

JULIETE LIRA DE SOUZA LIMA

AVALIAÇÃO DA CASTRAÇÃO QUÍMICA COM PAPAÍNA ASSOCIADA AO ÁCIDO
LÁTICO EM RATOS WISTAR

RECIFE

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

JULIETE LIRA DE SOUZA LIMA

AVALIAÇÃO DA CASTRAÇÃO QUÍMICA COM PAPAÍNA ASSOCIADA AO ÁCIDO
LÁTICO EM RATOS WISTAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de mestre em Biociência Animal.

Orientador:

Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto

Co-Orientadora:

Profa. Dra. Fábiana Regina N. Fernando Burgos

RECIFE

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

AVALIAÇÃO DA CASTRAÇÃO QUÍMICA COM PAPAÍNA ASSOCIADA AO ÁCIDO
LÁTICO EM RATOS WISTAR

Dissertação de Mestrado elaborada por

JULIETE LIRA DE SOUZA LIMA

Aprovado em 24 de fevereiro de 2016

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto (Presidente)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE

Prof. Dr. Francisco de Assis Leite Souza
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE

Dra. Mariana Gomes do Rêgo
PNPD/CAPES/UFRPE/PPGCV da UFRPE

Profa. Dra. Fábía Regina Nascimento Fernando Burgos
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE

RECIFE

2016

*Dedico a
Deus, aos meus pais José
Roberto e Maria Lira, minha
irmã Juliana Lira, ao meu
noivo Thúlio Pimentel e as
minhas cadelinhas Bela e Mel
pelo suporte e auxílio em todos
os momentos desta jornada.*

AGRADECIMENTOS

“A sabedoria é a essência da conquista. É iniciada nos sonhos, desenvolvida na coragem, eternizada no tempo.”

Bruno Raphael da Cunha Dobicz

A Deus, agradeço por tudo que eu vivi e que me possibilitou chegar até aqui, que me fez ser quem eu sou. Agradeço pelos bons momentos que me fizeram celebrar a vida, e agradeço pelos momentos difíceis que me fizeram crescer.

Aos meus pais, José Roberto e Maria Lira, pelo amor incondicional, pelo exemplo de força, determinação, humildade e caráter. Obrigada pela dedicação e ensinamentos.

Ao meu noivo Thúlio Pimentel, que além de me fazer feliz, ajudou-me durante todo o percurso da minha vida acadêmica e profissional. Obrigada pelo apoio, paciência e entender meus momentos de estresse e angústia, e por vibrar pelas minhas conquistas.

A minha irmã Juliana Lira, cunhado Rodrigo Andrade, pelo apoio, companheirismo e por acreditar em mim.

Aos meus avós paternos, Nilza Lima (*in memorian*), Agnaldo Lima (*in memorian*) e bisavó Angelina (*in memorian*), sei que onde estiverem, estarão orando e torcendo por mim.

Aos meus avós maternos, Sílvia Lira (vovó de Surubim) e Paulo Lira (*in memorian*), que vibraram em todas as minhas conquistas, principalmente vovó, pois é muito bom saber que sou o orgulho dela.

Aos tios, tias, primos, primas, madrinha, padrinho, sogro e sogra e cunhados, que acreditaram até o fim na minha formação.

Aos amigos Cristiane Paixão, Nathália Roberta, Emanuela Aguiar, Naedja Karla, Thúlio Nilson, pela força, entusiasmo e por torcerem por mim.

Aos amigos da UFRPE, Leandro Álvaro, Raquel Albuquerque, Wanessa Noadya, Thais Almeida, Carolline Guimarães, Cintia Giselle, Aline Mariano, Jaciel Oliveira, Barbara Burgos, Adrianne Alcântara, Clovis Lapa e Mariana Rêgo, por várias vezes me deram força, carinho e atenção em todos os momentos que precisei.

Aos animais do biotério, pela tão inocente e valiosa contribuição como fonte da minha pesquisa.

Ao Professor Francisco Leite, pelas análises histopatológicas.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, por terem contribuído para a minha formação.

A Maria Edna Barros, por todo o apoio nos procedimentos laboratoriais.

Ao Professor Diogo Vivacqua de Lima, pela contribuição experimental e apoio, mesma pela distância, sempre disponível em ajudar.

A Professora Janaina Couto por todo o apoio, força, carinho e amizade.

Ao meu Orientador Professor Joaquim Evêncio Neto, pela confiança e ensinamentos, que tem sido preciosos para minha formação acadêmica, profissional e pessoal. Obrigada, por todas as horas de atenção e compreensão e por ter dado o privilégio de ser sua orientanda.

A minha Co-orientadora Professora Fábila Burgos, pelo apoio e auxílio durante o experimento. Obrigada pela atenção, carinho, companheirismo, amizade e dedicação.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos durante o curso.

A todos e a todas, que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a castração química com papaína associada ao ácido láctico em ratos Wistar adultos. 25 ratos Wistar com 90 dias de idade foram divididos em 5 grupos. Os animais dos grupos G1, G2, G3, G4 receberam 0,1mL da solução papaína e ácido láctico por via intratesticular e foram eutanasiados respectivamente em 24h, 48h, 72h e 96h após o tratamento, os do grupo controle "GC" receberam 0,1mL de solução fisiológica a 0,9% e foram eutanasiados 24h após o tratamento. Foram coletados fragmentos de testículo, epidídimo, rim e fígado para avaliação histopatológica e sangue para análise dos níveis de testosterona. O acompanhamento diário dos animais não evidenciou comprometimento comportamental, apresentando atos fisiológicos dentro da normalidade, tais como, alimentação, defecação e micção, assim como socialização com o grupo. Não foram observadas alterações renais e hepáticas no estudo histopatológico desses órgãos, sugerindo ser uma solução de efeito apenas local. Já nos testículos e epidídimos as alterações foram caracterizadas por infiltrado inflamatório, vacuolização citoplasmática e necrose de células germinativas. Sobre os níveis de testosterona os grupos G1 e G2 apresentaram valores abaixo de 1 ng/mL, cuja técnica mostrou ser eficaz em diminuir esses níveis em 48 horas. Tendo em vista os achados histopatológicos no testículo e epidídimo, a solução papaína e ácido láctico não afetaram o rim e o fígado e não comprometeram o comportamento dos animais. A solução mostrou-se capaz de reduzir a atividade das células de Leydig nas primeiras 48 horas. Porém são necessários novos estudos sobre os efeitos prolongados e na aplicação de maiores concentrações desta solução em ratos Wistar além da elaboração de novos projetos que se possam abranger outras as espécies.

Palavras-Chave: Substâncias esclerosantes, esterilização química, testículo, epidídimo, Ratos

ABSTRACT

This study aimed to evaluate and chemical castration with papain associated with lactic acid in adult Wistar rats. Twenty-five male Wistar rats at 90 days of age were divided into 5 groups. The animals of the groups G1, G2, G3, G4 received 0.1 mL of papain solution and lactic acid intratesticularly and they were euthanized respectively 24h, 48h, 72h and 96h after treatment, and the animals of the control group "CG" received 0.1ml of saline and they were euthanized 24h after treatment. Fragments of testis, epididymis, kidney, and liver were collected for histopathological evaluation and blood for analysis of testosterone. The daily monitoring of the animals showed no behavioral impairment, with physiological acts within the normal range, such as eating, defecation and urination, as well as socializing with the group. kidney and liver changes were observed in the histopathological study of these organs, suggesting that only a local effect solution. Already in the testis and epididymis changes were characterized by inflammatory infiltrate, vacuolation and necrosis of germ cells. On testosterone levels G1 and G2 had values below 1 ng / ml, which technique was effective in reducing testosterone levels within 48 hours. Given the histopathological findings in the testis and epididymis, papain and lactic acid solution did not affect the kidney and liver and did not affect the behavior of animals. The solution was shown to reduce the activity of Leydig cells in the first 48 hours. But further studies are needed on the long-term effects and the application of higher concentrations of this solution in rats and the development of new projects that could cover all species.

Keywords: Sclerosing substances, chemical sterilization, testis, epididymis, Rats.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Estrutura e funcionamento do testículo	15
2.1.1 Células de Sertoli	16
2.1.2 Espermatogênese	17
2.2 Testosterona	18
2.3 Epidídimo	19
2.4 Tipos de castração	20
2.4.1 Orquiectomia	21
2.4.2 Vasectomia	21
2.4.3 Terapia hormonal	22
2.4.4 Imunoesterilização	23
2.4.5 Castração química	23
2.4.6 Ácido láctico	25
2.5 Papaína	25
3. OBJETIVOS	28
3.1 Geral	28
3.2 Específico	28
4. MATERIAL E METODOS	29
4.1 Animais e condições de alojamento	29
4.2 Procedimento experimental	29
4.3 Avaliação clínica dos animais	30
4.4 Análise histopatológica	30
4.5 Análise da testosterona sérica	31
4.6 Análise estatística	32
5. REFERÊNCIAS	33
6. ARTIGO 01	42
CONSIDERAÇÕES FINAIS	57

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** **A.** Corte histológico do testículo, evidenciando a túnica albugínea, região intersticial e túbulo seminífero. **B.** Corte histológico do túbulo seminífero evidenciando túnica própria, epitélio seminífero e lume tubular - H.E. (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). **15**
- Figura 2:** Corte histológico do ducto epididimário, evidenciando o tecido epitelial pseudoestratificado colunar com estereocílios, lâmina basal, tecido muscular liso e tecido conjuntivo frouxo – Picro-sirius-hematoxilina. (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). **19**
- Figura 3:** Rato da linhagem Wistar pertencente ao grupo G2 recebendo aplicação intratesticular de solução papaína e ácido láctico na dose de 0,1 mL (LIMA, 2016). **26**

ARTIGO 01

- Figura 1:** Rato da linhagem Wistar pertencente ao grupo G2 recebendo aplicação intratesticular de solução papaína e ácido láctico na concentração de 0,1 mL (LIMA, 2016). **43**
- Figura 2:** **A.** Grupo G1 evidenciando vacuolização extensiva (seta) (HE); **B.** Grupo G3 apresentando túbulo seminífero com vacuolização leve (seta) (HE); **C.** Grupo G3 degeneração testicular acentuada. Células “gigantes” multinucleadas no interior do túbulo seminífero (ponta da seta) (HE); **D.** Grupo G2 infiltrado inflamatório polimorfonuclear neutrofílico peritubular (seta) (HE); **E.** Grupo G4 Infiltrado inflamatório mononuclear intertubular (estrela) e intratubular (estrela) (HE); **F.** Grupo GC evidenciando estrutura preservada dos túbulos seminíferos (estrela) (HE). **46**
- Figura 3:** **A.** Fotomicrografia do epidídimo de rato do grupo G4 evidenciando infiltrado inflamatório mononuclear (estrela), neovascularização (ponta de seta preta) e hiperplasia de células musculares lisas (seta vermelha) (HE); **B.** Fotomicrografia do grupo G4 evidenciando células claras no ducto epididimário (ponta de seta preta) e no interior do ducto massa eosinofílica constituída por espermatozoides degenerados com *debris celulares* (ponta de seta vermelha) e células espermáticas necróticas (estrela) (PAS); **C** e **D.** Fotomicrografia de Epidídimo de ratos dos grupos G3 (HE) e G4 (PAS) respectivamente, evidenciando vacuolização citoplasmática do ducto **46**

epididimário (seta) e infiltrado inflamatório mononuclear entre os ductos (estrela); **E.** Grupo G2 fragmento de fígado (HE); **F.** Grupo G1 fragmento de rim evidenciando região cortical (HE).

LISTA DE ABREVIATURAS

ABP: Proteína ligadora de andrógeno

CEUA: Comitê de ética no uso de animais

CES: Ciclo do Epitélio Seminífero

DMFA: Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal

DMSO: Dimetilsufóxido

ELISA: Enzyme Linked immuno Sorbent Assay

FSH: Hormônio Folículo Estimulante

GnRH: Hormônio Liberador de Gonadotrofina

GPEG: Grau de perda de epitélio germinativo

GPx: Glutationa peroxidase

HE: Hematoxilina e Eosina

IP: Intraperitoneal

LH: Hormônio Luteinizante

MPA: Acetato de Medeoxiprogesterona

NaCl: Cloreto de Sódio

PAS: Ácido Periódico de Schiff

SH: Radical Sulfidríla

UFRPE: Universidade Federal Rural de Pernambuco

1 INTRODUÇÃO

A superpopulação de cães e gatos é um problema social e mundial. Frente ao grande número de animais procuram-se formas alternativas a esta medida (FAGGELLA et al., 1993). Nos últimos anos, métodos de prevenção ou interrupção do ciclo reprodutivo têm sido descritos para o controle populacional destes animais. As medidas de controle incluem cirurgia, terapia hormonal, controle imunológico e químico. Esses animais possuem gestação curta e normalmente possuem um número considerável de filhotes. A maturidade sexual pode ser atingida a partir dos seis meses de vida, levando então à necessidade de desenvolvimento de técnicas que realizem esse controle populacional (FAGUNDES, 2011).

Dentre as formas de controle populacional, os métodos contraceptivos são os mais aceitáveis e podem ser classificados sob diferentes aspectos. Quanto à durabilidade do procedimento, o efeito pode ser permanente, quando a função reprodutiva é abolida, ou temporária (SPEROFF & DARNEY, 2010).

Os métodos podem ser cirúrgicos ou não cirúrgicos, sendo considerados invasivos, comumente são mutilatórios, por extraírem componentes dos sistemas reprodutivos do macho (JOHNSTON, KUSTRIZ & OLSON, 2001), necessitando de cuidados pré e pós-operatórios específicos, como qualquer procedimento cirúrgico (SLATTER, 2003). Nos métodos não cirúrgicos, são utilizadas substâncias que inibem processos da função reprodutiva ou que impedem que gametas viáveis sejam produzidos. Por motivos diversos os métodos não cirúrgicos, de um modo especial à castração química, vêm sendo estudada e aprimorada, especialmente nos últimos anos, devido à procura por métodos mais baratos e principalmente pelo bem-estar animal (PRUNIER et al., 2006; VON BORELL et al., 2009; LOPES & SILVA, 2014).

A castração química à base de princípios ativos naturais (ácido lático e papaína) tem como efeito uma ação esclerosante, ou seja, uma vez em contato com o tecido testicular, induz, inicialmente, um processo inflamatório e, posteriormente, uma substituição deste por tecido conjuntivo fibroso. Esta técnica promove a eliminação da síntese testicular de testosterona, não requerendo cirurgia (VIVACQUA, 2010).

O desenvolvimento de sistemas de contenção de natalidade baseados no controle da reprodução tornam-se necessários (LOPES, NUNES-PINHEIRO & FIGUEIREDO, 2005), sendo assim a castração é um método reconhecido e eficaz para o controle populacional de animais (JANA & SAMANTHA, 2011), nesse caso, a castração química, vem sendo utilizada devido ao seu baixo custo, menor grau de dor ao animal e pode ser irreversível. A utilização

da solução papaína e ácido láctico como efeito esterilizante já foi confirmada em bovinos, portanto, objetiva-se com este trabalho avaliar os efeitos da solução papaína associada ao ácido do láctico no testículo e epidídimo de ratos Wistar.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Estrutura e funcionamento do Testículo

Os testículos são órgãos pares contidos na cavidade celomática ou fora dela, mas especificamente no interior do saco escrotal, uma estrutura semelhante a uma bolsa, derivada da pele e da fáscia da parede abdominal. Estruturalmente, os testículos estão envoltos por uma cápsula esbranquiçada de tecido conjuntivo, denominada túnica albugínea, que emite trabéculas até o mediastino dividindo-o incompletamente em lóbulos. A quantidade de tecido conjuntivo que forma estas trabéculas é variável entre as espécies de mamíferos eutérios (RUSSELL et al., 1990). É responsável pela gametogênese e pela secreção dos hormônios sexuais masculinos, sobretudo a testosterona.

Este órgão pode ser dividido em dois compartimentos: o intertubular ou intersticial, e os túbulos seminíferos, no que consiste o parênquima testicular (Fig. 1A) (RUSSELL et al., 1990). Os elementos que compõem o compartimento intertubular são os vasos sanguíneos e linfáticos, que são essenciais para o movimento dos hormônios e nutrientes para dentro e fora do testículo (O'DONNELL et al., 2001), nervos, células de Leydig e uma população celular variável constituída principalmente de fibroblastos, macrófagos e mastócitos (SETCHELL, 1991). O tipo celular mais comumente encontrado no interstício é a célula de Leydig, a qual é primariamente envolvida na secreção de andrógenos, notavelmente a testosterona, que é importante para o desenvolvimento e manutenção da espermatogênese e das características masculinas (O'DONNELL et al., 2001).

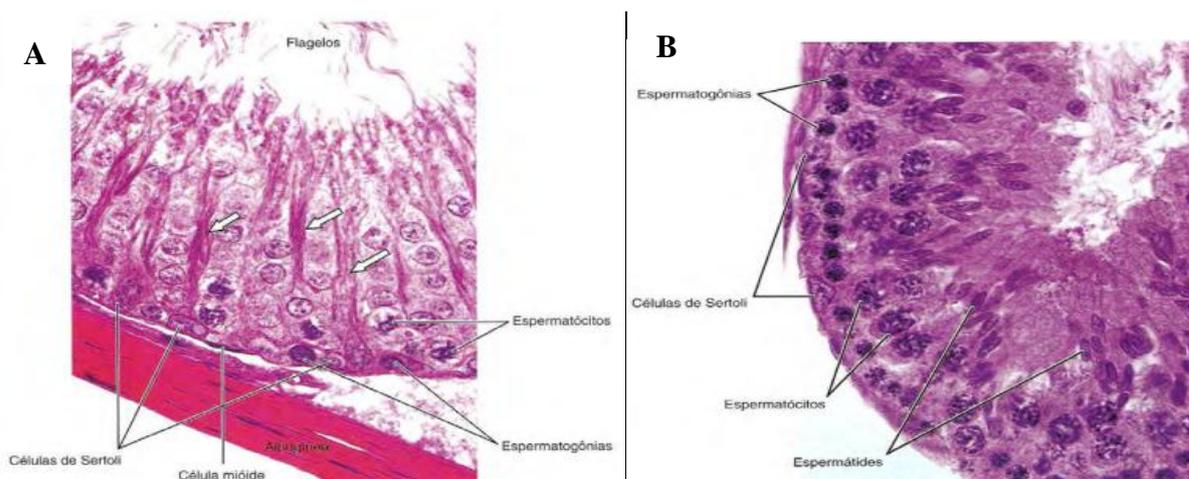


Figura 1: A. Corte histológico do testículo, evidenciando a túnica albugínea, região intersticial e túbulo seminífero. B. Corte histológico do túbulo seminífero evidenciando túnica própria, epitélio seminífero e lume tubular H.E (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

O compartimento dos túbulos seminíferos constitui a maior parte do testículo, ocupando, na grande maioria dos mamíferos, de 70% a 90% do parênquima testicular (FRANÇA & RUSSELL, 1998; HESS & FRANÇA, 2007) e apresentam grande variação na densidade volumétrica no testículo entre as diferentes espécies (FRANÇA & RUSSEL, 1998).

Os túbulos seminíferos são constituídos por túnica própria, epitélio seminífero e lume tubular. A túnica própria envolve o túbulo externamente, sendo composta de células mióides e matriz extracelular. No epitélio seminífero são encontrados dois tipos celulares de origem embriológica distintas: as células germinativas originárias do epiblasto e as células de Sertoli provenientes do epitélio do celoma (Fig.1B) (KARL & CAPEL, 1998).

2.1.1 Células de Sertoli

Também denominada célula de suporte ou de sustentação, nos testículos de mamíferos sexualmente maduros, estão completamente diferenciadas. A variação considerável na forma e estrutura da célula de Sertoli durante o ciclo do epitélio seminífero (CES) demonstra o alto grau de plasticidade desta célula, o qual reflete as alterações morfológicas e funcionais que ocorrem nas células germinativas (FRANÇA & HESS, 2005). Elas apresentam um citoesqueleto bastante desenvolvido, variando a sua forma e a localização do núcleo conforme os movimentos das células germinativas, que durante a espermatogênese se deslocam desde a base para o lúmen dos túbulos seminíferos.

Além da formação de barreira hematotesticular, as células de Sertoli desempenham outras funções essenciais para o desenvolvimento das células germinativas. Assim, pode ser citada a síntese de várias proteínas, o fornecimento de nutrientes, mediação da ação do hormônio folículo estimulante (FSH) e da testosterona na espermatogênese, fornecimento de suporte físico para as células espermatogênicas, participação ativa no processo de liberação das espermátides para o lume tubular, fagocitose do excesso de citoplasma resultante da liberação das células espermiadas e fagocitose de células germinativas que sofreram apoptose (HESS & FRANÇA, 2007).

As células de Sertoli secretam ainda fluido em direção ao lume tubular, o qual possui substâncias importantes, para a função epididimária e maturação espermática, servindo também de veículo para o transporte dos espermatozóides. Dentre as várias proteínas que a célula de Sertoli secreta através do estímulo do FSH, a ABP forma um complexo com os andrógenos produzidos pelas células de Leydig, resultando no auxílio do trânsito de

andrógenos dentro da cabeça do epidídimo (HAFEZ & HAFEZ, 2004). A secreção também ocorre em direção ao interstício, estando envolvida com os mecanismos de regulação parácrina de outros tipos celulares do testículo tais como células mióides, células de Leydig e células musculares lisas dos vasos (HESS & FRANÇA, 2007).

2.1.2 Espermatogênese

A espermatogênese é um processo no qual as células germinativas entram em divisão e diferenciação para dar origem as espermátides haplóides (O'DONNELL et al., 2001), é um processo altamente complexo e bem organizado que ocorre nos túbulos seminíferos e dura cerca de 30 a 78 dias em alguns mamíferos (FRANÇA & RUSSELL, 1998; HESS & FRANÇA, 2007) e em ratos Wistar com duração de 13 dias (HUCKINS, 1965). As células germinativas em maturação estão intimamente associadas às grandes células de Sertoli que as envolvem durante o desenvolvimento.

Baseado em características morfológicas e funcionais, o processo espermatogênico pode ser dividido em três fases: fase proliferativa, na qual as espermatogônias passam por sucessivas e rápidas divisões mitóticas; fase meiótica, onde o material genético é duplicado, recombinado e segregado, sendo esta fase muito importante para a variabilidade genética entre membros da mesma espécie (SHARPE, 1994). Esta série de divisões celulares, incluindo a proliferação das espermatogônias e das divisões meióticas, é conhecida por espermatocitogênese. As células haplóides resultantes deste processo são chamadas de espermátides. As espermátides, então, sofrem uma série progressiva de modificações estruturais e de desenvolvimento, dando origem aos espermatozóides (HAFEZ & HAFEZ, 2004) chegando à fase de diferenciação ou espermiogênica, na qual células haplóides formadas se transformam em células altamente especializadas e estruturalmente equipadas para alcançar e fertilizar os oócitos (SHARPE, 1994).

As espermátides produzidas na fase final da espermiogênese são liberadas durante a espermição para dentro do lúmen dos túbulos seminíferos como espermatozóides imaturos. Essas células espermáticas, imóveis, são impulsionadas dos túbulos por secreções fluidas originadas das células de Sertoli. O trânsito dentro do epidídimo é auxiliado por secreções da *rete testis*, por elementos contráteis dos testículos (células mióides e cápsula testicular) e pelos esteriocílios que se alinham nos ductos deferentes (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

A espermatogênese é completamente dependente de andrógenos. Os receptores de andrógenos localizam-se nas células de Sertoli, nas células mióides peritubulares e nas células de Leydig. Não há receptores para andrógenos nas células germinativas, o que indica que a ação da testosterona ocorre via células de Sertoli. A atividade dos receptores de andrógenos é regulada pela testosterona e pela diidrotestosterona (DHT), cuja ligação inicia a translocação nuclear e a função reguladora dos receptores de andrógeno (HOLDCRAFT & BRAUN, 2004).

2.2 Testosterona

A testosterona é hormônio reprodutivo de maior predominância no macho e suas funções estão relacionadas ao desenvolvimento e manutenção da libido (KALTENBACH & DUNN, 1982), atividade secretora dos órgãos acessórios (STANBENFELD & EDQVIST, 1996) e características corporais que em geral são associadas com o macho.

A produção de testosterona pelas células de Leydig é controlada pelo hormônio luteinizante (LH). O LH liga-se especificamente as membranas nas células de Leydig e ativa a adenosina-monofosfato cíclica (HUHTANIEMI & TOPPARI, 1995). Este processo dá início a ativação das proteínas cinases que catalisam a fosforilação das proteínas intracelulares e a mobilização dos precursores dos esteroides, principalmente através da conversão do colesterol. O LH também tem efeito tóxico sobre as células de Leydig, estimulando-as a se hipertrofiarem. A remoção do LH cessa a produção de testosterona e leva a uma grande redução no tamanho das células de Leydig (STANBENFELD & EDQVIST, 1996). A secreção de testosterona pelas células de Leydig também é influenciada pela velocidade em que este hormônio deixa o testículo via vasos linfáticos, vasos sanguíneos e fluidos seminal (RUSSELL, 1996).

A elevação dos níveis basais de testosterona é consequência da diferenciação das células de Leydig e está associada à proliferação das células germinativas, eventos essenciais para que o animal se torne púbere (1983; AMANN et al., 1986).

Cerca de 95% da testosterona circulante no sangue é de origem testicular, e 1% liberado pela produção adrenal com a conversão periférica de androstenediona. Outros andrógenos detectados no sangue vêm do testículo, como diidrotestosterona (20% origem testicular), dehidro-epiandrosterona (30%) e androstenediona (50%) (DADOUNE & DEMOULIN, 1993).

2.3 Epidídimo

Situa-se ao longo da porção lateral da face posterior dos testículos. Estão envolvidos pela túnica albugínea e pela túnica vaginal. Morfologicamente, o órgão é dividido em três regiões: cabeça, corpo e cauda (TURNER, 2003). A cabeça é a porção onde os ductos eferentes fundem-se no ducto epididimário, e a cauda comporta a região mais distal do ducto.

O epidídimo é um tubo único altamente espiralado. Juntamente com o tecido conjuntivo circunvizinho e vasos sanguíneos, esse ducto forma o corpo e a cauda do epidídimo, uma estrutura anatômica com capsula própria. É formado por um epitélio colunar pseudoestratificado e a superfície das células é coberta por longas e ramificadas estruturas imóveis chamadas de estereocílios. As células epiteliais se apoiam em uma lamina basal, células musculares lisas e tecido conjuntivo frouxo (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013). Essas células exercem várias funções importantes que são necessárias para a atividade do epidídimo, tais como: secreção de proteínas e absorção, endocitose, atividades secretoras de fluidos responsáveis pela acidificação do lúmen, defesa imunológica, fagocitose e produção de antioxidantes (HERMO & ROBAIRE, 2002) como a glutatona peroxidase (GPx) e a desmutase superóxida extracelular produzidas na cabeça e cauda do epidídimo, respectivamente (VERNET et al., 1996, 1997) (Fig. 2).

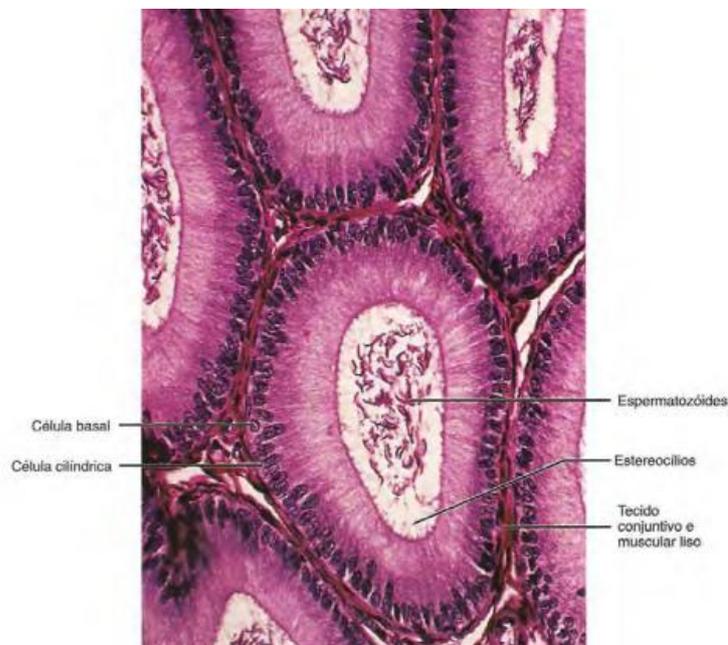


Figura 2: Corte histológico do ducto epididimário, evidenciando o tecido epitélio pseudoestratificado colunar com estereocílios, lamina basal, tecido muscular liso e tecido conjuntivo frouxo – Picro-sirius-hematoxilina. (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2013).

O epitélio epididimário apresenta seis tipos celulares, células principais, células apicais, células basais, células halo, células claras e células estreitas que desempenham variadas funções. Algumas células estão localizadas ao longo do ducto, enquanto outras se encontram tanto exclusiva ou principalmente em regiões específicas (ROBAIRE, 2006).

As quatro principais funções do epidídimo são transporte, desenvolvimento da motilidade e capacitação dos espermatozoides, como também a criação de um ambiente luminal especializado no processo de maturação, através das atividades de absorção e secreção do epitélio epididimal. Uma vez liberado no lúmen dos túbulos seminíferos, os espermatozoides são transportados através dos dutos eferentes e começam a sua jornada no epidídimo (ORGBIN-CRIST, 1962).

Nos vertebrados superiores, os espermatozoides tornam-se funcionalmente maduros à medida que passam através do epidídimo. Estudos indicam que há uma maturação progressiva na capacidade de fertilização de espermatozoides no epidídimo. Além da capacidade de motilidade progressiva, os espermatozoides do epidídimo desenvolvem a capacidade de sofrer a reação acrossômica, reconhecer e se ligar a zona pelúcida e se fundir com a membrana vitelínica (RIBEIRO, 2013).

Juntamente com estas alterações funcionais, os espermatozoides sofrem também alterações estruturais durante o trânsito epididimário: migração da gota citoplasmática ao longo do flagelo, modificações no acrossoma, mudanças na cromatina e algumas organelas na cauda, e ainda mudanças na membrana plasmática (BEDFORD, 2004).

A passagem dos espermatozoides através dos epidídimos depende de contrações localizadas na parede do ducto com uma frequência de cerca de três minutos. O tempo de trânsito pode ser reduzido de 10 a 20 % pelo aumento da frequência de ejaculado. Os elementos contráteis da parede dos epidídimos mostram diferenças regionais, como o conteúdo das células dos músculos lisos, que aumenta progressivamente da cauda do epidídimo para o vaso deferente (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

2.4 Tipos de castração em machos

O controle da fertilidade no macho pode ser obtido por meio de cirurgias (orquiectomia e vasectomia) ou por meios não cirúrgicos com terapias medicamentosas ou da utilização de agentes esclerosantes no testículo ou epidídimo. A contracepção medicamentosa tem sido realizada por meio de hormônios esteróides (andrógenos, progestágenos, anti-

andrógenos) e agonistas do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (JOHNSTON, KUSTRIZ & OLSON, 2001). Quanto à utilização de agentes esclerosantes para o bloqueio da fertilidade de machos, particularmente em caninos, podem ser citados: glicerol (IMMEGART & THRELFALL, 2000), tanato de zinco, gluconato de zinco (FAHIM et al., 1993), clorexidina, dimetilsulfóxido (DMSO) (PINEDA et al., 1977; PINEDA & DOLEY, 1984) e ácido láctico (NISHIMURA et al., 1992; FAGUNDES, 2011).

2.4.1 Orquiectomia

É classificada como um dos métodos físicos mais utilizados, sendo definida como a operação cirúrgica que consiste na ablação testicular ou supressão funcional do órgão reprodutor, realizada pela retirada dos mesmos (ALMEIDA, SILVEIRA & OLIVEIRA, 2010). A orquiectomia pode ser dividida em três tipos, orquiectomia fechada, semi-fechada e aberta, a mais comum (STAINKI, 2006).

A orquiectomia é uma técnica clássica para a esterilização masculina cujas indicações incluem: a diminuição da superpopulação animal, a eliminação ou diminuição significativa de muitos comportamentos censuráveis, tais como, a marcação territorial pela micção, monta e agressividade (JOHNTON, KUSTRIZ & OLSON, 2001; HEDLUND, 2007; BOWEN, 2008). Além de preventiva, a orquiectomia é utilizada para o tratamento de patologias reprodutivas, como neoplasias testiculares e escrotais, orquites, doenças prostáticas, trauma ou abscessos e controle de alterações endócrinas (BLOOMBERG, 1996; CRANE, 1996; HOWE, 2006; HEDLUND, 2007). Complicações na orquiectomia incluem inchaço, hemorragias do pedículo do cordão espermático, infecção no local da incisão (BOOTHE, 2002; MACÊDO, 2013) e dor local.

2.4.2 Vasectomia

Esta técnica inibe a fertilidade masculina, mas mantém os padrões comportamentais, pois os andrógenos continuam sendo produzidos pelas células de Leydig no testículo. Esta cirurgia é raramente indicada porque o comportamento errante, agressão e marcação por urina continuam. A vasectomia consiste na remoção bilateral de um segmento do ducto deferente, o que previne a fertilidade pela obstrução da passagem dos espermatozóides para o ejaculado (JOHNSTON KUSTRIZ & OLSON, 2001).

As desvantagens da vasectomia como também da orquiectomia, foram constatadas devido à necessidade de aplicação da anestesia geral ou analgesia local, utilização de instrumental adequado para a cirurgia asséptica, na necessidade de maiores cuidados nos períodos pré e pós operatórios (RODASK et al., 2001) e em alguns animais, esses procedimentos podem ser reversíveis ou o animal continua fértil.

Três grandes classes de métodos não cirúrgicos são descritas, sendo elas a terapia hormonal, a imunoesterilização e a esterilização química (OLIVEIRA et al., 2012), que diferem entre si pelo mecanismo de ação no organismo.

2.4.3 Terapia Hormonal

Na terapia hormonal, busca a queda da qualidade seminal pela redução na concentração de espermatozoides, utilizando progestágenos, andrógenos ou agonistas de hormônio liberador de gonadotrofinas (JOHNSTON, KUSTRITZ & OLSON, 2001).

Sobre os progestágenos, são descritos como contraceptivos para machos o acetato de megestrol e o acetato de medroxiprogesterona (MPA) (JOHNSTON, KUSTRITZ & OLSON, 2001; RODRIGUES & RODRIGUES, 2005). Os progestágenos são contraindicados devido a efeitos adversos, como supressão adrenocortical, alterações no metabolismo da glicose (ASA & PORTON, 2005) induzindo ao aparecimento de diabetes *mellitus* (GUIMARÃES, 2008) e estimulam o tecido mamário do cão podendo causar tumores de mama (JOHNSTON, KUSTRITZ & OLSON, 2001).

O uso de andrógenos é considerado como mais eficaz que o de progestágenos. Eles atuam na diminuição da concentração de testosterona intratesticular, com consequente bloqueio ou diminuição da espermatogênese. Entre os efeitos colaterais associados, apontam-se dermatite seborréica, disfunções hepáticas, obesidade e mudanças comportamentais. Os andrógenos são fortemente contraindicados em animais pré-puberes, dadas às alterações em conformações ósseas (GRAY et al., 2001). O uso de progestágenos, assim como o de andrógenos, é considerado reversível (POLI et al., 2009).

Outra abordagem consiste em influenciar a secreção das gonadotrofinas pela ação de agonistas ou antagonistas do GnRH. Os agonistas de GnRH, quando usados em altas doses e de forma contínua, agem promovendo uma dessensibilização dos receptores hipofisários para GnRH, levando a inibição de liberação de LH e FSH pela hipófise, o que bloqueia a síntese de

testosterona e a espermatogênese (RODRIGUES & RODRIGUES, 2005; KUTZLER & WOOD, 2006; GUIMARÃES, 2008).

Os agonistas de GnRH causam, inicialmente, aumento transitório na concentração sérica de LH e testosterona, seguido por declínio até concentrações não detectáveis em sete a 14 dias (JOHNSTON, KUTRITZ & OLSON, 2001; RODRIGUES & RODRIGUES, 2005; KUTZLER & WOOD, 2006; GUIMARÃES, 2008). A redução da testosterona ocorre devido à falha na secreção de LH e está associada à hipotrofia das células de Leydig, comprometendo a qualidade seminal (RODRIGUES & RODRIGUES, 2005).

2.4.4 Imunoesterilização

A imunoesterilização possui uma ação diferente da terapia hormonal, pois leva o organismo a produzir ação imunológica a elementos essenciais na espermatogênese. As técnicas mais utilizadas e estudadas envolvem a produção de anticorpos contra o GnRH ou o LH, tanto em animais de produção (PIRARD et al., 2002) como de companhia (PURSWELL & KOLSTER, 2006; LOPES & SILVA, 2014).

O efeito contraceptivo é reversível, mantendo-se até que as concentrações dos anticorpos específicos, que gradativamente vão decaindo a níveis abaixo de um limiar contraceptivo, ou seja, tornem-se insuficientes para o bloqueio da reprodução. A duração deste efeito varia em função do título inicial de anticorpos contraceptivos, sendo observados períodos de até cinco anos de infertilidade (BROWN et al., 1997).

Em alguns casos, os anticorpos produzidos e células citotóxicas do sistema imunológico ativadas nas vacinações causam a destruição de elementos não regeneráveis do sistema reprodutivo, caracterizando-se, assim, um processo de esterilização imunológica (LOPES, NUNES-PINHEIRO & FIGUEIREDO, 2005).

2.4.5 Castração química

É um processo no qual se realiza a administração de agentes esclerosantes no testículo ou em estruturas adjacentes (SAMANTA, 1998; JANA, SAMANTA & GHOSH, 2002; AVMAAWD, 2012). Esse tipo de procedimento se refere ao uso de elementos que geram inflamação, fibrose e dano físico definitivo às estruturas do aparelho reprodutor do macho, especialmente nos ductos deferentes, nos epidídimos e nos próprios testículos, reduzindo a

espermatogênese e a concentração sérica de andrógenos (KUTZLER & WOOD, 2006). Este método é tido como irreversível e proporciona menor nível de dor e maior velocidade de recuperação quando comparados à castração cirúrgica (COHEN et al., 1990; EMIR et al., 2008; AHMED & AL-BADRANY, 2009).

A castração química pode ser classificada em três categorias considerando-se o local de aplicação da solução esterilizante: intratesticular, intraepididimal ou intraductal. O mecanismo de ação varia com a técnica: na intratesticular o agente químico compromete a espermatogênese pela ação que exerce nos túbulos seminíferos; na intraepididimal, causando comprometimento no transporte de espermatozoides e na intraductal com obstrução no lúmen do ducto (GOLDSMITH et al., 1985).

A aplicação desses agentes no testículo induz uma resposta sistêmica imune, provocando não só uma ruptura da barreira de células de Sertoli como também inflamação local com liberação de antígenos testiculares (JOHNSTON, KUSTRITZ & OLSON, 2001). Em contrapartida, quando esses agentes são injetados no ducto deferente ou epidídimo induzem uma oclusão fibrosa e subsequente azoospermia (PINEDA et al., 1977; PINEDA & DOOLEY, 1984; FAHIM et al., 1993).

Os agentes esclerosantes que têm sido utilizados em machos caninos e felinos incluem o glicerol (IMMEGART & THRELFALL, 2000), tanato de zinco e gluconato de zinco (FAHIM et al., 1993), clorexidina (AIUDI et al., 2010), dimetil-sulfóxido (PINEDA et al., 1977; PINEDA & DOLEY, 1984), ácido láctico (NISHIMURA et al., 1992) e cloreto de cálcio (BARAN et al., 2010). Dentre as demais substâncias esclerosantes destacam-se em pesquisas o ácido láctico e o gluconato de zinco.

O gluconato de zinco em injeção intratesticular vem sendo amplamente utilizado e estudado. Em cães, diagnósticos histológicos revelaram danos similares e igual aos processos inflamatórios e perda da função testicular (OLIVEIRA et al., 2007). Em estudo realizado com gatos, 73% dos animais apresentaram azoospermia e mudanças comportamentais, em 36% dos animais, sem detecção de queda dos níveis de testosterona (OLIVEIRA et al., 2013). O gluconato de zinco provoca atrofia dos túbulos seminíferos com formação de tecido de granulação e oclusão fibrosa à passagem de espermatozoides (WANG, 2002).

A castração à base de princípios ativos naturais (ácido láctico e papaína) tem como efeito uma ação esclerosante, ou seja, uma vez em contato com o tecido testicular, induz, inicialmente, um processo inflamatório e, posteriormente, uma substituição deste por tecido

conjuntivo fibroso. Esta técnica promove a eliminação da síntese testicular de testosterona, não requerendo cirurgia (VIVACQUA, 2010).

2.4.6 Acido Láctico

O ácido láctico ou ácido 2hidroxipropanoico possui a fórmula molecular $C_3H_6O_3$ e peso molecular de 90,08 g/mol. Ele é obtido através da fermentação do açúcar de cana e se apresenta como uma solução xaroposa, límpida, e isenta de material em suspensão. Tem sabor suave e é largamente utilizado como acidulante na indústria alimentícia (WATANABE et al., 2006).

Administração intratesticular de ácido láctico foi eficaz na castração de bovinos, camundongos e cães, com resultados perceptíveis após 24 h (NISHIMURA et al., 1992). Estudo com caprinos, onde foram administradas doses de 1 a 3 mL/10 kg de ácido láctico, levaram à infertilidade definitiva (OKWEE-ACAI, OJOK & ACON 2014).

Nishimura et al. (1992) promoveram a esterilização de cães com injeção intratesticular de ácido láctico puro. Os autores observaram interrupção do desenvolvimento de ambos os testículos em cães pré-púberes. O diâmetro testicular aumentou após a injeção, mas este voltou ao normal em poucos dias e após sete semanas os mesmos não foram detectados à palpação. O ácido láctico puro levou ao decréscimo da concentração de testosterona e diminuição da libido imediatamente após a injeção. Foram observadas atrofia dos túbulos seminíferos e degeneração das células germinativas, quatro meses após o tratamento.

2.5 Papaína

A papaína é uma enzima de origem vegetal, encontrada nas folhas e nos frutos da *Carica papaya* Linne. Ela é isolada a partir do látex do frutos verde dessa espécie (CAPUCHO, 2007). É uma enzima proteolítica muito empregada na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica, cujo sítio ativo é portador de um radical sulfidrílica (SH) possuindo fórmula molecular com 17 aminoácidos diferentes e uma massa molecular relativa de 20900U, pertencente ao aminoácido cisteína fundamental para sua atividade enzimática (SILVA, 2003; FERREIRA et al., 2008)

Após seu preparo, a papaína é um pó de cor leitosa, com odor forte e característico, lembrando enxofre. É solúvel em água e glicerol, mas praticamente insolúvel no álcool, éter e

clorofórmio; é inativada ao reagir com agentes oxidantes como o ferro, oxigênio, derivados de iodo, água oxigenada e nitrato de prata, luz e calor. Por ser uma enzima de fácil deterioração, deve ser mantida em lugar fresco, seco, ventilado e protegido (SANCHES NETO, 1991).

Esta substância possui ampla aplicação terapêutica, além de também ser utilizada na indústria têxtil, em laboratórios bioquímicos e bacteriológicos, em indústria de alimentos e de borracha. No debridamento químico caracteriza-se por provocar, em doses diminutas, a proteólise, isto é, a dissociação de uma quantidade importante de proteínas em moléculas mais simples e, finalmente, em aminoácidos (MONETA, 1987; LOHIYA et al., 2000; ROCHA, 2005; FERREIRA et al., 2008).

Tem sido utilizada em testes com imunoglobulinas e na indústria farmacêutica vem sendo utilizada em curativos como um acelerador no processo de cicatrização, sendo indicada no tratamento de úlceras de decúbito. A enzima possui amplo espectro de especificidade, os peptídeos, amidas, ésteres e tioésteres são todos susceptíveis para hidrólise catalítica da papaína (BATISTUZZO et al., 2002).

Dentre as ações da papaína ela pode agir na remoção de exsudatos inflamatórios e células mortas, diminuindo assim o período necessário para a reparação tecidual, sem afetar o tecido íntegro ao redor da lesão. Todavia, ela ainda facilita a cicatrização de feridas. Deste modo, a papaína digere os restos teciduais e constituintes insolúveis do exsudato inflamatório (fibrina e material genético das células mortas) e conseqüentemente os transformam em peptídeos quimiotáticos para os fibroblastos, que conseqüentemente irão estimular precocemente a fibroplasia/cicatrização (FERREIRA et al., 2008).

Outra característica da papaína é seu poder anti-inflamatório, bacteriostático e bactericida (MONETA, 1992; VELASCO, 1993; HARDMAN & LIMBIRD, 1996). Em inflamação aguda causada por infecção intraperitoneal em camundongos, no grupo tratado com papaína, ocorreu maior migração de polimorfonucleares do que nos animais não tratados (ARRUDA, 1991).

A eficácia da papaína é aumentada na presença de ativadores que estimulam sua potência digestiva, dentre eles o ácido láctico, principalmente os que desnaturam proteínas presentes no material necrosado permitindo que o mesmo fique mais susceptível à digestão enzimática. Estudos têm demonstrado que a combinação com este tipo de substância torna papaína em torno de duas vezes mais eficaz que a papaína pura (FALANGA, 2002).

Existe uma urgência em se difundir o conceito de posse responsável, bem como a necessidade de medidas de controle eficazes para solucionar problemas relacionados ao

crescente número de cães e gatos errantes e semi domiciliados. As medidas de controle incluem técnicas cirúrgicas e não cirúrgicas. A castração cirúrgica apesar de ser um método bastante invasivo, ainda é o meio mais utilizado de esterilização permanente em cães e gatos. Em contra partida a castração química, é um método eficaz de esterilização que deve ser mais bem exposto entre os tutores e assim aumentar os números de procedimentos realizados.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a castração química com papaína associada ao ácido láctico em ratos Wistar adultos

3.2 Específicos

- Investigar os efeitos da solução de papaína associada ao ácido láctico sobre o testículo, epidídimo, rim e fígado;
- Analisar histopatologicamente o testículo, epidídimo, rim e fígado utilizando microscopia óptica;
- Avaliar a testosterona sérica pelo método ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais e Condições de Alojamento

Foram utilizados 25 ratos Wistar com 90 dias de idade, provenientes do biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Os animais foram acondicionadas em gaiolas de policarbonato forradas com maravalha de pinus, mantidos em temperatura de 22 ± 2 °C controlada por ar condicionado convencional ligado 24 horas por dia, expostos a fotoperíodo de 12 horas de luz (400 Lux) por 12 horas de escuro e com acesso a ração balanceada (Presence para ratos-Purina) e água *ad libitum*. Procedimento padrão do Biotério do DMFA da UFRPE.

4.2 Procedimento Experimental

Todas as atividades envolvendo a utilização de animais foram aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRPE (Licença N° 063/2015).

Os 25 ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus Norvegicus albinus*) com 90 dias, foram distribuídos em grupos de cinco indivíduos por amostragem não probabilística de conveniência. Foi realizada a coleta de amostras de sangue para dosagem de testosterona sérica, como também testículo, epidídimo, rim e fígado para estudo histopatológico.

G1 - aplicação intratesticular de 0,1 mL da solução papaína e ácido láctico com coleta do material biológico 24 horas após o tratamento;

G2 - aplicação intratesticular de 0,1 mL da solução papaína e ácido láctico com coleta do material biológico em 48 horas após o tratamento;

G3 - aplicação intratesticular de 0,1 mL da solução papaína e ácido láctico com coleta do material biológico em 72 horas após o tratamento;

G4 - aplicação intratesticular de 0,1 mL da solução papaína e ácido láctico com coleta do material biológico em 96 horas após o tratamento;

GC – Controle; aplicação intratesticular de 0,1 mL da solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9 % com coleta do material biológico em 24 horas após o tratamento.

Os animais foram submetidos à anestesiada dissociativa com cloridrato de xilazina a 2% (10mg/kg/IP) (Anasedan[®]) e cloridrato de cetamina (75mg/kg/IP) (Vetanarcol[®]) não associadas por via intraperitoneal. Os animais foram posicionados em decúbito dorsal e realizou-se assepsia dos testículos com álcool etílico a 70%. Com auxílio de seringa de 1 mL e agulha com calibre de 12,7 mm x 0,3 mm foi injetado 0,1 ml por via intratesticular da solução a base de papaína e ácido láctico na região ventro caudal dos testículos (Fig.3). Após o procedimento, os animais foram transferidos para as caixas e mantidos em temperatura controlada até a recuperação anestésica.



Figura 3: Aplicação intratesticular de 0.1 mL de solução papaína e ácido láctico em ratos Wistar pertencentes ao grupo G2 (LIMA, 2016).

4.3 Avaliação clínica dos animais

As características clínicas dos animais foram observadas durante todo o período do experimento, considerando os seguintes aspectos: estado geral dos animais (comportamento social e individual), edema e hiperemia no testículo.

4.4 Análise Histopatológica

Após o término do período experimental, os animais foram anestesiados para coleta do material biológico. O sangue foi coletado e em seguida realizado perfusão intracardíaca com solução fisiológica de NaCl a 0,9%, acrescida de formol neutro a 10% tamponado com fosfato

de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico e pH 7,2. Foram coletados testículos, epidídimos, rins e fígado que colocados na solução de formol neutro tamponado a 10% por 24 horas. Posteriormente os fragmentos dos testículos, epidídimos, rins e fígado foram desidratados em etanol, em concentrações crescentes de 80%, 90%, 95% e etanol absoluto, diafanizados em álcool butílico, impregnados e incluídos em paraplast. Os blocos de paraplast foram então cortados em micrótomo tipo Minot (Leica®), ajustado para 5 micrómetros (μm) de espessura, com os cortes sendo, em seguida, colocados em lâminas, onde foram mantidas na estufa a 37 °C durante 24 horas para a secagem. Em seguida os cortes foram corados com hematoxilina/eosina (HE) e ácido periódico de Schiff (PAS).

As imagens dos cortes histológicos foram capturados usando um microscópio biológico Leica®, acoplado a um sistema de câmera digital usado para capturar imagens microscópicas. Todo o procedimento de confecção de lâminas e imagens foi realizado no Laboratório de Histologia do DMFA/UFRPE.

4.5 Análise da Testosterona Plasmática

As amostras de sangue foram colhidas por punção no seio venoso (confluência das veias cavas). O plasma separado por centrifugação e embalado em Eppendorf (dois por amostra). As amostras foram mantidas em refrigeração a -20 °C. A dosagem foi realizada pelo método de ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA - Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) através do Testosterone ELISA kit (Enzo Life Sciences®), com a leitura de absorvância a 405 nm conforme descrito por Brow et al. (2004), com correção entre 570 nm e 590 nm, contendo placa sensibilizada. Todo o procedimento foi realizado no laboratório de Histologia do DMFA/UFRPE.

Para a curva padrão, realizou-se diluições seriadas de 250 μL do padrão de concentração 50.000 pg/40 μL de testosterona (Enzo N° 80-0430) até a concentração de 7,81pg/40 μL , em 250 μL de solução de ensaio de ELISA. Antes do início do ensaio, a placa foi lavada com tampão de lavagem (Wash buffer) e o excesso de solução foi retirado batendo-se a placa em papel toalha. Posteriormente, nos poços apropriados foram pipetados 100 μL dos padrões, controles e amostras e logo após 50 μL do anticorpo amarelo (Enzo N° 80-0429). A placa foi incubada a temperatura ambiente em um shake a 500 rpm por 1 hora. Em seguida acrescentou-se o conjugado azul (Enzo N° 80-0431) nos poços apropriados e incubou-se a placa novamente em temperatura ambiente no shake por 1 hora a 500 rpm. Após

esse tempo, as placas foram esvaziadas e lavadas com 400 μ L da solução tampão de lavagem seguida pela remoção do líquido tampão, batendo a placa firmemente em papel absorvente. Posteriormente foi adicionada nas placas 200 μ L do substrato pNpp (solução de p-nitrophenyl phosphate, ENZO N° 80-0075), a placa foi coberta com selo, seguida pela incubação a 37 °C por 1 hora sem agitação. Após esse período foi acrescentado na placa 50 μ L da solução stop (ENZO N° 80-0247). Procedeu-se então a leitura no leitor de microplacas (Biochorm Anthos 2010[®], n/s 501365)

4.6 Análise Estatística

Foi realizado um estudo descritivo que tem como fundamento descrever o perfil dos casos observados. Foi realizado o teste de Student para comparação de médias dos valores de Testosterona sérica.

5 REFERÊNCIAS

- AHMED, O.S.; AL-BADRANY, M.S. Chemical castration in equidae. Mosul: College of Veterinary Medicine, University of Mosul, 2009.
- AIUDI, G.; SILVESTRE, F.; LEOCI, R.; LACALANDRA, G.M. Single testicular injection Chlorhexidine solution as a chemical sterilant in dogs. In: International Symposium on Non-Surgical Contraceptive Methods for Pet Population Control, 4, 2010, Dallas, TX. Proceedings Dallas, TX: ACC & D, 2010.
- ALMEIDA, K.B.; SILVEIRA, A.C.; OLIVEIRA, V.A. Orquiectomia em bovinos. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.6, p.1, n.9, 2010.
- AMANN, R.P. Sperm production rates. In: JOHNSON, A.D.; GOMES, W.R. VANDEMARK, N.L. (Eds). **The Testis**. New York: Academic Press. p.433-482, 1970.
- ARRUDA, M. A. S. **Ação da papaína sobre a migração leucocitária em modelo de inflamação aguda em cavidade peritoneal de camundongos**. **Dissertação**. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 1991.
- ASA, C.S.; PORTON, I.J. Wildlife contraception: Issues, methods, and applications. [s.l.] JHU Press, 2005.
- AVMA (American Veterinary Medical Association): Disponível em <http://www.avma.org/reference/backgrounders/castration_cattle_bgnd.asp>. Acesso realizado em 10 de agosto de 2015.
- AVMAAWD. **Welfare Implications of Castrations of Cattle**. 2014. Acessado em: 20 de agosto de 2015. Online. Disponível em: <http://www.journalofavma.org/reference/backgrounders/practices_piglets_bgnd.asp>.
- BARAN, A.; OZDAS, O.B.; GULCUBUK, A.; HAMZAOGLU, A.I.; TONGUC, M. Pilot study: intratesticular injection induces sterility in male cats. In: International Symposium on Non-Surgical Contraceptive Methods for Pet Population Control. 4, 2010, Dallas, TX. Proceedings ... Dallas, Texas: ACC & D, 2010.
- BATISTUZZO, J. A. O.; ITAYA, M. E. L. O; YAKUKO. **Formulário médico farmacêutico**, 2ª edição – SP – Tecnopress, 2002.
- BEDFORD, J.M. Components of sperm maturation in the human epididymis. **Advances in the biosciences**, 10, p. 145-155, 2004.

BLOOMBERG, M.S. Surgical neutering and non-surgical alternatives. **Journal American Veterinary Medical Association**, New York, V. 208, P.517-519, 1996.

BOOTHE, H.W. Tests and epididymides. In: Slatter D, (ED) Textbook of small animal surgery. 2 ed. USA: Elsevier Science, 2002. Cap. 102, p.1521-1530, 2002.

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

BROWN, R.G.; BOWEN, W.D.; EDDINGTON, J.D.; KIMMINS, W.C.; MEZEI, M.; PATERSONS, J.L.; POHAJDAK, B. Evidence for a long-lasting single administration contraceptive vaccine in grey seals. **Journal of Reproductive Immunology**, v.35, p.43-51, 1997.

CAPUCHO, H.C. **Desenvolvimento de formulações tópicas contendo papaína para o tratamento de feridas. Dissertação** (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2007.

CHIARINI-GARCIA, H.; RUSSELL, L.D. High-resolution light microscopic characterization of mouse spermatogonia. **Biology of Reproduction**, 65: 1170-78, 2001.

COHEN, R.D.H.; KING, B.D.; THOMAS, L.R.; JANZEN, E.D. Efficacy and stress of chemical versus surgical castration of cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, v.70, p.1063-1072, 1990.

DADOUNE, J.; DEMOULIN, A. Structure and functions of testis. In: THIBAUT, C.; LEVASSEUR, M.C.; HUNTER, R.H.F. Reproduction in mammals and man. Paris: Ellipses, Cap. 13, p.227-225, 1993.

DE ROOIJ, D.G.; RUSSELL, L. D. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. **Journal of Andrology**, v.21, n.6, p.776-798, 2000.

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

FAGGELLA, A.M.; ARONSOHN, M.G. Anesthetic techniques for neutering 6 to 14 week year's old kittens. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.202, p.56-62, 1993.

FAGUNDES, A.K.F. **Esterilização de gatos com injeção intratesticular de gluconato de zinco. Estudo clínico, bioquímico, histológico e hormonal.** Dissertação (Mestrado em Biociência Animal), Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2011.

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

FALANGA, V. Wound bed preparation and the role of enzymes: a case for multiple actions of therapeutic agents. **Wound**, v. 14(2): p. 47-57, 2002.

FERREIRA, A.M. WATANABE, E. NASCIMENTO, A. P. ANDRADE, D. ITO. I. Y. Atividade antibacteriana *in vitro* de géis com diferentes concentrações de papaína. **Revista eletrônica de enfermagem**. 2008, V.10, p.1035-1340. Disponível em: <http://www.fen.ufg.br/revista/v10/n4/pdf/v10n4a15.pdf>. Acessado em: 13/08/2014.

FRANCA, L.R.; HESS, R.A. Structure of the Sertoli cell. In: SKINNER, M; GRISWOLD, M. (Eds). Sertoli cell Biology. San Diego - California: Elsevier Academic Press. 19-40. 2005.

FRANÇA, L.R.; RUSSELL, L.D. The testis of domestic animals. In: REGADERA, J.; MARTINEZ GARCIA (Eds.). Male reproduction: a multidisciplinary overview. Madrid: Churchill Livingstone, p.197-219, 1998.

GOLDSMITH, A. et al. Transcutaneous male sterilization. **Research on Fertility Regulation**, v.3, n.4, p.1-8, 1985.

GRAY, L.E.; OSTBY, J.; FURR, J.; WOLF, C.J.; LAMBRIGHT, C.; PARKS, L.; VEERAMACHANENI, D.N.; WILSON, V.; PRICE, M.; HOTCHKISS, A.; ORLANDO, E.; GUILLETTE, L. Effects of environmental antiandrogens on reproductive development in experimental animals. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v.109, p.S302-S319, 2001.

GUIMARÃES, M.A.B.V. **Monitorização não invasiva da supressão da atividade cíclica e do comportamento de estro em fêmeas de leão africano (*Panthera leo*), induzidos pelo uso de implantes de análogo de GnRH, deslorelina.** 2008. 79f. Tese (Curso para Professor Livre-Docente) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. Espermatozóides e plasma seminal. In: GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. (Ed). **Reprodução Animal**, 7 ed., Manole, Cap. 7, p.97 – 103, 2004.

HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. (Ed): Goodman's and Gilman's; **The Pharmacological basis of Therapeutics**, 9th edition. New York, Ed. McGraw-Hill; 1996.

HEDLUND, C.S. Surgery of the reproductive and genital systems. In: FOSSUM, T.W.; HEDLUND, C.S.; HULSE, D.A.; JONHSON, A.L.; SEIM, H.B.; WILLARD, M.D.; CARROLL, G.L (Ed). **Small animal surgery**. 3 ed. Missouri: Mosby, Cap. 26,p. 702-774, 2007.

HERMO, L.; ROBAIRE. B. Epididymal cell types and their functions. In: ROBAIRE, B.; HINTON, B.T. The Epididymis – from molecular to clinical practice. 1 ed. New York: Academic/Plenum Publisher. Cap.5, p. 81-102, 2002.

HESS, R.A.; FRANÇA, L.R. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: Molecular mechanisms in spermatogenesis (ed.Cheng CY), p. 1-15. Landes Bioscience, 2007.

HOLDCRAFT, R.W.; BRAUN, R.E. Hormonal regulation of spermatogenesis. **International Journal of Andrology**, v. 27, p. 335-342, 2004.

HOWE, L.M. Surgical methods of contraception and sterilization. **Theriogenology**, Davis, v. 66,n. 3,p. 500-509, 2006.

HUCKINS, C. Duration of spermatogenesis in pre and postpuberal Wistar rat. **The Anatomical Record**, v. 151, p. 364, 1965.

HUHTANIEMI, I.; TOPPARI, J. Endocrine, paracrine and autocrine regulation of testicular steroidogenesis. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 377, p. 33-54, 1995.

IMMEGART, H.I.; THRELFALL, W.R. Evaluation of intratesticular injection of glycerol for nonsurgical sterilization of dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, p. 544-549, 2000.

JANA, K.; SAMANTA, P.K. Clinical evaluation of non surgical sterilization of male cats with single intratesticular injection of calcium chloride. **Veterinary Research**, v.7, p.1-15, 2011.

JANA, K; SAMANTA,P.K.; GHOSH, D. Dose dependent response to an intratesticular injection of calcium chloride for induction of Chemoesterilization in adult albino rats. **Veterinary Research**, v. 26(8): p.65-73, 2002.

JOHNSTON, S.D.; KUSTRIZ, M.V.R.; OLSON, P.N.S. Canine and Feline **Theriogenology**, 592p. 2001.

JUNQUEIRA, L.C.U. & CARNEIRO, J. Histologia Básica. 11ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 524, 2008.

KALTENBACH, C.C.; DUNN, T.G. Endocrinologia da reprodução. In: HAFEZ, E.S.E. Reprodução animal. São Paulo: editora Manole, cap.5, p. 95-127, 1982.

KARL, J.; CAPEL, B. Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. In: *Developmental biology*, v. 203, p. 323-333. Academic Press, 1998.

KUIPERS, H. Training and overtraining: an introduction. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v. 30, n. 7, p. 1137-9, 1998

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

LOHIYA, N. K., PATHAK, N., MISHRA, P. K., MANIVANNAN, B. Contraceptive evaluation and toxicological study of aqueous extract of the seeds of *Carica papaya* in male rabbits. **Journal of Ethno-Pharmacology**, v. 70, p. 17-27, 2000.

LOPES, C.A.P.; NUNES-PINHEIRO, D.C.S.; FIGUEIREDO, J.R. Imunocontraceção em mamíferos com ênfase no controle populacional de cães. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, n.3/4, p. 159-166, 2005.

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

MACÊDO, S.R.B. **Avaliação do efeito esterilizante de solução à base de gluconato de zinco em testículos de ratos wistar em associação com anti-inflamatórios e antiálgicos.** Dissertação (mestrado em Biociência Animal), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2013.

MONETA, L. O uso da papaína nos curativos feitos pela enfermagem. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 40, n. 1, p. 66-73, 1987.

MULLER, P. M.; OLIVEIRA, E. C. S.; SILVA, F. L. M.; SILVA, L. G.; BRITO, L. T.; TEIXEIRA, M. J. C. D. S. Avaliação das características da próstata de cães submetidos à injeção intratesticular de gluconato de zinco. **Anais da JEPEX 2009** (IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFRPE), Recife – 19 a 23 de Outubro de 2009.

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

O'DONNELL, L.; ROBERTSON, K.M.; JONES, M.E.; SIMPSON, E.R. Estrogen and spermatogenesis. **Endocrine Review**, v. 22, n.3, p. 289-318, 2001.

OKWEE-ACAI, J.; OJOK, L.; ACON, J. Testicular morphologic and hormonal responses to an intratesticular injection. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 38, n. 1, p. 49-53, jan./mar. 2014. Disponível em www.cbra.org.br 53

OLIVEIRA, B.A.S.; ROCHA, L.M.; MÓL, B.; VALLE, G.R. Métodos cirúrgicos e não cirúrgicos de contracepção masculina em cães. **Sinapse Múltipla**, v. 1, p. 1-14, 2012.

OLIVEIRA, E.C.S.; FAGUNDES, A.K.; MELO, C.C.; NERY, L.T.; RÊVOREDO, R.G.; ANDRADE, T.F.; OLIVEIRA-ESQUERRE, K.; KASTELIC, J.P.; SILVA, V.A. JR.. Intratesticular injection of a zinc-based solution for contraception of domestic cats: arandomized clinical trial of efficacy and safety. **Veterinary Journal**, v. 197, p. 307-310, 2013.

OLIVEIRA, E.C.S.; MOURA, M.R.; SILVA JUNIOR, V.A.; PEIXOTO, C.A. Intratesticular injection of a zinc-based solution as a contraceptive for dogs. **Theriogenology**, v. 68, p.137-145, 2007.

ORGEBIN-CRIST, M.C. Recherches expérimentale *sur* ladurée de passage dès spermatozoide dans'épididyme dutaureau. **Annual Animal Biology Biochem Biophys**. 2, p. 51-108, 1962.

PINEDA, A.M.H; REIMERS, T.J.; FAULKNER, L.C.; et al. Azoospermia in dogs induced by injection of sclerosing agents into the caudae of the epididymides. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, n. 6, p. 831- 838, 1977.

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

PIRARD, M.; PORTETELLE, D.; BERTOZZI, C.; PARMENTIER, I.; HAEZEBROECK, V.; FONTAINE, S.; RENAVILLE, R. Immunocastration of farm animals. In: Renaville R, Burny A (Ed.). **Biotechnology in Animal Husbandry**. Focus on Biotechnology. [s.l.] Springer Netherlands, p.169-178, 2002.

POLI, M.E.H.; MELLO, C.R.; MACHADO, R.B.; PINHO NETO, J.S.; SPÍNOLA, P.G.; TOMAS, G.; SILVEIRA, M.M.; FORMIGA FILHO, J.F.N.; FERRARI, A.E.M.; GIORDANO, M.V.; ALDRIGHI, J.M.; GIRIBELA, A.H.G.; ARAÚJO, F.F.; MAGALHÃES, J.; BOSSEMEYER, R.P. Manual de anticoncepção da FEBRASGO. **Femina**, v. 37, n. 9, p. 460, 2009.

PONTELI, N.N.; SANCHES Jr, C.A. Notas para uma análise sociológica sobre a castração química. **Revista Levs/Unesp Marília**, n.5, p. 13, 2011.

PRUNIER, A.; BONNEAU, M.; VON BORELL, E.H.; CINOTTI, S.; GUNN, M.; FREDRIKSEN, B.; GIERSING, M.; MORTON, D.B.; TUYTTENS, F.A.M.; VELARDE, A. A review of the welfare consequences of surgical castration in piglets and the evaluation of non-surgical methods. **Animal Welf**, v. 15, p. 277, 2006.

PURSWELL, B.J.; KOLSTER, K.A. Immunocontraception in companion animals. **Theriogenology**, v. 66, p. 510-513, 2006.

RIBEIRO, S.P. **Efeitos do cádmio, chumbo e zinco em epidídimo de ratos Wistar**. Dissertação, 2013, Universidade Federal de Viçosa, Pos-Graduação em Biologia Animal, Viçosa, Minas Gerais.

ROCHA, R. P. A.; GURJÃO, W. S; JUNIOR, L. C. B.: Avaliação morfológica da cicatrização de lesões ulcerativas assépticas tratadas com soluções de papaína. **7º Congresso Virtual Hispanoamericano de Anatomia Patológica**. P. 1 - 8. 2005. Disponível em: <www.conganat.org/7congreso/final/vistaImpresion.asp?id_trabajo =4>. Acesso realizado em: 20/08/2015.

RODASKI, S.; WEISS, R.R.; GUERIOS, S.D.; TORRES, M.A.N.; KASECKER, G.G.; BUCHELLE, J.; NARDI, A.B. Esterilização química m cães com aplicação intra epididimária de solução de adrenalina 0,1% e Lugol 10%. **Archives of veterinary Science**, v. 6, n. 2, p. 9-17, 2001.

RODRIGUES, B.A.; RODRIGUES, J.L. Alternativas contraceptivas em caninos e felinos domésticos. 2005. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Goiânia. **Anais**. Goiânia: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, p.1-12, 2005.

RUSSELL, L.D., ETTLIN, R.A., SINHA HIKIM, A.P., CLEGG, E.D. (Ed.) Histological and histopathological evaluation of the testis. **Cache River Press**, Clearwater, FL, p. 213, 1990.

SAMANTA, P.K. Chemoesterilization of stray dogs. **Indian Journal of Animal Sciences**, v.37, p.61-62, 1998.

SANCHES NETO, R. Aspectos morfológicos e morfométricos da reparação tecidual de feridas cutâneas de ratos com e sem tratamento com solução de papaína a 2% [**dissertação de mestrado**]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina; 1991.

SETCHELL, B.P. Male reproductive organs and semen. In: CUPPS, P.T. (Ed.). **Reproduction in Domestic Animals**. San Diego: Academic Press, p.221-249, 1991.

SHARPE, R.M. Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL, E; NEIL, J.D. (Eds). **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press, p. 1363-1434. 1994.

SILVA, L. M. Efeitos benéficos da papaína no processo terapêutico de lesões de pele. In Jorge AS, Dantas SRPE. Abordagem multiprofissional do tratamento de feridas. São Paulo: Atheneu, p. 123-32, 2003.

SLATTER, D.H. Textbook of small animal surgery. [s.l.]: Elsevier Health Sciences, v.2, 2003.

SPEROFF, L.; DARNEY, P.D. **A clinical guide for contraception**. [s.l.] Lippincott Williams & Wilkins, 2010.

STABENFELDT, G.H.; EDQVIST, L. Processos reprodutivos do macho. In: SWENSON M, J.; REECE, W. O. Dukes – Fisiologia dos animais domésticos, Rio de Janeiro: editor Guanabara Koogan S.A., cap. 35, p. 603-614, 1996.

STAFFORD, K. J.; MELLOR, D. J: The welfare significance of the castration of cattle: a review. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 53: p. 271-278, 2005.

STAINKI, D. R. **Orquiectomia**. 2006. Acessado em: 08 de setembro de 2014. Online. Disponível em: <<http://puhrs.campus2.br/~stainki/CirurgiaI/orquiectomia%2006.pdf>>.

TURNER, T.T.; BOMGARDNER, D.; JACOBS, J.P.; NGUYEN, Q.A. Association of segmentation of the epididymal interstitium with segmented tubule function in rats and mice. **Reproduction**, v. 125, n. 6, p. 871-878, 2003.

VELASCO, M. V. R. **Desenvolvimento e padronização de gel contendo papaína para uso tópico**. Dissertação. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo; 1993.

VERNET, P.; RIGAUDIERE, N.; GHYSELINCK, N.; DUFAURE, J.P.; DREVET, J.R. In vitro expression of a mouse tissue-specific glutathione peroxidase protein lacking selenocysteine can protect stably transfected mammalian cells against oxidative damage. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 74, p. 125-131, 1996.

VIVACQUA, M. Manual Stop Sex 100. Biological Sterilization Method. 2010. Disponível em: http://www.stopsex100.com.br/download/Manual_V1.0.pdf. Acessado em: 16/10/2015.

VON BORELL. E.; BAUMGARTNER, J.; GIERSING, M.; JÄGGIN, N.; PRUNIER, A.; TUYTTENS, F.A.; EDWARDS, S.A. Animal welfare implications of surgical castration and its alternatives in pigs. **Animal**, v. 3, p. 1488-1496, 2009.

WANG, M. Neutersol: intratesticular injection induces sterility in dogs. 2002. In: Internacional Symposium on Non-Surgical Contraceptive Methods for Pet Population Control, Callaway Gardens, GA. ACC&C, p. 62-65, 2002.

WATANABE, M. J.; THOMASSIAN, A.; NETO, F. J. T.; ALVES, A. L. G.; HUSSNI, C. A.; NICOLETTI, J. L. M. Alterações do pH, da PO₂ e da PCO₂ arteriais e da concentração de lactato sanguíneo de cavalos da raça Árabe durante exercício em esteira de alta velocidade. **Arquivo Revista Brasileira de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 3, p. 320-326, 2006.

ARTIGO 01

Efeitos da papaína associada ao ácido láctico na função testicular e epididimal em ratos da
linhagem Wistar

Papain the effects associated with lactic acid in testicular and epididymal function in Wistar
rats

J.L.S. LIMA^{1*}; F.R.N.F. BURGOS¹; D.V. LIMA²; J. EVÊNCIO-NETO¹

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco – Recife/PE

²Universidade Federal de Viçosa – Minas Gerais

*lete_lira@hotmail.com

RESUMO

O bloqueio reprodutivo no macho pode ser obtido por meio de intervenção cirúrgica, terapia hormonal ou da utilização de agentes esclerosantes. Tendo em vista a necessidade de novos estudos de métodos menos invasivos e de baixo custo para o controle da população de cães e gatos, objetivou-se avaliar a ação da papaína associada ao ácido láctico na função testicular e epididimal em ratos Wistar adultos. 25 ratos Wistar aos 90 dias de idade foram divididos em 5 grupos. Os animais dos grupos G1, G2, G3, G4 receberam 0,1mL da solução papaína e ácido láctico por via intratesticular e foram eutanasiados respectivamente 24h, 48h, 72h e 96h após o tratamento, os do grupo controle "GC" receberam 0,1mL de solução fisiológica a 0,9% e foram eutanasiados 24h após o tratamento. Foram coletados testículos, epidídimos, rins e fígado para avaliação histopatológica e sangue para análise dos níveis de testosterona. O acompanhamento diário dos animais não evidenciou comprometimento comportamental, apresentando atos fisiológicos dentro da normalidade, tais como, alimentação, defecação, micção e socialização em grupo. Não foram observadas alterações renais e hepáticas no estudo histopatológico desses órgãos, sugerindo ser uma solução de efeito apenas local. Já nos testículos e epidídimos as alterações foram caracterizadas por infiltrado inflamatório, vacuolização citoplasmática e necrose de células germinativas. Sobre os níveis de testosterona os grupos G1 e G2 apresentaram valores abaixo de 1 ng / mL, mostrando que a solução papaína ácido láctico foi eficaz em diminuir os níveis da testosterona até 48 horas após o tratamento. Tendo em vista os achados histopatológicos no testículo e epidídimo, a solução papaína e ácido láctico não afetaram o rim e o fígado, não comprometendo o comportamento

dos animais. A solução mostrou ser capaz de reduzir a atividade das células de Leydig nas primeiras 48 horas, porém são necessários novos estudos sobre os efeitos prolongados e na aplicação de maiores concentrações desta solução em ratos Wistar.

Palavras-Chave: Substâncias esclerosantes, esterilização química, testículo, epidídimo, Ratos.

ABSTRACT

The male reproductive block can be obtained by surgery, hormone therapy or the use of sclerosing agents. Given the need for new less invasive study methods of low cost and to control the population of dogs and cats, this study aimed to evaluate the effect of papain associated with lactic acid in testicular and epididymal function in rats. Twenty-five rats at 90 days of age were divided into 5 groups. The animals of the groups G1, G2, G3, G4 received 0.1 mL of papain solution and lactic acid intratesticularly and they were euthanized respectively 24h, 48h, 72h and 96h after treatment, and the animals of the control group "CG" received 0.1ml of saline and they were euthanized 24h after treatment. Fragments of testis, epididymis, kidney, and liver were collected for histopathological evaluation and blood serum for analysis of testosterone. The daily monitoring of the animals showed no behavioral impairment, with physiological acts within the normal range, such as food, defecation, urination and socializing in groups. kidney and liver changes were observed in the histopathological study of these organs, suggesting that only a local effect solution. Already in the testis and epididymis changes were characterized by inflammatory infiltrate, vacuolation and necrosis of germ cells. On testosterone levels G1 and G2 had values below 1 ng / ml, which technique proves to be effective in reducing testosterone levels within 48 hours. Given the histopathological findings in the testis and epididymis, papain and lactic acid solution did not affect the kidney and liver, not compromising the animals' behavior. The solution was shown to reduce the activity of the Leydig cells within 48 hours, but further studies are needed on the long-term effects and the application of higher concentrations of this solution in rats and so that they can cover all species.

Keywords: sclerosing substances, chemical sterilization, testis, epididymis, Rats.

INTRODUÇÃO

A superpopulação de cães e gatos é um problema social e mundial (Faggella e Aronsohn, 1993). A busca de alternativas mais econômicas e com uma proposta mais “rápida” pode ser uma grande opção para essa medida. Uma vez que, os meios de controle para machos, incluem método cirúrgico (vasectomia e orquiectomia) e não cirúrgico, como a terapia hormonal, controle imunológico e químico (Fagundes, 2011).

No caso cirúrgico, os órgãos reprodutivos são extraídos (Johnston et al., 2001) e sendo de suma importância que ocorra um pré e pós-cirúrgico específico (Slatter, 2003). Nos métodos não cirúrgicos, são utilizadas substâncias que inibem processos da função reprodutiva (disfunção do órgão copulador) ou que impedem que gametas viáveis sejam produzidos. Nos últimos anos estudos relacionados ao bem estar animal vem buscando alternativas menos invasivas, com isso a busca por métodos não cirúrgicos são mais procurados, principalmente pelo custo e benefício (Lopes e Silva, 2014).

A castração química à base de princípios ativos naturais (ácido lático e papaína) tem como efeito uma ação esclerosante, ou seja, uma vez em contato com o tecido testicular, induz, inicialmente, um processo inflamatório e, posteriormente uma substituição deste por tecido conjuntivo fibroso. Esta técnica promove a eliminação da síntese testicular de testosterona, não requerendo cirurgia (Vivacqua, 2010), não sendo necessário o uso de outros medicamentos e não ocorre perda de peso. Soma-se a essas vantagens, o fato de a prática ser humana e ecologicamente correta, pois não provoca dor nos animais tratados (Lima, 2014).

A castração química utilizando a solução papaína e ácido lático quando administrada em grandes concentrações (5 mL, 10 mL e 15 mL com 5, 10 e 20 meses de idade respectivamente) em bovinos, mostrou a rápida recuperação pós aplicação, ganho de peso, azoospermia e redução dos níveis de testosterona, confirmando o efeito esterilizante da solução (Lima, 2014).

A castração cirúrgica apesar de ser um método bastante invasivo, ainda é o meio mais utilizado de esterilização permanente em cães e gatos. Em contra partida a castração química, é um método eficaz de esterilização que deve ser mais bem exposto entre os tutores e assim aumentar os números de procedimentos realizados. Portanto, este trabalho teve como o objetivo avaliar os efeitos da solução papaína associada ao ácido lático na função testicular e epididimal em ratos Wistar adultos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 25 ratos Wistar (*Rattus Norvegicus albinus*) adultos com 90 dias de vida, provenientes do Biotério do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Os animais foram acondicionados em gaiolas de policarbonato forradas com maravalha de pinus, mantidos na temperatura de 22 ± 2 °C controlada por ar condicionado ligado 24 horas por dia, expostos a fotoperíodo de 12 horas de luz (400 Lux) por 12 horas de escuro e com acesso a ração balanceada e água *ad libitum*. Procedimentos padrão do Biotério do DMFA-UFRPE. Os procedimentos experimentais envolvendo a utilização de animais teve aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFRPE (Licença N° 063/20125).

Os animais foram escolhidos e distribuídos em grupos de 5 indivíduos por amostragem não probabilística de conveniência. Formando os grupos: G1 – aplicação intratesticular de 0,1 mL da solução papaína e ácido láctico com coleta do material biológico 24 horas após o tratamento; G2 - aplicação intratesticular de 0,1 mL da solução papaína e ácido láctico com coleta do material biológico 48 horas após o tratamento; G3 - aplicação intratesticular de 0,1 mL da solução papaína e ácido láctico com coleta do material biológico 72 horas após o tratamento; G4 - aplicação intratesticular de 0,1 mL da solução papaína e ácido láctico com coleta do material biológico 96 horas após o tratamento; GC – grupo controle; aplicação intratesticular 0,1 mL da solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9 % com coleta do material biológico 24h após o tratamento.

Para o procedimento experimental, os animais foram submetidos à anestesia dissociativa com cloridrato de xilazina a 2% e cloridrato de cetamina por via intraperitoneal. Os animais foram posicionados em decúbito dorsal e realizou-se assepsia dos testículos com álcool etílico a 70%. Com auxílio de seringa de 1 ml e agulha com calibre de 12,7 mm x 0,3 mm foi injetado 0,1 mL por via intratesticular da solução a base de papaína e ácido láctico na região dorsocranial dos testículos (Fig.1). Após o procedimento, os animais foram transferidos para as caixas e mantidos em temperatura controlada até a recuperação anestésica.



Figura 1. Rato da linhagem Wistar pertencente ao grupo G2 recebendo aplicação intratesticular de 0,5 mL da solução papaína e ácido láctico (Lima, 2016).

As características clínicas dos animais foram observadas durante todo o período do experimento, considerando o estado geral dos animais (comportamento social e individual), edema e hiperemia no testículo.

Após o término do período experimental, os animais sob aprofundamento anestésico, para coleta de materiais. Após a coleta do sangue, realizou-se perfusão intracardíaca com solução fisiológica de NaCl a 0,9%, acrescida de formol tamponado a 10% com fosfato de sódio monobásico e fosfato de sódio dibásico em pH 7,2. Foram coletados os testículos, epidídimos, rins e fígado, fixados em solução de formol neutro tamponado a 10% e destinados à confecção de lâminas histológicas. Os fragmentos foram submetidos à clivagem e processados, os fragmentos foram armazenados em etanol a 70%. Em seguida foram desidratado com etanol crescente, diafanizados em butanol, impregnados e incluídos em Paraplast. Posteriormente os blocos foram cortados em micrótomo tipo Minot (Leica®) a 5µm e corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) e Ácido Periódico de Schiff (PAS), de acordo com a técnica de rotina do laboratório de Histologia do DMFA-UFRPE.

As amostras de sangue foram colhidas por punção no seio venoso (confluência das veias cavas). Em seguida, o soro foi separado por centrifugação e embaladas em Eppendorf (dois por amostra). As amostras foram mantidas em refrigeração a -20 °C. A dosagem foi realizada pelo método de enzima-imuno-ensaio (ELISA - Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) através do Testosterone ELISA kit (Enzo Life Sciences®), com a leitura de absorvância a 405 nm com correção entre 570 nm e 590 nm, contendo placa sensibilizada. Análise realizada seguindo protocolo do Testosterone ELISA kit (Enzo Life Sciences®).

Procedeu-se a leitura no leitor de microplacas (Biochorm Anthos 2010[®], n/s 501365). Procedimentos realizados no Laboratório de Histologia do DMFA/UFRPE.

Foi realizado um estudo descritivo que tem como fundamento analisar o perfil dos casos observados e o teste de Student para comparação de médias dos níveis da testosterona sérica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais dos grupos que receberam a solução papaína e ácido láctico por via intratesticular apresentaram processos inflamatórios com presença de infiltrado leucocitário, corroborando os achados de Jana e Samanta (2011), que observaram infiltrados leucocitários no testículo de gatos tratados com solução de cloreto de cálcio por via intratesticular. Aplicação de agente esterilizante por via intratesticular promove uma resposta imunológica causada pela ruptura da barreira hematotesticular com consequente inflamação local e liberação de antígenos testiculares (Wang, 2002).

Nos grupos G1 e G3, foram evidenciados túbulos seminíferos com vacuolização extensiva (fig. 2A) a leve (fig. 2B) no epitélio germinativo, semelhante os relatos de Macedo (2013), que evidenciou vacuolização do epitélio germinativo em ratos tratados com solução de gluconato de zinco por via intratesticular. O método de determinação do grau de perda de epitélio germinativo (GPEG) fornece uma das melhores estimativas da função espermatogênica dos testículos (Palasz et al., 1994), sendo que o dano pode variar de vacuolização leve do epitélio seminífero com perda de algumas células germinativas, a uma vacuolização extensiva com grave perda de células germinais (Romero et al., 1998).

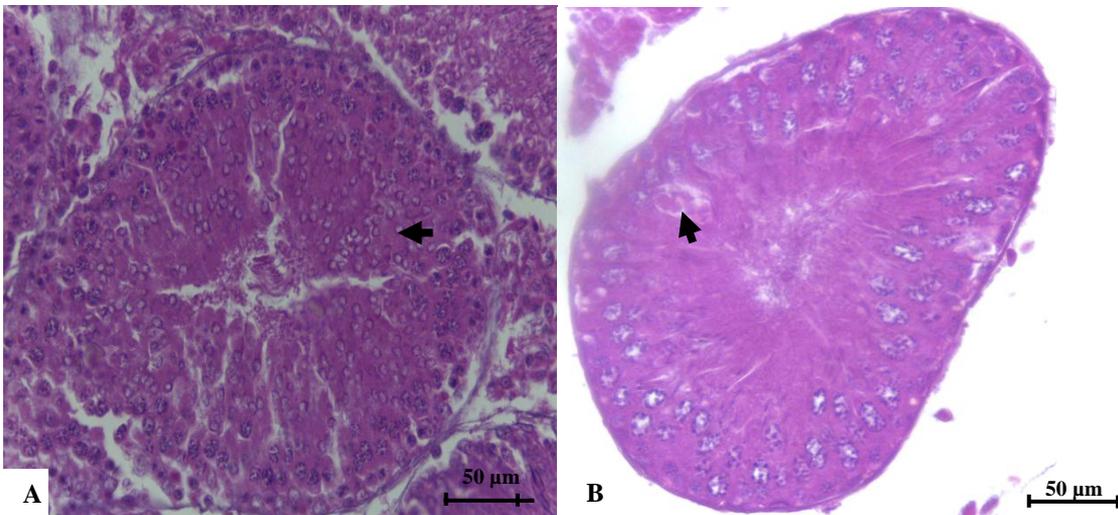
Quando a degeneração é mais avançada às áreas afetadas são extensas e as alterações degenerativas aparecem em precursores de espermátides, caracterizando-se por vacuolização citoplasmática (Jubb et al., 1993). Quando em acúmulo nas células, o ácido láctico torna o pH muito baixo gerando disfunções metabólicas que podem variar de intensidade de acordo com a permanência dessa condição, gerando lesões celulares (Kuipers, 1998).

Os Grupos G2, G3 e G4 apresentaram nos túbulos seminíferos células gigantes multinucleadas, degeneração e necrose do epitélio germinativo com perda de seu arranjo celular (fig. 2C) e intenso infiltrado inflamatório polimorfonuclear neutrofílico peritubular (fig. 2D) e intratubular (fig. 2E) que são alterações sugestivas de processo inflamatório, contudo o grupo GC apresentou sua estrutura preservada com a presença das células

germinativas (fig. 2F). A degeneração do epitélio seminífero constitui a causa mais comum e importante de declínio da fertilidade em machos das espécies domésticas. Em etapas precoces ocorrem falha na maturação de espermatozoides e degeneração de espermátides, produzindo células gigantes multinucleadas (Jubb et al., 1993).

Sobre os achados histopatológicos do epidídimo nos animais dos grupos G1, G2, G3 e G4, apresentaram infiltrados inflamatórios mononucleares e células espermáticas necróticas, sugerindo uma inflamação do epidídimo (fig. 3B). Agentes infecciosos com tropismo pelo parênquima testicular e que causam intensa reação inflamatória, ocasionam orquite e epididimite com presença de células germinativas de descamação na luz do ducto (Silva, 2005). Os animais do grupo G4 apresentaram neovascularização e hiperplasia de células musculares lisas (fig. 3A).

Nos epidídimos, a descamação do epitélio tubular epididimário somada à presença de vacúolos citoplasmáticos (fig. 3C e 3D) e núcleos picnóticos, caracterizaram degeneração epididimária, que ocorreram em casos associados à epididimite.



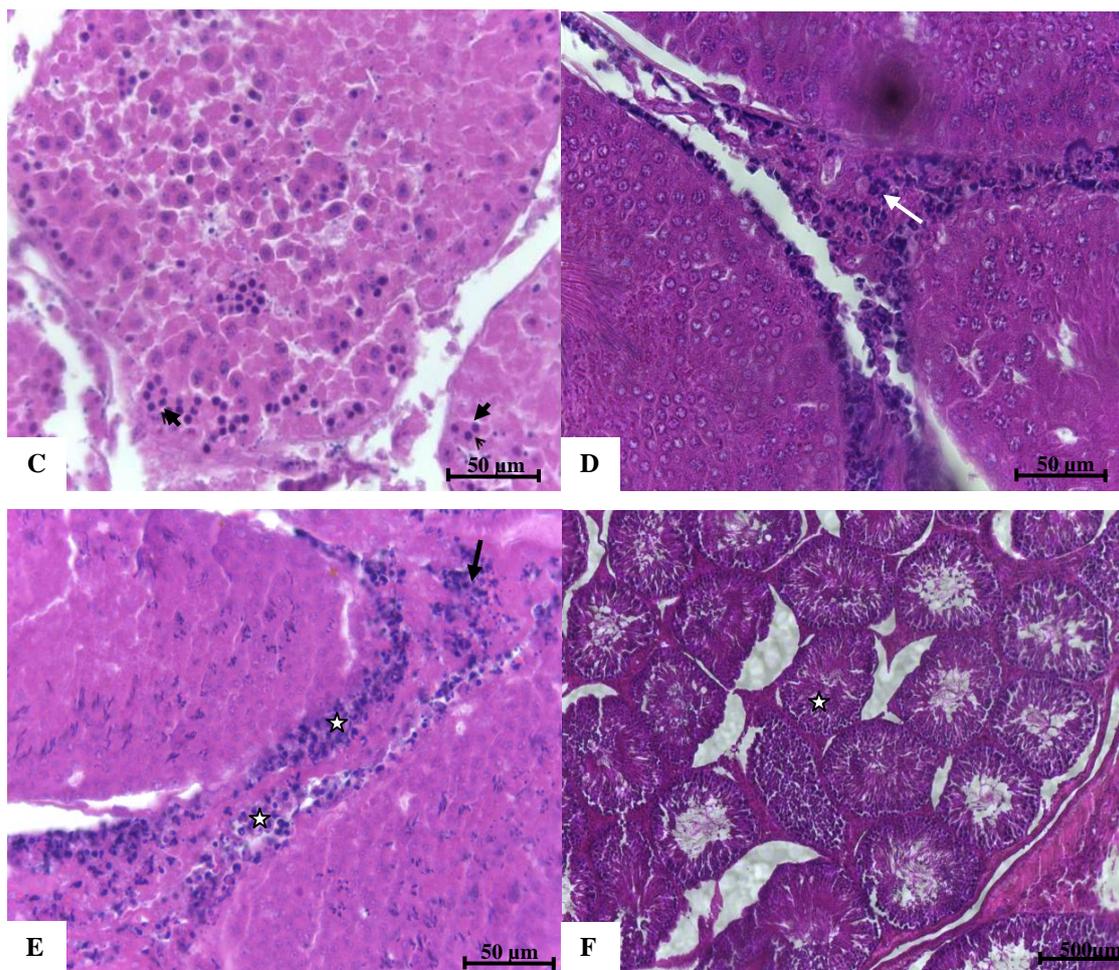


Figura 2: **A.** Grupo G1 evidenciando vacuolização extensiva (seta) (HE); **B.** Grupo G3 apresentando túbulo seminífero com vacuolização leve (seta) (HE); **C.** Grupo G3 degeneração testicular acentuada. Células “gigantes” multinucleadas no interior do túbulo seminífero (ponta da seta) (HE); **D.** Grupo G2 infiltrado inflamatório polimorfonuclear neutrofílico peritubular (seta) (HE); **E.** Grupo G4 Infiltrado inflamatório mononuclear intertubular (estrela) e intratubular (estrela) (HE); **F.** Grupo GC evidenciando estrutura preservada dos túbulos seminíferos (estrela) (HE).

A orquite e a epididimite são afecções que frequentemente estão associadas devido à proximidade anatômica e a continuidade do sistema de ductos dos testículos e epidídimos. Processos infecciosos ou inflamatórios que atingem uma das estruturas vão provavelmente estender-se a outra. Podem resultar também da destruição imunomediada do tecido testicular e epididimário que desencadeia um processo inflamatório (Feldman e Nelson, 2004). Neste caso, a reação inflamatória pode ter sido desencadeada pela ação da solução papaína e ácido láctico. Portanto, reação inflamatória testicular pode ter influenciado diretamente as funções do epidídimo.

Em nossos resultados não foram observadas alterações histopatológicas nos rins e no fígado dos animais de todos os grupos (fig. 3E e 3F). De uma forma geral, a ação da solução

papaína e ácido láctico teve os seus efeitos restritos ao parênquima testicular, sem ação sistêmica, portanto não afetaram os outros órgãos e o estado geral dos animais.

Essa ausência de efeitos colaterais adversos no presente estudo divergem dos achados de Pate et al. (1970), que avaliou a ação do cloreto de cádmio aplicado por via intratesticular em bezerros, e observou que os animais apresentaram edema testicular e necrose no local da aplicação, além de apresentarem efeitos sistêmicos adversos como a diminuição do apetite e peso.

Sobre a análise dos níveis da testosterona, os animais dos grupos G1 (24h) e G2 (48 h), após aplicação da solução papaína e ácido láctico, apresentaram níveis de testosterona abaixo de 1 ng/mL, indicando ação efetiva da solução papaína e ácido láctico na diminuição dos níveis de testosterona. Estes resultados corroboram com relatos de Lima (2014) que observou diminuição dos níveis de testosterona em bovinos tratados com injeção intratesticular da solução papaína e ácido láctico e com os de Nishimura et al. (1992) quando afirmam que após a esterilização de cães com injeção intratesticular de ácido láctico puro houve um decréscimo da concentração de testosterona. Hart (1997) cita que a testosterona é metabolizada tão rapidamente, que oito horas após a castração, a concentração da mesma é reduzida a valores não detectáveis.

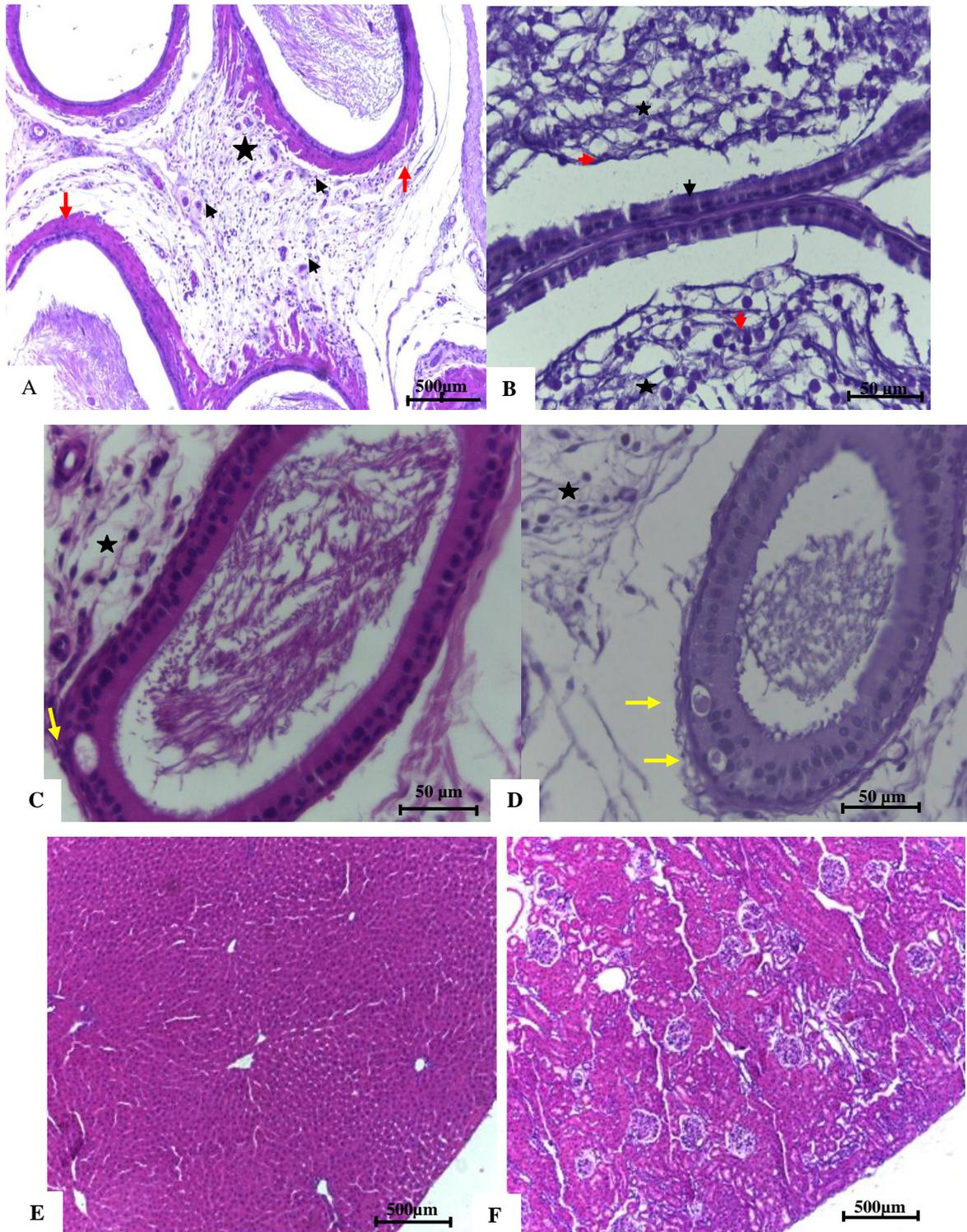


Figura 3: **A.** Fotomicrografia do epidídimo de rato do grupo G4 evidenciando infiltrado inflamatório mononuclear (estrela), neovascularização (ponta de seta preta) e hiperplasia de células musculares lisas (seta vermelha) (HE); **B.** Fotomicrografia do grupo G4 evidenciando células claras no ducto epididimário (ponta de seta preta) e no interior do ducto massa eosinofílica constituída por espermatozoides degenerados com *debris celulares* (ponta de seta vermelha) e células espermáticas necróticas (estrela) (PAS); **C e D.** Fotomicrografia de Epidídimo de ratos dos grupos G3 (HE) e G4 (PAS) respectivamente, evidenciando

vacuolização citoplasmática do ducto epididimário (seta) e infiltrado inflamatório mononuclear entre os ductos (estrela); **E.** Grupo G2 fragmento de fígado (HE); **F.** Grupo G1 fragmento de rim evidenciando região cortical (HE).

Segundo Silva (1999), os animais que apresentam níveis séricos de testosterona abaixo de 1 ng/mL são considerados impúberes. Já Assumpção et al. (2013), afirma que concentrações séricas de testosterona iguais ou superiores a 1ng/mL, como ocorreu no grupo G4 do nosso experimento (média de 1,18ng/mL), são consideradas marcadoras do início da puberdade, uma vez que indica atividade das células de Leydig, responsáveis pela produção de andrógenos, principalmente da testosterona.

A ocorrência de não ter tido uma redução mais significativa dos níveis da testosterona dos ratos submetidos à castração química, deve-se provavelmente pelo fato da síntese da testosterona ter ocorrido em alguma área do parênquima testicular que não tenham sofrido ação da solução papaína e ácido láctico, no entanto, não deve ser considerada suficiente para expressão da libido.

A testosterona está relacionada ao comportamento sexual dos machos (Pacheco e Quirino, 2010) e o que se deseja no processo da castração química, além da infertilidade é a redução do comportamento sexual e agressividade (Oliveira et al., 2011). Neste experimento, a solução papaína e ácido láctico foi capaz de reduzir a atividade das células de Leydig nas primeiras 48 horas.

CONCLUSÕES

Baseados em nossos resultados podemos concluir que:

1. A aplicação de 0,1 mL da solução papaína e ácido láctico em ratos Wistar aos 90 dias de idade, reduz a ação das células de Leydig, diminuindo os níveis séricos de testosterona até 48 horas após o tratamento, não sendo eficiente após esse tempo;
2. A histopatologia mostra que a ação da solução papaína e ácido láctico ficou restrita ao parênquima testicular e epididimal, não afetando o rim e o fígado e não comprometeu o comportamento dos animais;

REFERÊNCIAS

ASSUMPCÃO, T.I.; SOUZA, M.A. ALBERTON, C. *et al.* Características reprodutivas de machos bovinos da raça Nelore da fase pré-púbere à maturidade sexual. *Arq. Bras. Med. Vet.*, v.20, n.3, p.148-154, jul./set. 2013.

FAGGELLA, A.M.; ARONSOHN, M.G. Anesthetic techniques for neutering 6 to 14 week year's old kittens. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.202, p.56-62, 1993.

FAGUNDES, A.K.F. *Esterilização de gatos com injeção intratesticular de gluconato de zinco. Estudo clínico, bioquímico, histológico e hormonal.* 2011. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal), Universidade Federal Rural de Pernambuco.

FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. Disorders of the testes and epidymides. In: FELDMAN, E.C & NELSON, R.W. (Ed). *Canine and feline endocrinology and reproduction.* St. Louis Missouri: WB Saunders Co, 2004, cap.29, p.961-977.

HART, B.L. Effects of neutering and spaying on the behavior of dogs and cats: questios and answers about practical concerns. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.198, p.1204-1205, 1997.

HUHTANIEMI, I.; TOPPARI, J. Hormonal regulation of the testis. In: MARTINEZ-GARCIA, F.; REGADERA, J. (Ed). *Male Reproduction: a multidisciplinary overview.* Spain: Churchill Communications Europe; España, 1998, cap.7, p.67-80.

JANA, K.; SAMANTA, P.K. Clinical evaluation of non surgical sterilization of male cats with single intratesticular injection of calcium chloride. *Vet. Res*, v.7, p.1-15, 2011.

JOHNSTON, S.D.; KUSTRIZ, M.V.R.; OLSON, P.N.S. *Canine and Feline Theriogenology*, 592p. 2001

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

KUIPERS, H. Training and overtraining: an introduction. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, v.30, n.7, p.1137-9, 1998.

LIMA, D.V. *Castração de machos bovinos em diferentes idades utilizando ácido láctico e papaína*. 2014. 59f. Tese (Pós-Graduação em Zootecnia). Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

LOPES, K.R.F.; SILVA, A.R. Castração química de mamíferos machos: revisão. *Ver. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.38, n.1, p.49-53, jan./mar. 2014.

MACÊDO, S.R.B. *Avaliação do efeito esterilizante de solução à base de gluconato de zinco em testículos de ratos wistar em associação com anti-inflamatórios e antiálgicos*. 2013. 65f. Dissertação. (Pós-Graduação em Biociência Animal). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife,

NISHIMURA, N; KAWATE, N; SAWADA, T. Chemical castration by single intra testicular injection of lactic acid in rats and dogs. *J. Reprod. Dev.*, v. 38, p. 263- 266, 1992.

OLIVEIRA, C.A.A. *Aspectos imunológicos da torção testicular: trabalho experimental em ratos*. 1999. 60p. Tese. Universidade Federal da Bahia: Faculdade de Medicina, Salvador.

OLIVEIRA, E.C.S.; SILVA, F.L.M.; MULLER, P.M. *et al.* Castração química de caninos e felinos por meio de injeção intratesticular de Gluconato de zinco – quebrando paradigmas. *Ver. Bra. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.262-265, abr./jun, 2011.

PACHECO, A.; QUIRINO, C.R. Comportamento sexual em ovinos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v.34, n.2, p.87-97, 2010.

PALASZ, A.T.; CATES, W.F.; BARTH, A.D. *et al.* The relationship between scrotal circumference and quantitative testicular traits in yearling beef bulls. *Theriogenology.*, v.42, p.715, 1994.

PATE, F.M; JOHNSON A.D; MILLER W.J. Testicular changes in calves following injection with cadmium choride; University of Georgia, Athens. *J. Anim. Sci.*, p.559-64; 1970.

ROMERO, A.U.; MADRID-BURY, N.; MÁRQUEZ, J.R. *et al.* Histopatológica y morfometría de testículos en toros mestizos 5/8 holstein y 5/8 pardo suizo a lós 24 meses de edad. *Rev. Cien.*, FCV-LUZ, v.8, n.2, p.163-176, 1998.

SILVA, A.E & UNANIAN, M. M. Aspectos relacionados à precocidade sexual em bovinos machos da raça Nelore, PO. *Braz. Arch. Biol. Techn.*, Curitiba, v.42 n.4, 1999.

SILVA, L.B.G. Lesões anatomo-histopatológica em cobaias (*Cavia porcellus*), experimentalmente infectadas pela *Burkholderia mallei*. *Arq. Instit. Biol.*, São Paulo, v.72, n.1, p.23-28, 2005.

SLATTER, D.H. Textbook of small animal surgery. [s.l.]: Elsevier Health Sciences, 2003. v.2.

VIVACQUA, M. Manual Stop Sex 100. Biological Sterilization Method. 2010. Disponível em: http://www.stopsex100.com.br/download/Manual_V1.0.pdf. Acessado em: 16/10/2015.

WANG, M. Neutersol: intratesticular injection induces sterility in dogs. In: Internacional Symposium on Non-Surgical Contraceptive Methods for Pet Population Control, Callaway Gardens, GA. ACC&C, p.62-65, 2002

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aplicação de 0,1 mL da solução papaína e ácido láctico em ratos Wistar aos 90 dias de idade, não foi eficiente para reduzir os níveis de testosterona após 72 horas de aplicação, pois ela retornou ao nível acima de 1 ng/mL em 96 horas, deixando a castração química não eficiente. Portanto a solução mostrou ser capaz de reduzir a atividade das células de Leydig nas primeiras 48 horas.

Tendo em vista os achados histopatológicos no testículo e epidídimo, onde os efeitos foram restritos ao parênquima testicular e epididimal, a solução papaína e ácido láctico não afetou o rim e o fígado e não comprometeu o comportamento dos animais, que apresentaram normalidade dos atos fisiológicos como alimentação, defecação e micção, assim como socialização com o grupo. Diante dos nossos resultados concluímos que são necessários novos estudos com a utilização da solução papaína e ácido láctico em outras concentrações e por períodos maiores visando a obtenção de efeitos mais prolongados e buscando a eficiência desta solução na castração química de ratos e de outras espécies.

“Mesmo que a minha mente e o meu corpo enfraqueçam, Deus é a minha força, ele é tudo o que eu sempre preciso.”

Salmos 73,26