



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

DESENVOLVIMENTO DE UM PROTOCOLO DE FOTOHIPERTERMIA MEDIADA  
POR NANOPARTÍCULAS PARA PROMOÇÃO DE INFERTILIDADE DE ANIMAIS  
MACHOS

Vanessa Nicolau de Lima

Março  
2024



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

DESENVOLVIMENTO DE UM PROTOCOLO DE FOTOHIPERTERMIA MEDIADA  
POR NANOPARTÍCULAS PARA PROMOÇÃO DE INFERTILIDADE DE ANIMAIS  
MACHOS

ORIENTADORA: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Carolina Madeira Lucci

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do Título de Doutora em Biologia Animal.

Brasília - 2024

## AGRADECIMENTOS

Agradeço sinceramente a todas as pessoas que desempenharam um papel crucial nesse percurso. Minha orientadora, Carolina Lucci, pela orientação, apoio e sabedoria compartilhada ao longo dessa jornada acadêmica.

Meus pais, Rosane, Dielson e Geneci, pelo amor, incentivo e suporte incondicional em todas as fases da minha vida.

Minhas filhas, Mel e Natasha, fontes constantes de inspiração e motivação.

Minha esposa, Juliana, cujo apoio esteve sempre presente, sendo minha companheira não apenas na vida, mas também no laboratório.

Aos meus "irmãos" Victor e Vinicius (Gumball Quartz Universe) por, apesar da implicância, terem proporcionado momentos de risadas e descontração.

Aos amigos Andrei e Talita, por todos esses anos de amizade, escuta e incentivo. Ian e Mônica, parceiros de risadas e companhia constante. Amigas do CEP Saúde, professoras Wanessa, Maria Paula, Jéssica e Carol, pela amizade, ensinamentos e ombro amigo. A todos que pacientemente me ouviram nos momentos de desabafo, proporcionando palavras de estímulo que foram fundamentais ao longo da jornada.

Gostaria de expressar minha sincera gratidão às minhas coordenadoras, Clarice e Loiane, do CEP Saúde, pela compreensão ao longo da minha jornada no doutorado. Agradeço ambiente de trabalho positivo que tornaram possível superar desafios e alcançar metas.

Aos meus alunos do CEP Saúde, em especial Vitória e João Victor, pela valiosa ajuda no laboratório.

Às colegas de laboratório, Cecibel, Babu e Alie, e alunas de PIBIC, Gabriela, Júlia, Letícia, Rafaela pela parceria, ajuda e troca de conhecimento. Um agradecimento especial à Bruna e ao Luiz, cuja ajuda e risadas foram elementos essenciais para tornar o percurso mais leve.

À veterinária Aline Ramos, pela realização da ultrassonografia na primeira fase da pesquisa.

Ao Prof. Ricardo Bentes, sempre carinhoso e educado, que contribuiu significativamente para minha formação acadêmica e profissional.

Aos laboratórios parceiros que desempenharam papel fundamental, tornando possível a execução do projeto. especialmente ao Prof. Paulo Souza, e aos alunos Rodrigo Nunes, André Mariano e Juliana dos Anjos. Prof. Andris Bakuzis e ao aluno Marcos Vinicius Araujo, do Laboratório de Ressonância Magnética Eletrônica (UFG), pela colaboração essencial. Professores Marcelo Sousa e Breno Cunha do Laboratório de Nanoverde,

Prof. Osmindo Rodrigues e técnico Adolfo, pelo uso do liofilizador.

Prof. Sergio Moya e técnica Raquel Pazos do Centro de Investigación Cooperativa de Biomateriales, CIC biomaGUNE, pela análise de ICP-MS das nanopartículas de ouro.

Prof. Sônia Bão e técnica Ingrid, pela análise em microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas de citrato.

Veterinário Jivago, veterinária Carina, e técnicos do biotério Jaime e Juliana, pelo cuidado e responsabilidade com os animais.

Profa. Mônica Garcia, pela disponibilização do microscópio EVOS, e técnica Karen, pelo suporte técnico.

Profa. Connie McManus e Dallago, pela disponibilização da câmera termográfica.

Agências de fomento FAPDF, CAPES e CNPq, por tornarem possível a realização desta pesquisa.

A todos, meu mais profundo agradecimento por contribuírem de maneira tão significativa para o sucesso deste projeto de doutorado.

## RESUMO

A superpopulação de animais errantes é um problema global, levantando preocupações sobre a reprodução descontrolada e riscos à saúde pública. A nanotecnologia oferece um potencial para castração através da fotohipertermia mediada por nanopartículas (FHT), mostrando-se promissora para o controle da população animal. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da fotohipertermia testicular mediada por nanopartículas de maghemita recobertas com citrato e ouro (NPAu) e nanopartículas de ferrita de manganês funcionalizadas com citrato (NPCit) nos parâmetros reprodutivos de ratos Wistar. Foram utilizados no total 49 ratos Wistar (aproximadamente 10 semanas de idade). O tratamento por FHT foi realizado com a injeção intratesticular de 150 µL do fluido (NPAu ou NPCit) combinados com a irradiação de LED visando atingir a temperatura de aproximadamente 45 °C por 15 minutos. Avaliações de parâmetros reprodutivos foram feitas até 56 dias, tempo necessário para que ocorra a espermatogênese completa em ratos. Os resultados mostraram que a FHT testicular mediada pelas NPAu proporcionou danos progressivos a parâmetros reprodutivos dos animais, como: redução do volume testicular e redução da porcentagem de espermatozoides móveis, porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais e número de espermatozoides na cauda dos epidídimos. Além disso, a avaliação histopatológica dos testículos aos 7, 28 e 56 dias após o tratamento revelou dano progressivo aos túbulos seminíferos. No entanto, túbulos seminíferos intactos ainda estavam presentes até o final das avaliações, sugerindo que o efeito não foi completo. A FHT testicular mediada pelas NPCit inicialmente mostrou resultados semelhantes aos obtidos com a NPAu, porém foi possível identificar que os túbulos seminíferos intactos estavam localizados na periferia dos testículos, mesmo com a presença de aglomerados de nanopartículas na região. Este achado sugeriu uma ineficiência na penetração da luz no tecido, que possivelmente não estava atingindo as nanopartículas do lado oposto à incidência do LED. Assim, um novo equipamento com 2 LEDs foi utilizado para a FHT mediada por NPCit, e os resultados mostraram uma destruição mais homogênea dos túbulos seminíferos. A análise histopatológica mostrou danos irreversíveis à espermatogênese, com agravamento progressivo com o passar do tempo. Além disso os parâmetros espermáticos e a morfometria testicular também foram afetados negativamente. Em todos os casos, independente da nanopartícula utilizada, não houve dor ou comprometimento do ganho de peso dos animais, e a histologia de fígado, baço, rim e pulmões não foi afetada pelo procedimento. Em conclusão, a aplicação de fotohipertermia mediada por nanopartículas (NPCit e NPAu) diretamente aos testículos resultou em efeitos prejudiciais importantes aos parâmetros reprodutivos de ratos em um período de curto prazo (56 dias), se mostrando um procedimento promissor para causar infertilidade em animais machos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Esterilização de machos, nanocastração, nanopartículas magnéticas, terapia fototérmica.

## ABSTRACT

The overpopulation of stray animals is a global issue, raising concerns about uncontrolled reproduction and risks to public health. Nanotechnology presents potential for castration through nanoparticle-mediated photohyperthermia (FHT), showing promise for animal population control. The aim of this study was to assess the effect of testicular photohyperthermia mediated by maghemite nanoparticles coated with citrate and gold (NPAu) and citrate-functionalized manganese ferrite nanoparticles (NPCit) on the reproductive parameters of Wistar rats. A total of 49 Wistar rats (approximately 10 weeks old) were used. NHT treatment involved intratesticular injection of 150  $\mu$ L of fluid (NPAu or NPCit) combined with LED irradiation to achieve a temperature of approximately 45°C for 15 minutes. Reproductive parameter evaluations were conducted up to 56 days, the time required for complete spermatogenesis in rats. Results indicated that testicular NHT mediated by NPAu led to progressive damage to reproductive parameters, including reduced testicular volume and percentages of motile and morphologically normal sperm, as well as the number of sperm in the epididymal tail. Additionally, histopathological evaluation of testicles at 7, 28, and 56 days post-treatment revealed progressive damage to seminiferous tubules. However, intact seminiferous tubules were still present at the end of the assessments, suggesting incomplete effects. Testicular NHT mediated by NPCit initially showed similar results to NPAu; however, it was identified that intact seminiferous tubules were located at the periphery of the testicles, even with the presence of nanoparticle clusters in the region. This finding suggested inefficient light penetration into the tissue, possibly not reaching nanoparticles on the opposite side of LED incidence. Therefore, a new device with 2 LEDs was used for NPCit-mediated NHT, and the results demonstrated more homogeneous destruction of seminiferous tubules. Histopathological analysis revealed irreversible damage to spermatogenesis, worsening progressively over time. Additionally, spermatogenic parameters and testicular morphometry were also negatively affected. In all cases, regardless of the nanoparticle used, there was no pain or compromised weight gain in the animals, and the histology of the liver, spleen, kidneys, and lungs was not affected by the procedure. In conclusion, the application of nanoparticle-mediated photohyperthermia (NPCit and NPAu) directly to the testicles resulted in significant harmful effects on the reproductive parameters of rats in a short-term period (56 days), proving to be a promising procedure for inducing infertility in male animals.

**KEYWORDS:** Male sterilization, nanocastration, magnetic nanoparticles, photothermal therapy.

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>3</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>4</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>5</b>
<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>5</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>7</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>8</b>
2.1. ANIMAIS ERRANTES .....	8
2.2. SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO.....	9
2.2.1. <i>Anatomia e fisiologia</i> .....	9
2.2.2. <i>Espermatogênese</i> .....	10
2.2.3. <i>Termorregulação testicular</i> .....	13
2.3. MÉTODOS DE ESTERILIZAÇÃO DE MACHOS.....	15
2.4. NANOTECNOLOGIA .....	19
2.5. NANOPARTÍCULAS.....	19
2.5.1. <i>Toxicidade</i> .....	22
2.5.2. <i>Hipertermia</i> .....	22
2.5.3. <i>Nanocastração</i> .....	23
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>27</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
4.1. OBJETIVOS GERAIS .....	28
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	28
<b>5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>29</b>
<b>6. CAPÍTULO 2 - FOTOHIPERTERMIA TESTICULAR MEDIADA POR NANOPARTÍCULAS DE MAGHEMITA RECOBERTAS COM CITRATO E OURO</b> .....	<b>38</b>
6.1. INTRODUÇÃO.....	38
6.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	38
6.2.1. <i>Nanopartículas de Ouro</i> .....	38
6.2.2. <i>Fonte de luz e controle da potência luminosa</i> .....	39
6.2.3. <i>Animais e Desenho experimental</i> .....	40
6.2.4. <i>Parâmetros avaliados</i> .....	43
6.2.5. <i>Quantificação das Nanopartículas nos órgãos</i> .....	45
6.2.6. <i>Análise Estatística</i> .....	45
6.3. RESULTADOS .....	46
6.4. DISCUSSÃO .....	62
6.5. CONCLUSÃO .....	66
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>67</b>
<b>8. CAPÍTULO 3 – FOTOHIPERTERMIA TESTICULAR MEDIADA POR NANOPARTÍCULAS DE FERRITA DE MANGANÊS FUNCIONALIZADAS COM CITRATO</b> .....	<b>70</b>
8.1. INTRODUÇÃO.....	70
8.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	70

8.2.1.	<i>Nanopartícula de Ferrita de Manganês com citrato</i> .....	70
8.2.2.	<i>Fonte de luz e controle da potência luminosa</i> .....	72
8.2.3.	<i>Animais e Desenho experimental</i> .....	72
8.2.4.	<i>Análise Estatística</i> .....	72
<b>8.3.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>72</b>
<b>8.4.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>78</b>
<b>8.5.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>79</b>
<b>9.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>80</b>
<b>10.</b>	<b>CAPÍTULO 4 – FOTOHIPERTERMIA TESTICULAR MEDIADA POR NANOPARTÍCULAS DE FERRITA DE MANGANÊS FUNCIONALIZADAS COM CITRATO UTILIZANDO UM EQUIPAMENTO PARA IRRADIAÇÃO DE LUZ COM 2 LEDS</b> .....	<b>81</b>
<b>10.1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>81</b>
<b>10.2.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>81</b>
10.2.1.	<i>Nanopartículas</i> .....	81
10.2.2.	<i>Fonte de luz e controle da potência luminosa</i> .....	81
10.2.3.	<i>Animais e Desenho experimental</i> .....	82
10.2.4.	<i>Análise Estatística</i> .....	84
<b>10.3.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>84</b>
<b>10.4.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>99</b>
<b>10.5.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>102</b>
<b>11.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>103</b>
<b>12.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>105</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), há mais de 30 milhões de animais vivendo em situação de abandono no Brasil. Esses animais se tornam um risco para a saúde pública por transmitirem doenças, causam desequilíbrio à fauna local por meio da predação de animais de pequeno porte e contaminam o meio ambiente com a dispersão de lixo doméstico. Uma das maiores preocupações a esse respeito é o elevado grau de reprodução desses animais. Dessa forma, o controle da população por meio da castração e educação da população sobre posse responsável é o método mais indicado.

Há dois tipos de castração para machos: a cirúrgica e a não cirúrgica. A mais comum é a cirúrgica, que consiste na retirada total dos testículos (orquiectomia) e é o método mais aceito pelos proprietários de animais. No entanto, esse método apresenta alto custo, necessidade de ambiente controlado e asséptico, profissionais especializados, além de riscos no pós-operatório. Já a castração não cirúrgica (química) é realizada por meio de uma injeção intratesticular à base de uma solução esclerosante. A castração química apresenta vantagens como custo baixo, a possibilidade de esterilizar uma quantidade maior de animais em um único dia, simplicidade do processo e ausência de pós-operatório. No entanto, a castração química causa inflamação e desconforto nos animais e, apesar dos inúmeros estudos, ainda não há relatos provando que esse método seja irreversível.

Com o potencial da nanotecnologia, a aplicação de hipertermia testicular mediada por nanopartículas é uma possibilidade de castração para animais machos, uma vez que o aumento da temperatura testicular pode comprometer a produção de espermatozoides. Essa técnica já vem sendo aplicada em estudos alternativos de castração. Inclusive estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa mostraram resultados promissores utilizando a magnetohipertermia testicular mediada por nanopartículas. No entanto, a fotohipertermia mediada por nanopartículas poderia ser ainda mais vantajosa pela praticidade e portabilidade que ela confere.

A fotohipertermia utiliza as propriedades que algumas nanopartículas apresentam que permitem a absorção de energia proveniente de irradiação de luz, resultando em conversão em calor. Logo, o objetivo deste estudo foi desenvolver um método de promover a infertilidade em animais machos por meio da fotohipertermia mediada por nanopartículas aplicada diretamente aos testículos. Para isso, foram avaliados dois fluidos magnéticos distintos, a nanopartícula de maghemita recoberta com citrato e ouro e a nanopartícula de ferrita de manganês funcionalizada com citrato, administrados por via intratesticular, associados a irradiação de luz por diodo emissor de luz (LED).

## 1.1. REVISÃO DE LITERATURA

### 1.2. Animais errantes

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) referentes a 2022, o Brasil contava com aproximadamente 30 milhões de animais abandonados em suas ruas, sendo 10 milhões de gatos e 20 milhões de cães. No Distrito Federal, um levantamento realizado pela Confederação Brasileira de Proteção Animal em 2021 estima que existam cerca de 700 mil animais abandonados. Além da superpopulação, esses animais apresentam uma alta taxa de reprodução (Behaver, 2003). Um casal de gatos, gerando oito filhotes por ano, pode produzir até 781.250 descendentes diretos e indiretos em um período de sete anos (Olson & Johnston, 1993). É possível calcular uma estimativa do número de descendentes de um casal de gatos em até 10 anos, considerando fatores como taxa de mortalidade, número de gatos por ninhada e número de fêmeas, em uma página na internet.<sup>1</sup>

Há uma grande preocupação em relação à saúde pública, já que esses animais contribuem diretamente para a contaminação ambiental, através do lixo doméstico espalhado nas ruas, transmissão de zoonoses e até mesmo desequilíbrio ambiental, devido à predação de fauna nativa (Joffily *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2013). Durante muito tempo utilizou-se a eutanásia como medida de controle populacional nos Centros de Controle de Zoonose. No entanto, esse método não se mostra eficiente, gerando gastos públicos e ciclos de mortes contínuas, além de ir contra os princípios humanitários dos direitos dos animais (Saito *et al.*, 2002; Almeida, 2011). Essa contraposição levou instituições de destaque, incluindo a Organização Mundial de Saúde, a Organização Mundial de Saúde Animal, o Ministério da Saúde do Brasil e o Conselho Federal de Medicina Veterinária, a desencorajarem a utilização dessa prática para o controle populacional de cães e gatos (Paula Junior, 2022). No cenário brasileiro, a Lei nº 14.228/2021 estabelece de forma clara a proibição da eliminação da vida de cães e gatos nos Centros de Controle de Zoonoses, refletindo uma mudança legislativa recente. Adicionalmente, a criação do Departamento de Proteção, Defesa e Direitos Animais, vinculado ao Ministério do Meio Ambiente, junto com a implementação de um Programa de manejo populacional ético de cães e gatos, representa uma abordagem ética e humanitária para o controle populacional de animais. Nesse contexto, a implementação de medidas de controle populacional voltadas para o bem-estar animal torna-se essencial (Vanderstichel *et al.*, 2015).

---

<sup>1</sup><https://calculate-this.com/420000-kittens-unspayed-cat-kitten-calculator>

Estudos já demonstraram que a esterilização é o método mais efetivo para o controle populacional de animais errantes. Dessa maneira, em cinco anos de campanhas de esterilização, seria possível haver uma redução de até 20% na população canina (Amaku *et al.*, 2009; Bastos *et al.*, 2013). Um exemplo disso é o controle de colônias de felinos e matilhas através da técnica denominada Captura, Esterilização e Devolução (CED), que já vem sendo realizada em diversos países (Boone & Slater, 2014). A CED realizada nas principais capitais da Austrália resultou em uma redução das colônias de gatos ferais em 31% em dois anos (Tan, 2017). A Holanda se tornou o primeiro país sem animais abandonados, utilizando apenas a CED (Sternheim, 2012).

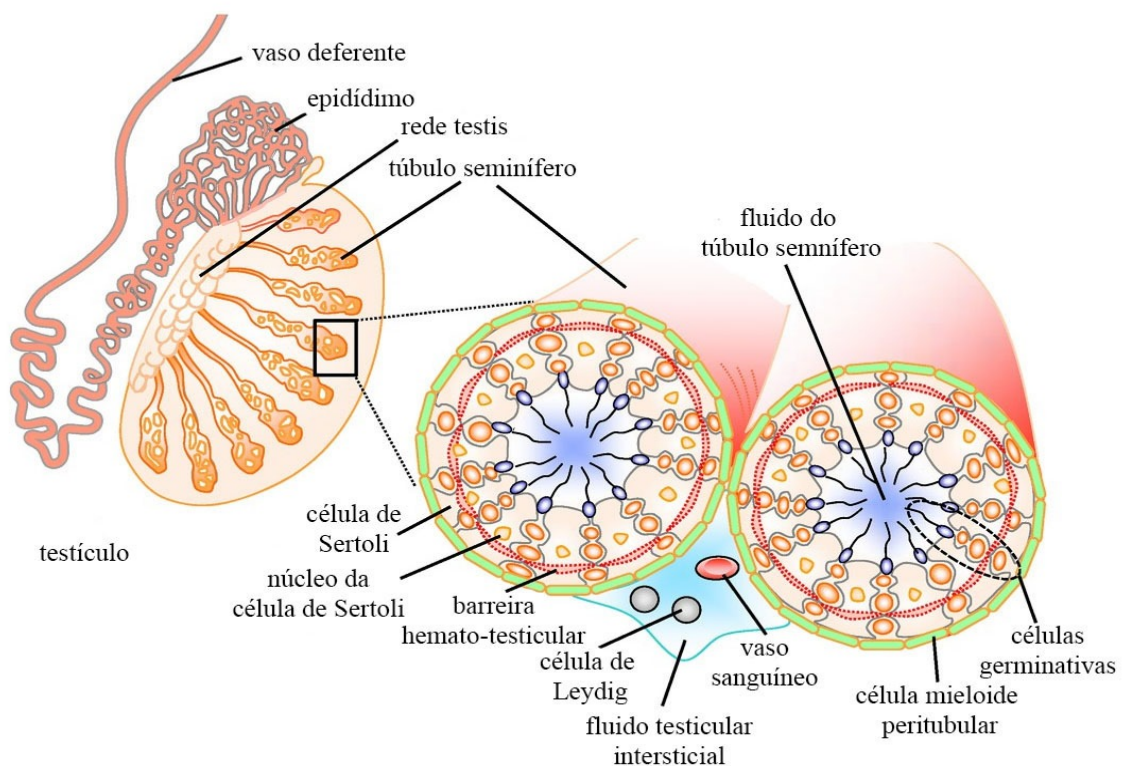
### **1.3. Sistema reprodutor masculino**

#### *1.3.1. Anatomia e fisiologia*

O sistema reprodutor masculino dos mamíferos é composto pelo pênis, saco escrotal, testículos, túbulos retos, túbulos eferentes, epidídimos, vasos deferentes e glândulas acessórias, incluindo a próstata, vesículas seminais e glândulas bulbouretrais (Reece *et al.*, 2015). Em animais domésticos, como cães e gatos, algumas características marcantes são observadas, como o osso peniano e a ausência das glândulas acessórias (exceto a próstata) em cães e a presença de espículas nos pênis dos gatos (Stanbenfeld & Edqvist, 1996).

Os testículos apresentam forma oval e estão localizados no saco escrotal, fora da cavidade abdominal, para manter a temperatura testicular mais baixa do que a temperatura corporal. Essa temperatura é crucial para o desenvolvimento normal dos espermatozoides. Os testículos são as gônadas sexuais masculinas, e desempenhando duas funções principais: a produção de células germinativas, que geram os espermatozoides responsáveis por transmitir os genes para a futura prole, e a produção de hormônios andrógenos, que definem as características masculinas e o comportamento sexual do indivíduo. Os testículos (Figura 1) são divididos em dois compartimentos, o compartimento tubular e o compartimento intersticial (Reece *et al.*, 2015). O compartimento tubular é composto por túbulos finos e emaranhados denominados túbulos seminíferos. Neles existem dois tipos celulares: as células espermatogênicas (espermatogônias, espermatócitos e espermátides), produtoras de espermatozoides no processo conhecido como espermatogênese, e as células de Sertoli, que dão sustentação e suporte ao processo da espermatogênese. As células de Sertoli se unem umas às outras, criando junções oclusivas que separam os compartimentos basal e adluminal, conhecido como barreira hematotesticular. Essa barreira faz com que qualquer substância atravesse primeiro as células

de Sertoli, impedindo assim uma resposta imune do corpo contra os gametas em desenvolvimento e estabelecendo um ambiente intratubular diferenciado (Berne & Levy, 2018). Entre os túbulos seminíferos, encontram-se as células de Leydig, que secretam testosterona, hormônio que incita a manifestação das características masculinas, da libido e possui um papel importante na espermatogênese (Tortora & Derrickson, 2010). Na superfície de cada testículo, encontram-se os epidídimos, divididos em cabeça, corpo e cauda. Os espermatozoides ficam armazenados na cauda dos epidídimos e nos ductos deferentes por vários meses até serem ejaculados (Berne & Levy, 2018).



Adaptado de Stanton et al. 2016

Figura 1: Desenho esquemático dos compartimentos internos dos testículos de mamíferos.

### 1.3.2. Espermatogênese

A espermatogênese é um processo fundamental para assegurar a fertilidade masculina, desempenhando um papel crucial na continuidade da espécie. Esse processo tem início na puberdade e se estende por toda a fase adulta do indivíduo do sexo masculino, compreendendo as etapas de mitose, meiose e diferenciação celular. Nos túbulos seminíferos, as células da linhagem germinativa se dividem para originar células-filhas, que subsequentemente passam por um processo de diferenciação até se tornarem espermatozoides maduros (Koeppen & Stanton, 2009). A espermatogênese (Figura 2) pode ser subdividida em três fases principais:

(1) a proliferação e diferenciação das espermatogônias, (2) a fase de meiose e (3) a espermiogênese, que consiste na transformação das espermátides redondas em espermatozoides maduros (Sharma & Agarwal, 2011).

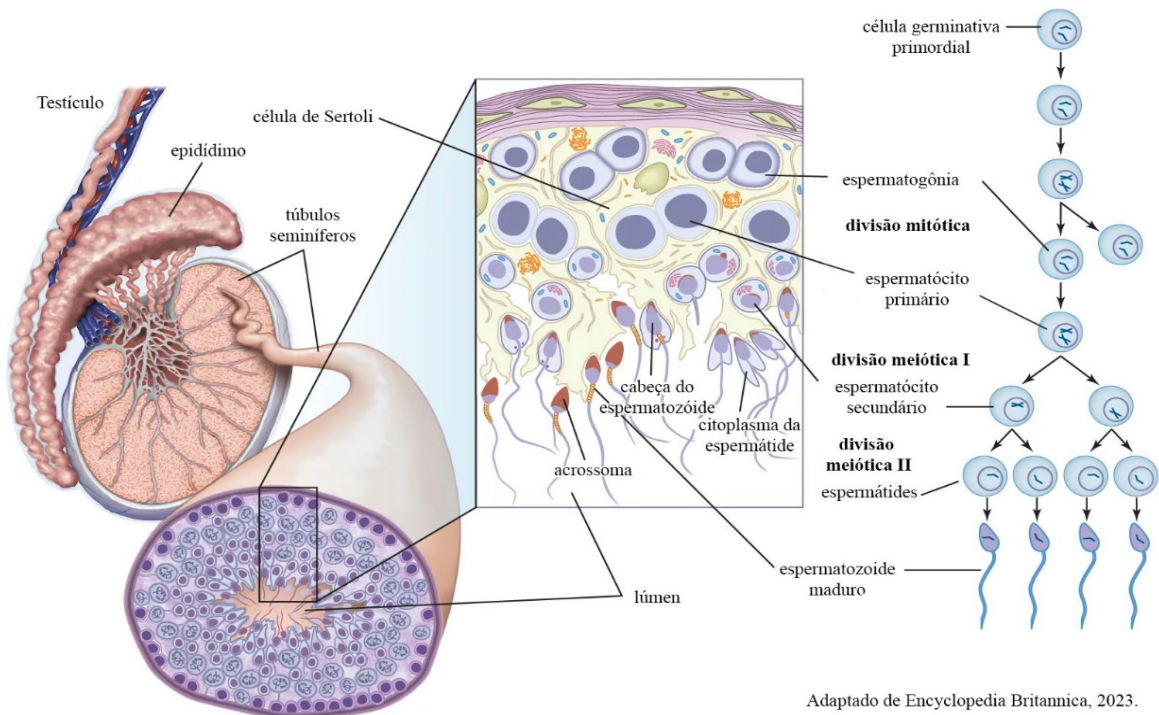
A mitose é a primeira fase da espermatogênese, que ocorre no compartimento basal e inicia a produção de um grande número de células germinativas. Essa fase ocorre quando a maturidade sexual é atingida. O desenvolvimento das células germinativas compreende uma sequência complexa e é organizado em subtipos, de acordo com o estágio de diferenciação que envolve as espermatogônias tipo A e tipo B. As células espermatogênicas de reserva são as espermatogônias do tipo A, as quais, quando se dividem, geram outra espermatogônia do tipo A e uma do tipo B. As espermatogônias do tipo A substituem as células precursoras, enquanto as espermatogônias do tipo B passam por um número pré-determinado de mitoses (espécie-específico) e entram em meiose, produzindo a partir daí os espermatócitos primários (Reece *et al.*, 2015; Sharma & Agarwal, 2014).

As espermatogônias do tipo B entram na espermatogênese em algum ponto do túbulo seminífero e, após um intervalo de tempo, neste mesmo ponto do túbulo, um novo grupo de espermatogônias do tipo B entra na espermatogênese. Dessa forma, as células espermatogênicas anteriores passam para um estágio mais avançado de desenvolvimento de forma sincronizada. Os estágios de diferenciação apresentam ciclos ordenados conhecidos como ciclo do epitélio seminífero, responsável por garantir que a espermatogênese se inicie e se propague de forma definida. Dentro dos túbulos seminíferos, os grupos de células espermatogênicas encontram-se em estágios específicos da espermatogênese. A duração do ciclo, assim como da espermatogênese, é sempre constante em cada espécie, mas varia entre elas (Reece *et al.*, 2015; Sharma & Agarwal, 2014). A relação entre a duração do ciclo do epitélio seminífero e da espermatogênese é bastante precisa, sendo o ciclo do epitélio seminífero um quarto da duração da espermatogênese (Schatten & Constantinescu, 2008; Reece *et al.*, 2015).

A segunda etapa da espermatogênese é a meiose, que tem como finalidade reduzir o número de cromossomos da célula da linha germinativa, transformando uma célula diploide ( $2n$ ) em uma célula haploide ( $n$ ). Nessa fase, os espermatócitos primários migram para o compartimento adluminal e passam pela primeira divisão meiótica, dando origem a dois espermatócitos secundários, ainda com cada cromossomo possuindo duas cromátides (Sharma & Agarwal, 2011).

Em seguida, ocorre a segunda divisão meiótica, resultando na formação de quatro espermátides esféricas haploides a partir dos espermatócitos diploides. Essas espermátides passam por um processo chamado espermiogênese, no qual ocorrem diversas mudanças morfológicas e as espermátides se diferenciam em espermatozoides. Durante o processo de espermiogênese, ainda associado às células de Sertoli, ocorrem mudanças morfológicas significativas, culminando na formação dos espermatozoides. Isso inclui o desenvolvimento da cauda, que contém estruturas microtubulares que facilitam a propulsão do espermatozoide. A cromatina no núcleo do espermatozoide se condensa, e uma grande parte do citoplasma é reduzida. O complexo de Golgi e as mitocôndrias sofrem desenvolvimento e diferenciação. Por fim, o acrossomo amadurece, e as estruturas intermediárias e da cauda são desenvolvidas. (Schatten & Constantinescu, 2008; Berne & Levy, 2009; Sharma & Agarwal, 2011).

Posteriormente, ocorre a espermiação, o processo pelo qual os espermatozoides são liberados das células de Sertoli. Esses espermatozoides então migram para o lúmen dos túbulos seminíferos e, com a assistência de um líquido secretado pelas células de Sertoli, são impulsionados pelos túbulos em direção aos epidídimos, uma vez que ainda não possuem capacidade de locomoção independente (Tortora & Derrickson, 2009). A maturação completa dos espermatozoides ocorre nos epidídimos, onde seus flagelos tornam-se funcionais, e podem ser armazenados lá por vários meses (Koeppen & Stanton, 2009).

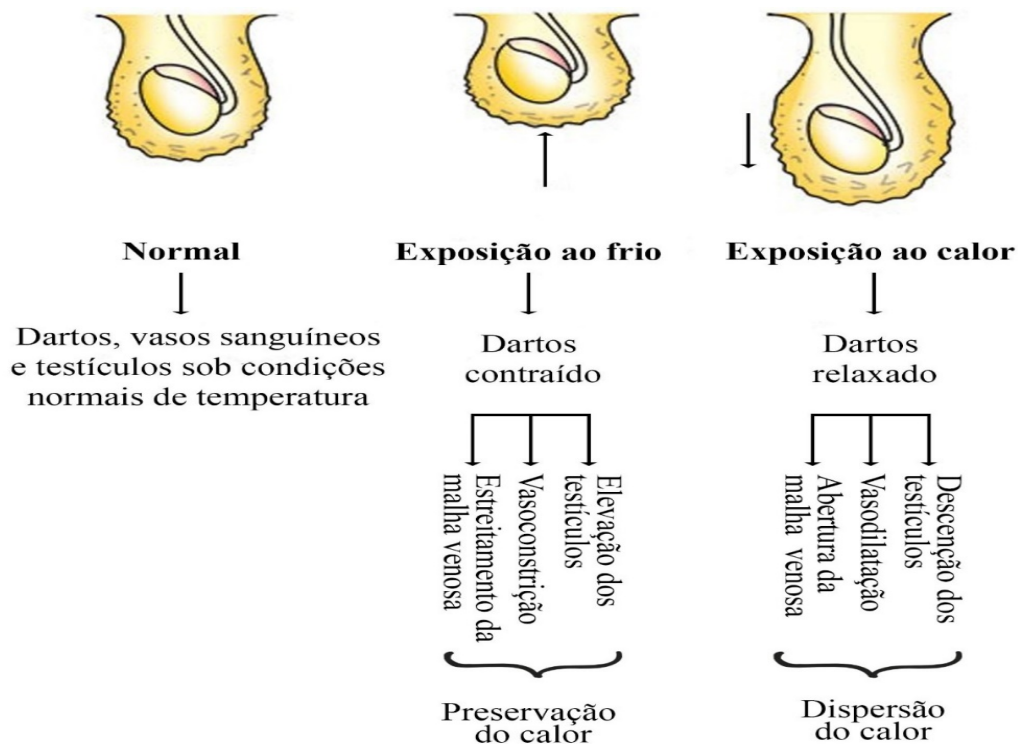


Adaptado de Encyclopedia Britannica, 2023.

Figura 2: Representação gráfica dos processos da espermatogênese.

### 1.3.3. Termorregulação testicular

A termorregulação testicular é um processo de manutenção da temperatura dos testículos que ocorre por meio do cone vascular testicular, localizado na parte superior do testículo, que é responsável pela regulação do fluxo sanguíneo para possibilitar a troca de calor contracorrente (Barros *et al.*, 2011; Kastelic *et al.*, 2018). A localização extrabdormal dos testículos permite que o cone vascular testicular seja exposto mais facilmente ao ambiente, aumentando a dissipação do calor. Além disso, a pele escrotal é delgada e possui pouco tecido adiposo, facilitando a perda térmica por irradiação e evaporação (Vieira *et al.*, 2018). A túnica dartus e os músculos cremáster também possuem um importante papel na termorregulação testicular, relaxando ou contraindo, e assim, controlando a posição dos testículos em relação ao corpo em função da temperatura ambiente (Figura 3), conhecido como reflexo cremastérico (Hafez & Hafez, 2004).



Adaptado de Basu SC (2011)

Figura 3: Principais elementos envolvidos no mecanismo de termorregulação dos testículos.

A termorregulação testicular é essencial para a ocorrência adequada da espermatogênese. Para isso, é necessário que a temperatura dos testículos seja mantida cerca de 3 °C a 4 °C abaixo da temperatura corporal (Kastelic *et al.*, 1997). O estresse térmico nos testículos, ao aumentar a temperatura, induz apoptose das células germinativas, ressaltando a sensibilidade dessas células ao calor (Shahat *et al.*, 2020). Esse aumento térmico impacta negativamente as células de Leydig e Sertoli, causando degeneração e alterações morfológicas e funcionais nessas

células. Isso resulta na redução do volume testicular e no aumento dos níveis séricos de FSH (Absalan *et al.*, 2008), prejudicando também a motilidade e viabilidade espermáticas (Mieusset & Bujan, 1995). Uma pesquisa realizada por Kastelic *et al.* (2019) examinou a hipótese de que a hipóxia poderia replicar os efeitos da hipertermia na quantidade e qualidade dos espermatozoides, enquanto a hiperóxia poderia atenuar esses efeitos. Ao utilizar camundongos expostos a diferentes níveis de oxigênio e temperaturas, os resultados não corroboraram essa hipótese, indicando que a hipóxia não reproduz os efeitos da hipertermia e que a hiperóxia não atenua os impactos dessa condição térmica. Os achados destacaram efeitos significativos da temperatura em diversos parâmetros relacionados a testículos e espermatozoides, sublinhando a importância de concentrar-se na hipertermia para abordar suas implicações na reprodução masculina.

O criptorquidismo, uma condição em que os testículos não descem para o escroto, ilustra as consequências do aumento da temperatura testicular. Isso leva à ruptura do epitélio germinativo, resultando na redução da concentração espermática, mesmo mantendo a normalidade nos aspectos sexuais secundários (Rizzoto & Kastelic, 2020). A maioria dos mamíferos com criptorquidia evidencia que até uma hipertermia leve pode levar à infertilidade (Nelson, 1951; Yavetz *et al.*, 1992).

#### 1.4. Métodos de esterilização de machos

Há evidências de que a castração de machos é um procedimento realizado há milhares de anos e teve início na China antiga com o intuito de domesticar animais e evitar comportamentos indesejados, como brigas por território (Turton, 1982). A esterilização de cães e gatos machos é uma ferramenta altamente eficiente para o controle populacional, uma vez que um único macho intacto é capaz de fertilizar várias fêmeas (Johnston *et al.*, 2001). Além disso, a castração proporciona diversos benefícios, incluindo a melhora da expectativa de vida, graças à prevenção de doenças do sistema reprodutivo, como infecções sexualmente transmissíveis e tumores, e à redução de comportamentos de risco, como fugas, bem como comportamentos indesejáveis, como marcação de território por urina e agressividade (Hamilton, 1975; Howe, 2006; Kustritz, 2007; Bowen, 2008; Reichler, 2008; Reichler, 2009).

O método padrão para esterilização de machos é a orquiectomia, que consiste na remoção cirúrgica dos testículos (Reichmann *et al.*, 2000). Contudo, esse procedimento apresenta alto custo, requer profissionais especializados, anestesia geral, equipamentos médicos, ambiente controlado, exames pré-operatórios, monitoramento e cuidados pós-operatórios, além de envolver riscos cirúrgicos e pós-cirúrgicos (Oliveira *et al.*, 2012; Rafatmah *et al.*, 2019).

Visando eficiência e praticidade na esterilização de animais machos, têm sido estudados métodos alternativos, como a castração química não cirúrgica. Há muitos anos, diversos estudos têm investigado essa abordagem como uma alternativa à castração cirúrgica em animais machos (Cathey & Menon, 2010; Jana & Samanta, 2007). Nesse sentido, diferentes agentes químicos têm sido injetados no ducto deferente ou na cauda do epidídimo em modelos animais como ratos, camundongos, coelhos, porquinhos-da-índia, gatos, cães e macacos (Revisado por Ansari & Lahiya, 2018). Alguns desses agentes incluem danazol (Dixit *et al.*, 1975), etanol (Raman *et al.*, 1976), dimetilsulfóxido (Pineda *et al.*, 1977; Pineda & Doley, 1984) e clorexidina (Aiudi *et al.*, 2010). No entanto, nem todos esses tratamentos resultaram em esterilidade e é importante ressaltar que muitos efeitos adversos têm sido relatados.

Apesar dessas tentativas, existem desafios quanto à efetividade e duração da esterilização, tornando algumas dessas opções inviáveis em aplicações em larga escala, devido ao custo e reações adversas (Jana & Samanta, 2007). Não existe um método de esterilização ideal, e é necessário levar em consideração a aplicação em diferentes espécies, o bem-estar animal e, principalmente, o efeito permanente, especialmente para a esterilização de animais de estimação (Bowen, 2008; Fayrer *et al.*, 2000). A eficácia é alcançada quando afeta a

espermatogênese, androgênese e libido, sem efeitos colaterais tóxicos (Fahim *et al.*, 1993). Além disso, é importante que seja realizado por meio de uma única injeção em casos de castração química ou apenas um tratamento disponível (Fayrer *et al.*, 2000; Cathey & Menon, 2010). Nesse contexto, métodos de castração química utilizando zinco e cloreto de cálcio têm sido estudados como alternativas à castração cirúrgica em animais machos por várias décadas.

O zinco é um elemento químico essencial para a espermatogênese, maturação espermática, ovulação e fertilização. No entanto, concentrações elevadas podem prejudicar a divisão e diferenciação das células germinativas (Fahim *et al.*, 1993). A injeção intratesticular destrói os espermatozoides em todas as fases de desenvolvimento e maturação, resultando em esterilização permanente sem afetar o sistema endócrino. O zinco é absorvido e metabolizado em até 72 horas após a injeção, causando temporária inflamação e fibrose permanente nos órgãos reprodutivos. Após algum tempo, os testículos atrofiam (Weedon, 2014).

A castração química com utilização de zinco é uma alternativa aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos desde 2003. Consiste na injeção intratesticular de uma solução química à base de gluconato de zinco, que interrompe a produção de espermatozoides (Massei & Miller, 2013). Os primeiros estudos utilizaram o tanato de zinco (Kastrin) como busca por uma alternativa à castração cirúrgica (Fahim, 1982; Migally & Fahim, 1984). Vários fármacos à base de zinco foram comercializados, como o Neutersol<sup>®</sup> (gluconato de zinco neutralizado pela arginina). Entretanto, devido a problemas com o produto, ele ficou indisponível no mercado entre 2005 e 2007, sendo relançado em 2008 no México com outro nome, EsterilSol<sup>®</sup>, e aprovado no Brasil em 2009 como Infertile<sup>®</sup> (Ansari & Lohiya, 2018). Inicialmente, a aplicação dos agentes à base de zinco requer certificação veterinária devido à técnica de injeção crucial para evitar reações adversas (Weendon, 2014).

O estudo de LaCroix (2006) avaliou a eficácia do Neutersol<sup>®</sup> em cães adultos e concluiu que é um método seguro e eficaz para controlar a superpopulação de cães. Houve relatos de dor moderada e, em alguns casos, úlcera no local da injeção, provavelmente devido a erros na técnica de aplicação. No entanto, nenhum dos cães apresentou anormalidades nos exames físicos realizados após a injeção, o que demonstra a sua viabilidade como alternativa não cirúrgica para esterilização.

Em um estudo com gatos machos, uma única injeção de gluconato de zinco em cada testículo interrompeu a espermatogênese em 60 a 120 dias após o tratamento. O método foi eficaz na maioria dos gatos, sendo econômico e fácil de administrar (Oliveira *et al.*, 2013). Outro estudo confirmou esses resultados, mostrando danos à espermatogênese após a injeção

de Testoblock™, sugerindo que esse composto pode ser uma opção não cirúrgica para esterilização em gatos machos adultos (Fagundes *et al.*, 2014).

Um estudo realizado na Patagônia (Chile) em 2012 avaliou os efeitos adversos da injeção intratesticular do EsterilSol® em cães. As injeções foram feitas conforme as instruções do fabricante, mas algumas reações graves ocorreram sete a oito dias após a injeção, levando à necessidade de ablação escrotal. Embora seja um método simples de esterilização, é importante monitorar de perto os cães e fornecer cuidados veterinários após as injeções intratesticulares (Forzán *et al.*, 2013).

O uso do Infertile® foi avaliado em cães com duas injeções intratesticulares, realizadas com um mês de intervalo. O tratamento resultou em redução no volume testicular, concentração de testosterona, motilidade e concentração de espermatozoides, com aumento das anomalias espermáticas. A análise histológica mostrou degeneração, fibrose e calcificação no tecido testicular (Vannucchi *et al.*, 2015). Porém, um outro estudo avaliou o uso de uma solução neutralizada de gluconato de zinco em cães machos adultos. A injeção da solução resultou em atrofia dos túbulos seminíferos, interrupção da espermatogênese, presença de fibrose, mas apresentou inflamação e hemorragia. Não houve resposta inflamatória sistêmica ou regeneração nas células de Leydig após o estudo de 37 dias (Rafatmah *et al.*, 2019).

O uso da solução à base de zinco apresentou algumas reações temporárias, como inchaço, apatia e vômitos nos primeiros dias. Já o Zeuterin® mostrou-se capaz de causar irritação e úlceras escrotais, abscessos e infecções testiculares. Estudos comparativos entre os métodos de castração cirúrgica e a injeção intratesticular de gluconato de zinco já demonstraram que algumas reações são mais severas do que as relacionadas à castração cirúrgica (Levy *et al.*, 2008).

Com relação ao cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>), Jenkins & Clark (1977) observaram que este composto era capaz de causar gangrena quando injetado perivascularmente para tratar hipocalcemia e parada cardíaca. Esse efeito adverso foi utilizado no tratamento de neoplasias e hiperplasia, ou em procedimentos como esterilização (Koger, 1977). Diversos estudos foram conduzidos para avaliar a castração química em uma ampla variedade de animais machos, incluindo bezerros, touros, cães, gatos, ratos, burros e bode utilizando o CaCl<sub>2</sub>, à base de água ou álcool, em diferentes concentrações (Singh *et al.*, 2020).

Em gatos, a castração química com CaCl<sub>2</sub> resultou em inchaço escrotal e leve dor, sem alterações sanguíneas significativas. Concentrações mais altas de CaCl<sub>2</sub> levaram à azoospermia, enquanto doses menores reduziram a concentração de espermatozoides em comparação com o

grupo controle. Análises histológicas indicaram degeneração e fibrose extensiva nos testículos (Baran *et al.*, 2010).

Em cães, a injeção intratesticular de  $\text{CaCl}_2$  em doses específicas reduziu o peso testicular, concentração de espermatozoides e concentrações de testosterona, tornando-se uma opção eficaz para a esterilização desses animais. Além disso, as análises histológicas revelaram danos nos tecidos testiculares. No entanto, a maioria dos cães sentiu desconforto à apalpação após as injeções (Jana & Samanta, 2007).

Um outro estudo com cães, o tratamento com  $\text{CaCl}_2$  em diferentes concentrações resultou em uma diminuição nos parâmetros espermáticos e concentrações de testosterona, com efeitos dependentes da dose. A azoospermia foi alcançada em diferentes proporções com doses variadas, sendo 100% em doses mais altas (60% e 80%). Houve também uma diminuição no tamanho dos testículos. No entanto, foram observados efeitos colaterais em várias concentrações, e as concentrações de testosterona se recuperaram em alguns grupos. Portanto, a esterilidade foi considerada temporária (Leoci *et al.*, 2014a, 2014b).

Em burros, a castração com  $\text{CaCl}_2$  não foi considerada eficaz, pois resultou em complicações como úlceras escrotais e fístulas, além de não reduzir as concentrações de testosterona (Ibrahim *et al.*, 2016).

Em geral, a esterilização química com  $\text{CaCl}_2$  em injeções intratesticulares e intraepididimais mostrou eficácia na redução de espermatozoides e comportamento sexual em cães, mas também apresentou efeitos colaterais a serem considerados (Jana & Samanta, 2007; Leoci *et al.*, 2014a; Leoci *et al.*, 2014b). Vale ressaltar que foram observados efeitos indesejados, como inchaço escrotal, claudicação, úlcera escrotal e necrose testicular em cães, burros e touros. Além disso, em algumas espécies, a castração química com  $\text{CaCl}_2$  não foi eficaz como esterilização permanente (Asari & Lahiya, 2018).

Além da castração química, métodos hormonais, como progestinas, ésteres de testosterona e agonistas/antagonistas do GnRH, foram estudados para reduzir a fertilidade em machos. Alguns desses métodos mostraram resultados promissores na redução da produção de espermatozoides e fertilidade em cães machos (Kutzler & Wood, 2006; Bowen, 2008). Outra abordagem é o uso de vacinas contra GnRH para bloquear a liberação de LH e FSH. Contudo, esse método enfrenta desafios, como variações significativas nas respostas individuais, resultando em eficácia de curta duração. Isso leva a um aumento nas concentrações de testosterona durante o período de recuperação, provocando um retorno gradual do comportamento sexual. Para superar esse desafio, são necessárias múltiplas vacinações,

acarretando custos adicionais. É crucial reconhecer que essas opções ainda enfrentam obstáculos, como a variabilidade de resposta entre indivíduos (Wang *et al.*, 2023). Em geral, nenhum desses métodos atende plenamente aos critérios desejados para uma castração definitiva, que incluem permanência, uma única aplicação e efeitos adversos aceitáveis. Assim, são necessárias mais pesquisas para desenvolver tecnologias contraceptivas mais eficazes e comercialmente viáveis.

### **1.5. Nanotecnologia**

A nanotecnologia representa um domínio interdisciplinar da ciência dedicado à criação de materiais com estrutura superficial e propriedades químicas em uma escala nanométrica, onde pelo menos uma dimensão das partículas é inferior a 100 nm. Nos últimos anos, tem atraído a atenção de inúmeros pesquisadores, resultando em avanços significativos e diversas aplicações em variados setores, incluindo biomedicina, farmácia, agricultura, meio ambiente, materiais avançados, química, física, eletrônica, tecnologia da informação, entre outros (Coelho *et al.*, 2016; Hussein, 2016). Desde a década de 1990, a nanotecnologia vem se destacando, sobretudo devido às suas promissoras aplicações tecnológicas e biomédicas no tratamento de doenças, como o câncer. Além disso, as pesquisas nessa área também têm se concentrado em abordagens terapêuticas para condições cardiovasculares, neurológicas, gastrointestinais, autoimunes, infecciosas e até mesmo questões relacionadas à reprodução, como infertilidade. A nanotecnologia desempenha um papel fundamental no desenvolvimento de métodos altamente sensíveis de detecção e imagem nas áreas de ciências analíticas e biológicas, permitindo o diagnóstico precoce de doenças (Kumar, 2013; Barkalina *et al.*, 2014). Diversos estudos também destacam o potencial da nanotecnologia para abordar desafios relacionados à energia e ao meio ambiente (Savage & Diallo, 2005; Li *et al.*, 2013).

### **1.6. Nanopartículas**

As nanopartículas desempenham um papel de destaque na pesquisa científica devido às suas notáveis características. Elas podem manifestar uma ampla variedade de propriedades físico-químicas, incluindo composições orgânicas, inorgânicas e à base de proteínas, bem como uma diversidade de formatos e tamanhos. Os estudos envolvendo NPs demonstram diferentes possibilidades de aplicações clínicas, como administração de medicamentos, ressonância magnética e hipertermia (Yu *et al.*, 2011), assim como a comercialização de diversos produtos

contendo nanopartículas, desde medicamentos, produtos alimentícios, produtos têxteis, objetos esportivos e materiais eletrônicos (Brohi, 2017).

As nanopartículas de óxido de ferro com propriedades superparamagnéticas têm sido amplamente investigadas como uma estratégia promissora no tratamento do câncer, especialmente na aplicação da hipertermia. Nesse contexto, um fluido contendo suspensões de nanopartículas superparamagnéticas é injetado no tumor e posteriormente submetido a um campo magnético externo de frequência alternada. Esse processo induz uma mudança constante na orientação das nanopartículas, resultando na dissipação de energia na forma de calor, seja por liberação de calor quando as nanopartículas tentam alinhar-se com mudanças em um campo magnético, encontrando resistência (Perda de Histerese), liberação de calor quando as nanopartículas gradualmente ajustam sua orientação em resposta a um campo magnético, superando barreiras térmicas (Relaxação de Néel), ou geração de calor devido ao movimento aleatório das nanopartículas em um ambiente, resultante de agitação térmica (Movimento Browniano). Importante destacar que as nanopartículas superparamagnéticas perdem suas propriedades magnéticas quando o campo magnético é removido, o que reduz significativamente a tendência à agregação das nanopartículas (Bohara *et al.*, 2016).

Uma outra possibilidade é o uso de nanopartículas com propriedades ópticas, que estão ganhando notável destaque devido à sua capacidade de gerar calor sob a influência da iluminação óptica, um fenômeno que se baseia na ressonância plasmônica superficial. Esse fenômeno permite que essas nanopartículas absorvam fótons incidentes (Govorov & Richardson, 2007; Kravets *et al.*, 2018). Além disso, quando combinadas com nanopartículas que possuem propriedades fototérmicas, tornam-se capazes de induzir a hipertermia. Nanopartículas de ouro, por exemplo, podem gerar calor quando são irradiadas com um laser de infravermelho (Songca & Oluwafemi, 2023).

Com o avanço da nanotecnologia, o uso medicinal do ouro foi aprimorado, especialmente no contexto do tratamento do câncer, sendo um material largamente empregado para modificar a superfície de nanopartículas metálicas, através de processos químicos que podem facilmente controlar seu tamanho para escalas inferiores a 100 nm (Coelho *et al.*, 2016). As nanopartículas revestidas com ouro exibem uma notável estabilidade devido à inércia química do ouro (Kohout *et al.*, 2018; Bohara *et al.*, 2016).

Uma das vantagens mais marcantes do ouro é a sua capacidade de manter as propriedades magnéticas quando utilizado para revestir nanopartículas de óxido de ferro, ao mesmo tempo em que melhora a sua biocompatibilidade. Nanopartículas superparamagnéticas revestidas com

ouro demonstraram menor citotoxicidade em culturas celulares (Bohara *et al.*, 2016; Sabale *et al.*, 2017). Além disso, as propriedades ópticas do ouro abrem portas para a aplicação das nanopartículas de ouro na terapia do câncer através da hipertermia. As nanopartículas de ouro têm a capacidade de absorver energia proveniente da irradiação de luz ou ondas de rádio e converter essa energia em calor, resultando na ablação das células tumorais e na degradação das membranas celulares. Além disso, também são amplamente utilizadas em sistemas de "*drug delivery*" e em terapias de contraste em diagnósticos por Raios-X, devido ao seu elevado peso atômico (Coelho *et al.*, 2016; Siqueira, 2019).

Em contraste com as nanopartículas de ouro mencionadas anteriormente, as pesquisas envolvendo nanopartículas de ferrita de manganês ainda estão em estágios iniciais, principalmente devido à sua toxicidade, o que limita sua aplicação medicinal. O manganês é um metal pesado essencial para o metabolismo humano e desempenha um papel crítico em diversas enzimas, além de ser crucial para o funcionamento normal do cérebro. No entanto, o excesso de manganês pode levar a distúrbios neurodegenerativos (Silva & Bock, 2007). Apesar disso, o manganês obteve aprovação da FDA para uso em medicamentos como agente de contraste em imagens de ressonância magnética do fígado e para demarcar regiões ativas do cérebro, devido à sua capacidade de penetrar em células por meio de canais de cálcio dependentes de voltagem (Zhen & Xie, 2012).

De acordo com Rodrigues *et al.* (2013), a passivação da superfície das nanopartículas ou o revestimento delas com uma camada protetora podem reduzir a citotoxicidade em nanoestruturas de ferrita de manganês, ao mesmo tempo em que permitem a manipulação da força do campo magnético para gerar calor suficiente sem a interferência de correntes parasitas induzidas pelo campo. Isso torna as nanopartículas de ferrita de manganês altamente promissoras para a aplicação de hipertermia. Em uma revisão, Bohara *et al.* (2016) descreveram o potencial da hipertermia na indução de morte de células HeLa após a utilização de uma suspensão contendo nanopartículas de ferrita de manganês.

A passivação de superfície com citrato também desempenha um papel importante na melhoria da biocompatibilidade das nanopartículas. Essa camada protetora reduz a toxicidade das nanopartículas, tornando-as mais seguras para aplicações em sistemas biológicos, como a entrega de medicamentos, terapia fototérmica e diagnóstico por imagem. Uma das características mais significativas do citrato de sódio é sua capacidade de proporcionar estabilidade coloidal às nanopartículas. Essa estabilidade é essencial para evitar que as nanopartículas se agreguem em suspensão, garantindo uma distribuição uniforme (Valdiglesias

*et al.*, 2015). A estabilidade coloidal é fundamental para manter as propriedades físicas e químicas das nanopartículas intactas, contribuindo para a eficácia das aplicações em que são utilizadas (Pinheiro *et al.*, 2019; Vines *et al.*, 2019).

### 1.6.1. Toxicidade

A toxicidade refere-se ao grau de nocividade de uma substância para um organismo vivo. No caso das nanopartículas metálicas, sua capacidade de penetrar em tecidos biológicos e até mesmo nas células pode resultar em toxicidade devido à grande área de superfície e reatividade química das nanopartículas, levando à formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Bohara *et al.*, 2016). Além disso, as nanopartículas metálicas têm a capacidade de ultrapassar barreiras biológicas, como a barreira hematoencefálica e hematotesticular (Oberdorster, 2010). Dentro do organismo, essas nanopartículas podem se deslocar para diferentes tecidos através do sistema circulatório e, eventualmente, algumas delas são eliminadas pelas fezes e pela urina, mas também podem ser reabsorvidas pela barreira gastrointestinal e, assim, retornar à corrente sanguínea (Oberdorster *et al.*, 2005). Órgãos ricos em células fagocíticas, como o fígado e o baço, tendem a acumular mais nanopartículas, tornando-se mais suscetíveis a danos causados pelas ROS (Aillon *et al.*, 2009).

É fundamental destacar que as nanopartículas não ligadas ou não fixadas geralmente demonstram maior toxicidade em comparação com aquelas que estão ligadas ou fixadas a outras estruturas. Além disso, diversos fatores, como o tamanho, hidrofiliicidade, carga superficial e tipo de revestimento das nanopartículas, influenciam diretamente na biocompatibilidade das nanopartículas metálicas (Bohara *et al.*, 2006). Portanto, a análise das propriedades das nanopartículas em sistemas biológicos desempenha um papel crucial na garantia da segurança e eficácia das aplicações biomédicas e tecnológicas das nanopartículas, ao mesmo tempo em que minimiza os potenciais riscos à saúde (Powers *et al.*, 2006).

### 1.6.2. Hipertermia

A hipertermia é uma terapia que envolve o aumento controlado da temperatura nos tecidos, geralmente mantendo-a entre 42 °C e 48 °C. Essa técnica vem sendo utilizada no tratamento de tumores, uma vez que as células tumorais são particularmente sensíveis ao calor (Sabale *et al.*, 2017; Vines *et al.*, 2019). Desta forma, este mesmo princípio poderia ser utilizado para promover esterilidade em animais machos, devido à sensibilidade dos testículos ao calor. Em um estudo recente, foi possível observar que a aplicação de hipertermia nos testículos de ratos

após uma injeção intratesticular de nanopartículas magnéticas, gerou uma eficaz esterilização de ratos machos em apenas 56 dias (Jivago *et al.*, 2021).

A hipertermia é eficaz em parte devido ao alto nível de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) que são geradas durante o processo, levando à apoptose das células tumorais, muitas vezes devido à desnaturação das proteínas (Cabiscol *et al.*, 2000, Li *et al.*, 2013). Quando a temperatura atinge valores superiores a 46 °C, a morte celular ocorre em questão de minutos, um fenômeno conhecido como termoablação (Deatsch & Evans, 2014; Kumar & Mohammad, 2011).

Diferentes fontes de energia podem ser aplicadas a fim de gerar hipertermia, incluindo campos magnéticos, fontes de luz, pulsos de radiofrequência e ultrassom (Fang & Chen, 2013). A combinação com nanopartículas magnéticas tem emergido como uma promissora abordagem para aprimorar a eficácia da hipertermia, minimizando os efeitos adversos nos tecidos circundantes. Dessa forma, a geração de calor ocorre através da absorção de fótons incidentes, bem como da transferência de calor das nanopartículas para o ambiente circundante (Hedayatnasab *et al.*, 2017).

Os LEDs (diodos emissores de luz) são componentes eletrônicos semicondutores que desempenham um papel fundamental na conversão de energia elétrica em luz. Seu uso apresenta uma série de vantagens notáveis. Eles não são fontes de luz pontuais, mas sim emissoras de luz extensiva e de alta potência, controlável e de comprimento de onda específico. Além disso, os LEDs consomem pouca energia, têm uma vida útil longa, são econômicos e seguros em comparação com a irradiação a laser. Essas características fazem com que os LEDs sejam uma escolha ideal em aplicações de pesquisa biomédica (Hayashi *et al.*, 2013; Yue *et al.*, 2016). Comparado à magnetohipertermia, o uso de LEDs para hipertermia tem a vantagem de ser uma alternativa mais econômica e prática.

### 1.6.3. Nanocastração

A utilização de nanomateriais já está sendo pesquisada no desenvolvimento de métodos alternativos para a castração, conforme destacado por estudos como (Li *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2015a; Liu *et al.*, 2015b; Brito *et al.*, 2020; Jivago *et al.*, 2021; Ding *et al.*, 2021; Coimbra *et al.*, 2023).

Pesquisas em modelos animais têm investigado os impactos das nanopartículas nos sistemas reprodutivos, com foco particular na espermatogênese. Um estudo conduzido por Nasri *et al.* (2015) avaliou os efeitos da administração intraperitoneal de nanopartículas de

óxido de ferro em camundongos, revelando uma redução significativa na concentração e motilidade dos espermatozoides, além de inflamação no epidídimo após a administração das nanopartículas.

O estudo de Brito *et al.* (2020) abordou os efeitos da injeção intratesticular de nanopartículas de prata em ratos Wistar machos, evidenciando impactos notáveis na motilidade e morfologia dos espermatozoides. Observou-se uma significativa diminuição no grupo avaliado no dia 7 após a injeção, seguida de uma recuperação gradual ao longo do tratamento, ressaltando a dinâmica complexa das respostas do sistema reprodutivo a esse tipo específico de nanopartícula.

Outra pesquisa explorou os efeitos das nanopartículas de ouro após duas injeções intratesticulares, com um intervalo de sete dias, em ratos Wistar. Os animais expostos apresentaram danos na histologia dos testículos e estresse oxidativo, resultando em uma redução na concentração de espermatozoides. A conclusão aponta para um impacto moderado das nanopartículas de ouro na saúde geral dos animais, sugerindo a viabilidade de seu uso em biotecnologias reprodutivas e ressaltando a necessidade de avaliações abrangentes de seus efeitos (Coimbra *et al.*, 2023).

Outros estudos explorando a relação entre o uso de nanopartículas e o aquecimento têm sido conduzidos, tendo em vista a sensibilidade da espermatogênese ao calor. O trabalho de Fahim *et al.* (1975), apesar de não utilizar nanotecnologia, destaca-se como um dos primeiros a compreender o impacto direto do aumento da temperatura localizada nos testículos sobre a fertilidade. A exposição dos testículos de ratos Wistar a diferentes fontes de calor, como água aquecida, infravermelho, micro-ondas e ultrassom, mostrou efeitos distintos na produção de espermatozoides e no processo de espermatogênese. Esses resultados demonstram a vulnerabilidade da espermatogênese à elevação localizada da temperatura testicular. Mais recentes se utilizam da hipertermia mediada por nanopartículas para intensificar a aplicação de calor às gônadas.

Quanto aos efeitos deletérios do calor, um estudo precursor conduzido por Li *et al.* (2013) avaliou a fertilidade de camundongos após a administração intratesticular de nanorods de ouro revestidos com polietilenoglicol (PEG), seguida por irradiação de laser de 808 nm a 45 °C. A morfologia dos túbulos seminíferos mostrou danos as células espermatogênicas e uma redução na taxa de fertilidade dos camundongos após 7 e 60 dias de tratamento. Seguindo a mesma linha, os efeitos da hipertermia testicular usando nanocristais plasmônicos de sulfeto de cobre associadas a irradiação a laser de 980 nm em camundongos mostrou redução nas

concentrações de testosterona sérica e as análises histológicas evidenciaram danos severos às células de Sertoli (Liu *et al.*, 2015a). Em outra pesquisa com camundongos conduzida por Liu *et al.* (2015b) com nanopartículas de óxido de tungstênio, os resultados mostraram aumentando os níveis ROS e comprometimento à espermatogênese, com danos as células de Sertoli. Já Ding *et al.* (2021) exploraram a injeção intratesticular de nanopartículas de óxido de ferro revestidas com PEG, bem como a injeção intravenosa de nanopartículas de óxido de ferro revestidas com ácido cítrico, seguida por exposição a um campo magnético alterado, evidenciando degeneração e desorganização das células espermatogênicas em camundongos, além de redução do volume testicular após 60 dias.

Apesar dos resultados positivos obtidos em camundongos, os testículos são de tamanho reduzido, portanto, a busca por um método de castração mais adequado para animais de maior porte, como cães e gatos, demanda uma abordagem mais próxima do tamanho de seus testículos. Assim, nosso grupo de pesquisa revelou que a magnetohipertermia testicular, conduzida por meio de nanopartículas de ferrita de manganês funcionalizadas com citrato resultou em degeneração progressiva dos túbulos seminíferos, com substituição do tecido testicular por tecido conjuntivo em um período curto de 56 dias (Jivago *et al.*, 2021). No entanto, para garantir sua eficácia e segurança contínuas, foi feita uma análise de longo prazo que se estendeu por 10 meses, a fim de avaliar quaisquer possíveis efeitos colaterais tardios e consolidar a irreversibilidade da infertilidade, conforme destacado no estudo anterior. Nesse estudo, foi observado redução ou mesmo a completa ausência dos testículos, juntamente com uma diminuição nos níveis de testosterona, sem impactos negativos na saúde geral dos animais (Brito *et al.*, 2022). Contudo, apesar dos resultados promissores, a implementação desse método enfrenta desafios logísticos, como o tamanho da bobina e dificuldades no transporte do equipamento, além de limitações no controle da temperatura. Nesse sentido, novas pesquisas são necessárias para desenvolver um método prático, simples e eficaz.

Assim, a fotohipertermia testicular mediada por nanopartículas surge como uma alternativa promissora para a esterilização de animais machos. Esse processo inovador envolve o aumento controlado da temperatura nos testículos, sendo alcançado por meio da injeção intratesticular de nanopartículas seguida pela irradiação com luz não-ionizante proveniente de LEDs. As vantagens distintivas do uso da fotohipertermia mediada por nanopartículas para essa finalidade incluem a possibilidade de um controle preciso da temperatura nos tecidos-alvo, em função das nanopartículas, e de usar uma fonte de luz, fácil de manipular e transportar e de baixo custo. Além disso, a fotohipertermia mediada por nanopartículas é segura, eficiente e

facilmente ajustável, oferecendo uma abordagem prática e menos invasiva para a esterilização, superando desafios logísticos associados a outras técnicas.

## 2. JUSTIFICATIVA

Existe uma crescente necessidade de buscar alternativas para o controle populacional de animais domésticos errantes. Atualmente, a castração cirúrgica é considerada a medida mais efetiva para esterilizar machos, mas não consegue suprir a alta demanda existente. As opções não cirúrgicas, como o uso de soluções de glucanato de zinco ou cloreto de cálcio, apresentam efeitos colaterais que, em alguns casos, podem ser mais severos que a própria castração cirúrgica. Além disso, não existem relatos comprovando a eficácia desses métodos. Por isso, é essencial continuar pesquisando e desenvolvendo métodos alternativos.

Diante desse desafio, diversas investigações vêm sendo conduzidas para encontrar formas de esterilização que sejam facilmente aplicáveis em larga escala. Os avanços na nanotecnologia abriram caminho para a exploração das propriedades de nanomateriais em várias áreas da saúde, incluindo ciências animais e veterinária. De fato, nanomateriais já têm sido utilizados no desenvolvimento de alternativas para a castração.

Uma abordagem promissora é a fototerapia mediada por nanopartículas, que oferece praticidade e potencial viabilidade como alternativa ao método de esterilização tradicional. A dependência da espermatogênese em temperaturas testiculares baixas torna a fototerapia uma opção atraente neste processo. Apesar de já existirem alguns estudos com o uso de fototerapia mediada por nanopartículas para promover esterilidade em animais machos, todos estes estudos foram conduzidos em camundongos, que possuem testículos de tamanho muito reduzido, fazendo com que os métodos talvez não sejam aplicáveis para os animais de interesse.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivos gerais**

Desenvolvimento de um método para gerar infertilidade em animais machos baseado em fotohipertermia mediada por nanopartículas para aplicação direta nos testículos, usando como modelo animal ratos Wistar.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Avaliação de uma nanopartícula de maghemita recoberta com citrato e ouro na fotohipertermia testicular;
- Avaliação de uma nanopartícula de ferrita de manganês recoberta com citrato na fotohipertermia testicular;
- Avaliação do uso de 1 ou 2 LEDs na fotohipertermia testicular mediada por nanopartícula de ferrita de manganês recoberta com citrato;
- Avaliação da fotohipertermia testicular nos parâmetros reprodutivos (volume e peso testicular, parâmetros espermáticos e histopatologia de testículos e epidídimos) dos animais pelo período de duração da espermatogênese;
- Avaliação da biodistribuição das nanopartículas maghemita recoberta com citrato e ouro para órgãos vitais (rim, fígado, baço e pulmão) quando aplicada por via intratesticular e de seus efeitos sobre estes órgãos.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Absalan, F., Movahedin, M., & MOULA, S. J. (2008). Assessment of testis histological changes and sperm parameters in experimentally induced unilateral and bilateral cryptorchid mouse model.
- Aillon, K. L., Xie, Y., El-Gendy, N., Berkland, C. J., & Forrest, M. L. (2009). Effects of nanomaterial physicochemical properties on in vivo toxicity. *Advanced drug delivery reviews*, 61(6), 457-466.
- Aiudi, G. G., De Sandro Salvati, A., Binetti, F., Mataresse, R., Leoci, R., & Lacalandra, G. M. (2007). Chemical sterilization in dogs with intra-epididymal injection of 5% chlorhexidine solution. *Reproduction in Domestic Animals*, 42, 83-83.
- Almeida, M. F. (2011). Controle de populações caninas: considerações técnicas e éticas. *Revista Brasileira de Direito Animal*, 6(8).
- Amaku, M., Dias, R. A., & Ferreira, F. (2009). Dinâmica populacional canina: potenciais efeitos de campanhas de esterilização. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 25(4), 300-304.
- Ansari, A. S., Badar, A., & Lohiya, N. K. (2017). Fertility control modalities in animals: an overview. *BAOJ Vet Sci*, 1(004).
- Baran, A., Ozdas, O. B., Gulcubuk, A., HAMZAOGLU, A. I., & TONGUC, M. (2010, April). Pilot study: intratesticular injection induces sterility in male cats. In *Proceedings of the 4th International Symposium on Non-Surgical Methods of Pet Population Control* (pp. 8-10).
- Barkalina, N., Charalambous, C., Jones, C., & Coward, K. (2014). Nanotechnology in reproductive medicine: emerging applications of nanomaterials. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 10(5), e921-e938.
- Barros, C. M. Q., Oba, E., Siqueira, J. B., Leal, L. D. S., & Kastelic, J. P. (2011). Efeitos da diminuição do fluxo sanguíneo testicular nas temperaturas escrotal superficial, escrotal subcutânea, intratesticular e intravascular em touros. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 49-54.
- Bastos, A. L. F. (2013). Estudo da dinâmica populacional e das estratégias de manejo da população canina no município de Itabirito, MG, Brasil de 2007 a 2011.
- Beaver, B. V. (2003). *Feline Behavior-E-Book*. Elsevier Health Sciences.
- Berne e Levy (2018). *Fisiologia - Tradução da 7ª Edição*. Eds: Bruce M. Koeppen e Bruce A. Stanton. Editora Elsevier, Rio de Janeiro.

- Bowen, R. A. (2008). Male contraceptive technology for nonhuman male mammals. *Animal reproduction science*, 105(1-2), 139-143.
- Bowen, R. A. (2008). Male contraceptive technology for nonhuman male mammals. *Animal reproduction science*, 105(1-2), 139-143.
- BRASIL. Lei nº 14.228, de 20 de outubro de 2021. Dispõe sobre a proibição da eliminação de cães e gatos pelos órgãos de controle de zoonoses, canis públicos e estabelecimentos oficiais congêneres; e dá outras providências. Brasília, 20 de outubro de 2021. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/lei-n-14.228-de-20-de-outubro-de-2021-353634863>>. Acesso em: 26 de dezembro de 2023.
- Brito, J. L. M., Lima, V. N. D., Ansa, D. O., Moya, S. E., Morais, P. C., Azevedo, R. B. D., & Lucci, C. M. (2020). Acute reproductive toxicology after intratesticular injection of silver nanoparticles (AgNPs) in Wistar rats. *Nanotoxicology*, 14(7), 893-907.
- Brito, J. L. M., Lima, V. N. D., Jivago, J.L.P.R., Marangon, A. R. M., Vinícius-Araújo, M., Bakuzis, A. F., Azevedo, R. B., Lucci, C.M. (2022). Magnetic nanoparticle hyperthermia as a non-surgical method for neutering male animals: a short and long-term study. in: XXIV CBRA / VII ISABR. *Animal Reproduction*, v. 19. p. 73.
- Brohi, R. D., Wang, L., Talpur, H. S., Wu, D., Khan, F. A., Bhattarai, D., ... & Huo, L. J. (2017). Toxicity of nanoparticles on the reproductive system in animal models: a review. *Frontiers in pharmacology*, 606.
- Cabiscol Catalã, E., Tamarit Sumalla, J., & Ros Salvador, J. (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species.
- Cathey, M., & Memon, M. A. (2010). Nonsurgical methods of contraception in dogs and cats: Where are we now. *Vet. Med*, 105, 12-17.
- Coelho, B. C. P., Siqueira, E. R., Ombredane, A. S., Joanitti, G. A., Chaves, S. B., Da Silva, S. W., ... & Sousa, M. H. (2017). Maghemite–gold core–shell nanostructures ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>@Au) surface-functionalized with aluminium phthalocyanine for multi-task imaging and therapy. *RSC advances*, 7(19), 11223-11232.
- Coimbra, J. L., de PF Dantas, G., de Andrade, L. M., Brener, M. R., Viana, P. I., Lopes, R. A., ... & Costa, G. M. (2023). Gold nanoparticle intratesticular injections as a potential animal sterilization tool: Long-term reproductive and toxicological implications. *Toxicology*, 492, 153543.
- de PAULA JÚNIOR, R. A. (2022). Aspectos legais da prática da eutanásia em centros de controle de zoonoses. *Ciência Animal*, 32(3), 78-86.

- Deatsch, A. E., & Evans, B. A. (2014). Heating efficiency in magnetic nanoparticle hyperthermia. *Journal of Magnetism and magnetic Materials*, 354, 163-172.
- Ding, W., Chen, Z., Gu, Y., Chen, Z., Zheng, Y., & Sun, F. (2021). Magnetic testis targeting and magnetic hyperthermia for noninvasive, controllable male contraception via intravenous administration. *Nano Letters*, 21(14), 6289-6297.
- Dixit, V. P., Lohiya, N. K., Arya, M., & Argrawal, M. (1977). Chemical sterilization of male dogs after a single intra-testicular injection of " Danazol".
- Esquivel LaCroix, C. (2006). Evaluation of a single intratesticular injection of zinc gluconate neutralized by Arginine (Neutersol®) as a chemical sterilant in sexually mature, male dogs. In *Proceedings of the 3rd ACC&D International Symposium on Non-surgical contraceptive methods for Pet Population Control*.
- Fagundes, A. K. F., Oliveira, E. C., Tenorio, B. M., Melo, C. C., Nery, L. T., Santos, F. A. B., ... & Silva Jr, V. A. (2014). Injection of a chemical castration agent, zinc gluconate, into the testes of cats results in the impairment of spermatogenesis: A potentially irreversible contraceptive approach for this species. *Theriogenology*, 81(2), 230-236.
- Fahim, M. S., Fahim, Z., Der, R., Hall, D. G., & Harman, J. (1975). Heat in male contraception (hot water 60° C, infrared, microwave, and ultrasound). *Contraception*, 11(5), 549-562.
- Fahim, M. S., Wang, M., Sutcu, M. F., Fahim, Z., & Youngquist, R. S. (1993). Sterilization of dogs with intra-epididymal injection of zinc arginine. *Contraception*, 47(1), 107-122.
- Fang, J., & Chen, Y. C. (2013). Nanomaterials for photohyperthermia: a review. *Current pharmaceutical design*, 19(37), 6622-6634.
- Fayrer-Hosken, R. A., Dookwah, H. D., & Brandon, C. I. (2000). Immunocontrol in dogs. *Animal Reproduction Science*, 60, 365-373.
- Forzán, M. J., Garde, E., Perez, G. E., & Vanderstichel, R. V. (2014). Necrosuppurative orchitis and scrotal necrotizing dermatitis following intratesticular administration of zinc gluconate neutralized with arginine (EsterilSol) in 2 mixed-breed dogs. *Veterinary pathology*, 51(4), 820-823.
- Govorov, A. O., & Richardson, H. H. (2007). Generating heat with metal nanoparticles. *Nano today*, 2(1), 30-38.
- Hafez, E. S. E., & Hafez, B. (2004). Reprodução animal.
- Hamilton, D. W. (1975). Structure and function of the epithelium lining the ductuli efferentes, ductus epididymis, and ductus deferens in the rat. *Handbook of physiology. Endocrinology*, 259-301.

- Hayashi, D., van Dongen, A. M., Boerekamp, J., Spoor, S., Lucassen, G., & Schleipen, J. (2017). A broadband LED source in visible to short-wave-infrared wavelengths for spectral tumor diagnostics. *Applied Physics Letters*, *110*(23).
- Hedayatnasab, Z., Abnisa, F., & Daud, W. M. A. W. (2017). Review on magnetic nanoparticles for magnetic nanofluid hyperthermia application. *Materials & Design*, *123*, 174-196.
- Howe, L. M. (2006). Surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology*, *66*(3), 500-509.
- Hussein, M. M., Ali, H. A., Saadeldin, I. M., & Ahmed, M. M. (2016). Querectin alleviates zinc oxide nanoreprotoxicity in male albino rats. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, *30*(10), 489-496.
- Ibrahim, A., Ali, M. M., Abou-Khalil, N. S., & Ali, M. F. (2016). Evaluation of chemical castration with calcium chloride versus surgical castration in donkeys: testosterone as an endpoint marker. *BMC Veterinary Research*, *12*(1), 1-9.
- Jana, K., & Samanta, P. K. (2007). Sterilization of male stray dogs with a single intratesticular injection of calcium chloride: a dose-dependent study. *Contraception*, *75*(5), 390-400.
- Jenkins, W. L., & Clark, D. R. (1977). A review of drugs affecting the heart. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, *171*(1), 85-92.
- Jivago, J. L. P., Brito, J. L. M., Capistrano, G., Vinícius-Araújo, M., Lima Verde, E., Bakuzis, A. F., ... & Lucci, C. M. (2021). New prospects in neutering male animals using magnetic nanoparticle hyperthermia. *Pharmaceutics*, *13*(9), 1465.
- Joffily, D., Souza, L. D., Gonçalves, S. M., Pinto, J. V., Barcellos, M. C. B., & Alonso, L. D. S. (2013). Medidas para o controle de animais errantes desenvolvidas pelo grupo Pet Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. *Rev Em Ext*, *12*(1), 197-211.
- Johnston, S. D., Kustritz, M. V., & Olson, P. S. (2001). Canine and feline theriogenology.
- Kastelic, J. P., Cook, R. B., & Coulter, G. H. (1997). Contribution of the scrotum, testes, and testicular artery to scrotal/testicular thermoregulation in bulls at two ambient temperatures. *Animal reproduction science*, *45*(4), 255-261.
- Kastelic, J. P., Rizzoto, G., & Thundathil, J. (2018). Testicular vascular cone development and its association with scrotal thermoregulation, semen quality and sperm production in bulls. *Animal*, *12*(s1), s133-s141.
- Koeppen, B. M., & Stanton, B. A. (2009). Sistemas reprodutores masculino e feminino. *Berne & Levy Fisiologia*. 6<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro, Elsevier Editora Ltda, 787-788.

- Koger, L. M. (1977). Calcium chloride, practical necrotising agent. *The Bovine Practitioner*, 118-119.
- Kohout, C., Santi, C., & Polito, L. (2018). Anisotropic gold nanoparticles in biomedical applications. *International journal of molecular sciences*, 19(11), 3385.
- Kravets, V. G., Kabashin, A. V., Barnes, W. L., & Grigorenko, A. N. (2018). Plasmonic surface lattice resonances: a review of properties and applications. *Chemical reviews*, 118(12), 5912-5951.
- Kumar, C. S., & Mohammad, F. (2011). Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 63(9), 789-808.
- Kumar, S., Rhim, W. K., Lim, D. K., & Nam, J. M. (2013). Glutathione dimerization-based plasmonic nanoswitch for biodetection of reactive oxygen and nitrogen species. *ACS nano*, 7(3), 2221-2230.
- Kustritz, M. V. R. (2018). Population control in small animals. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 48(4), 721-732.
- Kutzler, M., & Wood, A. (2006). Non-surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology*, 66(3), 514-525.
- Leoci, R., Aiudi, G., Silvestre, F., Lissner, E. A., & Lacalandra, G. M. (2014a). Alcohol diluent provides the optimal formulation for calcium chloride non-surgical sterilization in dogs. *Acta veterinaria scandinavica*, 56(1), 1-7.
- Leoci, R., Aiudi, G., Silvestre, F., Lissner, E. A., Marino, F., & Lacalandra, G. M. (2014). A dose-finding, long-term study on the use of calcium chloride in saline solution as a method of nonsurgical sterilization in dogs: evaluation of the most effective concentration with the lowest risk. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 56, 1-8.
- Levy, J. K., Crawford, P. C., Appel, L. D., & Clifford, E. L. (2008). Comparison of intratesticular injection of zinc gluconate versus surgical castration to sterilize male dogs. *American journal of veterinary research*, 69(1), 140-143.
- Li, W. Q., Sun, C. Y., Wang, F., Wang, Y. C., Zhai, Y. W., Liang, M., ... & Sun, F. (2013). Achieving a new controllable male contraception by the photothermal effect of gold nanorods. *Nano letters*, 13(6), 2477-2484.
- Li, W. Q., Sun, C. Y., Wang, F., Wang, Y. C., Zhai, Y. W., Liang, M., ... & Sun, F. (2013). Achieving a new controllable male contraception by the photothermal effect of gold nanorods. *Nano letters*, 13(6), 2477-2484.

- Liu, Z., Liu, X., Du, Y., Ren, J., & Qu, X. (2015b). Using plasmonic copper sulfide nanocrystals as smart light-driven sterilants. *ACS nano*, 9(10), 10335-10346.
- Liu, Z., Liu, X., Ran, X., Ju, E., Ren, J., & Qu, X. (2015a). Single-layer tungsten oxide as intelligent photo-responsive nanoagents for permanent male sterilization. *Biomaterials*, 69, 56-64.
- Massei, G., & Miller, L. A. (2013). Nonsurgical fertility control for managing free-roaming dog populations: a review of products and criteria for field applications. *Theriogenology*, 80(8), 829-838.
- Mieusset, R., & Bujan, L. (1995). Testicular heating and its possible contributions to male infertility: a review. *International journal of andrology*, 18(4), 169-184.
- Migally, N. B., & Fahim, M. S. (1984). Pharmacokinetics of zinc tannate after intratesticular injection. *Archives of andrology*, 13(2-3), 129-136.
- Nasri, S., Rezai-Zarchi, S., Kerishchi, P., & Sadeghi, S. (2015). The effect of iron oxide nanoparticles on sperm numbers and mobility in male mice. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 17(10).
- Nelson, W. O. (1951). Mammalian spermatogenesis: effects of experimental cryptorchidism in the rat and non-descent of the testis in man. *Recent Prog Horm Res*, 6, 29-62.
- Oberdörster, G. (2010). Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. *Journal of internal medicine*, 267(1), 89-105.
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., & Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental health perspectives*, 113(7), 823-839.
- Oliveira, B., Rocha, L., Mól, B., & Valle, G. R. (2012). Métodos cirúrgicos e não cirúrgicos de contracepção masculina em cães. *Sinapse Múltipla*, 1(1).
- Oliveira, E. C. S., Fagundes, A. K. F., Melo, C. C. S., Nery, L. T. B., Rêvoredó, R. G., Andrade, T. F. G., ... & Silva Jr, V. A. (2013). Intratesticular injection of a zinc-based solution for contraception of domestic cats: a randomized clinical trial of efficacy and safety. *The Veterinary Journal*, 197(2), 307-310.
- Olson, P. N., & Johnston, S. D. (1993). New developments in small animal population control.
- Organização de Proteção Animal. Abandono de animais é crime. Notícias UNB. Disponível em: <https://noticias.unb.br/artigos-main/6573-abandono-de-animais-e-crime>. Acesso em: 17 de setembro de 2023.

- Pineda, M. H., & Dooley, M. P. (1984). Surgical and chemical vasectomy in the cat. *American journal of veterinary research*, 45(2), 291-300.
- Pineda, M. H., Reimers, T. J., Faulkner, L. C., Hopwood, M. L., & Seidel Jr, G. E. (1977). Azoospermia in dogs induced by injection of sclerosing agents into the caudae of the epididymides. *American journal of veterinary research*, 38(6), 831-838.
- Pinheiro, R. G., Pinheiro, M., & Neves, A. R. (2021). Nanotechnology innovations to enhance the therapeutic efficacy of quercetin. *Nanomaterials*, 11(10), 2658.
- Powers, K. W., Brown, S. C., Krishna, V. B., Wasdo, S. C., Moudgil, B. M., & Roberts, S. M. (2006). Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part VI. Characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation. *Toxicological Sciences*, 90(2), 296-303.
- Rafatmah, D., Mogheiseh, A., & Eshghi, D. (2019). Chemical sterilization with intratesticular administration of zinc gluconate in adult dogs: A preliminary report. *Basic and clinical andrology*, 29, 1-9.
- Raman, G., Purandare, T. V., & Munshi, S. R. (1976). Sterility induced in male rats by injection of chemical agents into the vas deferens. *Andrologia*, 8(4), 321-325.
- Reece, W. O. (1991). *Physiology of domestic animals*. Lea & Febiger.
- Reichler, I. M. (2008). Surgical contraception: Pros and cons. In *6th International Symposium on Canine and Feline Reproduction and 6th Biannual European Veterinary Society for Small Animal Reproduction Congress*.
- Reichler, I. M. (2009). Gonadectomy in cats and dogs: a review of risks and benefits. *Reproduction in Domestic Animals*, 44, 29-35.
- Reichmann, M. L. A. B., Figueiredo, A. C. C., Pinto, H. B. F., & Nunes, V. F. P. (2000). Controle de animais de estimação. *São Paulo: Instituto Pasteur*.
- Rizzoto, G., & Kastelic, J. P. (2020). A new paradigm regarding testicular thermoregulation in ruminants. *Theriogenology*, 147, 166-175.
- Rizzoto, G., Hall, C., Tyberg, J. V., Thundathil, J. C., Caulkett, N. A., & Kastelic, J. P. (2018). Increased testicular blood flow maintains oxygen delivery and avoids testicular hypoxia in response to reduced oxygen content in inspired air. *Scientific Reports*, 8(1), 10905.
- Rodrigues, H. F., Mello, F. M., Branquinho, L. C., Zufelato, N., Silveira-Lacerda, E. P., & Bakuzis, A. F. (2013). Real-time infrared thermography detection of magnetic nanoparticle hyperthermia in a murine model under a non-uniform field configuration. *International Journal of Hyperthermia*, 29(8), 752-767.

- Sabale, S., Kandesar, P., Jadhav, V., Komorek, R., Motkuri, R. K., & Yu, X. Y. (2017). Recent developments in the synthesis, properties, and biomedical applications of core/shell superparamagnetic iron oxide nanoparticles with gold. *Biomaterials science*, 5(11), 2212-2225.
- Saito, C. H., Pedrosa, L. P., Zatz, M. G., & dos Santos, G. B. (2002). A matança dos gatos na UNB: estilhaços da distância entre homens e animais. *Rev. eletrônica Mestr. Educ. Ambient*, 9.
- Savage, N., & Diallo, M. S. (2005). Nanomaterials and water purification: opportunities and challenges. *Journal of Nanoparticle research*, 7, 331-342.
- Schatten, H., & Constantinescu, G. M. (Eds.). (2007). *Comparative reproductive biology* (pp. 117-131). Blackwell Pub.
- Shahat, A. M., Rizzoto, G., & Kastelic, J. P. (2020). Amelioration of heat stress-induced damage to testes and sperm quality. *Theriogenology*, 158, 84-96.
- Sharma, R., & Agarwal, A. (2011). Spermatogenesis: an overview. *Sperm chromatin: biological and clinical applications in male infertility and assisted reproduction*, 19-44.
- Silva, A. C., & Bock, N. A. (2008). Manganese-enhanced MRI: an exceptional tool in translational neuroimaging. *Schizophrenia bulletin*, 34(4), 595-604.
- Singh, G., Kumar, A., Dutt, R., Arjun, V., & Jain, V. K. (2020). Chemical castration in animals: an update. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 9(4), 2787-2807.
- Siqueira, E. R. L. (2019). Nanoestruturas magnéticas revestidas com ouro como agente indutor de magneto-hipertermia para tratamento de câncer de mama.
- Songca, S. P., & Oluwafemi, O. (2023). *Combination Therapies Involving Photodynamic Therapy*. Royal Society of Chemistry.
- Stabenfeldt, G. H.; Edqvist, L. (1996). *Processos reprodutivos do macho*. In: Swenson M. J.; Reece, W. O. Dukes – Fisiologia dos animais domésticos. Rio de Janeiro: editora Guanabara Koogan S. A. Cap. 35, (pp. 603-614).
- Sternheim, I. (2012). How Holland became free of Stray dogs. *Isis*, 2-9.
- Tan, K., Rand, J., & Morton, J. (2017). Trap-neuter-return activities in urban stray cat colonies in Australia. *Animals*, 7(6), 46.
- Tortora, GJ, Derrickson, B., Tzal, K., de los Ángeles Gutiérrez, M., & Klajn, D. (2002). *Princípios de anatomia e fisiologia* (Vol. 7). Imprensa da Universidade de Oxford.
- Turton, J. D., & Rechcigl, M. (2018). Castration and animal productivity. In *Handbook of Agricultural Productivity* (pp. 213-262). CRC Press.

- Valdiglesias, V., Kiliç, G., Costa, C., Fernández-Bertólez, N., Pásaro, E., Teixeira, J. P., & Laffon, B. (2015). Effects of iron oxide nanoparticles: cytotoxicity, genotoxicity, developmental toxicity, and neurotoxicity. *Environmental and molecular mutagenesis*, *56*(2), 125-148.
- Vanderstichel, R., Forzán, M. J., Pérez, G. E., Serpell, J. A., & Garde, E. (2015). Changes in blood testosterone concentrations after surgical and chemical sterilization of male free-roaming dogs in southern Chile. *Theriogenology*, *83*(6), 1021-1027.
- Vannucchi, C. I., Angrimani, D. D. S. R., Eyherabide, A. R., Mazzei, C. P., Lucio, C. D. F., Maiorka, P. C., ... & Nichi, M. (2015). Effects of intratesticular administration of zinc gluconate and dimethyl sulfoxide on clinical, endocrinological, and reproductive parameters in dogs. *Theriogenology*, *84*(7), 1103-1110.
- Vieira, J. I. T., da Silva, T. A., Barbosa, W. M. P., de Lima, F. C. S., & da Silva, E. C. B. (2018). Influência da temperatura sobre a função testicular. *Medicina Veterinária (UFRPE)*, *12*(1), 62-72.
- Vines, J. B., Yoon, J. H., Ryu, N. E., Lim, D. J., & Park, H. (2019). Gold nanoparticles for photothermal cancer therapy. *Frontiers in chemistry*, *7*, 167.
- Wang, C., Yang, C., Zeng, Y., & Zhang, M. (2023). GnRH-immunocastration: an alternative method for male animal surgical castration. *Frontiers in Veterinary Science*, *10*.
- Weedon, G. R. (2014). Zeuterin: The Non-Surgical Alternative to Neutering.
- Yavetz, H., Harash, B., Paz, G., Yogev, L., Jaffa, A. J., Lessing, J. B., & Homonnai, Z. T. (1992). Cryptorchidism: incidence and sperm quality in infertile men. *Andrologia*, *24*(5), 293-297.
- Yu, T. J., Li, P. H., Tseng, T. W., & Chen, Y. C. (2011). Multifunctional Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/alumina core/shell MNPs as photothermal agents for targeted hyperthermia of nosocomial and antibiotic-resistant bacteria. *Nanomedicine*, *6*(8), 1353-1363.
- Yue, K., Nan, J., Zhang, X., Tang, J., & Zhang, X. (2016). Photothermal effects of gold nanoparticles induced by light emitting diodes. *Applied Thermal Engineering*, *99*, 1093-1100.
- Zhen, Z., & Xie, J. (2012). Development of manganese-based nanoparticles as contrast probes for magnetic resonance imaging. *Theranostics*, *2*(1), 45.

## **5. CAPÍTULO 2 - Fototerapia testicular mediada por nanopartículas de maghemita recobertas com citrato e ouro**

### **5.1. Introdução**

A crescente preocupação com o aumento do número de animais de rua tem impulsionado a busca por métodos eficazes e éticos de controle populacional. O método convencional de castração cirúrgica, embora definitivo, enfrenta desafios, limitando sua aplicabilidade em larga escala (Oliveira *et al.*, 2012; Rafatmah *et al.*, 2019).

As nanopartículas de ouro são conhecidas por sua capacidade única de converter luz em calor, uma característica amplamente explorada em tratamentos de câncer por meio da fototerapia (Coelho *et al.*, 2016; Siqueira *et al.*, 2019). No entanto, a aplicação dessa tecnologia inovadora no contexto da esterilização animal, particularmente em machos, ainda permanece pouco explorada.

Nesse contexto, a fototerapia testicular surge como uma abordagem interessante e promissora para a esterilização de machos. Essa técnica combina a utilização de luz de LED com as propriedades aquecedoras das nanopartículas de ouro, proporcionando uma alternativa promissora e inovadora para lidar com a problemática do controle populacional de animais.

O objetivo deste capítulo foi avaliar o efeito da fototerapia testicular utilizando uma nanopartícula de maghemita recoberta com citrato e ouro associada a uma fonte de luz proveniente de um LED nos parâmetros reprodutivos (volume e peso testicular, parâmetros espermáticos e histopatologia de testículos e epidídimos) dos animais pelo período de duração da espermatogênese. Além disso, também foi um objetivo avaliar a biodistribuição da nanopartícula utilizada para órgãos vitais (rim, fígado, baço e pulmão) quando aplicada por via intratesticular e de seus efeitos sobre estes órgãos.

### **5.2. Material e Métodos**

#### *5.2.1. Nanopartículas de Ouro*

Foi utilizada uma nanopartícula magnética de maghemita recoberta com citrato e ouro (NPAu) na forma de um fluido magnético.

O fluido magnético foi produzido por rota adaptada de acordo com a evolução da metodologia descrita por Coelho *et al.* (2016). Para preparar a amostra de NPAu foi misturado e diluído 1 ml da amostra de  $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$  em 400 ml de água MilliQ e mantido em sonicação por 4 minutos em sonda grande com 40% da potência máxima. Em seguida, foram adicionados 1,7 ml (45 mg em 5 ml) de  $\text{HAuCl}_4$  1% e sonicado por mais 4 minutos. Após esse tempo, foram

adicionados 1,25 ml de NaBH<sub>4</sub> 0,3 mol/L em etanol (5 mg/ml) e sonificado por 4 minutos. Esses passos foram repetidos mais duas vezes. Para evaporação de volume foi utilizado a rota de evaporação a 60° C por 600 rpm por 48 h. Após a rota de evaporação a amostra foi reduzida para 30 ml e adicionado acetona, com auxílio de um imã o sobrenadante foi retirado e descartado. A acetona residual foi evaporada e obteve-se, então, 7,5 ml da amostra de NPAu no volume final. Essa amostra foi armazenada em tubo Falcon e mantida em temperatura ambiente.

As NPAu apresentam características conforme descrito na tabela a seguir:

**Tabela 1:** Dados de caracterização da nanopartícula de maghemita recoberta com citrato e ouro (NPAu).

<b>Parâmetros</b>	<b>NPAu</b>
<b>dMET (nm)</b>	12,1 (s = 0,30)
<b>Magnetização a saturação (emu/g)</b>	43
<b>Concentração ouro (em massa)</b>	12,1 %
<b>Diâmetro hidrodinâmico</b>	157 (DPI = 0,18)
<b>Potencial zeta (mV)</b>	-39,6 (pH = 7,0)

\*Adaptado de Cunha *et al.*, 2017

### 5.2.2. Fonte de luz e controle da potência luminosa

Como fonte de luz, empregou-se um LED emitindo luz no comprimento de onda de 808 nm, conectado a um sistema de controle de temperatura. Um microcontrolador, sistema Arduíno, acoplado a um software foi desenvolvido para monitorar e controlar a temperatura desejada nos experimentos.

Antes de iniciar o experimento com os animais, foi feito um teste de aquecimento das nanopartículas (NPAu) com irradiação pelo LED sem controlador. Para isso, foi adicionado aproximadamente 1 ml da amostra em um béquer de 10 ml e mantido sob incidência de luz em potência máxima do LED. A temperatura da amostra chegou a 67,5 °C em 3 segundos sem evaporar. Em seguida, um teste utilizando o controlador do Software foi realizado para calibração do equipamento, a fim de manter a temperatura em 45 °C.

O aquecimento dos testículos foi alcançado através da absorção da energia luminosa pelas nanopartículas, essa energia luminosa é convertida em energia térmica e como consequência eleva a temperatura dos compostos e testículos. A temperatura superficial dos testículos foi utilizada como sinal de realimentação para a criação de um controle, elaborado em malha fechada com algoritmo PI (proporcional-integral). O sinal de saída ocorreu através do ciclo de

trabalho de uma onda quadrada de 5v, técnica conhecida como controle PWM (Pulse Width Modulation), que então foi enviado para um circuito de controle específico para regular a corrente do LED de 808 nm diretamente relacionada ao ajuste da potência luminosa emitida. Para a aquisição das medidas de temperatura dos testículos, sensores termopar tipo K (junção cromel/alumel) foram utilizados na superfície dos testículos. Um chip MAX6675 foi utilizado para a compensação de junção fria e digitalização dos resultados, além disso, um filtro passa baixas digital, do tipo média móvel exponencial, foi empregado para reduzir o ruído presente nas medições. Por fim foram desenvolvidos um software do controlador PI, filtro digital e obtenção dos dados na plataforma Open-Hardware Arduino, por meio do microcontrolador ATMEGA128A.

### 5.2.3. *Animais e Desenho experimental*

Neste experimento foi utilizado um total de 18 ratos machos da linhagem Wistar, com cerca de 10 semanas de idade, obtidos do biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. Os animais foram alojados em gaiolas com quatro indivíduos por gaiola, mantidos em condições de temperatura ambiente, sob um regime de iluminação alternando entre 12 horas de luz e 12 horas de escuridão, com acesso irrestrito a ração peletizada para ratos e água.

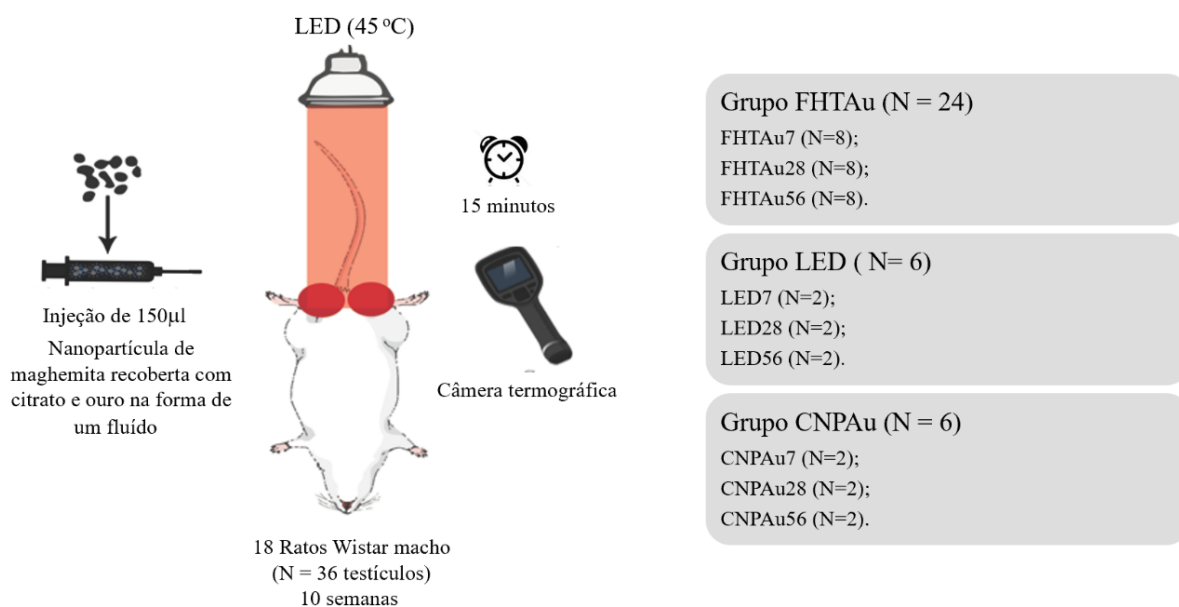
O uso dos animais foi aprovado pela Comissão de Ética em Uso Animal da Universidade de Brasília (UnBDOC n° 71/2019).

O experimento foi realizado com base no número de testículos (N=36 testículos; 18 animais) e divididos de acordo com o tratamento recebido da seguinte forma:

- Grupo FHTAu (N=24 testículos): Os testículos receberam injeção do fluido magnético e foram submetidos à incidência de luz do LED para gerar fotohipertermia.
- Grupo LED (N=6 testículos): Os testículos foram submetidos apenas à incidência de luz do LED, sem receber injeção do fluido magnético. Para assegurar que a exposição à luz no grupo LED fosse equiparável à do grupo FHT, seis animais foram submetidos à injeção intratesticular do fluido magnético em um dos testículos com a irradiação de luz do LED (FHT), enquanto o outro testículo recebeu apenas a irradiação de luz do LED, com a mesma intensidade luminosa.
- Grupo CNPAu (N=6 testículos): Os testículos receberam apenas injeção intratesticular do fluido magnético de maghemita recoberta com citrato e ouro (NPAu).

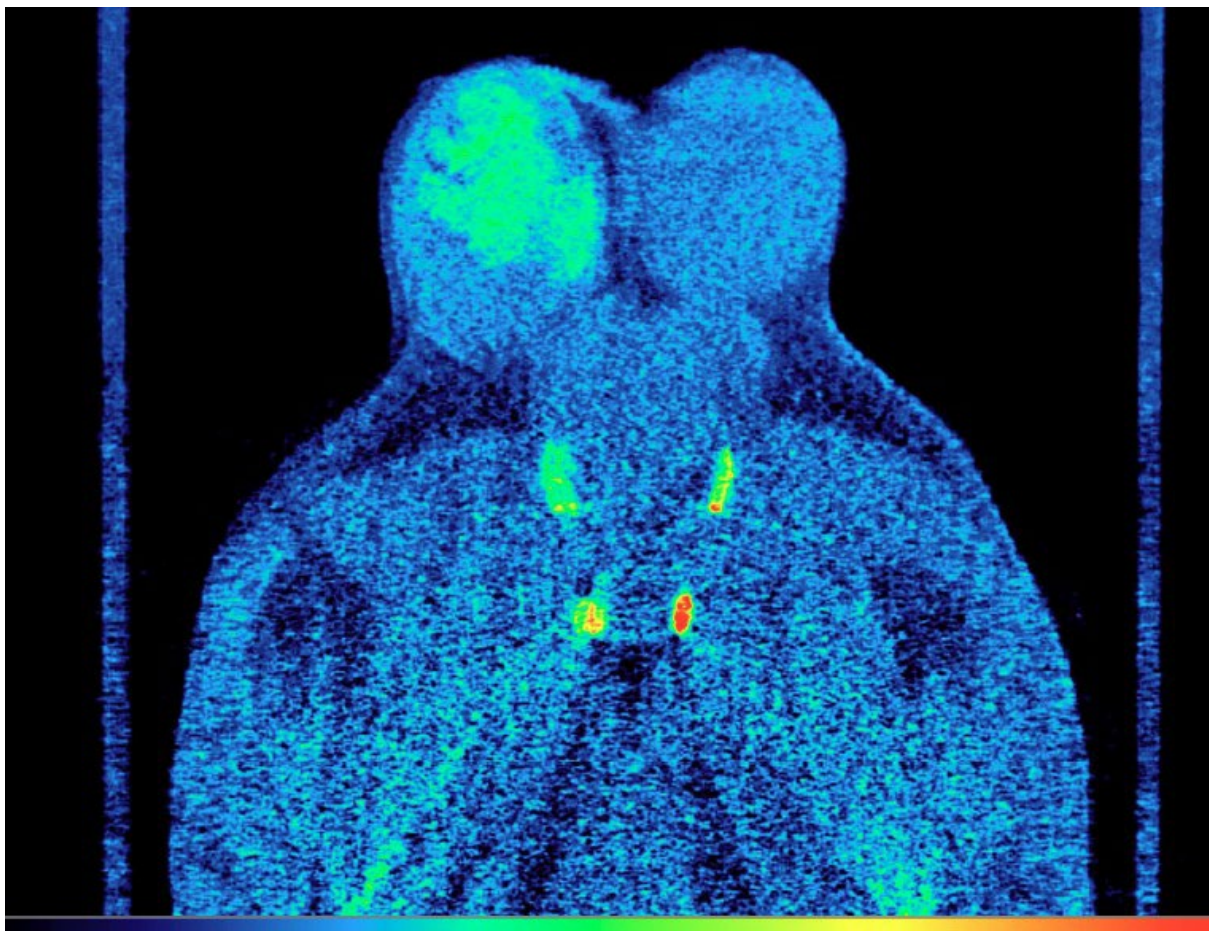
Além disso, os tratamentos foram subdivididos com relação ao dia da eutanásia, a saber: 7, 28 e 56 dias após o tratamento, formando os seguintes subgrupos (Figura 4):

- FHTAu7 (N=8), FHTAu28 (N=8) e FHTAu56 (N=8).
- LED7 (N=2), LED28 (N=2) e LED56 (N=2).
- CNPAu7 (N=2), CNPAu28 (N=2) e CNPAu56 (N=2).



**Figura 4:** Desenho experimental do método de fotohipertermia testicular.

Após injeção do fluido magnético apenas no testículo esquerdo, um animal do grupo CNPAu foi submetido a avaliação no microtomógrafo para comparar a diferença de imagens entre o tecido testicular com a nanopartícula e o tecido testicular sem a nanopartícula, para avaliar a distribuição do fluido aplicado (Figura 5). Após o procedimento este mesmo animal recebeu a injeção do fluido no testículo direito.

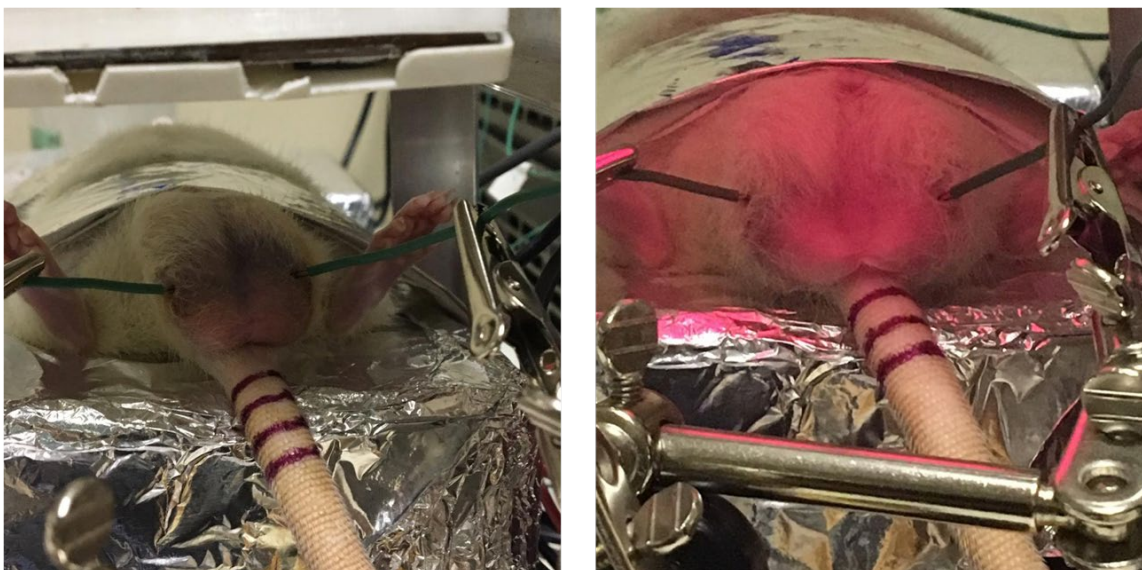


**Figura 5:** Microtomografia dos testículos de um animal do grupo CNPAu: à esquerda, após a injeção de nanopartículas magnéticas, e à direita, sem a nanopartícula.

No dia do tratamento (D0) todos os animais foram pesados e receberam uma dose de morfina (Sulfato de morfina, 2 mg/kg IM) para potencializar o efeito sedativo e analgésico. Alguns minutos depois receberam uma dose de anestésico intraperitoneal contendo Cetamina (Cetamin®, Syntec, 60 mg/kg) e Xilazina (Calmiun®, Agener União, 8 mg/kg). O protocolo neurocepto analgésico foi realizado pela Med. Vet. Ana Bárbara Rocha Silva CRMV 2015/DF.

Assim que a anestesia fez efeito, foram injetados 150 µl do fluido magnético NPAu em três pontos distintos dos testículos (cranial, médio e caudal) dos grupos CNPAu e FHTAu. Os animais dos grupos FHTAu e LED foram posicionados no equipamento de modo que a irradiação de luz do LED incidisse na superfície ventral dos testículos, a uma distância de 4 cm. Além disso, foram posicionados um termopar do tipo K (junção cromel/alumel) na superfície de cada testículo (Figura 6) para medir a temperatura e fornecer dados para o microcontrolador, a fim de manter a temperatura dos testículos tratados em 45° C por 15 minutos. Além disso, uma câmera termográfica FLIR® (FLIR Systems, Wilsonville, USA) T420 foi utilizada para observar a alteração de calor da região testicular durante o procedimento. Após o tratamento

todos os animais receberam uma dose de analgésico e anti-inflamatório (Meloxicam 1 mg/Kg SC).



**Figura 6:** Posicionamento dos animais durante o procedimento de fotohipertermia.

#### 5.2.4. Parâmetros avaliados

**Avaliação de dor:** Os animais foram avaliados visualmente quanto a manifestações de dor, de acordo com a escala de expressões faciais e corporais descrita por Sotocinal *et al.* (2011), e sinais de inflamação a cada 2h nas primeiras 12h e diariamente durante a primeira semana. O comportamento e a aparência geral dos animais foram observados semanalmente durante todo o experimento.

**Peso vivo:** Os animais foram pesados diariamente nos primeiros sete dias e semanalmente até o final do experimento, para monitorar seu desenvolvimento corporal e consumo de alimentos.

**Avaliações ultrassonográficas:** Os animais passaram por avaliação de ultrassonografia testicular semanalmente para avaliar a presença, tamanho e aparência geral dos testículos e epidídimos. Para isso foi utilizado um aparelho de ultrassom Doppler colorido veterinário (modelo Z5 vet, Mindray, Guangdong, China) com sonda de multifrequência linear (faixa de 7,5 a 10 MHz).

**Avaliações post-mortem:** Após a eutanásia foram retirados os dois testículos e epidídimos, fígado, baço, rins e pulmões. Os testículos foram separados dos epidídimos, medidos e pesados e ambos foram fixados em solução de Bouin por 24 h para análises histopatológicas. As medidas de comprimento e largura (cm) dos testículos foram utilizadas para determinar seu volume. Para isso foi utilizada a média de duas equações matemáticas a do cilindro  $VOLC =$

$[(LARG/2)^2 \times \Pi \times (COMP)]$ ; e a do prolato esferoide  $VOLP = [4/3 \times \Pi \times (LARG/2)^2 \times (COMP/2)]$ , conforme descrito por Louvandini *et al.* (2008). O peso relativo dos testículos foi obtido dividindo o peso de cada testículo pelo peso corporal do animal, com o resultado expresso em porcentagem.

As caudas dos epidídimos foram maceradas em 2 ml de solução salina aquecida a 37° C em uma placa aquecedora para preservar a temperatura dos espermatozoides. Uma gota dessa suspensão foi imediatamente colocada em uma lâmina para avaliação da porcentagem de espermatozoides móveis em microscópio de luz (Modelo E100, Nikon Instruments, Shanghai, China). Em seguida, 1 ml da suspensão resultante foi separado e adicionado a 1 ml de formalina 10%, fixados para análise de morfologia espermática e para determinar concentração de espermatozoides na cauda dos epidídimos. Na morfologia espermática foram contadas 200 células de cada lavado epididimário e a determinação da concentração espermática foi feita em câmara de Neubauer (CBRA, 1998). A cabeça e o corpo dos epidídimos foram fixados em solução de Bouin por 24h e processados para as análises histopatológicas.

Os demais órgãos foram pesados e divididos em duas partes, uma parte foi fixada em formol 10% por 24h para análises histopatológicas e a outra foi congelada para posterior quantificação das nanopartículas. O peso relativo de cada órgão foi obtido dividindo o peso do órgão pelo peso corporal do animal, com o resultado expresso em porcentagem.

**Processamento histológico:** Os órgãos destinados à análise histopatológica foram desidratados em soluções de concentrações crescentes de etanol (80%, 90% e 100%), em seguida foram diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Foram realizados cortes com espessura de 5µm, para montagem das lâminas e corados com Hematoxilina e Eosina (HE). As lâminas foram avaliadas e fotografadas em microscópio de luz (EVOSTM FL Auto Imaging System, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Na histologia dos testículos foram avaliadas a estrutura geral do órgão, assim como, a organização dos túbulos seminíferos, presença de células da linhagem germinativa, integridade da lâmina basal e possíveis alterações no parênquima e estroma testicular. Nos epidídimos foram avaliadas a estrutura geral do órgão, incluindo a organização dos ductos epididimários, a presença dos espermatozoides nos ductos, a integridade do epitélio epididimário e a ocorrência de possíveis alterações e sinais de inflamação. Os outros órgãos (baço, fígado, rins e pulmões) foram avaliados quanto à sua estrutura e integridade gerais.

### 5.2.5. Quantificação das Nanopartículas nos órgãos

Para a quantificação das NPAu, a porção dos órgãos previamente congelada após eutanásia foi adicionada em tubo Falcon de 15 ml e digerida em 2 ml de ácido nítrico 70% por 48 horas em capela de exaustão. Após esse período, os tubos Falcon foram submetidos a um banho-maria ultrassônico de curta duração, seguido de um período de espera de 30 minutos. Em seguida foram transferidos 20 µL da amostra para 10 ml de água mili-Q. Por fim, a quantificação da presença de ouro (Au) foi realizada por meio de Espectrometria de Massa por Plasma Acoplado Indutivamente (iCAP™ Q ICP-MS Thermo Scientific™) em colaboração com o professor Dr. Sérgio Moya e da técnica de laboratório Raquel Pazos do Centro de Investigación Cooperativa de Biomateriales, CIC biomaGUNE. Os valores encontrados pelo equipamento foram utilizados para chegarmos a um valor de miligrama de Au por grama de órgão de acordo com os cálculos detalhados no documento ISM02.3, Exhibit D da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (UEPA, 2023), a seguir:

$$\text{Concentração } \left( \frac{mg}{Kg} \right) = C \times \frac{Vf}{W \times S} \times \frac{DF}{1000}$$

C = Valor detectado em µg/L (a média em todas as replicações)

Vf = Volume final digerido (mL)

W = Alíquota inicial (g)

S = % Sólido/1000

DF = Fator de diluição

$$\% \text{ Sólido} = \frac{\text{Peso do sólido digerido (g)}}{\text{Peso total do sólido (g)}} \times 100$$

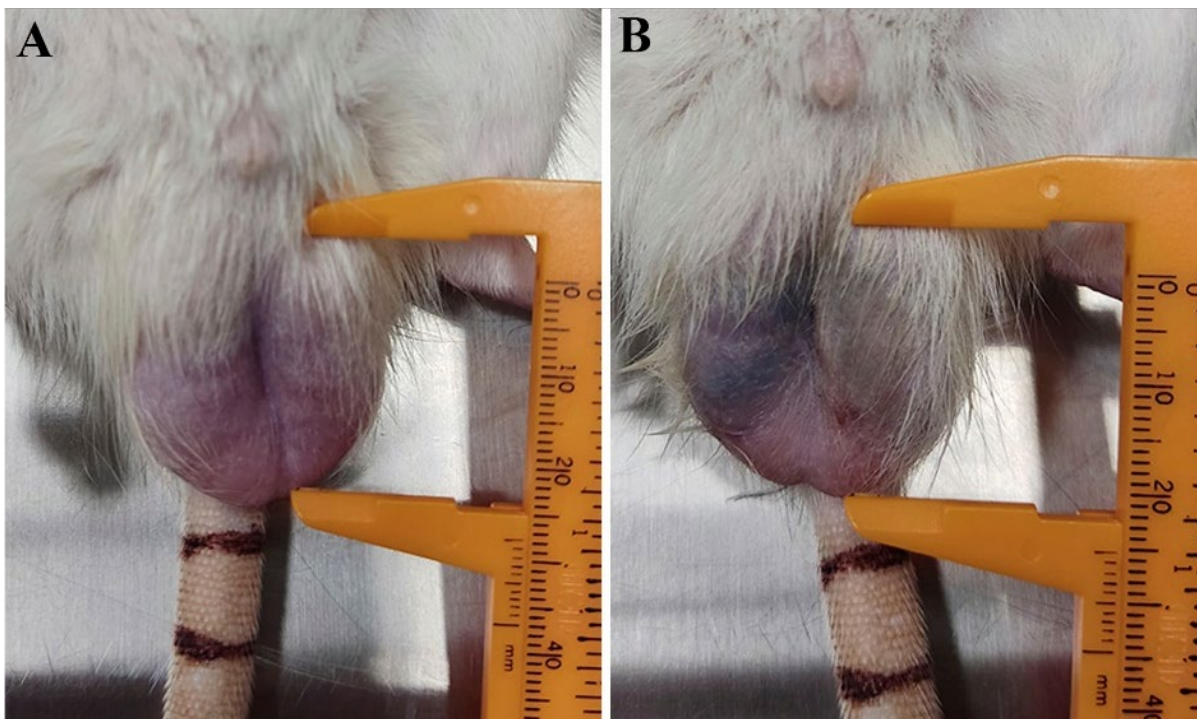
### 5.2.6. Análise Estatística

Todos os dados obtidos foram testados e demonstraram normalidade com o teste Shapiro-Wilk. Os dados avaliados foram comparados entre os grupos experimentais pela análise de variância (ANOVA) e teste de médias (Tukey) utilizando o programa estatístico GraphPad prism 8.0.2 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA), com nível de significância de 5% (P<0,05).

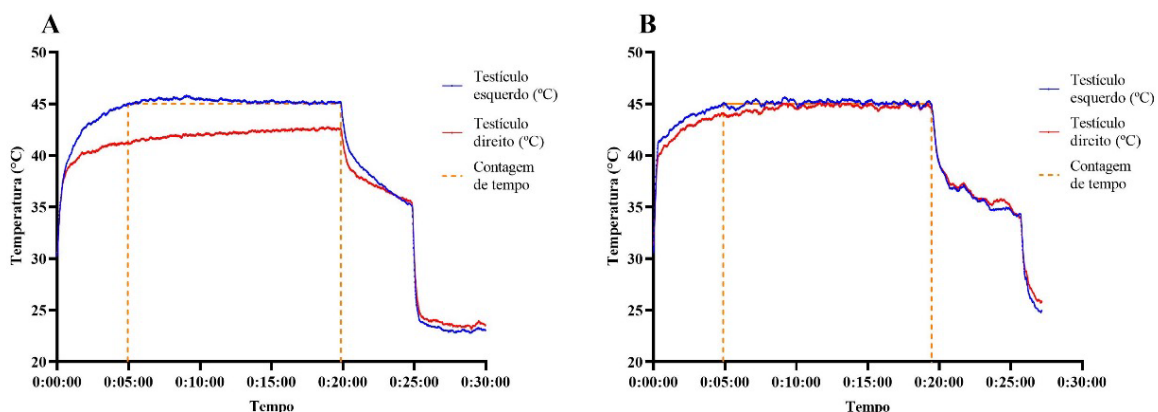
### 5.3. Resultados

Após a administração do fluido, os testículos apresentaram uma coloração mais escura (Figura 7). Essas características permaneceram inalteradas até o momento da eutanásia. Notou-se uma alteração imediata na textura dos testículos, tornando-os mais firmes. Ao longo dos dias seguintes, essa consistência foi gradualmente retornando à sua condição fibroelástica inicial.

A temperatura registrada pelos termopares antes do equipamento de LED ser ligado variou entre 29° C e 31° C. Após ligar o dispositivo, a temperatura aumentou progressivamente, alcançando uma média de 43,73° C (máxima 45,07° C e mínima 43,85° C) nos animais do grupo FHTAu e 41,84 °C (máxima 43,33° C e mínima 41,46° C) no grupo controle LED. O tempo médio para iniciarmos a contagem dos 15 minutos foi de 4 minutos e 38 segundos. Os animais que receberam a injeção do fluido magnético de NPAu em ambos os testículos apresentaram uma pequena variação de temperatura entre os dois testículos. Já os animais que receberam a injeção do fluido magnético em apenas um testículo e a incidência do LED em ambos os testículos apresentaram uma variação de temperatura média entre os testículos de 1,8° C (0,7 – 3,6° C) (Figura 8).

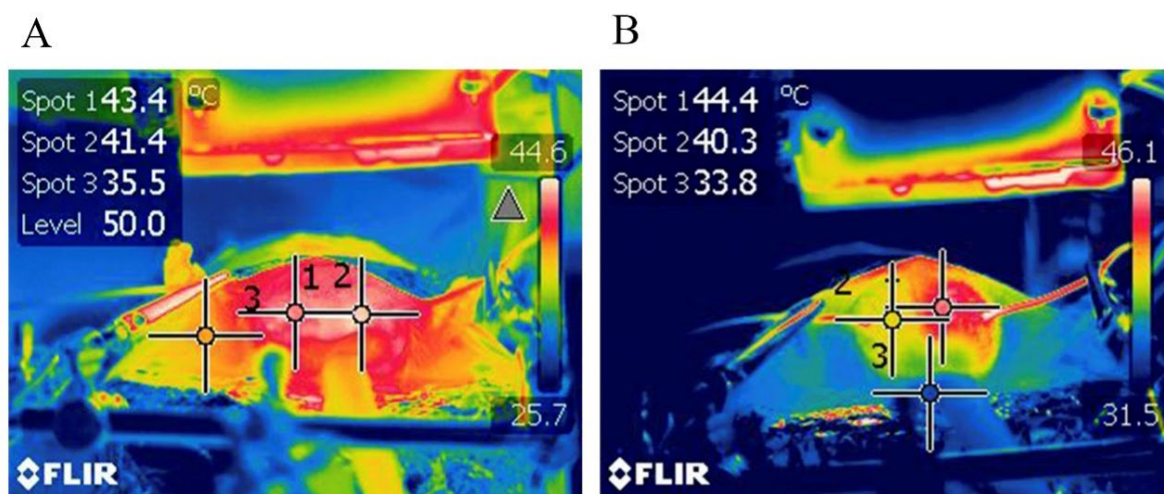


**Figura 7:** Aparência macroscópica dos testículos de um animal antes e depois da aplicação do fluido contendo NPAu. A: Testículos antes da injeção da nanopartícula; B: Testículos após a injeção da nanopartícula, no mesmo animal, apresentando coloração escura.



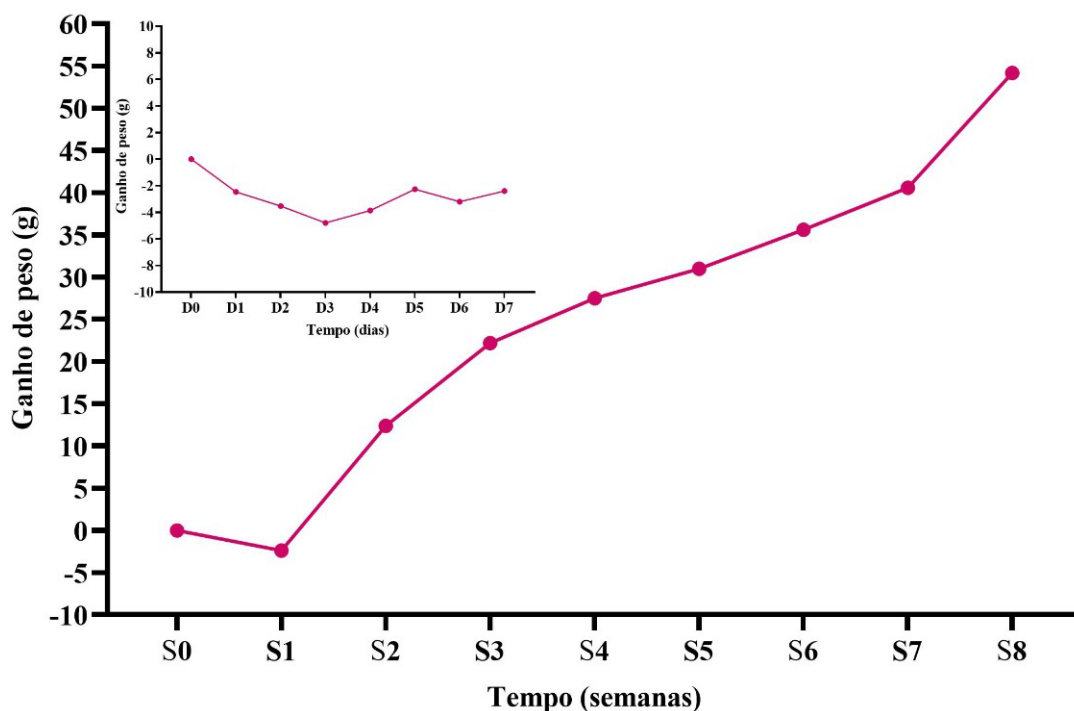
**Figura 8:** Curva de aquecimento dos testículos de animais da Fase 1. (A) o animal recebeu a injeção do fluido NPAu apenas no testículo esquerdo e irradiação de luz nos dois testículos. Testículos esquerdo – Grupo FHT-Au; testículo direito – Grupo LED. (B) o animal recebeu a injeção do fluido NPAu e irradiação de luz nos dois testículos (Grupo FHTAu).

As imagens registradas pela câmera térmica mostram um comparativo entre os animais que receberam o fluido de NPAu nos dois testículos (Figura 9A) e os animais que receberam o fluido em apenas um dos testículos (Figura 9B). Também foi possível observar que apenas a região testicular aqueceu durante o tratamento de fotohipertermia.



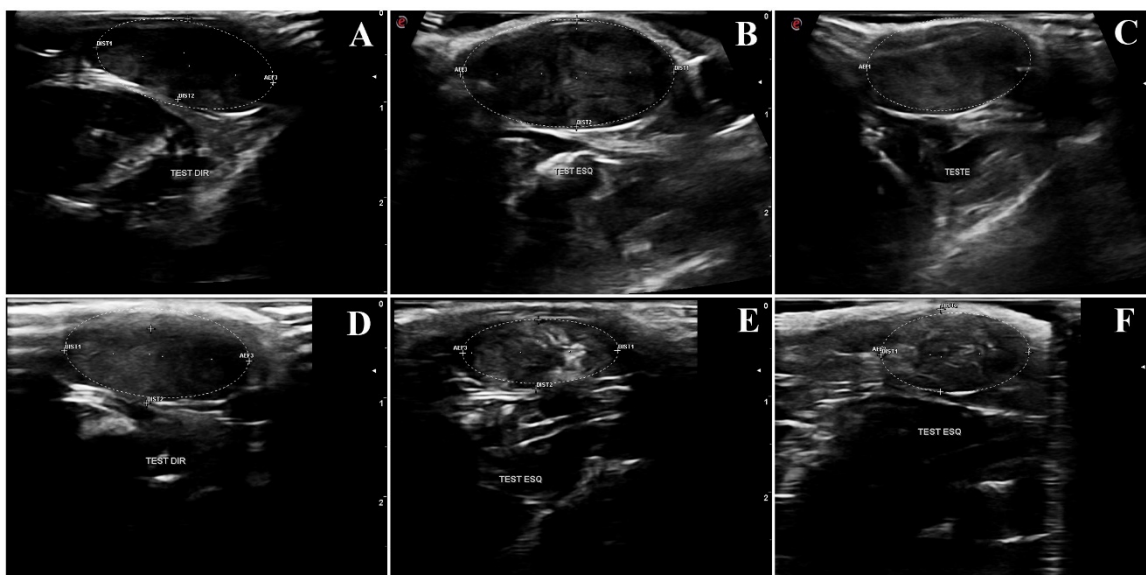
**Figura 9:** Fotos obtidas pela câmera térmica de (A) animal que recebeu o fluido NPAu nos dois testículos e (B) animal que recebeu o fluido NPAu apenas no testículo esquerdo.

Ao longo de todos os dias após o tratamento, os animais apresentaram apetite normal e todos eles apresentaram um ganho de peso dentro do esperado (Figura 10), sem diferença entre os tratamentos. É importante destacar que, após o tratamento, nenhum dos animais manifestou sinais de dor ou desconforto ao toque em momento nenhum. Além disso, não foram identificados quaisquer sinais de inflamação visível a olho nu nos testículos e epidídimos.



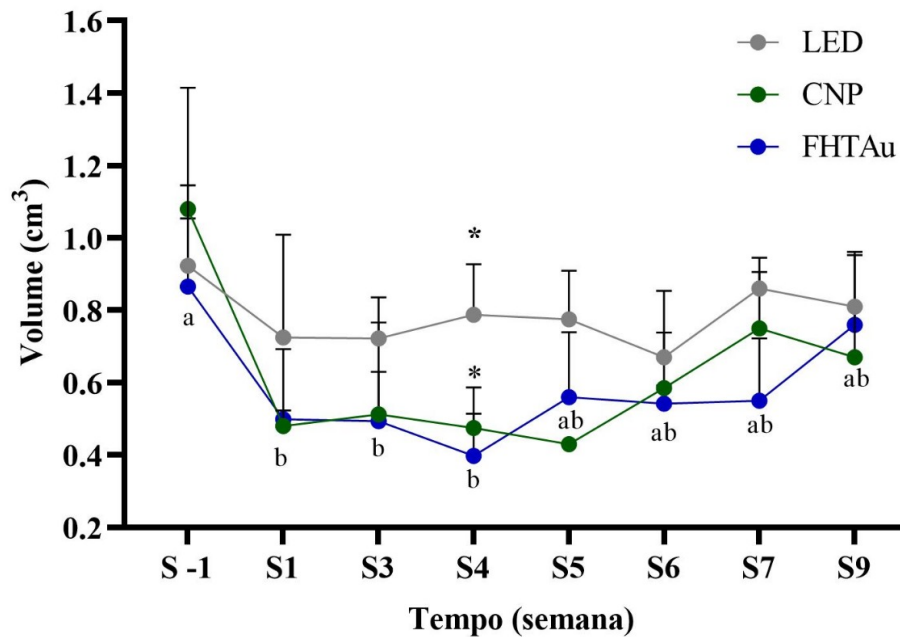
**Figura 10:** Ganho de peso corporal médio (g) de todos os animais dos grupos CNPAu e FHTAu. Inset mostra a variação de peso nos 7 primeiros dias. Gráfico mostra a variação de peso corporal ao longo das semanas.

A avaliação de ultrassonografia nos grupos que receberam a injeção do fluido de nanopartícula revelou uma ecotextura homogênea e hiperecoica no dia -6 em todos os animais (Figura 11A-C). Já no dia 26, o grupo LED não apresentou nenhuma diferença, porém os grupos CNPAu e FHTAu mostraram uma diminuição de tamanho do testículo com um contorno irregular, ecogenecidade mista e ecotextura grosseira de aspecto heterogêneo. Apesar disso, não foram observados sinais de inflamação. Essas características foram mantidas ao longo de todo o período de observação após o tratamento.



**Figura 11:** Ultrassom testicular dos grupos experimentais 6 dias antes do experimento - A: LED; B: CNPAu; C: FHTAu. E 26 dias após o procedimento de fototerapia - D: LED; E: CNPAu; F: FHTAu.

Os volumes testiculares, obtidos por meio das imagens de ultrassom (Figura 12), revelaram mudanças significativas nos grupos. No grupo FHTAu, houve uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) no volume testicular nas semanas 1 (0,50 ml), 3 (0,49 ml) e 4 (0,40 ml) após o tratamento quando comparado ao primeiro dia de ultrassom, realizado uma semana antes do tratamento (0,87 ml). Da mesma forma, os animais do grupo CNPAu apresentaram uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) no volume testicular nas semanas 1 (0,48 ml), 3 (0,51 ml), 4 (0,48 ml) e 5 (0,43 ml) após a administração do fluido NPAu quando comparado à semana anterior ao tratamento (1,08 ml). Já no grupo LED não houve diferença significativa no volume testicular entre as semanas. Na semana 4, tanto o grupo FHTAu quanto CNPAu apresentaram volume significativamente inferior ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo LED.

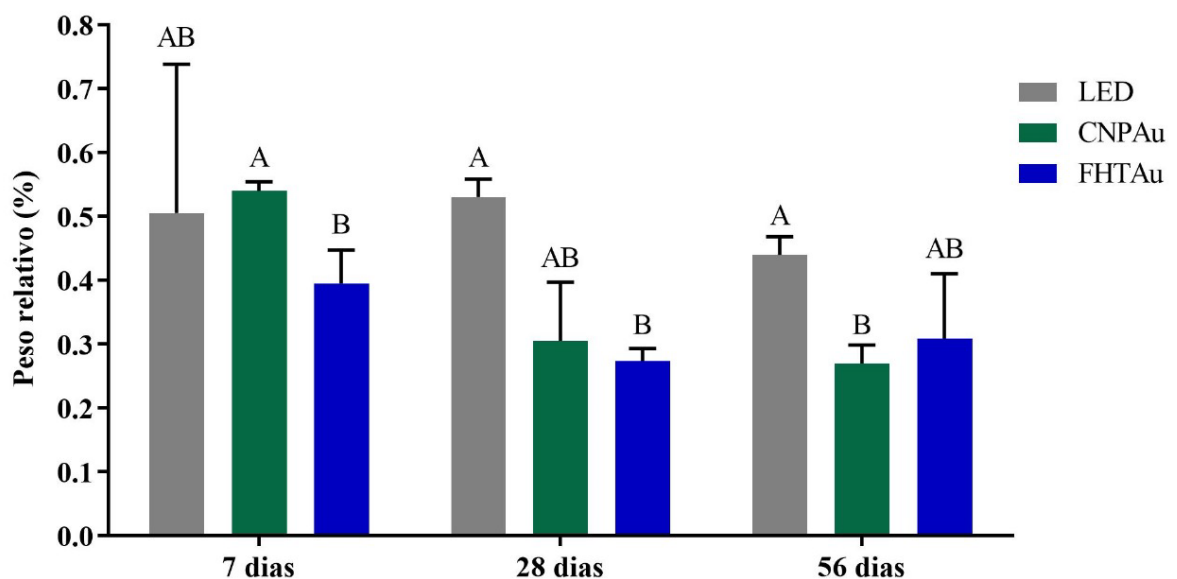


**Figura 12:** Média do volume testicular (cm<sup>3</sup>) medido pelo ultrassom, dos testículos dos grupos LED, CNPAu e FHTAu ao longo do período experimental.

(A, B): letras maiúsculas mostram diferença significativa ( $\leq 0,05$ ) entre os grupos no mesmo momento de avaliação.

(a, b): letras minúsculas mostram diferença significativa ( $\leq 0,05$ ) dentro do mesmo grupo em diferentes tempos.

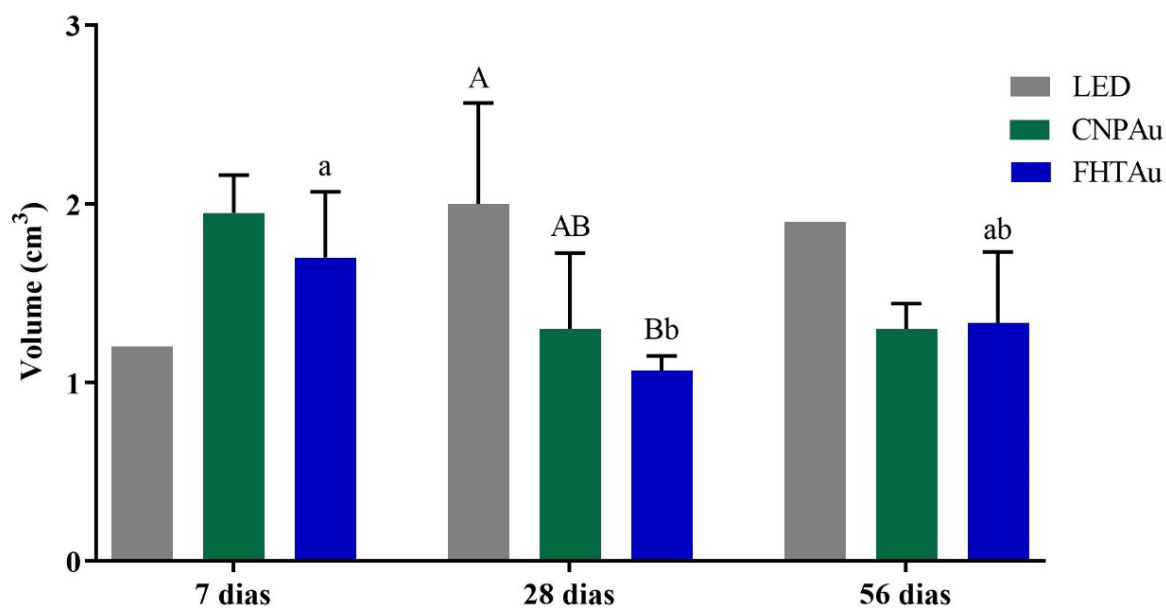
No dia da eutanásia, o peso relativo dos testículos (Figura 13) mostrou redução significativa ( $p < 0,05$ ) no grupo FHT-Au7 (0,40) em relação ao grupo CNP-Au7 (0,54), e no grupo FHT-Au28 (0,28) em relação ao grupo LED28 (0,53), bem como no grupo CNP-Au56 (0,27) em relação ao grupo LED56 (0,44).



**Figura 13:** Porcentagem de peso relativo dos testículos dos animais dos grupos LED, CNPAu e FHTAu ao final do experimento.

(A, B): letras maiúsculas mostram diferença significativa ( $\leq 0,05$ ) entre os grupos no mesmo momento de avaliação.

No que diz respeito à avaliação do volume testicular no dia da eutanásia (Figura 14), observou-se uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) no volume dos testículos no grupo FHTAu28 ( $1,06 \text{ cm}^3$ ) em comparação com o grupo FHTAu7 ( $1,70 \text{ cm}^3$ ). Além disso, o grupo FHTAu28 ( $1,06 \text{ cm}^3$ ) também apresentou um volume significativamente ( $p < 0,05$ ) menor em relação ao grupo LED28 ( $2,00 \text{ cm}^3$ ). Não foram observadas diferenças entre os grupos no dia 56.

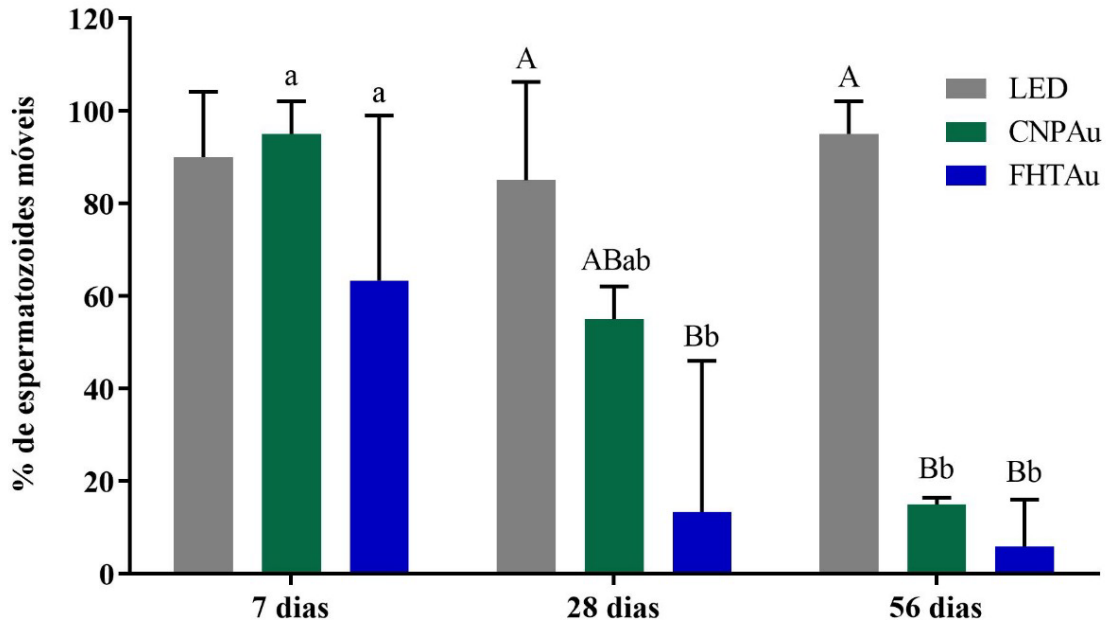


**Figura 14:** Média do volume testicular ( $\text{cm}^3$ ) dos testículos dos grupos LED, CNPAu e FHTAu, no final do experimento.

(A, B): letras maiúsculas mostram diferença significativa ( $\leq 0,05$ ) entre os grupos no mesmo momento de avaliação.

(a, b): letras minúsculas mostram diferença significativa ( $\leq 0,05$ ) dentro do mesmo grupo em diferentes tempos.

A motilidade espermática (Figura 15) diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) nos grupos FHTAu28 (13%) e FHTAu56 (6%) em relação ao grupo FHTAu7 (63%). Além disso, o grupo LED apresentou uma porcentagem significativamente maior de espermatozoides móveis nos grupos LED28 (85%) e LED56 (95%) em comparação ao grupo FHTAu nos mesmos dias (13% e 6% respectivamente).

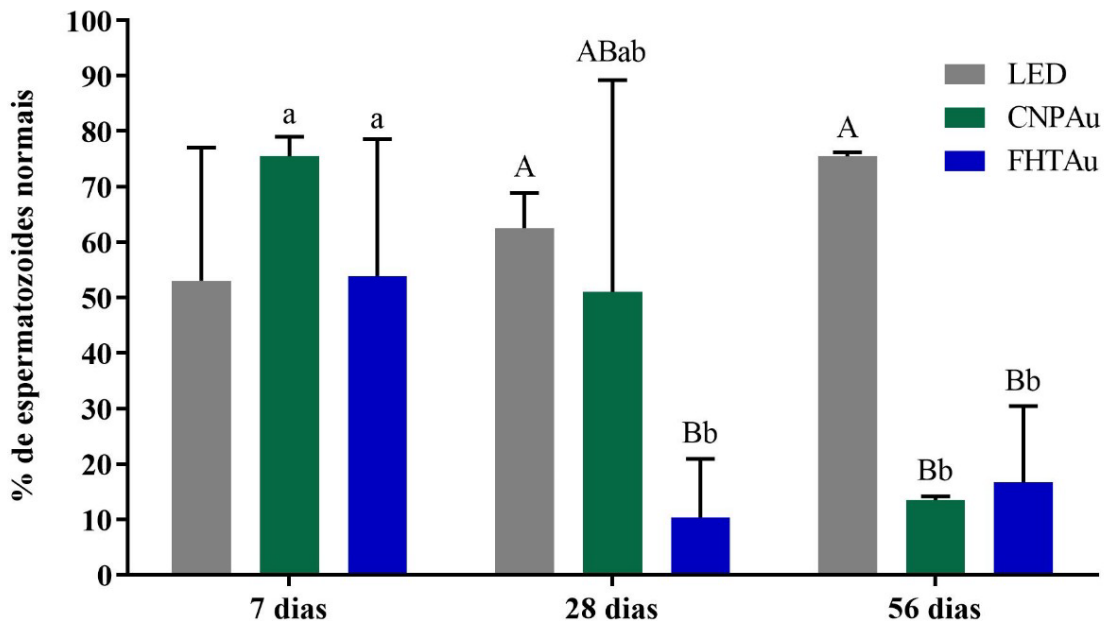


**Figura 15:** Motilidade espermática (%) no lavado da cauda do epidídimo dos grupos LED, CNPAu e FHTAu no final do experimento.

(A, B): letras maiúsculas mostram diferença significativa ( $\leq 0,05$ ) entre os grupos no mesmo momento de avaliação.

(a, b): letras minúsculas mostram diferença significativa ( $\leq 0,05$ ) dentro do mesmo grupo em diferentes tempos.

Nos dados de morfologia espermática (Figura 16) houve uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) na porcentagem de espermatozoides normais nos grupos FHTAu28 (10%) e FHTAu56 (17%) em comparação com o grupo FHTAu7 (54%), bem como nos grupos FHTAu28 (10%) e FHTAu56 (17%) em relação aos grupos LED28 (62%) e LED 56 (75%), respectivamente.

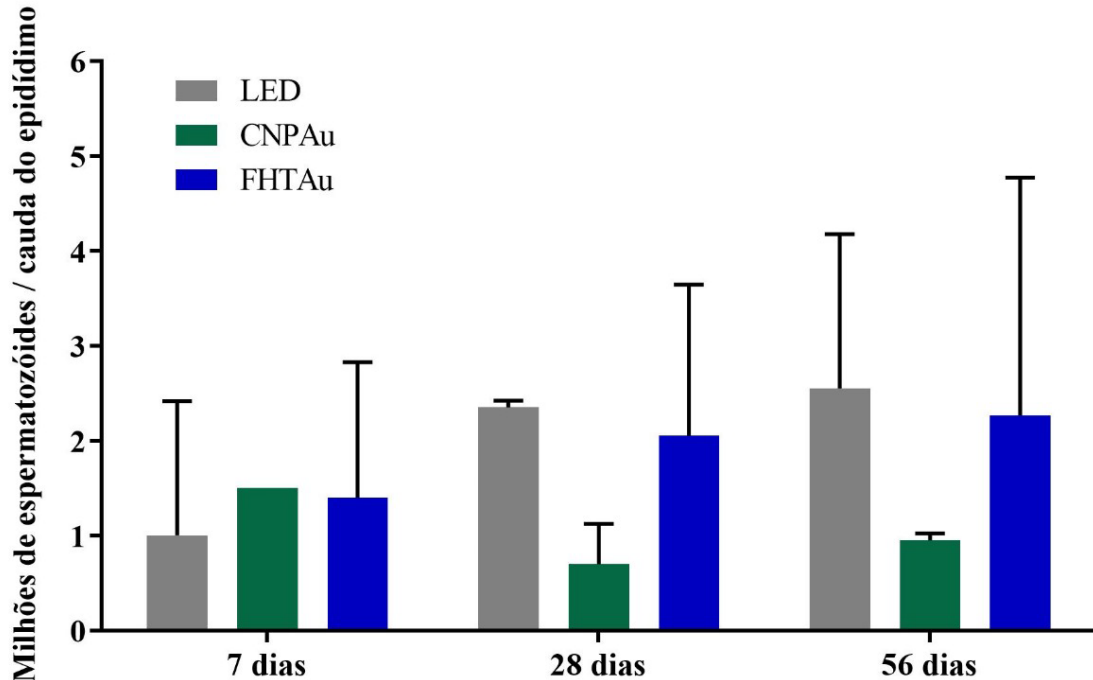


**Figura 16:** Porcentagem de espermatozoides normais na cauda dos epidídimos dos grupos LED, CNPAu e FHTAu no final do experimento.

(A, B): letras maiúsculas mostram diferença significativa ( $\leq 0,05$ ) entre os grupos no mesmo momento de avaliação.

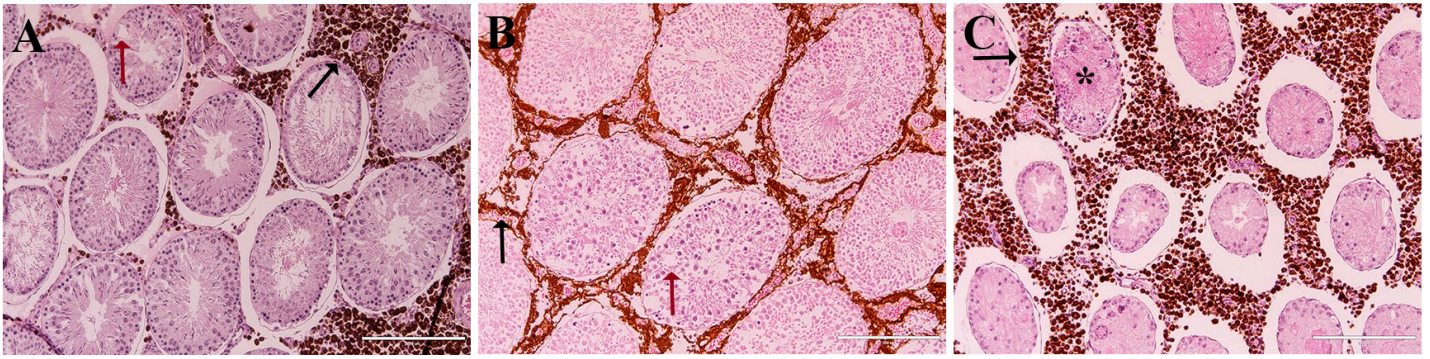
(a, b): letras minúsculas mostram diferença significativa ( $\leq 0,05$ ) dentro do mesmo grupo em diferentes tempos.

A concentração espermática encontrada na cauda do epidídimo (Figura 17) não encontrou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos FHTAu e grupos controle CNP e LED.



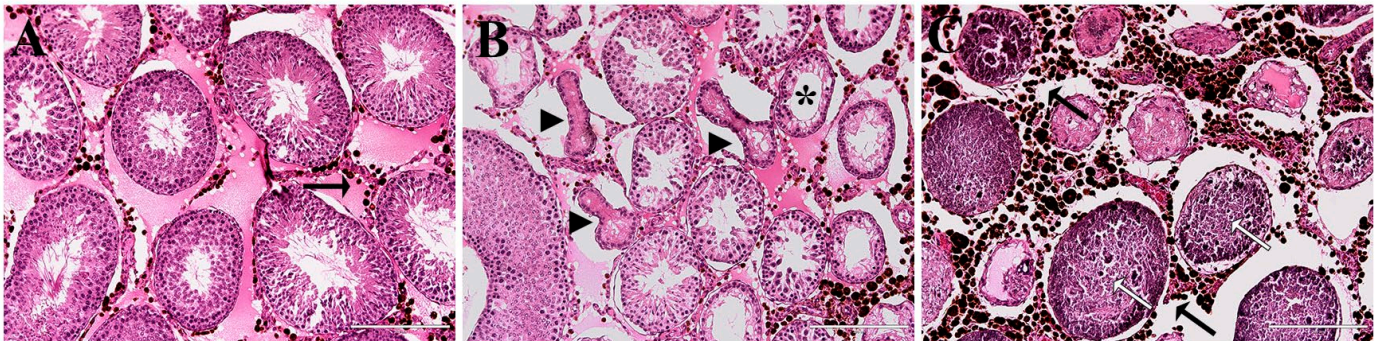
**Figura 17:** Concentração espermática de espermatozoides (milhões de espermatozoides) nas caudas dos epidídimos dos grupos LED, CNPAu e FHTAu no final do experimento.

Nos achados histológicos dos testículos do grupo FHTAu, foi observada uma progressiva degeneração do Dia 7 (D7) ao Dia 56 (D56). Aos 7 dias, alguns túbulos seminíferos apresentavam início de vacuolização, com o lúmen preenchido por células da linhagem germinativa, enquanto outros não continham espermatozoides na luz dos túbulos. Havia presença de nanopartículas visíveis no espaço intersticial, mas em algumas regiões da periferia dos testículos ainda existiam túbulos preservados, com presença de todas as células germinativas e espermatozoide na luz dos túbulos (Figura 18).



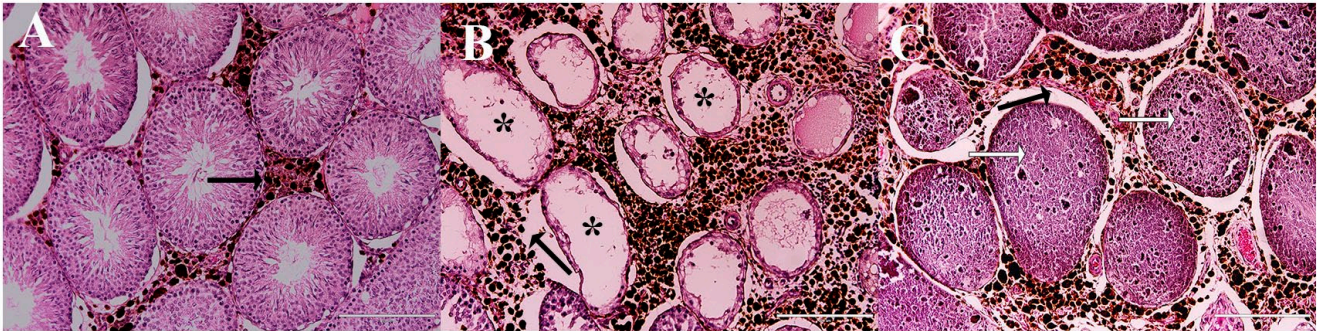
**Figura 18:** Cortes histológicos dos testículos do grupo FHTAu7 dias. A: Alguns túbulos seminíferos intactos com presença de espermatozoides no lúmen, início de vacuolização (seta vermelha); B: Túbulos com presença de debris no lúmen, e túbulos apresentando vacuolização (seta vermelha); C: início de retração dos túbulos seminíferos, túbulos com necrose coagulativa (asterisco). Em todas as imagens é possível notar a presença de aglomerados de nanopartículas no interstício (setas pretas). Barras: 200 $\mu$ m.

Aos 28 dias, a degeneração nos túbulos seminíferos tornou-se mais pronunciada, resultando em túbulos irregulares com predominância apenas de espermatogônias. Alguns túbulos apresentavam o lúmen totalmente preenchido por células germinativas, enquanto outros exibiam necrose coagulativa (Figura 19).



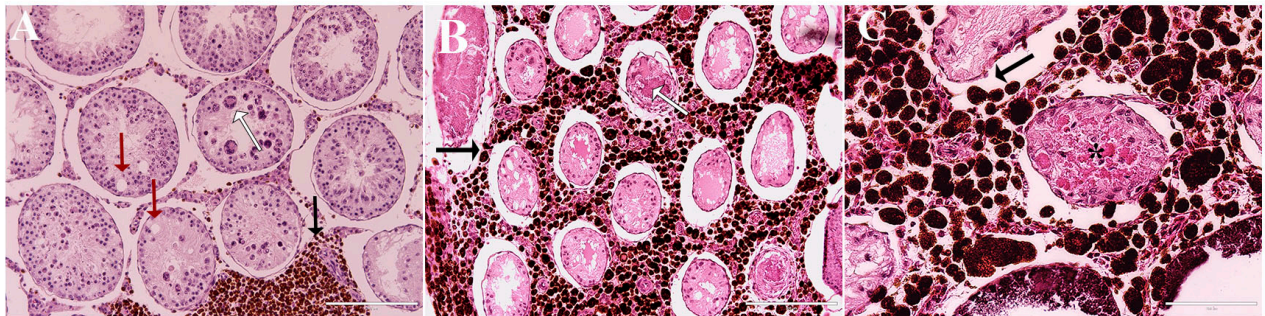
**Figura 19:** Cortes histológicos dos testículos do grupo FHTAu28 dias. A: Túbulos seminíferos intactos com presença de espermatozoides no lúmen, e presença de aglomerados de nanopartículas no interstício (seta preta); B: Túbulos com início de vacuolização, túbulos sem definição e retraídos (cabeça de seta preta), e túbulos com perda de epitélio seminífero (asterisco); C: Túbulos com necrose coagulativa (seta branca), e presença de aglomerados de nanopartículas no interstício (seta preta). Barras: = 200 $\mu$ m.

Aos 56 dias, os danos se mostravam mais extensos, embora ainda fossem observados túbulos seminíferos totalmente intactos. A necrose coagulativa nos túbulos seminíferos era mais intensa no D56 em comparação com os o D28. Além disso, aos 56 dias, foram observadas células inchadas na luz de alguns túbulos, bem como o desaparecimento das células da linhagem germinativa em outros (Figura 20).



**Figura 20:** Cortes histológicas dos testículos do grupo FHTAu56 dias. A: Túbulos seminíferos intactos com presença de espermatozoides no lúmen; B: Túbulos com perda de epitélio seminífero (asterisco); C: Túbulos com necrose coagulativa (seta branca). Em todas as imagens é possível notar a presença de aglomerados de nanopartículas no interstício (setas pretas). Barras: = 200 $\mu$ m.

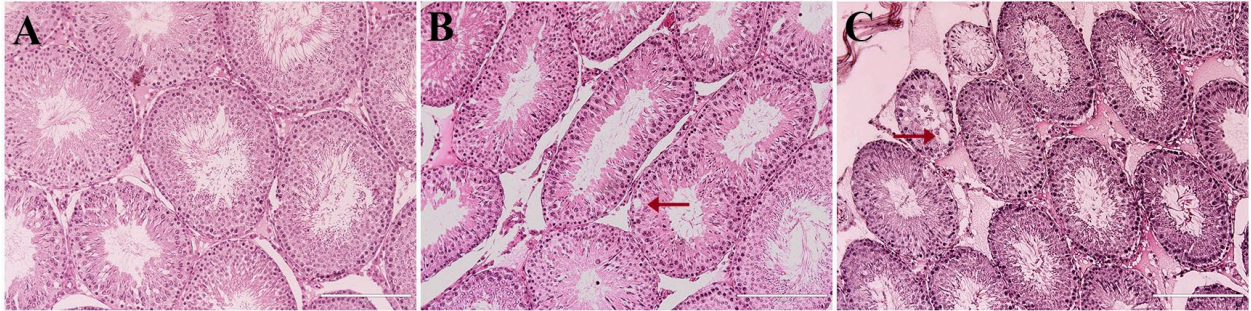
No grupo CNPAu, a histopatologia revelou danos, porém menos intensos do que os observados no grupo FHTAu. Aos 7 dias, muitos túbulos ainda permaneciam intactos, embora apresentassem vacuolização, túbulos preenchidos por células germinativas e células multinucleadas (Figura 21A). Aos 28 dias, houve uma redução na quantidade de túbulos seminíferos intactos em comparação com o D7 (Figura 21B), e o estágio de vacuolização estava mais avançado. Além disso, alguns túbulos mostraram-se preenchidos por necrose coagulativa. Aos 56 dias, os danos foram semelhantes aos encontrados no D28, mas com uma extensão maior, e alguns túbulos apresentaram debris (resíduos celulares) no lúmen (Figura 21C).



**Figura 21:** Cortes histológicas dos testículos do grupo CNPAu. A: CNPAu 7 dias, túbulos seminíferos com início de vacuolização (seta vermelha); presença de células multinucleadas no lúmen (seta branca); B: CNPAu 28 dias, túbulos seminíferos diminuídos alguns apresentando necrose coagulativa (seta branca); C: CNPAu 56 dias, túbulos retraídos com presença debris no lúmen (asterisco). Em todas as imagens é possível notar a presença de aglomerados de nanopartículas no interstício (setas pretas). A e B = Barras: = 200 $\mu$ m; C = 100  $\mu$ m.

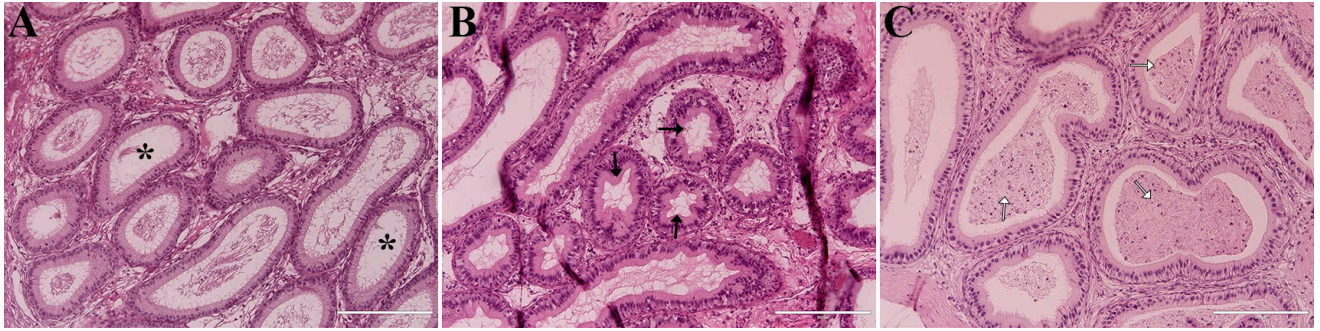
Nas análises histopatológicas do grupo controle LED, a estrutura dos túbulos seminíferos permaneceu preservada no D7, sem evidência de ruptura ou desorganização do epitélio seminífero (Figura 22A). Não foram observados sinais de processo inflamatório ou presença de células do sistema imune. Além disso, identificou-se uma organização adequada de todas as células da linhagem germinativa, incluindo espermatogônias, espermátocitos e

espermátides nos túbulos seminíferos. Também foi notada a presença de espermatozoides na luz dos túbulos de forma organizada. Entretanto, a partir do D28, alguns túbulos apresentaram estágio inicial de vacuolização no epitélio seminífero (Figura 22B), enquanto aos 56 dias foi observado alguns túbulos vacuolizados e epitélio seminífero desorganizado (Figura 22C).



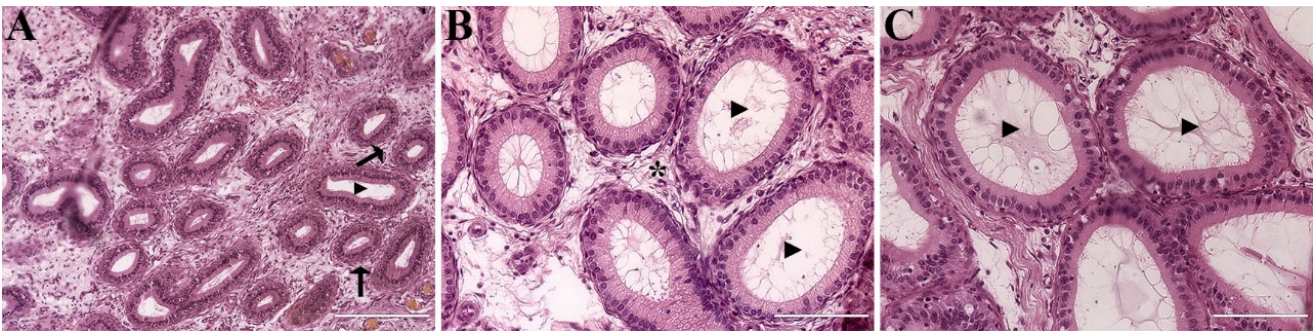
**Figura 22:** Cortes histológicos dos testículos do grupo LED. A: LED 7 dias, B: LED 28 dias e C: LED 56 dias, em todos os tempos de experimento foi possível observar túbulos seminíferos intactos com presença de espermatozoides no lúmen, aos 28 e 56 dias foi observado pequenos sinais de vacuolização (seta vermelha) em alguns túbulos. Barras: = 200 $\mu$ m.

De modo geral, a histologia dos epidídimos do grupo tratado FHTAu revelou ductos epididimários em cortes transversais e longitudinais, revestidos por tecido epitelial pseudoestratificado cilíndrico com estereocílios, e no interstício, foram encontrados vasos sanguíneos, linfócitos e tecido frouxo entre os ductos. Aos 7 dias (Figura 23), a maioria dos lúmens estavam preenchidos por espermatozoides, porém alguns ductos epididimários apresentaram lúmens preenchidos com infiltrado de leucócitos, alguns estavam vazios e outros com alterações cribriformes. Foi também possível observar infiltrados inflamatórios no interstício.



**Figura 23:** Cortes histológicos dos epidídimos do grupo FHTAu 7 dias. A: Alguns túbulos intactos, e outros sem espermatozoides no lúmen (asterisco preto); B: Túbulos com apresentando alterações cribriformes (seta preta), disformes e diminuídos; C: Túbulos com debris celulares no lúmen (seta branca). Barras: = 200 $\mu$ m.

Aos 28 dias, foram identificadas células linfocitárias no interstício, juntamente com alguns ductos epididimários com o lúmen vazio e disformes (Figura 24).



**Figura 24:** Cortes histológicos dos epidídimos do grupo FHTAu 28 dias. A: Presença de túbulos diminuídos (seta preta); B e C: Túbulos sem espermatozoides visíveis no lúmen (cabeça de seta preta). Barras: A = 200 $\mu$ m, B e C = 100  $\mu$ m.

Já aos 56 dias, apesar da presença de alguns túbulos intactos, observou-se a presença de debris celulares no lúmen de alguns ductos epididimários. Adicionalmente, notou-se a ocorrência de vasos sanguíneos no interstício, acompanhados por infiltração linfocitária e movimento de migração dos linfócitos em alguns epidídimos (Figura 25).



**Figura 25:** Cortes histológicos dos epidídimos do grupo FHTAu 56 dias. A: Túbulos íntegro, com poucos ou nenhum espermatozoide no lúmen; B: Túbulos com presença de debris celulares no lúmen (seta preta) e presença de vasos sanguíneos no interstício (asterisco preto); C: Infiltrado linfocitário no interstício (seta branca). Barras: A = 200µm, B e C = 100 µm.

Aos 7 dias, no grupo CNPAu, foram visualizados materiais esfoliados no lúmen do epidídimo, e ductos do epidídimo com lúmen vazio. Aos 28 e 56 dias, foi observada infiltração linfocitária no interstício e movimento de migração dos linfócitos, assim como espermatozoides no lúmen. No D56, também foram encontrados alguns ductos do epidídimo com lúmen vazio (Figura 26).



**Figura 26:** Cortes histológicos dos epidídimos do grupo CNPAu A: CNPAu 7 - Túbulos íntegro, e túbulos sem espermatozoides no lúmen (asterisco preto), e túbulos com presença de debris celulares no lúmen (seta preta) B: CNPAu 28 - Presença de infiltrado linfocitário no interstício (cabeça de seta preta) e presença de espermatozoides no lúmen dos túbulos (seta branca); C: CNPAu 56 - Túbulos sem espermatozoides no lúmen (asterisco preto). Barras: A = 200µm, B e C = 100 µm.

A avaliação histológica dos epidídimos dos animais do grupo LED mostrou estrutura epididimária íntegra e conforme os padrões normais, independentemente do dia de tratamento (7, 28 e 56 dias), com presença de espermatozoides nos ductos epididimários e ausência de sinais de inflamação. (Figura 27).



**Figura 27:** Cortes histológicas dos epidídimos do grupo LEDAu A: LED 7, B: LED 28 e C: LED 56 -Túbulos íntegros com presença de espermatozoides no lúmen Barras: A = 200µm.

Os órgãos (fígado, baço, rim e pulmões) apresentaram aparência macroscópica normal e similares em todos os grupos. Os pesos relativos dos órgãos estão representados na Tabela 3. Não houve diferença significativa entre os grupos.

**Tabela 2:** Média de peso relativo (peso do órgão / peso do animal) dos órgãos Rim, Baço, Fígado e Pulmão, dos animais dos grupos CNPAu e FHTAu no final do experimento.

	CNPAu7	CNPAu28	CNPAu56	FHTAu7	FHTAu28	FHTAu56
<b>Rim</b>	0,38±0,00	0,38±0,00	0,41±0,00	0,38±0,03	0,38±0,02	0,35±0,01
<b>Baço</b>	0,44±0,00	0,29±0,00	0,34±0,00	0,38±0,03	0,38±0,01	0,37±0,06
<b>Fígado</b>	3,34±0,00	2,94±0,00	3,05±0,00	3,44±0,26	3,00±0,08	2,92±0,22
<b>Pulmão</b>	0,58±0,00	0,49±0,00	0,53±0,00	0,57±0,10	0,52±0,02	0,49±0,04

A análise histopatológica dos órgãos (Figura 28) revelou uma condição morfológica sem alterações significativas no fígado, rim e baço, tanto nos grupos tratados FHTAu quanto no grupo controle CNPAu, eutanasiados aos 7, 28 e 56 dias.

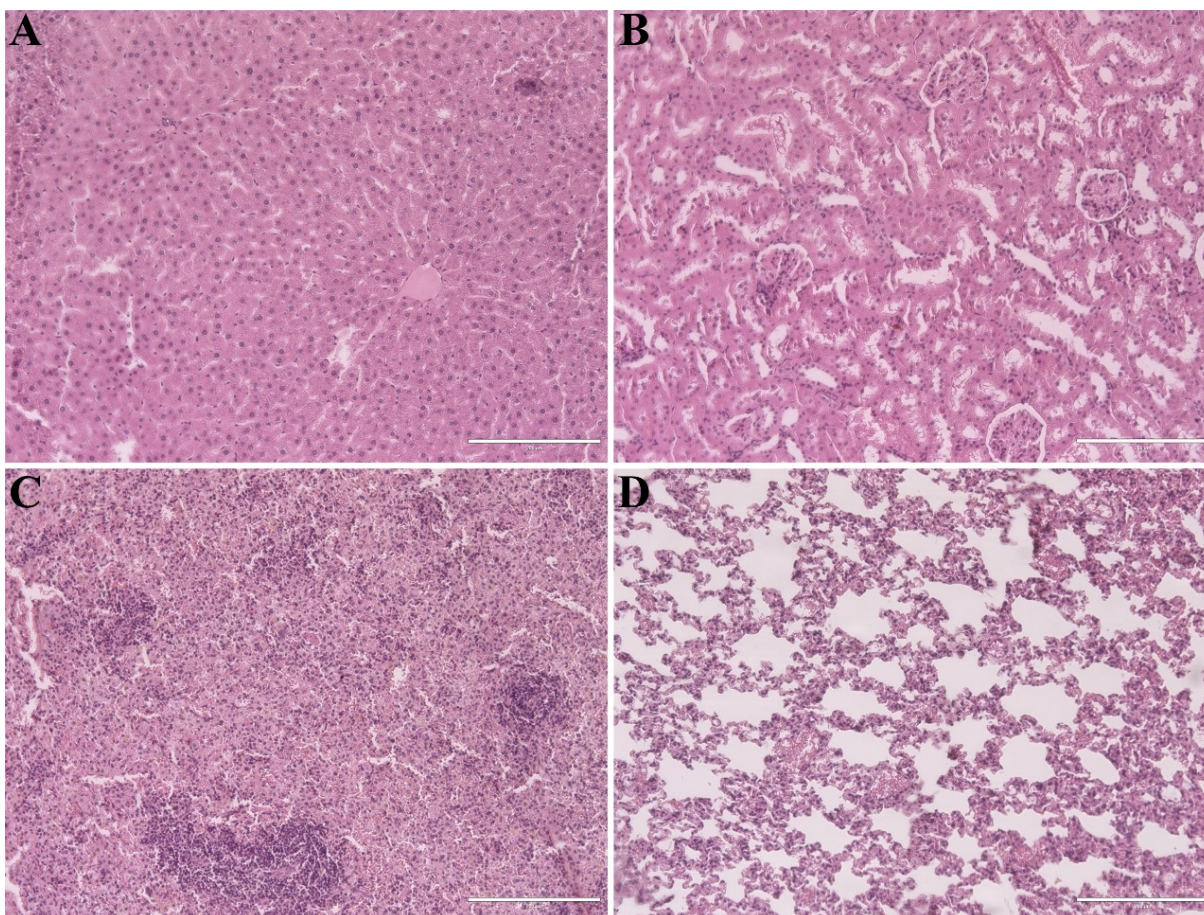
No fígado, o parênquima hepático apresentou estrutura lobular preservada. Tanto a veia central quanto os cordões de hepatócitos exibiram características normais, com ausência de alterações significativas nos tecidos hepáticos ao longo do período de observação, independente do grupo.

O córtex renal apresentou morfologia típica, com a preservação dos corpúsculos renais e dos túbulos contornados. E os túbulos renais não apresentaram lesões, mantendo uma organização celular regular.

Na análise histopatológica do baço, constatou-se uma morfologia tecidual típica. A estrutura da polpa branca e vermelha, trabéculas, cápsula, células reticulares e macrófagos esplênicos apresentaram-se normais, indicando a integridade do órgão ao longo desses períodos.

No entanto, nos pulmões, observou-se um padrão distinto. Independentemente do tratamento ou dia de eutanásia, houve espessamento dos septos alveolares, especialmente nas

regiões próximas aos bronquíolos. É relevante destacar que, apesar desse espessamento, a luz alveolar foi preservada, e não foram observados sinais de congestão pulmonar ou infiltrado inflamatório. Nas bordas dos pulmões, a estrutura permaneceu normal, sem alterações evidentes.

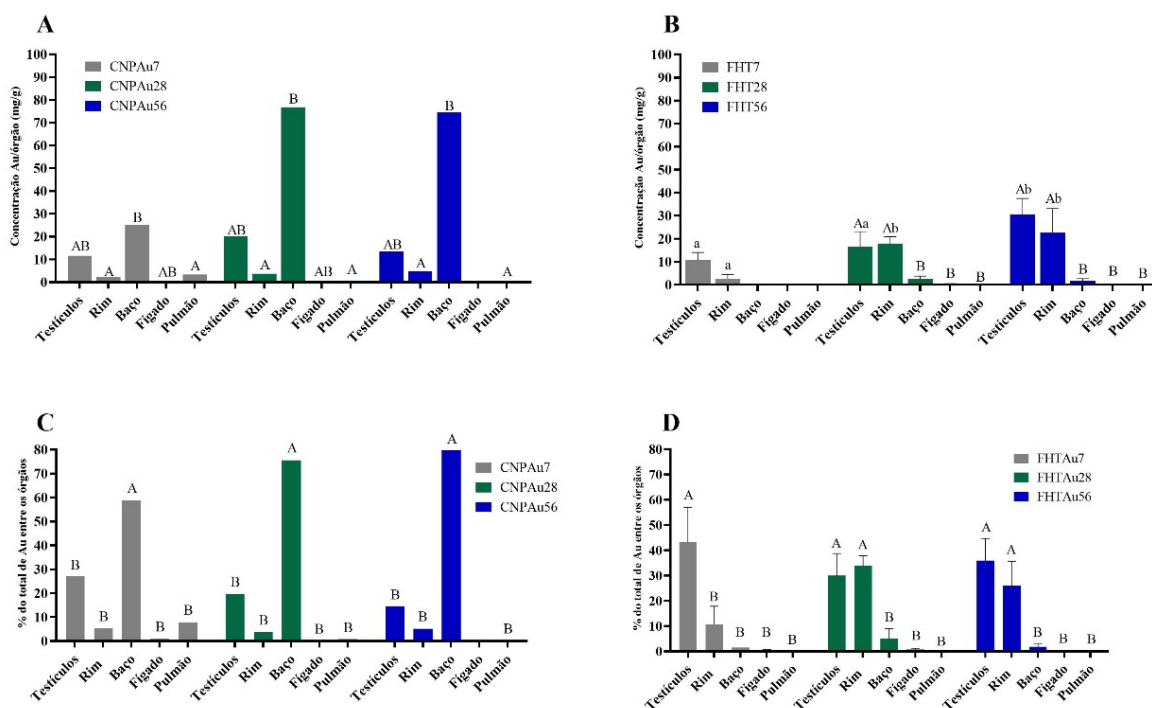


**Figura 28:** Aparência geral dos órgãos dos animais tratados com FHT testicular mediada por nanopartículas de maghemita recobertas com ouro e citrato (NPAu). Todos os órgãos apresentavam morfologia normal. A: Fígado; B: Rim; C: Baço; D: Pulmão. Barras = 200  $\mu$

A análise da biodistribuição do elemento ouro presente nas nanopartículas NPAu no grupo CNPAu revelou um aumento significativo na quantidade de nanopartículas no dia 7, em comparação com a quantidade nos testículos. Além disso, a quantidade de nanopartículas no baço foi consistentemente maior do que em outros órgãos em todos os períodos (Figura 29A). No grupo FHTAu, observou-se um aumento significativo na quantidade de NPAu nos testículos aos 56 dias, em comparação com os dias 28 e 7, assim como nos rins aos dias 28 e 56 em comparação com o dia 7. Aos 28 e 56 dias, a maior quantidade de NP foi encontrada nos testículos e rins, em comparação com outros órgãos (baço, fígado e pulmão) (Figura 29B).

Ao considerar o percentual total de NPAu em todos os órgãos como 100%, foi observado que mais de 50% das nanopartículas de ouro foram encontradas no baço no grupo

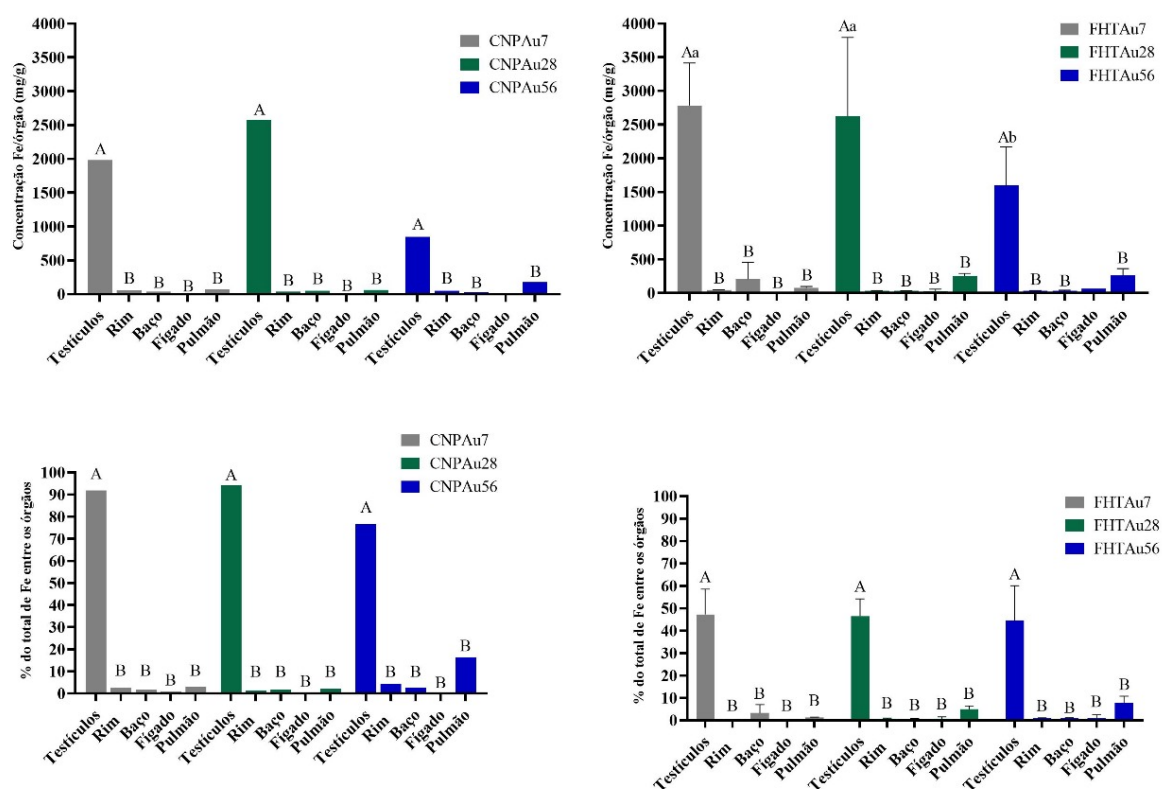
CNPAu (Figura 29C). No grupo FHTAu, a maior porcentagem foi observada nos testículos aos 7 dias, e nos testículos e rins aos 28 e 56 dias (Figura 29D).



**Figura 29:** Distribuição do elemento ouro presente nas nanopartículas de maghemita recobertas com ouro e citrato (NPAu). A - Concentração de ouro (mg/g) nos órgãos: testículo, rim, baço, fígado e pulmão no grupo CNPAu. B - A - Concentração de ouro (mg/g) nos órgãos: testículo, rim, baço, fígado e pulmão no grupo FHTAu; C - Porcentagem do total de ouro encontrado nas amostras distribuído entre os órgãos avaliados no grupo CNPAu. D - Porcentagem do total de ouro encontrado nas amostras distribuído entre os órgãos avaliados no grupo FHTAu. (A, B): letras maiúsculas mostram diferença significativa ( $\leq 0,05$ ) entre os grupos no mesmo momento de avaliação.

(a, b): letras minúsculas mostram diferença significativa ( $\leq 0,05$ ) entre os diferentes tempos no mesmo órgão.

Já com relação à detecção do elemento ferro das nanopartículas NPAu, o grupo CNPAu mostrou significativamente maior quantidade nos testículos em comparação com outros órgãos (Figura 30A), representando um percentual de superior a 75% em todos os períodos (Figura 30C). No grupo FHTAu, também foi observada uma quantidade maior nos testículos em relação aos demais órgãos avaliados, que diminuiu significativamente aos 56 dias (Figura 30B), representando um percentual acima de 40% em todos os períodos (Figura 30D).



**Figura 30:** Distribuição do elemento ferro presente nas nanopartículas de maghemita recobertas com ouro e citrato (NPAu). A: Concentração de ferro (mg/g) nos órgãos: testículo, rim, baço, fígado e pulmão no grupo CNPAu. B: Concentração de ferro (mg/g) nos órgãos: testículo, rim, baço, fígado e pulmão no grupo FHTAu; C: Porcentagem do total de ferro encontrado nas amostras distribuído entre os órgãos avaliados no grupo CNPAu. D: Porcentagem do total de ferro encontrado nas amostras distribuído entre os órgãos avaliados no grupo FHTAu. (A, B): letras maiúsculas mostram diferença significativa ( $\leq 0,05$ ) entre os grupos no mesmo momento de avaliação. (a, b): letras minúsculas mostram diferença significativa ( $\leq 0,05$ ) entre os diferentes tempos no mesmo órgão.

#### 5.4. Discussão

O estudo apresenta uma abordagem inovadora como método de castração não cirúrgica, combinando a injeção de nanopartículas de ouro e irradiação por luz de LED de 808 nm. Os resultados evidenciam que o aquecimento transitório dos testículos a temperatura próxima de 45 °C é capaz de induzir à degeneração das células germinativas, prejudicando a produção de espermatozoides, sem comprometer a saúde dos animais a curto prazo (56 dias). Alinhando-se a estudos prévios que vinculam o aumento de temperatura testicular a efeitos na espermatogênese, corroborando com a grande importância da temperatura na função reprodutiva masculina (Fahin *et al.*, 1975; Setchell, 1998; Setchell, 2006). Essas descobertas representam uma possível evolução na contracepção para animais abandonados, oferecendo uma alternativa prática, segura e eficaz, sem efeitos indesejáveis.

Logo após a administração intratesticular da nanopartícula, houve uma mudança na coloração dos testículos, evidenciada por uma tonalidade mais escura, atribuída à cor do

fluido. Apesar disso, não foram identificadas sensibilidade à palpação ou ferida ao longo do período de avaliação. Os resultados do estudo de Jivago *et al.* (2021) corroboram essa mudança na coloração testicular após a administração da solução, embora ressaltem a presença de ferida local e inchaço como efeitos colaterais. Em contraste, estudos sobre castração química, destacam reações adversas, como escroto inflamado, úlcera escrotal e fistula (Levy *et al.* 2008; Oliveira *et al.* 2013; Forzan *et al.* 2014; Leoci *et al.*, 2014; Rafatmah, *et al.*, 2019).

Os resultados decorrentes da aplicação da fototerapia mediada por nanopartículas evidenciaram uma atrofia progressiva no peso e volume testicular ao longo do tempo. Li *et al.* (2013) destacaram uma diminuição significativa no peso e volume testicular em resposta ao tratamento com nanopartículas de ouro (GNR) e terapia com luz infravermelha (NIR) em temperaturas próximas de 45 °C, mas não nas temperaturas de 40 °C e 37 °C. De maneira semelhante, Jivago *et al.* (2021) descreveram uma diminuição significativa nas medidas de comprimento, espessura e peso dos testículos após a magnetoterapia testicular. Em contraste, o estudo de Brito *et al.* (2020), que se limitou à injeção intratesticular de nanopartículas de prata, não evidenciou diferenças no peso relativo dos testículos. Essa tendência foi corroborada por Coimbra *et al.* (2023), que, ao realizar duas injeções de nanopartículas de ouro com um intervalo de 7 dias entre elas, não observaram alterações no peso testicular.

O estresse térmico ocorre quando as temperaturas ultrapassam a faixa fisiológica, afetando os testículos. Esses órgãos, que normalmente ficam mais frios que a temperatura central do corpo, são sensíveis ao aumento de temperatura. Dessa forma, a elevação da temperatura testicular prejudica a motilidade, morfologia e fertilidade dos espermatozoides temporariamente (Shahat *et al.*, 2020). Os parâmetros espermáticos analisados em nosso estudo, revelaram variações notáveis entre os grupos de tratamento e os controles. No grupo FHTAu, observou-se uma significativa diminuição da porcentagem de espermatozoides móveis e com morfologia normal ao longo do tempo, em contraste com o grupo LED que não apresentou alterações. Estes dados sugerem que o efeito deletério é causado pelo aquecimento conseguido pela interação da luz com as nanopartículas, e que a exposição à luz isoladamente não influenciou a produção ou a qualidade dos espermatozoides. Estudos prévios, como os de Patil *et al.* (2014), Kastelic *et al.* (2017) e Zhao *et al.* (2010), consistentemente ressaltam os efeitos adversos do calor na qualidade espermática. Patil *et al.* (2014) destacaram um aumento significativo na porcentagem de espermatozoides com alterações morfológicas em grupos expostos a temperaturas de 41 °C e 43 °C. Zhao *et al.* (2010) relataram diminuição na

motilidade e aumento na porcentagem de espermatozoides anormais em machos expostos a temperaturas ambiente de 37 °C por um período prolongado. O que reforçam a influência do calor na qualidade dos espermatozoides. Outros estudos que verificaram o efeito de hipertermia mediada por nanopartículas (magnetohipertermia ou fotohipertermia) não realizaram avaliação dos parâmetros espermáticos no lavado epididimário (Li *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2015a; Liu *et al.*, 2015b; Jivago *et al.*, 2021).

Por outro lado, o grupo CNPAu apresentou uma redução nos parâmetros espermáticos apenas aos 56 dias, sugerindo uma resposta tardia a possíveis efeitos tóxicos da injeção. Brito *et al.* (2020) observaram uma diminuição temporária na motilidade e na porcentagem de espermatozoides normais 7 dias após a injeção intratesticular de nanopartículas de prata, seguida por uma recuperação ao longo do tempo. Em contraste, no estudo de Coimbra *et al.* (2023), embora não tenham sido encontradas diferenças significativas na motilidade e morfologia espermática entre os grupos, observou-se uma redução na concentração de espermatozoides nos animais tratados em comparação com o grupo de controle. Portanto, existem indícios de que a injeção de nanopartículas pode desencadear efeitos adversos nos parâmetros espermáticos; contudo, é relevante destacar que esses efeitos parecem ser moderados e/ou reversíveis ao longo do tempo. No entanto, para animais, há preferência pela obtenção de uma infertilidade irreversível.

Na análise histológica, investigamos a eficácia da fotohipertermia testicular ao observar sinais de degeneração das células germinativas e atrofia dos túbulos seminíferos. No grupo tratado, identificamos uma degeneração progressiva dos testículos do dia 7 ao dia 56, evidenciando sinais iniciais de vacuolização aos 7 dias e danos mais notáveis aos 56 dias, incluindo necrose coagulativa e células inchadas multinucleadas. Essas descobertas estão alinhadas com resultados de outros estudos que também destacaram efeitos adversos significativos relacionados à hipertermia mediada por nanopartículas, como um epitélio seminífero não caracterizado, estrutura atípica nos túbulos seminíferos, necrose coagulativa, desorganização ou perda total da definição do epitélio seminífero (Li *et al.*, 2013; Jivago *et al.*, 2021). Essas constatações ressaltam a sensibilidade dessas células ao estresse térmico testicular, destacando a complexidade das respostas germinativas diante da hipertermia. Da mesma maneira, o aparecimento de células gigantes e multinucleadas, conforme descrito por Holstein & Eckmann (1986), sugere a degeneração das espermátides. Conforme observado por Nolte *et al.* (1995), a presença de vacúolos no epitélio tubular indica danos nas células de Sertoli, sendo esta a resposta predominante dessas células a vários agentes químicos. A ocorrência de

vacuolização também foi identificada em estudos que empregaram diversas fontes de calor, como temperatura ambiente elevada, banho-maria, micro-ondas, infravermelho e ultrassom (Fahim *et al.*, 1975; Lue *et al.*, 1999, 2000; Patil *et al.*, 2014). O grupo controle LED preservou a estrutura seminífera até 56 dias, embora tenha apresentado sinais de vacuolização no epitélio seminífero, sugerindo que o aquecimento leve verificado neste grupo foi apenas superficial.

No grupo CNPAu, foram identificados danos, embora menos intensos do que no grupo FHTAu, evidenciando vacuolização e necrose coagulativa. Esses achados são semelhantes aos observados por Coimbra *et al.* (2023), que também relataram a presença de túbulos seminíferos vacuolizados após administração intratesticular de nanopartículas de ouro. Em contraste, Brito *et al.* (2020), utilizando nanopartículas de prata, observaram a presença de detritos no lúmen e uma redução na quantidade de espermatozoides, no entanto, a arquitetura geral do túbulo seminífero permaneceu normal. Essas discrepâncias indicam variações nos efeitos tóxicos das diferentes nanopartículas.

A avaliação histológica dos epidídimos evidenciou mudanças progressivas, incluindo infiltrado de leucócitos, granulomas, alterações cribriformes e debris celulares na luz dos túbulos. As alterações cribriformes, caracterizadas pelo estiramento do epitélio formando dobras e estruturas pseudoglandulares, estão frequentemente associadas a toxicidade testicular em ratos. Essas mudanças cribriformes podem ocorrer como uma resposta secundária à ausência de células espermáticas e de fluido testicular e atrofia epididimária (Kempinas & Klinefelter, 2015). No grupo CNPAu, observou-se materiais esfoliados e ductos com lúmen vazio aos 7 dias, com recuperação aos 28 dias. Contudo, aos 56 dias, alguns ductos apresentaram novamente lúmen vazio. Estudos prévios, como os de Brito *et al.* (2020) e Coimbra *et al.* (2023), também destacam alterações nos epidídimos após aplicação intratesticular com nanopartículas, resultando em desaparecimento temporário e subsequente recuperação dos espermatozoides.

Os resultados macroscópicos e histopatológicos indicaram a ausência de alterações significativas nos órgãos (rim, fígado, baço e pulmão), evidenciando a preservação da integridade e funcionalidade durante o período de observação. Apesar do espessamento nos septos alveolares pulmonares, não foram identificados sinais de congestão pulmonar, inflamação, ou dificuldades respiratórias nos animais. Destaca-se que o uso de maravalha em gaiolas de roedores pode impactar o sistema respiratório, resultando em alterações histológicas nos pulmões, como inflamação e pneumonia (Ogur *et al.*, 2016). Sugere-se que os resultados

do nosso estudo podem estar relacionados à forragem das caixas dos animais, e não às nanopartículas, dado que os animais não apresentaram nenhum outro sintoma.

Após o tratamento com fotohipertermia testicular (nos animais FHTAu), a análise por ICP-MS revelou que o ouro estava predominantemente distribuído no testículo e no rim. No grupo CNPAu (que recebeu a injeção de nanopartículas, mas não passou por hipertermia), a preferência foi pelo baço, seguido dos testículos. Outros estudos apontam o fígado como o principal órgão de acúmulo de ouro (Poon *et al.*, 2015). Estudos anteriores com nanorods de ouro modificados com polietilenoglicol mostraram eliminação através do sistema retículo-endotelial após injeção sistêmica (Maltzahn *et al.*, 2009; Goodrich *et al.*, 2010). Já o estudo de Kozics *et al.* (2021) indicou que a maior quantidade de ouro inicialmente acumulou-se no sangue após 1 hora, seguido por pulmão e baço. Após 4 horas, a maior quantidade estava no baço, mantendo-se até 28 dias, e o fígado tornou-se o segundo órgão com maior quantidade de ouro. A administração da nanopartícula sem calor parece promover um acúmulo no baço, enquanto com a fotohipertermia há uma maior concentração nos testículos e rins. Uma hipótese possível é que as nanopartículas podem se aglomerar devido ao calor, assim, mantendo-se nos testículos, sendo gradualmente eliminadas pelos rins. Observa-se em outros estudos que a síntese e o diâmetro das nanopartículas de ouro podem alterar a via de eliminação (Longmire *et al.*, 2008), como evidenciado em pesquisas com NPs de ouro ultrapequenas (1,9 nm) e coloidais de 10 a 250 nm (Hainfeld *et al.*, 2006; De Jong *et al.*, 2008), sendo estas eliminadas preferencialmente pelos rins. No entanto, o padrão de biodistribuição identificado no estudo, com o acúmulo em órgãos específicos, não indicou toxicidade, sugerindo a segurança do método empregado. Essa diversidade nos resultados destaca a importância de considerar as variáveis experimentais ao interpretar dados de biodistribuição de nanopartículas.

## 5.5. Conclusão

A fotohipertermia com LED de 808 nm associada a injeção intratesticular de nanopartículas de ouro para induzir infertilidade em ratos Wistar demonstrou eficácia a curto prazo (56 dias), com degeneração das células germinativas, impactando a espermatogênese e proporcionando infertilidade, sem efeitos adversos imediatos à saúde dos animais. Os resultados indicam que esse método pode representar um método promissor na contracepção para animais abandonados, oferecendo uma alternativa prática, segura e eficaz, com mínimos efeitos colaterais.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Brito, J. L. M., Lima, V. N. D., Ansa, D. O., Moya, S. E., Morais, P. C., Azevedo, R. B. D., & Lucci, C. M. (2020). Acute reproductive toxicology after intratesticular injection of silver nanoparticles (AgNPs) in Wistar rats. *Nanotoxicology*, *14*(7), 893-907.
- Coelho, B. C. P., Siqueira, E. R., Ombredane, A. S., Joanitti, G. A., Chaves, S. B., Da Silva, S. W., ... & Sousa, M. H. (2017). Maghemite–gold core–shell nanostructures ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3@ \text{Au}$ ) surface-functionalized with aluminium phthalocyanine for multi-task imaging and therapy. *RSC advances*, *7*(19), 11223-11232.
- Coimbra, J. L., de PF Dantas, G., de Andrade, L. M., Brener, M. R., Viana, P. I., Lopes, R. A., ... & Costa, G. M. (2023). Gold nanoparticle intratesticular injections as a potential animal sterilization tool: Long-term reproductive and toxicological implications. *Toxicology*, *492*, 153543.
- De Grava Kempinas, W., & Klinefelter, G. R. (2014). Interpreting histopathology in the epididymis. *Spermatogenesis*, *4*(2), e979114.
- De Jong, W. H., Hagens, W. I., Krystek, P., Burger, M. C., Sips, A. J., & Geertsma, R. E. (2008). Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials*, *29*(12), 1912-1919.
- Fahim, M. S., Fahim, Z., Der, R., Hall, D. G., & Harman, J. (1975). Heat in male contraception (hot water 60° C, infrared, microwave, and ultrasound). *Contraception*, *11*(5), 549-562.
- Forzán, M. J., Garde, E., Perez, G. E., & Vanderstichel, R. V. (2014). Necrosuppurative orchitis and scrotal necrotizing dermatitis following intratesticular administration of zinc gluconate neutralized with arginine (EsterilSol) in 2 mixed-breed dogs. *Veterinary pathology*, *51*(4), 820-823.
- Goodrich, G. P., Bao, L., Gill-Sharp, K., Sang, K. L., Wang, J., Payne, J. D. (2010). Photothermal therapy in a murine colon cancer model using near-infrared absorbing gold nanorods. *Journal of Biomedical Optics*, *15*(1), 18001.
- Hainfeld, J. F., Slatkin, D. N., Focella, T. M., & Smilowitz, H. M. (2006). Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent. *The British journal of radiology*, *79*(939), 248-253.
- Holstein, A. F., & Eckmann, C. (1986). Multinucleated spermatocytes and spermatids in human seminiferous tubules. *Andrologia*, *18*(1), 5-16.
- ISM02.3: Exhibit D - Part D: Analytical Methods for Total Cyanide Analysis. Washington, DC.

- Jivago, J. L. P., Brito, J. L. M., Capistrano, G., Vinícius-Araújo, M., Lima Verde, E., Bakuzis, A. F., ... & Lucci, C. M. (2021). New prospects in neutering male animals using magnetic nanoparticle hyperthermia. *Pharmaceutics*, *13*(9), 1465.
- Kastelic, J. P., Rizzoto, G., & Thundathil, J. (2018). Testicular vascular cone development and its association with scrotal thermoregulation, semen quality and sperm production in bulls. *Animal*, *12*(s1), s133-s141.
- Kozics, K., Sramkova, M., Kopecka, K., Begerova, P., Manova, A., Krivosikova, Z., ... & Gabelova, A. (2021). Pharmacokinetics, biodistribution, and biosafety of PEGylated gold nanoparticles in vivo. *Nanomaterials*, *11*(7), 1702.
- Leoci, R., Aiudi, G., Silvestre, F., Lissner, E. A., Marino, F., & Lacalandra, G. M. (2014). A dose-finding, long-term study on the use of calcium chloride in saline solution as a method of nonsurgical sterilization in dogs: evaluation of the most effective concentration with the lowest risk. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *56*, 1-8.
- Levy, J. K., Crawford, P. C., Appel, L. D., & Clifford, E. L. (2008). Comparison of intratesticular injection of zinc gluconate versus surgical castration to sterilize male dogs. *American journal of veterinary research*, *69*(1), 140-143.
- Li, W. Q., Sun, C. Y., Wang, F., Wang, Y. C., Zhai, Y. W., Liang, M., ... & Sun, F. (2013). Achieving a new controllable male contraception by the photothermal effect of gold nanorods. *Nano letters*, *13*(6), 2477-2484.
- Liu, Z., Liu, X., Du, Y., Ren, J., & Qu, X. (2015b). Using plasmonic copper sulfide nanocrystals as smart light-driven sterilants. *ACS nano*, *9*(10), 10335-10346.
- Liu, Z., Liu, X., Ran, X., Ju, E., Ren, J., & Qu, X. (2015a). Single-layer tungsten oxide as intelligent photo-responsive nanoagents for permanent male sterilization. *Biomaterials*, *69*, 56-64.
- Longmire, M., Choyke, P. L., & Kobayashi, H. (2008). Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats.
- Louvandini, H., Pimentel, C. M. M., Martins, R. D., Lucci, C. M., & Corrêa, P. S. (2008). Características biométricas testiculares em carneiros Santa Inês submetidos a diferentes regimes de suplementação protéica e tratamentos anti-helmínticos.
- Lue, Y. H., Sinha Hikim, A. P., Swerdloff, R. S., Im, P., Taing, K. S., Bui, T., ... & Wang, C. (1999). Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: role of intratesticular testosterone on stage specificity. *Endocrinology*, *140*(4), 1709-1717.

- Nolte, T., Harleman, J. H., & Jahn, W. (1995). Histopathology of chemically induced testicular atrophy in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 47(4), 267-286.
- Ogur, R., Ogur, T., Uysal, B., & Oztas, E. (2017). Nesting materials may cause pneumonia-like findings in Sprague Dawley rats. *J Environ Occup Sci*, 6(3).
- Oliveira, E. C. S., Fagundes, A. K. F., Melo, C. C. S., Nery, L. T. B., Rêvored, R. G., Andrade, T. F. G., ... & Silva Jr, V. A. (2013). Intratesticular injection of a zinc-based solution for contraception of domestic cats: a randomized clinical trial of efficacy and safety. *The Veterinary Journal*, 197(2), 307-310.
- Patil, S. S., Patil, A. B., Patil, M. M., Nikam, P. B., Mahadik, Y. M., Londhe, S. R., & Kamble, N. A. (2014). Testicular hyperthermia in *Rattus norvegicus*: focus on gamatocytic alterations. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 3(6), 93-103.
- Poon, W., Heinmiller, A., Zhang, X., & Nadeau, J. L. (2015). Determination of biodistribution of ultrasmall, near-infrared emitting gold nanoparticles by photoacoustic and fluorescence imaging. *Journal of Biomedical Optics*, 20(6), 066007-066007.
- Rafatmah, D., Mogheiseh, A., & Eshghi, D. (2019). Chemical sterilization with intratesticular administration of zinc gluconate in adult dogs: A preliminary report. *Basic and clinical andrology*, 29, 1-9.
- Setchell, B. P. (1998). The parkes lecture heat and the testis. *Reproduction*, 114(2), 179-194.
- SETCHELL, B. P. (2006). The effects of heat on the testis of mammals. *International Symposium on Animal Biology of Reproduction*, 3(2): 81-91.
- Shahat, A. M., Rizzoto, G., & Kastelic, J. P. (2020). Amelioration of heat stress-induced damage to testes and sperm quality. *Theriogenology*, 158, 84-96.
- Siqueira, E. R. L. (2019). Nanoestruturas magnéticas revestidas com ouro como agente indutor de magneto-hipertermia para tratamento de câncer de mama.
- Sotocina, S. G., Sorge, R. E., Zaloum, A., Tuttle, A. H., Martin, L. J., Wieskopf, J. S., ... & Mogil, J. S. (2011). The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Molecular pain*, 7, 1744-8069.
- Von Maltzahn, G., Park, J. H., Agrawal, A., Bandaru, N. K., Das, S. K., Sailor, M. J., & Bhatia, S. N. (2009). Computationally guided photothermal tumor therapy using long-circulating gold nanorod antennas. *Cancer research*, 69(9), 3892-3900.
- Zhao, J., Zhang, Y., Hao, L., Wang, J., Zhang, J., Liu, S., & Ren, B. (2010). Effects of a mild heat treatment on mouse testicular gene expression and sperm quality. *Animal cells and systems*, 14(4), 267-274.

## **7. CAPÍTULO 3 – Fotohipertermia testicular mediada por nanopartículas de Ferrita de Manganês funcionalizadas com citrato**

### **7.1. Introdução**

O crescente desafio relacionado ao controle populacional de animais, em especial o aumento de animais de rua, tem impulsionado a busca por métodos eficazes e éticos de esterilização (Cathey & Menon, 2010; Jana & Samanta, 2007). Sabe-se que a melhor forma de controle populacional é a castração (Amaku *et al.*, 2009; Bastos *et al.*, 2013). A técnica de captura, esterilização e soltura já foi comprovada como eficiente (Boone & Slater, 2014). Países como Estados Unidos e Canadá aplicam essa técnica, e a Holanda conseguiu erradicar o número de animais de rua apenas utilizando-a (Sternheim, 2012; Tan, 2017).

Diante desse cenário, a nanotecnologia surge como uma alternativa promissora, ganhando destaque nas pesquisas recentes. As nanopartículas de ouro demonstraram êxito, fornecendo resultados promissores. No entanto, visando aprimorar ainda mais essa abordagem, exploramos nesse capítulo a utilização das nanopartículas de ferrita de manganês funcionalizadas com citrato.

Essas nanopartículas, previamente utilizadas em estudos de magnetohipertermia por nosso grupo de pesquisa, demonstraram sucesso (Jivago *et al.*, 2021), mas enfrentaram desafios relacionados à manipulação e logística do equipamento gerador do campo magnético, dificultando sua aplicação prática para a uma castração móvel, seguindo o método de captura, esterilização e soltura. Buscando superar essas limitações, a presente pesquisa propõe o uso da combinação de nanopartículas de ferrita de manganês funcionalizadas com citrato com a luz de LED.

O objetivo deste capítulo foi avaliar o efeito de uma nanopartícula de ferrita de manganês recoberta com citrato na fotohipertermia testicular, utilizando como fonte de luz um LED, nos parâmetros reprodutivos (volume e peso testicular, parâmetros espermáticos e histopatologia de testículos e epidídimos) dos animais pelo período de duração da espermatogênese.

### **7.2. Material e Métodos**

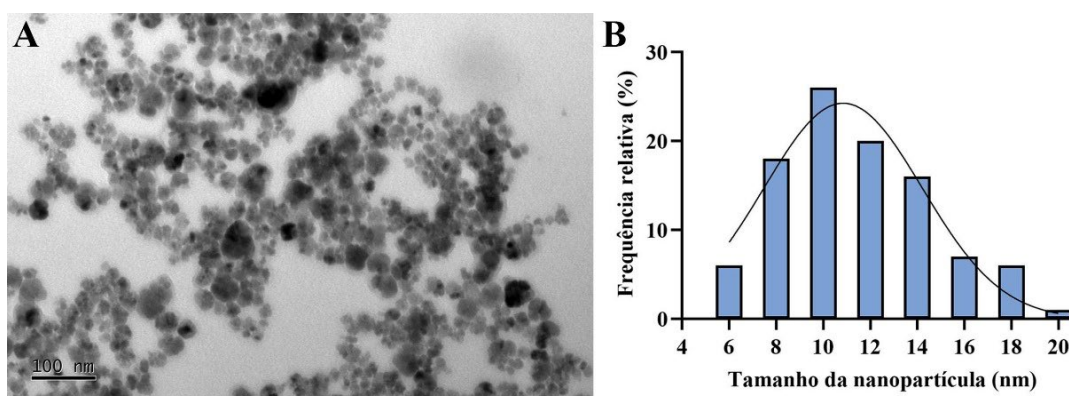
#### *7.2.1. Nanopartícula de Ferrita de Manganês com citrato*

Foi utilizada uma nanopartícula magnética de ferrita de manganês funcionalizada com citrato (NPCit), a qual foi sintetizada sob a forma de um fluido magnético pelo método de coprecipitação, seguindo o protocolo previamente descrito por Branquinho *et al.* (2013) e Sousa-Junior *et al.* (2020), e cedida pelo Prof. Dr. Andris Figueiroa Bakuzis.

Para isso, uma solução de metilamina foi inicialmente diluída em água ultrapura e aquecida até atingir o ponto de ebulição. Em seguida, soluções contendo cloreto de manganês ( $\text{MnCl}_2$ ) e cloreto de ferro-III ( $\text{FeCl}_3$ ) foram adicionadas à mistura. Após um período de 30 minutos, uma precipitação de coloração negra contendo as nanopartículas magnéticas se formou. Essa precipitação foi então separada magneticamente, passou por uma fase de três lavagens e, posteriormente, foi ressuspensa em água ultrapura.

O processo de revestimento com citrato foi conduzido pela adição de 1 mol de citrato de sódio ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ , Sigma-Aldrich) para cada 10 mols de íons de ferro-III. Após aquecimento e agitação controlada, a amostra foi gradualmente resfriada. As nanopartículas revestidas foram, mais uma vez, separadas magneticamente, submetidas a uma etapa de lavagem com acetona e finalmente ressuspensas em água ultrapura.

As nanopartículas apresentaram uma concentração de aproximadamente 43 mg/ml e exibem um tamanho uniforme caracterizado por meio da técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), com dimensão média ( $\pm\text{DP}$ ) de  $11,5\pm 3,2$  nanômetros (Figura 31).



**Figura 31:** A: Micrografia eletrônica das nanopartículas de ferrita de manganês funcionalizadas com citrato, B: gráfico da distribuição de tamanho das partículas.

### 7.2.2. *Fonte de luz e controle da potência luminosa*

Foi utilizada a mesma fonte de luz e sistema de controle de potência luminosa descritos no Capítulo 2 (tópico 5.2.2).

### 7.2.3. *Animais e Desenho experimental*

Nesta fase foram utilizados 6 ratos (N=12 testículos), mantidos conforme descrito no tópico 5.2.3. Como a fonte de luz e o sistema de controle de potência luminosa foram os mesmos utilizados no Capítulo 2, não foi feito um grupo de testículos para receber só a incidência da luz (sem injeção de nanopartículas).

Os animais passaram pelos mesmos procedimentos de anestesia, injeção do fluido, posicionamento para irradiação da luz, fotohipertermia testicular e procedimentos pós-tratamento descritos no Capítulo 2, só que utilizando a nanopartícula de ferrita de manganês funcionalizada com citrato (NPCit) em ambos os testículos. Os animais foram divididos de acordo com o dia da eutanásia após o tratamento (7, 28 e 56 dias), formando os grupos:

- FHTCit7 (N=4 testículos)
- FHTCit28 (N=4 testículos)
- FHTCit56 (N=4 testículos)

Após a eutanásia foram avaliados os seguintes parâmetros: 1) Manifestação de dor e comportamento dos animais, 2) Ganho de peso dos animais, 3) Peso e medida dos testículos, 4) Análise espermática do lavado epididimário, 5) Análise histológica dos testículos e epidídimos, e 6) Peso dos órgãos vitais (fígado, baço, rim e pulmão). A metodologia está detalhadamente descrita no Capítulo 2 (tópico 5.2.4).

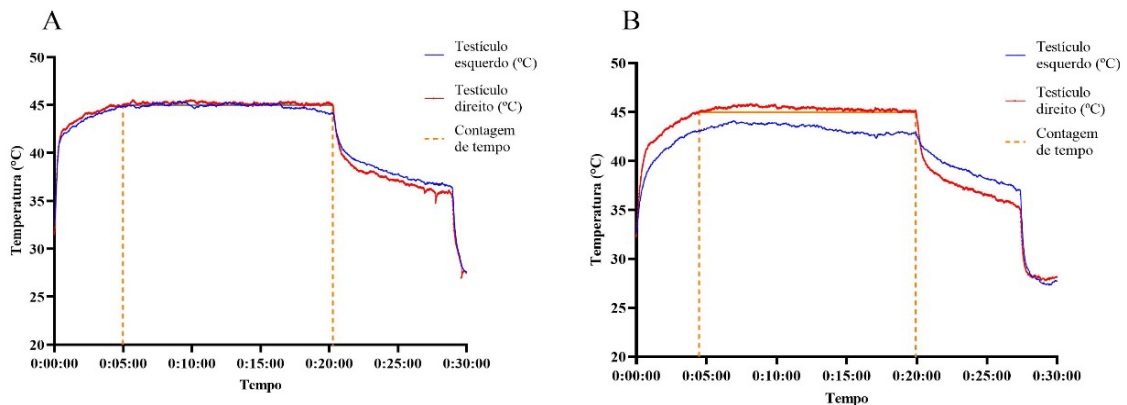
### 7.2.4. *Análise Estatística*

Todos os dados obtidos foram testados para normalidade com o teste Shapiro-Wilk. Os dados avaliados foram comparados entre os grupos experimentais pela análise de variância (ANOVA) e teste de médias (Tukey) utilizando o programa estatístico GraphPad prism 8.0.2 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA), com nível de significância de 5% ( $P < 0,05$ ).

## 7.3. **Resultados**

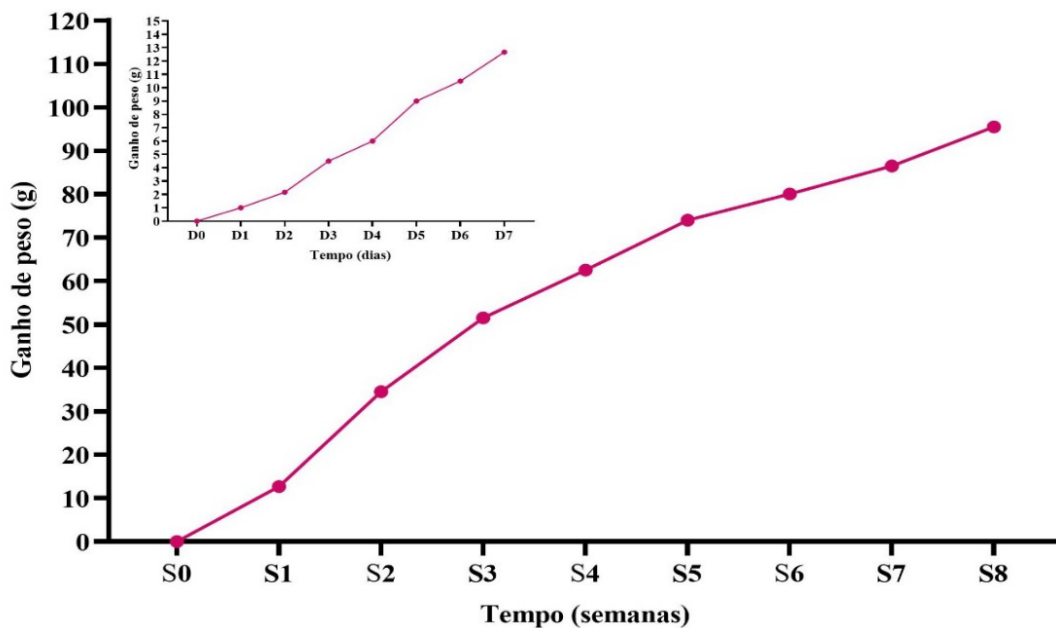
Os animais que passaram por FHT com NPCit apresentaram uma pequena diferença de temperatura entre testículo direito e esquerdo. A temperatura média registrada ao longo do tratamento foi de 44,13 °C (máxima 44,97 °C e mínima 43,87 °C). Levando um tempo médio

de 4 minutos para atingir o platô. Os gráficos de aquecimento (Figura 32) mostram a variação de calor encontrada nos grupos durante todo o procedimento de fotohipertermia.



**Figura 32:** Gráficos de temperatura ( $^{\circ}$  C) dos testículos de dois animais submetidos à fotohipertermia mediada por nanopartículas de ferrita de manganês funcionalizadas com citrato. (A) e (B) receberam a injeção do fluido NPCit nos dois testículos.

Após o tratamento, nenhum animal manifestou sinais de dor ou alterações comportamentais ao longo dos dias. E todos os animais demonstraram um ganho de peso consistente de acordo com o esperado, como evidenciado na Figura 33.

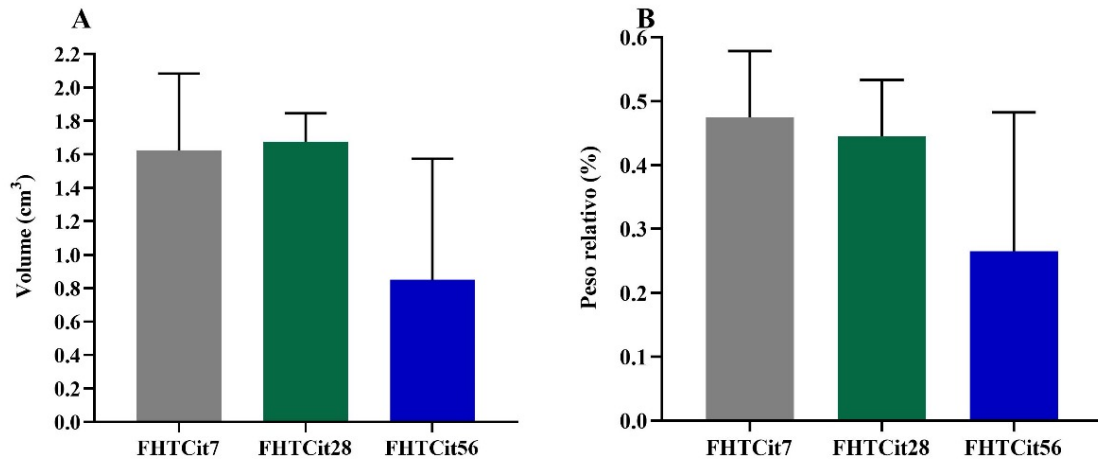


**Figura 33:** Ganho de peso corporal médio (g) de todos os animais tratados com FHT testicular mediada por NPCit. Insert mostra a variação de peso nos 7 primeiros dias. Gráfico mostra a variação de peso corporal ao longo das semanas.

Durante a eutanásia, foi observado que alguns testículos estavam aderidos à pele da bolsa escrotal. Além disso, aos 7 dias, houve evidência de inflamação em ambos os testículos de apenas um animal do grupo tratado com o fluido de NPCit. Aos 56 dias, notou-se que um animal do grupo tratado apresentava fibrose e um tamanho visivelmente menor no testículo direito,

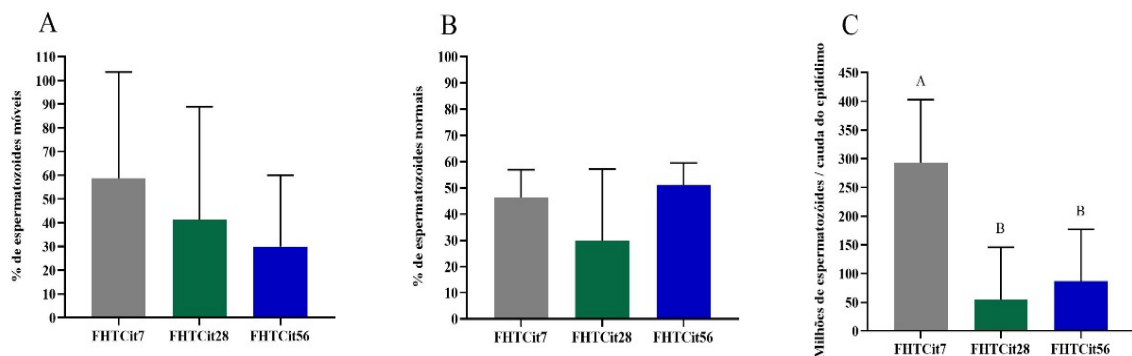
além de inflamação no testículo esquerdo. Surpreendentemente, em um outro animal do grupo tratado aos 56 dias, o testículo direito estava significativamente reduzido em tamanho, e o testículo esquerdo não pôde ser encontrado durante a eutanásia.

Em relação ao volume e ao peso relativo dos testículos obtidos após a eutanásia, não houve diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre os grupos FHTCit (Figura 34).



**Figura 34:** A: Média do volume testicular (cm<sup>3</sup>) e do peso dos testículos dos grupos FHTCit7; FHTCit28 e FHTCit56, no final do experimento. B: Porcentagem de peso relativo dos testículos dos animais dos grupos FHTCit7; FHTCit28 e FHTCit56, ao final do experimento

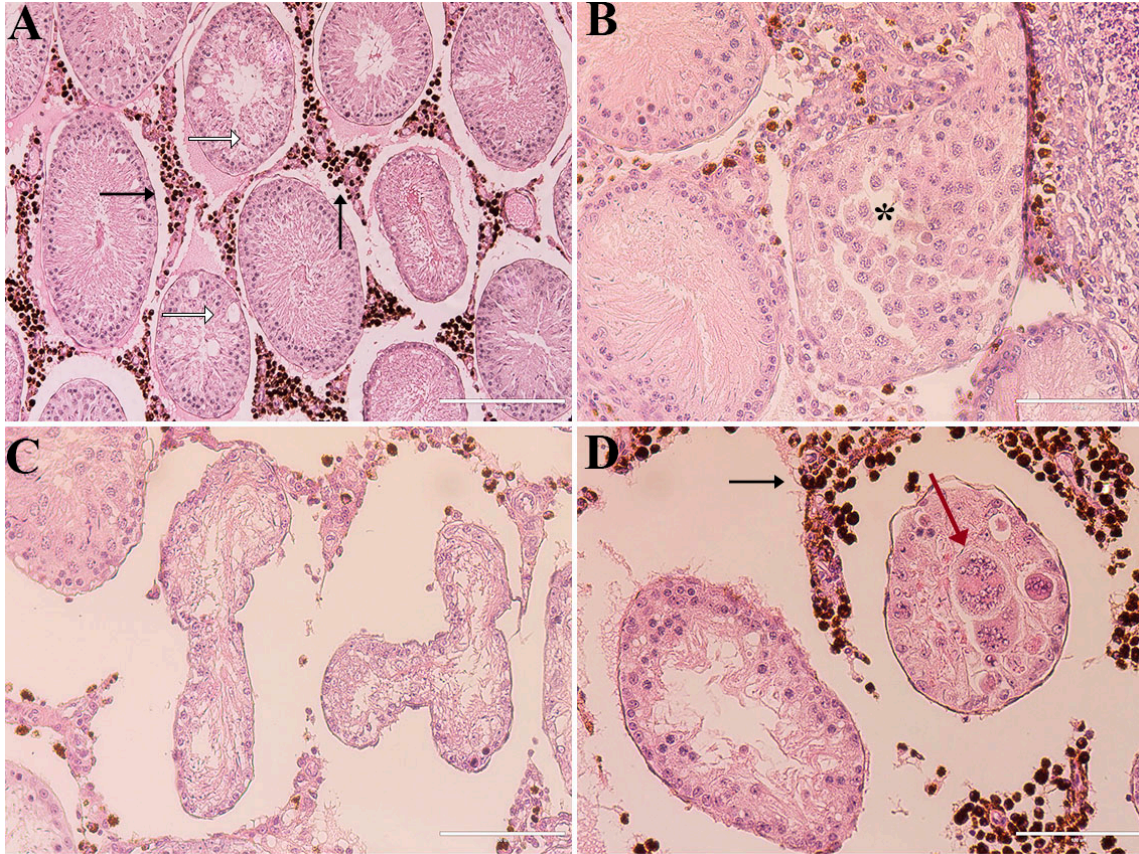
Não foram observadas diferenças significativas ( $p>0,05$ ) na motilidade e na morfologia espermática entre os grupos FHTCit. No entanto, a concentração de espermatozoides na cauda dos epidídimos apresentou uma redução significativa nos grupos FHTCit28 e FHTCit56 (Figura 35).



**Figura 35:** Parâmetros espermáticos dos grupos FHTCit7; FHTCit28 e FHTCit56, no final do experimento. A: Motilidade espermática (%), B: Porcentagem de espermatozoides morfologicamente normais, e C: Número de espermatozoides.

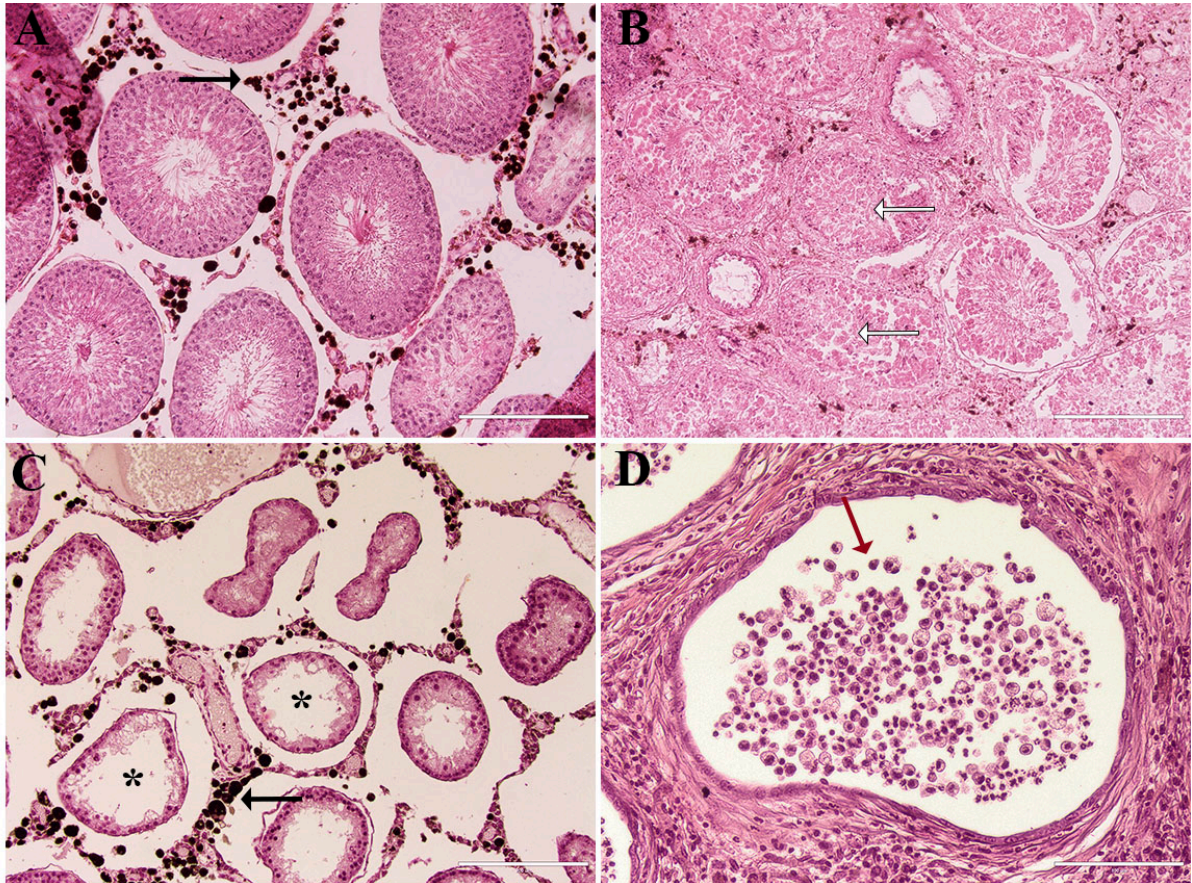
(A, B): letras maiúsculas mostram diferença significativa ( $>0,07$ ) entre os grupos no mesmo momento de avaliação.

No grupo FHTCit, aos 7 dias (Figura 36), a maioria dos túbulos permaneceu intacta, mesmo na presença das nanopartículas. Observou-se desorganização dos túbulos seminíferos, com vacuolização, túbulos irregulares e presença de células inchadas no lúmen dos túbulos.



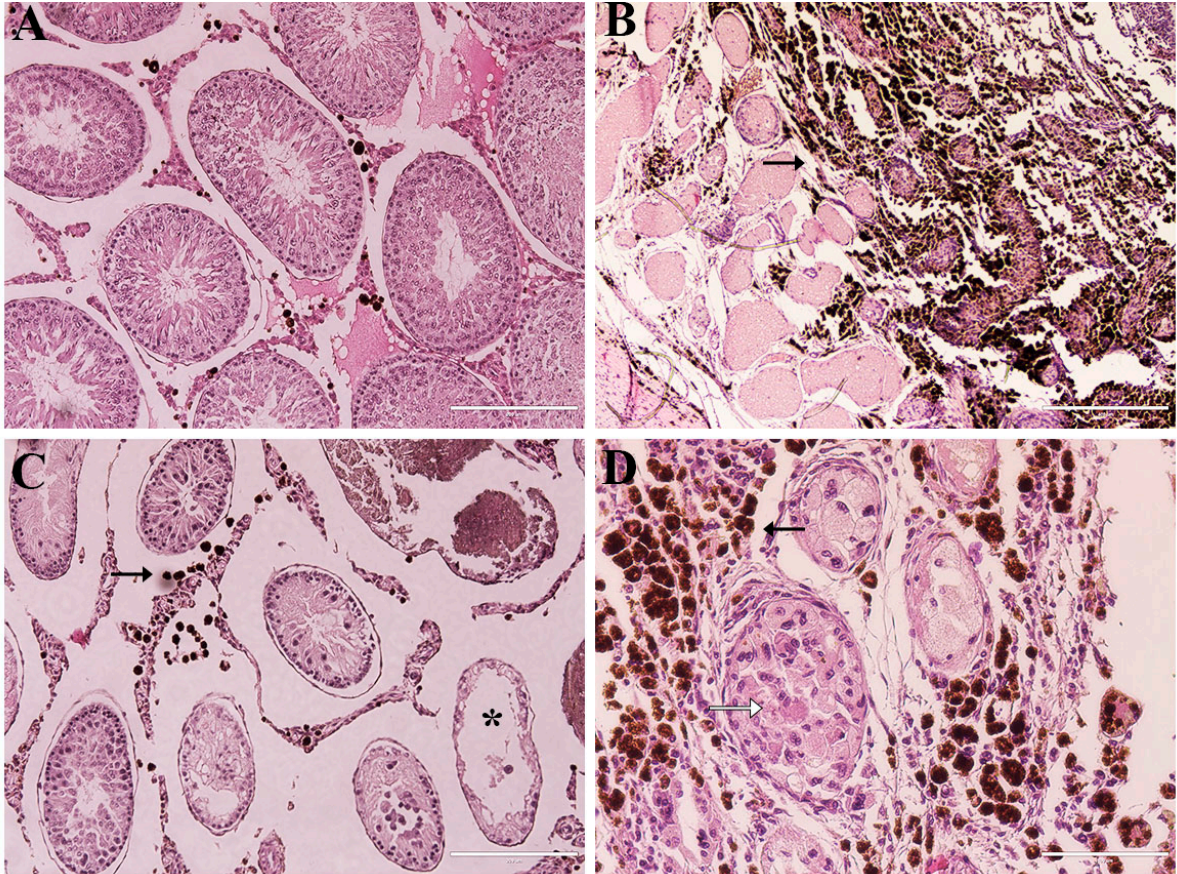
**Figura 36:** Cortes histológicas dos testículos do grupo FHTCit 7 dias. A: Túbulos seminíferos com presença de espermatozoides no lúmen, e aglomerados de nanopartículas no interstício (setas pretas), assim como túbulos com início de vacuolização (setas brancas); B: Desorganização dos túbulos seminíferos e presença de espermatócitos (asterisco); C: Túbulos com delimitações irregulares, retraídos e com diminuição do epitélio germinativo; D: Túbulos desorganizados com espaçamento irregular no tecido intersticial, presença de aglomerado de nanopartículas no interstício (seta preta) e células gigantes multinucleadas (seta vermelha) no lúmen do túbulo. Barras: A = 200µm; B, C e D = 100µm.

No D28 (Figura 37), ainda foram observados túbulos intactos, no entanto, os danos eram mais extensos em comparação ao D7, havendo alguns túbulos seminíferos que apresentavam apenas a lâmina basal. Também foi visualizado o início da necrose coagulativa em algumas regiões dos testículos.



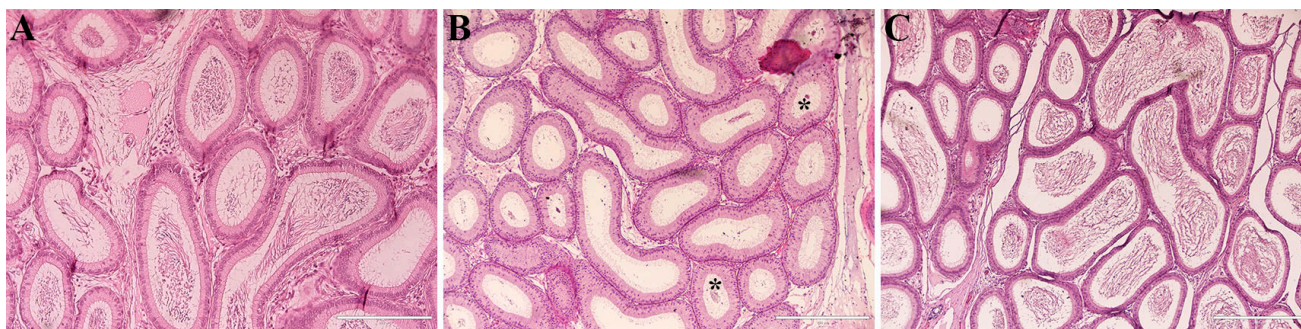
**Figura 37:** Cortes histológicos dos testículos do grupo FHTCit 28 dias. A: Túbulos seminíferos com presença de espermatozoides no lúmen, e aglomerados de nanopartículas no interstício (setas pretas); B: Túbulos seminíferos com necrose coagulativa (setas brancas) e descolamento do epitélio germinativo da lâmina basal; C: Túbulos com delimitações irregulares, retraídos e com diminuição do epitélio germinativo (asterisco), e presença de aglomerados de nanopartículas no interstício (setas pretas); D: Túbulo com o lúmen repleto de debris celular (seta vermelha). Barras: A, B e C = 200µm; D = 100µm.

Já aos 56 dias (Figura 38), foram observados túbulos seminíferos íntegros e alguma vacuolização. Houve um aumento no número de túbulos seminíferos com necrose coagulativa e túbulos irregulares. Além disso, foram observados túbulos seminíferos com células edemaciadas no lúmen.



**Figura 38:** Cortes histológicos dos testículos do grupo FHTCit 56 dias. A: Túbulos seminíferos íntegros com presença de espermatozoides no lúmen; B: Túbulos seminíferos retraídos com muito aglomerado de nanopartículas (seta preta) ao seu redor; C: Túbulos com descolamento do epitélio germinativo da lâmina basal e com diminuição do epitélio germinativo (asterisco preto), desorganização e aumento do espaço intersticial e presença de aglomerados de nanopartículas (setas pretas); D: Túbulo com células gigantes multinucleadas no lúmen (seta branca), e aglomerados de nanopartículas no interstício (seta preta). Barras: A e C = 200 $\mu$ m; B = 400  $\mu$ m e D = 100 $\mu$ m.

A análise histológica dos epidídimos (Figura 39) revelou uma estrutura intacta, com ductos epididimários revestidos por epitélio pseudoestratificado cilíndrico com estereocílios, além da presença de tecido conjuntivo frouxo entre os ductos. Embora a maioria dos ductos apresentasse o lúmen preenchido por espermatozoides, também foram observados ductos com o lúmen vazio em todos os dias de tratamento. Somente nos dias 28 e 56, foram identificadas algumas alterações, como a presença de debris celulares no lúmen de alguns ductos epididimários, bem como material esfoliado no lúmen do epidídimo e alterações cribriformes. Alguns epidídimos continham uma quantidade reduzida de tecido conjuntivo frouxo entre os ductos, e foi possível observar infiltração linfocitária e movimento de migração dos linfócitos no interstício.



**Figura 39:** Cortes histológicas dos epidídimos do grupo FHTCit. A: FHTCit 7 dias, presença de túbulos epididimários com muitos espermatozoides no lúmen; B: FHTCit 28 dias, túbulos íntegros com poucos espermatozoides e presença de debris celulares (asterisco preto); C: FHTCit 56 dias, túbulos disformes, mas com muita presença de espermatozoides no lúmen. Barras: 200µm.

Os demais órgãos exibiram aparência macroscópica normal e semelhante em todos os grupos, com a exceção de um único animal que mostrou a presença de grânulos próximos ao mesentério. Não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) no peso relativo (peso do órgão / peso do animal) dos órgãos dos animais entre os dias de tratamento (Tabela 4).

**Tabela 3:** Média ( $\pm$ DP) de peso relativo (peso do órgão / peso do animal) dos órgãos Rim, Baço, Fígado e Pulmão, dos animais dos grupos FHTCit7 ( $n = 2$ ), FHTCit28 ( $n = 2$ ) e FHTCit56 ( $n = 2$ ), no final do experimento.

	FHTCit7	FHTCit28	FHTCit56
<b>Rim</b>	0,49 $\pm$ 0,01	0,40 $\pm$ 0,02	0,37 $\pm$ 0,01
<b>Baço</b>	0,36 $\pm$ 0,08	0,34 $\pm$ 0,05	0,35 $\pm$ 0,04
<b>Fígado</b>	3,86 $\pm$ 0,30	3,30 $\pm$ 0,12	3,08 $\pm$ 0,23
<b>Pulmão</b>	0,63 $\pm$ 0,08	0,52 $\pm$ 0,01	0,54 $\pm$ 0,01

#### 7.4. Discussão

Na nossa investigação da fotohipertermia testicular utilizando nanopartículas de ferrita de manganês funcionalizadas com citrato, notamos uma distribuição não uniforme dos danos. Algumas regiões dos testículos, especialmente próximas à periferia, permaneceram íntegras, mesmo na presença das nanopartículas. Apesar disso, as análises histológicas dos testículos revelaram degeneração dos túbulos seminíferos, sem evidência de inflamação. Adicionalmente, ao completar 56 dias, observamos a ausência de um dos testículos em um dos animais.

Na análise histológica dos testículos houve dano progressivo, iniciado com vacuolização, evoluindo para retração dos túbulos seminíferos e desestruturação do epitélio germinativo e culminando com necrose coagulativa. Embora ainda houvesse túbulos intactos na periferia dos testículos, esses resultados indicam impactos significativos na fertilidade

causados pela fotohipertermia testicular mediada por nanopartículas. Essas respostas fornecem implicações positivas para o potencial contraceptivo do método. Shahat *et al.* (2020), justifica que a principal consequência do estresse térmico nos testículos é a apoptose das células germinativas, destacando a suscetibilidade dos espermátocitos de paquíteno, espermátides e espermatozoides epididimários ao calor. O estudo de Rizzoto *et al.* (2019) indica que a exposição a diferentes níveis de oxigênio e temperatura afeta significativamente o diâmetro dos túbulos seminíferos, resultando em alterações nas espermátides e uma perda total do epitélio espermato gênico em alguns casos. Dessa forma, o autor afirma que a hipertermia, foi a principal causa dos efeitos na espermato gênese e nos espermatozoides, e não a hipóxia. Essas descobertas destacam a importância de abordagens centradas na hipertermia para alcançar a infertilidade.

A observação de túbulos seminíferos íntegros, especialmente na periferia dos testículos, levou à suposição de que a luz poderia não estar atingindo as nanopartículas na área oposta à irradiação do LED. Luz no comprimento de onda de 808 nm utilizado no presente estudo, apresenta uma penetração em tecido animal (pele) de até 5 mm (Francisco *et al.*, 2021). Considerando que a espessura do testículo é maior do que isso, possivelmente as nanopartículas mais distantes da superfície irradiada não chegaram a receber a luz, fazendo com que o aquecimento não atingisse a gônada de forma homogênea. Diante disso, optou-se por desenvolver um novo dispositivo equipado com dois LEDs para garantir a incidência luminosa em ambas as faces dos testículos (ventral e dorsal).

### **7.5. Conclusão**

A aplicação da fotohipertermia utilizando nanopartículas de ferrita de manganês funcionalizada com citrato demonstrou impactos significativos na histologia testicular, resultando em danos severos, embora não tenha resultado em alterações nos parâmetros espermáticos. Os resultados se mostram bastante promissores, destacando a fotohipertermia mediada por nanopartículas aplicada diretamente aos testículos como potencial método contraceptivo para animais machos. É importante observar, no entanto, que os danos causados aos túbulos seminíferos não foram uniformemente distribuídos, evidenciando a necessidade de aprimorar a distribuição térmica nos testículos. Como resposta a essa limitação, novos estudos foram empreendidos com o objetivo de otimizar a técnica, visando uma distribuição mais homogênea do calor, especificamente por meio do uso de dois LEDs para garantir a penetração da luz em todo o órgão.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amaku, M., Dias, R. A., & Ferreira, F. (2009). Dinâmica populacional canina: potenciais efeitos de campanhas de esterilização. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 25(4), 300-304.
- Bastos, A. L. F. (2013). Estudo da dinâmica populacional e das estratégias de manejo da população canina no município de Itabirito, MG, Brasil de 2007 a 2011.
- Boone, John D.; Slater, Margaret. (2014). A Generalized Population Monitoring Program to Inform the Management of Free-Roaming Cats. ACC&D.
- Branquinho, L. C., Carrião, M. S., Costa, A. S., Zufelato, N., Sousa, M. H., Miotto, R., ... & Bakuzis, A. F. (2013). Effect of magnetic dipolar interactions on nanoparticle heating efficiency: Implications for cancer hyperthermia. *Scientific reports*, 3(1), 2887.
- Cathey, M., & Memon, M. A. (2010). Nonsurgical methods of contraception in dogs and cats: Where are we now. *Vet. Med*, 105, 12-17.
- Francisco, M. D., Chen, W. F., Pan, C. T., Lin, M. C., Wen, Z. H., Liao, C. F., & Shiue, Y. L. (2021). Competitive real-time near infrared (NIR) vein finder imaging device to improve peripheral subcutaneous vein selection in venipuncture for clinical laboratory testing. *Micromachines*, 12(4), 373.
- Jana, K., & Samanta, P. K. (2007). Sterilization of male stray dogs with a single intratesticular injection of calcium chloride: a dose-dependent study. *Contraception*, 75(5), 390-400.
- Jivago, J. L. P., Brito, J. L. M., Capistrano, G., Vinícius-Araújo, M., Lima Verde, E., Bakuzis, A. F., ... & Lucci, C. M. (2021). New prospects in neutering male animals using magnetic nanoparticle hyperthermia. *Pharmaceutics*, 13(9), 1465.
- Rizzoto, G., & Kastelic, J. P. (2020). A new paradigm regarding testicular thermoregulation in ruminants. *Theriogenology*, 147, 166-175.
- Shahat, A. M., Rizzoto, G., & Kastelic, J. P. (2020). Amelioration of heat stress-induced damage to testes and sperm quality. *Theriogenology*, 158, 84-96.
- Sousa-Junior, A. A., Mendanha, S. A., Carriao, M. S., Capistrano, G., Prospero, A. G., Soares, G. A., ... & Bakuzis, A. F. (2020). Predictive model for delivery efficiency: erythrocyte membrane camouflaged Magnetofluorescent Nanocarriers Study. *Molecular Pharmaceutics*, 17(3), 837-851.
- Sternheim, I. (2012). How Holland became free of Stray dogs. *Isis*, 2-9.
- Tan, K., Rand, J., & Morton, J. (2017). Trap-neuter-return activities in urban stray cat colonies in Australia. *Animals*, 7(6), 46.

## **9. CAPÍTULO 4 – Fotohipertermia testicular mediada por nanopartículas de Ferrita de Manganês funcionalizadas com citrato utilizando um equipamento para irradiação de luz com 2 LEDs**

### **9.1. Introdução**

O Capítulo 3 desse estudo proporcionou uma análise mais profunda do uso da tecnologia de LED associada a nanopartículas na hipertermia testicular. Observou-se uma limitação na uniformidade do dano causado pelo aquecimento nos testículos. A histologia revelou áreas periféricas dos testículos que, mesmo com a presença de nanopartículas, permaneciam íntegras, sugerindo uma possível falta de uniformidade no calor distribuído ao longo do tecido testicular.

Essa limitação instigou a reflexão sobre estratégias para aprimorar a eficácia do tratamento. Uma abordagem envolvendo o posicionamento estratégico de dois LEDs, um acima, na região ventral, e outro abaixo, na região dorsal dos testículos, visando superar a possível limitação na penetração da luz nesse tecido. Com isso, espera-se atingir uma distribuição de calor mais uniforme, otimizando assim os efeitos da hipertermia sobre os testículos.

O objetivo deste capítulo foi avaliar o uso de 2 LEDs na fotohipertermia testicular mediada por nanopartículas de ferrita de manganês recoberta com citrato nos parâmetros reprodutivos (volume e peso testicular, parâmetros espermáticos e histopatologia de testículos e epidídimos) dos animais pelo período de duração da espermatogênese; bem como avaliar possíveis efeitos da aplicação desta nanopartícula por via intratesticular em órgãos vitais (rim, fígado, baço e pulmão).

### **9.2. Material e Métodos**

#### *9.2.1. Nanopartículas*

Foi utilizada a mesma nanopartícula magnética de ferrita de manganês funcionalizada com citrato (NPCit) descrita no Capítulo 3 (Tópico 6.2.1).

#### *9.2.2. Fonte de luz e controle da potência luminosa*

Na busca por uma distribuição uniforme de energia luminosa nos testículos, um aparelho foi projetado com a utilização de dois LEDs, de forma que um LED seja posicionado na superfície ventral dos testículos, enquanto o segundo seja colocado na superfície dorsal, garantindo uma distribuição simétrica de luz.

A fonte luminosa empregada no equipamento consiste em um LED cuja luz possui pico de intensidade no comprimento de onda de 808 nm. Esse LED é alimentado por uma fonte de

corrente contínua de 24 V, mas pode ser ligado e desligado em alta frequência através de um circuito transistorizado. O ligamento e desligamento do LED é feito seguindo esquema PWM (Pulse Width Modulation). Nesse contexto, o ciclo de trabalho do LED é calculado automaticamente por um microcontrolador Arduino Uno, baseado em microprocessador ATMEGA328P, usando informação em tempo real sobre a temperatura testicular do animal sendo tratado. A informação de temperatura em tempo real é coletada por sensor termopar tipo K, digitalizada por um circuito baseado em chip MAX6675 e processada através de um filtro digital de mediana móvel. O sistema de controle sobre o acionamento do LED funciona em malha fechada e foi projetado com regra de controle PI (Proporcional Integral) em tempo discreto.

### 9.2.3. *Animais e Desenho experimental*

Neste experimento foram utilizados 27 animais, mantidos conforme descrito no tópico 5.2.3. Os testículos (N=54) foram divididos de acordo com o tratamento recebido da seguinte forma:

- Grupo FHT (N=32 testículos): Os testículos receberam injeção intratesticular do fluido magnético e foram submetidos à incidência de luz dos LEDs para gerar fotohipertermia.
- Grupo LED (N=10 testículos): Os testículos foram submetidos apenas à incidência de luz dos LEDs, com a mesma potência luminosa do grupo FHT, sem receber injeção do fluido magnético.
- Grupo CNP (N=12 testículos): Os testículos receberam apenas injeção intratesticular do fluido magnético.

Os tratamentos foram subdivididos com relação dia da eutanásia, formando os seguintes subgrupos (Figura 40):

- FHT-D7 (N=11), FHT-D28 (N=11) e FHT-D56 (N=10)
- LED-D7 (N=3), LED-D28 (N=3) e LED-D56 (N=4)
- CNP-D7 (N=4), CNP-D28 (N=4) e CNP-D56 (N=4)



#### Grupo FHT (N = 32)

FHT7 (N=11);  
FHT28 (N=11);  
FHT56 (N=10).

#### Grupo LED (N = 10)

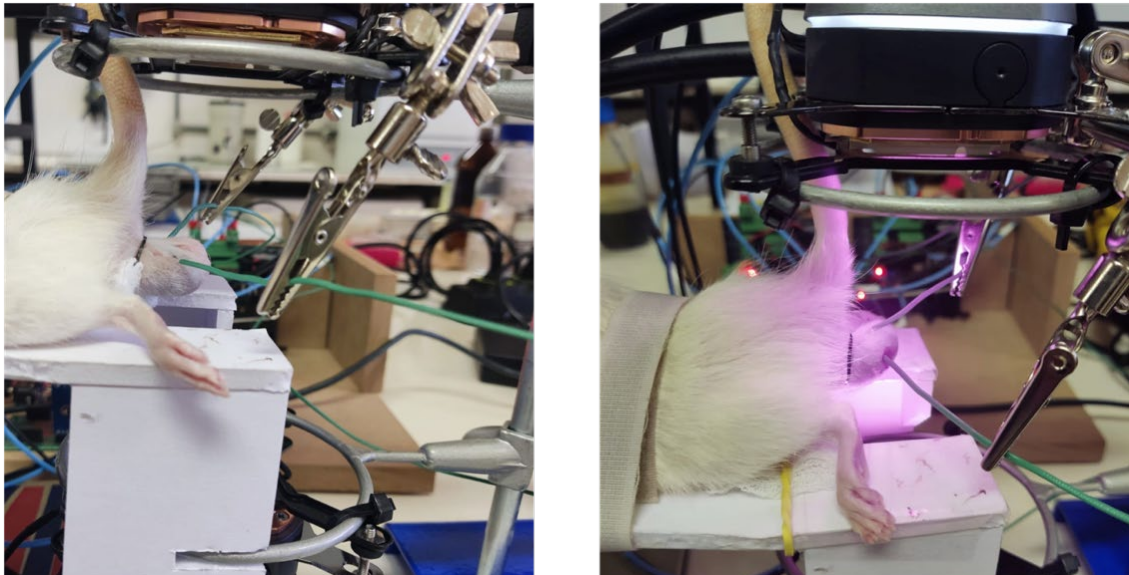
LED7 (N=3);  
LED28 (N=3);  
LED56 (N=4).

#### Grupo CNP (N = 12)

CNP7 (N=4);  
CNP28 (N=4);  
CNP56 (N=4).

**Figura 40:** Desenho experimental do método de fotohipertermia com o equipamento projetado com 2 LEDs.

Neste experimento, os animais foram submetidos aos mesmos procedimentos de anestesia, injeção do fluido e cuidados pós-tratamento, conforme descrito anteriormente. No entanto, os animais foram posicionados em decúbito ventral, e dois LEDs foram utilizados, um posicionado na superfície ventral e outro na superfície dorsal dos testículos (Figura 41), sempre a uma distância aproximada de 4 cm da superfície do órgão. Isso foi feito para garantir que a irradiação de luz dos LEDs incidisse tanto na superfície ventral quanto na superfície dorsal dos testículos.



**Figura 41:** Fotos do posicionamento dos animais durante o procedimento de fotohipertermia.

Após a eutanásia foram avaliados os seguintes parâmetros: 1) Ganho de peso dos animais, 2) Manifestação de dor e comportamento dos animais, 3) Exame ultrassonográfico dos testículos, 4) Peso e medida dos testículos, 5) Análise espermática do lavado epididimário, 6)

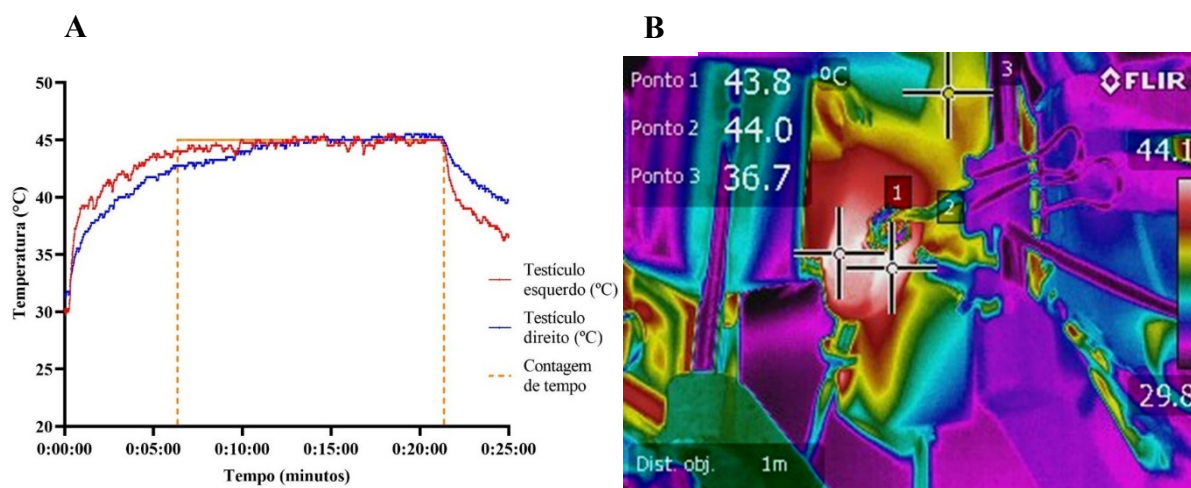
Análise histológica dos testículos e epidídimos, e 7) Peso e análise histológica dos órgãos vitais (fígado, baço, rim e pulmão). A metodologia da avaliação desses parâmetros está detalhadamente descrita no Capítulo 2 (tópicos 5.2.4).

#### 9.2.4. Análise Estatística

Todos os dados obtidos foram testados para normalidade com o teste Shapiro-Wilk. Os dados avaliados foram comparados entre os grupos experimentais pela análise de variância (ANOVA) e teste de médias (Tukey) utilizando o programa estatístico GraphPad prism 8.0.2 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA), com nível de significância de 5% ( $P < 0,05$ ).

### 9.3. Resultados

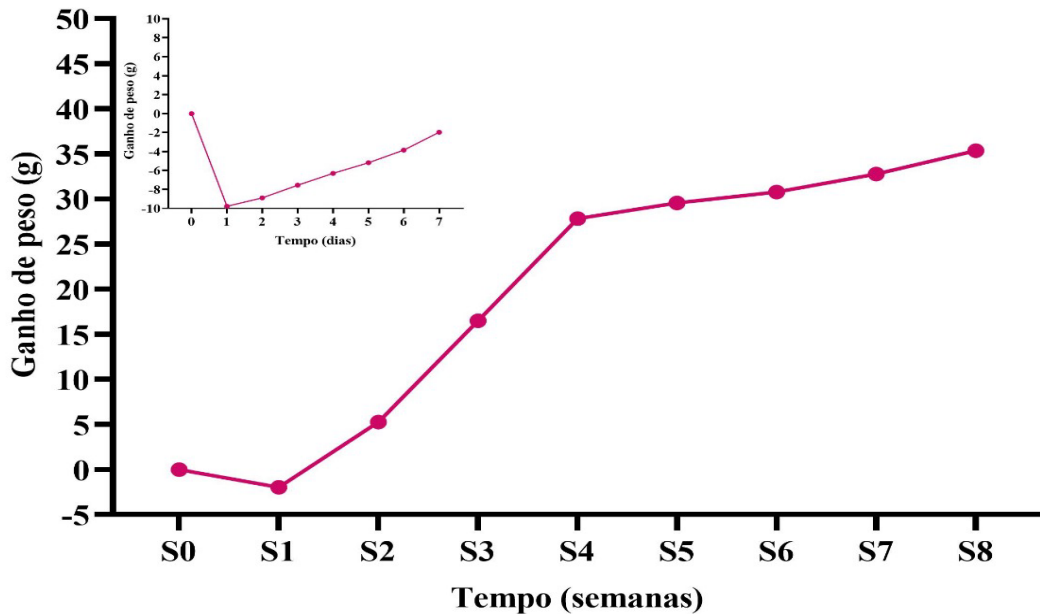
Durante o procedimento de fotohipertermia, não foram observadas complicações. Ao ligar o aparelho, a temperatura aumentou gradualmente, registrando uma média de 44,65 °C (com máxima de 45,69 °C e mínima de 43,53 °C). Foi observada uma pequena variação de temperatura entre os testículos do mesmo animal (Figura 42A), provavelmente devido a pequenas diferenças anatômicas, de posicionamento ou mesmo da distribuição das nanopartículas no tecido. As imagens da câmera termográfica revelaram um aquecimento específico na região dos testículos (Figura 42B).



**Figura 42:** A: Temperatura durante o procedimento de fotohipertermia. B: Foto obtida pela câmera térmica.

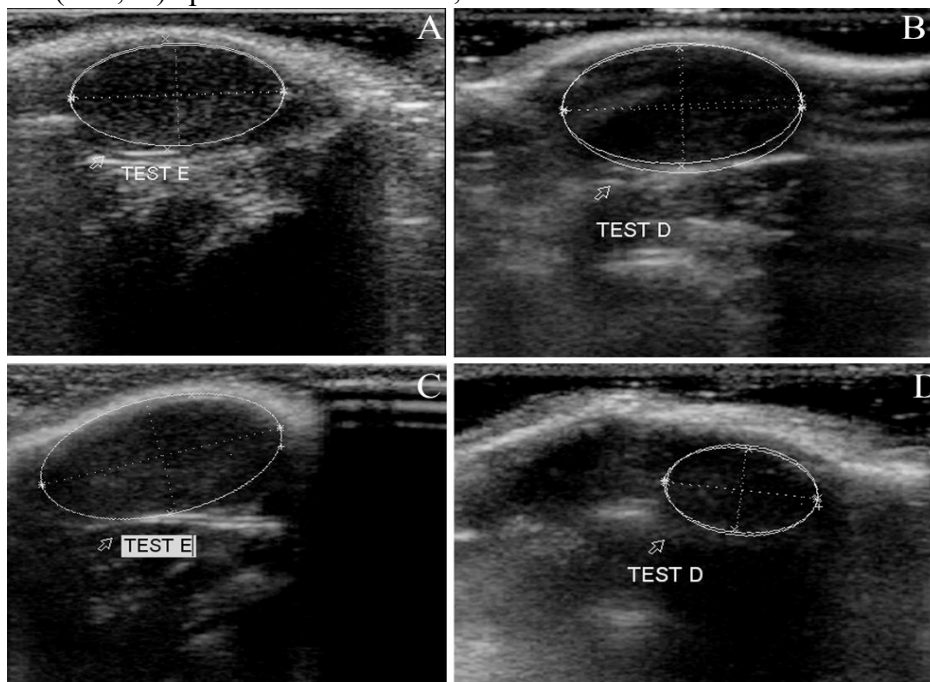
Uma redução inicial discreta no ganho de peso médio (~10 g) dos animais foi observada imediatamente após o procedimento de fotohipertermia. No entanto, ao longo de todos os dias após o tratamento, os animais mantiveram um apetite normal. Esse declínio foi seguido por uma recuperação, retornando ao ganho de peso normal uma semana após o tratamento (Figura

43). Importante destacar que nenhum dos animais apresentou sinais de dor ou desconforto ao toque em nenhum momento após o tratamento.

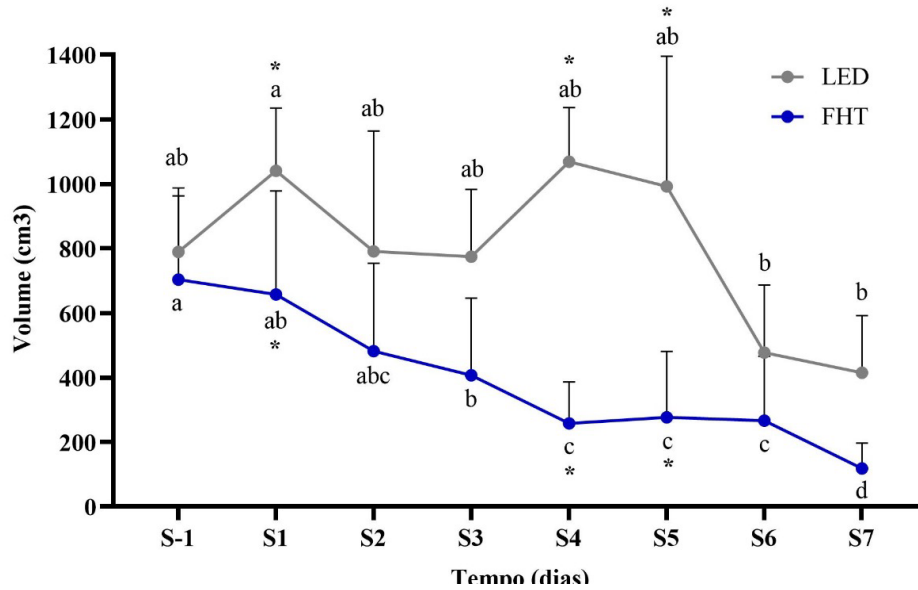


**Figura 43:** Ganho de peso corporal médio (g) de todos os animais dos grupos LED, CNP e FHT. Insert mostra a variação de peso nos 7 primeiros dias. Gráfico mostra a variação de peso corporal ao longo das semanas.

A ultrassonografia dos testículos e epidídimos dos animais tratados com FHT apresentou uma aparência normal (Figura 44). É possível identificar uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) no volume testicular no grupo FHT nas semanas 3 a 7 em comparação com a semana -1 (antes do procedimento) (Figura 45). Entre o grupo LED e o grupo FHT houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) apenas nas semanas 1, 4 e 5.



**Figura 44:** A, B: Ultrassom testicular dos grupos experimentais 6 dias antes do experimento. C: CNP 26 dias após a injeção do fluido contendo nanopartículas. D: FHT 26 dias após o procedimento de fotohipertermia.

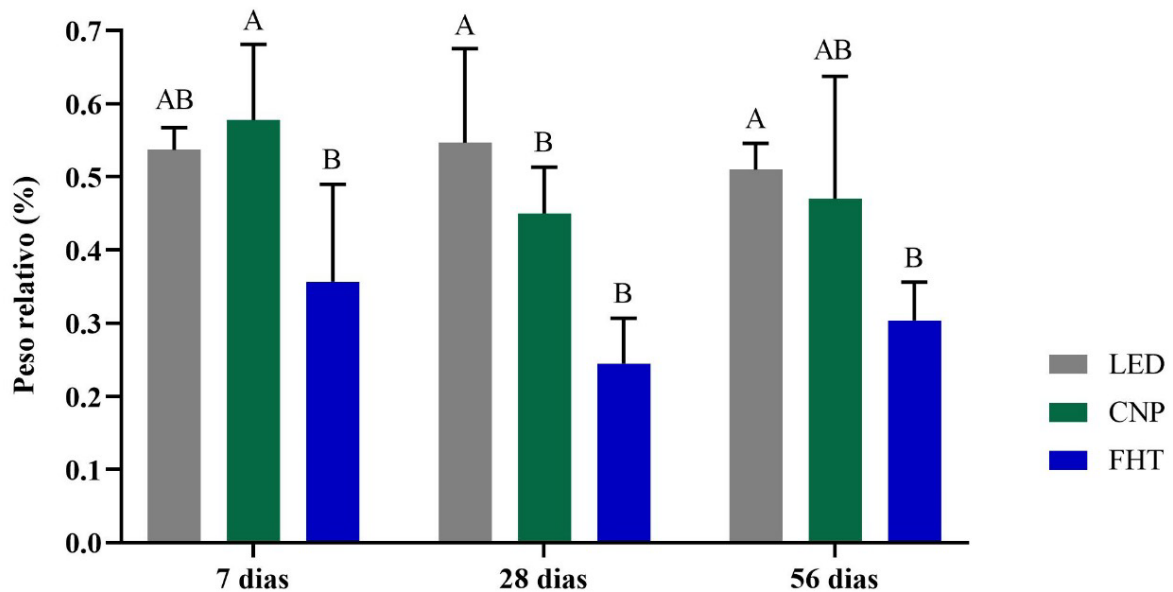


**Figura 45:** Média do volume testicular (cm<sup>3</sup>) medido pelo ultrassom, dos testículos dos grupos LED e FHT, ao longo tempo experimental.

(A, B): letras maiúsculas mostram diferença significativa ( $\leq 0,05$ ) entre os grupos no mesmo momento de avaliação.

(a, b): letras minúsculas mostram diferença significativa ( $\leq 0,05$ ) dentro do mesmo grupo em diferentes tempos.

O peso relativo dos testículos (Figura 46) mostrou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) aos 7 dias entre os grupos CNP e FHT, aos 28 dias entre os grupos LED e CNP e FHT e aos 56 dias entre os grupos LED e FHT. Não houve diferença significativa entre os dias dentro do mesmo grupo.

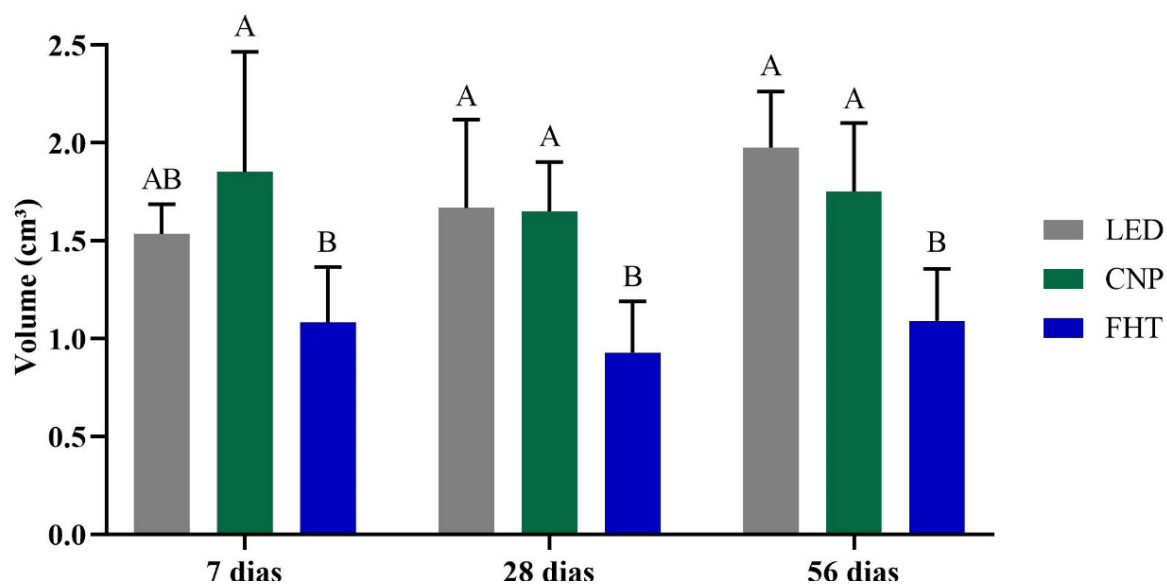


**Figura 46:** Peso relativo dos testículos dos animais dos grupos LED, CNP e FHT, ao final do experimento.

(A, B): letras maiúsculas mostram diferença significativa ( $\leq 0,05$ ) entre os grupos no mesmo momento de avaliação.

No volume testicular calculado a partir das medidas de comprimento e largura dos testículos extraídos após a eutanásia, houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o grupo FHT e os demais grupos em todos os dias de observação (Figura 47). Também não houve diferença significativa entre os dias dentro do mesmo grupo.

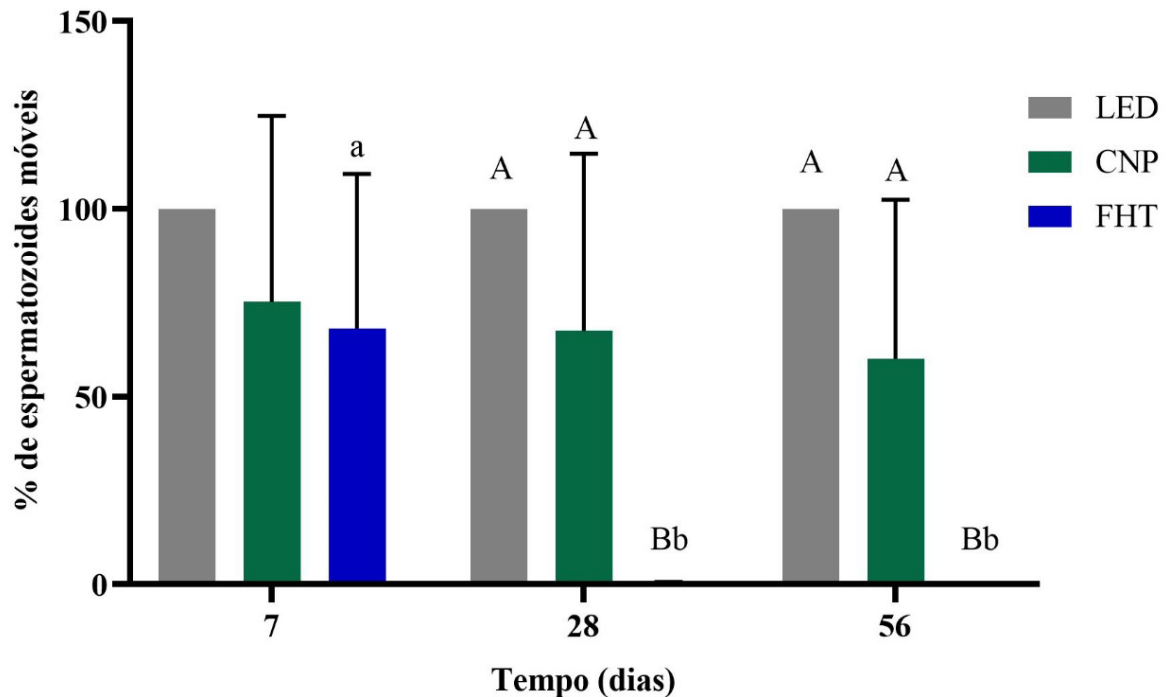
**Figura 47:** Média do volume testicular ( $\text{cm}^3$ ) dos testículos dos grupos LED, CNP e FHT aos 7, 28 e 56 dias após



o procedimento.

(A, B): letras maiúsculas mostram diferença significativa ( $\leq 0,05$ ) entre os grupos no mesmo momento de avaliação.

A motilidade dos espermatozoides diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) no grupo FHT no D28 (0%) e D56 (0,2%) em comparação com o D7 (95,8%) e com os outros grupos (Figura 48).

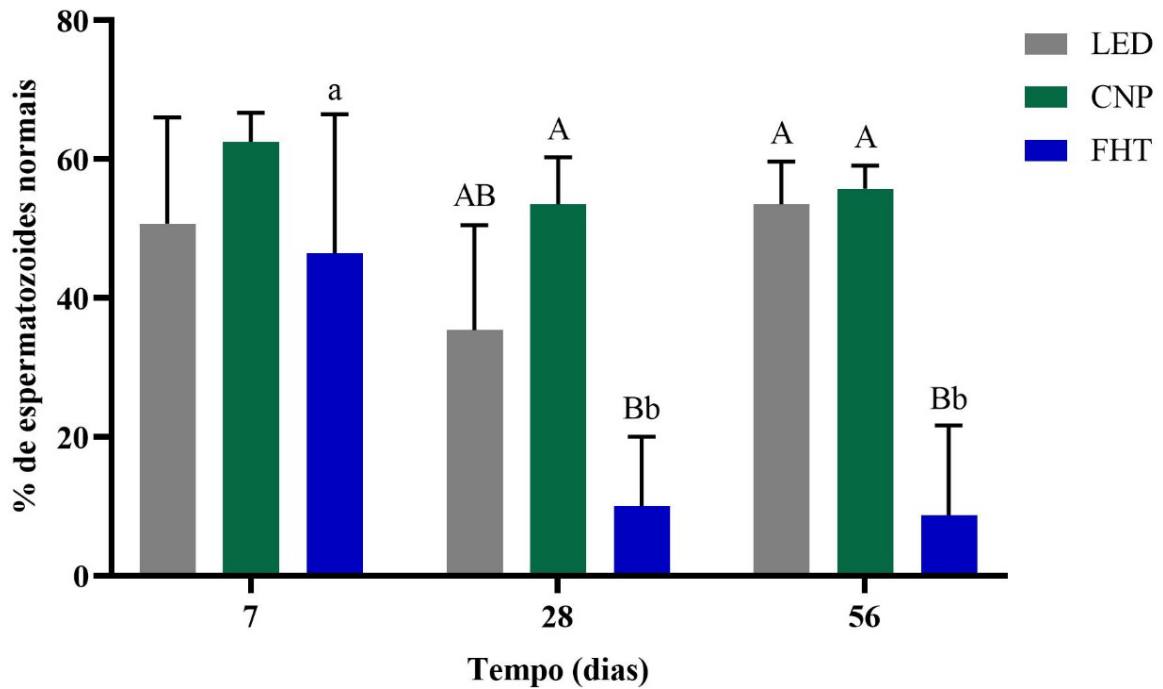


**Figura 48:** Motilidade espermática (%) do lavado da cauda do epidídimo dos grupos LED, CNP e FHT, no final do experimento.

(A, B): letras maiúsculas mostram diferença significativa ( $\leq 0,05$ ) entre os grupos no mesmo momento de avaliação.

(a, b): letras minúsculas mostram diferença significativa ( $\leq 0,05$ ) dentro do mesmo grupo em diferentes tempos.

A porcentagem de espermatozoides com morfologia normal diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) no grupo FHT no D28 (2,3%) e D56 (3,8%) em comparação com o D7 (55,8%) e com os grupos CNP e LED (Figura 49).

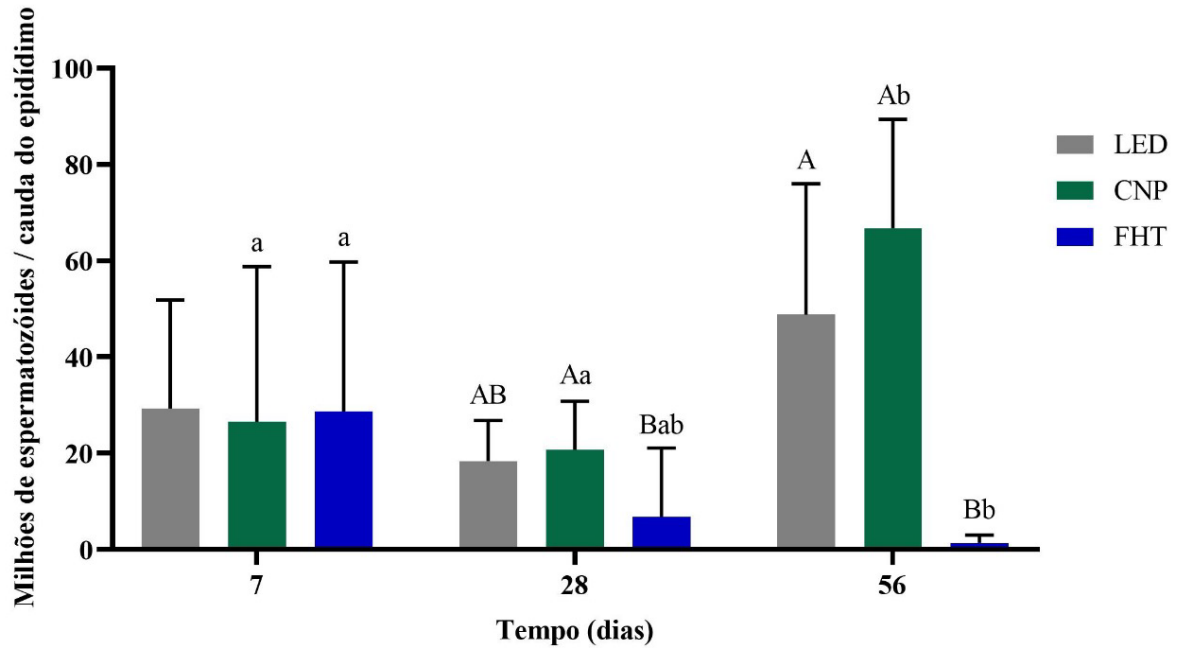


**Figura 49:** Porcentagem de espermatozoides normais na cauda do epidídimo dos grupos LED, CNP e FHT no final do experimento.

(A, B): letras maiúsculas mostram diferença significativa ( $\leq 0,05$ ) entre os grupos no mesmo momento de avaliação.

(a, b): letras minúsculas mostram diferença significativa ( $\leq 0,05$ ) dentro do mesmo grupo em diferentes tempos.

O número total de espermatozoides na cauda dos epidídimos diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) no grupo FHT no D56 em relação ao D7, e aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) no grupo CNP no D56 em comparação ao D7 e ao D28 (Figura 50). Além disso, o número de espermatozoides no grupo FHT foi significativamente inferior ( $p < 0,05$ ) ao do grupo CNP no D28 e ao dos grupos CNP e LED no D56.

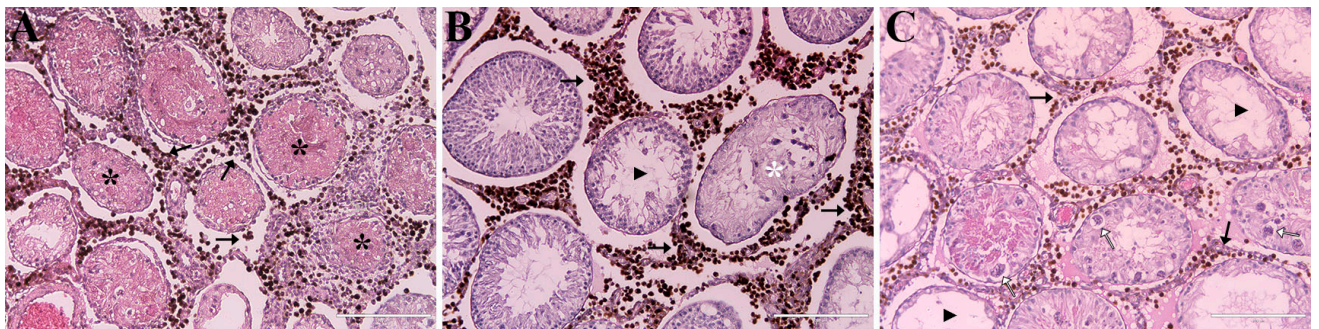


**Figura 50:** Número de espermatozoides (milhões de espermatozoides) nas caudas dos epidídimos dos grupos LED, CNP e FHT, no final do experimento.

(A, B): letras maiúsculas mostram diferença significativa ( $\leq 0,05$ ) entre os grupos no mesmo momento de avaliação.

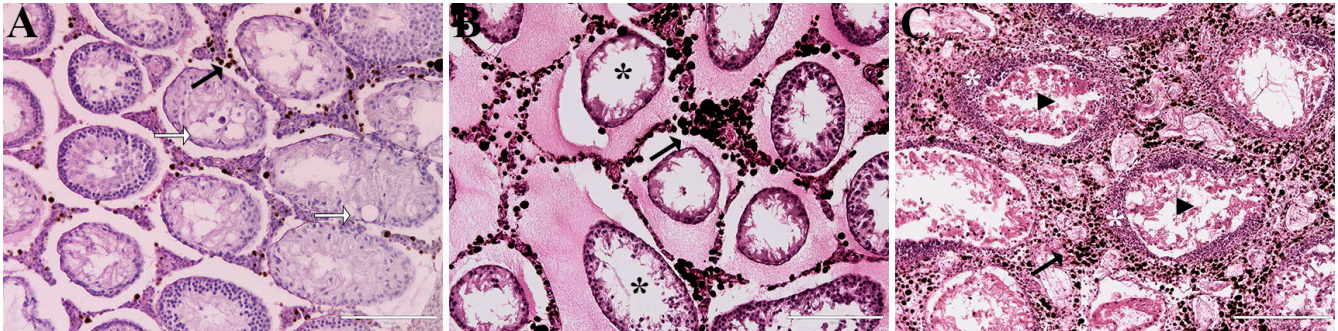
(a, b): letras minúsculas mostram diferença significativa ( $\leq 0,05$ ) dentro do mesmo grupo em diferentes tempos.

Na análise histológica realizada aos 7 dias no grupo FHT, observou-se uma grande quantidade de túbulos seminíferos com necrose coagulativa. Havia uma vasta presença de túbulos vacuolizados e alguns túbulos seminíferos intactos, mesmo na presença das nanopartículas. Alguns túbulos exibiram células inchadas e multinucleadas. As luzes dos túbulos estavam preenchidas por células germinativas exfoliadas. O tecido intersticial mostrou um infiltrado de linfócitos, indicando um processo inflamatório (Figura 51).



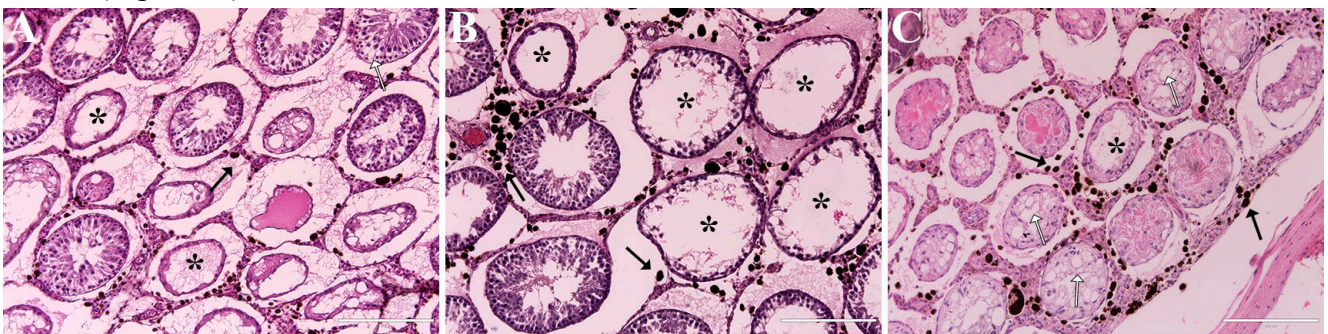
**Figura 51:** Cortes histológicos dos testículos do grupo FHT 7 dias A: Túbulos com necrose coagulativa (asterisco preto); B: Túbulos íntegros na periferia dos testículos mesmo com a presença de aglomerados de nanopartículas (seta preta) nas proximidades, e lúmen preenchido com debris celulares (asterisco branco); C: Túbulos com epitélio germinativo diminuído (cabeça de seta preta), presença de células multinucleadas (seta branca). Aglomerado de nanopartículas (seta preta). Barras: 200 $\mu$ m

Após 28 dias, observou-se uma alta quantidade de túbulos muito vacuolizados, com presença abundante de aglomerados de nanopartículas nos cortes histológicos. Raros túbulos intactos foram visualizados na periferia dos testículos, e esses apresentavam baixa presença de espermatozoides. Havia ampla formação de necrose coagulativa e presença de túbulos disformes, com suas luzes preenchidas por debris. Além disso, foi observado severa perda de epitélio germinativo. Ainda havia infiltrado de linfócitos, caracterizando um processo inflamatório nos testículos neste período (Figura 52).



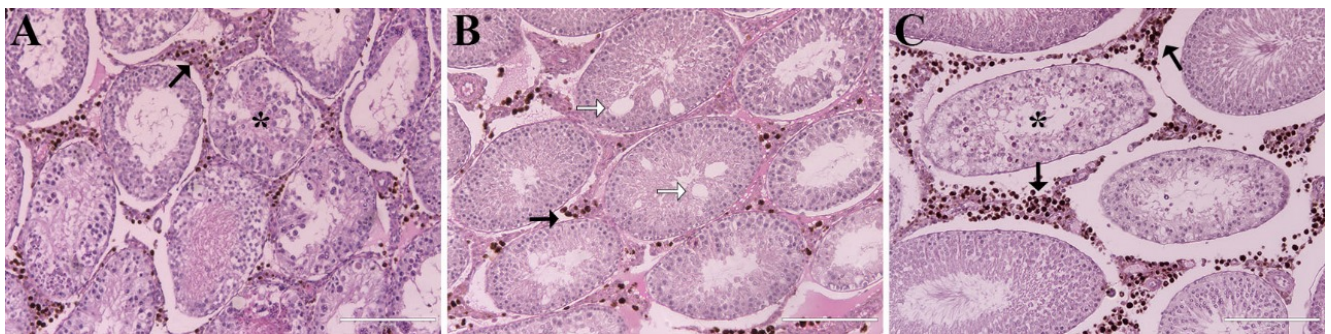
**Figura 52:** Cortes histológicos dos testículos do grupo FHT 28 dias A: Alguns túbulos intactos sem a presença de espermatozoides no lúmen, presença de vacuolização (seta branca); B: Túbulos com dimensões reduzidas e com perda do epitélio germinativo (asterisco preto); C: Túbulos com severa degeneração por necrose coagulativa (cabeça de seta preta), infiltrado linfocitário ao redor dos túbulos no interstício (asterisco branco). Presença de aglomerados de nanopartículas (seta preta). Barras: 200µm

Aos 56 dias, a histologia dos testículos apresentou túbulos com extensa vacuolização, completamente descaracterizados. Alguns túbulos mostraram sinais de necrose coagulativa. Havia presença de células inchadas na luz dos túbulos. E túbulos preservados ainda foram observados, principalmente nas regiões periféricas dos testículos. Nesse contexto, a análise histológica aos 56 dias revelou um dano extenso comparado aos demais dias de tratamento (Figura 53).



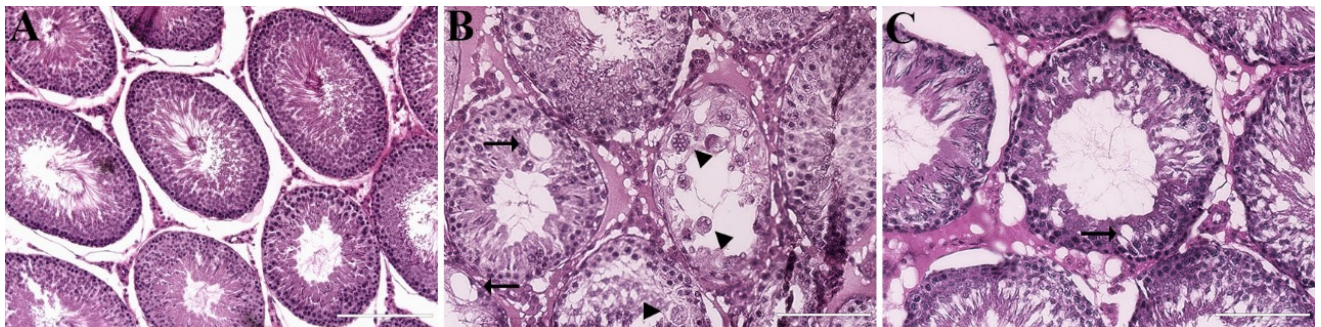
**Figura 53:** Cortes histológicos dos testículos do grupo FHT 56 dias A: Túbulos com extensa perda de epitélio germinativo (asterisco preto) e atrofiados, alguns túbulos íntegros sem a presença de espermatozoides; B: Túbulos com perda do epitélio germinativo (asterisco preto) e alguns túbulos íntegros sem a presença de espermatozoides; C: Presença de vacuolização (seta branca). Aglomerado de nanopartículas (seta preta). Barras: 200µm

No grupo controle CNP alguns danos foram observados, mas com grande número de túbulos intactos. Aos 7 dias (Figura 54A) foram observados túbulos com presença de debris celulares no lúmen, bem como túbulos íntegros, com a presença de espermatozoides e todas as células germinativas. Vacuolização em alguns túbulos foi observada nos achados histológicos aos 28 dias (Figura 54B), porém a maior parte era de túbulos íntegros. No grupo CNP 56 dias (Figura 54C) alguns túbulos com perda de epitélio germinativo e com debris celulares no lúmen ainda foram observados, apesar da maior parte dos túbulos estar íntegra e com presença de espermatozoides na luz. Em todos os tempos aglomerados de nanopartículas foram observados no interstício.



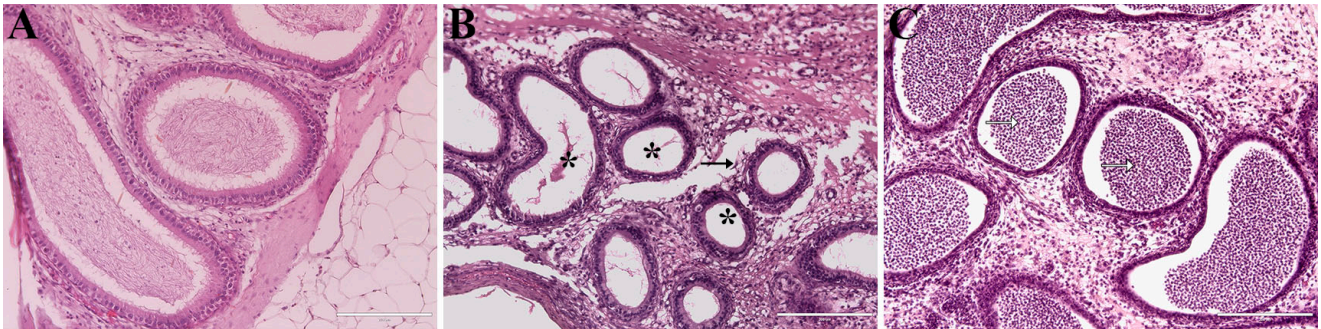
**Figura 54:** Cortes histológicos dos testículos do grupo CNP A: Presença de túbulos com o lúmen preenchido com debris celulares (asterisco) aos 7 dias; B: Túbulos com presença de vacuolização (seta branca) aos 28 dias; C: Lúmen com debris celulares (asterisco) aos 56 dias. Aglomerado de nanopartículas (seta preta). Barras: 200µm

No grupo controle LED 7 dias (Figura 55A) os túbulos seminíferos se apresentaram íntegros, com a presença de espermatozoides e todas as células germinativas. No entanto, os achados histológicos aos 28 dias (Figura 55B) revelaram alguns túbulos com vacuolização pronunciada e células inchadas e multinucleadas. Mas a maior parte dos túbulos estava preservada. No grupo LED 56 dias (Figura 55C), a histologia dos testículos mostrou predominantemente túbulos com aparência normal e intacta na região central do órgão, com alguns túbulos apresentando retração e vacuolização no epitélio germinativo, especificamente nas áreas de periferia dos testículos.



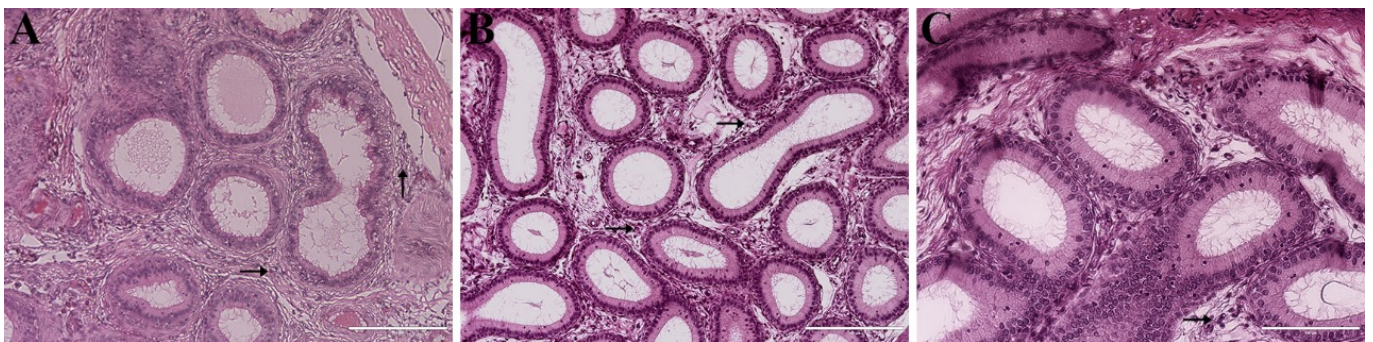
**Figura 55:** Cortes histológicos dos testículos do grupo LED A: Presença de túbulos intactos aos 7 dias; B: Túbulos com presença de vacuolização (seta preta) e células inchadas multinucleadas (cabeça de seta) aos 28 dias; C: Túbulos retraídos e com vacuolização (seta preta) aos 56 dias. Barras: 200µm

A análise histológica dos epidídimos do grupo FHT aos 7 dias revelou luz dos túbulos epididimários preenchidas principalmente por debris celulares, e em uma grande região, a luz dos túbulos estava preenchida apenas por linfócitos. Em uma pequena região, foram observados túbulos intactos, mas sem a presença de espermatozoides (Figura 56).



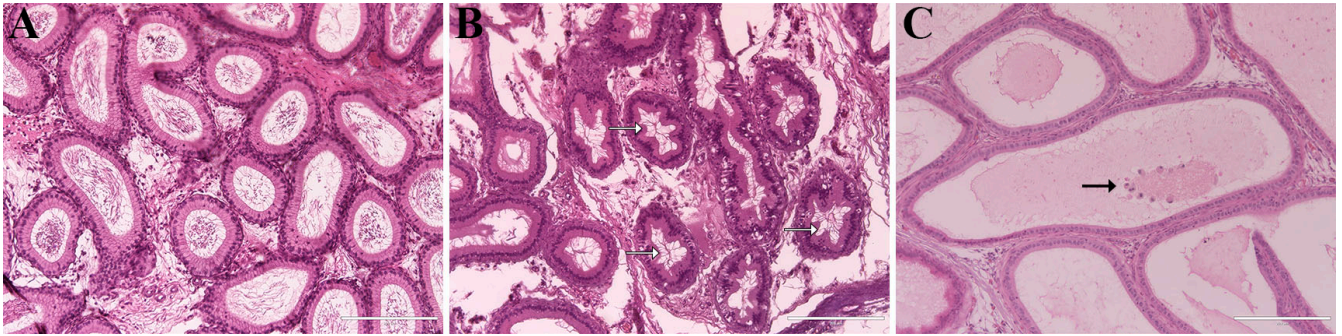
**Figura 56:** Cortes histológicos dos epidídimos do grupo FHT 7 dias. A: Túbulos intactos e com presença de espermatozoides no lúmen. B: Túbulos diminuídos (seta preta) e sem a presença de espermatozoides no lúmen (asterisco preto); C: Infiltrado linfocitário no lúmen dos túbulos (seta branca). Barras: 200 $\mu$ m.

Aos 28 dias, a análise histológica dos epidídimos revelou uma grande parte dos túbulos epididimários vazios, sem a presença de espermatozoides. O tecido intersticial ainda apresentava um infiltrado de linfócitos, indicando a persistência do processo inflamatório (Figura 57).



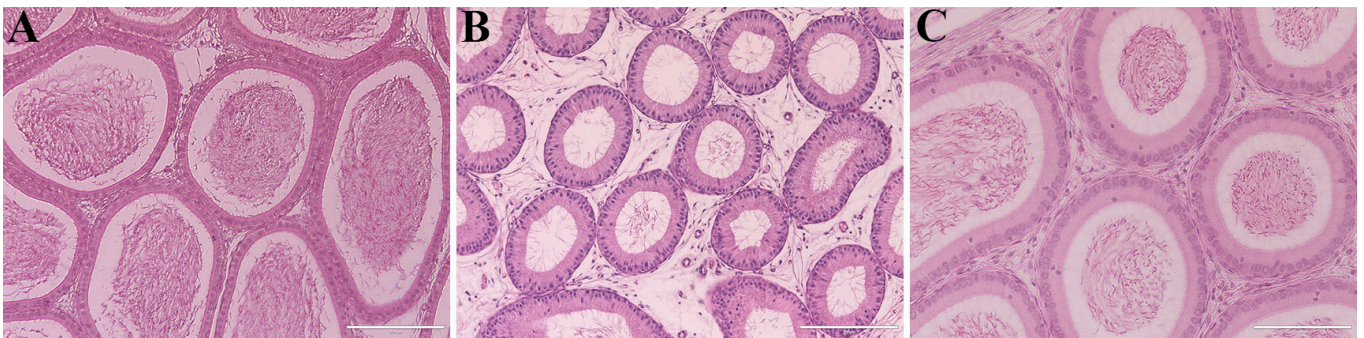
**Figura 57:** Cortes histológicos dos epidídimos do grupo FHT 28 dias. A, B e C: Túbulos sem espermatozoides no lúmen, e presença de linfócitos no tecido intersticial (seta preta). Barras: A e B = 200 $\mu$ m, C = 100 $\mu$ m.

Já aos 56 dias, a histologia dos epidídimos ainda apresentava alterações significativas, mas com alguns túbulos ainda intactos, e uma redução na presença de espermatozoides nos túbulos, e com alterações cribriformes acompanhados por um processo inflamatório persistente no tecido intersticial (Figura 58).



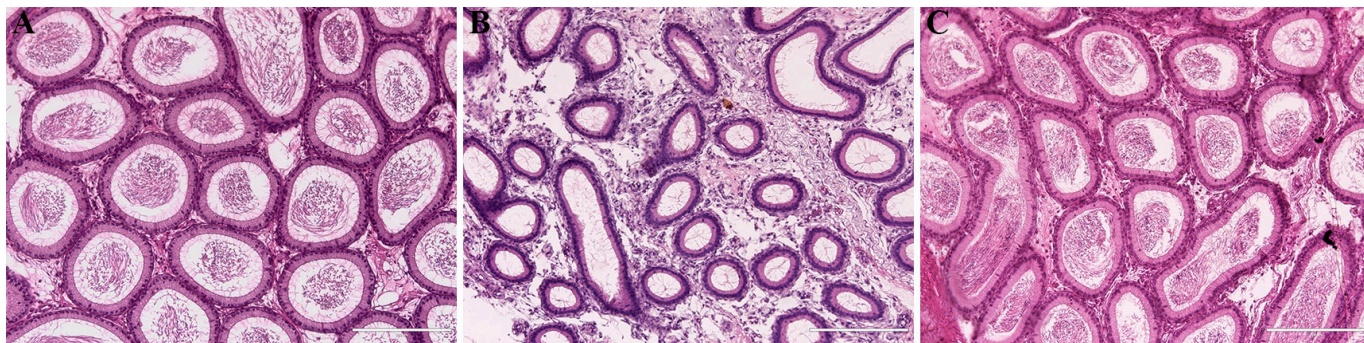
**Figura 58:** Cortes histológicos dos epidídimos do grupo FHT 56 dias. A: Túbulos intactos e com presença de espermatozoides no lúmen. B: Túbulos sem espermatozoides e com alterações cribriformes (seta branca); C: Presença de debris celulares no lúmen (seta preta) e túbulos vazios. Barras: 200 $\mu$ m.

No grupo CNP a histologia dos epidídimos apresentou uma estrutura aparentemente normal e sem alterações significativas. Aos 7 dias (Figura 59A) foram observados túbulos repletos de espermatozoides e com estrutura íntegra. Aos 28 dias (Figura 59B) foi possível observar uma reduzida presença de espermatozoides em seus lúmens, mas com túbulos epididimários ainda íntegros. E aos 56 dias (Figura 59C) a estrutura dos epidídimos voltou ao normal, sem nenhuma alteração, com presença de espermatozoides no lúmen.



**Figura 59:** Cortes histológicos dos epidídimos do grupo CNP. A: 7 dias com túbulos intactos e com presença de espermatozoides no lúmen. B: 28 dias, com túbulos íntegros mostrando uma redução na quantidade de espermatozoides no lúmen; C: 56 dias, túbulos intactos com presença de espermatozoides no lúmen. Barras: 200 $\mu$ m.

No grupo LED, os epidídimos apresentaram uma histologia aparentemente normal e sem alterações significativas. Não foram observadas vacuolizações, desorganização ou outras anomalias histológicas notáveis nos tecidos epididimários aos 7 dias (Figura 60A). A aparência dos túbulos epididimários aos 28 dias (Figura 60B) apresentou diminuição de tamanho, com uma reduzida presença de espermatozoides em seus lumens. Aos 56 dias (Figura 60C), os epidídimos exibiram túbulos com aparência normal e intacta, embora algumas áreas mostrassem alterações cribriformes.



**Figura 60:** Cortes histológicos dos epidídimos do grupo LED. A: 7 dias com túbulos intactos e com presença de espermatozoides no lúmen. B: 28 dias, túbulos íntegros com redução na quantidade de espermatozoides e túbulos diminuídos; C: 56 dias, túbulos intactos com presença de espermatozoides no lúmen. Barras: 200 $\mu$ m.

A aparência macroscópica dos órgãos (baço, rim, fígado e pulmão) avaliados nos diferentes grupos mostrou-se normal e semelhante em todos os animais. Além disso, não foram identificadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) no peso relativo (peso do órgão / peso do animal) dos órgãos entre os diferentes dias de tratamento, como detalhado na Tabela 5.

**Tabela 4:** Média de peso relativo (peso do órgão / peso do animal) de Baço, Rim, Fígado e Pulmão, dos animais dos grupos LED, CNP e FHT, no final do experimento.

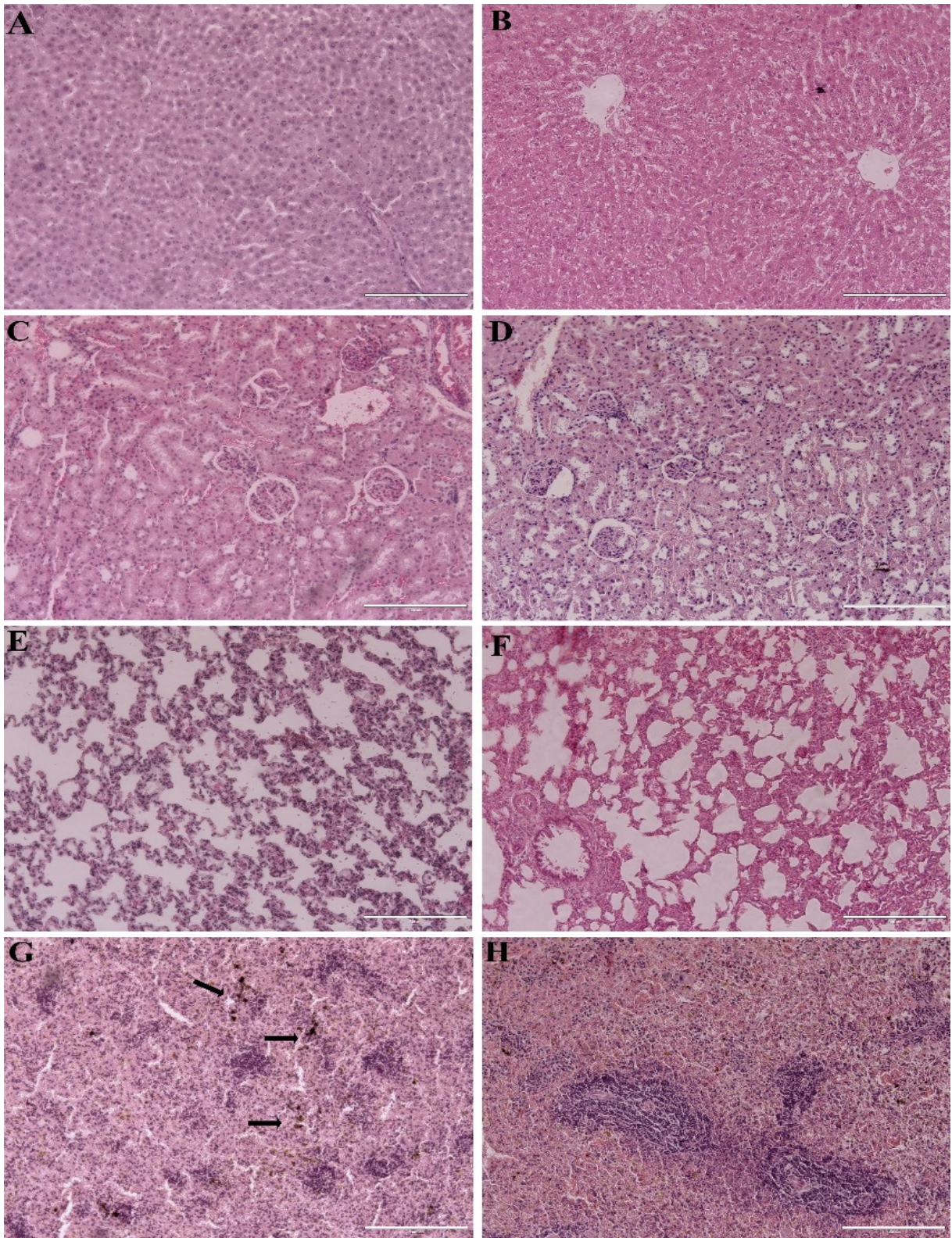
	<b>LED7</b>	<b>LED28</b>	<b>LED56</b>	<b>CNP7</b>	<b>CNP28</b>	<b>CNP56</b>	<b>FHT7</b>	<b>FHT28</b>	<b>FHT56</b>
<b>Baço</b>	0,25±0,00	0,24±0,00	0,25±0,00	0,55±0,12	0,40±0,01	0,27±0,05	0,51±0,31	0,37±0,19	0,38±0,07
<b>Rim</b>	0,32±0,00	0,34±0,00	0,30±0,00	0,42±0,00	0,36±0,05	0,33±0,02	0,38±0,06	0,38±0,13	0,32±0,03
<b>Fígado</b>	2,79±0,00	2,70±0,00	2,59±0,00	4,45±0,18	3,27±0,16	3,39±0,18	3,81±0,94	3,09±0,53	2,84±0,21
<b>Pulmão</b>	0,47±0,00	0,42±0,00	0,52±0,00	0,49±0,07	0,52±0,05	0,55±0,02	0,56±0,14	0,51±0,09	0,53±0,08

A análise histopatológica dos órgãos (Figura 61) revelou características específicas na morfologia tecidual, permitindo a identificação de potenciais alterações decorrentes à exposição a nanopartículas. No exame específico do fígado nos animais dos grupos FHT e controles CNP e LED, eutanasiados aos 7, 28 e 56 dias, evidenciou-se um parênquima hepático aparentemente saudável. A estrutura lobular manteve-se preservada, exibindo uma morfologia típica. Tanto a veia central quanto os cordões de hepatócitos também mostraram características normais.

Na análise dos rins de ambos os grupos, eutanasiados nos mesmos períodos, observou-se uma estrutura renal saudável. O córtex renal apresentou morfologia típica, com preservação dos corpúsculos renais e dos túbulos contornados. Da mesma maneira, os túbulos renais mantiveram uma organização celular regular, sem sinais evidentes de lesão.

A avaliação dos pulmões nos grupos controle e tratado, eutanasiados aos 7, 28 e 56 dias, revelou características indicativas de uma estrutura pulmonar saudável. Alvéolos pulmonares permaneceram íntegros, com membranas alveolares preservadas e ausência de fibrose ou infiltrados anormais. Os bronquíolos apresentaram morfologia normal, sem sinais de obstrução ou inflamação significativa. Os vasos sanguíneos pulmonares também estavam preservados.

Quanto ao baço, em todos os animais eutanasiados aos 7 e 28 dias, a estrutura geral do órgão permaneceu inalterada. No entanto, aos 56 dias, observou-se a presença de pontos escuros, indicativos da possível acumulação de nanopartículas no tecido esplênico, o que não foi observado nos animais que não receberam injeção de nanopartículas (grupo LED). Os componentes histológicos usuais, como a polpa branca e vermelha, mantiveram-se preservados em todos os grupos, incluindo aqueles eutanasiados aos 56 dias.



**Figura 61:** Aparência geral dos órgãos dos animais. A, C, E, G: Órgãos dos animais do grupo FHT (Fígado, Rim, Pulmão e Baço, respectivamente); B, D, F, H: Órgãos dos animais do grupo LED (Fígado, Rim, Pulmão e Baço, respectivamente). Setas pretas indicam presença de material sugestivo de aglomerados de nanopartículas no baço dos animais do grupo FHT. Barras = 200  $\mu$ m.

#### 9.4. Discussão

A temperatura desempenha um papel crucial na função reprodutiva masculina, conforme indicado por estudos anteriores que revelam efeitos na espermatogênese em resposta ao aumento da temperatura testicular (Fahim *et al.*, 1975; Setchell, 1998; Setchell, 2006; Zhao *et al.*, 2010). Os impactos do calor sobre a espermatogênese são conhecidos. Exemplo disso, a criptorquidia, caracterizada pela não descida dos testículos para o escroto e permanência na cavidade abdominal, resulta em esterilidade, pois a temperatura mais alta compromete a produção de espermatozoides, levando à infertilidade. A elevada temperatura afeta negativamente a espermatogênese, causando danos às células germinativas e, conseqüentemente, interferindo na capacidade de fertilização (Yavetz *et al.*, 1992; Nelson, 1995; Rizzoto & Kastelic, 2020). Alguns estudos já tentaram aproveitar esta característica para desenvolver métodos de promover a infertilidade em animais machos pela aplicação de calor nos testículos. Fahim *et al.* (1975) mostrou que diferentes fontes de calor, como a imersão em água a 60 °C resultou em uma significativa redução na produção de espermatozoides. O tratamento com infravermelho levou à ausência de espermatogênese em determinados túbulos seminíferos. A aplicação de micro-ondas a 100% de potência resultou na completa falta de espermatogênese, enquanto o ultrassom, especialmente quando aplicado duas vezes, demonstrou a ausência de estágios de espermatogênese. Os efeitos tiveram duração variável, de acordo com o tratamento, permanecendo de 30 dias a 10 meses. Da mesma forma, Patil *et al.* (2014) envolvendo imersões dos testículos em água a diferentes temperaturas (39°C, 41°C e 43°C) indicou mudanças significativas nos testículos dos ratos, incluindo alterações no peso, contagem de espermatozoides e morfologia espermática.

Mais recentemente, a hipertermia mediada por nanopartículas tem sido explorada como uma forma de promover o aquecimento localizado e controlado dos testículos, por meio da magnetohipertermia (Jivago *et al.*, 2021; Ding *et al.*, 2021) ou da fotohipertermia utilizando diferentes nanoestruturas (Li *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2015a; Liu *et al.*, 2015b;). Neste sentido, a uniformidade na distribuição do calor destaca-se como uma questão essencial para uma castração mais eficaz, atingindo as gônadas inteiramente. Nossos trabalhos anteriores (Capítulo 2 e Capítulo 3) mostraram que o uso de fotohipertermia mediada por nanopartículas com o uso de irradiação luminosa apenas por uma das superfícies dos testículos resulta em regiões em que os túbulos seminíferos permanecem intactos, possivelmente por falha na penetração da luz. O presente trabalho investigou o efeito da fotohipertermia testicular mediada por nanopartículas ativada por 2 LEDs, permitindo a penetração da luz pelas faces dorsal e ventral das gônadas.

Esta abordagem demonstrou ser eficaz na redução dos parâmetros espermáticos e na indução de danos progressivos aos túbulos seminíferos e à espermatogênese, por meio de um único procedimento, sem comprometer a saúde dos animais a curto prazo (56 dias).

A técnica de hipertermia aqui utilizada demonstrou eficácia ao elevar localmente a temperatura nos testículos, sendo bem tolerada pelos animais. As imagens térmicas destacaram o aquecimento específico na região testicular durante a fotohipertermia. Tanto no estudo de Jivago *et al.* (2021) quanto em Ding *et al.* (2021), a análise termográfica também revelou um aumento exclusivo na temperatura dos testículos, sem impacto na temperatura corporal dos animais.

O uso da fotohipertermia mostrou diminuição no peso e no volume testicular dos animais tratados ao longo do tempo. De maneira semelhante, outros trabalhos também relataram uma diminuição significativa nas medidas de comprimento e espessura, bem como no peso dos testículos após hipertermia testicular mediada por nanopartículas (Li, *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2015a, Liu *et al.*, 2015b, Jivago *et al.*, 2021; Ding *et al.*, 2021). Os testículos, sensíveis ao calor, podem ter sua espermatogênese afetada pela exposição prolongada a temperaturas elevadas, resultando em uma diminuição na produção de espermatozoides e, conseqüentemente, em uma redução no tamanho e peso testicular (Fahim *et al.*, 1975; Setchell, 1998; 2006; Zhao *et al.*, 2010). Além disso, a hipertermia pode causar danos às células germinativas, comprometendo a qualidade dos espermatozoides. Os parâmetros espermáticos, como motilidade espermática, porcentagem de espermatozoides com morfologia normal e número total de espermatozoides na cauda dos epidídimos, apresentaram redução significativa no grupo tratado com fotohipertermia, especialmente após 28 e 56 dias. A magnetohipertermia em camundongos demonstrou uma diminuição temporária nos espermatozoides, indicando uma contracepção masculina reversível, com os índices de fertilidade se recuperando após 60 dias (Ding *et al.*, 2021). Outros estudos que aplicaram hipertermia mediada por nanopartículas aos testículos não fizeram avaliação dos parâmetros espermáticos (Li, *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2015a, Liu *et al.*, 2015b, Jivago *et al.*, 2021).

A análise histológica dos testículos submetidos à fotohipertermia testicular revelou danos extensos, incluindo necrose coagulativa, perda de epitélio germinativo e intensa vacuolização, que foram se tornando mais graves ao longo do tempo. No grupo CNP, foram observados danos moderados, enquanto o grupo LED apresentou apenas leve vacuolização, indicando que apenas a aplicação das nanopartículas ou da luz não são suficientes para causar o efeito castrativo, ao contrário do que ocorre com a fotohipertermia (FHT). A vacuolização do

epitélio tubular, descrita por Creasy *et al.* (2013) em análises histológicas de animais com criptorquidismo, reforça os efeitos do calor na reprodução masculina. O estudo de Li *et al.* (2013) com uma única injeção intratesticular de nanorods de ouro em camundongos e laser de 808 nm em diferentes temperaturas provocou a completa degeneração das células espermatogênicas e completo desaparecimento de espermatozoides no epidídimo a 45° C. Em estudos utilizando laser de 980 nm, tanto com injeção intratesticular de nanocristais de sulfeto de cobre plasmônico quanto de nanofolhas de tungstênio em camundongos, houve fragmentação e degeneração, principalmente nas células de Sertoli, após duas semanas. No entanto, após sete semanas, os testículos diminuíram significativamente de tamanho, o que dificultou a análise, mas revelou a absorção de tecidos circundantes (Liu *et al.*, 2015a; Liu *et al.*, 2015b). Contudo, é importante ressaltar que esses estudos foram conduzidos em camundongos, os quais possuem testículos bem menores que os ratos. Para desenvolver um método que se pretende utilizar para castrar animais maiores, como cães e gatos, é crucial levar em consideração as dimensões dos testículos ao realizar os estudos.

Na magnetohipertermia em ratos, conforme observado por Jivago *et al.* (2021), a análise histológica revelou a substituição do tecido testicular por tecido conjuntivo. Vale destacar que a magnetohipertermia não apresenta barreiras de penetração, diferentemente das ondas luminosas da fotohipertermia. Nos Capítulos 2 e 3 deste estudo, a observação de túbulos seminíferos intactos, especialmente nas regiões periféricas dos testículos, sugere que a luz não alcança as nanopartículas na área oposta à irradiação do LED. Um LED de 808 nm tem a capacidade de penetrar cerca de 5 mm de profundidade da pele (Francisco *et al.*, 2021). A uniformidade nos danos histológicos no presente capítulo, com irradiação por 2 LEDs, pode ser interpretada como uma distribuição mais equitativa do efeito térmico nas áreas testiculares expostas à fotohipertermia.

Independente do material utilizado ou da via de administração, nanopartículas são capazes de penetrar nos tecidos através dos sistemas circulatório e linfático, podendo se acumular em órgãos vitais, como fígado, baço, pulmões e rins (De Jong *et al.* 2008; Singh & Lillard 2009; Dziendzikowska *et al.* 2012). Dessa maneira, a análise histopatológica desses órgãos desempenha um papel crucial em estudos relacionados a nanopartículas, proporcionando compreensão sobre a toxicidade em longo prazo. Em nossa pesquisa, conduzimos análises histológicas detalhadas desses órgãos em diferentes momentos, identificando a presença de material sugestivo de aglomerados de nanopartículas no baço aos 56 dias após a administração. Vale destacar que, mesmo com essa presença, a integridade

estrutural do órgão foi mantida, sem evidências de danos ou sinais de inflamação. O estudo conduzido por Jivago *et al.* (2021), envolvendo a injeção da mesma nanopartícula utilizada em nossa pesquisa apresentou resultados que corroboram com as análises histomorfológicas, indicando uma estrutura normal nos órgãos avaliados. A injeção intratesticular de nanocristais de sulfeto de cobre plasmônico e de nanofolhas de tungstênio não induziu danos nos tecidos conforme avaliação realizada após 7, 30 e 60 dias (Liu *et al.*, 2015a; Liu *et al.*, 2015b). Os resultados de Pham *et al.* (2018), ao analisar a biodistribuição e toxicidade de nanopartículas à base de óxido de ferro em camundongos, evidenciaram, através da análise histológica, que os sinais de inflamação são uma resposta normal à introdução de um corpo estranho no organismo dos animais. A resposta biológica à introdução de nanopartículas pode variar dependendo de vários fatores, incluindo o tipo de nanopartícula, a dose administrada, o local de administração e as características específicas do organismo estudado. A ausência de inflamação em nosso estudo pode ser vista como um sinal positivo de biocompatibilidade das nanopartículas.

### **9.5. Conclusão**

A aplicação da fototerapia mediada por nanopartículas de ferrita de manganês funcionalizada com citrato e dois LEDs resultou em efeitos prejudiciais significativos nos parâmetros reprodutivos de ratos machos a curto prazo (56 dias), indicando potencial para causar infertilidade após uma única aplicação. Os resultados foram mais homogêneos em comparação ao estudo com apenas um LED. No entanto, para uma avaliação completa, são necessários estudos de longo prazo, considerando aspectos como alterações em órgãos-alvo, efeitos sistêmicos, análises bioquímicas e hematológicas, além de outros indicadores de toxicidade. A compreensão dos efeitos das nanopartículas no organismo requer a realização de estudos a longo prazo.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Creasy, D. M., & Chapin, R. E. (2013). Male reproductive system. *Haschek and Rousseaux's handbook of Toxicologic pathology*, 2493-2598.
- De Jong, W. H., Hagens, W. I., Krystek, P., Burger, M. C., Sips, A. J., & Geertsma, R. E. (2008). Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials*, 29(12), 1912-1919.
- Ding, W., Chen, Z., Gu, Y., Chen, Z., Zheng, Y., & Sun, F. (2021). Magnetic testis targeting and magnetic hyperthermia for noninvasive, controllable male contraception via intravenous administration. *Nano Letters*, 21(14), 6289-6297.
- Dziendzikowska, K., Gromadzka-Ostrowska, J., Lankoff, A., Oczkowski, M., Krawczyńska, A., Chwastowska, J., ... & Kruszewski, M. (2012). Time-dependent biodistribution and excretion of silver nanoparticles in male Wistar rats. *Journal of Applied Toxicology*, 32(11), 920-928.
- Fahim, M. S., Fahim, Z., Der, R., Hall, D. G., & Harman, J. (1975). Heat in male contraception (hot water 60° C, infrared, microwave, and ultrasound). *Contraception*, 11(5), 549-562.
- Francisco, M. D., Chen, W. F., Pan, C. T., Lin, M. C., Wen, Z. H., Liao, C. F., & Shiue, Y. L. (2021). Competitive real-time near infrared (NIR) vein finder imaging device to improve peripheral subcutaneous vein selection in venipuncture for clinical laboratory testing. *Micromachines*, 12(4), 373.
- Jivago, J. L. P., Brito, J. L. M., Capistrano, G., Vinícius-Araújo, M., Lima Verde, E., Bakuzis, A. F., ... & Lucci, C. M. (2021). New prospects in neutering male animals using magnetic nanoparticle hyperthermia. *Pharmaceutics*, 13(9), 1465.
- Li, W. Q., Sun, C. Y., Wang, F., Wang, Y. C., Zhai, Y. W., Liang, M., ... & Sun, F. (2013). Achieving a new controllable male contraception by the photothermal effect of gold nanorods. *Nano letters*, 13(6), 2477-2484.
- Liu, Z., Liu, X., Du, Y., Ren, J., & Qu, X. (2015b). Using plasmonic copper sulfide nanocrystals as smart light-driven sterilants. *ACS nano*, 9(10), 10335-10346.
- Liu, Z., Liu, X., Ran, X., Ju, E., Ren, J., & Qu, X. (2015a). Single-layer tungsten oxide as intelligent photo-responsive nanoagents for permanent male sterilization. *Biomaterials*, 69, 56-64.
- Nelson, W. O. (1951). Mammalian spermatogenesis: effects of experimental cryptorchidism in the rat and non-descent of the testis in man. *Recent Prog Horm Res*, 6, 29-62.

- Patil, S. S., Patil, A. B., Patil, M. M., Nikam, P. B., Mahadik, Y. M., Londhe, S. R., & Kamble, N. A. (2014). Testicular hyperthermia in *Rattus norvegicus*: focus on gamatocytic alterations. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 3(6), 93-103.
- Pham, B. T., Colvin, E. K., Pham, N. T., Kim, B. J., Fuller, E. S., Moon, E. A., ... & Hawkett, B. S. (2018). Biodistribution and clearance of stable superparamagnetic maghemite iron oxide nanoparticles in mice following intraperitoneal administration. *International journal of molecular sciences*, 19(1), 205.
- Rizzoto, G., & Kastelic, J. P. (2020). A new paradigm regarding testicular thermoregulation in ruminants. *Theriogenology*, 147, 166-175.
- Setchell, B. P. (1998). The parkes lecture heat and the testis. *Reproduction*, 114(2), 179-194.
- Setchell, B. P. (2006). The effects of heat on the testis of mammals. *International Symposium on Animal Biology of Reproduction*. 3(2): 81-91.
- Singh, R., Singh, S., Sharma, P. K., & Lillard Jr, J. W. (2009). T regulatory and prostate cancer cell-specific drug targeting using novel XPclad© nanoparticles (42.7). *The Journal of Immunology*, 182(1\_Supplement), 42-7.
- Yavetz, H., Harash, B., Paz, G., Yogev, L., Jaffa, A. J., Lessing, J. B., & Homonnai, Z. T. (1992). Cryptorchidism: incidence and sperm quality in infertile men. *Andrologia*, 24(5), 293-297.
- Zhao, J., Zhang, Y., Hao, L., Wang, J., Zhang, J., Liu, S., & Ren, B. (2010). Effects of a mild heat treatment on mouse testicular gene expression and sperm quality. *Animal cells and systems*, 14(4), 267-274.

## 11. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica de fototerapia utilizando LED de 808 nm em conjunto com nanopartículas de ouro demonstrou redução dos parâmetros espermáticos a curto prazo (56 dias), levando à indução de subfertilidade em ratos. Essa eficácia foi evidenciada pela degeneração das células germinativas e impacto na espermatogênese. Notavelmente, a abordagem mostrou-se segura, sem provocar efeitos adversos imediatos à saúde dos animais.

Por outro lado, a fototerapia testicular empregando nanopartículas de ferrita de manganês funcionalizadas com citrato resultou em danos severos na histologia testicular. No entanto, essa lesão não foi uniforme em todo o testículo, indicando uma região periférica intacta mesmo na presença aparente de nanopartículas. Essa observação ressaltou a necessidade premente de aprimorar a distribuição térmica nos testículos para garantir resultados mais uniformes.

Dessa forma, a fototerapia testicular utilizando dois LEDs resultou em efeitos prejudiciais significativos nos parâmetros reprodutivos dos ratos machos a curto prazo (56 dias), sugerindo um possível efeito irreversível com apenas uma aplicação, mostrando resultados mais homogêneos quando comparados à aplicação com um único LED.

O estudo demonstrou que a aplicação de fototerapia mediada por nanopartículas diretamente aos testículos pode ser uma opção promissora como método de contracepção para animais errantes. No entanto, a necessidade de estudos de longo prazo é destacada para avaliar não apenas a irreversibilidade, mas também de possíveis efeitos adversos tardios, proporcionando uma compreensão mais completa da segurança e eficácia dessa estratégia contraceptiva.