

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

ANA CECILIA RICARTE DOS SANTOS

**Aplicação de fotohipertermia testicular mediada por nanopartículas
para indução de infertilidade em gatos**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

BRASÍLIA – DF
2025

ANA CECILIA RICARTE DOS SANTOS

**Aplicação de fotohipertermia testicular mediada por nanopartículas
para indução de infertilidade em gatos**

Dissertação de mestrado apresentado
ao PROGRAMA DE PÓS –
GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL,
da Universidade de Brasília, como parte
dos requisitos necessários à obtenção
do título de Mestre em biologia animal.
Orientador: Prof.^a Dr.^a Carolina Madeira
Lucci

BRASÍLIA – DF

2025

ANA CECILIA RICARTE DOS SANTOS

**Aplicação de fotohipertermia testicular mediada por nanopartículas
para indução de infertilidade em gatos**

Dissertação de mestrado apresentado
ao PROGRAMA DE PÓS –
GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL,
da Universidade de Brasília, como parte
dos requisitos necessários à obtenção
do título de Mestre em biologia animal.
Orientador: Prof.^a Dr.^a Carolina Madeira
Lucci

Brasília, ____ de _____ de 2025

BANCA EXAMINADORA

À minha mãe, pelo amor silencioso e pela força inabalável que sempre me sustentaram. Seu trabalho árduo, seu cuidado e sua torcida discreta, mas constante, me deram o incentivo necessário para seguir em frente. Dedico também, à minha esposa, Julia, por todo amor e parceria durante esses anos. Essa conquista também é de vocês.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer à Deus pelo dom da vida e todas as conquistas que me é permitido viver. Agradecer também à todas as inspirações do alto, por nunca me deixarem vacilar nos momentos difíceis.

Agradeço imensamente à professora Dr^a Carolina, por toda paciência e dedicação durante esses dois anos. Por todos os “insights” e todo amor colocado à educação de qualidade de seus orientados. Aos colegas que fiz durante a trajetória: Bruna, Louiz, Juliana, Fernanda, Rafaela, André, obrigada por deixarem meu trabalho mais leve e alegre. Agradeço também a toda solicitude durante a realização do trabalho, em que me auxiliaram em pontos que não estava tão segura.

À FAPDF e CAPES pelo financiamento da pesquisa científica, que possibilitou a execução deste trabalho. À Premier, pelo fornecimento de alimentos de qualidade para os pacientes que ficaram sob nossa tutela durante todo experimento.

Quero agradecer à minha mãe, Teresa, por nunca desistir de mim e sempre me incentivar, desde muito pequena, aos estudos. À minha avó, Terezinha, por sempre ser pilar em nossas vidas, figura central e muito importante, que nunca deixou que nada faltasse em nossas vidas.

À minha esposa, minha parceira de vida, Julia, por cada palavra de incentivo, cada gesto de carinho e cada momento compartilhado. Sua presença tornou tudo mais leve e significativo. Obrigada por acreditar em mim, mesmo quando eu duvidei, e por ser minha fortaleza nos dias difíceis. Este trabalho é também um reflexo do amor e apoio que recebo de você todos os dias. Meu muito obrigada.

À Ana Bárbara, vulgo “Babu”, por estar presente em diversas fases da minha vida, todas muito importantes: fosse me orientando, rindo ou puxando a orelha. Muito obrigada por tudo.

Por último, mas não menos importante, à Donatella. Minha cachorrinha, que deu sentido e alegria à nossas vidas, de uma forma tão leve e bagunçada! Obrigada por me inspirar a sempre buscar o melhor para todos aqueles que não podem pedir ajuda, mas que agradecem com cada olhar.

Resumo

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da fotohipertermia testicular mediada por nanopartículas (FHT) como alternativa minimamente invasiva para indução de infertilidade em gatos. Onze animais machos, jovens e não castrados, foram submetidos à injeção intratesticular de nanopartículas de ferrita de manganês (MnFe_2O_4), subsequentemente ativadas por luz de 808 nm, com o objetivo de elevar a temperatura local a 43–45 °C por 15 minutos. Os animais foram alocados em três grupos experimentais de acordo com o tempo decorrido até a orquiectomia: G7 (7 dias), G28 (28 dias) e G49 (49 dias). O protocolo anestésico incluiu dexmedetomidina, cetamina e propofol, com manutenção em isoflurano e, para o pós-operatório, a analgesia foi complementada com meloxicam e dipirona dose única imediatamente após o procedimento. A avaliação de dor foi conduzida nas primeiras 48 horas por meio da Feline Grimace Scale, sem necessidade de resgate analgésico em nenhum dos indivíduos. As mensurações testiculares revelaram redução progressiva no volume e no peso dos testículos ao longo do tempo. A análise histopatológica dos testículos evidenciou um quadro evolutivo de dano tecidual ao longo do tempo e não foram encontrados espermatozoides nos epidídimos de nenhum animal. Os resultados demonstram que a FHT testicular é capaz de promover infertilidade de forma eficaz a curto prazo, com mínima manifestação de dor e sem efeitos adversos. A técnica apresenta potencial como alternativa viável à castração cirúrgica em programas de controle populacional felino, embora estudos adicionais sejam necessários para a avaliação dos efeitos a longo prazo e a validação do método em maior escala.

Palavras-chaves: Hipertermia testicular, Nanopartícula, Túbulos seminíferos, Feline Grimace Scale

Abstract

The present study aimed to evaluate the effects of nanoparticle-mediated testicular photohyperthermia (FHT) as a minimally invasive alternative to induce infertility in cats. Eleven young, intact male cats were subjected to intratesticular injection of manganese ferrite (MnFe_2O_4) nanoparticles, subsequently activated by 808 nm light, with the goal of raising the local temperature to 43–45 °C for 15 minutes. The animals were allocated into three experimental groups according to the time elapsed before orchiectomy: G7 (7 days), G28 (28 days), and G49 (49 days). The anesthetic protocol included dexmedetomidine, ketamine, and propofol, maintained with isoflurane; postoperative analgesia was provided with a single dose of meloxicam and dipyrone. Pain assessment was conducted during the first 48 hours using the Feline Grimace Scale, with no need for rescue analgesia in any of the individuals. Testicular measurements revealed a progressive reduction in testicular volume and weight over time. Histopathological analysis of the testicles showed a progressive pattern of tissue damage over time, and no spermatozoa were found in the epididymis of any animal. The results demonstrate that testicular FHT can effectively induce infertility in the short term, with minimal pain and no adverse effects. The technique shows potential as a viable alternative to surgical castration in feline population control programs, although further studies are needed to assess long-term effects and validate the method on a larger scale.

Keywords: Testicular hyperthermia, Nanoparticle, Seminiferous tubules, Feline Grimace Scale

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Problemática da superpopulação de animais de rua	2
2.2 Resoluções para o controle de aumento populacional.....	3
2.3 Método Castração-Esterilização-Devolução (CED)	4
2.3.1 Anatomofisiologia reprodutiva do gato macho.....	5
2.3.2 Testículos.....	5
2.3.3 Envoltórios testiculares.....	7
2.3.4 Vascularização, drenagem e inervação testicular.....	8
2.3.5 Espermatogênese	8
2.3.6 Epidídimo.....	9
2.3.7 Ducto deferente	10
2.3.8 Glândulas acessórias	10
2.3.9 Pênis e Prepúcio	10
2.4 Termorregulação testicular	11
2.5 Métodos de castração	12
2.5.1 Castração Cirúrgica (Orquiectomia)	12
2.5.2 Castração de criptorquidas.....	13
2.6 Métodos Alternativos à orquiectomia	14
2.6.1 Métodos Químicos.....	14
2.6.2 Métodos Térmicos	17
2.7 Nanotecnologia e hipertermia mediada por nanopartículas	18
3. JUSTIFICATIVA.....	20
4. OBJETIVOS	22
4.1. Objetivo Geral	22
4.2. Objetivos Específicos.....	22
5. METODOLOGIA.....	23
5.1 Animais	23
5.2 Protocolo anestésico.....	23
5.3 Mensuração testicular	24
5.4 Procedimento de fotohipertermia testicular (FHT).....	25
5.5 Delineamento experimental	27

5.6	Avaliação de dor aguda.....	28
5.7	Avaliação testicular pós-procedimento.....	28
5.8	Orquiectomia, mensuração testicular e epididimária.....	29
5.9	Método para estimativa do volume testicular	30
5.10	Avaliação Histopatológica	31
5.11	Análise Estatística.....	32
6.	RESULTADOS	33
6.1	Temperatura testicular durante o procedimento de FHT	33
6.2	Avaliação de dor aguda pós-procedimento	34
6.3	Exames de sangue	35
6.4	Avaliação visual e física dos testículos	36
6.5	Volume testicular.....	38
6.6	Histopatologia testicular e epididimária.....	40
6.7	Anestesia	46
7.	DISCUSSÃO	49
8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

1. INTRODUÇÃO

Os animais em situação de abandono não estão sob controle dos seres humanos, sendo apontados como principal problema associado ao crescimento populacional de animais errantes (TOVO & WILMSEN, 2023). No Brasil, segundo a Organização Mundial de Saúde, são 30 milhões de animais abandonados, dos quais dois terços são cães e um terço, gatos (CATAPAN et al, 2021). Os gatos são predadores natos e podem interferir diretamente na biodiversidade e vida selvagem (KITTS-MORGAN, 2015), transmitir doenças para outros animais ou ainda para o homem (FAO, 2011), sendo, portanto, fonte de forte preocupação para a saúde pública.

A esterilização e castração de cães e gatos é uma medida fundamental para reduzir os impactos das superpopulações de animais de rua. A castração de machos refere-se à retirada completa dos testículos do paciente, chamada orquiectomia (MACPHAIL, 2015).

Entre a década de 80 e meados dos anos 2000, as publicações envolvendo métodos de esterilização de animais machos de forma pouco invasiva aumentaram exponencialmente (MASSEI & MILLER, 2013), e muitas substâncias têm sido aplicadas pela via intratesticular para produzir a “castração química”, como o cloreto de cálcio (LEOCI et al. 2019), glicerol (IMMEGART & WALTER, 2000), gluconato de zinco (VANDERSTICHEL et al, 2015). Da mesma forma, a hipertermia testicular também pode ser uma alternativa para produzir infertilidade de machos. Alguns estudos investigaram o uso de imersões dos testículos em banhos quentes ou o uso de ultrassom como método de castração em ratos (KANTER & AKTAS, 2009; TSURUTA et al, 2012; ANSARI et al, 2020) e cães (LEOCI et al, 2019).

A partir dos anos 2000, a nanotecnologia foi vista como uma nova possibilidade para tratamentos à base de aquecimento, com o uso de nanopartículas capazes de transformar energia eletromagnética em calor (CHERUKURI et al, 2010). Desde então, a hipertermia mediada por nanopartículas tem sido estudada como uma técnica capaz de promover infertilidade em animais machos (JIVAGO et al, 2021).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Problemática da superpopulação de animais de rua

No Brasil, segundo a Organização Mundial de Saúde, são 30 milhões de animais abandonados, dos quais dois terços são cães e um terço, gatos (CATAPAN et al, 2021). Sendo assim, há uma grande necessidade em controlar essas populações, particularmente pelo problema de saúde pública (SALLUM et al., 2000), em que animais abandonados podem transmitir doenças para outros animais ou ainda para o homem (FAO, 2011), causar impactos ambientais e ecológicos irreversíveis por conta da predação descontrolada (KITTS-MORGAN, 2015) ou ainda impactos no bem estar animal, visto que essas populações abandonadas serão expostas à fome, sede, agressões, incertezas e alta taxa de mortalidade (TOVO & WILMSEN, 2023).

Os animais em situação de abandono, errantes, não estão sob controle dos seres humanos, sendo apontados como principal problema associado ao crescimento populacional (TOVO & WILMSEN, 2023). Os animais que não são acostumados com o contato humano, chamados de animais ferais ou ariscos, possuem fortes laços territoriais e, por características do seu ciclo reprodutivo, podem se reproduzir com grande rapidez e gerar dezenas de indivíduos em pouco tempo (MELLO, 2016). Há também aqueles animais que possuem acesso irrestrito à rua, onde há um responsável legal, porém o espaço não oferece barreiras físicas para restringir a saída desses animais, contribuindo também para o aumento populacional de animais de rua (TOVO & WILMSEN, 2023). Geralmente, animais machos nessa situação são problemáticos, já que podem acasalar com fêmeas na rua.

Os gatos são predadores natos e podem interferir diretamente na biodiversidade e vida selvagem (KITTS-MORGAN, 2015). São chamados de predadores “subsidiados”, ou seja, mesmo que seres humanos lhes forneçam comida e água, esses animais ainda preservam o instinto de caça, podendo caçar desde artrópodes e répteis até pequenos mamíferos e aves (KITTS-MORGAN, 2015). Gatos com acesso à rua utilizam em média 0,59 Km² de área para explorar, chamadas de “home range”, ou seja, área que o animal ocupa regularmente para as suas atividades diárias, como alimentação, descanso e

reprodução (BISCHOF et al., 2022). Este comportamento pode influenciar diretamente a biodiversidade local, seja por predação, competição ou contaminação de plantações e nascentes (BISCHOF et al., 2022).

Gatos de vida livre representam um sério problema envolvendo saúde pública, sendo uma fonte abundante de doenças zoonóticas como a raiva, toxoplasmose, larva *migrans* cutânea, esporotricose (GERHOLD & JESSUP, 2012). Dentre essas, a raiva é a mais conhecida por ser uma doença viral grave que afeta o sistema nervoso de animais e seres humanos, quase sempre fatal (VIEIRA, 2022). A prevenção da raiva se dá pela vacinação de populações animais, bem como profilaxia pós exposição para seres humanos que tiverem contato potencial com animais infectados ou suspeitos (GERHOLD & JESSUP, 2012). A falta de programas eficazes de vacinação contra a raiva em gatos livres pode levar a uma maior disseminação do vírus da raiva dentro dessa população (VIEIRA, 2022). Além do mais, gatos de vida livre têm maior probabilidade de entrar em contato com animais selvagens portadores de raiva, como morcegos, aumentando assim o risco de exposição à doença (GERHOLD & JESSUP, 2012).

2.2 Resoluções para o controle de aumento populacional

Para reduzir os impactos na biodiversidade, algumas estratégias podem ser consideradas: educação e conscientização sobre os impactos dos gatos na biodiversidade; alimentação controlada e adoção; guarda responsável e esterilização e castração de cães e gatos (KITTS-MORGAN, 2015). No Brasil, ainda não existe uma política nacional para controle populacional de animais de vida livre, tampouco medidas que incentivem a prática de adoção, sendo designado aos estados e municípios a responsabilidade de planejamento e execução de programas de controle.

A lei nº 13.426 de 30 de março de 2017 trata sobre o controle de natalidade de cães e gatos em todo território nacional, de responsabilidade estadual ou municipal, e estabelece que este deve ser feito mediante a esterilização permanente por cirurgia ou qualquer outro método que garanta eficiência, segurança e bem-estar ao animal (BRASIL, 2017). Sendo assim, sugere-se que Estados e municípios forneçam meios para o controle populacional de cães e gatos, tanto para os animais em situação de abandono

como os que possuem acesso à rua, seja por convênios com clínicas particulares ou por campanhas de castração em massa (HADAD, 2019).

A eutanásia se tornara um método pouco eficiente, mas já foi muito comum no Brasil para controle de populações. Contudo, em 2021 a lei nº 14.228 sancionou a proibição da eliminação de cães e gatos pelos órgãos de controle de zoonoses, canis e afins (BRASIL, 2021), eliminando essa possibilidade. Portanto, uma forma eficaz de promover o controle populacional de animais errantes é evitando a sua procriação. Neste contexto é importante esterilizar fêmeas e machos, e não apenas animais que possuem um responsável, mas também aqueles em situação de rua. Apesar de no geral a preocupação com a castração de fêmeas seja maior, um macho não castrado é capaz de fecundar várias fêmeas. Sendo assim, a esterilização de machos é um ponto importante para o controle dessas populações (FAGUNDES et al, 2014) e o procedimento padrão para este fim é a remoção cirúrgica dos testículos.

2.3 Método Castração-Esterilização-Devolução (CED)

A depender da situação em que se encontra o animal, ou seja, se se tratar de um animal feral, em situação de rua, pode-se adotar o método “Captura-Esterilização-Devolução” (CED), que consiste em, como o nome elucida, capturar o animal, realizar o método de castração escolhido (geralmente métodos cirúrgicos) e, após completa recuperação, devolvê-lo ao ambiente em que foi capturado (BEGALLI, 2020).

O método CED é utilizado desde 1960 na Inglaterra para controlar gatos ferais ou ariscos (MELLO, 2016), descrito pela American Society for the Prevention of Cruelty to Animals (ASPCA) como “estratégia humana, efetiva e financeiramente viável para controle de gatos errantes”. O CED é validado em diversos países e foi associado com uma possível substituição à prática de eutanásia em massa nos Estados Unidos da América (WALLACE & LEVY, 2006). No Brasil, Batista et al. (2015) validaram o método CED para controle populacional de cães errantes em Minas Gerais, mas relatam que isso não é suficiente, sendo necessário campanhas de conscientização para adoção e guarda responsável, no que tange ao controle de doenças zoonóticas e bem-estar animal.

Os gatos submetidos ao procedimento cirúrgico se tornam menos agressivos e suavizam características desagradáveis, como a demarcação de território (MELLO, 2016). Porém, a redução hormonal causada pela castração pode desequilibrar a dinâmica social da colônia felina, tornando os gatos castrados alvos de agressões e exclusão, o que compromete a eficácia e estabilidade do método CED (WOLF et al, 2021). Outro ponto importante é que a técnica de castração cirúrgica se torna problemática do ponto de vista do pós-operatório, em que há necessidade da administração de anti-inflamatórios e analgésicos para controle da dor e limpeza da ferida cirúrgica. Assim, a busca por um procedimento seguro, rápido, pouco oneroso e que promova a infertilidade irreversível e ao mesmo tempo que não possua efeitos colaterais significativos, ainda é necessária (LI et al., 2013).

2.3.1 Anatomofisiologia reprodutiva do gato macho

Os órgãos genitais masculinos estão relacionados com a produção, maturação, transporte e armazenamento dos gametas masculinos. São compostos por um par de testículos, epidídimos, ductos deferentes, uretra e as glândulas acessórias, pênis, escroto e prepúcio (KÖNIG & LIEBICH, 2011).

2.3.2 Testículos

Testículos ou gônadas masculinas (grego *orchis*, do latim *testis*) são responsáveis pela produção dos gametas e hormônios sexuais masculinos. Os testículos passam por um fenômeno denominado “descida testicular” (KÖNIG & LIEBICH, 2011). Trata-se da migração dos testículos da cavidade abdominal para o processo vaginal, onde ficarão encobertos pelo escroto e, caso essa descida não ocorra, em um ou ambos os testículos, o animal é chamado de criptorquida (NELSON & COUTO, 2015). Este processo é de extrema importância nos animais domésticos, pois a localização no escroto reduz a temperatura testicular entre 2 a 4°C em relação à temperatura corporal, para assim ocorrer a espermatogênese (KÖNIG & LIEBICH, 2011).

O testículo (FIGURA 1) é revestido por uma cápsula fibrosa (túnica albugínea) e seu interior é destacado por septos, que evidenciam o parênquima testicular em lóbulos piramidais (JOHNSON, 2022), que ao centro se unem formando o mediastino. O parênquima é composto por: túbulos seminíferos contorcidos, túbulos seminíferos retos, rede testicular e ductos eferentes. A parede dos túbulos seminíferos é formada por células espermato gênicas e células de sustentação (Sertoli) (PINTUS et al, 2021). O tecido intersticial dos testículos é formado por fibroblastos, vasos linfáticos, vasos sanguíneos, e células de Leydig (KÖNIG & LIEBICH, 2011).

As células de Leydig são extremamente importantes para a produção do hormônio esteroide masculino, a testosterona (NUÑEZ-FAVRE, 2012). Durante a puberdade, as células de Leydig apresentam um aspecto poligonal e com núcleos centralizados, de coloração eosinofílica, com citoplasma rico em material lipídico (TSUTSUI, 2012). A produção de testosterona se dá pelo gatilho na liberação do hormônio estimulador de gonadotrofina (GnRH) pelo hipotálamo, seguido de estímulo da hipófise para liberação do hormônio luteinizante (LH). A secreção da testosterona pelas células de Leydig é feita, portanto, pelo gatilho na produção do LH (MESCHER & JUNQUEIRA, 2018).

O parênquima testicular é formado por unidades fundamentais, chamadas túbulos seminíferos e seus respectivos ductos (FIGURA 1). Os túbulos são compostos por um epitélio estratificado que contém, além das células de Sertoli, linhagens em desenvolvimento: espermato gônias, espermato cîtos primários e secundários, espermátides e espermatozoides. As células de Sertoli têm papel importante no metabolismo e suporte físico das células germinativas. Essas células se estendem da membrana basal dos túbulos seminíferos em direção ao lúmen, e uma de suas funções é estabelecer junções oclusivas para formar a barreira hematotesticular (MESCHER & JUNQUEIRA, 2018). Esta barreira faz com que o processo da espermato gênese seja isolado do plasma, proteínas circulantes e nutrientes sistêmicos (JOHNSON, 2022). Conforme a espermato gênese ocorre, a migração adluminal acontece sem comprometer essa barreira. A espermato gênese ocorre desde a membrana basal se deslocando em direção ao lúmen dos túbulos, sempre em contato com as células de Sertoli, de forma que as caudas flagelares das espermátides aparentam como

“tufos” se projetando na região apical das Células de Sertoli (MESCHER & JUNQUEIRA, 2018).

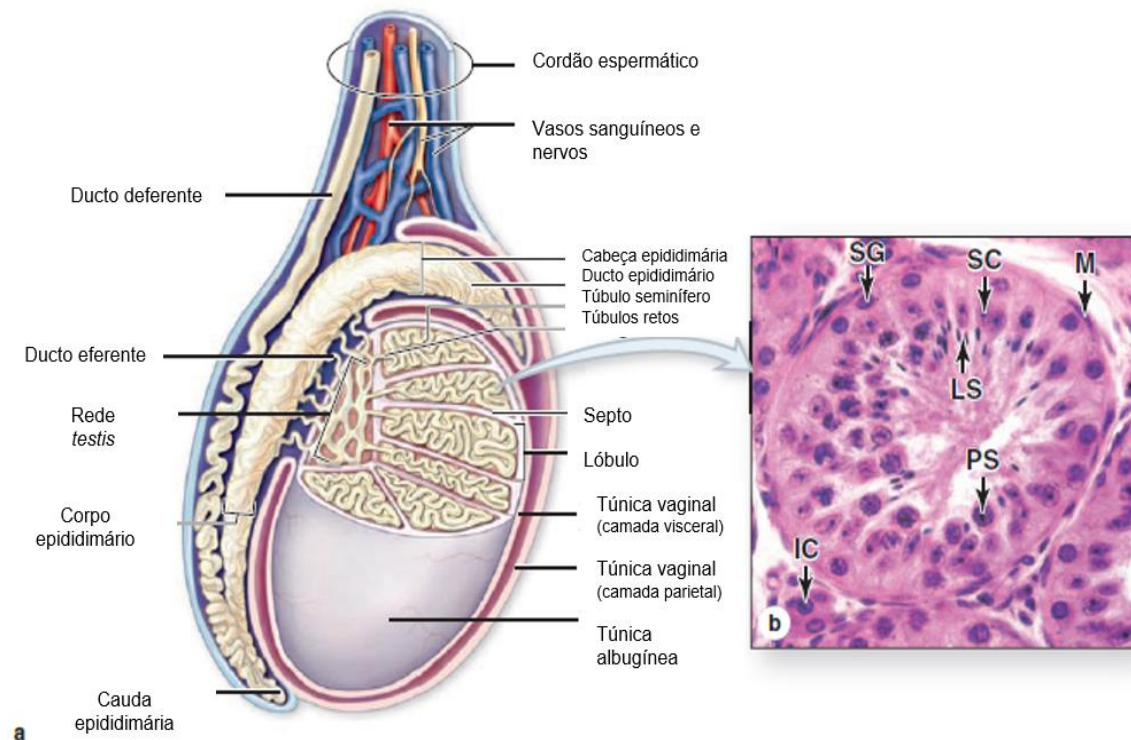


Figura 1: Anatomia e histologia testicular. Imagem adaptada de MESCHER & JUNQUEIRA (2018). Legenda: SG (espermatogônias); SC (células de Sertoli); M (miócito); LS (espermátide tardia); OS (espermátide precoce); IC (espaço intersticial)

2.3.3 Envoltórios testiculares

Os envoltórios testiculares cobrem e moldam o formato dos testículos, sendo eles:

- | | |
|------------------|--|
| Escroto | <ul style="list-style-type: none"> • Pele externa • Túnica Dartos • Fáscia espermática externa de dupla camada • Músculo cremaster |
| Processo vaginal | <ul style="list-style-type: none"> • Fáscia espermática interna |

- Camada parietal

A pele do escroto não costuma apresentar pelos, exceto em gatos. A túnica Dartos é composta por musculatura lisa, capaz de retrain o escroto, auxiliando no controle de temperatura testicular (KÖNIG & LIEBICH, 2011). A fáscia espermática externa desempenha um papel na sustentação e no envolvimento dos órgãos masculinos na região genital. Essa fáscia é uma camada de tecido conjuntivo que envolve e suporta as estruturas adjacentes, incluindo os testículos e o cordão espermático. O músculo cremáster é um “alongamento” do oblíquo interno do abdômen e durante sua contração, aproxima os testículos para a posição inguinal (JOHNSON, 2022). A posição e orientação do escroto varia de acordo com cada espécie e nos gatos é subanal (NUÑEZ-FAVRE, 2022).

2.3.4 Vascularização, drenagem e inervação testicular

O funículo espermático contém a artéria testicular, que se ramifica para abastecer os testículos, epidídimo e uma parte do ducto deferente. As veias testiculares formam um emaranhado de vasos, semelhante a uma malha, ao redor das artérias, chamado “plexo pampineforme”. O plexo, no final se torna uma única veia, a veia testicular que desemboca na veia cava caudal (KÖNIG & LIEBICH, 2011). Esse contato muito próximo entre os vasos, refrigera o sangue arterial que desce para os testículos, contribuindo, também para a termorregulação testicular (MESCHER & JUNQUEIRA, 2018).

Os vasos linfáticos escoam nos linfonodos escrotais ou inguinais, já a inervação é favorecida por ramos ventrais dos nervos lombares, sendo os nervos ilio-hipogástrico, ilioinguinal e genitofemoral os contribuintes dessa inervação (JOHNSON, 2022).

2.3.5 Espermatogênese

Entende-se por espermatogênese um processo organizado e complexo, em que se dá a formação dos gametas sexuais masculinos ou espermatozoides. As unidades elementares para a formação dos espermatozoides são as

espermatogônias e elas passam por divisões mitóticas e meióticas e diferenciação (DIAGONE, 2019).

As linhagens germinativas passam por diversas divisões celulares e alterações, a começar pela periferia dos túbulos seminíferos até serem liberadas no lúmen. As “células tronco” ou espermatogônias passam por diversas mitoses, dando origem a novas espermatogônias e, ao entrar em meiose, aos espermatócitos primários (PINTUS et al, 2021). Os espermatócitos primários passam por duas divisões celulares consecutivas: meiose I (formação dos espermatócitos secundários) e meiose II (formando das espermatídes haplóides). As espermatídes passam por sucessivas transformações estruturais até se tornarem espermatozoides, como a formação do acrosso, flagelo e perda de maior parte do citoplasma (MESCHER & JUNQUEIRA, 2018). A esse processo dá-se o nome de “espermiogênese”.

No final da espermiogênese, os espermatozoides são liberados na luz dos túbulos e migram para o epidídimo, onde ocorre a maturação espermática. No gato, a produção espermática diária, por testículo é de 15.8 ± 2.5 milhões de espermatozoides (KUTZLER, 2022). O tempo da espermatogênese varia entre as espécies, sendo 35, 49 e 74 dias, respectivamente nos camundongos, ratos e humanos (ALDAHAN & STANTON, 2021b). Nos gatos, a espermatogênese completa dura cerca de 47 dias e inicia-se aos 5 meses de vida, enquanto a maturidade sexual é atingida entre os 7 e 12 meses (PINTUS et al., 2021).

2.3.6 Epidídimo

O epidídimo está firmemente anexado ao testículo, sendo dividido em três segmentos: cabeça, corpo e cauda (JOHNSON et al., 2022). No ducto do epidídimo os espermatozoides produzidos no testículo são amadurecidos, restos celulares desnecessários sofrem absorção por fagocitose e os espermatozoides recebem nutrientes. A parede do ducto epididimário é composta por uma camada de músculo liso, tecido conjuntivo e um epitélio formado por células alongadas, pseudoestratificadas, de formato colunar e com a presença de cílios na região apical (MESCHER & JUNQUEIRA, 2018). Os espermatozoides ficam armazenados na cauda do epidídimo até o momento da ejaculação e, neste

momento, ocorre a contração peristáltica da musculatura lisa. No gato o epidídimo tem em média 4 a 6 metros de comprimento (KÖNIG & LIEBICH, 2011).

2.3.7 Ducto deferente

O ducto deferente é a continuação direta do ducto epididimário, apresentando uma aparência mais retilínea (NUÑEZ-FAVRE et al, 2012). Apresenta parede muscular grossa e lúmen relativamente pequeno (MESCHER & JUNQUEIRA, 2018), saindo da região caudal epididimária, ascende dentro do funículo espermático, desembocando na região da uretra prostática (JOHNSON et al, 2022). Ao passar por dentro dessa estrutura, o ducto deferente ganha a cavidade abdominal, até desembocar na uretra proximal do colículo seminal (KÖNIG & LIEBICH, 2011).

2.3.8 Glândulas acessórias

As glândulas estão na extensão pélvica da uretra, e no gato estão presentes as glândulas bulbouretrais e próstata. A próstata no gato é uma glândula que produz parte do líquido seminal que ajuda na nutrição e transporte dos espermatozoides (KÖNIG & LIEBICH, 2011).

A glândula bulbouretral nos gatos é uma glândula pequena e esférica, localizadas ao redor da uretra e secretam um fluido claro durante a excitação sexual. Esse fluido tem a função de limpar a uretra e neutralizar a acidez, criando um ambiente mais propício para a passagem dos espermatozoides (JOHNSON et al, 2022).

2.3.9 Pênis e Prepúcio

O pênis se origina no arco isquiático, em formado de duas colunas, que convergem para formar a raiz do pênis, corpo do pênis e glândula do pênis. O pênis do gato tem uma orientação caudal, quando em repouso e sua glândula possui espículas queratinizadas que irradiam para todas as direções durante a excitação (TSUTSUI, 2012). A castração reduz o tamanho dessas espículas, que

são testosterona-dependentes (NELSON & COUTO, 2015). O prepúcio é uma bainha que cobre o pênis durante o repouso (JOHNSON et al, 2022).

2.4 Termorregulação testicular

Na maioria dos mamíferos, a espermatogênese não pode ocorrer a temperaturas corporais (37-39°C) (MESCHER & JUNQUEIRA, 2018). O microambiente favorável para que ocorra a produção de gametas masculinos depende de temperaturas discretamente mais baixas que a temperatura corporal, cerca de 2 a 4°C (KÖNIG & LIEBICH, 2011). Na maioria dos mamíferos, os testículos descem da cavidade abdominal em direção ao escroto durante o desenvolvimento neonatal (ALDAHAN & STANTON, 2021a), favorecendo uma menor temperatura do órgão. Além disso, há várias estruturas e mecanismos responsáveis por manter a temperatura testicular na faixa adequada à produção dos espermatozoides.

Um primeiro mecanismo, realizado pelo plexo pampiniforme, formado de uma extensa e complexa rede de vasos que carregam sangue venoso, contendo o sangue resfriado do testículo. Ao manter contato direto com as artérias que chegam trazendo sangue oxigenado, ocorre uma troca de calor, favorecendo o resfriamento do sangue arterial (MESCHER & JUNQUEIRA, 2018).

O escroto também contém uma quantidade significativa de glândulas sudoríparas, em algumas espécies, que favorecem, também, essa redução de temperatura, além de ter pouca gordura subcutânea (ALDAHAN & STANTON, 2021b). Porém, cães e gatos tendem a ter uma quantidade reduzida dessas glândulas ao longo do corpo (MESCHER & JUNQUEIRA, 2018).

Um terceiro mecanismo, a túnica Dartos é capaz de contrair ou distender a pele do escroto, diminuindo ou aumentando a área de superfície para troca de calor com o meio ambiente. Seguindo a mesma lógica, o músculo cremaster move os testículos, aproximando ou distanciando da cavidade abdominal, permitindo assim o controle da temperatura testicular (KÖNIG & LIEBICH, 2011), sendo pouco desenvolvido em gatos (KUTZLER, 2022). Na exposição ao frio, esse mecanismo permite a contração de ambas as estruturas, diminuindo a área de superfície e aproximando os testículos da cavidade abdominal, permitindo o

seu discreto aquecimento. Além disso, aumenta-se a rugosidade da pele do escroto, fazendo com que a temperatura não se dissipe, mantendo a temperatura testicular (PHAM & SCHULTZ, 2021). Porém, quando o testículo é aquecido, é quase que impossível dissipar o calor, seja pela troca de calor venosa ou pelo afastamento dos testículos da cavidade abdominal, sendo esse método, portanto, bastante limitado (NUÑES e al, 2022).

Diversos estudos relatam reduções na espermatogênese ou ainda aumento no número de defeitos espermáticos quando a temperatura testicular aumenta. Tanto em bovinos (KASTELIC et al., 1996) como em roedores (SETCHELL ET AL., 1998), o aumento da temperatura testicular para próximo de 40 °C por períodos variados proporcionou redução na produção de espermatozoides e aumento de defeitos morfológicos, confirmando a importância da temperatura no microambiente testicular para que ocorra a espermatogênese de forma perfeita.

2.5 Métodos de castração

2.5.1 Castração Cirúrgica (Orquiectomia)

A castração refere-se à retirada completa dos testículos do paciente, chamada orquiectomia (MACPHAIL, 2015). A partir desse procedimento, o animal não será mais capaz de copular, tampouco reproduzir, ou seja, gerar descendentes. Pode ser utilizada uma variedade de técnicas e abordagens cirúrgicas, variando geralmente entre as espécies.

Todos os animais submetidos à orquiectomia devem passar por uma avaliação clínica veterinária, coleta de sangue para realização de hemogramas e bioquímicos, exames de imagem, urinálise, dentre outros para avaliar a condição clínica que se encontra o paciente. O exame físico é indispensável para avaliar o tamanho, simetria, textura dos testículos, escroto, pênis e prepúcio (NELSON & COUTO, 2015).

Para realizar procedimentos cirúrgicos é importante que o paciente esteja devidamente anestesiado e com analgesia suficiente para reduzir os efeitos deletérios da nocicepção (TRANQUILLI et al, 2004). As medicações pré-anestésicas, como fenotiazínicos, benzodiazepínicos, opioides e agonistas alfa

2 adrenérgicos, são comumente utilizadas para promover tranquilização, sedação e analgesia preventiva no período pré-operatório. A combinação de fármacos de classes farmacológicas distintas, geralmente em doses baixas ou intermediárias, são capazes de promover boa resposta sedativa e analgésica, reduzindo efeitos colaterais de doses maiores, usadas isoladamente. Para as cirurgias de castração de gatos machos, é possível realizar o bloqueio intratesticular utilizando anestésico local, como a lidocaína sem vasoconstrictor, para bloquear a transmissão da via nociceptiva, complementando, assim, a analgesia transoperatória (MORAES et al, 2013). Trata-se da administração do anestésico, após preparo cirúrgico da região testicular, pela via intratesticular, utilizando agulha de insulina (13x45), na dose de 3mg/kg por testículo (MORAES et al, 2013).

A castração nos cães pode ser feita pela abordagem pré-escrotal ou perineal, sendo a pré-escrotal a mais comum. Nos gatos, a abordagem testicular é a mais comum, onde é feita uma incisão de 1 cm acima de cada testículo no final do escroto no sentido crânio caudal (MACPHAIL, 2015). Em seguida, é realizada uma incisão na túnica vaginal, exteriorizando o testículo. Com o dígito, é possível separar o ligamento caudal do epidídimo da túnica vaginal, liberando o cordão espermático. É feita então uma ligadura no cordão espermático com fio absorvível ou remoção do ducto deferente com os vasos. É feita uma transecção do cordão e verificação se há hemorragias e o segundo testículo é retirado da mesma forma. A incisão escrotal pode cicatrizar por segunda intenção (MACPHAIL, 2015).

2.5.2 Castração de criptorquidas

O criptorquidismo é uma condição genética, congênita em que ocorre uma falha na descida testicular para o interior do escroto, sendo assim, um ou ambos os testículos podem ficar na cavidade abdominal ou, comumente, no anel inguinal. Cães e gatos são considerados criptorquidas se ambos os testículos não estiverem na bolsa escrotal até os 6 meses de idade (MACPHAIL, 2015).

Os testículos criptorquidas são menores, moles e disformes, e por estarem localizados na cavidade abdominal, podem sofrer influências da temperatura corporal, interferindo na espermatogênese (MACPHAIL, 2015). O

testículo criptorquida ainda produz testosterona normalmente, aumentando o risco de torção testicular, neoplasias e alterações comportamentais e reprodutivas (VILLALOBOS-GOMEZ et al, 2023). Caso o testículo esteja na região inguinal, é possível palpar e realizar a incisão no local de sua palpação (NELSON & COUTO, 2015). Contudo, quando o testículo se encontra na cavidade abdominal, é necessário realizar exames de imagem para melhor planejamento cirúrgico, sendo necessário a celiotomia exploratória para retirada cirúrgica do testículo (MACPHAIL, 2015).

2.6 Métodos Alternativos à orquiectomia

2.6.1 Métodos Químicos

Injeções intratesticulares de substâncias que promovam esterilidade têm sido objeto de estudos por pelo menos seis décadas. As publicações envolvendo métodos de esterilização de animais machos de forma pouco invasiva aumentaram exponencialmente (MASSEI & MILLER, 2013), e muitas substâncias têm sido aplicadas para produzir a “castração química” como o cloreto de cálcio (LEOCI et al. 2019) e gluconato de zinco aplicados pela via intratesticular (FAGUNDES et al. 2014). O objetivo principal dos métodos químicos é induzir azoospermia e reduzir a androgênese, associada a poucos efeitos colaterais (locais e sistêmicos), não ser tóxico para o organismo e que a esterilização tenha carácter duradouro, ou seja, que a espermatogênese não seja retomada com o passar do tempo. A maioria das substâncias utilizadas para castração química em gatos machos ainda estão sob pesquisa e desenvolvimento, não estando disponíveis para castrações químicas em massa.

O gluconato de zinco é, dentre os métodos químicos, o que ganhou maior reconhecimento, sendo aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) em 2003 para uso em cães filhotes. FAGUNDES et al, (2014) investigaram o potencial uso do gluconato de zinco como abordagem contraceptiva para gatos machos. O estudo envolve a injeção intratesticular de gluconato de zinco, e os resultados mostraram alterações histopatológicas e ultraestruturais nos testículos dos gatos tratados, incluindo atrofia e dilatação dos túbulos seminíferos, diminuição do número de células germinativas e espermatogênese

incompleta. Além disso, observou-se redução significativa no diâmetro dos túbulos seminíferos, na altura epitelial e na área tubular. Esses resultados sugerem que o gluconato de zinco pode ter potencial como método contraceptivo para gatos machos, mas também levantam questões sobre possíveis efeitos adversos que não são citados no trabalho, tampouco é mencionado se os efeitos são duradouros ou não.

O gluconato de zinco tem formulações próprias para injeção intratesticular, produzidas e comercializadas por diversas empresas: Ark Sciences®, Zeuterin (aprovado, em 2015, pelo Food and Drug Administration - FDA) e o TestoBlock (BioRelease Technologies, USA) nos Estados Unidos e pela EsterilSol®, nos países latino-americanos. Essas formulações foram utilizadas de forma *off label* em gatos e cães adultos, ou seja, ainda sem aprovação pelos órgãos fiscalizadores.

Vanderstichel et al. (2015) apresentam um estudo sobre os efeitos da esterilização cirúrgica e química em cães machos, utilizando gluconato de zinco neutralizado com arginina (EsterilSol™). Ao se comparar as duas técnicas, cirúrgica e química, a esterilização cirúrgica reduziu significativamente os níveis de testosterona, enquanto a esterilização química não teve um efeito significativo.

Outra substância que tem sido bastante estudada como quimioesterilizante é o cloreto de cálcio (CaCl_2). O cloreto de cálcio promove esterilização por dois mecanismos: via intratesticular promove edema, necrose, evoluindo para degeneração dos túbulos seminíferos e fibrose e pela produção de radicais livres que culminam na peroxidação e destruição das estruturas celulares (JANA et al, 2005). A injeção intratesticular de CaCl_2 é bem tolerada e pouco desconforto é notado após a administração, sendo a lambertura da área observada nas primeiras 24 horas pós-tratamento (JANA et al, 2011). Ao contrário do gluconato de zinco, não há formulações comerciais disponíveis para compra, sendo o veículo mais recomendado o álcool ou a lidocaína (GOLDEN, 2014). PARANZINI et al (2018) descrevem um estudo realizado em gatos machos, no qual foi administrada uma injeção intratesticular de cloreto de cálcio a 20% com 0,5% de DMSO que resultou em azoospermia (ausência de espermatozoides no sêmen) em todos os gatos avaliados após 80 dias da injeção, sem efeitos colaterais, aparentemente de carácter duradouro. De acordo

com o estudo, não foram observados sinais clínicos locais de reação inflamatória, como dor, vermelhidão, calor ou inchaço, e o procedimento também não afetou adversamente os parâmetros fisiológicos e o bem-estar dos animais. Leoci et al (2019) utilizaram o cloreto de cálcio associado ao etanol 95% pela via intratesticular e intraepididimária em cães. Os cães apresentaram azoospermia e redução do comportamento sexual na presença de uma cadela no cio e da agressividade em relação aos membros da equipe de pesquisa. A esterilidade foi confirmada em todos os 148 cães no estudo e não foram relatados efeitos colaterais como edema inflamatório marcado nos testículos ou febre pós procedimento. Contudo, há um questionamento sobre a avaliação subjetiva da dor desses animais. Os autores também relatam que a esterilização foi temporária, pois os animais foram avaliados apenas por 9 meses após o procedimento, não sendo possível, segundo o trabalho, extrapolar para uma esterilidade duradoura.

O glicerol também já foi testado como método de castração química em cães, macacos e ratos (WIEBE, 1989) influenciando diretamente na produção de testosterona e azoospermia. A injeção intratesticular de glicerol em macacos (WIEBE, 1989) foi capaz de promover azoospermia, em contraste do que aconteceu em cães (IMMEGART & WALTER, 2000). Madbouly et al (2021) mostraram azoospermia em gatos, após injeção intratesticular de glicerol 70%, num volume de 1ml por testículo e queda na concentração sérica de testosterona. Contudo, os animais foram avaliados em curto prazo (3 semanas), não sendo possível confirmar a esterilização de forma duradoura.

O sucesso da castração química parece estar associado ao volume, veículo e concentração do agente utilizado (GOLDEN, 2014). Jana et al (2011) utilizou um volume de 0,2 a 0,25 ml/ testículo e o maior volume foi associado com maior sucesso. Nesse estudo, este volume associado com uma alta concentração do CaCl_2 causou necrose de todo parênquima. Madbouly et al (2021) utilizaram o glicerol como agente esterilizante e observaram que em menores volumes, de 0,5ml bilateral, foi capaz de causar apenas necrose focal, enquanto em volumes maiores, 1 ml bilateral de glicerol 70%, a necrose foi difusa, sendo o parênquima substituído por tecido fibroso.

2.6.2 Métodos Térmicos

A hipertermia também pode ser uma alternativa para produzir infertilidade de machos. A espermatogênese e maturação espermática dependem de temperaturas mais baixas que a temperatura corporal para ser bem-sucedida (ZHANG et al, 2019). Desde a década de 1970, pesquisadores tentam entender o mecanismo da infertilidade causada pelas temperaturas elevadas, mas sabe-se que a hipertermia é capaz de promover rápida degeneração do epitélio seminífero e comprometer a espermatogênese (FAHIM et al, 1975).

Diversos estudos relatam o uso do método de aquecimento testicular em animais experimentais para compreender os efeitos do calor, como por exemplo: aumento da temperatura ambiental; insulação no cordão espermático ou no próprio escroto; criptorquidismo induzido para retornar um ou ambos os testículos para cavidade abdominal; imersão em água quente e exposição à radiação de micro-ondas (ALDAHMAN et al, 2021a). Estudos mais recentes utilizaram imersões em banhos quentes ou ultrassom como forma de induzir infertilidade em ratos (KANTER & AKTAS, 2009; TSURUTA et al, 2012; ANSARI et al, 2020) e cães (LEOCI et al, 2019). Contudo, os métodos são reversíveis. Ziaepour et al. (2021) apresentam um estudo sobre os efeitos da hipertermia escrotal crônica na saúde testicular e fertilidade masculina em camundongos. Os animais foram expostos a uma temperatura de 43°C ou 34°C por 20 minutos a cada dois dias durante cinco semanas. Como resultado, mostraram que a exposição à hipertermia escrotal crônica levou à azoospermia e danos significativos ao tecido testicular dos camundongos, mas não revelam se o método promove esterilização permanente.

A partir dos anos 2000, a nanotecnologia forneceu novas possibilidades para tratamentos à base de aquecimento, com o uso de nanopartículas capazes de transformar energia eletromagnética em calor (CHERUKURI et al, 2010). Desde então, a hipertermia mediada por nanopartículas tem sido estudada como uma técnica capaz de promover infertilidade em animais machos (JIVAGO et al, 2021).

2.7 Nanotecnologia e hipertermia mediada por nanopartículas

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, define nanotecnologia como o entendimento e controle da matéria em dimensões nanométricas, um a 100 nanômetros. Um nanômetro equivale a um bilionésimo de metro. Os nanomateriais podem ter diversas aplicabilidades, como o diagnóstico e tratamento de diversas doenças (SEO et al, 2006) e pode ser uma alternativa inteligente para a castração de machos de forma irreversível. Por exemplo, sabe-se que partículas de prata são conhecidas por promoverem efeitos tóxicos na espermatogênese e, partindo disso, no estudo de Brito et al (2020), foram avaliados os efeitos da injeção intratesticular com nanopartículas de prata (AgNPs) em ratos. Observou-se severa redução de motilidade e número de espermatozoides morfolologicamente normais 7 dias após aplicação. Porém, os efeitos não foram duradouros, e a espermatogênese reiniciava-se com 14 dias após a aplicação e estava normal com 56 dias.

Sabe-se que a hipertermia também pode ser uma alternativa para produzir infertilidade de machos e controle de populações animais visto que a espermatogênese e maturação espermática dependem de temperaturas mais baixas que a temperatura corporal para ser bem-sucedida (ZHANG et al, 2019). Somando a clara influência da hipertermia na espermatogênese e a nanotecnologia, Li et al. (2013) descreveram, em um modelo utilizando camundongos, em que injetaram pela via intratesticular nanobastões de ouro e submeteram os testículos a irradiações próximas da infravermelha, mensurando o índice de fertilidade de acordo com o número de filhotes gerados a partir da interação de machos tratados com fêmeas no cio. Quando submetidos a maiores temperaturas intratesticulares (45°C) os índices de fertilidade foram zerados com 7 dias após aplicação e não houve recuperação da fertilidade observada 60 dias após o tratamento, ou seja, a curto prazo. Os dados mostram que o sucesso do experimento se deu pela combinação entre a nanopartícula e uma onda infravermelha de baixa intensidade, garantindo baixa toxicidade e poucos efeitos colaterais.

Um segundo trabalho, também em camundongos (LIU et al., 2015) utilizando desta vez, nanofolhas de tungstênio, injetadas via intratesticular, com irradiação acima de 980nm obteve resultados satisfatórios no contexto infertilidade. O estudo não menciona se a esterilização foi alcançada em 100% dos animais. No entanto, os resultados indicaram que a administração das nanolâminas de óxido de tungstênio e a irradiação com luz levaram a uma perda quase total dos testículos em camundongos, sugerindo uma alta eficácia na esterilização masculina. No trabalho de Jivago et al (2021), a utilização de nanopartículas magnéticas que promovem hipertermia mostrou-se efetiva em ratos. Neste trabalho os pacientes receberam uma única aplicação intratesticular da nanopartícula magnética e, foram submetidos a um campo magnético externo por 15 minutos, atingindo a temperatura testicular de 45°C, sendo suficiente para que ocorresse a substituição do parênquima por tecido estromal, mostrando que o procedimento pode causar uma infertilidade irreversível. Coimbra et al. (2023) avaliaram o potencial de injeções intratesticulares de nanopartículas de ouro como uma ferramenta de esterilização em ratos. Os resultados indicaram que os animais tratados apresentaram aumento do fluxo sanguíneo testicular, anormalidades histológicas nos testículos, estresse oxidativo e diminuição da fertilidade masculina. Além disso, a prole dos animais tratados apresentou placentas menos eficientes e mais leves. Contudo, para obter esses resultados, foram necessárias duas aplicações da nanopartícula, num intervalo de 7 dias, sendo que o índice de fertilidade caiu em apenas 20% com alto risco de filhotes com anomalias genéticas e não houve caráter duradouro da nanocastração.

3. JUSTIFICATIVA

O método cirúrgico apresenta problemas logísticos em se tratando de animais não domiciliados ou ainda ferais em que manter esses pacientes em ambiente hospitalar pode se tornar um problema devido ao pós-operatório, principalmente no que se refere ao controle da dor e limpeza da ferida cirúrgica. Os métodos químicos, por sua vez, não demonstraram serem definitivos ou ainda dependerem de mais de uma aplicação para o sucesso (VANDERSTICHEL et al, 2015; JANA et al, 2011; PARANZINI et al, 2018)

A partir do sucesso das terapias utilizando nanopartículas e calor gerado por campos eletromagnéticos em ratos (JIVAGO et al., 2021), a perspectiva da ciência, em relação às outras espécies domésticas de interesse, aumenta. Os gatos são o segundo grupo de animais mais comuns como animais de estimação no Brasil e a segunda espécie mais abandonada nas ruas, oferecendo risco à saúde pública e ao meio-ambiente. Há um trabalho em andamento no mesmo laboratório aplicando este método desenvolvido e validado em ratos, dessa vez, em gatos (dados não publicados). Contudo, o aparelho gerador do campo eletromagnético possui alto custo e baixa portabilidade, tornando inviável o transporte do equipamento de um local para outro.

Como alternativa, propomos utilizar um protótipo emissor de ondas eletromagnéticas emitidas pela luz que facilitará o transporte e instalação em qualquer sala ou laboratório. Este protótipo conta com quatro subunidades básicas, sendo elas: driver de LED (responsável por gerar uma corrente elétrica para o LED e possui sistema liga e desliga); termopares (estruturas que ficam encostadas nos testículos e automatizam o processo para ajuste da potência do LED); estrutura para resfriamento (para dissipar o excesso de calor produzido) e um ajuste manual para a altura dos LED's superior e inferior. Esse protótipo já foi utilizado para fotohipertemia mediada por nanopartículas em ratos, obtendo sucesso e foi modificado para adaptar às demandas anatômicas em gatos. Obtendo a efetividade nesta espécie, tem-se como intenção patentear-lo.

Um ponto importante, independente do procedimento a ser utilizado, é a necessidade de que o paciente fique parado durante todo o procedimento, para aplicação da injeção intratesticular e estímulo das ondas eletromagnéticas, sendo assim, necessária uma boa qualidade analgésica associada à anestesia

geral. A anestesia inalatória é utilizada mundialmente para a manutenção do plano anestésico durante procedimentos cirúrgicos ou diagnóstico por imagem (tomografia ou ressonância), sendo uma opção viável para a manutenção anestésica.

Portanto, o modelo proposto neste trabalho é a injeção por via intratesticular de nanopartículas sensíveis a ondas eletromagnéticas emitidas pela luz, promovendo a geração de calor e, desta forma, causar infertilidade em gatos.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Avaliar a eficácia e segurança da fotohipertemia mediada por nanopartículas para esterilização de gatos.

4.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da fotohipertermia mediada por nanopartículas aplicada aos testículos de gatos sobre a morfologia testicular e a produção espermática;
- Verificar o grau de dor e possíveis efeitos colaterais agudos do procedimento de fotohipertermia mediada por nanopartículas aplicada aos testículos de gatos como método de esterilização;
- Testar a qualidade anestésica e analgésica do protocolo escolhido como medicação pré-anestésica e manutenção durante o procedimento;
- Comparar os efeitos da fotohipertermia entre os grupos tratados.

5. METODOLOGIA

5.1 Animais

O trabalho contou com 11 gatos machos, jovens (8 meses a 1 ano de idade), SRD, não castrados. Os animais foram cedidos por protetores ou tutores sem pretensão de manter os animais como mascotes. Todos os animais passaram por um período de adaptação e quarentena (cerca de 7 dias) em uma área de aproximadamente 21 m². Foram realizados exames de sangue para avaliação do estado de saúde geral, pesquisa de parasitas, vacinação antirrábica, bem como vermifugação, e teste para FIV e FeIV. Após o período de adaptação e com a certificação de que todos eram negativos para os exames de FIV e FeIV, os animais eram colocados em contato com os outros animais do estudo, já previamente testados e vacinados. Agora os pacientes contavam com um espaço maior, de cerca de 50m², com enriquecimento ambiental. Durante todo o período em que os animais estiveram sob tutela, tinham acesso a água filtrada e alimentação específica para gatos (ração seca Premier®) *ad libitum*, cuidados diários e acompanhamento veterinário. O projeto segue as diretrizes e normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA e foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília (SEI n. 23106.031588/2023-65). Ao final do experimento, todos os animais foram adotados.

5.2 Protocolo anestésico

Previamente ao procedimento, os animais eram mantidos em jejum alimentar por 12 horas e jejum hídrico de 2h. No dia do experimento (D0), os pacientes foram conduzidos à sala de tratamento e, após contenção física utilizando manejo cat friendly, foram sedados com dexmedetomidina (Dexdomitor®, Zoetis, Brasil) (7 mcg/kg) intramuscular (IM) e cetamina (Ketamina® 10%, Agener União, Brasil) (5 mg/kg) IM. Após 15 minutos os pacientes eram avaliados quanto ao nível de sedação e, se constatado o estado sedativo moderado ou leve, era administrado um repique da medicação,

contendo metade da dose inicial de ambos os fármacos. Porém se constatado estado sedativo profundo, o acesso venoso era realizado, utilizando catéter 24 G ou 22 G em veia periférica (cefálica direita ou esquerda).

O paciente recebia suplementação de oxigênio via máscara facial (fração inspirada aproximadamente em 40%) e, na sequência, administração de propofol (Propovan®, Cristália, Brasil) intravenoso, dose dependente, para realização do procedimento de intubação orotraqueal. Ao administrar o propofol, o paciente apresentava rotação medial de globo ocular, relaxamento de mandíbula, e perda dos reflexos medial e lateral palpebral, bem como reflexo laríngeo, ou seja, sinais de anestesia geral que permitem a intubação orotraqueal. O bloqueio periglótico na região da orofaringe era realizado com lidocaína (Xylestesin Spray® 10%, Cristália, Brasil) cerca de uma borrifada, equivalente a 0,1 ml, sendo realizada a intubação orotraqueal com traqueotubo nº 3,0 ou 3,5, com *cuff* inflado em 12 mmHg. O paciente era então conectado ao circuito anestésico aberto, tipo Baraka, sendo ofertado uma mistura de oxigênio (aproximadamente 2 a 2.5 L/min) e isoflurano (vaporizador calibrado, com concentração alveolar mínima – CAM – de 1,0 a 2,0%).

O paciente era então posicionado em decúbito dorsal e a monitoração trans anestésica colocada, contendo: oxímetro, eletrocardiograma, termômetro esofágico e oscilometria ou Doppler Vascular Pastilha DV 610 para avaliação de pressão arterial não invasiva. Os pacientes eram avaliados quanto ao plano anestésico, sendo necessário mantê-los no estágio 3, planos 2 ou 3 de anestesia, segundo Guedel. A ficha anestésica foi registrada ao longo de todo procedimento, contendo todas as informações de monitoração trans anestésicas, bem como intercorrências.

5.3 Mensuração testicular

Com o paciente em decúbito dorsal e membros pélvicos discretamente tracionadas cranialmente, foi realizada tricotomia da região genital. A largura e comprimento testicular foram mensuradas através de um paquímetro manual e

por ultrassonografia (Mindray DP-6900Vet, Shenzhen Mindray Animal Medical Technology Co., China), utilizando probe linear com frequência de 5-7,5 MHz.

5.4 Procedimento de fotohipertermia testicular (FHT)

Após o preparo e antissepsia com álcool 70%, foi administrado um volume de 0,15 ml pela via intratesticular (IT) da solução contendo a nanopartícula de ferrita de manganês, com 10 *nm* de diâmetro, funcionalizadas com citrato (MnFe_2O_4) sintetizada no Laboratório de Ressonância Magnética Eletrônica do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás (UFG), na concentração de 101,8 NP/ml, em cada testículo. As nanopartículas foram sintetizadas por coprecipitação química a partir de sais de ferro e manganês em meio alcalino, sob agitação constante. O volume intratesticular foi definido a partir do estudo de JIVAGO et al (2021) e dividido em dois pontos, sendo um em região mais cranial do testículo e outro em região mais caudal, levando em consideração se houvesse refluxo da solução para o meio externo (FIGURA 2A). O paciente era então posicionado no aparelho emissor da radiação eletromagnética, que contém dois leds os quais emitem luz no comprimento de onda de 808 nm, próximo ao infravermelho (FIGURA 2B e FIGURA 3). Para evitar aquecimento desigual, o paciente era posicionado de forma que os testículos ficassem no centro do aparelho, com o led centralizado, e de forma equidistante (4-5 cm de distância) dos dois leds.

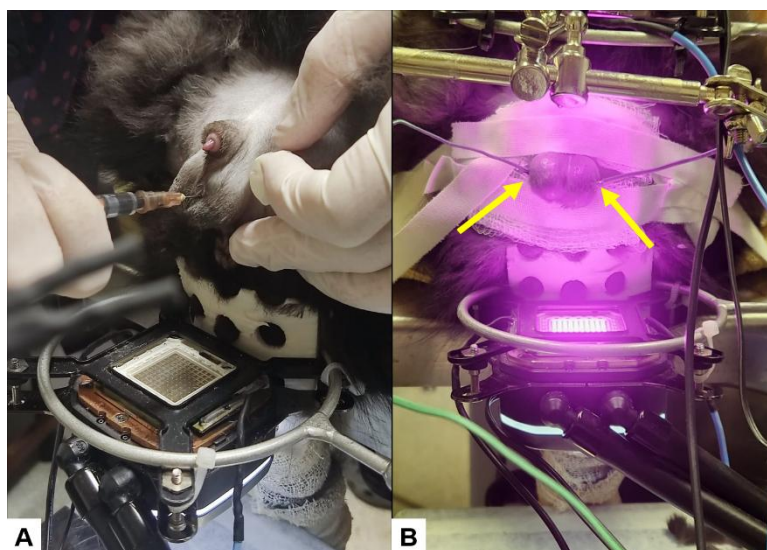


Figura 2: (A) Aplicação da nanopartícula pela via intratesticular. Os testículos eram tricotomizados e feito preparo da assepsia para a injeção. (B) Paciente posicionado na máquina emissora de ondas eletromagnéticas. Os testículos deveriam estar bem alinhados, e com os termopares (setas amarelas) bem encostados na pele testicular.

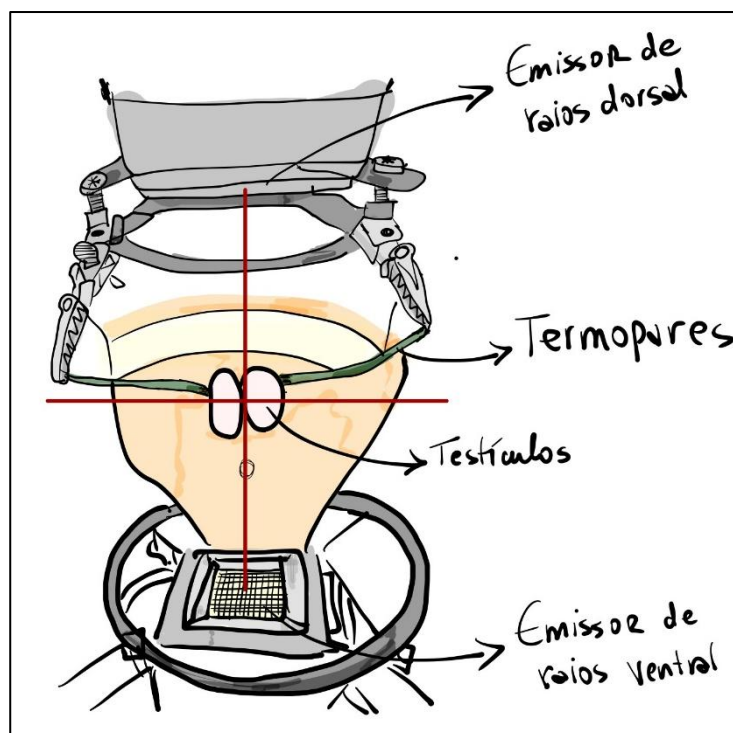


Figura 3: Ilustração do posicionamento do paciente no aparelho emissor de ondas eletromagnéticas. Os emissores de raios deveriam ficar o mais centralizado em relação aos testículos, direito e esquerdo, para evitar aquecimento desigual. O paciente deve ficar em decúbito dorsal com os membros pélvicos levemente projetadas para trás e a cauda se acomoda na parte aberta do aparelho, para baixo.

A temperatura testicular era mensurada durante todo o procedimento, utilizando dois termopares posicionados na superfície lateral (direita e esquerda) do escroto. Uma câmera termográfica (FLIR T-460; Teledyne FLIR, Wilsonville, Oregon, USA) também foi utilizada para registrar a variação da temperatura dos testículos durante o procedimento.

O procedimento se iniciava ligando os LEDs, e quando os testículos alcançassem temperaturas entre 43 e 45° C, deveriam permanecer em platô por 15 minutos (JIVAGO et al, 2021), sem que o animal apresentasse nenhum tipo de movimento. Ao final do procedimento, iniciava-se o retorno anestésico, reduzindo a CAM do isoflurano a 0% e administração do reversor atipamezole (Antisedan®, Zoetis, Brasil) pela via intravenosa.

Os animais submetidos ao procedimento receberam apenas uma dose de 0,1 mg/kg do anti-inflamatório não esteroidal (AINE), meloxicam (Flamavet® 0,2%, Agener União, Brasil) pela via subcutânea (SC) e dipirona, na dose de 25mg/kg (Dipirona Sódica D-500®, Zoetis, Brasil) pela via intravenosa (IV) imediatamente após o procedimento, ou seja, no dia 0 (D0).

5.5 Delineamento experimental

Após o tratamento de fotohipertermia testicular, os animais foram divididos em três grupos, de acordo com o momento em que seriam submetidos à castração cirúrgica e baseado na duração da espermatogênese em gatos (duração total de 49 dias, de acordo com FRANÇA & GODINHO, 2003). Os grupos foram: G7 (n=4) – orquiectomia 7 dias após o procedimento; G28 (n=3) – orquiectomia 28 dias após o procedimento, e G49 (n=4) – orquiectomia 49 dias após o procedimento (FIGURA 4).

Todos os animais, de todos os grupos, foram avaliados quando a dor pós-procedimento, ultrassonografia testicular, aspecto macroscópico e histopatológico de testículos e epidídimos após remoção cirúrgica e avaliação dos espermatozoides do lavado epididimário. Os animais foram continuamente monitorados quanto a qualquer sinal de perda de higidez durante todo o período

experimental e submetidos a exames de sangue (hemograma e bioquímicos antes do procedimento de FHT e da orquiectomia.

5.6 Avaliação de dor aguda

No dia D0, após completa recuperação anestésica, os pacientes eram encaminhados novamente ao gatil, onde tinham acesso à água potável e alimentação. Os pacientes foram avaliados duas, quatro, oito, 24 e 48 horas após o procedimento da fotohipertermia testicular, para avaliação da dor aguda nos pós imediato e possível necessidade de resgate analgésico, por avaliadores aleatórios. Para esta avaliação utilizou-se a escala “Feline Grimace” (WATANABE et al., 2022) disponível online através de um aplicativo. Se um paciente atingisse quatro pontos nessa escala, o resgate analgésico deveria ser feito.

5.7 Avaliação testicular pós-procedimento

Também às duas, quatro, oito, 24 e 48 horas após o procedimento, os testículos eram avaliados, de forma subjetiva, quanto às características visuais como aspecto do escroto e avaliação após palpação dos testículos, como a sensibilidade ao toque, consistência, mobilidade dentro da bolsa, presença ou não de edema subjacente e aumento de volume aparente (QUADRO 1).

Os testículos eram reavaliados semanalmente quanto às características visuais e físicas associados com o exame de imagem de ultrassonografia, para verificar as dimensões testiculares (comprimento e largura) e possíveis alterações na ecogenicidade testicular ou epididimária (FIGURA 4).

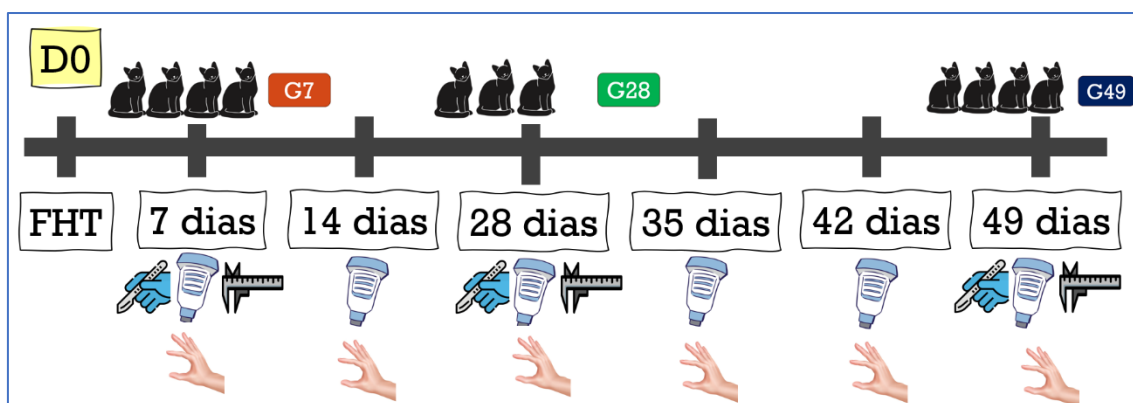


Figura 4: Esquema dos procedimentos realizados ao longo do tempo. Os pacientes do G7 passaram por 2 avaliações; do grupo G28, quatro e do G49, sete avaliações.

Quadro 1: Avaliação visual e física das alterações testiculares e escrotais no período pós procedimento. As avaliações foram feitas duas, quatro, oito, 24 e 48 horas após o procedimento. Autor: Ana Bárbara Rocha (2021).

Avaliação visual	Avaliação física
Alteração do aspecto do escroto? ☐ Sim ☐ Não	Sensibilidade ao toque ☐ Sim ☐ Não ☐
Alteração na pele do escroto? ☐ Sim ☐ Não ☐ Íntegra ☐ Rugosa/Áspera ☐ Úmida ☐ Crostosa ☐ ulcerada	Mobilidade na bolsa ☐ Sim ☐ Não ☐
	Consistência ☐ Flácido ☐ Macio ☐ Fibroelástico ☐ Túrgido ☐ Duro
	Apresenta edema? ☐ Sim ☐ Não

5.8 Orquiectomia, mensuração testicular e epididimária

No dia da castração, os animais foram mantidos em jejum alimentar por 12 horas e jejum hídrico de 2h. Os pacientes do G7 foram castrados sete dias após a fotohipertermia testicular; do G28, 28 dias após e do G49, 49 dias após

o procedimento. Para todos os animais do experimento, o procedimento anestésico foi exatamente igual daquele utilizado no dia da fotohipertermia testicular, ou seja, foram sedados com dexmedetomidina (7mcg/kg, IM) e cetamina (5 mg/kg, IM), acesso venoso era realizado, o paciente recebia suplementação de oxigênio via máscara facial e, na sequência, administração de propofol intravenoso, dose dependente, para realização do procedimento de intubação orotraqueal, sendo então conectado ao circuito anestésico. A monitoração trans anestésica também foi feita utilizando os mesmos recursos do dia do procedimento de fotohipertermia testicular.

Para a cirurgia, a área púbica foi novamente tricotomizada, a largura e o comprimento dos testículos foram medidos com paquímetro ainda dentro da bolsa escrotal, e, a seguir, feita antissepsia local. Os pacientes foram colocados em decúbito dorsal, sendo os membros pélvicos levemente tracionados cranialmente. A cirurgia ocorreu para retirada dos testículos e epidídimos utilizando a técnica testicular.

Os testículos e epidídimos foram separados e pesados em balança de precisão. O comprimento e a largura dos testículos foram novamente mensurados com o auxílio de um paquímetro. As caudas dos epidídimos foram maceradas em solução salina aquecida (36 °C) para coleta de possíveis espermatozóides e a motilidade, morfologia e concentração dos espermatozoides foram avaliadas (BRITO et al, 2020). Ambos os testículos, bem como a cabeça e corpo dos epidídimos, foram fixados em solução de Bouin para posterior análise histopatológica.

5.9 Método para estimativa do volume testicular

Visto que os testículos de gatos apresentam um formato esferoide não perfeito, o volume de cada testículo foi calculado utilizando a média aritmética de duas fórmulas matemáticas (de acordo com Louvandini et al., 2008) a partir das medidas de comprimento e largura obtidos pelo paquímetro e pela ultrassonografia. A primeira fórmula utilizada foi a do prolato esferoide sendo descrita como:

$$\left[\frac{4}{3} \cdot 3,14 \right] \cdot \left[\frac{\text{largura}}{2} \right]^2 \cdot \text{comprimento}$$

A outra fórmula utilizada foi a do volume do cilindro:

$$3,14 \cdot \left[\frac{\text{largura}}{2} \right]^2 \cdot \text{comprimento}$$

5.10 Avaliação Histopatológica

Os testículos e epidídimos dos animais submetidos à FHT testicular, bem como de 2 animais controle (animais de idade semelhante aos tratados submetidos a orquiecotomia eletiva) foram fixados em Bouin. O material foi desidratado em etanol, diafanizado em xilol e embocado em parafina. Os blocos foram seccionados em micrótomo manual (RM2125 RTS, Leica) e cortes (5 mcm) espaçados aleatoriamente foram corados em hematoxilina & eosina para avaliação geral do órgão, e com tricrômico de Masson (HistoKit Tricrômico de Masson, EasyPath Diagnósticos) para caracterizar o tecido conjuntivo.

A avaliação histopatológica dos testículos considerou a análise dos túbulos seminíferos e do espaço intersticial, levando em conta a presença ou ausência de espermatozoides, presença de *debris* celular no interior dos túbulos, presença de células da linhagem germinativa, presença de células de Leydig e de Sertoli, vacuolização, necrose, retração tubular, atrofia tubular, infiltrado inflamatório no interior dos túbulos e no espaço intersticial, e presença de nanopartículas.

Nos epidídimos, avaliou-se a presença de infiltrado inflamatório no interstício e nos túbulos epididimários, formato e aspecto dos túbulos, presença de nanopartículas e de espermatozoides.

As alterações identificadas como degeneração, infiltrado inflamatório e necrose foram classificadas de acordo com a extensão da área afetada, como: leve, moderada, grave, severa e total, conforme especificado no Quadro 2.

Quadro 2: Classificação das lesões observadas na histopatologia de acordo com a extensão de tecido afetada.

Classificação	Área de tecido afetada (%)
Leve	10-25%
Moderada	26-50%
Grave	51-75%
Severa	76-89%
Total	>90%

5.11 Análise Estatística

Todos os dados foram testados para normalidade usando o teste de Shapiro–Wilk. Os dados foram comparados entre os grupos pelos testes ANOVA e Tukey usando o software GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA), com nível mínimo de significância de 5%.

6. RESULTADOS

6.1 Temperatura testicular durante o procedimento de FHT

Os animais apresentaram temperatura testicular média inicial ($T^{\circ}\text{inicial}$) de $30,71 \pm 0,62$ °C, alcançando a temperatura testicular média máxima ($T^{\circ}\text{máx}$) de $43,67 \pm 0,54$ °C, com temperatura média no início da contagem de $42,63 \pm 0,52$ °C, com tempo médio para atingir a temperatura de contagem de 6 minutos e 37 segundos. Um gráfico de temperatura foi gerado para cada paciente, a exemplo da figura 5. As temperaturas da superfície dos testículos foram registradas pelos termopares acoplados ao aparelho do FHT.

Analisando cada animal individualmente, observou-se que 15 dos 22 testículos submetidos ao procedimento não atingiram a temperatura de 45°C. Houve refluxo do fluido injetado em 8 dos 22 testículos. As condições individualizadas do procedimento de FHT testicular podem ser conferidas no QUADRO 3.

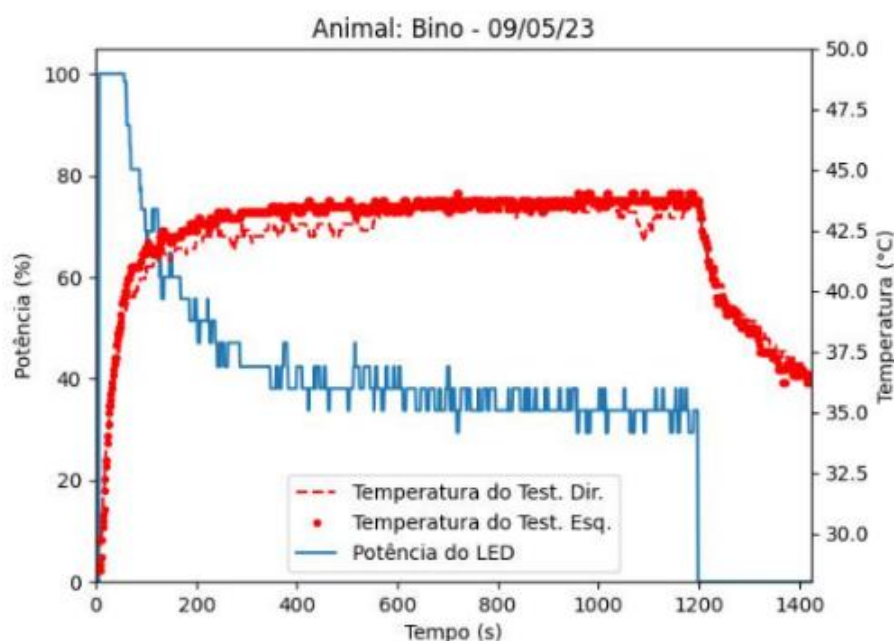


Figura 5: Paciente do G7, representando a curva de aquecimento testicular durante o FHT. Observar que durante os primeiros 240 segundos, se obtém um “platô” momento em que se inicia a contagem de 15 minutos, após a estabilização da temperatura. A potência dos LEDs (traço azul) era ajustada automaticamente ao longo do tempo baseado na temperatura dos testículos aferida pelos termopares.

Quadro 3: Temperaturas individuais dos testículos (n=22) submetidos à fotohipertermia mediada por nanopartículas.

GRUPO	PACIENTE	T° TD	T° TE	Classificação*	Refluxo e observações
G7	1	45,75	45,75	Total	TE (+);
G7	2	43,75	43,50	Severa	TD (+);
G7	3	45,75	45,25	Moderada	TD (++) e TE (+++); Temperatura ajustada manualmente
G7	4	43,25	45,50	Total	TD (+);
G28	1	44	43,75	TD Severa	TD (+) e TE (++)
				TE Total	
G28	2	44,50	40,75	Total	Condição inicial não nula (paciente se mexeu)
G28	3	44,25	44,75	Total	Condição inicial não nula (led desencostado)
G49	1	44,50	44,25	Severa	TE (+)
G49	2	46,25	45	TD Total	Temperatura ajustada manualmente
				TE Severa	
G49	3	44,50	39,50	Severa	TE não ficou centralizado
G49	4	44,25	39,75	TD Total	TE não ficou centralizado
				TE Severa	

Refluxo de nanopartícula durante a injeção testicular: leve (+); moderado (++); importante (+++)

* Classificação de acordo com a extensão de tecido afetada, vide QUADRO 2.

6.2 Avaliação de dor aguda pós-procedimento

Na avaliação de dor, apenas 9% dos animais obtiveram score 3 (WATANABE et al., 2022) nas primeiras 48 horas após o procedimento de fotohipertermia testicular mediada por nanopartículas, portanto, nenhum paciente do experimento teve necessidade de resgate analgésico até 48h do tratamento com FHT. Após 48h, 82% dos pacientes apresentaram score 0 (Tabela 1). Os pacientes que atingiram score 2 e 3, não apresentaram alterações comportamentais, tampouco precisaram de resgate analgésico. Esses animais foram evoluindo para uma melhora espontânea ao longo do estudo.

Tabela 1. Avaliação de dor aguda dos animais submetidos à fotohipertermia testicular mediada por nanopartículas (FHT), utilizando a Feline Grimace Scale (WATANABE et al., 2022).

Tempo pós-FHT	Escore na escala de dor			
	0	1	2	3
2 horas	45% (5/11)	9% (1/11)	36% (4/11)	9% (1/11)
4 horas	64% (7/11)	18% (2/11)	9% (1/11)	9% (1/11)
8 horas	64% (7/11)	18% (2/11)	18% (2/11)	0% (0/11)
24 horas	73% (8/11)	9% (1/11)	9% (1/11)	9% (1/11)
48 horas	82% (9/11)	0% (0/11)	9% (1/11)	9% (1/11)

6.3 Exames de sangue

Os exames de sangue realizados antes do procedimento de fotohipertermia testicular (D0) e 7, 28 e 49 dias após revelaram parâmetros dentro dos limites de normalidade para a espécie em todos os animais, o que sugere tolerabilidade renal e hepática a curto prazo (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2. Valores (Média±DP e variação) de indicadores de função renal (ureia e creatinina) e hepática (ALT, FA e proteína) dos gatos no dia do procedimento de fotohipertermia testicular mediada por nanopartículas (D0) e no dia da orquiectomia.

	D0 (N=11)	D7 (N=4)	D28 (N=3)	D49 (N=4)	Limites de normalidade*
Ureia (mg/dL)	19±11 (28-66)	62,5±7,2 (55,3-69,7)	42±3 (40-44)	40±4 (35-44)	42,8 a 64,2
Creatinina (mg/dL)	1,1±0,2 (0,8-1,4)	1,1±0,3 (0,8-1,4)	1,1±0,0 (1,1-1,1)	1,3±0,1 (1,2-1,4)	0,8 a 1,8
ALT (U/L)	46±20 (25-99)	46±3 (42-48)	60±22 (46-85)	33±5 (25-37)	6 a 83
FA (U/L)	92±32 (42-146)	70±37 (18-105)	140±0 (140-140)	76±22 (52-101)	25 a 93
Proteína total plasmática (g/dL)	6,5±0,3 (6,1-7,0)	6,7±0,4 (6,3-7,1)	6,7±0,0 (6,7-6,7)	6,7±0,2 (6,5-6,9)	6 a 8
Albumina (g/dL)	3,5±0,3 (2,9-3,9)	3,1±0,3 (2,8-3,3)	3,2±0,1 (3,1-3,2)	3,2±0,2 (3,0-3,4)	2,1 a 3,3

ALT = alanina aminotransferase; FA = Fosfatase alcalina

*Valores de referência para gatos (MEYER & HARVEY, 2004)

Tabela 3: Valores de hemograma (Média±DP e variação) dos gatos no dia do procedimento de fotohipertermia testicular mediada por nanopartículas (D0) e no dia da orquiectomia.

	D0 (N=11)	D7 (N=4)	D28 (N=3)	D49 (N=4)	Limites de normalidade*
Hemácias (10 ⁶ /μL)	8±2 (5-11)	6±1 (5-7)	8±1 (8-8)	9±1 (8-10)	8 a 15
HB (g/dL)	12±2 (8-14)	9±1 (8-11)	11±0 (11-11)	12±1 (11-13)	5 a 10
HT (%)	36±6 (23-43)	29±6 (24-36)	35±1 (34-35)	36±2 (33-38)	24 a 45
VCM (fL)	44±4 (36-50)	50±9 (42-63)	43±2 (41-44)	41±5 (37-48)	39 a 55
CHCM (g/dL)	33±1 (31-34)	31±4 (25-34)	32±0 (32-32)	27±11 (10-34)	30 a 36
PLT (10 ³ /μL)	232±154 (18-492)	564±86 (480-652)	512±124 (425-600)	328±41 (288-374)	200 a 800
Leucócitos (10 ³ /μL)	12,8±4,8 (7,8-21,0)	16,3±4,4 (11,7-22,3)	14,6±8,9 (8,2-20,9)	13,5±2,1 (10,9-16,0)	5,5 a 19,5
Neutrófilos (10 ³ /μL)	7,5±3,3 (4,2-10,8)	10,3±4,2 (6,0-14,5)	6,2±2,0 (4,2-8,3)	8,4±3,4 (4,9-11,8)	2,5 a 12,5
Linfócitos (10 ³ /μL)	3,5±1,9 (0,5-7,1)	5,1±2,9 (0,9-7,4)	6,9±6,2 (2,5-11,3)	3,3±1,8 (1,1-4,9)	1,5 a 7,0
Monócitos (/μL)	243±162 (0-840)	302±196 (118-494)	-	105±128 (0-260)	0 a 850
Eosinófilos (/μL)	1082±955 (251-3451)	618±657 (0-1318)	811±334 (575-1047)	776±391 (328-1280)	0 a 1500

HB: concentração de hemoglobina, HT: hematócrito, VCM: volume corpuscular médio; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; PLT: plaquetas

*Valores de referência para gatos (MEYER & HARVEY, 2004).

6.4 Avaliação visual e física dos testículos

Os pacientes apresentaram alterações significativas quanto a sensibilidade, mobilidade dentro do escroto, edema e consistência testicular no período de 48h pós FHT, contudo, os pacientes não apresentavam desconforto durante o manejo da área tratada. Sete dias após o tratamento os pacientes apresentavam sensibilidade aumentada em 41% dos casos, testículos móveis em 86%, sem presença de edema (91%), mas ainda com a consistência majoritariamente túrgida (86%). Mesmo assim, os pacientes não apresentavam desconforto ao toque ou ainda hipersensibilidade quando eram manejados. (QUADRO 4).

Aos 35 dias após o procedimento, 100% dos pacientes não apresentavam aumento da sensibilidade e a consistência testicular já havia voltado ao normal. Embora o edema e falta de mobilidade na bolsa ainda fossem observados, a aparência testicular e escrotal era normal (FIGURA 6).

Quadro 4: Alterações à palpação testicular ao longo do tempo. O n testicular reduz à medida que os pacientes vão sendo retirados do experimento após a orquiectomia

Tempo Pós FHT	Testículos (n)	Sensibilidade		Mobilidade		Edema		Consistência	
		SIM	NÃO	SIM	NÃO	SIM	NÃO	Túrgido	Fibro-elástico
2 horas	22	9 (41%)	13(59%)	22(100%)	0(0%)	0(0%)	22(100%)	8(36%)	14(64%)
4 horas	22	9 (41%)	13(59%)	22(100%)	0(0%)	1(5%)	21(95%)	13(59%)	9(41%)
8 horas	22	8 (36%)	14(64%)	22(100%)	0(0%)	0(0%)	22(100%)	14(64%)	8(36%)
24 horas	22	10(45%)	12(55%)	22(100%)	0(0%)	1(5%)	21(95%)	16(73%)	6(27%)
48 horas	22	13(59%)	9(41%)	21(95%)	1(5%)	1(5%)	21(95%)	15(68%)	7(32%)
7 dias	22	9(41%)	13(59%)	19(86%)	3(14%)	2(9%)	20(91%)	19(86%)	3(14%)
14 dias	14	9(64%)	5(36%)	11(79%)	3(21%)	1(7%)	13(93%)	9(64%)	4(29%)
21 dias	14	8(57%)	6(43%)	11(79%)	3(21%)	2(14%)	12(86%)	2(14%)	12(86%)
28 dias	14	4(29%)	10(71%)	11(79%)	3(21%)	3(21%)	11(79%)	1(7%)	13(93%)
35 dias	8	0(0%)	8(100%)	7(87,5%)	1(12,5%)	1(12,5%)	7(87,5%)	0(0%)	8(100%)
42 dias	8	0(0%)	8(100%)	5(62,5%)	3(37,5%)	0(0%)	8(100%)	0(0%)	8(100%)
49 dias	8	0(0%)	8(100%)	5(62,5%)	3(37,5%)	0(0%)	8(100%)	0(0%)	8(100%)

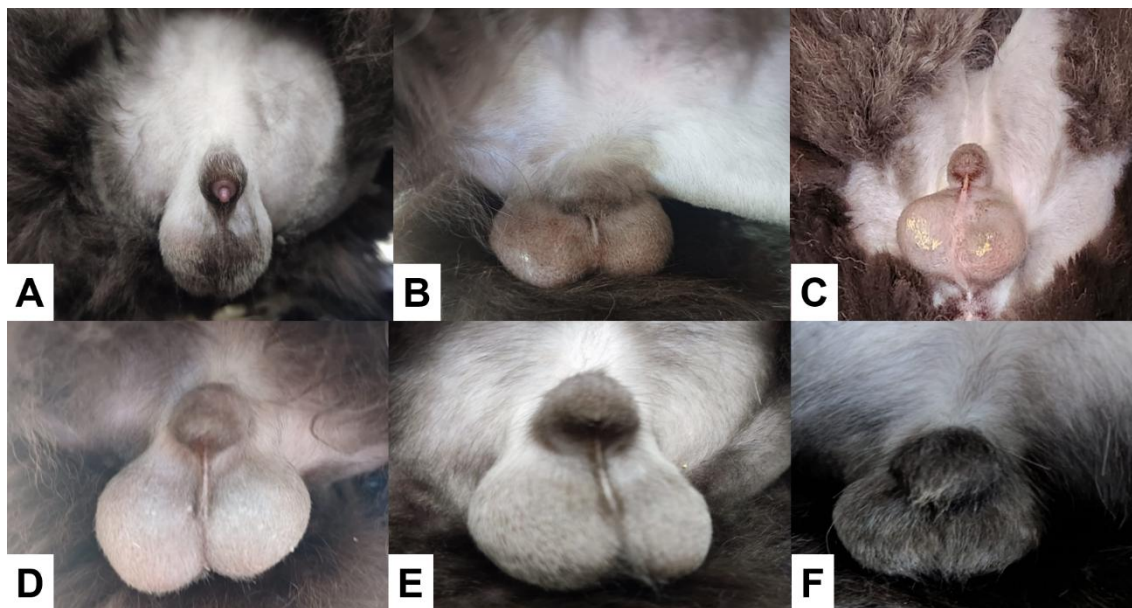


Figura 6: Evolução dos testículos, do mesmo paciente, do G49, ao longo das semanas. (A) D0; (B) D7; (C) D14; (D) D28; (E) D35 e (F) D42. Observe que em (D) e (E) o testículo apresentava uma clara assimetria, corrigida em (F).

Volume testicular

O volume testicular aferido por paquímetro dentro da bolsa escrotal revelou aumento entre o dia do tratamento (D0) e o dia da castração perceptível em todos os grupos, e estatisticamente significativo no grupo D7 ($P < 0,05$). Porém, também foi possível observar uma diferença no volume testicular entre as medidas obtidas dentro e fora da bolsa escrotal no dia da orquiectomia, com diferença significativa no grupo D49 ($P < 0,05$) (Figura 7).

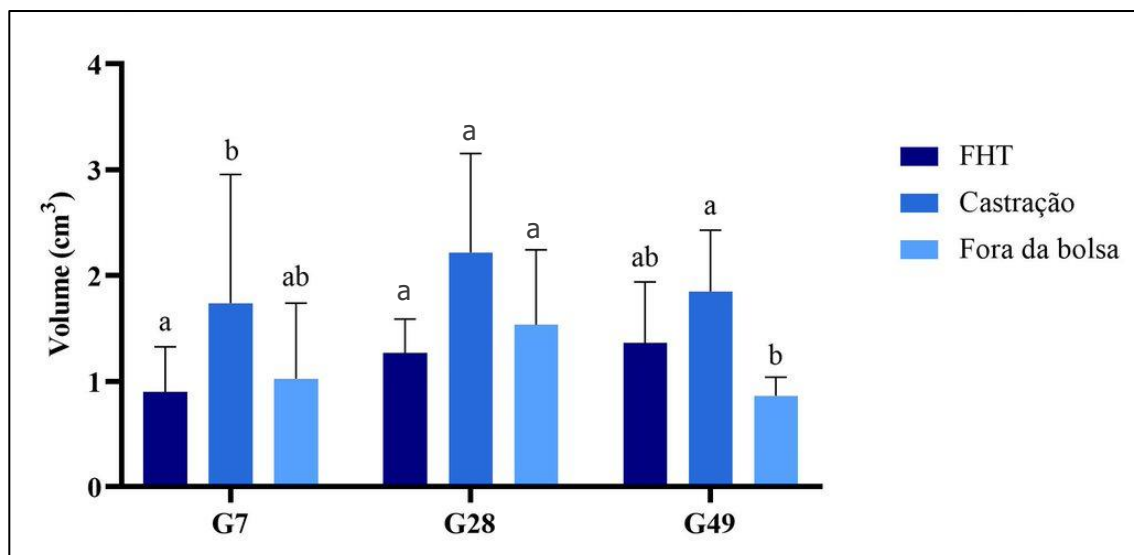


Figura 7: Volume testicular (média±DP) aferido por paquímetro no dia do tratamento (FHT), e no dia da orquiectomia, tanto dentro da bolsa (CASTRACÃO) como fora da bolsa.

a, b = letras diferentes indicam diferença significativa $p < 0,05$.

Já as medidas de volume testicular obtidas no exame ultrassonográfico (FIGURA 8) mostraram um aumento significativo 7 dias após o procedimento quando comparado ao D0 ($P < 0,05$) com posterior redução significativa ($P < 0,05$) já a partir de 14 dias até 49 dias pós-procedimento, com valores estatisticamente iguais aos de antes do procedimento (D0).

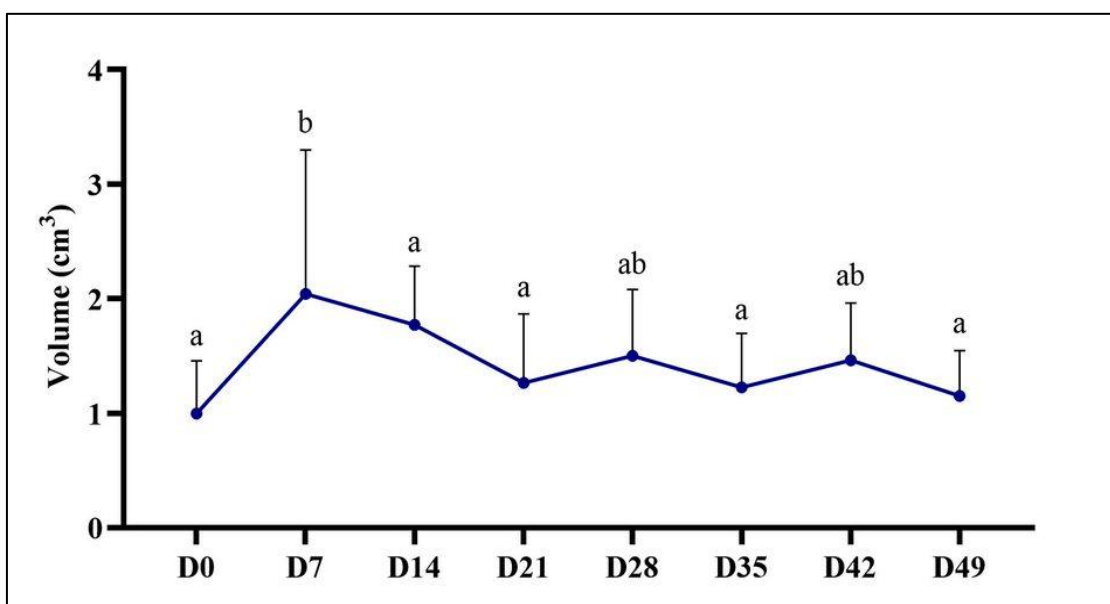


Figura 8: Média (±DP) dos volumes testiculares aferidos por ultrassonografia.

a, b = letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

6.6 Histopatologia testicular e epididimária

A análise histológica dos testículos (N=4 - Figura 9 A e C) dos animais controle revelou túbulos seminíferos íntegros, circundados por membrana basal íntegra, com epitélio germinativo contendo células da linhagem germinativa em diversos estágios da espermatogênese e células de Sertoli. No interior de alguns túbulos é possível perceber espermátides jovens e madura, além de alguns espermatozoides. No espaço intertubular havia presença de células de Leydig. Nos epidídimos (N=4 - Figura 9 B e D) os túbulos apresentavam epitélio de revestimento pseudoestratificado cilíndrico ciliado, com presença de grande quantidade de espermatozoides no interior do lúmen.

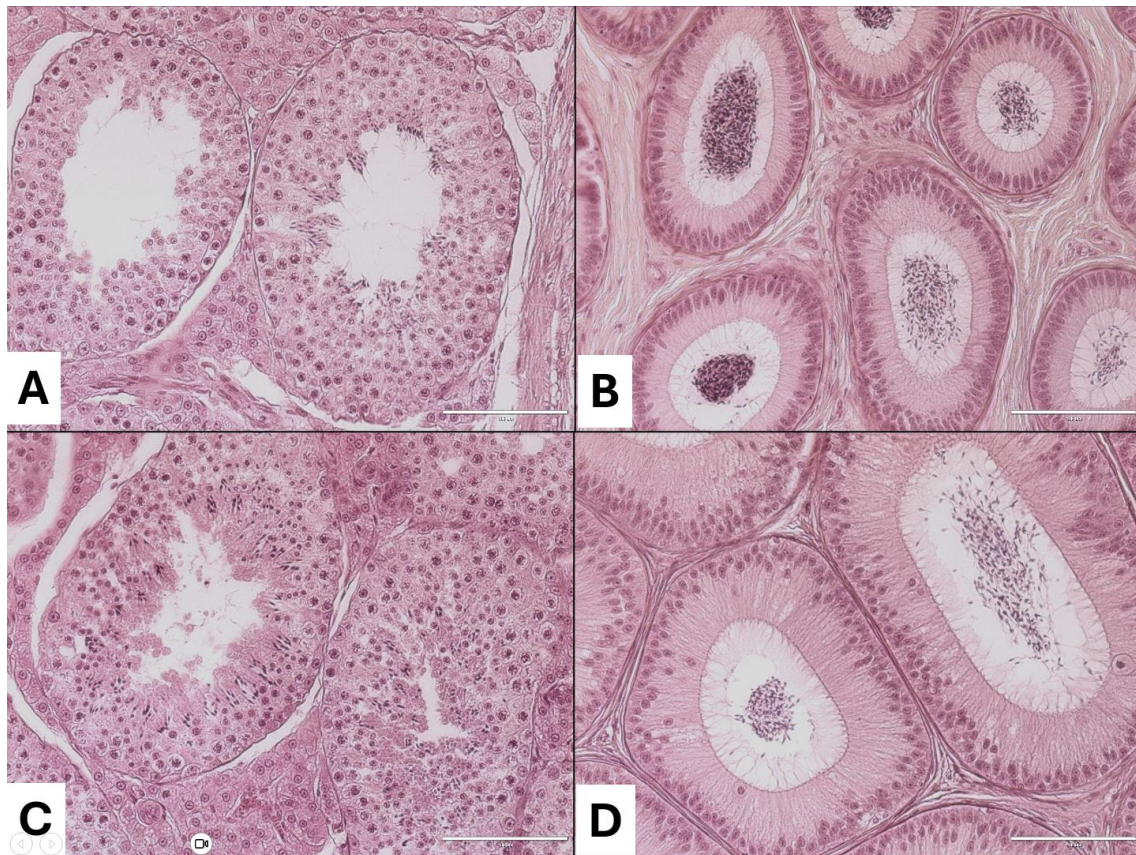


Figura 9: Histopatologia (H&E) do testículo (A e C) e epidídimo (B e D) de animal controle. (A e C) Túbulos seminíferos íntegros com epitélio germinativo contendo células da linhagem germinativa em diversos estágios de desenvolvimento, presença de espermátides tardias e alguns espermatozoides no lúmen. (B e D) túbulos epididimários com epitélio de revestimento pseudoestratificado cilíndrico ciliado. É possível perceber a presença de espermatozoides no interior do lúmen. Barras = 100μm.

Aos 7 dias após o procedimento de fototerapia testicular, foi observada uma resposta variada quanto a intensidade e extensão dos processos degenerativos e inflamatórios nos testículos (N=8; FIGURA 10). Os túbulos seminíferos apresentavam lúmen reduzido (FIGURA 10A), as células da linhagem germinativa, quando presentes, estavam com aspecto degenerado com núcleos picnóticos, citoplasma eosinofílico e presença de vacuolização (FIGURA 10C). O arcabouço testicular foi completamente perdido em algumas regiões, não sendo possível delimitar o espaço intersticial e luminal com clareza (FIGURA 10B). Infiltrado inflamatório intenso no espaço intersticial e, em alguns túbulos, é possível observar células inflamatórias no seu interior, evidenciando a perda da barreira hemato-testicular. Um paciente, apresentou necrose coagulativa extensa em ambos os testículos (FIGURA 10D). Não foi identificada a presença de espermatozoides no interior dos túbulos (Figura 10 A – D).

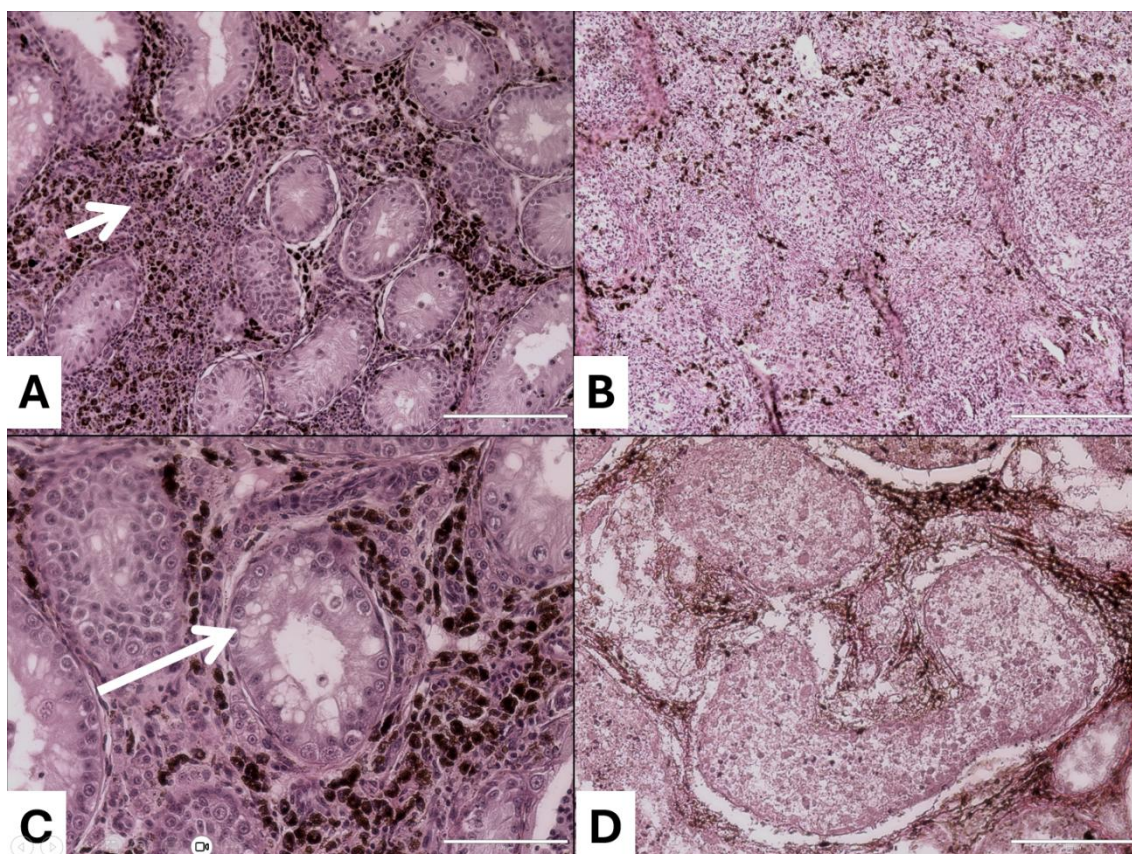


Figura 10: Histopatologia (H&E) testicular dos de animais pertencentes aos grupos G7(A - D) (A) Túbulos seminíferos contraídos, com infiltrado inflamatório no tecido intersticial (seta curta branca). Epitélio germinativo baixo e com número reduzido de células. (B) Intenso processo inflamatório com perda da arquitetura tubular. Os túbulos apresentam-se repletos de células leucocitárias. (C) Túbulo seminífero contraído e células da linhagem germinativa escassas, com vacuolização (seta longa branca). (D) Necrose coagulativa em túbulo seminífero, com perda do arcabouço tubular. É possível observar material sugestivo de aglomerado de nanopartículas no tecido intersticial de todos os testículos. Barras: (A = 100µm), (B = 200µm), (C=400µm) e (D= 400µm).

Os testículos (N= 6; FIGURA 11) dos animais do G28 apresentaram maiores áreas de necrose, com destruição total e/ou extensa do tecido testicular. Neste grupo, o processo inflamatório ainda era muito intenso, dificultando a identificação do espaço intersticial e identificação das células de Leydig. Em alguns casos, apenas os contornos tubulares ainda podiam ser identificados (FIGURAS 11 A e B). Quando visíveis, os túbulos seminíferos se apresentavam condensados, desorganizados com aspecto degenerativo avançado. As células de Sertoli são presentes, mas não é possível observar células da linhagem germinativa, tampouco espermatozoides. As áreas necróticas neste grupo são extensas e estão presentes em todos os testículos desse grupo (FIGURA 11 C e D).

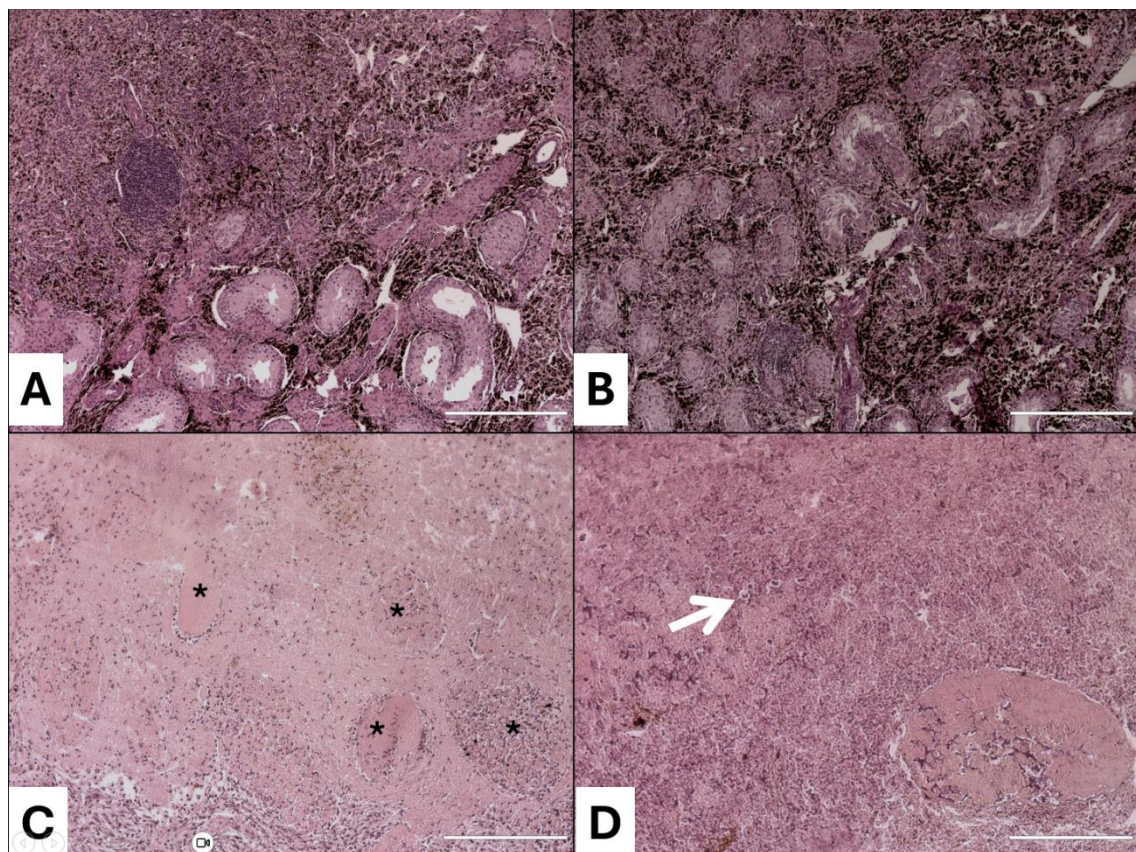


Figura 11: Histopatologia (H&E) testicular de animais pertencentes aos grupos G28. (A) Extensa área de infiltrado leucocitário, com perda da arquitetura tubular. Na região logo abaixo, é possível perceber alguns túbulos seminíferos contraídos. (B) Túbulos contraídos, com intenso infiltrado leucocitário ao redor. Não é possível diferenciar as células da linhagem germinativa. Há grande quantidade de nanopartícula no espaço intersticial. (C) Extensa área de necrose de coagulação, onde não é possível identificar túbulos seminíferos, mas apenas os contornos (asterisco). (D) Necrose de coagulação extensa, com perda do tecido testicular. É possível observar macrófagos (seta curta branca). Barras: (A = 100µm), (B = 200µm), (C=400µm) e (D= 400µm).

No G49 a inflamação intersticial já era menos intensa e extensa, permitindo melhor avaliação do espaço intersticial e tubular. Mesmo assim, as alterações histopatológicas não evidenciaram melhora ou recuperação do tecido testicular (FIGURA 12). Os túbulos seminíferos estavam condensados, células da linhagem germinativa raras e em processo degenerativo avançado, e extensa área de necrose coagulativa. É possível observar a presença de linfócitos e macrófagos no interior dos túbulos seminíferos, evidenciando a perda da barreira hemato-testicular. As células de Sertoli estão presentes em diversos túbulos, e as células de Leydig apresentam hipertrofia (Figura 12 D). Ainda é possível ver aglomerados de nanopartículas no tecido testicular (Figura 12 A e D).

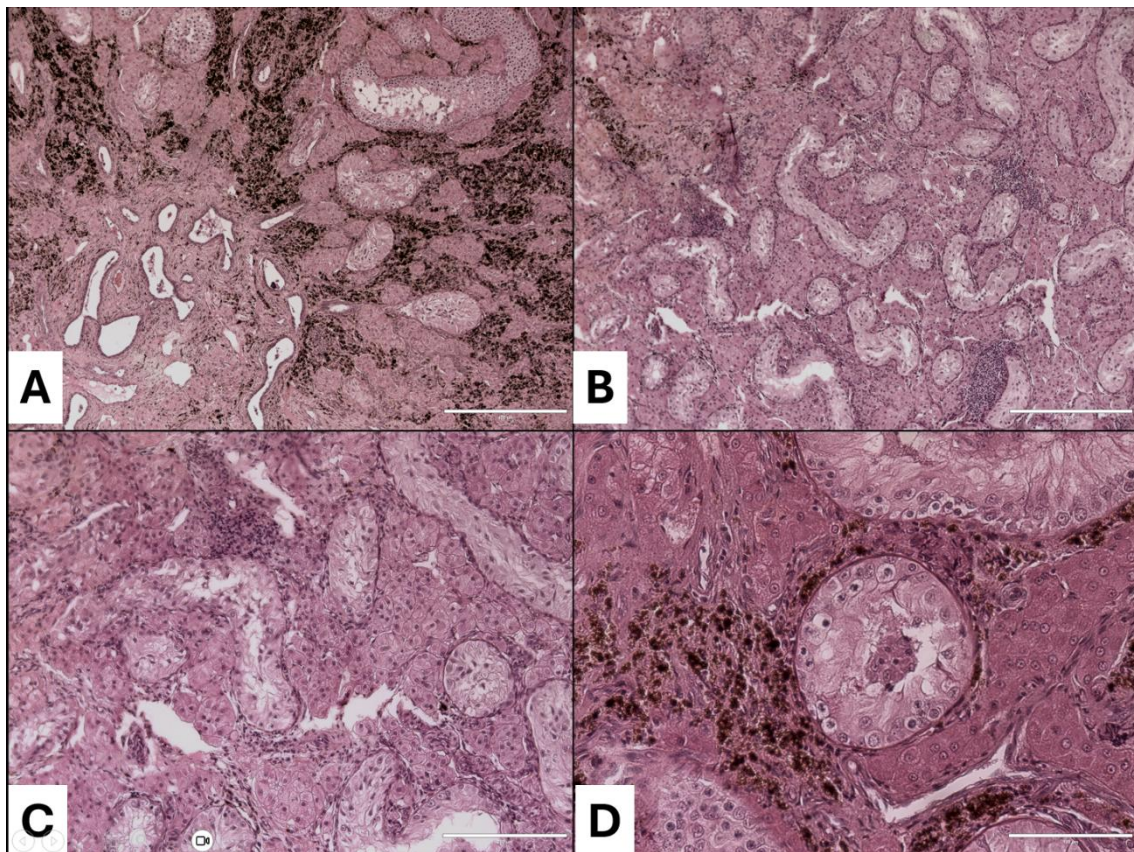


Figura 12: Histopatologia (H&E) testicular de animais pertencentes aos grupos G49. (A) Túbulos seminíferos próximos à rede testis. Os túbulos apresentam-se contraídos, com células da linhagem germinativa escassas e, quando presentes, apresentando processo degenerativo avançado. No interior dos túbulos coletores da rede testis, é possível observar células da linhagem leucocitária e células germinativas, que possivelmente descamaram do epitélio seminífero. (B) Túbulos retraídos, ausência de espermatozoides. Menor intensidade de infiltrado inflamatório. (C) Túbulos vazios e contraídos com linhagem germinativa escassa. Observe a grande quantidade de células de Leydig ao redor dos túbulos, aparentemente hipertrofiadas. (D) Túbulo seminífero apresentando células leucocitárias no seu interior. Observe a presença de espermatogônias com núcleos picnóticos e células de Sertoli. Ao redor, é possível perceber nanopartículas e células de Leydig hipertrofiadas. Barras: (A = 100µm), (B = 200µm), (C = 400µm) e (D = 400µm).

Na avaliação pela coloração de Masson, que cora em azul o tecido conjuntivo, não foram observadas áreas caracterizadas por maior deposição de tecido conjuntivo entre os animais controle e tratados (FIGURA 13).

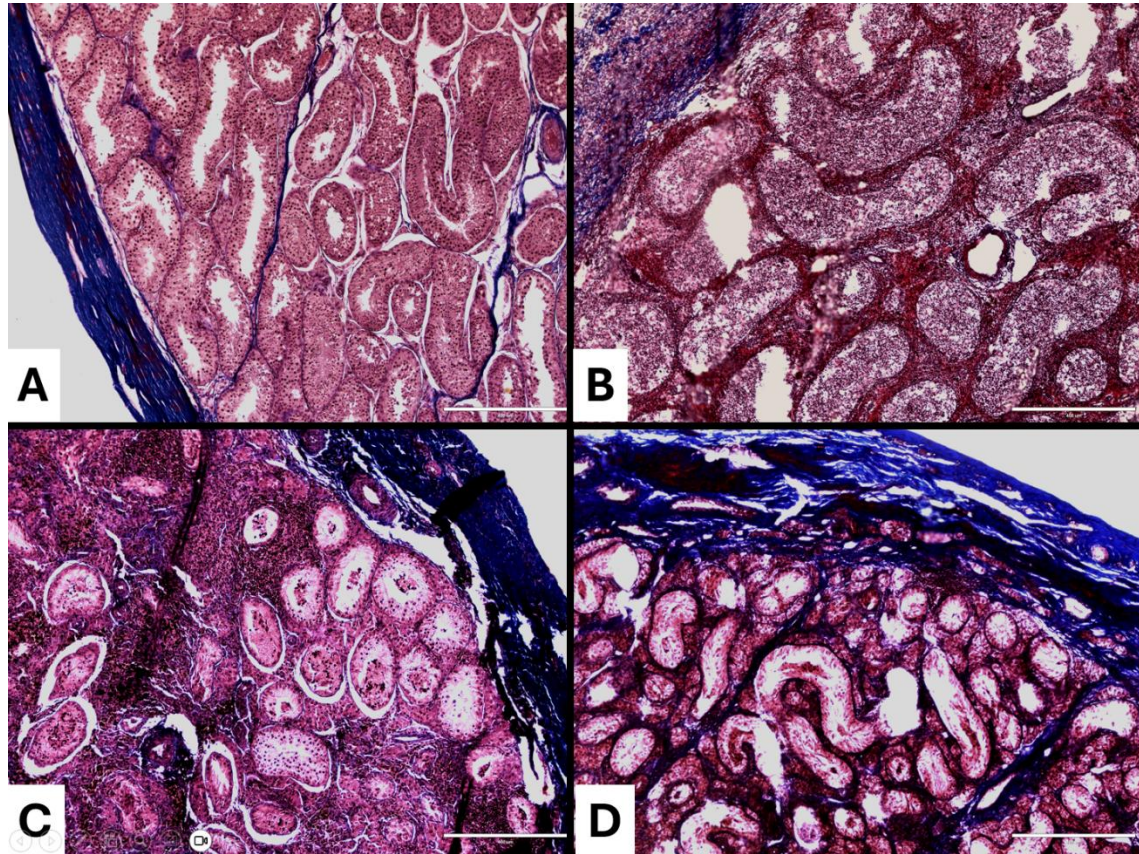


Figura 13: Histopatologia (Tricrômio de Masson) de testículos de animais dos grupos controle (A), G7 (B), G28 (C) e G49 (D). Observe que a distribuição de tecido conjuntivo (corado em azul) é semelhante entre os grupos controle e tratados. Barras = 400 μ m.

A histologia dos epidídimos mostrou que no grupo G7 (FIGURA 14 A e B) não havia espermatozoides na luz dos túbulos, mas sim grande quantidade de debris celular. Esses debris são compostos por células de defesa, restos celulares da espermatogênese ou macrófagos repletos de nanopartículas. Em alguns túbulos, observou-se alterações cribriformes, onde os túbulos apresentam aspecto irregular “estrelado”.

No G28 (FIGURA 14 C e D) havia grande quantidade de debris celular no interior dos túbulos epididimários, bem como ausência de espermatozoides. O espaço intertubular apresentava pontos de infiltrado inflamatório. Houve,

portanto, uma epididimite associada. O epitélio apresentava contornos irregulares e falhas no epitélio pseudoestratificado.

Da mesma forma, no grupo G49 (FIGURA 114 E e F) também não foram encontrados espermatozoides no interior dos túbulos epididimários, que por vezes continham células de defesa no lumen. O epitélio dos túbulos epididimários apresentava-se preservado em maioria, sendo pseudoestratificado cilíndrico ciliado. Houve leve infiltrado de carácter monocitário, variando de natureza focal e multifocal.

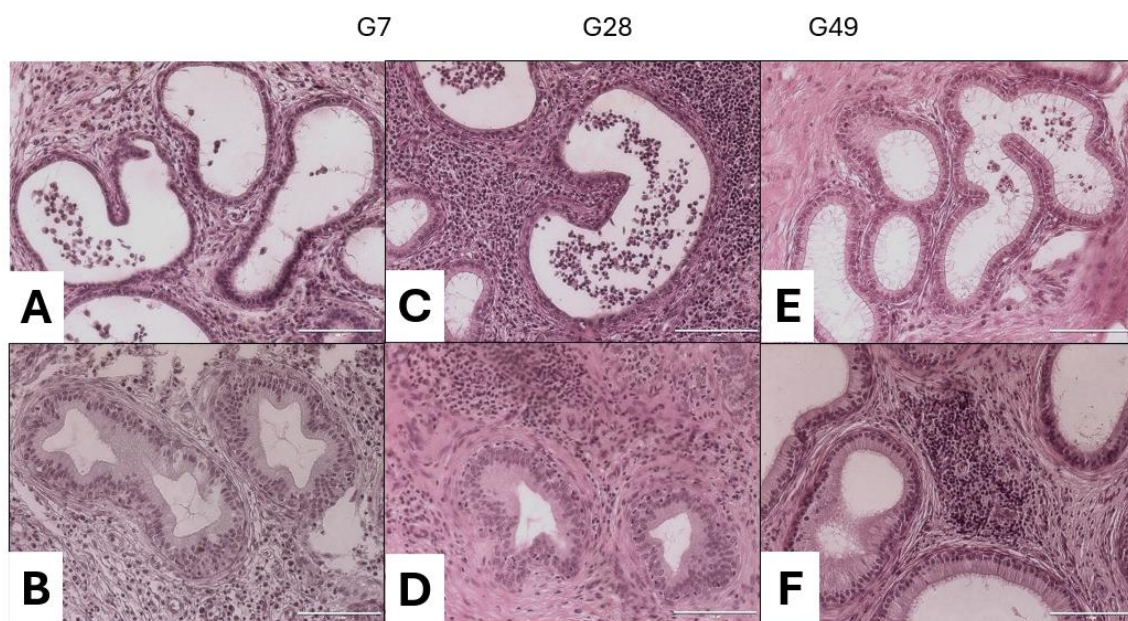


FIGURA 14: Histopatologia dos epidídimos dos animais do grupo G7 (A e B), G28 (C e D) e G49 (E e F). (A) Grande quantidade de debris celular e células de defesa, predominantemente linfócitos, no interior do túbulo epididimário. (B) Túbulos vazios com epitélio pseudoestratificado danificado e túbulos em formato “crenado” ou “estrelado”. (C) Inflamação peritubular e presença de grande quantidade de debris celular no interior do túbulo. (D) infiltrado inflamatório localizado e túbulos crenados, com as aspecto “estrelado” e vazio. (E) Epitélio pseudoestratificado baixo, com cílios preservados, porém com presença de linfócitos e macrófagos no interior dos túbulos. (F) Infiltrado polimorfonuclear focal ao redor de túbulos epididimários. Barras = 400µm.

Considerando a classificação do dano ao tecido testicular de acordo com a extensão das lesões, a análise histopatológica demonstrou que G7 apresentou intenso infiltrado inflamatório, com extensas áreas de degeneração, mas poucas áreas de necrose. Evoluindo, em G28, as lesões apareciam bem mais expressivas e em maior extensão em termos degenerativos e necróticos, ainda com grandes áreas de inflamação. Em G49, a inflamação era bem menor o que propiciou a melhor avaliação do tecido, evidenciando extensas áreas de necrose e atrofia tubular (FIGURA 15).

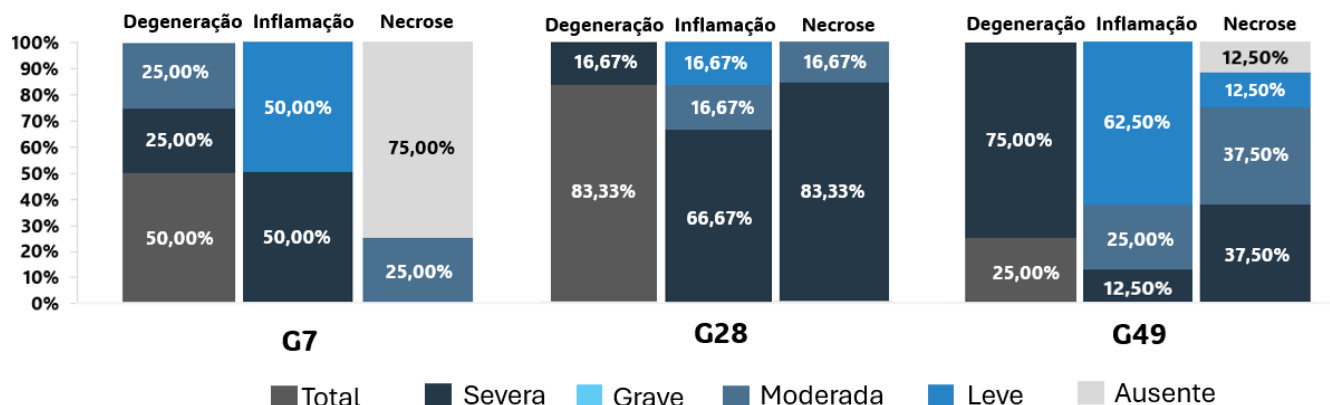


Figura 15: Avaliação da extensão de lesões degenerativas, inflamatórias e necróticas dos grupos G7, G28 e G49.

6.7 Anestesia

O protocolo de sedação adotado foi considerado satisfatório quanto a resposta farmacológica, promovendo sedação profunda em 64% dos pacientes do estudo (FIGURA 16).

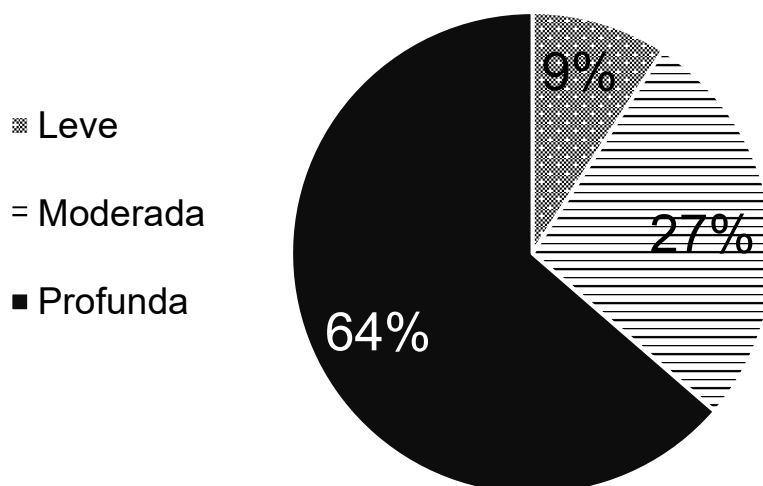


Figura 16: resposta às medicações pré-anestésicas administradas. A combinação da dexmedetomidina e da cetamina foi considerada satisfatória para contenção química dos pacientes.

Quatro animais permitiram intubação orotraqueal apenas com as medicações pré-anestésicas, sendo a média da dose da dexmedetomidina de 7,6 mcg/kg e da cetamina 4,5 mg/kg. Contudo, 64% dos pacientes necessitaram de dose média de 1,47mg/kg de propofol intravenoso para perda dos reflexos laríngeos e acesso à via aérea. Dentre as intercorrências da anestesia podemos citar: laringoespasma, jejum incompleto, hipotensão, êmese e apneia.

Mesmo apresentando sedação profunda e indução tranquila, 100% dos animais necessitaram de isoflurano para a manutenção anestésica, com CAM (concentração alveolar mínima) de 1,22%. Do momento da sedação ao despertar, a média de duração da anestesia foi de uma hora e 14 minutos. Os pacientes apresentaram estabilidade respiratória e cardiovascular satisfatória e a média dos parâmetros analisados constam no Quadro 5.

Quadro 5: parâmetros fisiológicos médios dos pacientes ao longo da anestesia para o FHT.

Parâmetro	Média ($\pm$ DP)
Frequência cardíaca (bpm)	140 ($\pm$ 16,2)
Frequência respiratória (mpm)	21($\pm$ 9,8)
Saturação periférica de oxigênio (%)	99 ($\pm$ 2,0)
Pressão arterial sistólica(mmHg)	146 ($\pm$ 22,2)
Pressão arterial média(mmHg)	101 ($\pm$ 25,1)
Pressão arterial diastólica (mmHg)	83 ($\pm$ 18,9)
Temperatura esofágica ($^{\circ}$ C)	37,9 ($\pm$ 0,5)

O procedimento do FHT se mostrou seguro em 72,7% dos pacientes. Os pacientes demonstraram conforto analgésico e boa tolerância, sem alterações de comportamento. Um paciente apresentou intercorrências durante o procedimento, como o termopar desencostado da superfície testicular, dificultando a aferição da temperatura correta na superfície escrotal. Em três

pacientes, foi observado uma ferida, na base da cauda, ocasionada pelo aquecimento de uma das estruturas do aparelho (aro metálico de fixação do led), em contato com a cauda retraída desses pacientes (FIGURA 17). As lesões foram tratadas como ferida simples e cicatrizaram por segunda intenção após limpeza com soro fisiológico e administração de Rifamicina (spray) na região. Após 15 dias, as feridas estavam cicatrizadas por segunda intenção.

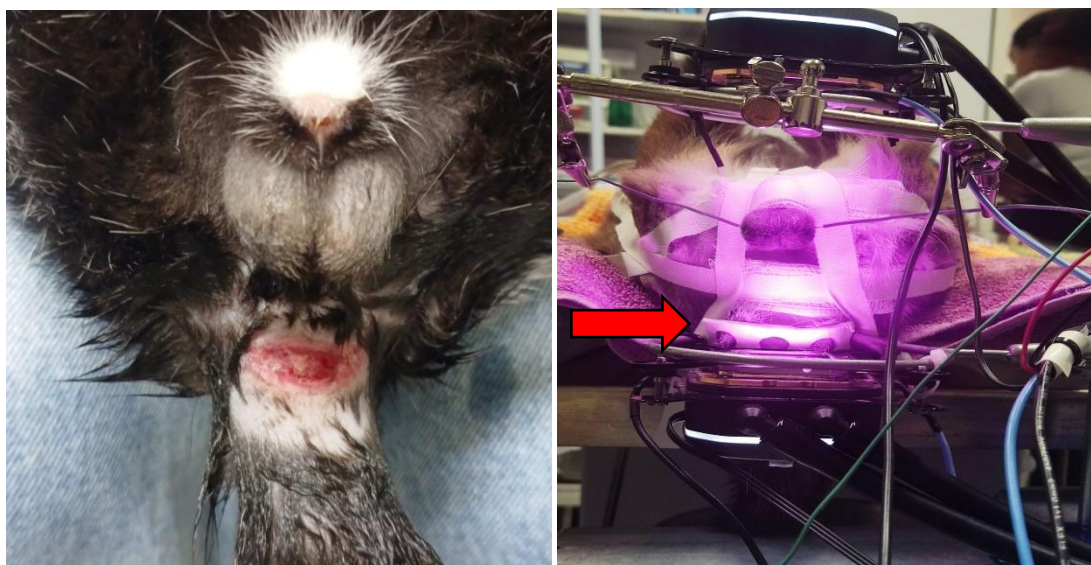


Figura 17: Lesão na base da cauda de um paciente submetido ao FHT. As lesões apareceram após 7 dias da exposição. Na foto à direita, observe a haste de metal que estava encostada na base da cauda (seta vermelha).

7. DISCUSSÃO

A superpopulação de animais de rua é sabidamente um problema de saúde pública incluindo riscos ambientais e zoonóticos (TOVO & WILMSEN, 2023). Os gatos, por apresentarem uma parte representativamente grande dessa população de animais errantes e possuírem um período gestacional curto, em comparação com outras espécies, são a espécie mais preocupante em relação aos problemas associados à superpopulação animal. O número de publicações sobre métodos de esterilização de machos de forma minimamente invasiva tem crescido significativamente (MASSEI & MILLER, 2013), buscando diferentes abordagens. Mais recentemente, a castração utilizando alternativas nanotecnológicas tem sido estudada, utilizando roedores como modelo animal (LI et al, 2015; LIU et al, 2015; JIVAGO et al, 2021; LEELAKAJORNKIT et al, 2025). A fotohipertermia mediada por nanopartículas, abordagem utilizada no presente estudo, se vale da capacidade de algumas nanopartículas produzirem calor quando submetidas a uma fonte luminosa, podendo ser uma alternativa inovadora de esterilização, simples, barata e pouco invasiva.

Jivago et al (2021) descreveram sucesso ao utilizar magnetohipertemia mediada por nanopartículas de ferrita de manganês em ratos. Contudo, o aparelho emissor de ondas magnéticas é caro e depende de uma série de condições para seu pleno funcionamento. Já Lima (2024), utilizou a mesma nanopartícula de ferida de manganês, mas utilizando um protótipo para emitir ondas eletromagnéticas na faixa de 808 *nm*. Esse protótipo permite portabilidade e não demanda condições especiais de instalação ou manutenção.

A temperatura testicular é um fator determinante para a espermatogênese, sendo amplamente estudada inclusive como estratégia de promover esterilidade em machos. Estudos prévios demonstram que a exposição dos testículos a temperaturas superiores a 42°C pode impactar a fertilidade temporariamente (PHAM & SCHULTZ, 2021) e que a manutenção da temperatura entre 43 e 45°C, por pelo menos 15 a 20 minutos, pode levar à azoospermia (ZIAEIPOUR et al., 2021; JIVAGO et al., 2021). No presente estudo, buscou-se atingir esse intervalo térmico por meio da fotohipertermia mediada por nanopartículas, e avaliar a eficácia da técnica proposta em causar

infertilidade. Embora a maioria dos animais tenha alcançado a faixa de temperatura considerada ideal para a indução de danos testiculares, houve variações individuais dentro dos grupos experimentais (QUADRO 3). Curiosamente, alguns animais que não atingiram 43°C ainda apresentaram escores elevados de destruição tecidual, sugerindo que outros fatores podem influenciar a resposta testicular à hipertermia mediada por nanopartículas. Esses fatores podem estar relacionados ao comportamento do aquecimento da nanopartícula, refluxo da solução contendo a nanopartícula no momento da aplicação intratesticular ou ainda ao posicionamento dos pacientes durante o procedimento.

A fotohipertemia mediada por nanopartículas envolve o aquecimento da nanopartícula no interior do parênquima testicular, onde o calor é produzido “de dentro para fora”, ou seja, do interior do parênquima testicular, para a periferia. Sendo assim, uma hipótese, seria que a temperatura no interior dos testículos seria maior do que a temperatura aferida pelos termopares na superfície testicular. Li et al (2015) e Jivago et al (2021) utilizaram câmeras térmicas para aferir a temperatura testicular. Contudo, tanto a aferição por câmeras térmicas, quanto a aferição por termopares aferem apenas a temperatura superficial dos testículos. Sendo assim, são necessárias novas técnicas para avaliar a temperatura no interior dos testículos e confirmar essa hipótese.

A solução de ferrita de manganês apresenta uma característica física viscosa, o que dificulta a injeção intratesticular, devido a sua capacidade de dissipar-se pelo parênquima testicular. Sendo assim, ao injetar a nanopartícula nos testículos, a pressão no interior é maior do que a pressão fora “expulsando” a solução contendo a nanopartícula para fora dos testículos (refluxo). Sendo assim, o volume no interior seria menor e, portanto, algumas áreas poderiam ficar sem a nanopartícula, ou seja, não sofreriam o tratamento da fotohipertemia. Uma possível solução é aumentar o volume injetado pela via intratesticular.

O G28 foi o grupo que obteve infiltrado e necrose severos e pior score em termos degenerativos, mas, nenhum paciente chegou à temperatura testicular de 45°C. Contudo, G49, que também apresentou infiltrado leve e necrose majoritariamente severa, obteve dois pacientes que não atingiram 40°C e mesmo assim, obtiveram scores altos em termos degenerativos. Logo, mesmo

sem atingir o limiar térmico descrito na literatura, algumas áreas testiculares podem ter sido expostas a temperaturas localmente elevadas, suficientes para desencadear alterações degenerativas significativas. A temperatura, portanto, não parece ser o único determinante do dano causado ao tecido testicular no presente trabalho.

Alguns fatores podem ter influenciado nos resultados, como a forma como a temperatura é aferida, a temperatura máxima alcançada, a dispersão da nanopartícula e o posicionamento do paciente. Todos esses pontos de atenção podem ser facilmente trabalhados e melhorados. No presente trabalho, a temperatura testicular foi mensurada durante o FHT utilizando termopares: sensores localizados na superfície do escroto. Liu et al (2015) utilizaram uma câmera termográfica infravermelha para medir a temperatura testicular. Essa técnica também permite aferir a temperatura superficial, mas não necessariamente intratesticular, visto que a temperatura no interior dos testículos pode ser afetada pela circulação sanguínea, atividade metabólica das células testiculares e isolamento térmico. Jivago et al (2021) também utilizaram uma câmera termográfica em associação a sensores de fibra óptica para a aferição da temperatura superficial de cada testículo em ratos.

A relação entre a temperatura superficial e intratesticular ainda não é completamente compreendida. Considera-se a possibilidade de que a temperatura na superfície testicular, onde os termopares estão posicionados, seja maior do que no interior do testículo, devido à dissipação do calor ao longo do tecido. No entanto, o fato de testículos com temperaturas superficiais abaixo de 43°C apresentarem destruição tecidual sugere que a temperatura interna pode ter sido maior do que a registrada na superfície. Outra hipótese seria que: como a fotohipertemia mediada por nanopartículas ocorre do interior dos testículos em direção à periferia, a temperatura no interior dos testículos fosse, na verdade, maior que a temperatura registrada na superfície. Dessa forma, são necessárias novas abordagens para avaliar com precisão o comportamento térmico testicular e entender a correspondência entre temperatura superficial e interna.

A dispersão da nanopartícula no tecido testicular também desempenha um papel crucial no sucesso da técnica já que a dispersão heterogênea da

nanopartícula dentro do testículo, resultante da viscosidade da solução e de eventuais refluxos no local da injeção, poderia levar a um aquecimento desigual. A dispersão da nanopartícula pode ser influenciada pelo volume injetado e por características próprias do fluido contendo as nanopartículas. Madbouly et al (2021) utilizaram até 1 ml de glicerol 70% em cada testículo e obtiveram necrose extensa e difusa. Este volume é cerca de dez vezes maior que o utilizado no presente trabalho (150 µl). Os autores, no entanto, não mencionam se este grande volume ocasionou refluxo ou ainda dor. Ainda assim, aumentar o volume do fluido contendo as nanopartículas injetado pode ser uma alternativa para tentar otimizar o processo pelo melhor espalhamento das nanopartículas no tecido.

O sucesso da técnica depende também do posicionamento adequado do paciente, de forma que os testículos fiquem posicionados de forma centralizada e equidistante dos emissores de ondas eletromagnéticas, para uma irradiação por igual. O testículo de roedores, modelo animal mais utilizado, é mais peduncular e está localizado na porção inguinal, porém, os gatos possuem os testículos mais aderidos à região perineal. Essa característica anatômica, dificulta a exposição e posicionamento dos testículos na máquina emissora de ondas, mas, basta posicionar o paciente em decúbito dorsal e tracionar os membros pélvicos em sentido cranial, que os testículos ficarão devidamente expostos.

Proteger as áreas ao redor da máquina foi essencial para evitar queimaduras ou outras lesões na pele dos pacientes causadas pela radiação e pelo aumento da temperatura. Três animais apresentaram lesões na base da cauda, decorrente do aquecimento da estrutura de suporte do aparelho emissor de ondas eletromagnéticas. As lesões causadas pelo aquecimento da barra estrutural do aparelho são lesões semelhante a queimaduras, apareceram após cinco a sete dias do evento, e se resolveram espontaneamente por segunda intenção. Contudo, esse processo foi acelerado com uso de pomadas e limpeza da ferida. Embora as lesões tenham sido causadas durante o procedimento, não foram decorrentes do FHT em si. Após o incidente, mudanças foram feitas no equipamento para evitar possíveis lesões decorrentes do contato da cauda do animal com essa estrutura metálica, visto que a estrutura que causou a lesão

não é parte fundamental do procedimento, mas sim uma estrutura de sustentação.

Os resultados histopatológicos dos três grupos, revelaram alterações significativas do FHT ao longo do tempo. Em um período curto de 7 dias após o FHT, as alterações foram expressivas, houve predomínio da destruição total do parênquima testicular, com presença extensa de infiltrado inflamatório. A destruição total do parênquima testicular, em gatos, pode estar ligada a intensa inflamação nesses primeiros 7 dias, com predomínio de células de defesa polimorfonucleadas. Diferentemente do que ocorreu em outros trabalhos com ratos, camundongos e gatos, que descreveram pouco ou nenhum infiltrado inflamatório (LIU et al, 2015; JIVAGO et al, 2021; LEELAKAJORNKIT et al, 2025). Semelhante ao que ocorreu no presente trabalho, Mohamed et al (2024) destacaram que cães submetidos a injeção de cloreto de cálcio pela via intratesticular, também apresentaram intenso processo inflamatório durante os 30 dias após a aplicação. Contudo, é importante ressaltar que a presença de infiltrado leucocitário dificulta a análise dos túbulos seminíferos e dos processos degenerativos paralelamente em curso com a inflamação acentuada.

Os achados do G28 corroboram com uma piora progressiva das lesões com predomínio da destruição total e uma necrose mais acentuada que G7. Embora G49 possua menor extensão de áreas inflamadas, há presença de túbulos seminíferos atrofiados, com sinais de degeneração ainda em curso. O padrão degenerativo de G49 pode indicar um limite na resposta tecidual, gerando uma fase de estabilização do dano ou um esgotamento do processo de necrose ativa, devido à morte celular prévia, já que houve sinais de atrofia dos túbulos seminíferos neste grupo. De modo semelhante, Paranzini et al (2018) concluíram que 80 dias após a administração intratesticular de cloreto de cálcio a 20% e DMSO, em gatos, não havia mais sinais de inflamação ou necrose macroscópica, tampouco histopatológica. Em cães, submetidos à injeção intratesticular de cloreto de cálcio, observou-se, após três meses, áreas de extensa necrose e sinais de atrofia testicular (LEOCl et al, 2019).

A inflamação observada em G7 e G28, pode mascarar a extensão real do dano estrutural nos primeiros dias pós FHT, dando a impressão de maior destruição. Sendo assim, a redução da porcentagem da destruição total em G49

pode sugerir uma linearidade na evolução das lesões, e não necessariamente uma reparação. A destruição severa ainda prevalece em G49, contudo, com menor incidência de uma necrose ativa. A ausência de necrose em algumas amostras do G49, também pode indicar uma variabilidade na resposta individual dos testículos, falhas no posicionamento do paciente para receber o tratamento, temperaturas testiculares baixas durante o FHT ou ainda atrofia dos túbulos seminíferos (MOHAMED et al, 2024; LEOCI et al, 2019; PARANZINI et al, 2018). A avaliação histológica de G7, G28 e G49, portanto, sinaliza um dano testicular progressivo e intenso suficiente para ser irreversível. Contudo, avaliações de mais longo prazo são necessárias para confirmar ou não esta possibilidade.

A coloração de tricrômio de Masson evidenciou que, embora o tecido estivesse lesionado por inflamação, degeneração, necrose e atrofia tubular, não houve a deposição de tecido conjuntivo fibroso na região peritubular, como ocorre de forma fisiológica nos tecidos que são lesionados por qualquer injúria. Paranzini et al (2018), num estudo em gatos castrados quimicamente com cloreto de cálcio e DMSO intratesticular, observaram a presença de túbulos necróticos e deposição de colágeno nos pacientes castrados oitenta dias após o tratamento. Mohamed et al, (2024) também descrevem a deposição de colágeno e presença intensa de fibrose em cães submetidos a injeção intratesticular de cloreto de cálcio, após 30 dias. Utilizando hipertermia mediada por nanopartículas em ratos, Jivago et al (2021) também reportaram a substituição total do parênquima testicular por tecido conjuntivo em um período de até 56 dias. Hipoteticamente, a fibrose testicular pode ser diferente em diferentes espécies, necessitando de maiores estudos. Talvez, a longo prazo, a fibrose e atrofia fiquem mais evidentes, mas, por hora, não houve presença de fibrose intratesticular em nenhum dos gatos avaliados.

No presente estudo, não foram encontrados espermatozoides no interior dos túbulos ou ainda na cauda do epidídimo, diferentemente de LEELAKAJORNKIT et al (2025) que descreveram espermatozoides na cauda dos epidídimos de gatos após a castração química com nanocarreadores lipídicos nanostruturados encapsulados com alfa-mangostina (AM-NLC).

Embora as nanopartículas despertem preocupações pelo possível dano renal e hepático, todos os pacientes do estudo apresentaram hemograma e

bioquímicos normais (TABELAS 2 e 3), sem alterações laboratoriais hepáticas ou renais, com valores dentro dos referenciados para a espécie (MEYER & HARVEY, 2004). Da mesma forma, o estudo de LEELAKAJORNKIT et al (2025) constatou que não houve valores acima ou abaixo dos referenciados para a espécie em questão. Contudo, convém avaliações mais profundas do efeito do FHT a longo prazo.

Além disso, o procedimento do FHT demonstrou excelente tolerância dos animais quanto a dor, não havendo nenhuma intercorrência com os animais colocados em estudo. O score 0, pela Feline Grimace Scale (FGE), foi dado a 82% dos animais do experimento, 48h após o experimento, evidenciando a boa tolerância da dor aguda pelos animais do experimento. Vullo et al (2023) utilizaram a FGE para avaliar a dor pós-operatória de gatos submetidos à castração cirúrgica (orquiectomia), onde a técnica epidural foi empregada utilizando a combinação de lidocaína e tramadol, juntos ou isolados e constataram que 1/3 precisou de resgate analgésico no pós-operatório imediato. Ingwesen et al (2012) demonstraram que não houve diferença significativa entre os pacientes que fizeram o uso do meloxicam, 0,2mg/kg seguido de 0,05mg/kg/dia, por três ou cinco dias após procedimentos de orquiectomia. Contudo, pacientes que receberam a dose do anti-inflamatório não esteroideal antes do procedimento, como preventivo, obtiveram menores scores de dor no pós-operatório, reforçando a importância de analgesia preventiva (INGWESEN et al, 2012). No presente estudo, a administração de apenas uma dose de meloxicam (0,1 mg/kg) no momento do procedimento foi suficiente pra não haver necessidade de medicação ou acompanhamento pós-procedimento.

Sete dias após o FHT, a palpação testicular demonstrou que uma sensibilidade aumentada era presente em 41% dos animais e estes apresentavam testículos com consistência majoritariamente túrgida (86%). Estas alterações são condizentes com o processo inflamatório que se instalou após a aplicação da nanopartícula. Da mesma forma, Jivago et al. (2021) demonstraram que sete dias após o tratamento com magneto hipertermia, os testículos de ratos ainda apresentavam maior turgidez. Contudo, 15 dias após, os testículos voltaram a consistência normal. Os testículos apresentavam redução na sensibilidade, partir do 14° dia e nenhum animal apresentou sensibilidade

testicular a partir do dia 35, demonstrando que a sensibilidade tende a ser maior nos primeiros 7 dias do tratamento, contudo a consistência natural do testículo, tende a normalizar a partir de 7 dias. Num estudo conduzido por Leoci et al. (2019), cães que receberam injeção intratesticular de cloreto de cálcio não apresentavam sensibilidade nas primeiras 72 horas após o tratamento. Embora este trabalho não demonstre exatamente como foram feitas as avaliações testiculares, focando mais na parte hormonal e comportamental, cerca de três meses após os pacientes apresentavam-se bastante confortáveis, sem sinais de dor importante, com testículos de consistência normal e sem sensibilidade exacerbada.

Embora não tenham feito avaliações da consistência ou sensibilidade testicular, Li et al. (2015) descrevem que os testículos de camundongos submetidos à fotohipertermia mediada por nanopartículas desaparecem ao longo de 7 semanas, não apresentando turgidez, mas sugerindo uma “atrofia testicular generalizada” em todos os animais do experimento. Atrofia e completo desaparecimento dos testículos foi também relatada após magnetohipertemia mediada por nanopartículas em ratos (Jivago et al., 2021). Estudos mais recentes, utilizando nanopartícula em gatos, não observaram esse comportamento, ou seja, não houve alteração significativa no volume testicular (LEELAKAJORNKIT et al., 2025). No presente trabalho, não foi observada uma atrofia testicular importante. A avaliação do volume testicular pela ultrassonografia também mostrou aumento significativo aos 7 dias pós-FHT em todos os grupos, mas com redução na semana seguinte e estabilização subsequente. Já as medidas de volume dos testículos dentro do escroto feitas com paquímetro mostraram uma tendência de aumento do dia da FHT para o dia da castração nos 3 grupos (D7, D28 e D49). Porém, após a remoção dos testículos, o volume aferido era mais próximo ao do dia da FHT, sugerindo uma inflamação dos tecidos peritesticulares. Portanto, é razoável especular que a resposta, tanto inflamatória quando atrófica, ocorra de forma diferenciada em roedores e gatos.

No presente trabalho, a sedação foi considerada satisfatória para o experimento, da mesma forma que outros trabalhos utilizando cães e gatos como modelos experimentais (PARANZINI et al, 2018; LEELAKAJORNKIT et al, 2025;

MOHAMED et al, 2024). Embora alguns trabalhos não descrevam ou não foquem nos protocolos anestésicos utilizados (LEOCI et al, 2019) sabe-se que a combinação de fármacos que promovem sedação e analgesia preventiva são primordiais para a boa recuperação no pós-operatório de procedimentos cirúrgicos (VULLO et al, 2023; INGWERSEN et al, 2012; GOMES et al, 2023; QUARTERONE et al, 2017). Gomes et al (2023) demonstraram que a combinação de dexmedetomidina (10 mcg/kg) associado com cetamina (7 mg/kg) e bloqueio intratesticular com lidocaína (2mg/kg) foram suficientes para promover imobilidade e analgesia trans e pós-operatória nos pacientes submetidos a orquiectomia. No presente estudo, a impossibilidade de administrar anestesia intratesticular, devido a administração da nanopartícula, pode ter contribuído para a necessidade de administrar vapores anestésicos durante o procedimento de FHT, para manter o paciente imobilizado.

É importante salientar a diferença entre anestesia e sedação. A anestesia geral suprime completamente a fase de percepção dolorosa, sendo assim, numa dose adequada, o paciente não é capaz de perceber o estímulo doloroso, mas ocorre nocicepção (GRIMM et al, 2015). A nocicepção é a resposta fisiológica ao estímulo doloroso, desencadeada por nociceptores que, uma vez que são sensibilizados, despolarizam e encaminham a informação dolorosa da periferia (fase de transdução) até o SNC (transmissão), onde ocorre a modulação da dor e por fim, a percepção. No paciente anestesiado, a nocicepção é presente, e é possível observar sinais fisiológicos associados, como aumento de frequência cardíaca e pressão arterial (QUARTERONE et al, 2017). Contudo, o paciente anestesiado não é capaz de perceber a dor, ou se mexer, visto que a anestesia promove miorelaxamento periférico e central (GRIMM et al, 2015). Nos pacientes sedados, o paciente tem apenas uma redução do nível de consciência e motricidade e não perde completamente os sentidos. Logo, se for dado um estímulo doloroso supra máximo, o paciente pode se movimentar, vocalizar e, dependendo do nível de sedação, reagir.

Embora os pacientes do presente estudo tenham apresentado boa sedação, permitindo acesso venoso e manipulação da área a ser tratada, todos precisaram da anestesia inalatória, um tipo de anestesia geral, bastante utilizado na rotina médica, para se manterem em plano anestésico, diferentemente de

outros estudos da literatura, que utilizam apenas sedação em protocolos baseados em injeções intratesticulares únicas como método alternativo de castração (PARANZINI et al, 2018; LEELAKAJORNKIT et al, 2025; MOHAMED et al, 2024). No presente estudo, além da injeção intratesticular, o animal precisava permanecer imóvel durante o tempo de aplicação da luz (15 a 20 minutos), no qual ocorria o aquecimento dos testículos. Isso revela que o método pode ser capaz de gerar um estímulo supra máximo nociceptivo, mas, que pode ser controlado com anestesia balanceada, utilizando técnicas de manutenção anestésica como a anestesia inalatória (usada nos pacientes deste estudo), a anestesia total intravenosa (TIVA) ou ainda adicionando técnicas complementares de analgesia, como a anestesia local.

Uma pesquisa sistemática relata que a CAM média suficiente para imobilidade diante de um estímulo doloroso é de 1,71% para isoflurano e 3,08% para sevoflurano (Shaughnessy et al, 2013). A dose utilizada de isoflurano no presente trabalho foi de uma CAM de 1,22%, da mesma forma que no estudo conduzido por Escobar et al. (2011), em que gatos anestesiados com dexmedetomidina e submetidos a um estímulo doloroso, utilizaram CAM de 1,76%. O estudo mencionou que a imobilidade em resposta a um estímulo doloroso (como a pinça da cauda) foi avaliada e, os gatos se moveram durante o tempo de equilíbrio sangue:cérebro, sem receber estimulação, o que sugere que a dexmedetomidina por si só não resultou em imobilidade em resposta a estímulos dolorosos (ESCOBAR et al., 2011). Sendo assim, o procedimento do FHT parece ser capaz de gerar um estímulo supra máximo nos pacientes sedados, mesmo que em sedação profunda, o que faz com que o paciente sinta desconforto algico e se movimente na mesa, sendo necessário o uso de técnicas de manutenção trans anestésica ou complementariedade do protocolo analgésico.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente pesquisa avaliou a fotohipertermia mediada por nanopartículas como método alternativo para indução de infertilidade permanente em gatos machos. Trata-se de um novo método, ainda em teste, mas com resultados promissores e intercorrências facilmente contornáveis. Os resultados demonstraram que, após aplicação intratesticular das nanopartículas e exposição às ondas eletromagnéticas, ocorreram alterações significativas na estrutura testicular e epididimária. Houve evidências claras de degeneração tecidual progressiva, acompanhada inicialmente por infiltrado inflamatório seguida de áreas extensas de necrose tecidual. Não foram observados espermatozoides em nenhum dos pacientes deste estudo.

Outro aspecto crucial abordado foi a avaliação do grau de dor associado ao procedimento. Com a utilização criteriosa de protocolos anestésicos e analgésicos adequados, os animais não apresentaram dor significativa no período pós-procedimento imediato e tardio. A aplicação combinada de meloxicam e dipirona foi suficiente para controlar o desconforto, reforçando que a técnica de fotohipertermia, além de eficaz, atende aos critérios de bem-estar animal, minimizando o sofrimento associado à castração.

Destaca-se também que, embora os resultados obtidos tenham sido promissores para o objetivo proposto, são necessários mais estudos para garantir a eficácia dessa técnica a longo prazo. A avaliação histopatológica apontou substituição gradual do parênquima testicular por tecido necrótico e cicatricial, sugestivo de dano permanente, porém é essencial monitorar efeitos de mais longo prazo, não só nos aspectos reprodutivos, mas também possíveis efeitos adversos tardios. Além disso, futuros trabalhos devem considerar uma maior amostragem e um período de observação prolongado para reforçar a consistência dos resultados.

Em suma, a técnica de fotohipertermia mediada por nanopartículas revelou-se uma alternativa viável e promissora à orquiectomia tradicional, proporcionando infertilidade com mínimo desconforto para os animais. Dada a importância do controle populacional de gatos errantes para a saúde pública e

conservação ambiental, esta abordagem inovadora pode oferecer benefícios significativos em programas de esterilização em massa.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDAHAN, R. A.; STANTON, P. G. Heat stress response of somatic cells in the testis. *Elsevier*, v. 527, p. 116–216, 2021a.

ALDAHAN, R.; STANTON, P. G. The blood-testis barrier and its influence on the pathogenesis and prevention of male infertility. *Biology of Reproduction*, v. 105, n. 2, p. 304–314, 2021b.

ANSARI, A. S. et al. Reproductive functions and toxicology following scrotal ultrasound therapy in rats. *International Journal of Science and Research in Biological Sciences*, v. 7, p. 15–24, 2020.

BATISTA, C. F. et al. Programa de controle populacional de cães errantes em áreas urbanas. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 37, n. 2, p. 1–7, 2015.

BEGALLI, J. H. Manejo populacional de cães e gatos. 2020. Tese para obtenção de título de Doutor (Ciência Animal); Universidade Federal De Minas Gerais Escola de Veterinária; Belo Horizonte, 20 de fevereiro de 2020. Disponível em: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/35217/1/TESE_formatada2020.pdf. Acesso em 14 de abril de 2025

BISCHOF, R. et al. Mapping the “catscape” formed by a population of pet cats with outdoor access. *Nature*, v. 12, n. 1, p. 5964, 2022.

BRASIL. Lei nº 13.426, de 30 de março de 2017. Dispõe sobre a política de controle de natalidade de cães e gatos. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 31 mar. 2017.

BRASIL. Lei nº 14.228, de 20 de outubro de 2021. Proíbe a eliminação de cães e gatos por órgãos de controle de zoonoses. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 21 out. 2021.

DE BRITO, J L M et al. Acute reproductive toxicology after intratesticular injection of silver nanoparticles (AgNPs) in Wistar rats. *Nanotoxicology*, v. 14, n. 7, p. 893–907, 2020.

CATAPAN, D. C. et al. Characteristics of animal protection non-governmental organizations in the state of Paraná / Brazil: qualitative-quantitative analysis. *Medicina Veterinária (UFRPE)*, v. 15, n. 3, p. 216–223, 2021.

CHERUKURI, P.; GLAZER, E. S.; CURLEY, S. A. Targeted hyperthermia using metal nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 62, n. 3, p. 339–345, 2010.

COIMBRA, J. L.P. et al; Gold nanoparticle intratesticular injections as a potential animal sterilization tool: Long-term reproductive and toxicological implications. *Toxicology*, v. 492, p. 153543, 2023.

DIAGONE, K. V. Histologia e morfometria dos testículos de gatos domésticos adultos. 2009. 41 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2009. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/101120>. Acesso em: 11 abr. 2024.

FAGUNDES, A. K. B. et al. Contraceptive effect of zinc gluconate in the reproductive system of cats. *Theriogenology*, v. 81, n. 1–2, p. 230–236, 2014.

FAHIM, M. S. et al. Thermic sterilization: a new approach to male contraception. *Contraception*, v. 11, n. 5, p. 550–562, 1975.

FAO – Dog Population Management; FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura; FAO/WSPA/IZSAM Expert Meeting Banna, Itália 14-19 Março 201; Disponível em: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/https://openknowledge.fao.org/server/api/core/bitstreams/b34c687f-52d3-4b54-acd3-1f5364228891/content. Acesso em 14 de abril de 2025.

FRANÇA, L. R.; GODINHO, C. L. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). *Biology of Reproduction*, v. 68, n. 5, p. 1554–1561, 2003.

GERHOLD, R. W.; JESSUP, D. A. Zoonotic diseases associated with free-roaming cats. *Zoonoses and Public Health*, v. 60, n. 3, p. 189–195, 2012.

GOLDEN, N. L. Injectable sterilants for male dogs: considerations for implementation. *Theriogenology*, v. 82, n. 5, p. 747–753, 2014.

GOMES, V. H. et al. Ketamine–dexmedetomidine combined with local anesthesia, with or without different doses of atipamezole in the postoperative period, for orchiectomy in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 261, n. 2, p. 217–222, 2023.

GRIMM, K. A. et al. (Ed.). *Veterinary Anesthesia and Analgesia: The Fifth Edition of Lumb and Jones*. 5. ed. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2015.

HADAD, Y. C. R. *Esterilização em cães e gatos: aspectos quali quantitativos e etnológicos no município de Mãe do Rio, Pará*. 2019. 46 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2019. Disponível em: <http://www.bdta.ufra.edu.br/jspui/handle/123456789/1799>. Acesso em: 11 abr. 2024.

IMMEGART, H. M.; WALTER, T. R. Evaluation of intratesticular injection of glycerol for non-surgical sterilization of dogs. *American Journal of Veterinary Research*, v. 61, p. 544–549, 2000.

INGWERSEN, W. P. et al. Efficacy and safety of 3 versus 5 days of meloxicam as an analgesic for feline onychectomy and sterilization. *Canadian Veterinary Journal*, v. 53, n. 4, p. 257–264, 2012.

JANA, K.; SAMANTA, P. K. Clinical evaluation of non-surgical sterilization of male cats with single intra-testicular injection of calcium chloride. *BMC Veterinary Research*, v. 7, p. 39, 2011.

JANA, K. et al. Evaluation of a non-surgical method for sterilization of male animals using calcium chloride. *Animal Reproduction Science*, v. 86, n. 3–4, p. 317–329, 2005.

JIVAGO, J, L; et al. New Prospects in Neutering Male Animals Using Magnetic Nanoparticle Hyperthermia. *Pharmaceutics*, v. 13, n. 9, p. 1465, 2021.

JOHNSON, A. K. Normal feline reproduction: The tom. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v. 24, n. 3, p. 212–220, 2022.

KANTER, M; AKTAS, C. Effects of scrotal hyperthermia on Leydig cells in long-term: a histological, immunohistochemical and ultrastructural study in rats. *Journal of Molecular Histology*, v. 40, n. 2, p. 123–130, 2009.

KASTELIC, J. P.; BYRNE C. R.; COULTER, G. H. Scrotal/Testicular Thermoregulation and the Effects of Increased Testicular Temperature in the Bull. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, v. 13, n. 2, p. 271–282, 1997.

KITTS-MORGAN, S. E. COMPANION ANIMALS SYMPOSIUM: Sustainable Ecosystems: Domestic cats and their effect on wildlife populations. *Journal of Animal Science*, v. 93, n. 3, p. 848, 2015.

KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H. G. *Anatomia dos animais domésticos: texto e atlas colorido*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. p 425-436

KUTZLER, M. A. Reproductive physiology of the male cat. In: JOHNSON, S. D. et al. (Ed.). *Reproductive biology and disease of the dog and cat*. 2. ed. Philadelphia: Elsevier, 2022. p. 211–220.

LEELAKAJORNKIT, S. et al. Clinical trials of intratesticular administration of nanostructured lipid carriers encapsulated alpha-mangostin: safety and efficacy on feline reproductive health. *Theriogenology*, v. 231, p. 240–249, 2025.

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

LI, X. *et al.* Photothermal ablation of testicular tissue using gold nanorods in mice. *Nano Letters*, v. 13, n. 2, p. 505–512, 2013.

LIU, Z. *et al.* Single-layer tungsten oxide as intelligent photo-responsive nanoagents for permanent male sterilization. *Biomaterials*, v. 69, p. 56–64, 2015.

LOUVANDINI, H. *et al.* Características biométricas testiculares em carneiros Santa Inês submetidos a diferentes níveis de proteína na dieta e infecção parasitária. *Ciência Animal Brasileira*, v. 9, n. 3, p. 638–647, jul./set. 2008.

MACPHAIL, C. M. Neutering and castration in small animals. In: SLATTER, D. H. (Org.). *Textbook of small animal surgery*. 3. ed. Philadelphia: Saunders, 2015.

MADBOULY, H *et al.* Efficacy of Intratesticular Glycerol Injection as Male Cat Contraception in Comparison with Two Surgical Approaches. *Topics in Companion Animal Medicine*, v. 42, p. 100493, 2021.

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

MELLO, O. Captura, esterilização e devolução: uma proposta de manejo para populações felinas. In: CONFERÊNCIA INTERNACIONAL DE MEDICINA VETERINÁRIA DO COLETIVO, 7., 2016, Porto Alegre. *Anais*. Porto Alegre: [s.n.], 2016.

MESCHER, A. L.; JUNQUEIRA, L. C. *Junqueira – Histologia básica*. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

MEYER, D. J.; HARVEY, J. W. *Veterinary Laboratory Medicine: Interpretation and Diagnosis*. 3. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2004.

MOHAMED, A. *et al.* Chemical castration in dogs using calcium chloride: effects on testicular hemodynamics and semen characteristic and serum levels of testosterone. *BMC Veterinary Research*, v. 20, n. 1, p. 511, 2024.

MORAES, C. F. *et al.* Local anesthetic techniques for feline castration: a comparative study. *Veterinary Anesthesia and Analgesia*, v. 40, n. 2, p. 145–150, 2013.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. *Medicina interna de pequenos animais*. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

NUÑEZ-FAVRE, R. et al. Effect of Natural Photoperiod on Epididymal Sperm Quality and Testosterone Serum Concentration in Domestic Cat (*Felis silvestris catus*). *Reproduction in Domestic Animals*, v. 47, n. s6, p. 232–234, 2012.

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

PHAM, K.; SCHULTZ, C. J. Testicular thermoregulation in mammals. *Biology of Reproduction*, v. 104, n. 2, p. 216–223, 2021.

PINTUS, E. et al. Spermatogenesis and testicular development in the domestic cat. *Cells*, v. 10, n. 624, p. 20–30, 2021.

QUARTERONE, C et al. Ovariohysterectomy requires more post-operative analgesia than orchiectomy in dogs and cats. *Canadian Veterinary Journal*, v. 58, p. 1191-1194, 2017.

SALLUM, P. C.; ALMEIDA, M. F.; MASSAD, E. Rabies seroprevalence of street dogs from São Paulo City, Brazil. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 45, n. 1–2, p. 131–139, 2000.

SEO, J. W. et al. Nanotechnology in medicine: therapeutic applications and developments. *Cancer Letters*, v. 241, n. 2, p. 167–175, 2006.

SETCHELL, B. P. The Parkes Lecture. Heat and the testis. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 114, n. 2, p. 179–194, 1998.

TOVO, B. G.; WILMSEN, M. O. Desafios no controle da superpopulação e abandono de cães e gatos: revisão de literatura. *Revista Foco*, v. 16, n. 7, p. e2702, 2023.

TSURUTA, K. et al. Application of testicular ultrasound for evaluation of azoospermia induced by hyperthermia. *Journal of Andrology*, v. 33, n. 6, p. 1285–1290, 2012.

TSUTSUI, T. et al. Spermatogenic function in cats. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 47, n. s6, p. 247–249, 2012.

VANDERSTICHEL, R.; FORZÁN, M. J.; PÉREZ, G. E.; et al. Changes in blood testosterone concentrations after surgical and chemical sterilization of male free-roaming dogs in southern Chile. *Theriogenology*, v. 83, n. 6, p. 1021–1027, 2015.

VIEIRA, F. N. Epidemiologia da raiva no Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v. 56, p. 98, 2022.

VILLALOBOS-GOMEZ, J. et al. A Retrospective Study of Laparoscopic Cryptorchidectomy in 19 Cats with Intra-Abdominal Testes. *Animals*, v. 13, n. 1, p. 181, 2023.

VULLO, C. et al. Comparison between the effects of epidural lidocaine, tramadol, and lidocaine–tramadol on postoperative pain in cats undergoing elective orchiectomy. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 65, n. 1, p. 33–47, 2023.

WALLACE, J. L.; LEVY, J. K. Population characteristics of feral cats admitted to trap-neuter-return programs. *Journal of Feline Medicine and Surgery* v. 229, n. 8, p. 1136–1138, 2006.

WATANABE, R. et al. Validation of the Feline Grimace Scale in assessing acute pain in cats. *Scientific Reports*, v. 12, p. 1453, 2022.

WIEBE, J. P.; KEVIN, J. B.; KEVIN, D. B. Sustained azoospermia in squirrel monkey, *Saimiri sciureus*, resulting from a single intratesticular glycerol injection. *Contraception*, v. 39, p. 447–457, 1989.

WOLF, P. J.; KREISLER, R. E.; LEVY, J. K. Cats Are Not Fish: A Ricker Model Fails to Account for Key Aspects of Trap–Neuter–Return Programs. **Animals**, v. 11, n. 7, p. 1928, 2021.

ZHANG, Y. et al. Effects of heat stress on reproductive function in male animals. *Animal Reproduction Science*, v. 198, p. 55–65, 2019.

ZIAEIPOUR, S. et al. Chronic scrotal hyperthermia induces azoospermia and severe damage to testicular tissue in mice. *Acta Histochemica*, v. 123, n. 4, p. 151712, 2021.