apenas o Grupo 2, que foi reaplicado após 30 dias, apresentado um aumento dos parâmetros aos 37 dias e posterior decréscimo (Tabela 18).

Tabela 17- Média e desvio padrão das características do sêmen de cães submetidos à aplicação do Gluconato de Zinco + DMSO de acordo como dia da avaliação.

Dias Avaliação/ Parâmetro	Características do sêmen							
	CONCtx10 ^b	Vol.(ml)	Vigor	(%) Motilidade	(%)Vivos/ mortos	(%)Pat. Maiores	(%)Pat. Menores	(%)Pat.tot al
Antes	189±69 ^a	1,4±0,6 ^a	4,2±0,8 ^a	85,4±8,3 ^a	12,9±12,6 ^a	8,5±5,5 ^a	1,7±2,8 ^b	10,3±8,3
D7	138±44 ^a	1,8±0,7 ^a	2,8±1,4 ^b	61,8±0,1 ^b	54,3±48,7 ^b	14,3±16,7 ^a	6,5± 8,3 ^a	20,9±25
D14	93±56 ^a	2,1±1,6 ^a	2,5±0,9 ^b	52,6±27,3 ^b	32,2±27,9 ^a	13,9±7,6 ^b	7,2±5,6 ^a	21,1±13,2
D21	68±45 ^a	1,4±2 ^a	3,1±3,5 ^b	41,6±9,2 ^b	21,0±20,1 ^a	17,7±13,4 ^a	7,1±9,5 ^a	25,6±22,9
D28	75±4 ^a	1,1±0,5 ^a	1,4±0,6 ^b	32,8±11,8 ^b	45,7±17,5 ^b	18,4±12,5 ^b	13±12,3 ^a	31,4±24,8
D35	30±1 ^b	0,7±0,4 ^a	0,8±0,5 ^b	16,6±16	65±9,5 ^b	18,5±19 ^b	1,7±0,3 ^b	20,2±11,3
D37	84 ±69 ^b	2,1±1,1 ^a	2±1,7 ^c	52,5±37,7 ^b	26,5±18 ^a	12,8±9,8 ^b	0,8±1,4 ^b	13,7±11,3
D44	41±2 ^b	3±2,9 ^a	2,2±0,5 ^c	60±18,2 ^b	51,7±44,9 ^b	20,1±17,9 ^b	8,5±6,3	28,6±24,3
D51	99±11 ^b	4,7±0,3 ^b	2,0±1,4 ^c	45±35,3 ^b	40±53,7 ^b	11,2±5,3 ^b	2,2±0,3 ^b	13,5± 5,6
D58	8±5 ^c	7,2±5,3 ^b	0,5±0,7 ^d	40±28,2 ^b	56,5±68,5 ^b	25,7±15,9 ^b	2,7±1,7 ^b	28,5±17,6

Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente. Anova, Tukey (P<0,05).

Observamos alterações a partir de sete dias após a aplicação do GZ+ DMSO, 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, e nos animais que receberam duas aplicações as alterações foram observadas em 100%. Mazzei et al. (2008) também utilizando o GZ+ DMSO 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 dias, entretanto, em nosso experimento, o decréscimo e manutenção dos parâmetros abaixo do padrão, são provavelmente devido as lesões no parênquima testicular, ocasionando alteração na espermatogênese.

2.3.5 Avaliação Histopatológica

No presente experimento as principais lesões nos grupos tratados foram ordenadas de acordo com o grupo de estudo e os dias de avaliação.

2.3.5.1 Grupo controle (Uma aplicação de solução salina)

Na primeira avaliação após sete dias da aplicação da solução salina, foi observado degeneração (1%), presença de espermatozoides no túbulo eferente e epidídimo, reação intersticial com infiltrado linfocitário, sem necrose. Aos 14 dias foi observada a presença de espermatozoides no túbulo eferente e epidídimo, sem necrose. Aos 21 dias, havia presença de espermatozoides no epidídimo, sem necrose, túbulos seminíferos com degeneração leve. Aos 28 dias foi observado presença de espermatozoides no epidídimo. Aos 35 dias, foi observado epidídimo com abundantes massas de espermatozoides no lúmen, o que demonstra que não houve alteração na fertilidade (Figura 15).

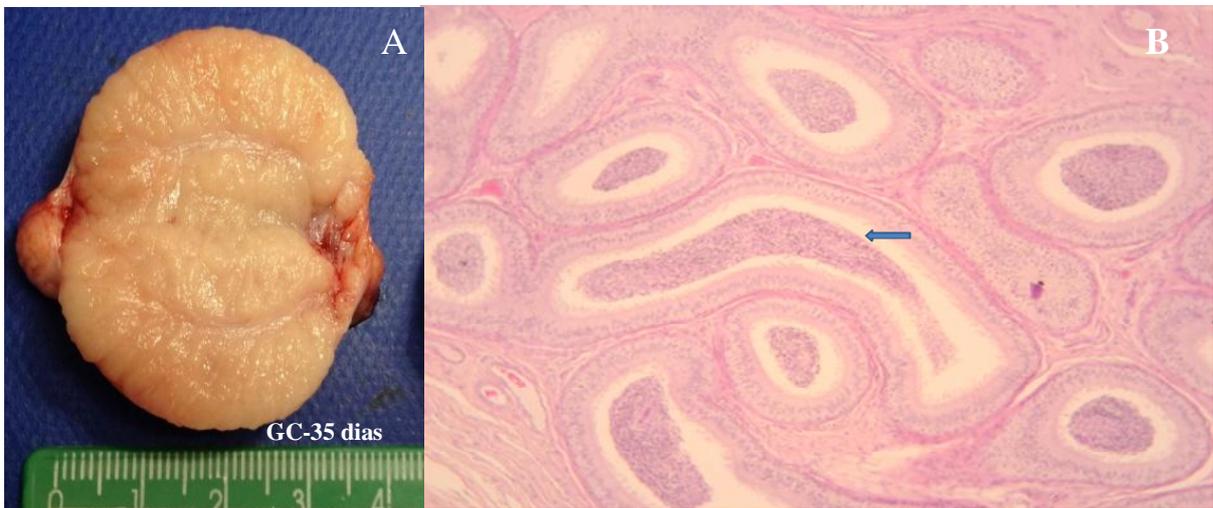


Figura 15 A- Aspectos da superfície de corte longitudinal de testículo de cão do grupo controle. B- Achados histológicos epididimário com detalhe do ducto epididimário após 35º dias de aplicação. Massas de espermatozoides no lúmen tubular (seta). HE. Objetiva 10x. **Fonte:** Arquivo Pessoal

No Grupo controle, as lesões encontradas foram moderadas por ser um processo agudo retornando à normalidade após 21 dias, semelhantes às descritas por Soto et al. (2009), sem prejuízo da espermatogênese.

2.3.5.2 Grupo 1(Uma aplicação GZ+ DMSO)

As alterações observadas aos sete dias foram hemorragia, edema, necrose de túbulos (Figura 16) em torno de 20 %, reabsorção tubular (Figura 16) em torno de 20 %, degeneração (1%), reação linfoplasmocitária, presença de macrófagos e espermatozóides em alguns túbulos e fibrose tubular. Aos 14 dias foi observado edema, necrose, degeneração em graus variados e reabsorção tubular. Aos 21 dias, foram observados túbulos necróticos (30%), edema, necrose intersticial, reabsorção tubular, fibrose, degeneração leve e grave (10%) e presença de espermatozóides. Aos 28 dias, foi observada degeneração tubular (90%), vacuolização de células germinativas, reabsorção tubular. Aos 35 dias foi observado no aspecto macroscópico áreas hemorrágicas (Figura 17A), e histologicamente foi observado estágio de reabsorção avançada, degeneração moderada, vacuolização de células germinativas, epidídimo com inflamação crônica leve, levando à alteração na espermatogênese (Figura 17 B e 18).

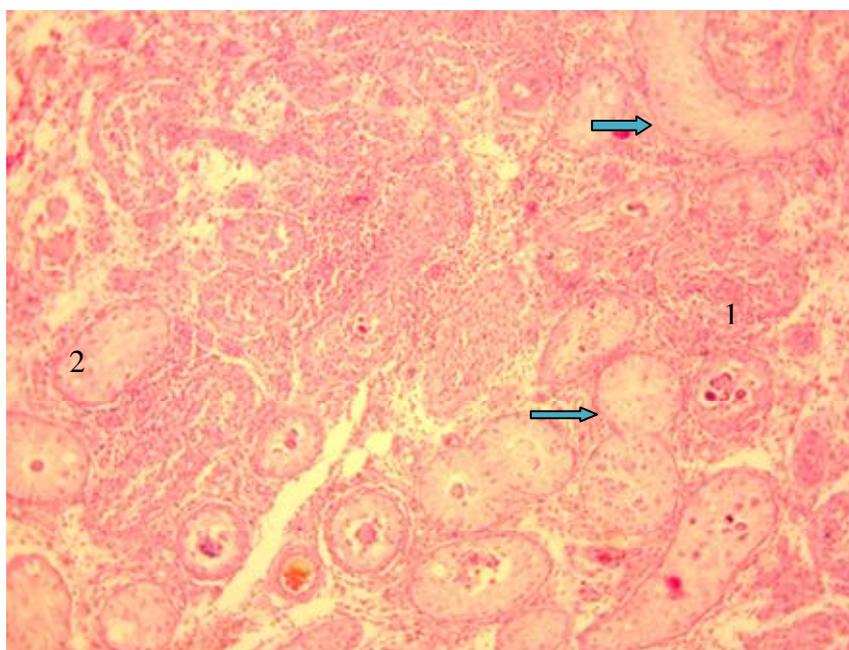


Figura 16- Achados histológicos de testículo do Grupo 1, após 7 dias de aplicação do Gluconato de zinco + DMSO com degeneração grave dos túbulos seminíferos (setas) destacando áreas em necrose (1) e em reabsorção (2). HE. Objetiva 40x. **Fonte:** Arquivo Pessoal.

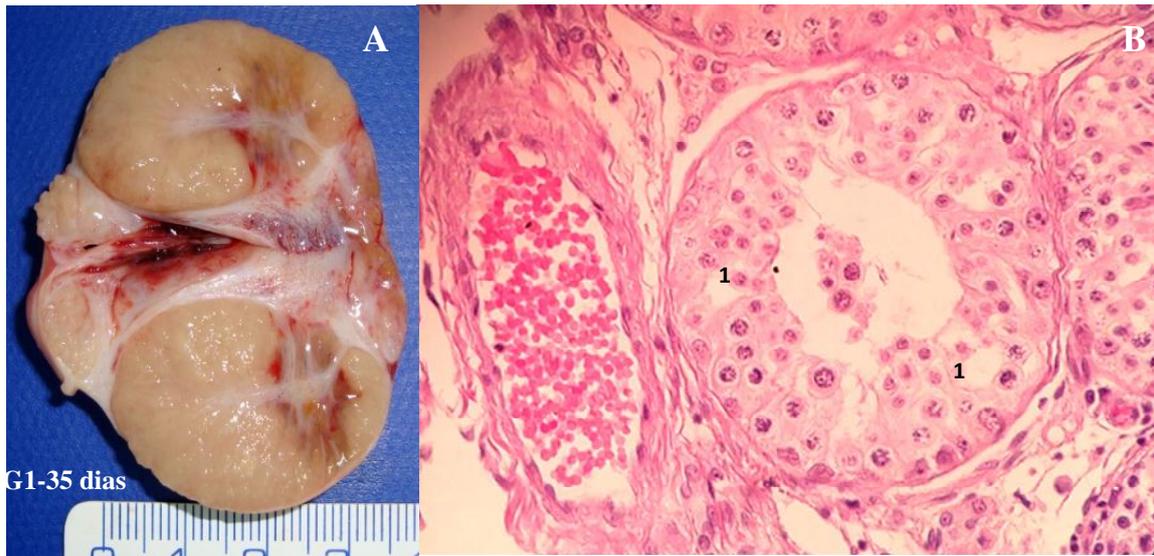


Figura 17-A- Aspectos da superfície corte longitudinal de testículo Grupo 1, após 35 dias de aplicação do Gluconato de zinco+DMSO, mostrando áreas escuras a avermelhadas próxima do mediastino. **B-** Achados histológicos com sinais de degeneração moderada, com dilatação luminal e vacuolização de células epiteliais (1), sem espermatozóide luminal. Ausência de necrose. HE. Objetiva 40x. **Fonte:** Arquivo Pessoal.

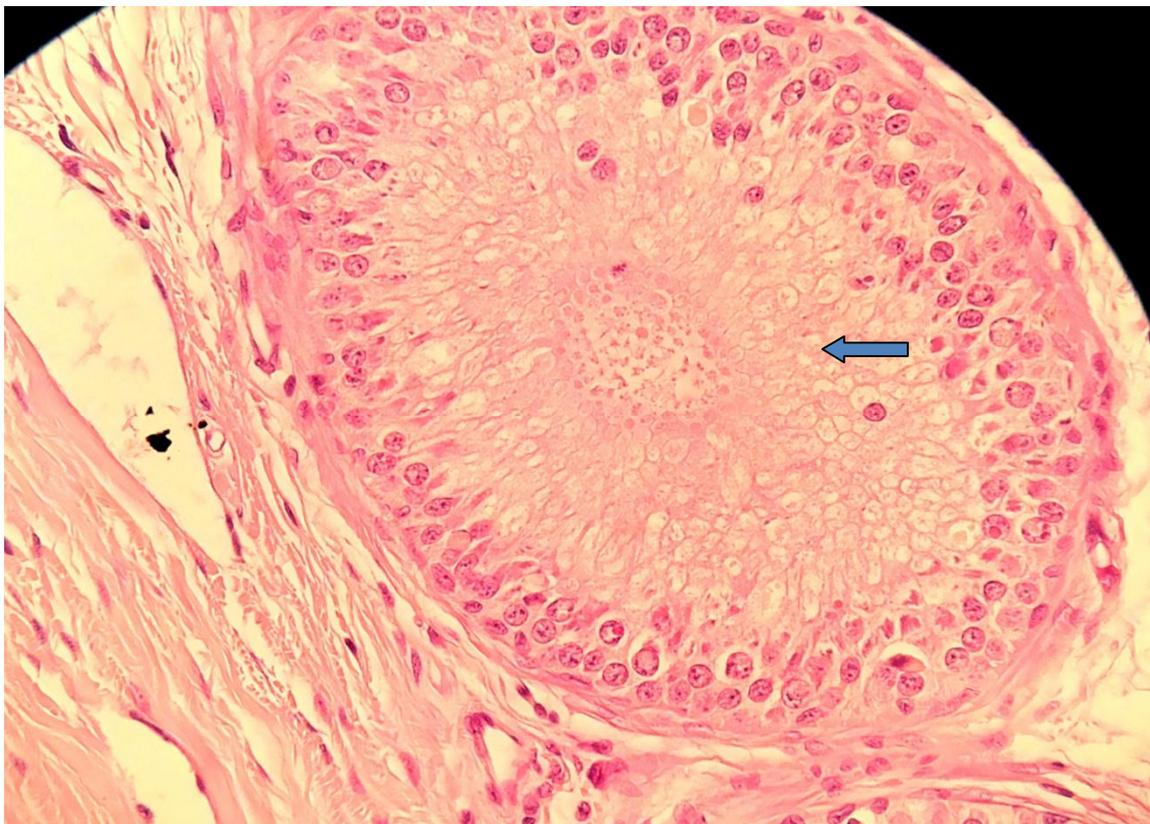


Figura 18- Achados histológicos de testículo do Grupo 1, após 35 dias de aplicação do Gluconato de zinco+DMSO. Mostrando degeneração moderada de túbulo seminífero (ausência de espermatídes alongadas e espermatozoides- seta). HE. Objetiva 40x. **Fonte:** Arquivo Pessoal.

2.3.5.3 Grupo 2 (Duas aplicações de GZ+ DMSO)

Observamos a partir de trinta e sete dias, degeneração tubular (30%), necrose discreta, infiltrado de linfócitos e macrófagos, células descamadas, reabsorção tubular. Aos 44 dias foi observada hemorragia (Figura 19B), reabsorção tubular, fibrose, áreas de normalidade espermatogênica, vacuolização de células de Sertoli, células descamadas e multinucleadas, degeneração tubular, e necrose. Aos 51 dias observamos áreas de degeneração tubular, vacuolização de células de Sertoli, fibrose, áreas de normalidade espermatogênica, necrose. Aos 58 dias lesões de necrose com padrão de coagulação, fibrose, reabsorção tubular, presença de espermatozóides em alguns túbulos seminíferos, degeneração. Aos 65 dias observamos áreas de espermioestase e vacuolização de células germinativas (Figura 20B), ausência de espermatozóides em grande parte dos túbulos, dilatação do lúmen tubular, degeneração, fibrose, reabsorção tubular e ausência de necrose, levando à alteração na espermatogênese.

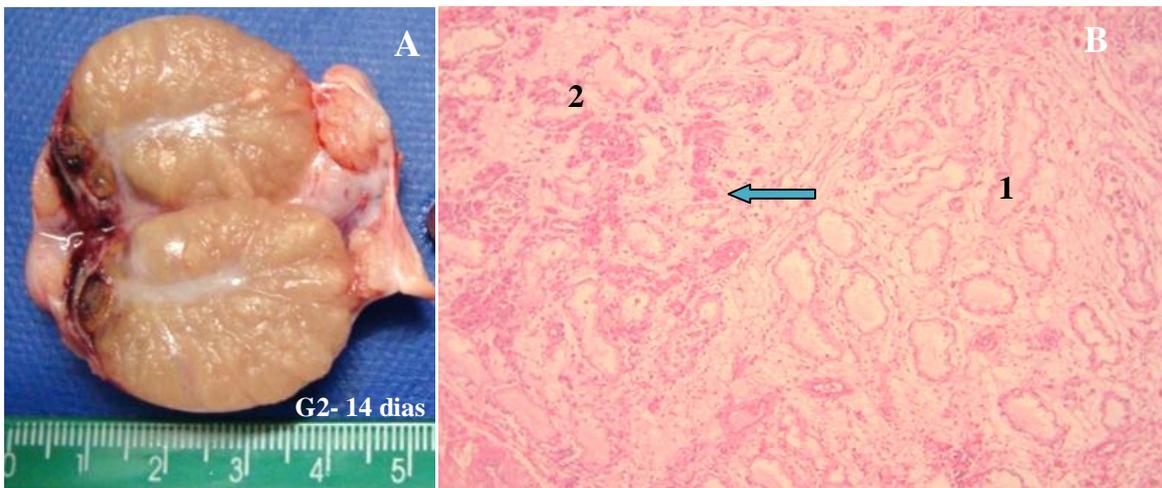


Figura 19-A- Aspectos da superfície corte longitudinal de testículo grupo 2, após 44 dias de aplicação do Gluconato de zinco+DMSO, com áreas hemorrágicas ao redor do local de aplicação (seta). **B-** Achados histológicos testiculares de cães do Grupo 2, após 44 dias de aplicação. Degeneração grave (1) e necrose (2). HE. Objetiva 10x. **Fonte:** Arquivo Pessoal.

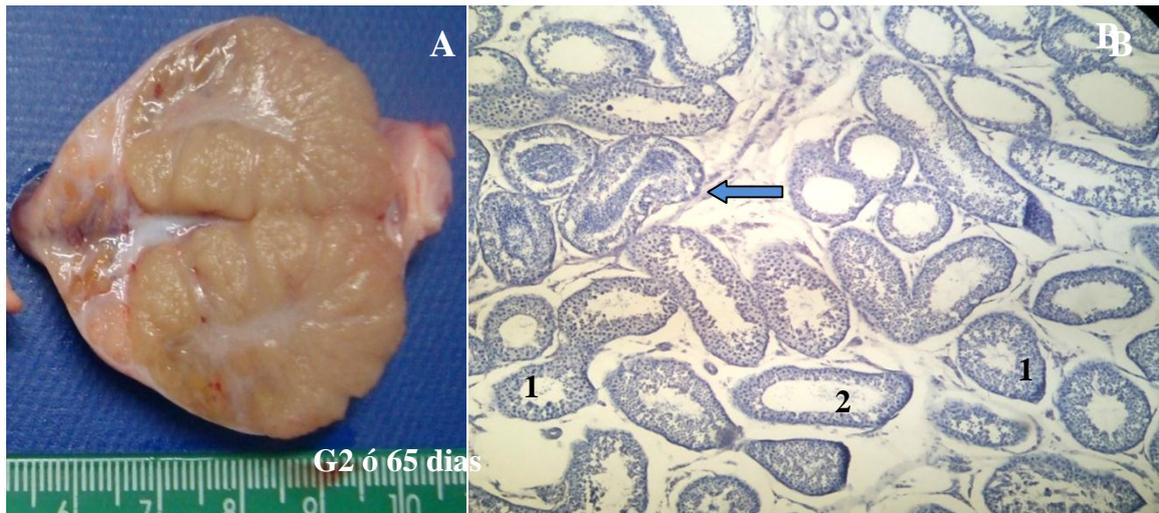


Figura 20-A- Aspectos da superfície corte longitudinal de testículo grupo 2, após 65 dias de aplicação do Gluconato de zinco+ DMSO, com aspecto atrofiado no local de aplicação. **B-** Achados histológicos testiculares de cães do Grupo 2, após 65 dias de aplicação. Túbulos seminíferos em degeneração grave, muitos com vacuolização das células germinativas (1). Massa de espermatozoides no lúmen (seta), e ausência de necrose. HE. Objetiva 10x. **Fonte:** Arquivo Pessoal.

Os achados histológicos encontrados no último dia de avaliação como necrose, fibrose, degeneração, e reabsorção em túbulos seminíferos, com alguns apresentando somente a membrana basal, foram semelhantes aos encontrados por Tepsumethanon (2005) utilizando GZ+ARG, após oito semanas de aplicação, entretanto o autor não se refere aos achados de espermoestase encontrados em nosso experimento.

2.3.5.4 Grupo 3 (Uma aplicação GZ+ DMSO até a saturação testicular- meia agulha)

Foi observada a partir de sete dias após a aplicação, necrose de coagulação (20 a 40 %- Figura 21B), espermoestase, degeneração tubular, células descamadas, inflamação intersticial. Aos 14 dias foi observada necrose, degeneração tubular, edema, hemorragia, fibrose. Aos 21 dias, observamos reabsorção tubular (15%), degeneração (25%), necrose (15%), células descamadas, espermoestase, fibrose intersticial. Aos 28 dias, foi observada fibrose intersticial, (20%), degeneração (15%), reabsorção tubular, presença de espermatozoides e células descamadas. Aos 35 dias foi observado presença de macrófagos, degeneração tubular de leve a grave, túbulos com células descamadas, ausência de espermatozoides em alguns túbulos seminíferos e nos túbulos eferentes.

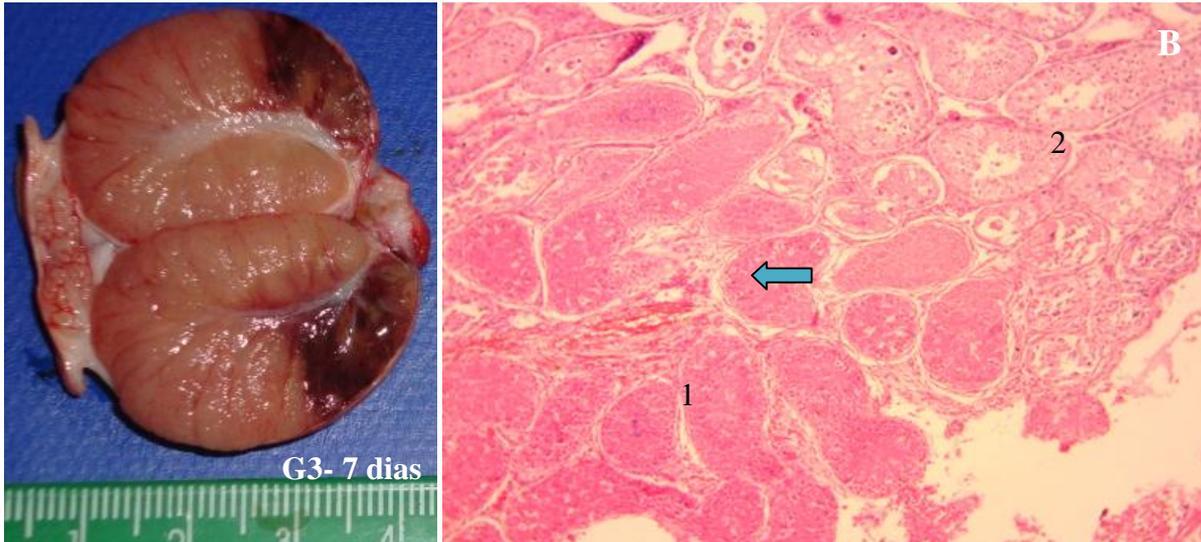


Figura 21- A- Aspectos da superfície corte longitudinal de testículo grupo 3, após sete dias de aplicação de Gluconato de zinco+DMSO, com áreas hemorrágicas extensas ao redor do local de aplicação. B- Achados histológicos testiculares de cães do Grupo 3 após 7 dias de aplicação. Necrose de coagulação de túbulos seminíferos (1) e reabsorção de túbulos próximos à área de necrose (2). Área de hemorragia (seta). HE. Objetiva 10x. **Fonte:** Arquivo Pessoal.

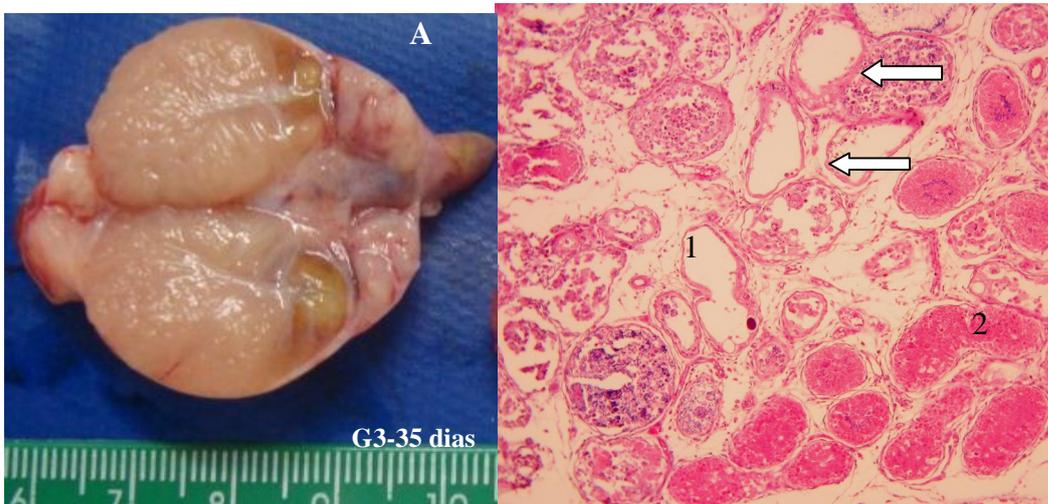


Figura 22- Aspectos da superfície corte de testículo grupo 3 após 35 dias de aplicação, com áreas de reabsorção tubular(1), apenas com a membrana basal tubular (setas) e necrose tubular(2). **Fonte:** Arquivo Pessoal.

No último dia de avaliação (35 dias) foi observado as lesões de fibrose e degeneração, com redução das células germinativas e atrofia da região mais próxima da aplicação, corroborando aos achados de Soto et al. (2009), que observaram essas mesmas características após 6 meses de tratamento com o GZ+DMSO, e destacando que em nosso experimento ocorreu em um intervalo de tempo inferior.

2.3.5.5 Grupo 4 (Uma aplicação GZ+ DMSO até saturação testicular- agulha inteira)

Na primeira avaliação aos 7 dias, foi observado hemorragia, necrose, células anucleadas e em picnose, vacuolização de células germinativas, descamação celular, presença de células multinucleadas e alguns túbulos com espermatozóides. Aos 14 dias, ainda observado hemorragia, necrose de coagulação, fibrose, degeneração de moderada a grave, edema, infiltração de macrófagos e linfócitos e fibrose. Aos 21 dias foi observada hemorragia, edema, células inflamatórias, células descamadas sem visualização do lúmen tubular e degeneração tubular. Aos 28 dias, degeneração tubular, ausência de espermatozóides, túbulos seminíferos apenas com membrana basal ou com infiltrado de macrófagos, fibrose, reabsorção tubular e aos 35 dias foi observado degeneração tubular, infiltrado linfoplasmocitário, vacúolos citoplasmáticos, fibrose, reabsorção tubular e ausência de túbulos seminíferos normais.

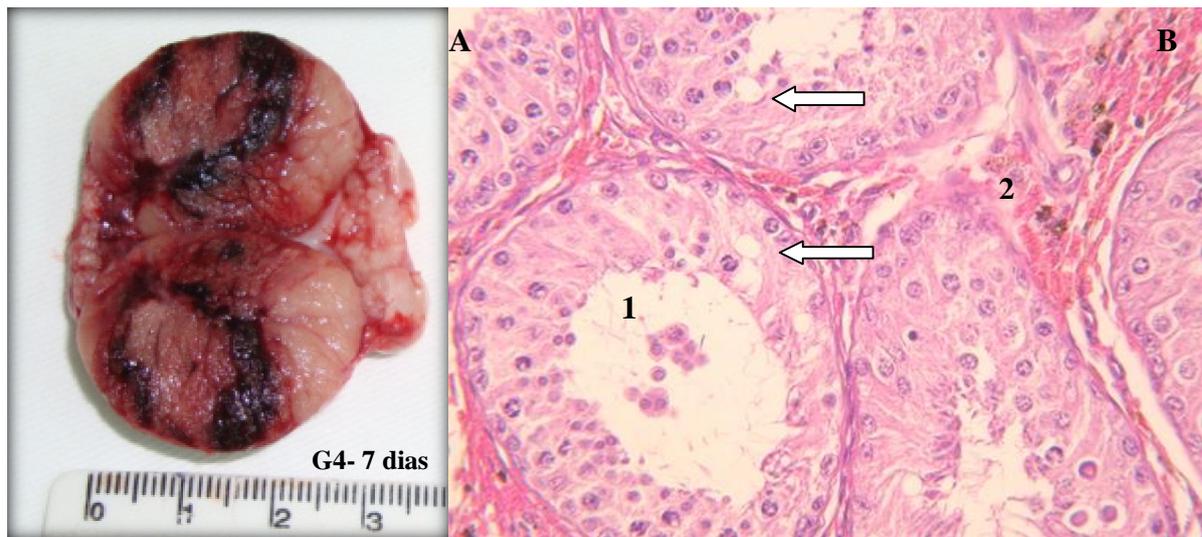


Figura 23- Aspectos da superfície corte de testículo grupo 4, com áreas hemorrágicas difusas e também áreas de fibrose na porção central mais pálida. Achados histológicos testiculares de cães do Grupo 4 após 7 dias de aplicação. Túbulo seminífero dilatado com macrófagos em seu lúmen (1), hemorragia (2) e vacuolização de células germinativas (seta). Túbulos seminíferos com degeneração moderada. HE. Objetiva 100x. **Fonte:** Arquivo Pessoal.

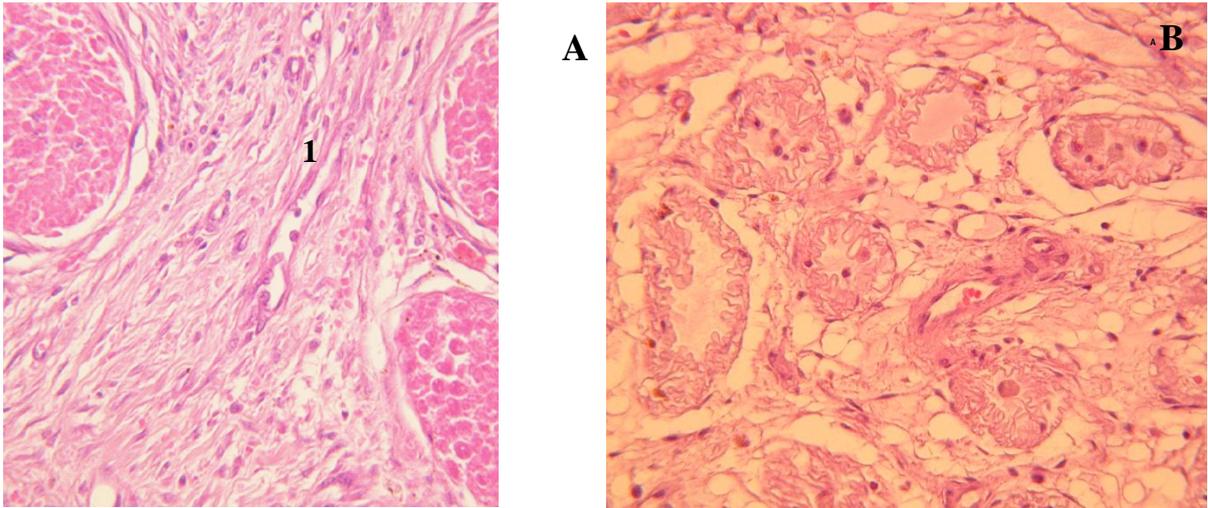


Figura 24- Achados histológicos testiculares de cães do Grupo 4 após 14 dias de aplicação. A. Túbulos em necrose (1). B- Destaca-se a fibrose intersticial tecidual (1). HE. Objetiva 100x. B. Achados histológicos testiculares de cães do Grupo 4 após 21 dias de aplicação. - Túbulos seminíferos apresentando total ausência de células germinativas, algumas com macrófagos e preenchidos por substância eosinofílica. A membrana basal está destacada e grande atrofia dos túbulos. HE. Objetiva 40x. **Fonte:** Arquivo Pessoal.

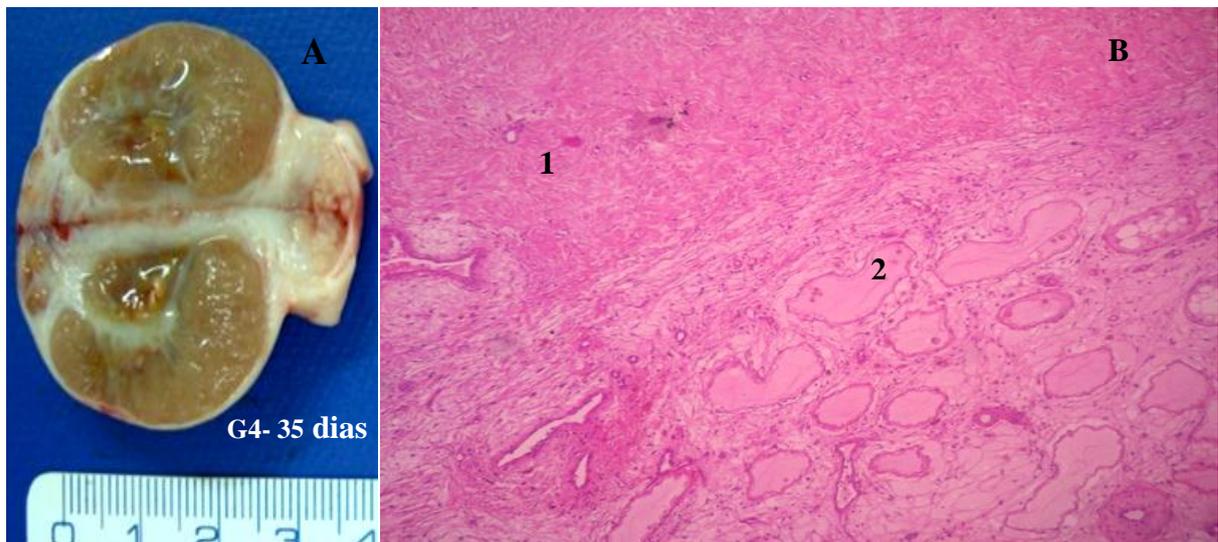


Figura 25 **6A-** Aspectos da superfície corte de testículo grupo 4 após 35 dias de aplicação, com áreas de fibrose periférica ao redor do local de aplicação. **B-** Achados histológicos testiculares de cães do Grupo 4 após 35 dias de aplicação. Fibrose intersticial (1). Área final de reabsorção com túbulos atróficos preenchidos por substância eosinofílica desprovido de células e macrófagos (2). HE. Objetiva 10x. **Fonte:** Arquivo Pessoal.

Aos 35 dias da aplicação do GZ+ DMSO, foi observado necrose de túbulos seminíferos, fibrose com total absorção de células necróticas, alguns apresentando somente a membrana basal, assim como numerosos túbulos seminíferos em estágios variados de degeneração, alguns com vacúolos citoplasmáticos e infiltrado linfoplasmocitário. Não foram

observados túbulos seminíferos normais, semelhante aos achados de Mazzei et al (2012) que após 5 meses da aplicação de do GZ+ DMSO, encontraram sinais de degeneração testicular e infiltração de macrófagos (processo inflamatório crônico) no grupo tratado, entretanto esses autores encontraram áreas de calcificação distrófica o que não encontramos em nosso experimento, provavelmente devido ao tempo de observação. Neste aspecto, Oliveira (2007), após cinco meses de uma aplicação de GZ+ ARG também observou atrofia de túbulos epididimários e ausência de espermatozóides no lúmen, com áreas de fibrose, atrofia dos túbulos seminíferos, degeneração e diminuição do número de células germinativas em locais mais distantes da aplicação.

2.4 CONCLUSÕES

A injeção intratesticular com solução à base de Gluconato de zinco 2,62% + DMSO 0,5% foi eficaz em causar a esterilização de cães adultos, entretanto, o resultado mais eficiente foi observado nos Grupos 2, 3 e 4, uma vez que apresentaram comprometimento na fertilização de forma semelhante, porém, o Grupo 4 apresentou os resultados em um tempo menor, podendo ser utilizado quando da necessidade de uma resposta em curto prazo.

Em todos os grupos tratados, houve redução das características físicas seminais, caracterizando o quadro de subfertilidade até infertilidade variando de acordo com o grupo tratado;

Os resultados dos espermogramas demonstraram que a solução de GZ+DMSO, interferiu na espermatogênese em todos os grupos tratados, causando interrupção da mesma com conseqüente oligospermia e até azoospermia;

As alterações observadas ao exame ultrassonográfico, demonstraram diminuição da ecogenicidade testicular em todos os grupos, validando esse meio diagnóstico para avaliação de alterações em curto espaço de tempo, no parênquima testicular;

As alterações histopatológicas do parênquima testicular causadas pelo tratamento foram principalmente edema, hemorragia, degeneração em graus diversos, infiltrados linfoplasmocitários de maneira geral e necrose, caracterizando a irreversibilidade do processo e a eficácia do tratamento.

REFERÊNCIAS

- BOOTHE, H.W. Testes and Epididymides In: SLATTER, D. **Textbook of Small Animal Surgery**. 3.ed: St. Louis, Saunders, 2003. p. 1521-1530.
- CARVALHO, F. C. **Ultrassonografia em pequenos animais**. Rio de Janeiro: Rocca, 2004. 214 p.
- CEDILLO V.G., VARGAS, P.F., MONROY, O. F. Results of the massive sterilization project using gluconate neutralized with arginine in male dogs living in the States of Hidalgo, Mexico and Puebla. Rabies in the Americas (RITA), 17., 2006, Brasília. **Proceedings** Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2006. p.15-20.
- CEROVSKY, J. A. New staining procedure for boar spermatozoa. **Czech Journal of Animal Science**, Zivocisnacyrobav. 21, p. 351-362, 1976.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte MG: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998.
- DIAS R.A. **Emprego de sistemas de informação geográfica (SIG) no controle da raiva canina**. 2001. 97 p. (Dissertação) ó Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2001.
- FAHIM, M. S; WANG, M; SUTCU M. F. 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>>. Acesso em: 8 maio 2012.
- HEIDRICH, S. **Ein beitrug zur tiefgefrierung von rudensperma**. 1977. 110 p. Dissertação (Doctor Medicinae Veterinarie)- Klinik fur Klauentierkrankheiten und Fortpflanzungskunde der Freien Universitat. Berlin. Alemanha, 1977.
- LEVY, J. K.; CRAWFORD, P. C.; APPEL, L. D. et. al. 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.
- LORENA, S. E. R. S.; LUNA, S. P. L.; RODRIGUES, D.; LIMA, A. F. **Avaliação álgica do gluconato de zinco injetado por via intratesticular para a contracepção química em cães**. (Relatório experimento não publicado). 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. 2012. Acesso em: 26 out. 2012. p. 26-29.

MAZZEI, C.P. ; EYHERABIDE, A. R. ; LUCIO, C. F. ; VANNUCCHI, CI. **Avaliação Clínica da Dupla Aplicação do Gluconato de Zinco Intratesticular para a Esterilização Química de Machos da Espécie Canina.** In: Semana Científica õBenjamim Eurico Malucelliö, 17., 2008, São Paulo. Anais da XVII Semana Científica do Departamento de Patologia, 2008.

MORROW, D. A. **Current Theraph in Therionology**, Philadelphia: W. B. Saunders, 1988. 592 p.

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.** 2007. 89 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) ó Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2007.

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 JR 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.

PARANHOS, T. N. Estudo das populações canina e felina em domicílio, município de São Paulo. 2002. 83 p. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2002.

PINHO, R. O. **Ultrassonografia testicular na avaliação andrológica em touros da raça Nelore e Composto Montana Tropical.** 2010. 109 p. Tese (Doutorado)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

RASBAND, W. **Image J, U. S.** National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 1997-2009. Disponível em: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>. Acesso em: 05 jun. 2011.

RODASKI, S.; WESS, R.R; GUERIOS, S.D. Esterilização química em cães com aplicação epididimária de solução de adrenalina 0,1% e Lugol10%. **Archives of Veterinary Science**, v. 6, n.2, p.9-17, 2001.

ROWAN, N.A. Companion animal demographics and unwanted animals in the United States. **Anthrozoös**, v. 5, n. 4, p. 222- 225, abr.1994.

SAS INSTITUTE INC. 8.0 Userø guide. SAS Institute Inc., Cary, 2001.

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, 1994. p.1063-1075.

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

SOYKA, E.J., KIMMICK, S.V.B., CARISON, G.P. et al. Dimethyl sulfoxide update ó New applications and dosing methods. *Proceedings American Association. 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**. 2003. 165 f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada ás Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

SOTO, F.R.M.; VIANA, W. G.; SOUSA, A. J; PINHEIRO, S. R; MUCCIOLO, 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.

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.

SOTO, F. R. M.; VIANA, W. G.; MUCCIOLO, G. C. B.; HOSOMI, F. Y. M.; VANNUCCHI, C. I.; MAZZEI, C. P.; EYHERABIDE, A. R.; DE FÁTIMA L. C.; 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**, n. 44, p. 927-931, 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, n. 5, p.686-689, 2005.

WANG, M. Neutersol: intratesticular injection induces sterility in dogs. In: International Symposium on Nonsurgical Methods for Pet Population Control, 2002, Callaway Gardens, GA. **Proceedings** Callaway Gardens, GA: ACC&D, 2002. p.62-65.