

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Escola de Veterinária  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária

**ESTERILIZAÇÃO DE CÃES COM INJEÇÃO INTRATESTICULAR  
DE SOLUÇÃO À BASE DE ZINCO**

**ERIKA CHRISTINA SANTOS OLIVEIRA**

MINAS GERAIS  
BELO HORIZONTE

2007

**ERIKA CHRISTINA SANTOS OLIVEIRA**

**ESTERILIZAÇÃO DE CÃES COM INJEÇÃO INTRATESTICULAR  
DE SOLUÇÃO À BASE DE ZINCO**

Tese apresentada à Escola de Veterinária da  
Universidade Federal de Minas Gerais como requisito  
parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência  
Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal

Orientador: Prof. Antônio de Pinho Marques Jr.

Co-orientador: Prof. Valdemiro Amaro da Silva Jr.

Belo Horizonte

Escola de Veterinária - UFMG

2007

Ficha catalográfica

Assinatura da banca



*“Pensar é aprender a ser livre, responsável e honrado. Pensar é esforço e inconformismo, para com o mundo e também para consigo mesmo. Pensar é duvidar e criticar, não de forma altaneira ou presunçosa, senão por desejo do bem comum. Pensar não é repetir ou reproduzir. Pensar é ativar o que de nobre há no ser humano, porque pensar é também sentir e intuir. A frase de Descartes não é de toda certa: não se trata de “penso, logo existo”, mas penso, logo vivo. Viver é encontrar seu próprio caminho e evitar permanentemente a tentação do fácil. O fácil é não pensar”.*

*(Nora K. e Vittorio Hösle. El café de los filósofos muertos. Madrid, 1998)*



## **Dedico**

*Aos meus pais José Alencar (in memorian) e Roseana, pelo apoio incondicional, amor, carinho e atenção, em todos os momentos da minha vida. Amo muito vocês!*

*Ao meu esposo Marcelo Sá, por me mostrar como a vida pode ser intensa... E tranqüila.*





**Ofereço**

*Ao Professor Pinho, orientador e amigo, por  
ter acreditado em mim.*



## AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível graças à colaboração direta ou indireta de muitas pessoas. Manifesto minha gratidão a todas elas, e de forma particular:

À Deus, por estar sempre ao meu lado.

Ao admirável Professor Antônio de Pinho Marques Jr, que me acolheu de braços abertos, pelo exemplo de vida e conduta científica e, principalmente, pelos ensinamentos preciosos que levarei comigo. Nossa convivência representou para mim um grande aprendizado profissional e pessoal.

Ao meu esposo Marcelo Sá, pela imprescindível colaboração, fundamental no desenvolvimento e viabilização deste trabalho, pelo seu amor e por compreender os momentos de distância...

A minha amiga Maria Raquel Moura, pela amizade sincera, apoio incondicional, por ter aberto as portas da sua casa e ter possibilitado o convívio com sua família. Por ter me adotado quando virei uma “sem-teto”... E, particularmente com relação à tese, pela motivação inestimável, paciência e ajuda que foram fundamentais durante todo o tempo.

Ao Professor Valdemiro Amaro da Silva Jr, do DMFA/UFRPE, pela co-orientação, por ter possibilitado a realização das análises morfológicas no Laboratório de Histologia da UFRPE e, acima de tudo, por ter acreditado em mim e ter tido a paciência (muitas vezes testada ao extremo!) em me auxiliar a superar obstáculos e limitações que encontramos no decorrer desta jornada.

Ao Dr Robert H. Douglas, do B.E.T. Labs, pela concessão da solução de zinco, pelas sugestões valiosas durante a realização deste trabalho e pelo auxílio com as dosagens hormonais.

Ao Professor Helio Chiarinni-Garcia, do ICB-UFMG, pelo espírito científico e crítico e pela atenção e solicitude dispensadas em vários momentos durante a realização deste trabalho.

À Professora Christina Malm, às enfermeiras Amendorina e Mônica e aos residentes Fabíola, Oscar, Érika e Sabrina, do HV-UFGM, e ao Evandro, estagiário do Setor de Reprodução Animal, pela colaboração na execução deste trabalho junto ao bloco cirúrgico.

À Dra. Christina Peixoto, do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-Fiocruz, pela gentileza em ter possibilitado a realização dos procedimentos de microscopia eletrônica, pelo interesse em ajudar a interpretar alguns dados e, acima de tudo, pela amizade que nasceu, fruto de momentos de trabalho, e que espero que não termine aqui.

À Professora Maria Madalena Pessoa Guerra, do DCV-UFRPE, pela gentileza em ter possibilitado a realização dos espermogramas no Laboratório de Andrologia da UFRPE, e aos monitores José Lopes Junior e Pedro Augusto Lima, pela ajuda na realização dos mesmos.

À Karla Patrícia Oliveira Esquerre, minha irmã querida, pela confecção dos gráficos presentes neste trabalho.

Ao Professor Marc Henry, a quem admiro muito, pelo espírito crítico e científico, que foi fundamental para meu crescimento profissional.

A todos os professores do Setor de Reprodução Animal da EV-UFGM, que contribuíram para o meu desempenho acadêmico.

Aos meus pais Alencar (*in memoriam*) e Roseana, e aos meus irmãos, Karla, Roseline, Diego e Pollyanna, que apesar da distância, sempre me apoiaram e incentivaram em todos os momentos da minha vida. Vocês sempre estarão em meu coração.

Ao Sr João Chumbinho, pela amizade incondicional, apoio e carinho e por estar sempre pronto a ajudar

Ao amigo e padrinho Marcelo Teixeira, pelo convívio harmonioso e conselhos sempre pertinentes.

Às amigas Carol, Lu, Aninha, Vanessa e Renata, pelos momentos de descontração na “Casa do Seu João”.

Ao amigo Geraldo Juliani, pela amizade, bate-papos, desabafos e risadas.

Aos colegas de pós-graduação, Alexandre Ramos, Carlos Zurita, Jair Perez, Marcio Gianordoli, Sergio Arias, Fabrízia Cury, Adriana, Bruna e Fabiana Varago, pelos momentos felizes.

A Eliane e Nilda, da Secretaria de Pós-graduação da EV-UFMG, pela simpatia e disponibilidade sempre.

Ao Dário, Ronaldo, Messias, Liu, Tião, Pedro e demais funcionários da EV-UFMG, pelo auxílio em vários momentos da execução deste trabalho.

Ao Fábio, Édem e Gilmar, pelo carinho e atenção.

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida.

A UFMG, por ter-me feito sentir realmente em casa...

*O meu muito obrigado!*

## SUMÁRIO

RESUMO .....	19
ABSTRACT .....	19
1. INTRODUÇÃO .....	21
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1. O testículo.....	21
2.2. O estabelecimento da espermatogênese .....	22
2.2.1. <i>Estádios do ciclo do epitélio seminífero</i> .....	22
2.2.2. <i>As células de Sertoli</i> .....	23
2.2.3. <i>As células de Leydig</i> .....	23
2.2.4. <i>Quantificação da espermatogênese</i> .....	24
2.3. Controle endócrino da espermatogênese .....	24
2.4. Avaliação do comportamento sexual do macho canino .....	26
2.5. Controle da fertilidade do macho.....	27
2.5.1. <i>Esterilização cirúrgica</i> .....	27
2.5.2. <i>Esterilização química</i> .....	27
2.6. Efeitos do zinco na reprodução do macho.....	28
2.7. O zinco como agente esterilizante.....	28
2.8. Cinética e dinâmica do zinco .....	30
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1. Composição da solução à base de zinco.....	30
3.2. Animais .....	30
3.3. Injeção intratesticular de gluconato de zinco.....	31
3.4. Avaliação clínica.....	33
3.5. Avaliação bioquímica e das funções renal e hepática .....	33
3.6. Coleta e avaliação de sêmen .....	33
3.7. Determinação da concentração de testosterona .....	33
3.8. Avaliação do comportamento sexual do animal .....	33
3.9. Colheita, preservação e processamento histológico e ultra-estrutura dos testículos e epidídimos.....	34

3.10. Análise morfométrica dos testículos .....	34
3.10.1. Diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero.....	34
3.10.2. Proporção volumétrica e volume dos diferentes componentes do testículo .....	34
3.10.3. População de células espermatogênicas e de células de Sertoli no estágio V do ciclo do epitélio seminífero, por secção transversal de túbulo seminífero. ....	35
3.10.4. Razão entre os tipos celulares.....	35
4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE DOS RESULTADOS .....	36
5. RESULTADOS .....	36
5.1. Avaliação clínica.....	36
5.2. Avaliação bioquímica.....	36
5.3. Avaliação do sêmen.....	37
5.4. Avaliação hormonal.....	37
5.5. Diâmetro testicular.....	38
5.6. Avaliação histológica.....	38
5.6.1. Microscopia de luz.....	38
5.6.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	38
5.7. Análises morfométricas dos testículos.....	56
5.7.1. Peso testicular e epididimário. ....	56
5.7.2. Altura do epitélio e diâmetro tubular.....	56
5.7.3. Contagem celular.....	56
5.7.4. Proporção volumétrica.....	56
6. DISCUSSÃO .....	56
7. CONCLUSÕES .....	62
8. PERSPECTIVAS .....	62
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	63
10. ANEXO.....	67



### LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Volume da solução à base de zinco injetada no testículo dos cães segundo o diâmetro testicular dos mesmos.....	32
Tabela 2.	Comportamento sexual dos cães quando em contato com fêmea em estro.....	33

### LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Controle endócrino da reprodução no macho.....	25
Figura 2.	Cão, SRD, em decúbito dorsal para administração intratesticular da solução à base de zinco.....	32
Figura 3.	Local da injeção intratesticular da solução à base de zinco em cão.....	32
Figura 4.	<b>A.</b> Epitélio seminífero de cão do grupo controle. Notar células de Sertoli (CS) e espermatócitos I em pré-leptóteno/leptóteno (PI) próximo à lâmina (seta) basal. Observar espermatócitos I em paquíteno (Pq) seguidos por espermátides arredondadas (Ar). <b>B</b> – Túbulo seminífero no estágio V do ciclo do epitélio seminífero e espaço intertubular. Células de Sertoli (cabeça de seta) e espermatócitos I em pré-leptóteno/leptóteno (PI) e espermatogônia B (B) próximo à lâmina basal (seta). Observar no espaço intertubular células de Leydig (CL) próximas ao espaço linfático (EL). Barras: 25µm.....	40
Figura 5.	Testículo de cão 150 dias após a injeção intratesticular de solução à base de zinco. <b>A</b> – Área de fibrose com intensa proliferação fibroblástica (cabeça de seta), túbulos atrofiados (seta) e deposição de colágeno no intertúbulo. Barra: 25µm. <b>B</b> – Área de mediastino testicular. Notar a presença de túbulos retos (TR) e de componentes da rede testicular ao lado de túbulos seminíferos em vários estágios de atrofia (TS). Barra: 25µm. <b>C</b> – Detalhe de túbulos retos (TR) próximo ao túbulo seminífero (TS). Notar células germinativas descamadas (CG). Barra: 100µm .....	42
Figura 6.	Testículo de cão 150 dias após a injeção intratesticular de solução à base de zinco. <b>A</b> – Graus variáveis de alterações no epitélio seminífero são observados nas seções transversais de túbulos seminíferos. Notar túbulos seminíferos com células germinativas descamadas no lume (T1), vacuolização de células de Sertoli (T2) e número reduzido de células germinativas (T3). <b>B</b> – Túbulos seminíferos com presença de vacuolização de células de Sertoli (estrela), necrose de espermatócito I em paquíteno (seta) e ausência de espermátides arredondadas. <b>C</b> – Túbulo seminífero com presença de células gigantes multinucleadas (S), necrose (N) de espermátides arredondadas e descamação de espermátides no lúmen (Ar). <b>D</b> – Detalhe do túbulo seminífero com presença de descamação de células necróticas no lume (seta) e vacuolização de células de Sertoli (estrela). Barras: 25µm.....	44
Figura 7.	Achados histológicos em testículos de cães 150 dias após a injeção intratesticular de solução à base de zinco. <b>A</b> – Notar túbulos seminíferos com presença de células de Sertoli apenas (CS) e espaço intertubular mostrando células de Leydig com citoplasma vacuolizado que sugere degeneração lipídica (seta). <b>B</b> – Detalhe do espaço intertubular mostrando células de Leydig (seta) em vários graus de morte celular por necrose <b>C</b> – Detalhe de células de Leydig em processo de esteatose. Notar vacúolos (seta pequena), núcleo mostrando opacidade e ausência de nucléolo que indica um processo de cariólise (seta grande). Barras: 25µm.....	46
Figura 8.	Achados histológicos em epidídimos de cães. <b>A</b> - Detalhe do ducto epididimário de cão do grupo controle. Notar epitélio de revestimento característico (setas). Abaixo do epitélio presença de camada muscular lisa (cabeças de seta). Lúmen contendo espermatozóides (asterisco). <b>B</b> - Detalhe do ducto epididimário de cão do grupo tratado. Notar epitélio de revestimento com espessura normal (setas) e ausência de espermatozóides no lúmen (asterisco)400X.....	48
Figura 9.	Micrografias eletrônicas de testículo de cães do grupo controle. <b>A</b> – Duas células de Sertoli (CS) próximas a lâmina basal do túbulo seminífero, uma contendo nucléolo	

- distinto (Nu). Notar a endentação do envelope nuclear (seta). **B** – Espermátides arredondadas (Ar) mostrando eurocromatina esparsa (estrela). **C** – Citoplasma de célula de Sertoli com presença de mitocôndrias (asterisco) e espermátides alongadas (Ea). **D** – Espaço intertubular mostrando núcleo de célula de Leydig com nucléolo evidente (Nu) e heterocromatina periférica associada com o envelope nuclear (seta). Observe também a presença de retículo endoplasmático rugoso (cabeça de seta) e mitocôndrias (asterisco). Barras: 0,5µm..... 50
- Figura 10. Ultraestrutura do túbulo seminífero de cão, 150 dias após injeção intratesticular de solução à base de zinco **A** – Célula de Sertoli em degeneração (CS). Notar vacuolização de célula de Sertoli (V) e várias mitocôndrias com ausência de matriz (asterisco). Observar presença de corpos lisossomais na célula circunvizinha (L). **B** – Detalhe de componentes do citoplasma de espermátides alongadas (Ea) mostrando retículo endoplasmático liso (setas) e mitocôndrias em processo de degeneração (asterisco). Notar necrose celular (Ne). **C** – Detalhe de componentes de espermátides alongadas (Ea). Notar presença de autofagossomos (setas) e corpos residuais (cabeças de seta). **D** – Detalhe de espermátide alongada mostrando vários aparelhos de Golgi (setas) e corpos de mielina (estrela). **E** – Espermátide em fase de Golgi mostrando vacuolização do aparelho de Golgi e mitocôndrias degeneradas (asteriscos). **F** – Espermátide arredondada mostrando lise da vesícula acrossomal (seta). Barras: 1,0µm..... 52
- Figura 11. Micrografias eletrônicas do espaço intertubular, 150 dias após injeção intratesticular de solução à base de zinco. **A** – Célula de Leydig (CL) em processo de necrose caracterizada pela presença de mitocôndrias com ausência de matriz (asterisco), corpos lisossomais (L) e autofagossomos (cabeça de seta). O núcleo contém estruturas vacuolares (seta) e o nucléolo mostra condensação de cromatina (C). **B** – Célula de Leydig em estágio avançado de necrose celular mostrando retículo endoplasmático liso (asterisco) edemaciado e hiperplasiado. Notar mitocôndrias com presença de corpos de mielina no seu interior (setas). **C** – Detalhe do retículo endoplasmático liso (asterisco) com edema e vacuolização, autofagossomos (seta) e mitocôndrias (asterisco). Barras: 0,5µm..... 54
-

---

**ANEXO**

---

Tabela 3.	Valores referentes ao hemograma de cães SRD, controle e tratados com injeção intratesticular de solução à base de zinco (Média e desvio padrão).....	68
Tabela 4.	Valores bioquímicos referentes à função hepática de cães SRD, controle e tratados com injeção intratesticular de solução à base de zinco (Média e desvio padrão).....	71
Tabela 5.	Valores bioquímicos referentes à função renal de cães SRD, controle e tratados com injeção intratesticular de solução à base de zinco (Média e desvio padrão).....	73
Tabela 6.	Valores bioquímicos referentes à concentração sérica de fibrinogênio de cães SRD, controle e tratados com injeção intratesticular de solução à base de zinco (Média e desvio padrão).....	74
Tabela 7.	Análise do sêmen ao final de 150 dias após a injeção intratesticular de solução à base de zinco.....	74
Tabela 8.	Concentração espermática de cães SRD, controle e tratados com injeção intratesticular de solução à base de zinco (Média e desvio padrão).....	75
Figura 12.	Média da concentração espermática de cães SRD, controle e tratados com injeção intratesticular de solução à base de zinco segundo o grupo e o tempo de avaliação.....	76
Tabela 9.	Motilidade espermática de cães SRD, controle e tratados com injeção intratesticular de solução à base de zinco (Média e desvio padrão).....	77
Figura 13.	Média da motilidade espermática (%) de cães SRD, controle e tratados com injeção intratesticular de solução à base de zinco segundo o grupo e o tempo de avaliação.....	78
Tabela 10.	Percentual de espermatozóides morfolologicamente normais de cães SRD, controle e tratados com injeção intratesticular de solução à base de zinco (Média e desvio padrão).....	79
Figura 14.	Média do percentual de espermatozóides morfolologicamente normais de cães SRD, controle e tratados com injeção intratesticular de solução à base de zinco.....	80
Tabela 11.	Volume ejaculado de cães SRD, controle e tratados com injeção intratesticular de solução à base de zinco (Média e desvio padrão).....	81
Figura 15.	Média do volume ejaculado (ml) de cães SRD, controle e tratados com injeção intratesticular de solução à base de zinco.....	82
Tabela 12.	Concentração de testosterona plasmática de cães SRD, controle e tratados com injeção intratesticular de solução à base de zinco (Média e desvio padrão).....	83
Figura 16.	Média da concentração de testosterona plasmática de cães SRD, controle e tratados com injeção intratesticular de solução à base de zinco.....	84
Tabela 13.	Diâmetro testicular direito de cães SRD, controle e tratados com injeção intratesticular de solução à base de zinco (Média e desvio padrão).....	85
Tabela 14.	Diâmetro testicular esquerdo de cães SRD, controle e tratados com injeção intratesticular de solução à base de zinco (Média e desvio padrão).....	86
Figura 17.	Média do diâmetro testicular (a) direito (mm) e (b) esquerdo (mm) de cães SRD, controle e tratados com injeção intratesticular de solução à base de zinco.....	87
Tabela 15.	Diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero de túbulos seminíferos no estágio V do ciclo do epitélio seminífero, em cães SRD, controles e tratados com injeção intratesticular de solução à base de zinco (Média e desvio padrão).....	88
Tabela 16.	População celular corrigida por secção transversal de túbulo seminífero no estágio V do ciclo do epitélio seminífero, em cães SRD, controles e tratados com injeção intratesticular de solução à base de zinco (Média e desvio padrão).....	88
Tabela 17.	Proporção volumétrica dos componentes testiculares em cães SRD, controles e tratados com injeção intratesticular de solução à base de zinco (Média e desvio padrão).....	89

---

## RESUMO

Este trabalho teve o propósito de caracterizar o efeito de uma única injeção intratesticular de uma solução à base de zinco na esterilização de cães de diferentes idades. Foram utilizados 15 cães (5 cães/grupo). O grupo controle recebeu injeções intratesticulares de solução salina. O Grupo 2 foi formado por animais entre 8 meses até 1,5 anos de idade e o Grupo 3, por animais de mais de 2 até 4 anos de idade, que receberam injeções intratesticulares de zinco em seis diferentes doses (0,2 a 1,0ml), segundo o diâmetro testicular do animal (10 a 27mm). Não foi observada reação de mordedura/lambedura, nem reação de dor à palpação dos testículos, embora os animais tenham apresentado aumento de temperatura escrotal e do volume testicular, que desapareceram 24h e 72h após a injeção, respectivamente. Os testículos diminuíram 8% de tamanho um mês após a injeção de zinco ( $p < 0,05$ ). Aos 60 dias, 8 animais encontravam-se azoospermicos e 2 oligospermicos ( $< 10 \times 10^6$  espermatozoides/ml). Não houve diferença significativa para os parâmetros bioquímicos e concentração de testosterona. Não houve alteração do comportamento dos animais. À avaliação histológica dos testículos do grupo tratado constatou-se degeneração, vacuolização e redução do número de células germinativas em túbulos seminíferos atróficos, que continham apenas células de Sertoli vacuolizadas. As células de Leydig apresentaram vários graus de degeneração lipídica e necrose. À avaliação ultraestrutural, foi observada degeneração das células de Sertoli e de Leydig caracterizadas pela presença de mitocôndrias sem matriz, autofagossomos e aglomerado de lisossomos. O citoplasma das espermátides alongadas continha túbulos de retículo endoplasmático liso hiperplásicos e hipertrofiadas e aparelhos de Golgi. Espermátides arredondadas apresentaram ruptura da vesícula acrossomal. Os resultados indicaram que a solução à base de zinco foi eficaz em bloquear a espermatogênese de cães de diferentes idades.

*Palavras-chaves:* Zinco, Esterilização, Testículo, Cão

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the efficacy of a single intratesticular injection of a zinc-based solution in causing sterility of male dogs. Fifteen mongrel dogs were randomized into 3 groups (5dogs/group). Group one, the control, was injected with saline solution. Group two, which consisted of animals ranging from 8 months to 1,5 years old and Group 3, animals ranging from 2 to 4 year old, were injected with a zinc-based solution, at six different doses (0.2 to 1.0mL), based on testicular width (10 to 27mm), determined by a caliper. No biting/licking was recorded after the injection in the treated animals. Transient testicular swelling was reported in the treated animals in the first three days after injection. Scrotal pain when the testis were manipulated was not observed in any animal of either group. By one month, the testicles in the treated animals decreased 8% in size ( $p < 0.05$ ). At 60 days post-injection, 8 of 10 of the treated animals were azoospermic. The two non azoospermic dogs (Group 3) were found to be oligospermic ( $< 10 \times 10^6$  spermatozoa/ml). There were no significant differences between treated and control groups for the biochemical parameters and testosterone concentration. Histological examination of treated groups revealed degeneration and decreased number of germ cells, vacuolation of germ cells in atrophic seminiferous tubules. Leydig cells showed different degree of lipid degeneration and necrosis. The majority of the seminiferous tubules in all dogs were lined only by Sertoli cells, which were vacuolated. Ultrastructure of testis of treated groups showed degenerated Sertoli and Leydig cells characterized by numerous mitochondria with lack of a matrix and agglomeration of lysosomal bodies. Elongated spermatids cytoplasm was characterized by tubules of hyperplasiated and hypertrophied smooth endoplasmic reticulum and numerous Golgi apparatus. Round spermatids in Golgi phase showed lyses of acrosomal vesicle. The results indicated that intratesticular injection of zinc-based solution was effective in impair spermatogenesis of dogs of different ages.

*Keywords:* Zinc, Sterilization, Testis, Dog



## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos métodos de prevenção ou interrupção do ciclo reprodutivo têm sido descritos para o controle populacional de cães. As medidas de controle incluem cirurgia, terapia hormonal e, mais recentemente, controle imunológico e químico (Concannon, 1995). Observa-se que a preocupação principal está relacionada ao controle da fêmea, e pouco se tem estudado quanto à esterilização do macho. Entretanto, cada macho intacto é um reprodutor em potencial. A esterilização de um grande número de machos contribui para o decréscimo do número de fêmeas gestantes.

A castração do macho é importante não apenas para o controle de coberturas indesejadas, mas também pela diminuição do comportamento característico, tais como monta, demarcação pela urina e agressividade. Muitas pesquisas têm sido realizadas na tentativa de tornar os métodos de esterilização mais acessíveis para a população a fim de reduzir o número de cães que sofrem eutanásia todos os anos. As cirurgias tradicionais requerem tempo, têm custo elevado, além de serem inconvenientes para o proprietário que precisa submeter seu animal a um procedimento cirúrgico, e ainda, traumáticas para o animal. A contracepção medicamentosa requer administração contínua do medicamento/tratamento uma vez que o animal não perde a capacidade de reproduzir, além de requerer atenção contínua do proprietário. Técnicas menos invasivas têm sido estudadas, tais como a utilização de agentes esclerosantes no testículo ou epidídimo (Fayrer-Hosken *et al.*, 2000). A esterilização química tem sido reportada por vários autores (Pineda *et al.*, 1977; Fahim *et al.*, 1993; Immegart e Threlfall, 2000; Wang, 2002).

Pesquisas que envolvem esterilização química de machos são restritas, e um dos fatores está relacionado aos resultados obtidos com a maioria dos agentes esclerosantes, que não resultam em azoospermia e causam irritação ou ulceração do escroto (Fahim *et al.*, 1993). O zinco tem pH neutro e faz parte da composição do plasma seminal e dos tecidos do trato reprodutor masculino. Além disso, o plasma seminal e os tecidos desta região contêm uma concentração de zinco maior que em qualquer outro órgão (Fahim *et al.*, 1993). Em baixas concentrações, o zinco é importante para a espermatogênese (incorpora-se

ao flagelo das espermátides alongadas e também é encontrado nas fibras densas externas) (Fahim *et al.*, 1993), mas em concentrações elevadas inibe a divisão e replicação das células germinativas e causa fragmentação da membrana celular e do núcleo (Fahim *et al.*, 1993; Bloomberg, 1996). Há relatos na literatura sobre a utilização de injeção intratesticular de gluconato de zinco em cães. Entretanto, estes estudos foram restritos a animais jovens e o perfil hormonal e avaliação histológica do testículo e epidídimo não foram descritos de maneira detalhada (Wang, 2002).

Recentemente, um novo agente esclerosante à base de zinco foi desenvolvido para ser utilizado na esterilização de machos caninos por meio de injeção intratesticular.

Este trabalho foi realizado com o propósito de testar a seguinte hipótese:

A injeção intratesticular de uma solução à base de zinco é eficaz na esterilização do cão púbere e adulto.

Por meio dos seguintes objetivos:

1. Determinar as características seminais de cães submetidos à injeção intratesticular de uma solução à base de zinco.
2. Determinar se a produção do hormônio testosterona é afetada em cães submetidos à injeção de uma solução à base de zinco.
3. Descrever os aspectos histológicos do testículo e epidídimo de cães submetidos à injeção intratesticular de uma solução à base de zinco.
4. Caracterizar o comportamento sexual de cães submetidos à injeção intratesticular de uma solução à base de zinco
5. Caracterizar o perfil bioquímico de cães submetidos à injeção intratesticular de uma solução à base de zinco

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. O testículo

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

## 2.2. O estabelecimento da espermatogênese

A espermatogênese é um complexo e bem organizado processo, que dura em média de 30 a 75 dias na maioria dos mamíferos estudados (França e Russel, 1998). No cão a espermatogênese tem a duração de 54 a 62 dias (Jonhston, 1991; Jonhston *et al.*, 2001). Envolve três classes de células germinativas: as espermatogônias, os espermatócitos e as espermátides e pode ser dividida em três fases distintas: a mitótica ou espermatogonial (ou ainda proliferativa), a meiótica e a espermiogênese ou fase de diferenciação. A fase espermatogonial é caracterizada pela divisão mitótica em série das espermatogônias primordiais. Quatro gerações sucessivas de espermatogônias do tipo A ( $A_1 - A_4$ ) são originadas. Algumas ficam responsáveis pela renovação celular e dão continuidade à linhagem de espermatogônias primordiais, garantindo o aspecto reprodutivo do macho adulto (Johnston, 1991). Outras se transformam em espermatogônias do tipo B, que por sua vez, sofrem divisão mitótica para gerar os espermatócitos primários. Este estágio celular dá origem à espermatocitogênese, que é caracterizada por duas divisões meióticas sucessivas dos espermatócitos primários, também chamados de pré-leptótenos. Durante a 1ª divisão celular por meiose, os espermatócitos primários seguem os estágios da prófase (leptóteno, zigóteno, paquíteno, diplóteno e diacinese) e de metáfase,

anáfase e telófase. Os produtos finais dessa divisão são os espermatócitos secundários, células haplóides que se dividem novamente e dão origem às células conhecidas como espermátides. A metamorfose das espermátides em espermatozoides constitui o processo final da espermatogênese, conhecido como espermiogênese. Ao final da diferenciação morfológica, os espermatozoides atingem o lúmen dos túbulos seminíferos e através da rede testicular e dos ductos deferentes chegam até o canal epididimário, de onde seguem para maturação e armazenamento na cauda do epidídimo (Hafez e Hafez, 2004). Kawakami *et al* (1991) observaram espermatócitos e espermátides nos túbulos seminíferos de cães da raça Beagle com idades entre 20 e 22 semanas, respectivamente. A espermatogênese completa foi comprovada às 32 semanas de idade, quando os mesmos autores verificaram um grande número de espermatozoides nos epidídimos de cães submetidos à avaliação histológica. Segundo Foote *et al.* (1972), a vida útil de um espermatócito primário no cão é de 20,9 dias, enquanto a de um espermatócito secundário não ultrapassa 0,5 dia, e as espermátides têm uma vida útil de 21,1 dias.

O trânsito epididimário leva mais 8-14 dias. O intervalo entre o estágio mais sensível - prófase meiótica - e a ejaculação é de, aproximadamente, 30 dias. Assim, o intervalo entre uma injúria causada no testículo e o surgimento de espermatozoides anormais no ejaculado é geralmente de 30 a 60 dias, dependendo do sítio da injúria (Arthur *et al.*, 2001).

### 2.2.1. Estádios do ciclo do epitélio seminífero

O ciclo do epitélio seminífero (CES) em um dado segmento pode ser definido como o período do desaparecimento de um determinado estágio até o seu reaparecimento neste mesmo segmento (Leblond e Clermont, 1952). A duração do ciclo do epitélio seminífero é geralmente constante para uma determinada espécie, variando, no entanto de uma espécie para outra (Russel *et al.*, 1990a). Este intervalo dura 13, 6 dias no cão (Foote *et al.*, 1972). Geralmente são necessários quatro a cinco ciclos para que o processo espermatogênico se complete, ou seja, para que haja liberação dos espermatozoides no lúmen do

túbulo seminífero a partir de uma espermatogônia A1 (França e Russel, 1998).

Considera-se uma associação celular ou estágio do CES como sendo um conjunto definido de gerações de células germinativas encontrado, em determinado momento, num túbulo seminífero seccionado transversalmente (Leblond e Clermont, 1952). A identificação dos diferentes estádios do ciclo do epitélio seminífero é essencial para a realização de estudos quantitativos da espermatogênese, sendo importante para a compreensão da espermatogênese normal, bem como para a determinação de fases específicas do processo que possam ser afetadas por um determinado tratamento ou droga (Berndtson, 1977).

No cão, o CES é dividido em oito estádios, de acordo com o método da morfologia tubular, o qual usa como critério a forma do núcleo da espermatíde, a localização da espermatíde e espermatozóide em relação à membrana basal, a presença de figuras de meiose e liberação de espermatozoides para o lúmen do túbulo (Foote *et al.*, 1972).

Comparando a espermatogênese de cães com a de outras espécies, ela parece ser menos organizada e rigidamente menos sincronizada. Os fenômenos de alongamento das espermatídes e condensação do núcleo são observados nos estádios VII, VIII e I e a espermição não ocorrem rigorosamente num estágio específico do CES e sim durante os estádios IV e V (Foote *et al.*, 1972).

### 2.2.2. As células de Sertoli

As células de Sertoli são alongadas, de forma piramidal, apóiam-se sobre a membrana basal do túbulo e desempenham as seguintes funções: (1) formação da barreira de células de Sertoli; (2) suporte estrutural e nutricional das células germinativas; (3) é responsável pela progressão das células germinativas, em diferenciação, em direção ao lúmen; (4) eliminação dos espermatozoides para o lúmen tubular, processo conhecido como espermição; (5) fagocitose das células germinativas degeneradas e corpos residuais de citoplasma de espermatídes maduras; (6) secreção de fluidos e proteínas para banhar as células germinativas em

desenvolvimento e conduzir os espermatozoides através dos túbulos em direção a rede testicular (Russel e Griswold, 1993).

As junções entre células de Sertoli adjacentes formam a barreira de células de Sertoli, que divide funcionalmente o epitélio seminífero em dois compartimentos: o basal e o adluminal (Russel *et al.*, 1990a; Setchell *et al.*, 1994). A renovação e proliferação das espermatogônias até espermátócito primário em pré-leptóteno ocorrem no compartimento basal, ou seja, abaixo das junções entre células de Sertoli adjacentes. No início da fase de leptóteno da primeira divisão meiótica, os espermátócitos primários migram através da barreira de células de Sertoli para o compartimento adluminal, onde a meiose continua e a espermiogênese ocorre (Russel *et al.*, 1990a). O compartimento basal dá livre acesso às substâncias que ultrapassam previamente a camada mióide e o adluminal demonstra maior variação de permeabilidade, qual seja: desde a completa exclusão de algumas substâncias até a transferência relativamente livre de outras, resultando em permeabilidade diferencial, importante para a manutenção de ambiente apropriado à função espermatogênica dos túbulos (Russel e Griswold, 1993). Na orquite auto-imune, processo inflamatório testicular mediado por formação de anticorpos contra os próprios antígenos testiculares do indivíduo, ocorre ruptura da barreira de células de Sertoli e conseqüente lesão no epitélio germinativo com destruição dos espermátócitos primários, espermatídes e espermatozoides (Mann e Lutwak-Mann, 1981).

### 2.2.3. As células de Leydig

As células de Leydig estão presentes no tecido intersticial do testículo e, usualmente, organizam-se em cordões ou em camadas de células que circundam os túbulos e seguem primariamente o curso dos vasos sanguíneos, o que reflete sua função endócrina (Russel *et al.*, 1990a). Morfológicamente, as células de Leydig possuem forma arredondada ou poligonal, núcleo central e citoplasma eosinofílico, com gotículas de lipídeos que são utilizadas como fonte de colesterol para produção dos hormônios masculinos, testosterona e diidrotestosterona (DHT) (Pelleniemi *et al.*, 1993).



Os andrógenos são responsáveis pela diferenciação do trato genital masculino e da genitália externa na fase fetal (Pelleniemi *et al.*, 1993) e pelo aparecimento das características sexuais secundárias e manutenção quantitativa da espermatogênese a partir da puberdade (Huhtaniemi e Toppari, 1998). A produção de andrógeno ocorre por meio de estímulos do hormônio luteinizante (LH) em receptores localizados na membrana citoplasmática das células de Leydig (Holdcraft e Braun, 2004), cujo citoplasma possui grande quantidade de retículo endoplasmático liso e mitocôndrias ricos em enzimas produtoras de testosterona (Zirkin *et al.*, 1980).

#### 2.2.4. Quantificação da espermatogênese

O tamanho do testículo, que tem alta correlação com o peso testicular, é um importante parâmetro na avaliação andrológica de mamíferos, pois, além de fornecer valiosas informações a respeito da normalidade do testículo permite inferir sobre a taxa de produção espermática (Amann, 1970; Olar *et al.*, 1983). Em cães, o peso testicular está relacionado com o peso corporal do animal (Amann, 1970) e este pode variar entre 9,0 e 14 gramas (Woodall e Johnstone, 1988; Paula, 1992).

Geralmente existe correlação positiva entre diâmetro tubular e a atividade espermatogênica. Assim, o estudo quantitativo das células que compõem o epitélio seminífero, em secções transversais dos túbulos seminíferos, é muito importante para a análise do processo espermatogênico. Este estudo permite um conhecimento mais completo da espermatogênese e também de como a estrutura testicular comporta-se em condições fisiológicas, experimentais e patológicas (França e Russel, 1998). A obtenção da proporção volumétrica (%) entre os diversos componentes do testículo e do epitélio seminífero também fornecem importantes resultados para a avaliação da função testicular (Russel *et al.*, 1990a).

Diversos estudos mostram que o número de células de Sertoli por testículo é o principal fator na determinação da produção espermática e do tamanho do testículo (França e Russel, 1998). A relação da produção espermática diária com o número de células de Sertoli, ou com o peso

testicular é estabelecida na fase espermatogonial. Em termos de eficiência da produção espermática por unidade de área de túbulo seminífero, o índice mais importante é o número de espermátides por células de Sertoli (Sharpe, 1994; França e Russel, 1998). Este índice, que corresponde à razão entre o número de espermátides e o número de células de Sertoli representa, ainda, base para o estudo de alterações no processo espermatogênico em decorrência de condições patológicas e terapêuticas (Russel *et al.*, 1990b).

No homem, a célula de Sertoli é pouco eficiente, pois apresenta uma capacidade de suporte de, aproximadamente, três espermátides por célula de Sertoli e uma produção espermática diária de, aproximadamente  $4,5 \times 10^6$  espermatozoides por grama de testículo (Sharpe, 1994). Ao contrário, a espécie canina apresenta a capacidade de suporte bem mais alta, de aproximadamente nove espermátides por célula de Sertoli e, por consequência, uma produção espermática diária entre  $17$  e  $20 \times 10^6$  espermatozoides/g de testículo (Amann, 1986).

### 2.3. Controle endócrino da espermatogênese

O testículo apresenta duas funções principais, a espermatogênese e a produção e secreção de andrógenos. A função testicular normal requer estimulação do hormônio luteinizante (LH) e do hormônio folículo estimulante (FSH), que por sua vez são controladas por secreções pulsáteis do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) do hipotálamo. A esteroidogênese testicular é modulada pela liberação episódica de LH, com a presença de receptores específicos na superfície das células de Leydig que, ao serem estimulados, levam à produção de andrógenos. Já o FSH atua nos túbulos seminíferos, estimulando a produção de ativina e inibina pelas células de Sertoli que, juntamente com os andrógenos, difundem-se junto às células de Sertoli adjacentes e são secretados para dentro do sangue, onde fazem um *feedback* com o hipotálamo para controlar a liberação de LH e FSH (Hafez, 2004). O FSH estimula, ainda, a produção de uma proteína ligadora de andrógenos (ABP) pelas células de Sertoli, que é secretada no lúmen dos túbulos seminíferos e forma um complexo com andrógenos, garantindo concentração adequada de testosterona para a maturação das células germinativas que resultam

nos espermatozoides (Neves *et al.*, 2003; Hafez e Hafez, 2004) (Fig. 1). A espermatogênese é completamente dependente de andrôgenos. Os receptores de andrôgenos localizam-se nas células de Sertoli, nas células mióides peritubulares e nas células de Leydig. Não há receptores para andrôgenos nas células germinativas, o que indica que a ação da testosterona ocorre via células de Sertoli (McLachlan, 2000; Holdcraft e Braun, 2004). A atividade dos receptores de andrôgenos é regulada pela testosterona e diidrotestosterona (DHT), cuja ligação inicia a translocação nuclear e a função reguladora dos receptores de andrôgeno (Holdcraft e Braun, 2004).

A remoção de andrôgenos em ratos adultos por meio da hipofisectomia levou a regressão aguda estágio-específico do epitélio seminífero. A eliminação da testosterona manifesta-se, inicialmente, pela perda de espermátides arredondadas e espermátides alongadas maduras, o que indica a influência do andrôgeno na fase de espermiacão e na transição da fase de espermátide arredondada para a alongada durante a espermiogênese. Também ocorre regressão dos espermatócitos no meio do estágio meiótico (Russel e Clemont, 1977; Ghosh *et al.*, 1991). Com a eliminação da testosterona

residual, a espermatogênese raramente prossegue além da meiose, sendo observado o declínio do número de espermátides arredondadas e presença de raras espermátides alongadas (França *et al.*, 1998).

Os receptores de andrôgeno são necessários para a progressão da meiose I, também durante a transição da fase de espermátide arredondada para a alongada e, finalmente, durante o estágio final da espermiogênese (Holdcraft e Braun, 2004). A expressão de receptores de andrôgeno é contínua nas células de Leydig e células mióides, mas nas células de Sertoli esta ocorre num estágio específico. Os estádios VII e VIII são os mais afetados pela queda na concentração de andrôgeno (Russel e Clemont, 1977; Ghosh *et al.*, 1991). A célula de Sertoli é a única célula somática em contato direto com as células germinativas diferenciadas. A adesão entre as células de Sertoli e as células germinativas é andrôgeno-dependente, uma vez que a diminuição na concentração de testosterona leva não apenas à retenção e fagocitose de espermátides alongadas maduras, mas à liberação prematura de espermátides arredondadas (Russel e Clemont, 1977).

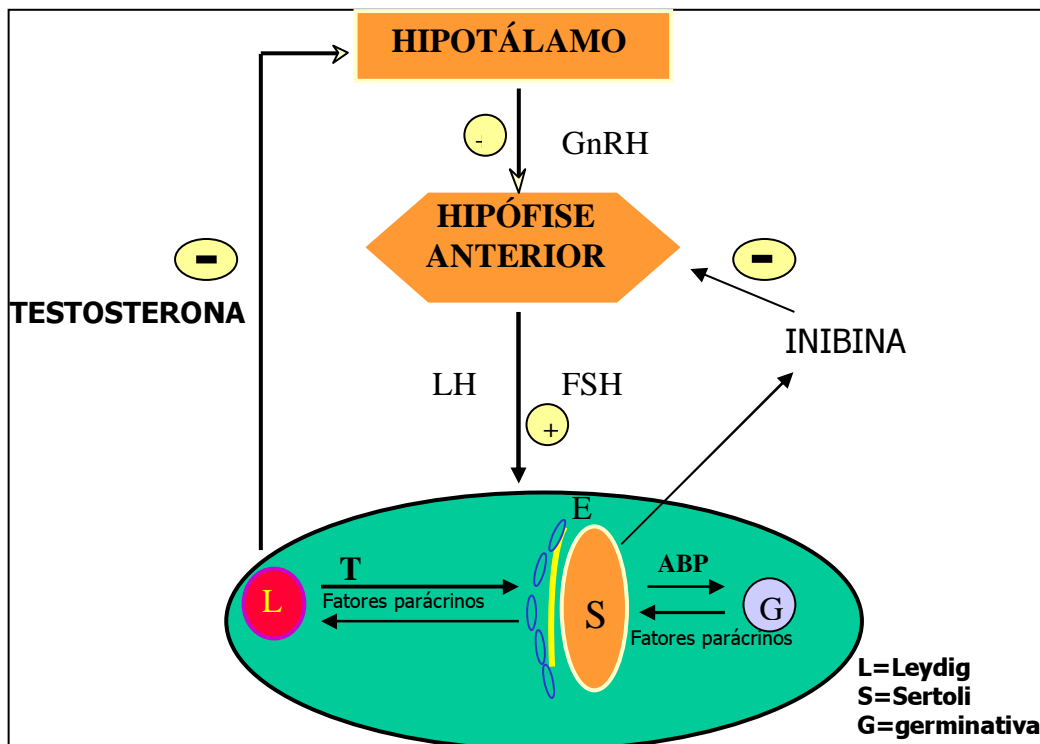


Figura 1. Controle endócrino da reprodução no macho.

#### **.4. Avaliação do comportamento sexual do macho canino.**

É sabido que a testosterona regula várias funções de comportamento e também neuroendócrinas no macho. No cérebro, como em muitos tecidos periféricos, a testosterona atua por meio dos receptores de andrógenos (RA) na sua forma original ou na forma de diidrotestosterona. A importância destes dois hormônios sobre o comportamento reprodutivo, quais sejam, sexual, agressividade e parental vem sendo estudada já há algum tempo (Ogawa *et al.*, 2005). A concentração média de testosterona no plasma é de  $560,8 \pm 395,4 \text{ ng/100ml}$  em cães entre um a cinco anos de idade, com um decréscimo após o terceiro ano de idade. Em machos intactos a concentração de testosterona oscila entre 0,4 a 6 ng/ml de plasma (Mann e Lutwak-Mann, 1981; Christiansen, 1988).

A castração é um dos métodos mais utilizados para o controle do comportamento dos animais domésticos. Além disso, ela também é indicada para o controle populacional de cães e eliminação de doenças testosterona-dependentes (Maarschalkerweerd *et al.*, 1997). Neilson *et al.* (1997), estudando o efeito da castração sobre problemas de comportamento em machos caninos, observaram que 50 a 70% dos animais diminuíram em até 90% a demarcação pela urina, a monta e o comportamento de fuga. Com relação à agressividade diante de outros cães ou membros da família, aproximadamente 25% dos cães apresentaram diminuição desta característica em até 90%. Apenas 15% dos animais apresentaram diminuição do comportamento agressivo diante de cães ou pessoas desconhecidas após a castração. Os autores também concluíram que não há correlação entre a idade à castração e a permanência do comportamento indesejável após a castração. Este fato também foi relatado por Hopkins *et al.* (1976) e Maarschalkerweerd *et al.* (1997).

Segundo Neilson *et al.* (1997) quando machos caninos que apresentam alteração de comportamento são castrados, alguns apresentam eliminação virtual do comportamento, alguns diminuem o comportamento sem eliminá-lo completamente e alguns não apresentam mudança alguma de comportamento. O período mínimo para se esperar qualquer mudança no comportamento

após a castração é de seis meses (Hopkins *et al.*, 1976). Maarschalkerweerd *et al.* (1997) estudando os efeitos da orquiectomia sobre o comportamento de cães, avaliaram os animais por um período de seis a doze meses. Para Hopkins *et al.* (1976) a mudança de comportamento é considerada rápida quando há diminuição do comportamento até duas semanas após a castração. Considera-se a mudança gradual se a redução do comportamento indesejável acontece em até seis meses após a cirurgia. onde

Hopkins *et al.* (1976) citam que a manutenção do comportamento de macho após a castração não está relacionada a concentrações residuais de andrógenos gonadais no sangue. Hart (1997) cita que a testosterona é metabolizada tão rapidamente que oito horas após a castração a concentração da mesma é reduzida a valores não detectáveis. Segundo Hopkins *et al.* (1976) e Hart (1997), a adrenal não aumenta a concentração de andrógenos em quantidades suficientes para influenciar a manutenção do comportamento de macho. A persistência do comportamento em alguns animais castrados parece ser um reflexo de diferenças individuais de sensibilidade de elementos mediadores no SNC à queda na concentração dos andrógenos. Segundo Rodrigues e Rodrigues (2005), animais castrados podem lembrar aspectos e odores associados à rotina sexual anterior à castração e estabelecer cópula com o sexo oposto, porque várias áreas do cérebro estão conectadas ao sistema olfatório acessório ou órgão vomeronasal, que contém receptores olfativos para feromônios.

Maarschalkerweerd *et al.* (1997) relataram que as principais consequências da castração incluem aumento do peso corporal (47%), aumento do apetite (25%) e decréscimo da atividade (21%). Além disso, os mesmos autores concluíram que não há correlação entre o aumento do peso corporal e o decréscimo da atividade, mas há correlação entre o ganho de peso e o aumento do apetite. O aumento do apetite estaria relacionado com a diminuição da concentração de testosterona. No homem, a testosterona aumenta a lipólise basal das células de gordura abdominais e o decréscimo da testosterona leva à diminuição da lipólise basal e ao aumento da gordura intracelular. Este mecanismo patofisiológico poderia explicar o aumento do peso de cães após a castração.

## 2.5. Controle da fertilidade do macho

O bloqueio reprodutivo no macho pode ser obtido por meio de intervenção cirúrgica (orquiectomia, vasectomia), terapia medicamentosa ou da utilização de agentes esclerosantes no testículo ou epidídimo. A contracepção medicamentosa tem sido realizada por meio de hormônios esteróides (andrógenos, progestágenos, anti-andrógenos) e agonistas do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) (Johnston *et al.*, 2001). Os agentes esclerosantes que têm sido utilizados incluem glicerol (Immegart e Threlfall, 2000), tanato de zinco, gluconato de zinco (Fahim *et al.*, 1993), clorexidina, dimetil-sulfóxido (Pineda *et al.*, 1977; Pineda e Doley, 1984) e ácido láctico (Nishimura *et al.*, 1992).

### 2.5.1. Esterilização cirúrgica

#### 2.5.1.1. Orquiectomia

A orquiectomia é o método contraceptivo mais utilizado na esterilização de cães que não são destinados à reprodução. As vantagens incluem prevenção do surgimento de alterações escrotais e testiculares como neoplasias, torções e orquites/epididimites. Além disso, ocorre supressão ou erradicação dos sinais clínicos associados a doenças andrógeno-dependentes tais como hipertrofia prostática, prostatite crônica, adenomas e hérnias perineais. O comportamento de macho (monta, agressividade) diminui em cerca de 50-70% (Neilson *et al.*, 1997). As complicações mais frequentes que ocorrem após a orquiectomia incluem obesidade, incontinência urinária, pancreatites, neoplasias prostáticas e alopecia (Soares e Silva, 1998; Salmeri *et al.*, 1991; Howe e Olson, 2000; Johnston *et al.*, 2001). Howe e Olson (2000) relataram retardo do fechamento das fises dos ossos longos (rádio/ulna) em cães castrados com sete semanas de vida ou aos sete meses, sugerindo um ligeiro aumento da estatura dos animais quando comparados aos não-castrados. As complicações referentes ao pós-operatório incluem hemorragia do pedículo do cordão espermático, edema escrotal e infecção no local da incisão (Johnston *et al.*, 2001). Os riscos da cirurgia e do procedimento anestésico devem ser considerados, principalmente em se tratando de pacientes pediátricos (Howe e Olson, 2000).

#### 2.5.1.2. Vasectomia

A vasectomia consiste na remoção bilateral de um segmento do ducto deferente, o que previne a fertilidade pela obstrução da passagem dos espermatozoides para o ejaculado. As doenças andrógeno-dependentes e o comportamento de macho que algumas vezes são indesejados permanecem, uma vez que a esteroidogênese não é afetada (Johnston *et al.*, 2001). Este método, que é muito empregado em humanos, não é utilizado amplamente em cães, possivelmente por não eliminar o comportamento indesejado de macho (Christiansen, 1988).

### 2.5.2. Esterilização química

#### 2.5.2.1. Agentes esclerosantes

Há relatos na literatura da utilização de agentes esclerosantes no testículo, epidídimo e ducto deferente (Pineda *et al.*, 1977; Nishimura *et al.*, 1992; Immegart e Threlfall, 2000). Quando injetados no parênquima testicular, os agentes esclerosantes levam à atrofia testicular e decréscimo da espermatogênese, além de promoverem redução da concentração de andrógenos, o que contribui para a diminuição de alterações andrógeno-dependentes, tais como doenças da próstata e alterações de comportamento (demarcação pela urina, monta, agressividade). A aplicação da droga no testículo leva a uma resposta sistêmica imune devido à ruptura da barreira de células de Sertoli, além de inflamação local com liberação de antígenos testiculares (Johnston *et al.*, 2001). Se estes agentes são injetados no ducto deferente ou epidídimo, observa-se azoospermia pela indução de oclusão fibrosa, contudo a possibilidade do surgimento de alterações andrógeno-dependentes não pode ser descartada (Bloomberg, 1996).

A injeção de 0,5ml de uma solução aquosa de gluconato de clorexidina a 4,5% na cauda do epidídimo causou azoospermia em cães 35 dias após o tratamento. A azoospermia persistiu por quatro meses (Barnett, 1985). Pineda *et al.* (1977), utilizando injeção intraepididimária de uma solução de gluconato de clorexidina a 1,5% em DMSO a 50%, promoveram azoospermia nos cães aos 90 dias após a injeção. Esta condição foi

observada durante todo o experimento que durou 357 dias.

O retorno à produção espermática normal pode estar associado à preservação de um número apropriado de espermatogônias, que possuem capacidade de divisão e multiplicação com formação de novas células germinativas que irão compor o epitélio seminífero (Russel *et al.*, 1990a; Immegart e Threlfall., 2000; Muson *et al.*, 2004).

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

Immegart e Threlfall (2000) utilizaram injeção intratesticular de glicerol em cães e não observaram azoospermia. Segundo os autores, o glicerol não apresentou boa difusão intratesticular, o que manteve a integridade da maior parte dos túbulos seminíferos, evidenciado por meio de avaliação histopatológica.

## **2.6.Efeitos do zinco na reprodução do macho**

O zinco é essencial para o crescimento normal, reprodução e expectativa de vida dos animais e tem efeito benéfico no processo de reparação tecidual e cicatrização. É considerado não-carcinogênico, não-teratogênico e não-mutagênico (Leonard *et al.*, 1987). O elemento é um componente essencial de um número de enzimas presente nos tecidos, incluindo desidrogenase alcoólica, fosfatase alcalina, anidrase carbônica, procarboxipeptidase e superóxido citosólico desmutase (Hidiroglou e Knipfel, 1984). Também é um componente importante do sêmen e afeta a motilidade espermática (Hidiroglou e Knipfel, 1984). Em baixas concentrações, o zinco é importante para a espermatogênese (incorpora-se ao flagelo das

espermátides alongadas e também é encontrado nas fibras densas externas da cauda do espermatozóide) (Fahim *et al.*, 1993), mas em concentrações elevadas inibe a divisão e replicação das células germinativas e causa fragmentação da membrana celular e do núcleo (Fahim *et al.*, 1993; Bloomberg, 1996). Estudos relatam a toxicidade do zinco na reprodução e no desenvolvimento dos animais (Saxena *et al.*, 1989; Everson *et al.*, 1993).

Em um estudo realizado por Saxena *et al.* (1989), ratos machos foram submetidos a dietas suplementadas com 20mg/kg de zinco durante três semanas ou 28mg/kg de zinco durante seis semanas. Os autores observaram que a suplementação com zinco afetou a atividade de enzimas dos tecidos do trato reprodutor dos animais. À avaliação histológica das gônadas dos animais que consumiram altas doses de zinco por três semanas, foram observados atraso da meiose do espermátócito primário e degeneração dos espermátócitos secundários, acúmulo de líquido no túbulo seminífero e redução na altura do epitélio celular do epidídimo. No grupo exposto ao zinco por seis semanas, a avaliação histológica dos testículos revelou mais evidências de atraso na espermatogênese, tais como, epitélio germinativo contendo apenas espermatogônias, uma linha de espermátócitos primários e presença de número reduzido de espermátócitos secundários, todos picnóticos. E ainda, células de Sertoli e de Leydig apresentando núcleo com figuras sugestivas de necrose. Não foram observados espermatozoides maduros na cauda do epidídimo.

Everson *et al.* (1993) estudaram o efeito de suplementações com zinco (deficiente, normal e em excesso) em ratos machos durante oito semanas. As doses utilizadas foram de 0,4, 1 e 49 mg de zinco/kg-dia. Dados da citometria de fluxo revelaram que o excesso de zinco causou anormalidades na estrutura cromossômica do espermatozóide. Os autores sugerem que o excesso de zinco, representado no experimento pela suplementação com dose mais elevada do mineral, desestabilizou as pontes dissulfídicas e complexos com moléculas de protamina (uma proteína básica do espermatozóide), o que levou à desestabilização da estrutura quaternária da cromatina espermática e à maior susceptibilidade de desnaturação do DNA.

Leathem (1970) citado por Hidiroglou e Knipfel (1984), relata que o zinco desempenha um

papel importante no controle do metabolismo de andrógenos na célula. A atividade da enzima 5  $\alpha$ -redutase é inibida por concentrações de zinco na ordem de 0,001M ou maiores, enquanto baixas concentrações de zinco estimulam a metabolização da testosterona a DHT. Segundo Fahim *et al.* (1993), em altas concentrações, o zinco inibe a ligação da enzima 5  $\alpha$ -redutase à testosterona e, desta forma, a produção de DHT também é inibida. Kellokumpu e Rajaniemi (1981) demonstraram que o zinco inibe a biossíntese de testosterona no testículo de ratos por meio da formação de um complexo receptor-hormônio envolvendo as gonadotropinas.

Leake *et al.* (1984) avaliaram o papel do zinco na regulação da metabolização da testosterona a DHT. Os resultados mostraram que quando o zinco é utilizado em baixas concentrações, a transformação da testosterona a DHT aumenta, mas quando utilizado em concentração elevada, o metabolismo é inibido significativamente. Este bloqueio é mediado pela inibição não competitiva da ligação da testosterona à enzima 5  $\alpha$ -redutase e pela redução da formação do cofator NADPH. Eles também demonstraram que a diminuição da síntese de NADPH ocorre por meio da inibição competitiva da ligação de ambos G6P e NADP à enzima G6PD.

## 2.7. O zinco como agente esterilizante

As pesquisas que envolvem esterilização química de machos são restritas e um dos fatores está relacionado aos resultados obtidos com a maioria dos agentes esclerosantes, que não resultam em azoospermia e causam irritação ou ulceração do escroto. O zinco tem pH neutro e faz parte da composição do plasma seminal e dos tecidos do trato reprodutor masculino. Além disso, o plasma seminal e os tecidos desta região contêm uma concentração de zinco maior que qualquer outro órgão do corpo (Fahim *et al.*, 1993).

A injeção intratesticular de tanato de zinco em ratos e cães resultou na supressão da espermatogênese e na redução significativa da concentração de testosterona sérica para valores semelhantes àqueles observados após castração cirúrgica. Também causou redução de 85% no peso da próstata (Fahim *et al.*, 1982).

Num experimento realizado por Fahim *et al.* (1993), onde foi testada a ação de injeção de gluconato de zinco na cauda do epidídimo de cães adultos, foi observada azoospermia aos 90 dias após o tratamento. À avaliação histológica do epidídimo e testículos um ano após o tratamento, os mesmos autores observaram atrofia dos túbulos seminíferos, formação de tecido cicatricial e atrofia da rede testicular, além de provocar enrolamento da cabeça e corpo do epidídimo. Entretanto, a concentração de testosterona plasmática não foi alterada. Wang (2002), avaliando o efeito de injeção intratesticular de gluconato de zinco em cães com idades entre 2½ a 10 meses, observou aspermia, azoospermia ou necroospermia aos 60 dias do início do tratamento em 95% dos animais. O mecanismo de ação da droga foi atribuído ao zinco que causou atrofia dos túbulos seminíferos com formação de tecido de granulação que impediu a migração dos espermatozoides dos túbulos seminíferos para o epidídimo. Posteriormente, foi relatado que a concentração de testosterona plasmática reduziu para 41 e 52% nos cães tratados com injeção com zinco, entretanto, alguns animais do experimento mantiveram a concentração do andrógeno semelhante ao do grupo controle (Neutersol, 2003; Haper, 2004). Haper (2004) concluiu que o procedimento não deve ser utilizado para correção de alterações andrógeno-dependentes.

TESTOBLOCK é uma solução à base de zinco na forma de gluconato de zinco, cujo pH foi neutralizado em veículo não irritante. Esta foi desenvolvida para ser utilizada como agente esterilizante de cães machos por meio de injeção intratesticular. O veículo tem a capacidade de reter o zinco dentro do testículo e acredita-se que seu mecanismo de ação consiste na ativação do sistema imune do animal (R.H. Douglas, comunicação pessoal).

No sistema imunológico o zinco desempenha papel fundamental, pelo fato de as células do sistema imune apresentarem altas taxas de proliferação, e este mineral estar envolvido na tradução, transporte e replicação do DNA (Blanc *et al.*, 1991). A influência direta do zinco no sistema imune acontece devido a este elemento estimular a atividade de enzimas envolvidas no processo de mitose, como a DNA e a RNA polimerase, timidina quinase, desoxiribonucleotidol terminaltransferase e ornitina descarboxilase (Fraker *et al.*, 1978; Delafuente 1991; Sena e

Pedrosa, 2005). O zinco pode, ainda, afetar o processo de fagocitose dos macrófagos e neutrófilos e interferir na lise celular mediada por células *natural killer* e na ação citolítica das células T (Blanc *et al.*, 1991).

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

## 2.8. Cinética e dinâmica do zinco

Alguns fatores influenciam a absorção e transporte celular de zinco, bem como os efeitos do zinco sobre o organismo. Podem ser citados a forma química de apresentação do elemento e a via de administração (inalação, oral ou cutânea) (Toxicological..., Washington-EUA, 2005). O zinco utilizado neste estudo apresenta-se na forma de gluconato de zinco. Este possui grau moderado de irritação cutânea, ausência de propriedades cáusticas como as apresentadas pelo cloreto de zinco e alta solubilidade em água, semelhante ao sulfato de zinco (Agren *et al.*, 1991; Sena e Pedrosa, 2005).

Uma vez absorvido, o zinco é encontrado em grandes quantidades nos músculos, ossos, trato gastrointestinal, rim, cérebro, pele, pulmões, coração e pâncreas. No plasma, dois terços do zinco encontra-se ligado à proteína albumina. O zinco é um metal encontrado no organismo como cátion divalente. Assim, este não é metabolizado, mas interage eletrostaticamente com ânions (carbonatos, hidróxidos, oxalatos) e com macromoléculas como as proteínas. Ele forma também complexos quelatos com aminoácidos e ácidos orgânicos. A excreção do zinco ocorre pela via gastrointestinal sendo eliminado nas fezes e na urina (Toxicological..., Atlanta-EUA, 2005).

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. Composição da solução à base de zinco

A solução utilizada contém 0,2M de zinco, cujo pH foi neutralizado em veículo fisiológico não-irritante desenvolvido pela Biorelease Technologies LLC (Birmingham, Alabama, USA), sendo a concentração final de 13,1mg de zinco por ml de solução. A solução encontra-se em vias de se adquirir patente.

### 3.2. Animais

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG), segundo o protocolo nº 130/04. Foram utilizados 15 cães, machos, com peso entre 8,5 e 18 kg, sendo 1 Daschund, 1 Pastor de Shetland e 13 SRD, provenientes do Serviço de Controle de Zoonoses da Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte-MG. As idades estimadas dos animais variavam entre seis meses e quatro anos, baseadas na análise da arcada dentária. Os animais foram agrupados segundo suas faixas etárias: de 8 meses até 1,5 anos de idade (n = 5) e de mais de 2 até 4 anos de idade (n = 5). O grupo controle foi formado por cinco animais, com idades variando entre 1,5 e 4anos.

Os animais foram mantidos em canis experimentais coletivos, tipo solário, pertencentes à Escola de Veterinária da UFMG, no período de adaptação, e submetidos a exames laboratoriais (hemograma, pesquisa de hemoparasitas e análise sorológica para Leishmaniose). No período de adaptação, os animais receberam vacina<sup>1</sup>,

vermífugo<sup>2</sup> e ectoparasiticida<sup>3</sup>. Após esta fase, os cães foram colocados em canis individuais, com área de 4,5 m<sup>2</sup>, onde recebiam ração comercial<sup>4</sup> e água à vontade.

### **3.3. Injeção intratesticular de gluconato de zinco**

Os animais foram submetidos a jejum sólido e líquido por 12 horas. Foi feita sedação leve com utilização de sulfato de atropina<sup>5</sup> (0,044 mg/kg, SC) e cloridrato de xilazina<sup>6</sup> (1,0 mg/kg, IM) e, em seguida, o escroto foi limpo com solução anti-séptica (Fig. 2). Seis diferentes doses da solução à base de zinco foram administradas segundo o diâmetro testicular do animal (Wang, 2002) que foi mensurado com a utilização de um paquímetro (Tab. 1). Foram utilizadas seringa e agulha de insulina (13 x 4,5mm), uma para cada testículo, para injetar o volume da solução à base de zinco. Uma única injeção foi realizada na região dorso-cranial de cada testículo, ao lado da cabeça do epidídimo (o mais próximo possível do ducto eferente e rede testicular) e a agulha foi inserida num plano paralelo em relação ao testículo (Fig. 3). Os animais do grupo controle receberam injeções intratesticulares de solução salina como placebo.

---

<sup>1</sup> Vanguard HTLP 5/CV-L (Laboratório Pfizer Ltda)

<sup>2</sup> Ivomec (Merial)

<sup>3</sup> Garma (Agener União)

<sup>4</sup> Kanina (Purina)

<sup>5</sup> Sulfato de Atropina 1 mg (Hypofarma)

<sup>6</sup> Rompum 2% (Bayer S.A.)



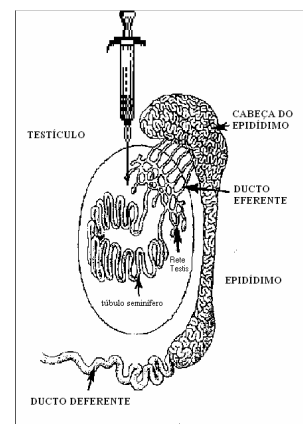
**Tabela 1** – Volume da solução à base de zinco injetada no testículo dos cães, segundo o diâmetro testicular dos mesmos.

<i>Diâmetro do testículo (mm)</i>	<i>Dose por testículo</i>	
	<i>(ml)</i>	<i>(mg de zinco)</i>
10-12	0,2	2,6
13-15	0,3	3,9
16-18	0,5	6,6
19-21	0,7	9,2
22-24	0,8	10,5
25-27	1,0	13,1

(Wang, 2002)



**Figura 2.** Cão, SRD, em decúbito dorsal para administração intratesticular da solução à base de zinco.



**Figura 3.** Local da injeção intratesticular da solução à base de zinco em cão.

### 3.4. Avaliação clínica

Foram observadas as variáveis: atitude, apetite, dor à palpação do testículo, temperatura corporal e presença de irritação, dermatite ou ulceração no local da injeção. O exame clínico foi realizado no dia da injeção (dia 0) e até o dia 7 após a mesma. A partir do sétimo dia a avaliação das variáveis foi realizada mensalmente por um período de 150 dias. Os testículos foram mensurados diariamente durante a primeira semana após o tratamento e, a partir daí, semanalmente, até o fim do experimento.

### 3.5. Avaliação bioquímica e das funções renal e hepática

Foram coletadas amostras de sangue dos animais no dia da injeção intratesticular (dia 0), dois e oito dias após a injeção de zinco, e mensalmente, por 150 dias. Todos os animais encontravam-se em jejum de doze horas no momento das coletas. Foram avaliados o hemograma e a concentração de fibrinogênio, a função renal que consistiu na mensuração da concentração de uréia e creatinina e a função hepática, que incluiu a dosagem de proteínas totais e suas frações e das enzimas hepáticas TGP (ALT), TGO (AST) e fosfatase alcalina. As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório TECSA, Belo Horizonte - MG.

### 3.6. Coleta e avaliação de sêmen

Os cães foram submetidos à coleta de sêmen por meio de manipulação digital do pênis (Johnston, 1991). Antes do início do tratamento, cada cão teve sua reserva espermática extragonadal equilibrada, por meio de coletas de sêmen diárias, durante sete dias consecutivos. Após um

intervalo de três dias, foram iniciadas as coletas de sêmen para avaliação da ação da solução à base de zinco, sendo realizadas coletas de sêmen um dia antes da injeção e nos dias quatro e sete após a mesma. Em seguida, as coletas foram realizadas uma vez por semana durante 150 dias. As variáveis avaliadas incluíram volume, motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática.

### 3.7. Determinação da concentração de testosterona

Amostras de sangue foram coletadas um dia antes da injeção e nos dias quatro e sete após a mesma, antes de cada coleta de sêmen. Em seguida, as coletas foram realizadas semanalmente até 150 dias. Todos os animais encontravam-se em jejum no momento da coleta e as mesmas foram realizadas sempre no mesmo horário (período da manhã). As amostras foram coletadas uma vez ao dia, pela punção da veia cefálica, em tubos vacutainer de 6ml, seguindo-se cuidadosa homogeneização. Após centrifugação a 700 x g por 5 min, o plasma era colhido e armazenado a -20°C para posterior análise. A concentração de testosterona plasmática foi mensurada no laboratório B.E.T. Labs (Lexington, Kentucky, USA) por meio da técnica de radioimunoensaio, utilizando-se kit validado para a espécie canina (DPC Inc Los Angeles, Califórnia).

### 3.8. Avaliação do comportamento sexual do animal

O comportamento sexual dos cães (libido) foi avaliado pelo grau de interesse que o macho apresentou na presença de uma fêmea em estro (Tab. 2). Este procedimento foi realizado um dia antes da injeção e semanalmente após a mesma até um período de três meses.

**Tabela 2.** Comportamento sexual dos cães quando em contato com fêmea em estro.

<i>Classificação</i>	<i>Comportamento</i>
+	Ausência de interesse sexual quando em contato com fêmea em estro
++	Pouco interesse sexual quando em contato com fêmea em estro (demora a se aproximar da fêmea, demonstra pouco ou nenhum interesse em realizar monta)
+++	Forte interesse sexual quando em contato com fêmea em estro (o animal cheira a vulva da fêmea, tenta realizar monta)

### 3.9. Colheita, preservação e processamento histológico e ultra-estrutura dos testículos e epidídimos.

Todos os cães foram submetidos à orquiectomia bilateral, com subsequente coleta de material, 150 dias após a injeção intratesticular de zinco. Os animais foram submetidos a jejum sólido e líquido por 12 horas. O protocolo anestésico constou da administração da medicação pré-anestésica, de sulfato de atropina<sup>7</sup> (0,044mg/kg SC) e cloridrato de xilazina<sup>8</sup> (1,0mg/kg IM). Na indução anestésica, foi utilizado tiopental sódico<sup>9</sup> a 2,5% (12,5mg/kg IV). Os testículos foram coletados, lavados em salina, separados de seus respectivos epidídimos e pesados e mensurados quanto ao diâmetro e comprimento dos mesmos. Em seguida, eles foram seccionados e feitos três cortes transversais iniciais, que dividiram o testículo em região capitata, intermediária e caudata. Os fragmentos dos testículos foram imersos em recipientes contendo glutaraldeído a 5% em tampão fosfato 0,1M, pH 7,4 por 10 minutos e submetidos a novos cortes de menor espessura, os quais foram também submersos na solução fixadora, que foi renovada após 120 minutos. Neste período, fragmentos de 2 mm de espessura foram recortados das bordas laterais dos fragmentos maiores e armazenados em uma nova solução fixadora a 4°C, até seu subsequente processamento histológico.

Para os estudos em microscopia de luz, os fragmentos foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico (70%, 80%, 90% e absoluto), com trocas a cada 30 minutos. Após a desidratação, os mesmos foram incluídos em resina plástica à base de glicol metacrilato<sup>10</sup>, sendo posteriormente seccionados, com uso de navalhas de vidro, na espessura de 4µm. As secções obtidas foram coradas com azul de toluidina, montadas em Entellan<sup>11</sup> e analisadas em microscópio ZEISS binocular (modelo Axiostar), no setor de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE, Recife - PE. Para os estudos sob microscopia eletrônica de transmissão, alguns fragmentos testiculares fixados em glutaraldeído foram pós-fixados, como descrito

a seguir: (1) lavagem em tampão cacodilato 0,1M com duas trocas de 10 minutos cada; (2) pós-fixação com mistura de tetróxido de ósmio a 1%, 2mM de CaCl<sub>2</sub> e ferricianeto de potássio a 8% em tampão cacodilato 0,1M; (3) lavagem em água destilada por 10 minutos; (4) imersão em solução aquosa de acetato de uranila a 2,5%, durante 60 minutos, em temperatura ambiente; (5) lavagem em água destilada com três trocas de 10 minutos cada. Posteriormente à fixação secundária, os fragmentos foram desidratados em séries crescentes de acetona: 30, 50, 70 e 90 em banhos de 30 minutos cada e acetona a 100% em banho de 40 minutos. Completada a desidratação, os fragmentos foram submetidos a banhos de 24 horas em mistura de acetona e meio de inclusão e resina Epon 812<sup>12</sup>, na proporção de 1:1, 2:1, 1:1 e 1:2 e então em meio puro, de onde se fez o emblocamento. A polimerização foi realizada a 60°C por dois dias. Cortes ultrafinos foram obtidos e corados com acetato de uranila a 3% e citrato de chumbo. O material foi analisado e fotografado no microscópio eletrônico de transmissão ZEISS EM 109, no Departamento de Biologia Celular e Ultraestrutura, (CPqAM - FIOCRUZ), UFPE, Recife - PE.

### 3.10. Análise morfométrica dos testículos

#### 3.10.1. Diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero

O diâmetro tubular médio por animal foi obtido a partir da mensuração, ao acaso, de 30 secções transversais (15 secções/testículo) dos túbulos seminíferos que apresentavam contorno o mais circular possível. Estas mensurações foram feitas utilizando-se ocular micrométrica de 10x, com aumento final de 100x. Nas mesmas secções utilizadas para se medir o diâmetro tubular, foi mensurada a altura do epitélio seminífero, a qual foi tomada da membrana basal até a borda luminal. O valor encontrado para a altura do epitélio em cada túbulo representa a média de duas medidas tomadas de forma diametralmente opostas.

#### 3.10.2. Proporção volumétrica e volume dos diferentes componentes do testículo

<sup>7</sup> Sulfato de Atropina 1 mg (Hypofarma)

<sup>8</sup> Rompum 2% (Bayer S.A.)

<sup>9</sup> Thiopentax (Cristália)

<sup>10</sup> Leica Histo-resin Embedding Kit, Leica Instruments

<sup>11</sup> Merck

<sup>12</sup> Sigma Company, St Louis, MO

As proporções volumétricas (%) foram estimadas utilizando-se retículo com 441 intersecções (pontos) em aumento de 400x. Para cada animal foram analisados 30 campos histológicos, 15 campos por testículo, escolhidos ao acaso, perfazendo um total de 6615 pontos por testículo. Do compartimento tubular foram analisados túnica própria, epitélio seminífero e lúmen, enquanto do compartimento intertubular foram avaliados as células de Leydig, tecido conjuntivo, compreendendo células e fibras colágenas e reticulares, e vasos linfáticos e sanguíneos (parede e lúmen).

### 3.10.3. População de células espermatogênicas e de células de Sertoli no estágio V do ciclo do epitélio seminífero, por secção transversal de túbulo seminífero.

Esta análise teve como objetivo principal fornecer dados para se investigar quantitativamente a evolução do processo espermatogênico por meio de índices ou razões celulares, e também estimar o número de células de Sertoli por testículo. As contagens dos

diferentes tipos celulares que compõem o epitélio seminífero no estágio V do ciclo, classificado segundo método acrossômico (Russel *et al.*, 1990a), foram feitas em dez secções transversais (cinco secções/testículo) de túbulos seminíferos no estágio V, e que apresentavam contorno o mais arredondado possível, em aumento de 400x. Os seguintes tipos celulares foram quantificados:

- a) Espermatogônias
- b) Espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno
- c) Espermatócitos primários em paquíteno
- d) Espermátides arredondadas
- e) Nucléolo de células de Sertoli

Todos os valores obtidos para a contagem numérica dos diferentes tipos celulares investigados foram corrigidos para o diâmetro nuclear e espessura do corte histológico, utilizando-se a fórmula de Abercrombie (1946) modificada por Amann e Almquist (1962), conforme segue:

$$\text{Número corrigido} = \frac{\text{contagem celular} \times \text{EC}}{\text{EC} + \sqrt{(\text{DM} / 2) - (\text{DM} / 4)}}$$

Onde: EC = espessura do corte  
DM = diâmetro nuclear (nucleolar) médio

O diâmetro nuclear médio (DM) representa a média das medidas dos diâmetros de vinte núcleos de células germinativas por animal (10 núcleos /testículo). Estes diâmetros foram medidos com o auxílio de ocular micrométrica de 10x, acoplada à objetiva de 100x, propiciando aumento final de 1000x. As contagens de células de Sertoli foram corrigidas para o diâmetro nucleolar e espessura dos cortes histológicos, utilizando-se para isto a mesma metodologia empregada na correção do número de células germinativas. Para isso, foram contadas apenas células de Sertoli com nucléolo visível, os quais tiveram seus diâmetros medidos da mesma forma que o núcleo de células germinativas.

### 3.10.4. Razão entre tipos celulares

Com a finalidade de se estimar a eficiência do processo espermatogênico e da célula de Sertoli foram calculadas as razões entre os números corrigidos de células espermatogênicas e entre estas últimas e as células de Sertoli no estágio V do ciclo. A razão que foi obtida incluiu: espermátide arredondada: nucléolo de células de Sertoli (índice ou eficiência da célula de Sertoli)

#### 4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE DOS RESULTADOS

Com o objetivo de avaliar o efeito dos tratamentos na variação das médias de interesse, foi utilizada a análise de variância, baseada em planejamento de medidas repetidas, ou seja, cada tratamento (grupos experimentais) foi avaliado em vários momentos de acompanhamento (período de 150 dias). Os dados obtidos foram analisados estatisticamente, utilizando-se o teste t-Student pareado e, no caso de diferença significativa na aplicação do teste F (ANOVA), foram utilizados os testes de comparações pareadas de Tukey (Técnicas de estatística inferencial) (Sampaio, 1998).

Destaca-se que a verificação da hipótese de igualdade de variâncias entre os três grupos foi realizada por meio do teste F de Levene. A normalidade dos dados foi verificada através do teste de Shapiro-Wilk aplicado aos resíduos padronizados (Altman, 1991; Zar, 1999).

O nível de significância utilizado nos testes estatísticos foi de 5% (0,05). O *software* utilizado para a obtenção dos cálculos Estatísticos foi o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) na versão 13.

#### 5. RESULTADOS

Nas Tabelas de 3 a 17 constantes do Anexo, são apresentados: média e desvio padrão das variáveis analisadas, segundo o grupo (G1, G2 e G3) e o tempo de avaliação. São também apresentados os resultados dos testes comparativos entre os grupos (G1, G2 e G3) em cada tempo de avaliação e entre o tempo inicial (t0) com cada um dos outros tempos para cada um dos grupos.

##### 5.1. Avaliação clínica

Não foi observada reação de mordedura ou lambedura, nem de dor à palpação dos testículos, nem aumento de temperatura corporal à avaliação clínica realizada após a injeção, embora tenha sido observado aumento de temperatura escrotal e de volume testicular, que desapareceram após 24h e 72 horas, respectivamente. Um cão (Grupo 3) apresentou irritação na bolsa escrotal e dermatite, 30 dias após a injeção.

##### 5.2. Avaliação bioquímica

Na Tabela 3 (Anexo), que mostra os valores do hemograma dos animais, verificou-se que a única variável que apresentou diferença significativa entre os três grupos após a injeção de zinco foi a concentração de hemoglobina que aumentou no grupo tratado adulto ( $P < 0,05$ ). Ao se realizar a comparação entre os valores do hemograma antes e após a injeção de zinco, observou-se, no grupo tratado adulto, aumento da concentração de hemácias e hemoglobina ( $P < 0,05$ ) e diminuição da concentração de leucócitos ( $P < 0,05$ ). Para o grupo tratado jovem foram encontradas diminuição da concentração de leucócitos e neutrófilos segmentados ( $P < 0,05$ ). Apesar da alteração das concentrações das variáveis, os valores das mesmas encontram-se dentro da faixa normal para a espécie.

A Tabela 4 (Anexo) mostra os valores das variáveis escolhidas para avaliação da função hepática dos animais. Ao se comparar os três grupos, verificou-se aumento significativo da concentração de fosfatase alcalina apenas para o grupo tratado jovem ( $P < 0,05$ ). Quando comparados os valores antes e depois da injeção de zinco, foi observado aumento significativo da concentração de fosfatase alcalina até uma semana após o tratamento para ambos os grupos tratados ( $P < 0,05$ ). Na avaliação dos valores encontrados no grupo tratado adulto foi observado, ainda, aumento da concentração de proteínas totais, globulinas e albuminas ( $P < 0,05$ ) e diminuição da concentração de globulinas e TGO ( $P < 0,05$ ). No grupo tratado jovem foram observados aumento da concentração de albumina, razão albumina/globulina e concentração de TGO ( $P < 0,05$ ). Embora tenha sido observada diferença significativa para algumas variáveis, os valores encontram-se dentro da faixa de normalidade para a espécie.

A Tabela 5 (Anexo) mostra os valores de uréia e creatinina, variáveis escolhidas para avaliação da função renal dos animais tratados. Não se observou diferença significativa para as variáveis avaliadas quando comparadas entre os grupos. Ao se realizar a comparação entre os valores antes da injeção de zinco (T0) e ao final do experimento (T5), não foi observada alteração da concentração das mesmas. Os valores encontrados encontram-se dentro da faixa de normalidade para a espécie.

A Tabela 6 (Anexo) mostra os valores da concentração sérica de fibrinogênio, variável escolhida como marcador da resposta inflamatória aguda nos animais tratados. Não foi verificada diferença significativa entre os três grupos em qualquer dos três tempos analisados ( $P > 0,05$ ). Entretanto, quando avaliados antes e depois da injeção de zinco, observou-se que as médias foram maiores após o tratamento, inclusive para o grupo controle que foi tratado com solução salina ( $P < 0,05$ ).

### 5.3. Avaliação do sêmen

Aos 150 dias após a injeção, oito dos dez animais tratados encontravam-se azoospermicos (Tab. 7, Anexo). Os dois cães não-azoospermicos, ambos pertencentes ao Grupo 3, apresentaram espermatozoides vivos em baixa concentração, e a análise do sêmen revelou que ambos encontravam-se oligospermicos. Neste experimento, a oligospermia foi caracterizada por uma concentração espermática de, aproximadamente,  $10 \times 10^6$  espermatozoides/ml, sendo o tratamento considerado efetivo. As alterações do sêmen caracterizaram-se, inicialmente, por necrospermia seguida pela diminuição da motilidade espermática, oligospermia e azoospermia.

Em relação à concentração espermática (Tab. 8; Fig. 12, Anexo) destacou-se diferença significativa entre os grupos a partir da sexta semana (tempo 7), com valores menores para os grupos tratados quando comparados com o controle ( $P < 0,05$ ). Esta diferença permaneceu até o final da experimentação. Ao se comparar os valores da concentração espermática antes e após a injeção intratesticular de zinco foi observada diminuição dos valores já aos quatro dias (T1) para todos os grupos, entretanto a queda da concentração espermática inicial só foi significativa para o grupo controle ( $P < 0,05$ ). Este comportamento permaneceu até a sétima semana de avaliação (T8), quando a concentração retornou aos valores semelhantes àqueles observados no dia 0. Já os grupos tratados manifestaram queda significativa da concentração espermática a partir do sétimo dia (T2) comparado com o dia 0 ( $P < 0,05$ ), e esta permaneceu por todo o período de avaliação experimental.

Em relação à motilidade espermática (Tab. 9; Fig. 13, Anexo) verificou-se diferença significativa entre os grupos a partir da terceira

semana (T4), com valores menores para os grupos tratados quando comparados com o controle ( $P < 0,05$ ). Esta diferença permaneceu até o final da experimentação. Ao se comparar a motilidade espermática antes e após a injeção intratesticular foi observado diminuição dos valores entre duas e três semanas (T3 e T4) após a injeção de zinco para os grupos tratados ( $P < 0,05$ ). Este comportamento permaneceu por todo o período de avaliação experimental.

Em relação à porcentagem de espermatozoides morfolologicamente normais (Tab. 10; Fig. 14, Anexo) verificou-se diferença significativa entre os grupos controle e tratado jovem já aos quatro dias após o tratamento (T1), com valores menores para o grupo tratado jovem ( $P < 0,05$ ). Os valores do grupo tratado adulto começaram a apresentar diminuição significativa em relação ao controle a partir da terceira semana após o tratamento ( $P < 0,05$ ). Esta diferença permaneceu até o final do experimento. Ao se comparar a porcentagem de espermatozoides morfolologicamente normais, antes e após a injeção intratesticular de zinco, foi observada diminuição significativa dos valores a partir da segunda semana (T3) e terceira semana (T4) após o tratamento, para os grupos tratados jovem e adulto, respectivamente ( $P < 0,05$ ). Este comportamento permaneceu por todo o período de avaliação experimental.

Para nenhum dos tempos de avaliação analisados comprovou-se diferença significativa entre os grupos, em relação à média do volume ejaculado. Quando comparado antes e após a injeção de zinco, foi observada diminuição do volume ejaculado para os grupos tratados, ( $P < 0,05$ ) (Tab. 11; Fig. 15, Anexo).

### 5.4. Avaliação hormonal

Na Tabela 12 e Figura 16 (Anexo), destacam-se as médias da concentração de testosterona plasmática. Não foi observada diferença significativa entre os grupos, embora seja evidente que, numericamente, os valores encontrados para os grupos tratados tenham começado a declinar uma semana (tempo 2) após a injeção de zinco. Este comportamento permaneceu durante todo o experimento, sendo que no tempo 10 o declínio foi significativo ( $P < 0,05$ ). Ao se comparar os valores da concentração de testosterona antes e após o tratamento, foi

registrado declínio da mesma nos grupos tratados, embora este comportamento tenha oscilado entre os momentos de avaliação.

### **5.5. Diâmetro testicular**

Nas Tabelas 13 e 14 e Figura 17 (Anexo), ao se comparar o diâmetro testicular entre os grupos, observou-se que as médias dos testículos direito e esquerdo foram mais elevadas para os grupos tratados, quando comparados com o grupo controle. O testículo direito permaneceu com médias elevadas em relação ao controle, por um período de duas semanas, enquanto o esquerdo, por um período de apenas três dias ( $P < 0,05$ ). Ao se comparar os valores do diâmetro testicular, antes e após a injeção de zinco, foi observado aumento do diâmetro para o testículo direito até a segunda semana após o tratamento ( $P < 0,05$ ), em ambos os grupos tratados. O diâmetro do testículo esquerdo permaneceu aumentado por duas semanas no grupo tratado jovem, enquanto no grupo tratado adulto, três dias após o tratamento os valores observados encontravam-se semelhantes aos do dia 0.

Ainda sobre o diâmetro testicular, observou-se também que o diâmetro do testículo esquerdo diminuiu 8% ( $P < 0,05$ ) para o grupo tratado adulto a partir da oitava (T9) ou nona semana (T10) após a injeção de zinco, quando comparado com o dia 0. O grupo tratado jovem apresentou diâmetro testicular direito e esquerdo numericamente inferior, ao se comparar os valores do dia 0 com os encontrados ao final do experimento (T16), entretanto estes não diferiram significativamente entre si.

### **5.6. Avaliação histológica**

#### **5.6.1. Microscopia de luz**

Ao exame histológico dos testículos do grupo controle, foi observada espermatogênese normal com presença de epitélio germinativo e células de Sertoli sem alterações. As células de Leydig apresentavam características típicas de células produtoras de esteróides (Fig. 4A,B). À avaliação histológica dos grupos tratados, foi observado que a região mais próxima (região cranial do testículo) do local da injeção de zinco apresentou áreas de fibrose com intensa

proliferação de fibroblastos e deposição de colágeno no intertúbulo (Fig. 5A). Na área do mediastino testicular foi observada presença dos túbulos retos localizados próximos a túbulos seminíferos atrofiados (Fig. 5B,C). Nas áreas mais distantes do local da injeção de zinco (regiões intermediária e caudal do testículo) foi observado atrofia dos túbulos seminíferos, com degeneração e diminuição do número de células germinativas, formação de células gigantes multinucleadas, vacuolização das células de Sertoli e das células germinativas e ausência de espermátides alongadas (Fig. 6A-D), com a maioria dos túbulos seminíferos mostrando apenas células de Sertoli (Fig. 6A). As células de Leydig apresentaram vacuolização característica de degeneração lipídica (Fig. 7B,C).

Ao exame histológico dos epidídimos do grupo controle foi observado que os túbulos epididimários apresentavam células colunares altas com citoplasma abundante, além da presença de grande número de espermatozoides no lúmen (Fig. 8A). Ao exame histológico dos epidídimos dos grupos tratados, notou-se que os túbulos epididimários apresentavam-se atrofiados, entretanto com a espessura do epitélio era normal. Não foi observada presença de espermatozoides no lúmen (Fig. 8B).

#### **5.6.2. Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Ao exame ultraestrutural dos testículos do grupo controle foi observado células de Sertoli com grande número de organelas, predominantemente mitocôndrias, alongadas e com presença de crista tubular e matriz, além de retículo endoplasmático liso (Fig. 9A,C). As espermátides alongadas continham grande número de mitocôndrias (Fig. 9B). No espaço intertubular foram evidenciadas células de Leydig com características morfológicas de células produtoras de esteróides, tais como, áreas do citoplasma ricas em anastomose tubular e retículo endoplasmático rugoso. O núcleo continha heterocromatina associada ao envelope nuclear (Fig. 9D).

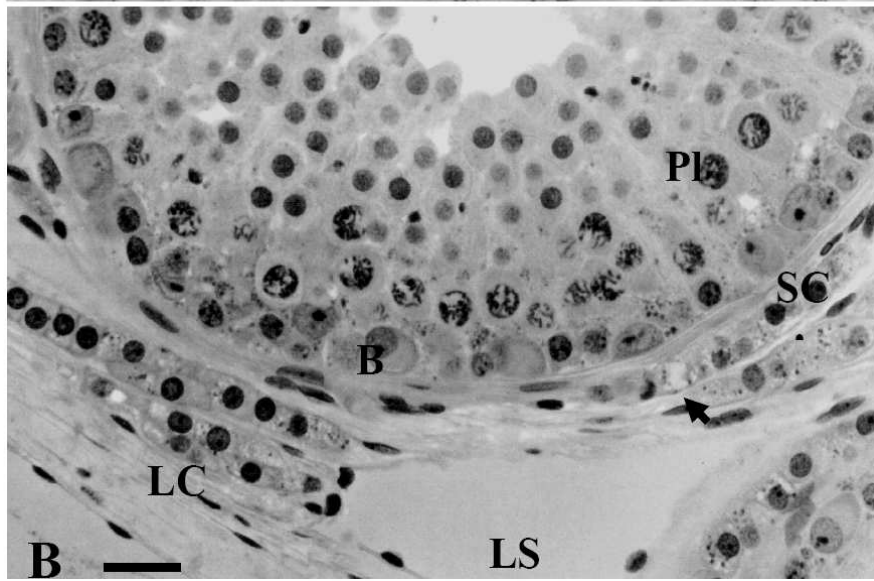
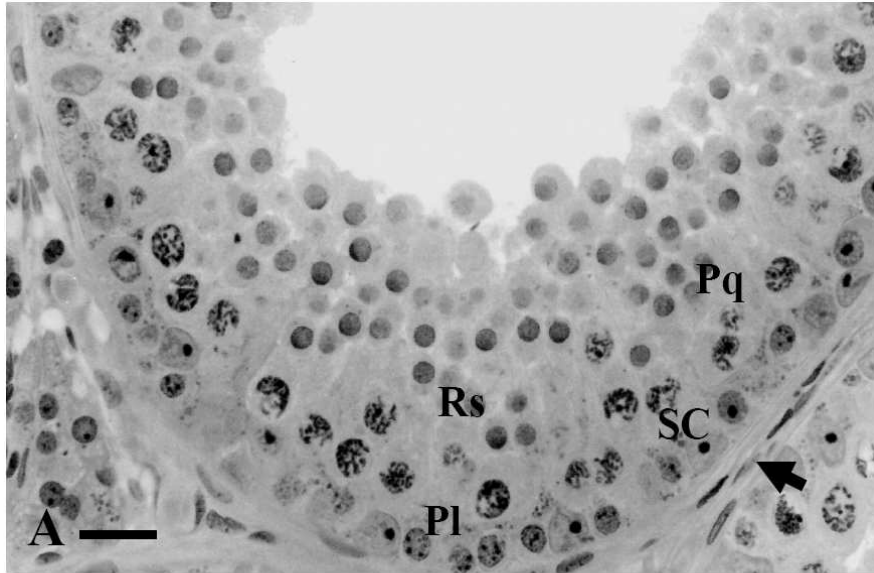
O exame ultraestrutural dos testículos dos animais tratados mostrou túbulos seminíferos caracterizados pela presença de vacúolos e várias mitocôndrias com ausência de matriz, além de aglomerados de corpos lisossomais (Fig. 10A). O

citoplasma das espermátides alongadas continha túbulos de retículo endoplasmático liso, vários complexos de Golgi e mitocôndrias degeneradas com corpos de mielina em seu interior, além de autofagossomos e corpos residuais (Fig. 10B-D). As espermátides arredondadas na fase de Golgi apresentaram ruptura da vesícula acrossomal (Fig. 10E). No espaço intertubular foram encontradas células de Leydig em processo de necrose,

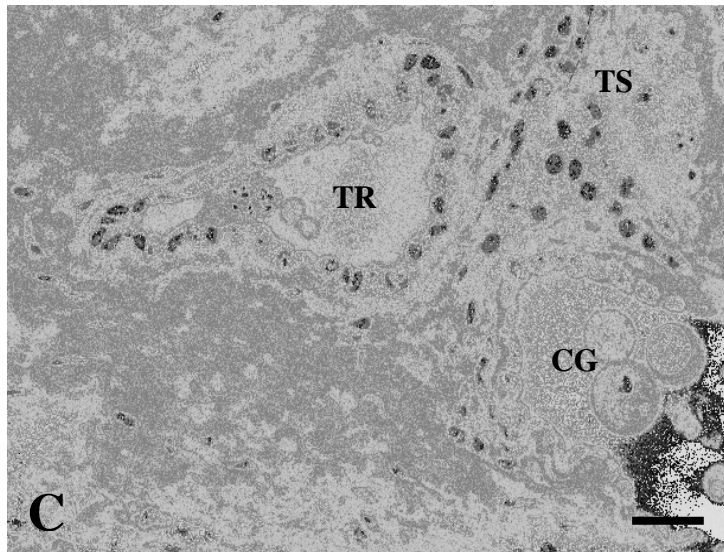
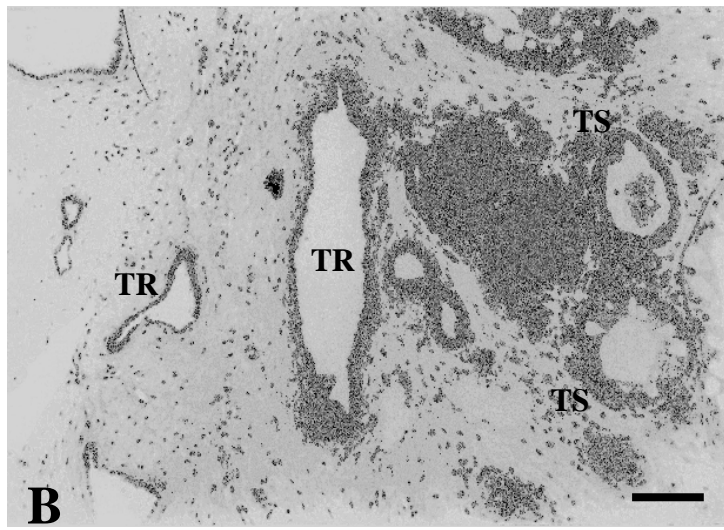
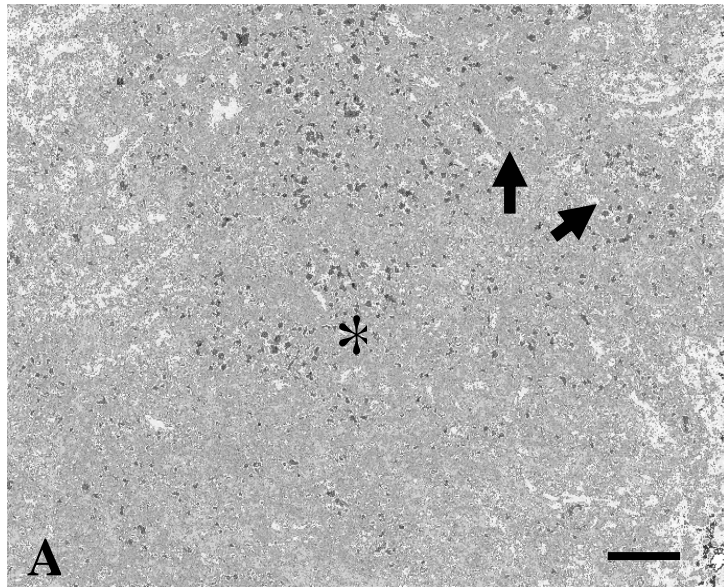
caracterizadas por mitocôndrias com ausência de matriz, contendo corpos de mielina, além da presença de autofagossomos (Fig. 11A). O núcleo mostrou condensação da cromatina e estruturas vacuolares. No estágio avançado de necrose, foi observado célula de Leydig com presença de retículo endoplasmático hipertrofiado e edemaciado (Fig. 11B,C).



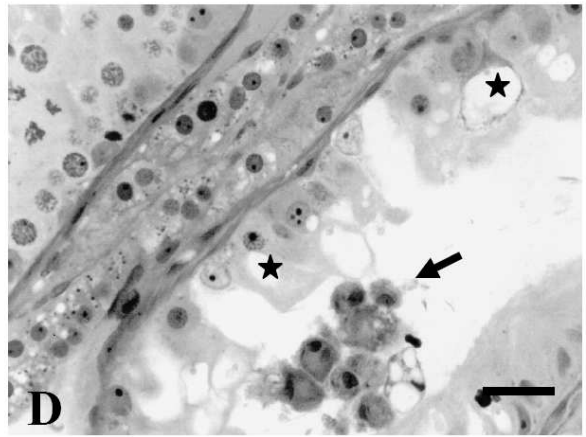
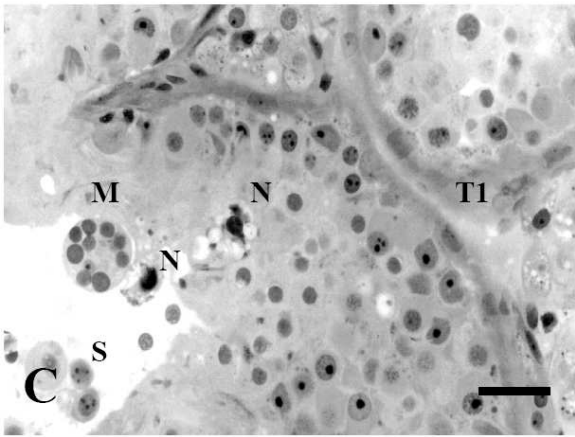
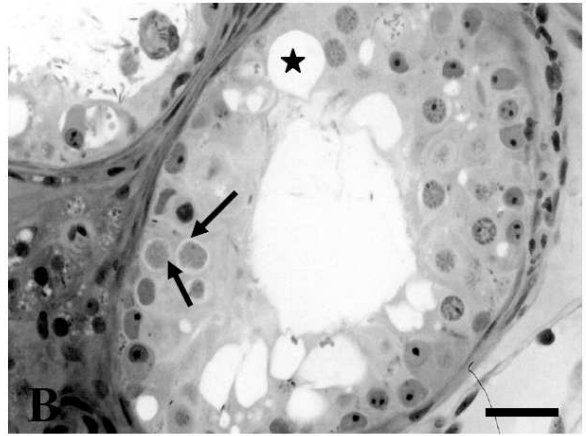
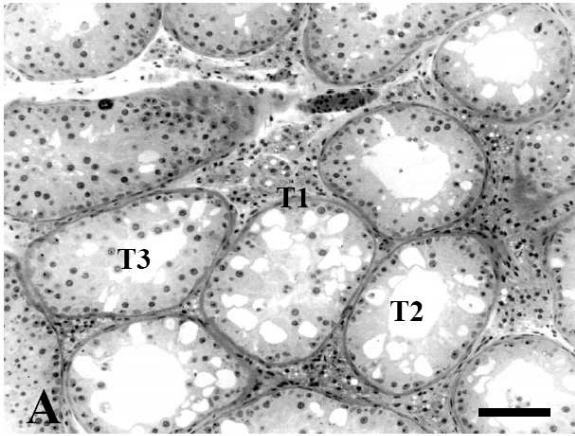
**Figura 4. A** – Epitélio seminífero de cão do grupo controle. Notar células de Sertoli (CS) e espermatócitos I em pré-leptóteno/leptóteno (PI) próximo à lâmina (seta) basal. Observar espermatócitos I em paquíteno (Pq) seguidos por espermátides arredondadas (Ar). **B** – Túbulo seminífero no estágio V do ciclo do epitélio seminífero e espaço intertubular. Células de Sertoli (cabeça de seta) e espermatócitos I em pré-leptóteno/leptóteno (PI) e espermatogônia B (B) próximo à lâmina basal (seta). Observar no espaço intertubular células de Leydig (CL) próximas ao espaço linfático (EL). Barras: 25µm



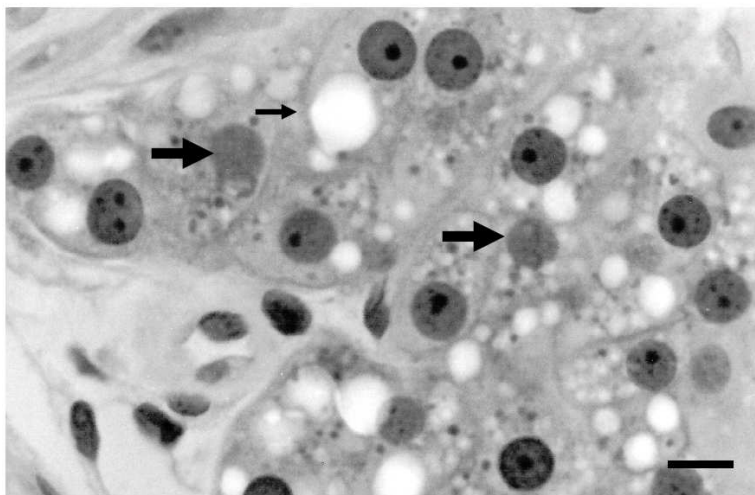
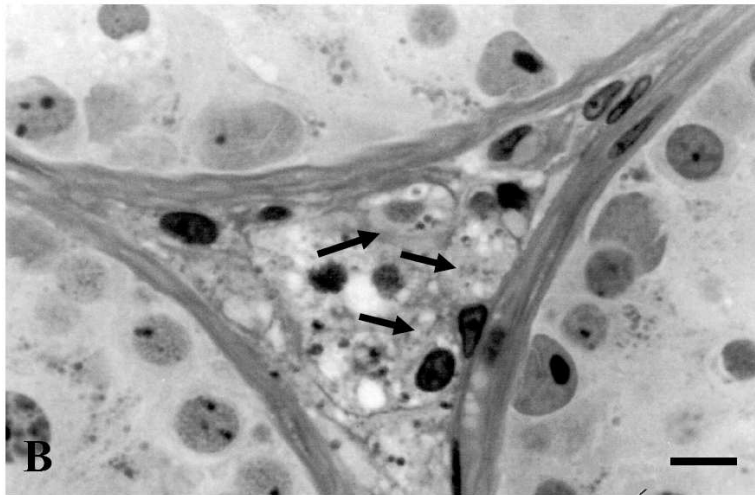
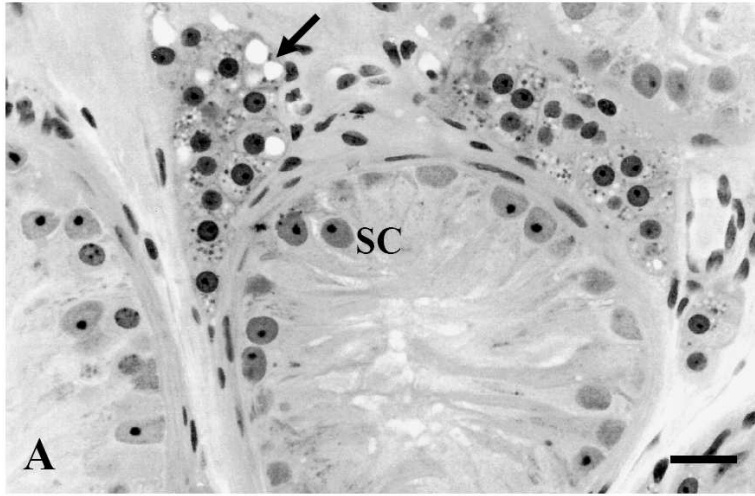
**Figura 5.** Testículo de cão 150 dias após a injeção intratesticular de solução à base de zinco. Região mais próxima ao local da injeção. **A** – Área de fibrose com intensa proliferação fibroblástica (cabeça de seta), túbulos atrofiados (seta) e deposição de colágeno no intertúbulo. Barra: 25µm. **B** – Área de mediastino testicular. Notar a presença de túbulos retos (TR) e de componentes da rede testicular ao lado de túbulos seminíferos em vários estágios de atrofia (TS). Barra: 25µm. **C** – Detalhe de túbulos retos (TR) próximo ao túbulo seminífero (TS). Notar células germinativas descamadas (CG). Barra: 100µm.



**Figura 6.** Testículo de cão 150 dias após a injeção intratesticular de solução à base de zinco. **A** – Graus variáveis de alterações no epitélio seminífero são observados nas secções transversais de túbulos seminíferos. Notar túbulos seminíferos com células germinativas descamadas no lúmen (T1), vacuolização de células de Sertoli (T2) e número reduzido de células germinativas (T3). Barra: 100µm. **B** – Túbulos seminíferos com presença de vacuolização de células de Sertoli (estrela), necrose de espermatócito I em paquíteno (seta) e ausência de espermátides arredondadas. Barra: 25µm. **C** – Túbulo seminífero com presença de células gigantes multinucleadas (S) e necrose (N) de espermátides arredondadas e descamação de espermátides no lúmen (Ar). Barra: 25µm. **D** – Detalhe do túbulo seminífero com presença de descamação de células necróticas no lume (seta) e vacuolização de células de Sertoli (estrela). Barra: 25µm.

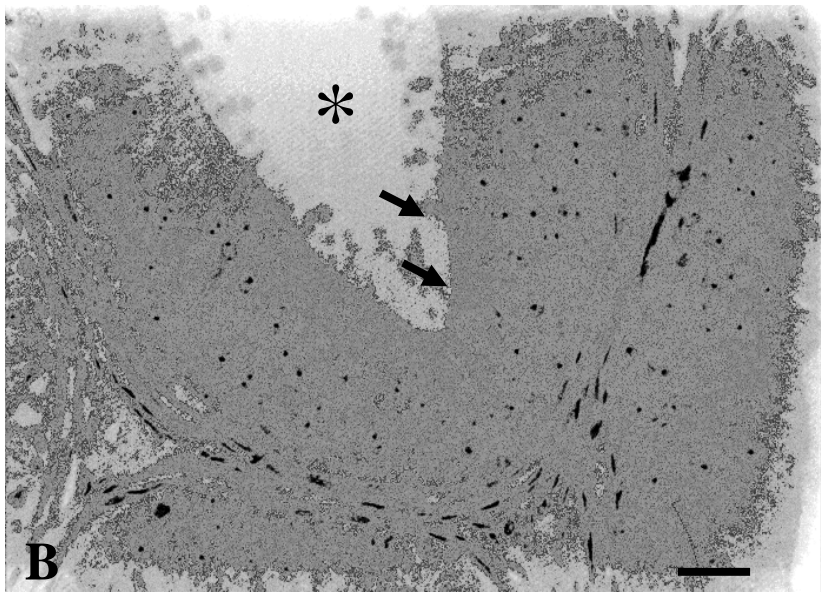
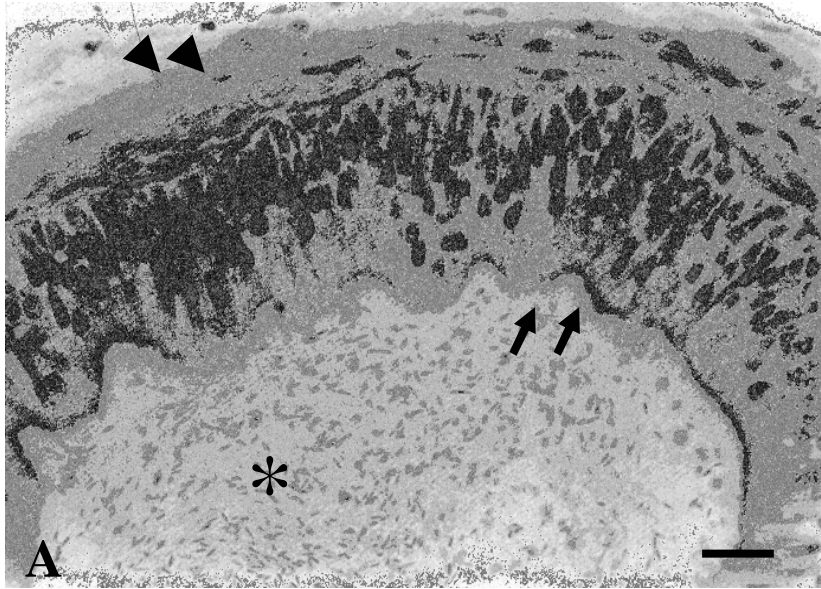


**Figura 7.** Achados histológicos em testículos de cães 150 dias após a injeção intratesticular de solução à base de zinco. **A** – Notar túbulos seminíferos com presença de células de Sertoli apenas (CS) e espaço intertubular mostrando células de Leydig com citoplasma vacuolizado que sugere degeneração lipídica (seta). **B** – Detalhe do espaço intertubular mostrando células de Leydig (seta) em vários graus de morte celular por necrose. **C** – Detalhe de células de Leydig em processo de esteatose. Notar vacúolos (seta pequena), núcleo mostrando opacidade e ausência de nucléolo que indica um processo de cariólise (seta grande). Barras: 25µm

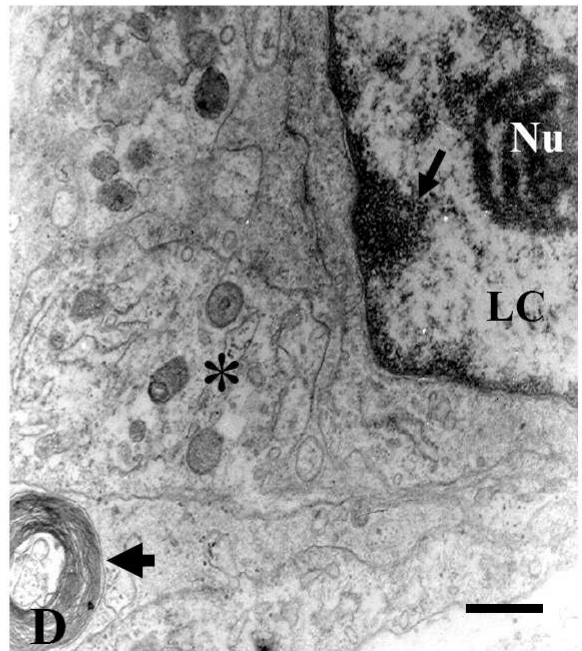
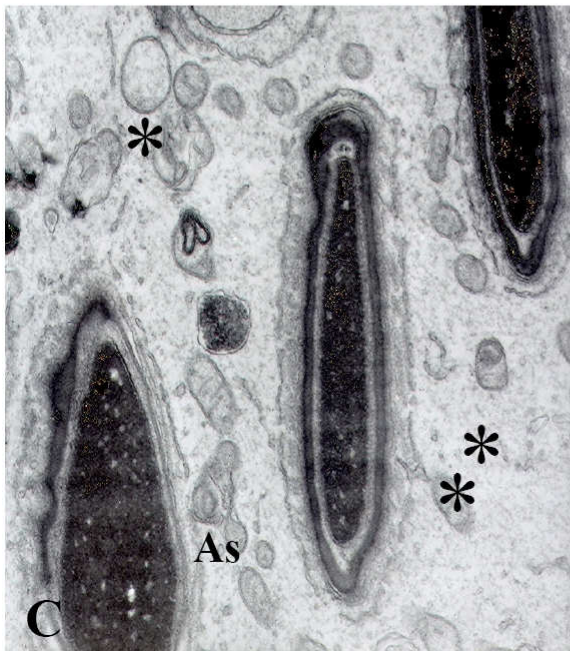
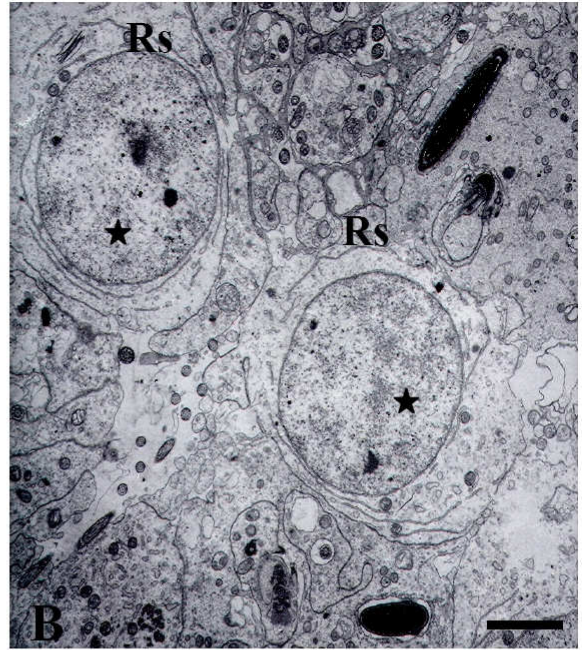




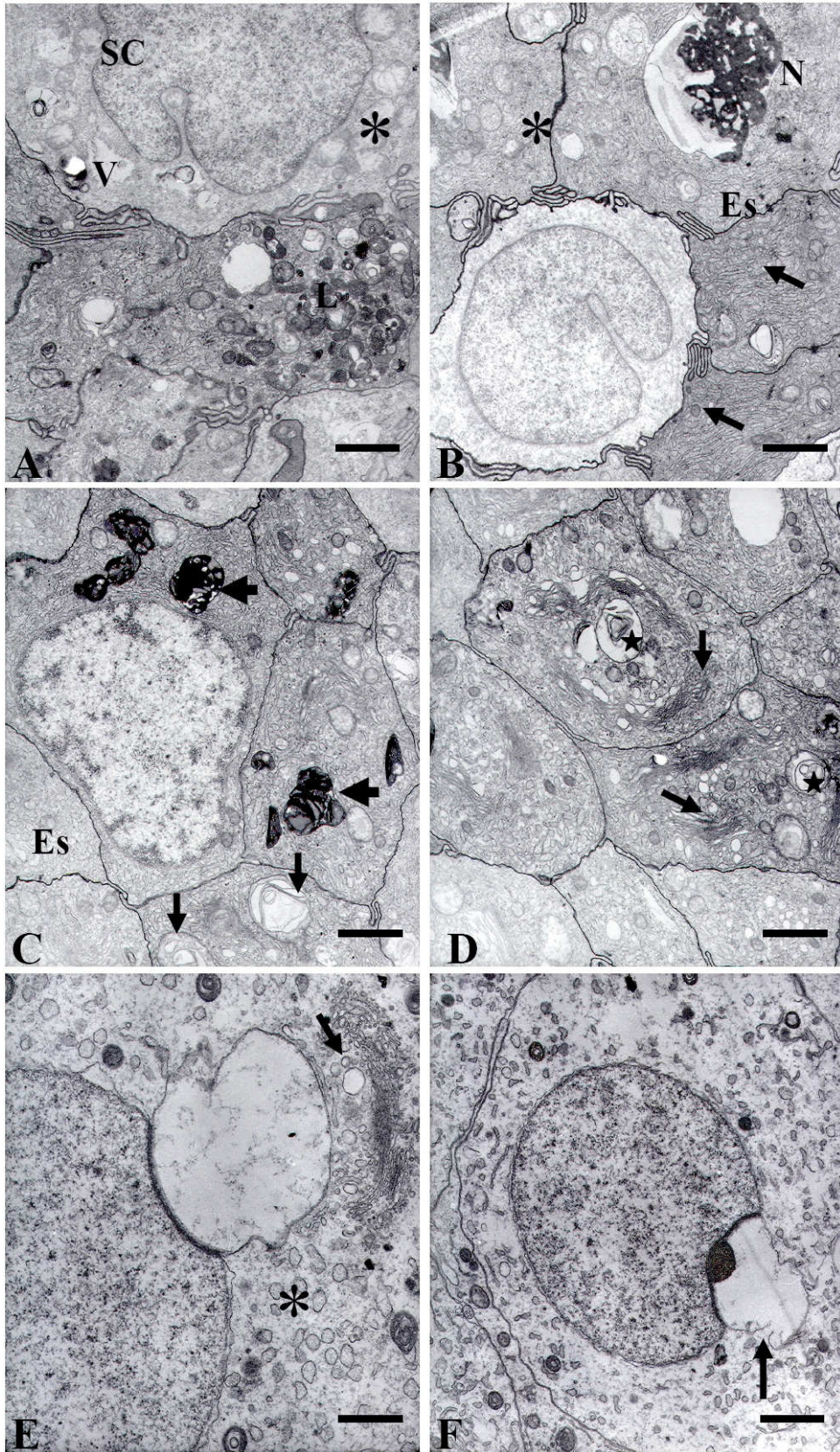
**Figura 8.** Achados histológicos em epidídimos de cães. **A** - Detalhe do ducto epididimário de cão do grupo controle. Notar epitélio de revestimento característico (setas). Abaixo do epitélio presença de camada muscular lisa (cabeças de seta). Lúmen contendo espermatozóides (asterisco). **B** - Detalhe do ducto epididimário de cão do grupo tratado. Notar epitélio de revestimento com espessura normal (setas) e ausência de espermatozóides no lúmen (asterisco). Barras: 25µm.



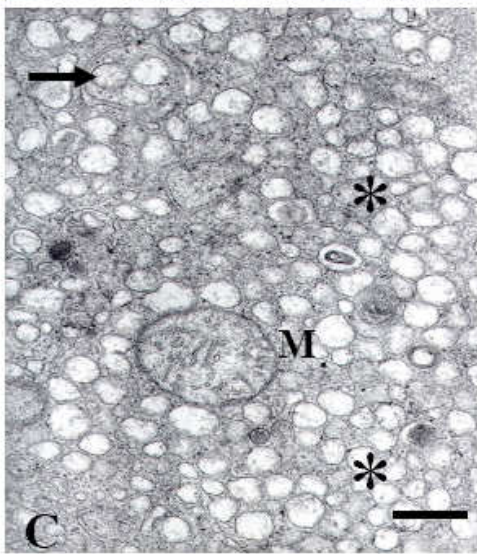
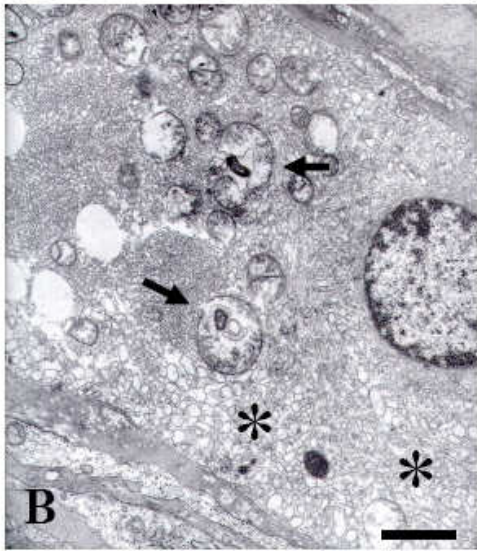
**Figura 9.** Micrografias eletrônicas de testículo de cães do grupo controle. **A** – Duas células de Sertoli (CS) próximas a lâmina basal do túbulo seminífero, uma contendo nucléolo distinto (Nu). Notar a endentação do envelope nuclear (seta). **B** – Espermatídes arredondadas (Ar) mostrando euocromatina esparsa (estrela). **C** – Citoplasma de célula de Sertoli com presença de mitocôndrias (asterisco) e espermatídes alongadas (Ea). **D** – Espaço intertubular mostrando núcleo de célula de Leydig com nucléolo evidente (Nu) e heterocromatina periférica associada com o envelope nuclear (seta). Observe também a presença de retículo endoplasmático rugoso (cabeça de seta) e mitocôndrias (asterisco). Barras: 0,5µm



**Figura 10.** Ultraestrutura do túbulo seminífero de cão, 150 dias após injeção intratesticular de solução à base de zinco **A** – Célula de Sertoli em degeneração (CS). Notar vacuolização de célula de Sertoli (V) e várias mitocôndrias com ausência de matriz (asterisco). Observar presença de corpos lisossomais na célula circunvizinha (L) **B** – Detalhe de componentes do citoplasma de espermatídes alongadas (Ea) mostrando retículo endoplasmático liso (setas) e mitocôndrias em processo de degeneração (asterisco). Notar necrose celular (Ne). **C** – Detalhe de componentes de espermatídes alongadas (Ea). Notar presença de autofagossomos (setas) e corpos residuais (cabeças de seta). **D** – Detalhe de espermatíde alongada mostrando vários aparelhos de Golgi (setas) e corpos de mielina (estrela). **E** – Espermatíde em fase de Golgi mostrando vacuolização do aparelho de Golgi e mitocôndrias degeneradas (asteriscos). **F** – Espermatíde arredondada mostrando lise da vesícula acrossomal (seta). Barras: 1,0µm



**Figura 11.** Micrografias eletrônicas do espaço intertubular, 150 dias após injeção intratesticular de solução à base de zinco. **A** – Célula de Leydig (CL) em processo de necrose caracterizada pela presença de mitocôndrias com ausência de matriz (asterisco), corpos lisossomais (L) e autofagossomos (cabeça de seta). O núcleo contém estruturas vacuolares (seta) e o nucléolo mostra condensação de cromatina (C). **B** – Célula de Leydig em estágio avançado de necrose celular mostrando retículo endoplasmático liso (asterisco) edemaciado e hiperplasiado. Notar mitocôndrias com presença de corpos de mielina no seu interior (setas). **C** – Detalhe do retículo endoplasmático liso (asterisco) com edema e vacuolização, autofagossomos (seta) e mitocôndrias (asterisco). Barras: 0,5µm





## 5.7. Análises morfométricas dos testículos

As análises morfométricas dos testículos são mostradas nas tabelas 15, 16 e 17. Pode-se observar o percentual ocupado pelos diversos componentes do parênquima testicular.

### 5.7.1. *Peso testicular e epididimário.*

Apesar da diminuição do diâmetro testicular dos grupos tratados ( $P < 0,05$ ), não houve diferença de peso testicular entre os grupos ( $P > 0,05$ ). Os pesos epididimários também não diferiram significativamente entre os grupos ( $P > 0,05$ ) (Tab. 15, Anexo).

### 5.7.2. *Altura do epitélio e diâmetro tubular*

Na Tabela 15 (Anexo), analisou-se o diâmetro tubular e a altura do epitélio seminífero segundo o grupo. Nos resultados relacionados à altura do epitélio não se verificou alteração entre os grupos experimentais, apesar das médias da altura do epitélio apresentarem variação de 70  $\mu\text{m}$  no grupo tratado jovem até 77  $\mu\text{m}$  no grupo tratado adulto. Em relação ao diâmetro tubular os grupos tratados apresentaram diminuição significativa ( $P < 0,05$ ) quando comparado ao grupo controle.

### 5.7.3. *Contagem celular*

Houve diminuição significativa ( $P < 0,05$ ) do número de células germinativas por seção transversal de túbulo seminífero nos grupos tratados (espermátócitos em pré-leptoteno, espermátócitos em paquíteno e espermátides arredondadas) quando comparado ao grupo controle (Tab. 16, Anexo). O índice de células de Sertoli (ICS), utilizado para determinar a capacidade de suporte dessas células, não diferiu entre os grupos, apesar da diminuição significativa ( $P < 0,05$ ) do número de espermátides arredondadas observado nos grupos tratados. O número de espermatogônias não diferiu significativamente entre os grupos ( $P > 0,05$ ), embora numericamente os valores tenham sido menores para os grupos tratados (Tab. 16, Anexo).

### 5.7.4. *Proporção volumétrica*

Na Tabela 17 (anexo) comprovou-se diminuição significativa da porcentagem de epitélio seminífero e aumento significativo da porcentagem de túnica própria para os grupos tratados quando comparados com o grupo controle ( $P < 0,05$ ). A porcentagem de tecido conjuntivo aumentou e a de vasos linfáticos diminuiu no testículo esquerdo dos grupos tratados ( $P < 0,05$ ). Entre os lados direito e esquerdo não se comprovou diferença significativa para qualquer das variáveis analisadas nos grupos tratados ( $P > 0,05$ ).

## 6. DISCUSSÃO

### *Quais as reações adversas observadas à avaliação clínica dos animais submetidos à injeção intratesticular de zinco?*

No presente estudo, não foi observada vocalização dos animais durante a administração da solução à base de zinco, uma vez que as terminações nervosas deste órgão estão localizadas no escroto, externamente ao testículo (Setchell *et al.*, 1994). A sedação dos animais ocorreu apenas para facilitar a administração do medicamento de forma acurada que, segundo Harper (2004), deve ser feita o mais próximo possível da cabeça do epidídimo, pois coincide com a proximidade da *rete testis*, o que facilita a difusão da solução por todo o testículo e epidídimo.

Não foi observado durante a avaliação clínica, qualquer sinal de irritação ou comprometimento da pele do escroto dos animais nos primeiros três dias após o tratamento com zinco, bem como durante todo o período de experimentação. Contudo, um cão do grupo tratado adulto desenvolveu irritação do escroto e dermatite aos 30 dias após o tratamento. Provavelmente, as condições do canil (umidade, piso áspero) podem ter contribuído para o desenvolvimento da lesão, uma vez que se tratava de um cão da raça Daschund, de estatura baixa. Em um estudo realizado por Wang (2002), foi observada irritação escrotal em apenas 2% dos cães submetidos à injeção intratesticular de gluconato de zinco. A avaliação foi realizada nos três primeiros dias após

a injeção de zinco e nenhum dos animais foi submetido a tratamento local, uma vez que as lesões não se agravaram. A solução à base de zinco utilizada no presente estudo, cujo pH é neutro e a composição é semelhante àquela dos tecidos e fluidos testiculares do macho, pode ter contribuído para a ausência de reação cutânea local observada neste experimento (Fahim *et al.*, 1993; Toxicological..., Atlanta-EUA, 2005).

Os animais do grupo tratado, jovens e adultos, desenvolveram um aumento evidente do diâmetro testicular durante os primeiros dias após a injeção de zinco, caracterizado por edema e eritema devido ao aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação. Foi observado também aumento da temperatura local. Estas alterações já eram esperadas por causa do desencadeamento de uma resposta inflamatória local, sendo que três dias após o tratamento este aumento de volume não foi mais observado macroscopicamente, sendo caracterizado apenas por meio de mensuração com paquímetro. Além disso, não foi observado aumento de temperatura corporal, nem aumento da sensibilidade testicular à palpação, alterações que também caracterizam uma resposta inflamatória local aguda (Voltarelli, 1994). Wang (2002) relatou aumento da sensibilidade à palpação do escroto no primeiro dia após a injeção intratesticular de gluconato de zinco em 6% dos animais, que foi decrescendo até o terceiro dia após o tratamento.

***A solução à base de zinco administrada por meio de injeção intratesticular é absorvida pelo organismo do animal? Há algum efeito sistêmico?***

Como não há relato na literatura consultada sobre os efeitos sistêmicos da injeção intratesticular de zinco no organismo, foram utilizados como comparativo os efeitos causados pela exposição cutânea ao zinco. As variáveis bioquímicas analisadas encontravam-se dentro dos valores de referência para a espécie canina segundo Allen *et al.* (1998). Optou-se por avaliar essas variáveis logo após a injeção de zinco e então a cada 30 dias para se verificar possíveis alterações de caráter agudo ou crônico que pudessem comprometer a saúde dos animais.

Há relatos na literatura da absorção do zinco via cutânea, mas seu mecanismo não está

claramente definido. A quantidade de zinco utilizada, a forma de apresentação e o veículo administrado juntamente com o zinco influenciam a absorção do mesmo (Agren *et al.*, 1991). O gluconato de zinco possui maior solubilidade em água quando comparada às outras formas de apresentação do zinco (Agren *et al.*, 1991). Assim, poder-se-ia aventar que esta propriedade aumentaria a velocidade de absorção do mesmo para a corrente sanguínea, o que poderia causar efeitos adversos sistêmicos no animal tratado. Tais hipóteses não foram evidenciadas no presente estudo. Acredita-se que a injeção intratesticular de zinco causa danos que se limitam à região testicular, uma vez que o veículo utilizado na composição da droga possui propriedades que retêm o zinco no órgão (RH Douglas, comunicação pessoal).

Muitos medicamentos empregados rotineiramente na clínica podem apresentar como reação colateral indesejável, a agressão ao fígado, o que poderá limitar seu uso e os benefícios esperados. O dano hepático induzido por medicamentos pode ser hepatocelular, o que se traduzirá por aumento das transaminases oxaloacética e pirúvica (TGO e TGP), ou colestático, o que levará ao aumento de bilirrubinas (particularmente da direta), da fosfatase alcalina e da gama-glutaril transferase (G-GT) (Bertolami, 2005). Já uma possível ação nefrotóxica do medicamento pode ser evidenciada por meio da mensuração da uréia e creatinina no sangue (Toxicological..., Washington-EUA, 2005).

Os resultados da avaliação bioquímica das enzimas hepáticas (TGO, TGP e fosfatase alcalina) e de uréia e creatinina observados neste estudo encontravam-se dentro dos valores fisiológicos para a espécie canina segundo Allen *et al.* (1998), em todos os momentos avaliados. Este fato demonstrou que a função hepática dos animais não foi afetada pelo tratamento com zinco, apesar de Bertolami (2005) citar a ação hepatotóxica de alguns medicamentos utilizados na rotina clínica. Llobet *et al.* (1988) avaliaram a função hepática e renal de ratos submetidos a overdoses de acetato de zinco e não encontraram alterações histopatológicas ou das enzimas hepáticas. Entretanto, como a urina consiste em uma das vias de excreção do zinco, foram observadas alterações do epitélio glomerular e túbulos proximais, além do aumento da concentração plasmática de creatinina e uréia. No presente estudo, não foi

observado o aumento destes marcadores o que demonstra a ausência de nefrotoxicidade da injeção intratesticular de zinco.

Os estádios iniciais da reação inflamatória incluem várias alterações denominadas resposta de fase aguda (Gruys *et al.*, 1994). No sítio inflamatório ocorrem modificações que favorecem a liberação de citocinas, resultando em respostas sistêmicas como febre, leucocitose e síntese de proteínas na fase aguda (Voltarelli, 1994). Ressalta-se a importância do proteinograma sérico para diagnóstico e monitoramento de várias enfermidades. O hemograma e o proteinograma, embora não forneçam informações específicas, podem auxiliar no diagnóstico e prognóstico da inflamação (Orsini, 1991; Luna, 1994). Um marcador da atividade inflamatória é o aumento na circulação das proteínas de fase aguda produzidas pelo fígado, como a proteína C reativa (PCR), a alfa 1 glicoproteína ácida e o fibrinogênio. O fibrinogênio é uma glicoproteína, componente fundamental da cascata de coagulação. Elevações em sua concentração plasmática podem ocorrer em resposta a inflamações, infecções, traumas e estresse emocional. O fibrinogênio aumenta duas a quatro vezes sua concentração sérica durante a resposta inflamatória aguda (Voltarelli, 1994; Allen *et al.*, 1998).

Apesar do aumento da concentração de fibrinogênio observado dois dias após a injeção de zinco, os valores mostraram-se dentro do padrão de normalidade para a espécie canina. Além deste marcador, à análise do hemograma dos animais tratados, não foi observada leucocitose ou diminuição da concentração de albumina sérica que são características da resposta inflamatória aguda sistêmica como citado por Orsini (1991) e Luna (1994). O grupo controle também apresentou o mesmo comportamento para as variáveis bioquímicas discutidas acima. Wang (2002) também não encontrou alteração significativa no hemograma de cães submetidos à injeção intratesticular de gluconato de zinco.

#### ***Quais as características do espermograma de animais submetidos à injeção intratesticular de solução à base de zinco?***

A avaliação do sêmen é o primeiro indicador da eficácia do tratamento. A espermiogênese foi interrompida em todos os

animais tratados, exceto em dois animais do grupo adulto. Entretanto, estes apresentaram concentração espermática  $<10 \times 10^6$  espermatozoides/ml, valor que os classifica como oligospermicos, sendo este valor considerado abaixo da média necessária para uma cobertura fértil. Para fins de avaliação da eficácia do tratamento neste estudo, valores de concentração espermática  $<10 \times 10^6$  espermatozoides/ml obtidos ao final do experimento comprovaram o sucesso do tratamento. Wang (2002), considerou a injeção intratesticular de zinco em cães eficaz ao obter resultados de concentração espermática menores que  $20 \times 10^6$  espermatozoides/ml ao final do experimento. No presente estudo, as coletas de sêmen foram realizadas semanalmente até 150 dias após o tratamento, período que compreendeu dois e meio ciclos espermatogênicos (Foote *et al.*, 1972; Kawakami *et al.*, 1991; França e Russel, 1998; Johnston *et al.*, 2001; Hafez e Hafez, 2004), desta forma ficou evidenciado que as alterações seminais observadas não se restringiram a apenas um ciclo espermatogênico.

Os resultados dos espermogramas obtidos no presente estudo mostram que a solução à base de zinco atuou sobre a espermatogênese, causando a interrupção da mesma, com conseqüente azoospermia, tanto dos cães jovens, quanto dos adultos. Nishimura *et al.* (1992) e Wang (2002) relataram a utilização de injeção intratesticular de agentes esclerosantes, com obtenção de azoospermia definitiva em cães, entretanto, os trabalhos limitaram-se à observação em animais pré-puberes.

#### ***Como a solução à base de zinco age no testículo?***

##### ***Achados histopatológicos e ultraestruturais***

Os achados histopatológicos mostram que a injeção intratesticular da solução à base de zinco foi capaz de interromper a espermatogênese em cães. Segundo Nishimura *et al.* (1992), Johnston *et al.* (2001) e Wang (2002), a injeção intratesticular de um agente esclerosante leva à resposta imunológica devido à ruptura da barreira de células de Sertoli com conseqüente inflamação local e liberação de antígenos testiculares. Mann e Lutwak-Mann (1981) e Saxena *et al.*, (1989) relatam que, em resposta à injeção intratesticular de um agente esclerosante, o sistema imunológico do cão destrói permanentemente o epitélio

seminífero do testículo o que resulta na esterilidade do animal.

Estudos anteriores utilizando-se injeção intratesticular de zinco em cães mostraram eficácia apenas em cães entre 3-10 meses de idade. Provavelmente, a razão para se restringir a utilização da droga a apenas animais jovens tenha sido devido ao volume testicular, que é menor em animais pré-púberes quando comparado aos animais adultos e a distribuição da droga no testículo tenha sido facilitada por esta característica anatômica. No presente estudo, a injeção intratesticular da solução à base de zinco induziu a alterações testiculares em ambos os animais jovens e adultos, apesar do volume testicular ser diferente. Segundo Immegart e Threlfall (2000), o grau de difusão da droga depende da solubilidade e das propriedades de ligação dos seus componentes. Acredita-se que o veículo usado na composição da solução à base de zinco possui propriedades que permitiram a difusão rápida da droga por todo o testículo e o mesmo atuou de forma semelhante em animais jovens e adultos. Adicionalmente, a injeção intratesticular de zinco causa danos que se limitam à região testicular, uma vez que o veículo utilizado na composição da droga possui propriedades que retém o zinco no órgão (RH Douglas, comunicação pessoal).

As alterações histopatológicas foram maiores em áreas próximas ao local da injeção, o que pode estar relacionado com a concentração da droga no local ou a uma característica físico-química inerente à droga (Immegart e Threlfall, 2000), uma vez que a injeção de solução salina não resultou no desenvolvimento de lesões durante o mesmo período de avaliação. Apesar de um menor grau de alterações morfológicas observadas na região contrária à injeção da droga, a espermatogênese foi afetada consideravelmente, sendo caracterizada pela presença de um número reduzido de células germinativas e presença de espermátides arredondadas descamadas inviáveis.

Além de romper a barreira de células de Sertoli e desencadear uma reação inflamatória local com liberação de antígenos testiculares, a exposição à concentração elevada de zinco aumenta o nível de leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e todos os tipos de linfócitos, com predominância de CD8 (Blanc *et al.*, 1991). O zinco afeta o processo de fagocitose dos

macrófagos e leucócitos polimorfonucleares e interfere com a lise mediada por células *natural killer* e ação citolítica das células T (Sena e Pedrosa, 2005). Acredita-se que o dano causado pela injeção intratesticular de zinco seja semelhante ao que ocorre numa orquite auto-imune. Mann e Lutwak-Mann (1981) descrevem a orquite auto-imune como uma patologia que se caracteriza pela produção de anticorpos contra os próprios antígenos testiculares do macho. Em consequência desta resposta, a espermatogênese é seriamente afetada com presença de lesões no epitélio seminífero e destruição dos espermátócitos, espermátides e espermatozóides, o que resulta na esterilidade do animal.

Os achados histológicos e ultraestruturais encontrados mostram que a injeção intratesticular de zinco bloqueou a espermatogênese. Os resultados caracterizaram-se pela presença de alterações, tanto nas células somáticas (Sertoli e Leydig), quanto nas células da linhagem germinativa. Estas alterações comprometeram a função destas células, bem como levaram à atrofia dos túbulos seminíferos com formação de células multinucleadas gigantes que resultam da incapacidade das células de Sertoli de dar suporte à linhagem germinativa (Russel *et al.*, 1990a; Pelleniemi *et al.*, 1993; Russel e Griswold, 1993; Shimomura *et al.*, 2004). O tratamento comprometeu ambos os compartimentos testiculares. À análise ultraestrutural das células de Leydig, foi identificado que alguns dos vacúolos citoplasmáticos observados na célula correspondiam ao retículo endoplasmático edemaciado. Para Zirkin *et al.* (1980), trata-se de um mecanismo de defesa compensatório da célula que sofreu uma injúria. Resultados semelhantes foram observados após tratamento com agentes que causam ruptura dos microtúbulos, interferindo assim com a capacidade dos microtúbulos de estabilizarem várias funções dentro da célula (Saraiva *et al.*, 2006). As células germinativas apresentaram alterações morfológicas características de necrose, tais como danos mitocondriais e ruptura da membrana com liberação de conteúdo intracelular, o que levou à resposta inflamatória, com edemaciamento e alteração das células circunvizinhas (Hirsch *et al.*, 1997). Estas alterações celulares poderiam ser explicadas por meio das propriedades do zinco de romper a barreira de células de Sertoli o que leva à uma reação inflamatória local e liberação de antígenos testiculares, segundo relatos de

Immegart e Threlfall (2000) e Johnston *et al.* (2001). O zinco também tem a capacidade de aumentar a resposta imunológica e inflamatória de um organismo (Fraker *et al.*, 1978; Delafuente 1991; Sena e Pedrosa, 2005). Pode-se supor que a injeção intratesticular de zinco causou uma reação imunológica exacerbada e a ação inapropriada de células do sistema imunológico sobre as células do próprio organismo (auto-imunidade) resultou numa reação inflamatória aguda que levou à injúria celular, fato que também foi citado por Mann e Lutwak-Mann (1981).

Alguns tratamentos interrompem a espermatogênese que pode retornar a sua característica original se um número apropriado de espermatogônias foi mantido intacto (Immegart e Threlfall, 2000; Muson *et al.*, 2004). A razão pelas quais as espermatogônias tornam-se incapazes de repovoarem o túbulo seminífero permanece sem resposta (Russel *et al.*, 1990a). No presente estudo, o fato da maioria dos túbulos seminíferos conter apenas células de Sertoli com ausência de espermatogônias, sugere a irreversibilidade do processo e eficácia da solução à base de zinco como agente esterilizante para cães. Entretanto, mais pesquisas necessitam ser desenvolvidas para se estabelecer a segurança e irreversibilidade a longo prazo.

### **Morfometria tubular**

A partir da análise dos números corrigidos de células germinativas por secção transversal de túbulo seminífero no estágio V, foi constatado que a administração intratesticular de zinco, além das alterações já descritas, promoveu um decréscimo no número de células germinativas. Adicionalmente, observou-se diminuição do diâmetro tubular dos animais tratados. Este fato pode ser corroborado pela correlação alta e significativa ( $r=0,95$ ;  $p<0,05$ ) existente entre estes parâmetros, como citado por Silva Jr. (2000). No presente estudo a avaliação da altura do epitélio dos túbulos seminíferos foi realizada utilizando-se para isso túbulos que preservaram suas características morfológicas normais. Aqueles com ausência de epitélio, circundados apenas por células de Sertoli ou apresentando poucas células germinativas não foram utilizados para avaliação. Este fato pode ter contribuído para a ausência de significância dos resultados, apesar do declínio significativo do número de células que integram o epitélio seminífero dos animais tratados.

Nos animais investigados no presente estudo, o peso testicular variou entre 7,34 e 8,17g. Estes valores ficaram abaixo do intervalo citado por Woodall e Johnstone (1988) e Paula (1992), o que se justifica pela variabilidade dos animais utilizados no experimento. Em mamíferos, é comum observar diferenças de até 50% para o peso testicular em indivíduos de uma mesma espécie com idades semelhantes (França e Russel, 1998). O peso testicular não diferiu entre os grupos experimentais devido a não homogeneidade da amostra causada pela variação de peso dos animais dentro do mesmo grupo. Por outro lado, foi observada diminuição significativa do diâmetro testicular, variável que, segundo Olar *et al.* (1983) e Amann (1986), possui alta correlação com o peso testicular ( $r > 0,75$ ), que associado aos achados histopatológicos e histomorfométricos indicam o comprometimento da espermatogênese e a eficiência do tratamento com zinco intratesticular na esterilização de cães.

O peso do epidídimo tem correlação direta com o peso testicular e produção espermática. No presente estudo, a diminuição do peso epididimário de 20% para os grupos tratados não foi significativa e também pode estar relacionada com a variação de peso encontrada para a espécie. Entretanto, os animais tratados não tinham espermatozóides no ducto epididimário, o que indica a eficiência do tratamento com zinco. A ausência de espermatozóides no lúmen do ducto epididimário também foi relatada por Fahim *et al.* (1993), ao injetar gluconato de zinco na cauda do epidídimo de cães. Os mesmos autores também descreveram aumento da quantidade de tecido conjuntivo fibroso, principalmente na região da cauda do epidídimo, o que não foi observado no presente estudo. Pineda *et al.* (1977) utilizando injeções intraepididimária de uma solução de gluconato de clorexidina a 1,5% em DMSO a 50%, evidenciaram ao exame histopatológico, presença de granulomas espermáticos e alteração do epitélio de revestimento.

Já o índice de células de Sertoli (ICS) dos animais tratados, embora numericamente menor, não apresentou diferença do encontrado para o grupo controle. Os ICS dos grupos tratados observados no presente estudo foram menores que os relatados por Woodall e Johnstone (1988) e Paula (1992) que, ao utilizarem cães SRD de diferentes faixas etárias, encontraram índices entre

6,1 e 9,8 para o estágio V do ciclo do epitélio seminífero.

A injeção intratesticular de zinco em cães promoveu alterações entre as proporções volumétricas dos componentes testiculares. Desta forma, como principais modificações podem ser citadas que o valor percentual de epitélio seminífero diminuiu entre seis e 10%, enquanto o percentual referente à membrana basal aumentou cerca de 3% nos grupos tratados. O espessamento da membrana basal é um achado comum em testículos anormais como, por exemplo, nos casos de criptorquidismo em ratos (França *et al.*, 2000). Acredita-se que esta alteração esteja relacionada com a atrofia dos túbulos seminíferos (Kurohmaru *et al.*, 1990). No presente estudo, foi observada presença de membrana basal espessada envolvendo, tanto túbulos seminíferos aparentemente normais, quanto os atrofiados, o que sugere que esta alteração precede a diminuição do número de células germinativas. Este fato também foi observado por França *et al.* (2000) ao estudarem a ação da cimetidina sobre os testículos de ratos.

#### ***A solução à base de zinco afeta a concentração de testosterona plasmática?***

Os resultados encontrados no presente estudo evidenciaram o declínio da concentração de testosterona plasmática nos cães submetidos à injeção intratesticular de zinco, entretanto este não foi significativo quando comparado com o grupo controle. Acredita-se que a ausência de significância tenha acontecido devido a grande variabilidade individual da concentração de testosterona apresentada pelo mesmo cão, em diferentes momentos do dia; demonstrada pelos altos valores de coeficiente de variação (CV). Vários autores citam que uma vez que a testosterona apresenta comportamento flutuante devido à sua liberação episódica pelo testículo, várias amostras do mesmo indivíduo precisam ser coletadas durante o dia, em intervalos frequentes, para se ter acesso às elevações episódicas da mesma no sangue (Mann e Lutwak-Mann, 1981; Sharpe, 1994; Huhtaniemi e Toppari, 1998). No presente estudo, as coletas de sangue foram realizadas uma vez ao dia, respeitando-se apenas o horário (sempre pela manhã) e o jejum dos animais, o que pode ter interferido com os resultados esperados.

O declínio na concentração de testosterona plasmática foi da ordem de 40 a 60%, atingindo, em alguns momentos, até 80% comparado aos valores observados antes da injeção intratesticular de zinco. Entretanto estes valores ainda estão acima daqueles observados nos cães submetidos a orquiectomia. Segundo Mann e Lutwak-Mann (1981) e Christiansen (1988) em machos intactos a concentração de testosterona oscila entre 0,4 a 6ng/ml de plasma, enquanto nos machos castrados esta é indetectável.

Sobre as doenças andrógenos-dependentes, os carcinomas prostáticos ocorrem em maior grau nos animais castrados, o que demonstra tratar-se de uma patologia hormônio-independente (Johnston *et al.*, 2001). Já a hiperplasia prostática benigna é uma condição testosterona-dependente e ocorre frequentemente em cães idosos que não foram castrados (Teske *et al.*, 2002). Estudos mostraram diminuição em até 50% do peso da próstata dos cães tratados quando comparado ao grupo controle, 24 meses após a injeção de zinco (Neutersol, 2003).

Vários autores citam a ação do zinco sobre a metabolização da testosterona a DHT (Leatham, 1970) citado por Hidiroglou e Knipfel, 1984; Kellokumpu e Rajaniemi, 1981; Leake, 1984), por meio da inibição da ação da enzima 5 $\alpha$ -redutase. A diminuição da DHT contribui para a diminuição do tamanho da próstata, que é um órgão andrógeno-dependente. No presente estudo, o tamanho da próstata não foi avaliado. Entretanto, Wang (2002) cita diminuição do tamanho da próstata de animais foi evidente 24 meses após o tratamento com injeção intratesticular de zinco.

Sharpe (1994) e McLachlan (2000) relatam que o declínio da concentração de testosterona não afeta toda a espermatogênese, mas apenas um ou dois estádios do ciclo espermatogênico. No camundongo, estes estádios compreendem o VII e o VIII (Leblond e Clermont, 1952; Berndtson, 1977; Russel e Clermont, 1997; Ghosh *et al.*, 1991; Holdcraft e Braun, 2004) e na espécie canina este se caracteriza pelo estágio V (Foote *et al.*, 1972; Russel *et al.*, 1990a). Pode-se sugerir que o declínio na concentração de testosterona afetou o processo espermatogênico, caracterizado pela diminuição do número de células germinativas do estágio V do ciclo do epitélio seminífero, dos cães tratados. Este fato também foi por França *et al.* (1998) e Ghosh *et al.*,

(1991), que ao estudarem a regulação hormonal da espermatogênese em ratos, observaram comprometimento dos estádios VII e VIII do CES, após o declínio da testosterona.

### ***Houve mudança no comportamento dos animais?***

Para se determinar o efeito da redução da concentração de testosterona sobre as características sexuais secundárias dos animais faz-se necessário a realização de um estudo mais prolongado (Munson *et al.*, 2004). No presente estudo, foram avaliadas a libido diante de fêmea em estro e a agressividade diante de outros animais e não foi observada alteração do comportamento dos animais durante o período de avaliação que consistiu em três meses. Segundo Hopkins *et al.* (1976), o período mínimo para se observar qualquer alteração no comportamento após a castração é de seis meses. Há relatos na literatura de avaliações realizadas por um período de doze meses (Maarschalkerweerd *et al.*, 1997) e Neilson *et al.* (1997) citam que machos castrados podem não apresentar mudança alguma de comportamento. Acredita-se que o período de avaliação utilizado neste estudo não foi suficiente para a observação de qualquer alteração de comportamento dos animais. Além disso, o canil experimental não proporciona ambiente adequado para avaliação de tais variáveis.

## **7. CONCLUSÕES**

A) A injeção intratesticular com solução à base de zinco foi eficaz em causar a esterilização de cães jovens e adultos.

B) A injeção intratesticular com solução à base de zinco não causou desconforto ou reações adversas para o animal, evidenciado pela ausência de alterações clínicas e bioquímicas avaliadas durante o período de 150 dias;

C) Os espermogramas feitos mostram que a solução à base de zinco interferiu na espermatogênese, causando interrupção da mesma, com conseqüente azoospermia dos cães jovens e adultos, observada aos 60 dias e durando até o final do experimento, aos 150 dias;

D) A injeção intratesticular de zinco levou à diminuição da concentração de testosterona entre 40% e 60%, atingindo, em algumas amostras, até 80%, quando comparado aos valores basais encontrados antes da injeção.

E) O diâmetro testicular diminuiu até 8%, em avaliação realizada aos 150 dias após o tratamento;

F) O grau de dano celular causado pela injeção solução à base de zinco indica a irreversibilidade do processo e a eficácia do tratamento.

## **8. PERSPECTIVAS**

A cada dia, novas pesquisas vêm sendo realizadas com o intuito de se aprimorar técnicas de controle de fertilidade já existentes. Diante da literatura consultada, esta tese é o primeiro trabalho que relata de maneira aprofundada os efeitos da injeção intratesticular de um agente esclerosante, uma solução à base de zinco, em cães de diferentes idades. Além de proporcionar dados valiosos para a biologia da reprodução desta espécie, este estudo mostrou que a injeção intratesticular de zinco leva a alterações testiculares que resultam na esterilidade do mesmo. Adicionalmente, foi constatada a ausência de efeitos adversos. Acreditamos que esta tese possa servir de base para pesquisas futuras, principalmente no que concerne a eficácia do tratamento em longo prazo.

Desta forma, aliada à cirurgia convencional, surge uma outra possibilidade de esterilização, segura e com características bem mais simples, e tão eficiente quanto à clássica orquiectomia. Pela simplicidade da técnica e eficácia do medicamento, a esterilização com injeção intratesticular de zinco pode ser utilizada, em campanhas de castração, e contribuir para o controle efetivo da população de cães de rua, diminuição das eutanásias em serviços públicos de controle populacional de cães de rua e controle de zoonoses. Além disso, pode proporcionar ao proprietário uma técnica de esterilização menos invasiva e mais segura para o seu animal, colaborando com questões de ordem social e com o bem-estar animal.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABERCROMBIE, M. Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat. Rec.*, v.94, p.239-247, 1946
- AGREN, M.S., KRUSELL, M., FRANZEN, L. Release and absorption of zinc from zinc oxide and zinc sulfate in open wounds. *Acta Derm. Venereol.*, v. 71, p.330-333, 1991.
- ALLEN, M.J.; HOFFMANN, W.E.; RICHARDSON, D.C. et al. Serum markers of bone metabolism in dogs. *Am J. Vet. Res.*, v.59, n.3, p.250-254, 1998.
- ALMEIDA, F.F.L. Estrutura e função testiculares em javalis (*Sus scrofa scrofa*) sexualmente maduros. 2002. 65p. *Dissertação* (mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte.
- ALTMAN, D.G. *Practical Statistics for Medical Research*. Great Britain: Chapman and Hall. 1991. 611p.
- AMANN, R.P. Sperm production rates. In: JOHNSON, A.D.; GOMES, W.R. VANDEMARK, N.L. (Eds). *The Testis*. New York: Academic Press. 1970. p.433-482.
- AMANN, R.P. Reproductive physiology and endocrinology of the dog. In: MORROW, D.A. *Current Therapy in Theriogenology* 2. Philadelphia: W.B.Saunders. 1986. p.532-538.
- AMANN, R.P.; ALMQUIST, J.O. Reproductive capacity of dairy bulls. VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. *J. Dairy Sci.*, v.45, p.774-781, 1962
- ARTHUR, G.H.; NOAKES, D.E.; PEARSON, H. *Veterinary Reproduction e Obstetrics*. Philadelphia: WB Saunders, 8 ed, 2001. 868p.
- BARNETT, B.D. Chemical vasectomy of domestic dogs in the Galapagos Islands. *Theriogenology*, v. 23, p. 499-509, 1985.
- BERNDTSON, W.E. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *J. Anim. Sci.*, v. 44, p.818-833, 1977
- BERTOLAMI, M.C. Mecanismos de hepatotoxicidade. *Arq. Bras. Cardiol.*, v. 85, p.25-27, 2005.
- BLANC, P.; WONG, H.; BERNSTEIN, M.S. An experimental human model of metal fume fever. *Ann. Intern. Med.*, v. 114, p. 930-936, 1991.
- BLOOMBERG, MS. Surgical neutering and non-surgical alternatives. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v. 208, p. 517-519, 1996.
- CHRISTIANSEN, I.J. *Reprodução no cão e gato*. São Paulo: Manole, 1988, 362p.
- CONCANNON, P.W. Contraception in the dog. *Vet. Ann.*, v. 35, p. 177-187, 1995.
- CZERWINSKI, A.W.; CLARCK, M.L.; SERAFETINIDES, E.A. et al. Safety and efficacy of zinc sulfate in geriatric patients. *Clin. Pharmacol. Therapy*, v.1-5, p.436-441, 1974.
- DELAFUENTE, J.C. Nutrients and immune responses. *Rheum. Dis. Clin. North Am.*, v.17, p. 203-212, 1991.
- ENGLAND, G.C.W. Effect of progestogens and androgens upon spermatogenesis and steroidogenesis in dogs. *J. Reprod. Fertil.*, Suppl. 51, p. 123-138, 1997.
- EVERSON, D.P.; EMERICK, R.J.; JOST, L.K. et al. Zinc-silicon interactions influencing sperm chromatin integrity and testicular cell development in the rat as measured by flow cytometry. *J. Anim. Sci.*, v. 71, p.955-962, 1993.
- FAHIM, M.S.; WANG, M; SUTCU M.F.; et al. Sterilization of dogs with intra-epididymal injection of zinc arginine. *Contraception*, v. 47, p. 107-22, 1993.
- FAHIM, M.S.; FAHIM, Z.; HARMAN, J.M. Chemical sterilization in the male. *Arch. Androl.*, v.9, p.261-265, 1982.
- FAYRER-HOSKEN, RA; DOOKWAH, HD; BRANDON, CI. Immunocontrol in dogs. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 60-61, p. 365-373, 2000.
- FERRO, V.A.; KHAN, M.A.H.; McADAM, D.; COLSTON, A. et al. Efficacy of na anti-fertility vaccine base don mammalian gonadotrophin



- releasing hormone (GnRH-I) – a histological comparison in male animals. *Vet Immunology Immunopathology*, v.101, p.73-86, 2004.
- FOOTE, R.H.; SWIERTRA, E.E.; HUNT, W.L. Spermatogenesis in the dog. *Anat. Rec.*, v. 173, n. 3, p. 341-352, 1972
- FRAKER, P.J.; DEPASQUALE-JARDIEN, P.; ZWICKL, C.M. Regeneration of T cell helper function in zinc deficient adult mice. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, v.75, p. 5660-5664, 1978.
- FRANÇA, L.R.; RUSSEL, L.D. The testis of domestic animals. In: Regadera, J e Martinez Garcia (Ed). *Male Reproduction: a multidisciplinary overview*. Madrid: Churchill Livingstone, 1998a. p.197-219.
- FRANÇA, L.R.; PARREIRA, G.G.; GATES, R.J. et al. Hormonal regulation of spermatogenesis in the hypophysectomized rat: quantitation of germ-cell population and effect of elimination of residual testosterone after long-term hypophysectomy. *J. Androl.*, v.19, p.335-342, 1998b.
- FRANÇA, L.R.; LEAL, M.C.; SASSO-CERRI, E. et al. Cimetidine (Tagamet) is a reproductive toxicant in male rats affecting peritubular cells. *Bio. Reprod.*, v.63, p.1403-1412, 2000.
- GHOSH, S; SINHA-HIKIM, A.P.; RUSSEL, L.D. Further observations of stage-specific effects seen after short term hypophysectomy in the rat. *Tissue and Cell*, v.23, p.613-630, 1991.
- GRUYS, E.; OBWOLO, M.J.; TOUSSAINT, M.J.M. Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review. *Vet. Bull.*, v.64, p.1009-1018, 1994.
- HABIB, F.K. Evaluation of androgen metabolism studies in human prostate cancer, correlation with zinc levels. *Prev Med.*, v.9, p.650-656, 1980.
- HAFEZ, E.S.R.; HAFEZ, B. *Reprodução Animal*. 7ed. São Paulo: Manole, 2004, 513p.
- HARPER, C. Neutersol: Chemical sterilization for dogs. In: Proceedings of the Caribbean Animal Welfare Conference. Best Practices in Humane Control Stray and Feral Dog and Cat Population. p.20-25. 2004.
- HART, B.L. Effects of neutering and spaying on the behavior of dogs and cats: questions and answers about practical concerns. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.198, p.1204-1205, 1997.
- HIDIROGLOU, M.; KNIPFEL, J.E. Zinc in mammalian sperm: a review. *J Dairy Sci.*, v.67, n.6, p.1147-1156, 1984.
- HIRSCH T, MARCHETTI P, SANTOS AS, DALLAPORTA B, ZAMZAMI N, MARZO I, GEUSKENS M AND KROEMER G. The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the model of cell death. *Oncogene* 1997; 15: 1573-1581
- HOLDCRAFT, R.W.; BRAUN, R.E. Hormonal regulation of spermatogenesis. *International J. Androl.*, v.27, p.335-342, 2004.
- HOPKINS, S.G.; SCHUBERT, T.A.; HART, B.L. Castration of adult male dogs: effects on roaming aggression, urine marking, and mounting. *J. Am. Vet. Méd. Assoc.*, v.168, p.1108-1110, 1976.
- HOWE, L.M; OLSON, P.N. Prepuberal gonadectomy-early-age neutering of dogs and cats. In: CONCANNON, PW; ENGLAND, E; VERSTEGEN, J. (Eds). *Recent Advances in Small Animal Reproduction*. 2000. Disponível em: [www.ivis.org](http://www.ivis.org).
- HUHTANIEMI, I; TOPPARI, J. Hormonal regulation of the testis. In: MARTINEZ-GARCIA, F.; REGADERA, J. *Male Reproduction: a multidisciplinary overview*. Spain: Churchill Communications Europe España, 1998. Cap. 7, p.67-80.
- IMMEGART, HI; THRELFALL, W.R. Evaluation of intratesticular injection of glycerol for nonsurgical sterilization of dogs. *Am. J. Vet. Res.*, v. 61, p. 544-549, 2000.
- INABA, T; UMEHARA, T; MORI J. et al. Reversible suppression of pituitary-testicular function by a sustained-release formulation of a GnRH agonist (leproride acetate). *Theriogenology*, v. 46, p. 671-677, 1996.
- JOHNSTON, S. Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. *Vet. Clin. North Am: Small Anim Pract.*, v. 21, p. 545-551, 1991

- JOHNSTON, S.D.; KUSTRIZ, M.V.R., OLSON, P.N.S. *Canine and Feline Theriogenology*. Philadelphia: W.B.Saunders Company, 2001, 592p.
- KAWAKAMI, E; TSUTSUI, T; OGASA, A. A histological observations of the reproductive organs of the male dog from birth to sexual maturity. *J. Vet. Med. Sci.*, v. 53, p. 241-248, 1991.
- KELLOKUMPU, S; RAJANIEMI, H. Effect of zinc on the uptake of human chorionic gonadotropin (LCG) in rat testis and testosterone response in vivo. *Biol Reprod.*, v.24, p.298, 1981.
- KUROHMARU, M.; SINHA-HIKIM, A.P.; MAYERHOFER, A. et al. Golden hamster myoid cells during active and inactive states of spermatogenesis: correlation of testosterone levels with structure. *Am. J. Anat.*, v.188, p.319-327, 1990.
- LEAKE, A.; CHISHOLM, G.D.; HABIB, F.K. The effect of zinc on the 5  $\alpha$ -reduction of testosterone by the hyperplastic human prostate gland. *J. Steroid. Biochem.*, v.20, p.651-655, 1984.
- LEBLOND, CP; CLERMONT, Y. Definition of the stages of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.55, p.548-573, 1952.
- LEONARD, A; GERBER, GB; LEONARD, F. Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of zinc. *Mutat Res.*, v.168, p.343-348, 1987.
- LEVY, J.K., MILLER L.A., CRAWFORD, P.C. et al. GnRH immunocontraception of male cats. *Theriogenology*, v. 62, p.1116-1130, 2004.
- LLOBET, J.M., DOMINGO, J.L., COLOMINA, M.T. et al. Subchronic oral toxicity of zinc in rats. *Bull Environ. Contam. Toxicol.*, v. 41, p.36-43, 1988.
- LUNA, S.P.L. Interpretação de exames laboratoriais. In: Fórum de gastroenterologia equina, I. Diagnóstico em cólica equina. Colégio Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, 1994. p.38-48.
- MAARSCHALKERWEERD, R.J.; ENDENBURG, N.; KIRPENSTEIJN, J. et al. Influence of orchietomy on canine behaviour. *Vet Rec.*, v.14, p.617-619, 1997.
- MANN, T.; LUTWAK-MANN, C. *Male Reproductive Function and Semen. Themes and Trends in Physiology, Biochemistry and Investigative Andrology*. New York: Springer-Verlag, 1981. 495p.
- McLACHLAN, R.I. The endocrine control of spermatogenesis. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism*. v.14, n.3, p.345-362, 2000.
- MUSON, L.; CHASSY, L.M.; ASA, C. Efficacy, safety and reversibility of bisdiamine as a male contraceptive in cats. *Theriogenology*, v.62, p. 81-92, 2004.
- NEILSON, J.C.; ECKSTEIN, R.A.; HART, B.L. Effects of castration on problems behaviours in male dogs with reference to age and duration of behaviour. *J. Am. Vet. Méd. Assoc.*, v.211, n.2, p.180-182, 1997.
- NEUTERSOL. *Dose Determination Study*. Freedom Information Summary. NADA 141-217. United States Food and Drug Administration, 2003.
- NEVES, M.M.; MARQUES Jr, A.P.; OLIVEIRA, E.C.S. Senescência reprodutiva. Desafios à fisiologia – revisão. *Clínica Veterinária*, n. 43, p. 16-22, 2003.
- NISHIMURA, N; KAWATE, N; SAWADA, T; et al. Chemical castration by single intratesticular injection of lactic acid in rats and dogs. *J. Reprod. Dev.*, v. 38, p. 263-266, 1992.
- OGAWA, S.; WASHBURN, T.F.; TAYLOR, J. et al. Modifications of testosterone-dependent behaviors by estrogen receptor- $\alpha$  gene disruption in male mice. *Endocrinology*, v.139, n.12, p.5058-5069, 2005.
- OLAR, T.T.; AMANN, R.P.; PICKET, B.W. Relationships among testicular size, daily sperm production and output of spermatozoa, and extragonadal spermatozoal reserves of the dog. *Biol. Reprod.*, v.29, p.1114, 1983.
- ORSINI, J.A. Validation of prognostic index for acute abdominal crisis in horses. In: Equine Colic Research Symposium, 4., 1991, Athens, Georgia. *Proceedings...* Athens, 1991. p11.

- PAULA, T.A.R. Estudo morfológico quantitativo da atividade espermatogênica do cão, em diferentes faixas etárias após a puberdade. 1992. 65f. *Dissertação* (Mestrado em Ciência-Biologia Celular) – Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Belo Horizonte.
- PELLENIEMI, L.J. et al. Embryological and prenatal development and function of Sertoli Cell. In: RUSSEL, L.D.; GRISWOLD, M.D. (Ed). *The Sertoli Cell*. Clearwater: Cache River Press, 1993. cap.3, p.87-113.
- PINEDA, M.H; DOOLEY, M.S. Surgical and chemical vasectomy in the cat. *Am. J. Vet. Res.*, v. 45, n. 2, p. 291-300, 1984.
- PINEDA, AM.H; REIMERS, T.J.; FAULKNER, L.C.; et al. Azoospermia in dogs induced by injection of sclerosing agents into the caudae of the epididymides. *Am. J. Vet. Res.*, v. 38, n. 6, p. 831-838, 1977.
- RODRIGUES, B.A.; RODRIGUES, J.L. Alternativas contraceptivas em caninos e felinos domésticos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. 2005. Goiânia. *Anais do...* Goiânia, Goiás: [s.n.], 2005. p.1-12.
- RUSSEL, L.D.; CLEMONT, Y. Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats. *Anatomical Record*, v.187, p.347-366, 1977.
- RUSSEL, L.D.; ETTLIN, R.A.; SINHAHIKIN, A.P. et al. *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. Clearwater: Cache River Press, 1990a. 286p.
- RUSSEL, L.D.; REN, H.P.; SINHA-HIKIN, I. et al. A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell. *Am. J. Anat.*, v.118, p.21-30, 1990b.
- RUSSEL, L.D.; GRISWOLD, M.D. *The Sertoli Cell* (Eds). Clearwater: Cache River Press, 1993. 801p
- SALGUEIRO, M.J. et al. Zinc as an essential micronutrient: a review. *Nutr. Rev.*, v.20, p.737-755, 2000.
- SALMERI, KR; OLSON, PN; BLOOMBERG, M.S. Elective gonadectomy in dogs: a review. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, v. 198, n. 7, p. 1183-1192. 1991.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.
- SARAIVA, K.L.A.; SILVA JR, V.A.; DIAS, E.S.F.; PEIXOTO, C.A. Morphological changes in the testis induced by diethylcarbamazine. *Reprod Toxicol.*, 2006; doi: 10.1016/j.reprotox.2006.07.008.
- SAXENA, R.; BEDWAL, R.S.; MATHUR, R.S. Zinc toxicity and male reproduction in rats: a histological and biochemical study. *Trace Elem. Med.*, v.6, p.119-133, 1989.
- SENA, K.C.M.; PEDROSA, L.F.C. Efeitos da suplementação com zinco sobre o crescimento, sistema imunológico e diabetes. *Rev. Nutr.*, v.18, n.2, p.251-259, 2005
- SETCHELL, B.P.; MADDOCKS, S.; BROOKS, D.E. Anatomy, vasculature, innervation and fluids of the male reproductive tract. In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. (Eds). *The Physiology of Reproduction*. 2Ed. New York: Raven Press, 1994. p.1063-1175.
- SHARPE, R.M. Regulation of Spermatogenesis. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. (Eds). *The Physiology of Reproduction*. 2Ed. New York: Raven Press, 1994. p.1363-1434.
- SHIMOMURA, K.; SHIMADA, M.; HAGIWARA, M. et al. Testicular toxicity induced in dogs by nefiracetam, a neurotransmitter enhancer. *Reprod. Toxicol.*, v.18, p.423-430, 2004.
- SILVA Jr, V.A. Efeitos da indução do hipotireoidismo e hipertireoidismo pós-natal na proliferação das células de Sertoli e na função testicular em suínos. 2000. *Tese*. 191p. (Doutorado) – Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Belo Horizonte.
- SOARES, J.A.G; SILVA, P.A.R. Castração precoce em cães e gatos – revisão de literatura. *Clinica Veterinária*, n. 13, p. 3440, 1998.
- TESKE, E. et al. Canine prostate carcinoma: epidemiological evidence of an increased risk in

castrated dogs. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v.97, p.251-255, 2002.

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

TOXICOLOGICAL Review of Zinc and Compounds. Washington: U.S.Environmental Protection Agency, 2005. 71p.

VOLTARELLI, J.C. Febre e inflamação. *Medicina, Ribeirão Preto*, v. 27, p. 7-48, 1994.

ZAR, J.H. *Biostatistical Analysis*. 4 ed. New Jersey: Prentice Hill. 1999. 929p

ZIRKIN, BR et al. Is FSH required for adult spermatogenesis? *J. Androl.*, v.15, p.273-276, 1994.

ZIRKIN, B.R.; EWING, L.L.; KROMANN, N. et al. Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cell ultrastructure. *Endocrinology*, v.107, p.1867-1874, 1980.

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

WICHER, J. T.; DIEPPE, P.A. Acute phase proteins. *Clin. Immunol. Allergy*, v.5, p.425-446, 1985.

WOODALL, P.F.; JOHNSTONE, I.P. Dimensions and allometry of testis, epididymides and spermatozoa in the domestic dog (*Canis familiaris*). *J. Reprod. Fertil.*, v.82, p.603-609, 1988.

## 10. ANEXO

**Tabela 3.** Valores referentes ao hemograma de cães SRD, controle e tratados com injeção intratesticular de solução à base de zinco (Média e desvio padrão).

Parâmetro/ Tempo	Grupo			Valor de p
	Controle	Tratado Jovem	Tratado Adulto	
	Média ± DP <sup>(1)</sup>	Média ± DP <sup>(1)</sup>	Média ± DP <sup>(1)</sup>	
<b>Hemácias (5,5-8,5 milhões/mm<sup>3</sup>)</b>				
Tempo 0 <sup>(4)</sup>	6,38 ± 0,65	7,08 ± 0,55	7,06 ± 0,58	p <sup>(2)</sup> = 0,152
Tempo 1 <sup>(4)</sup>	6,75 ± 1,05	6,71 ± 0,83	7,51 ± 0,75	p <sup>(2)</sup> = 0,313
Tempo 2 <sup>(4)</sup>	6,22 ± 0,43	6,79 ± 0,63	7,28 ± 0,92	p <sup>(2)</sup> = 0,091
Tempo 3 <sup>(4)</sup>	6,27 ± 0,94	6,56 ± 0,61	7,27 ± 0,85	p <sup>(2)</sup> = 0,175
Tempo 4 <sup>(4)</sup>	7,46 ± 1,08	6,82 ± 0,92	7,28 ± 0,50	p <sup>(2)</sup> = 0,504
Tempo 5 <sup>(4)</sup>	7,13 ± 0,65	6,29 ± 0,91	7,38 ± 0,23	p <sup>(2)</sup> = 0,054
<b>T1 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,156</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,183</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,016*</b>	
<b>T2 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,323</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,100</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,349</b>	
<b>T3 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,854</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,084</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,265</b>	
<b>T4 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,084</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,463</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,271</b>	
<b>T5 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,125</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,126</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,351</b>	
<b>Hemoglobina (12-18 g/dl)</b>				
Tempo 0 <sup>(4)</sup>	13,96 ± 1,38	15,40 ± 0,82	15,74 ± 1,47	p <sup>(2)</sup> = 0,099
Tempo 1 <sup>(4)</sup>	14,34 ± 1,89	14,64 ± 1,45	16,66 ± 1,75	p <sup>(2)</sup> = 0,105
Tempo 2 <sup>(4)</sup>	13,24 ± 0,87 <sup>(A)</sup>	15,10 ± 1,37 <sup>(AB)</sup>	15,84 ± 1,98 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> = 0,044*
Tempo 3 <sup>(4)</sup>	13,62 ± 2,21	14,60 ± 1,41	15,92 ± 1,65	p <sup>(2)</sup> = 0,168
Tempo 4 <sup>(4)</sup>	15,40 ± 1,85	14,82 ± 1,83	16,02 ± 1,20	p <sup>(2)</sup> = 0,536
Tempo 5 <sup>(4)</sup>	15,60 ± 1,40 <sup>(AB)</sup>	13,98 ± 2,07 <sup>(A)</sup>	17,04 ± 0,71 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> = 0,024*
<b>T1 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,483</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,233</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,014*</b>	
<b>T2 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,206</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,468</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,780</b>	
<b>T3 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,787</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,099</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,612</b>	
<b>T4 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,108</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,477</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,492</b>	
<b>T5 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,098</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,177</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,160</b>	
<b>Hematócrito (37-55%)</b>				
Tempo 0 <sup>(4)</sup>	40,66 ± 3,49 <sup>(A)</sup>	45,34 ± 2,81 <sup>(AB)</sup>	46,96 ± 2,84 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> = 0,018*
Tempo 1 <sup>(4)</sup>	42,26 ± 6,02	43,42 ± 4,30	48,58 ± 5,67	p <sup>(2)</sup> = 0,184
Tempo 2 <sup>(4)</sup>	39,32 ± 2,60	43,76 ± 4,43	47,06 ± 6,37	p <sup>(2)</sup> = 0,068
Tempo 3 <sup>(4)</sup>	41,26 ± 6,47	42,98 ± 3,78	46,56 ± 3,83	p <sup>(2)</sup> = 0,252
Tempo 4 <sup>(4)</sup>	48,42 ± 6,89	43,08 ± 5,07	46,52 ± 2,78	p <sup>(2)</sup> = 0,294
Tempo 5 <sup>(4)</sup>	45,80 ± 4,83	40,78 ± 6,65	48,90 ± 2,04	p <sup>(2)</sup> = 0,063
<b>T1 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,308</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,271</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,566</b>	
<b>T2 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,262</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,308</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,974</b>	
<b>T3 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,873</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,089</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,867</b>	
<b>T4 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,086</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,331</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,803</b>	
<b>T5 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,089</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,163</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,402</b>	

(\*) – Diferença significativa a 5,0%.

(1) – DP = Desvio Padrão.

(2) – Teste F (ANOVA).

(3) – Teste t-Student pareado.

(4) – Tempo 0 = mensuração antes da injeção da droga; Tempo 1 = mensurações realizadas dois dias após a injeção da droga; Tempo 2 = mensurações realizadas oito dias após a injeção da droga; Tempo 3-5 = mensurações realizadas mensalmente.

Obs: Se todas as letras entre os parêntesis são distintas existe diferença significativa entre os grupos correspondentes através do teste de Tukey.

## Continuação

**Tabela 3.** Valores referentes ao hemograma de cães SRD, controle e tratados com injeção intratesticular de solução à base de zinco (Média e desvio padrão).

Parâmetro/ Tempo	Grupo			Valor de p
	Controle	Tratado Jovem	Tratado Adulto	
	Média ± DP <sup>(1)</sup>	Média ± DP <sup>(1)</sup>	Média ± DP <sup>(1)</sup>	
<b>• Leucócitos (5500-16500/mm<sup>3</sup>)</b>				
Tempo 0 <sup>(4)</sup>	13340,00 ± 2212,01	16912,00 ± 6361,35	10764,00 ± 3311,02	p <sup>(2)</sup> = 0,120
Tempo 1 <sup>(4)</sup>	11646,00 ± 3254,78	17320,00 ± 1070,98	14862,00 ± 7477,58	p <sup>(2)</sup> = 0,208
Tempo 2 <sup>(4)</sup>	10702,00 ± 3332,42	14170,00 ± 4673,81	11456,00 ± 4030,12	p <sup>(2)</sup> = 0,392
Tempo 3 <sup>(4)</sup>	8928,00 ± 3775,40	12370,00 ± 4249,06	9828,00 ± 2174,05	p <sup>(2)</sup> = 0,311
Tempo 4 <sup>(4)</sup>	9616,00 ± 4079,01	10538,00 ± 5399,20	9354,00 ± 2851,68	p <sup>(2)</sup> = 0,899
Tempo 5 <sup>(4)</sup>	9474,00 ± 4678,18	9640,00 ± 3105,32	9572,00 ± 2181,71	p <sup>(2)</sup> = 0,997
<b>T1 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,451</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,878</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,135</b>	
<b>T2 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,263</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,202</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,314</b>	
<b>T3 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,144</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,112</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,173</b>	
<b>T4 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,199</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,031*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,036*</b>	
<b>T5 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,243</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,022*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,237</b>	
<b>• Segmentados (300-12705/mm<sup>3</sup>)</b>				
Tempo 0 <sup>(4)</sup>	7286,36 ± 2377,55	11171,76 ± 4851,18	6816,40 ± 2000,22	p <sup>(2)</sup> = 0,117
Tempo 1 <sup>(4)</sup>	6278,40 ± 3135,64	10090,00 ± 1462,74	9877,24 ± 4147,80	p <sup>(2)</sup> = 0,137
Tempo 2 <sup>(4)</sup>	5862,02 ± 1602,35	8635,00 ± 3047,97	7692,80 ± 3153,70	p <sup>(2)</sup> = 0,292
Tempo 3 <sup>(4)</sup>	5055,92 ± 1946,59	7824,40 ± 3111,01	5914,30 ± 1635,33	p <sup>(2)</sup> = 0,197
Tempo 4 <sup>(4)</sup>	5216,38 ± 2387,21	6228,84 ± 3273,23	6451,44 ± 2355,66	p <sup>(2)</sup> = 0,749
Tempo 5 <sup>(4)</sup>	5078,74 ± 3211,52	5870,40 ± 2729,44	6367,28 ± 1685,44	p <sup>(2)</sup> = 0,741
<b>T1 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,444</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,614</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,067</b>	
<b>T2 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,093</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,125</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,302</b>	
<b>T3 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,089</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,183</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,098</b>	
<b>T4 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,126</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,026*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,543</b>	
<b>T5 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,235</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,037*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,629</b>	
<b>• Eosinófilos (0-1650/mm<sup>3</sup>)</b>				
Tempo 0 <sup>(4)</sup>	862,88 ± 685,46 <sup>(A)</sup>	2103,92 ± 709,23 <sup>(B)</sup>	831,00 ± 422,93 <sup>(A)</sup>	p <sup>(2)</sup> = 0,010*
Tempo 1 <sup>(4)</sup>	1403,26 ± 1099,33	2439,40 ± 715,77	1191,68 ± 747,38	p <sup>(2)</sup> = 0,092
Tempo 2 <sup>(4)</sup>	1251,66 ± 1118,99	1981,40 ± 933,67	724,52 ± 552,95	p <sup>(2)</sup> = 0,127
Tempo 3 <sup>(4)</sup>	852,64 ± 827,02	1156,20 ± 574,06	898,44 ± 484,54	p <sup>(2)</sup> = 0,731
Tempo 4 <sup>(4)</sup>	982,28 ± 847,46	826,88 ± 945,83	682,04 ± 394,14	p <sup>(2)</sup> = 0,828
Tempo 5 <sup>(4)</sup>	968,28 ± 989,54	1004,80 ± 864,29	801,38 ± 545,32	p <sup>(2)</sup> = 0,889
<b>T1 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,422</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,597</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,250</b>	
<b>T2 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,327</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,738</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,560</b>	
<b>T3 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,939</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,119</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,809</b>	
<b>T4 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,665</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,054</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,123</b>	
<b>T5 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,814</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,062</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,905</b>	

(\*) – Diferença significativa a 5,0%.

(1) – DP = Desvio Padrão.

(2) – Teste F (ANOVA).

(3) – Teste t-Student pareado.

(4) – Tempo 0 = mensuração antes da injeção da droga; Tempo 1 = mensurações realizadas dois dias após a injeção da droga; Tempo 2 = mensurações realizadas oito dias após a injeção da droga; Tempo 3-5 = mensurações realizadas mensalmente.

Obs: Se todas as letras entre os parêntesis são distintas existe diferença significativa entre os grupos correspondentes através do teste de Tukey.

### Continuação

**Tabela 3.** Valores referentes ao hemograma de cães SRD, controle e tratados com injeção intratesticular de solução à base de zinco (Média e desvio padrão).

Parâmetro/ Tempo	Grupo			Valor de p
	Controle	Tratado Jovem	Tratado Adulto	
	Média ± DP <sup>(1)</sup>	Média ± DP <sup>(1)</sup>	Média ± DP <sup>(1)</sup>	
<b>• Linfócitos (660-4950/mm<sup>3</sup>)</b>				
Tempo 0 <sup>(4)</sup>	3395,32 ± 1189,06	3226,76 ± 1114,56	2865,04 ± 1192,55	p <sup>(2)</sup> = 0,7679
Tempo 1 <sup>(4)</sup>	3618,16 ± 1330,67	4033,00 ± 931,88	3165,66 ± 2142,20	p <sup>(2)</sup> = 0,6850
Tempo 2 <sup>(4)</sup>	3232,14 ± 1242,92	3071,20 ± 1265,15	2650,56 ± 371,09	p <sup>(2)</sup> = 0,6713
Tempo 3 <sup>(4)</sup>	2857,48 ± 1141,22	3108,30 ± 1308,72	2669,84 ± 912,59	p <sup>(2)</sup> = 0,8305
Tempo 4 <sup>(4)</sup>	3153,12 ± 1377,29	3266,50 ± 1445,93	1956,38 ± 677,86	p <sup>(2)</sup> = 0,2108
Tempo 5 <sup>(4)</sup>	3160,06 ± 1459,93	2595,20 ± 600,56	2205,16 ± 1023,84	p <sup>(2)</sup> = 0,4046
<b>T1 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,576</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,336</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,609</b>	
<b>T2 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,803</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,672</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,633</b>	
<b>T3 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,015*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,686</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,677</b>	
<b>T4 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,715</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,908</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,260</b>	
<b>T5 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,509</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,190</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,160</b>	
<b>• Monócitos (0-1650/mm<sup>3</sup>)</b>				
Tempo 0 <sup>(4)</sup>	479,44 ± 306,97	242,36 ± 110,17	251,56 ± 91,66	p <sup>(2)</sup> = 0,137
Tempo 1 <sup>(4)</sup>	346,18 ± 141,90	647,60 ± 254,06	517,46 ± 505,22	p <sup>(2)</sup> = 0,394
Tempo 2 <sup>(4)</sup>	328,18 ± 131,69	382,20 ± 168,09	388,12 ± 220,86	p <sup>(2)</sup> = 0,843
Tempo 3 <sup>(4)</sup>	161,96 ± 38,03	187,40 ± 77,90	196,52 ± 43,48	p <sup>(2)</sup> = 0,612
Tempo 4 <sup>(4)</sup>	264,22 ± 154,21	215,78 ± 98,85	264,14 ± 223,75	p <sup>(2)</sup> = 0,871
Tempo 5 <sup>(4)</sup>	225,92 ± 117,71	169,60 ± 65,38	198,18 ± 95,19	p <sup>(2)</sup> = 0,656
<b>T1 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,303</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,061</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,296</b>	
<b>T2 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,312</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,254</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,210</b>	
<b>T3 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,074</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,479</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,347</b>	
<b>T4 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,279</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,746</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,913</b>	
<b>T5 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,193</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,355</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,427</b>	
<b>• Plaquetas (150-500/mm<sup>3</sup>)</b>				
Tempo 0 <sup>(4)</sup>	250,40 ± 26,18	235,40 ± 53,85	267,40 ± 110,05	p <sup>(2)</sup> = 0,787
Tempo 1 <sup>(4)</sup>	228,00 ± 44,33	265,20 ± 94,67	279,20 ± 101,53	p <sup>(2)</sup> = 0,622
Tempo 2 <sup>(4)</sup>	200,00 ± 32,34	274,80 ± 53,14	325,00 ± 154,12	p <sup>(2)</sup> = 0,159
Tempo 3 <sup>(4)</sup>	126,00 ± 56,49	155,60 ± 80,58	163,20 ± 117,46	p <sup>(2)</sup> = 0,785
Tempo 4 <sup>(4)</sup>	211,40 ± 76,49	243,80 ± 98,33	239,00 ± 74,58	p <sup>(2)</sup> = 0,808
Tempo 5 <sup>(4)</sup>	200,40 ± 67,97	249,80 ± 90,05	252,00 ± 118,07	p <sup>(2)</sup> = 0,631
<b>T1 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,365</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,590</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,685</b>	
<b>T2 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,037*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,092</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,452</b>	
<b>T3 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,022*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,124</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,050</b>	
<b>T4 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,265</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,768</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,450</b>	
<b>T5 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,288</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,800</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,664</b>	

(1) – DP = Desvio Padrão.

(2) – Teste F (ANOVA).

(3) – Teste t-Student pareado.

(4) – Tempo 0 = mensuração antes da injeção da droga; Tempo 1 = mensurações realizadas dois dias após a injeção da droga; Tempo 2 = mensurações realizadas oito dias após a injeção da droga; Tempo 3-5 = mensurações realizadas mensalmente.

**Tabela 4.** Valores bioquímicos referentes à função hepática de cães SRD, controle e tratados com injeção intratesticular de solução à base de zinco (Média e desvio padrão).

	Grupo
--	-------

Parâmetro/ Tempo	Controle	Tratado Jovem	Tratado Adulto	Valor de p
	<i>Média ± DP<sup>(1)</sup></i>	<i>Média ± DP<sup>(1)</sup></i>	<i>Média ± DP<sup>(1)</sup></i>	
<b>• Fosfatase alcalina (10-96UI/l)</b>				
Tempo 0 <sup>(4)</sup>	43,40 ± 21,62	32,80 ± 7,43	24,40 ± 11,30	p <sup>(2)</sup> = 0,166
Tempo 1 <sup>(4)</sup>	23,40 ± 2,97 <sup>(A)</sup>	53,00 ± 19,94 <sup>(B)</sup>	33,40 ± 13,28 <sup>(AB)</sup>	p <sup>(2)</sup> = 0,017*
Tempo 2 <sup>(4)</sup>	28,60 ± 4,28	41,00 ± 6,00	32,00 ± 12,96	p <sup>(2)</sup> = 0,103
Tempo 3 <sup>(4)</sup>	52,00 ± 22,93	41,20 ± 14,92	31,00 ± 8,97	p <sup>(2)</sup> = 0,179
Tempo 4 <sup>(4)</sup>	43,40 ± 13,03	41,60 ± 7,96	31,60 ± 8,68	p <sup>(2)</sup> = 0,183
Tempo 5 <sup>(4)</sup>	34,40 ± 14,05	37,00 ± 6,89	31,60 ± 5,18	p <sup>(2)</sup> = 0,677
<b>T1 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,127</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,108</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,018*</b>	
<b>T2 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,232</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,029*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,015*</b>	
<b>T3 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,417</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,213</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,088</b>	
<b>T4 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 1,000</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,051</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,072</b>	
<b>T5 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,265</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,132</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,112</b>	
<b>T5 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,199</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,423</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,371</b>	
<b>• Albumina (2,3-3,8g/dl)</b>				
Tempo 0 <sup>(4)</sup>	2,94 ± 0,22	3,00 ± 0,15	3,12 ± 0,21	p <sup>(2)</sup> = 0,360
Tempo 1 <sup>(4)</sup>	3,15 ± 0,38	2,94 ± 0,18	3,33 ± 0,32	p <sup>(2)</sup> = 0,178
Tempo 2 <sup>(4)</sup>	2,88 ± 0,42	3,14 ± 0,22	3,36 ± 0,34	p <sup>(2)</sup> = 0,122
Tempo 3 <sup>(4)</sup>	2,91 ± 0,22	2,85 ± 0,11	3,06 ± 0,17	p <sup>(2)</sup> = 0,176
Tempo 4 <sup>(4)</sup>	3,35 ± 0,23	3,03 ± 0,24	3,17 ± 0,24	p <sup>(2)</sup> = 0,148
Tempo 5 <sup>(4)</sup>	3,32 ± 0,10	3,03 ± 0,37	3,36 ± 0,08	p <sup>(2)</sup> = 0,082
<b>T1 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,459</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,319</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,099</b>	
<b>T2 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,794</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,199</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,049*</b>	
<b>T3 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,871</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,017*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,159</b>	
<b>T4 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,094</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,760</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,467</b>	
<b>T5 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,012*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,830</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,027*</b>	
<b>• Globulina (2,3-5,2g/dl)</b>				
Tempo 0 <sup>(4)</sup>	3,24 ± 0,84	3,78 ± 0,40	3,32 ± 0,86	p <sup>(2)</sup> = 0,478
Tempo 1 <sup>(4)</sup>	3,36 ± 0,62	3,54 ± 0,30	3,67 ± 1,07	p <sup>(2)</sup> = 0,798
Tempo 2 <sup>(4)</sup>	3,04 ± 0,68	3,62 ± 0,35	3,22 ± 0,92	p <sup>(2)</sup> = 0,426
Tempo 3 <sup>(4)</sup>	3,05 ± 0,55	3,58 ± 0,63	3,30 ± 1,41	p <sup>(2)</sup> = 0,677
Tempo 4 <sup>(4)</sup>	2,75 ± 0,21	3,72 ± 0,56	3,54 ± 1,10	p <sup>(2)</sup> = 0,118
Tempo 5 <sup>(4)</sup>	2,48 ± 0,46	3,50 ± 0,69	2,95 ± 0,89	p <sup>(2)</sup> = 0,111
<b>T1 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,482</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,208</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,034*</b>	
<b>T2 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,535</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,153</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,221</b>	
<b>T3 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,338</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,455</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,942</b>	
<b>T4 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,324</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,831</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,326</b>	
<b>T5 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,019*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,328</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,040*</b>	

(1) – DP = Desvio Padrão.

(2) – Teste F (ANOVA).

(3) – Teste t-Student pareado.

(4) – Tempo 0 = mensuração antes da injeção da droga; Tempo 1 = mensurações realizadas dois dias após a injeção da droga; Tempo 2 = mensurações realizadas oito dias após a injeção da droga; Tempo 3-5 = mensurações realizadas mensalmente.

Continuação



**Tabela 4.** Valores bioquímicos referentes à função hepática de cães SRD, controle e tratados com injeção intratesticular de solução à base de zinco (Média e desvio padrão).

Parâmetro/ Tempo	Grupo			Valor de p
	Controle	Tratado Jovem	Tratado Adulto	
	Média ± DP <sup>(1)</sup>	Média ± DP <sup>(1)</sup>	Média ± DP <sup>(1)</sup>	
<b>• TGP – ALT (10-88UI/l)</b>				
Tempo 0 <sup>(4)</sup>	48,20 ± 16,99	48,60 ± 30,26	45,60 ± 14,17	p <sup>(2)</sup> = 0,972
Tempo 1 <sup>(4)</sup>	43,80 ± 8,81	40,20 ± 9,09	46,80 ± 15,80	p <sup>(2)</sup> = 0,679
Tempo 2 <sup>(4)</sup>	38,00 ± 11,79	42,60 ± 28,88	44,80 ± 14,57	p <sup>(2)</sup> = 0,860
Tempo 3 <sup>(4)</sup>	35,20 ± 13,31	42,00 ± 10,42	40,40 ± 7,96	p <sup>(2)</sup> = 0,595
Tempo 4 <sup>(4)</sup>	34,60 ± 9,42	36,60 ± 11,89	42,40 ± 8,14	p <sup>(2)</sup> = 0,459
Tempo 5 <sup>(4)</sup>	47,00 ± 28,23	38,20 ± 9,58	48,60 ± 9,63	p <sup>(2)</sup> = 0,632
<b>T1 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,431</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,457</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,659</b>	
<b>T2 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,368</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,747</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,729</b>	
<b>T3 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,248</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,593</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,236</b>	
<b>T4 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,294</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,258</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,487</b>	
<b>T5 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,938</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,495</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,281</b>	
<b>• TGO – AST (10-88UI/l)</b>				
Tempo 0 <sup>(4)</sup>	38,00 ± 10,32	32,40 ± 4,16	33,80 ± 6,30	p <sup>(2)</sup> = 0,481
Tempo 1 <sup>(4)</sup>	35,00 ± 10,44	38,40 ± 8,53	37,60 ± 15,69	p <sup>(2)</sup> = 0,896
Tempo 2 <sup>(4)</sup>	34,40 ± 8,73	40,80 ± 7,36	39,20 ± 24,38	p <sup>(2)</sup> = 0,798
Tempo 3 <sup>(4)</sup>	30,00 ± 10,84	40,00 ± 9,27	31,60 ± 7,86	p <sup>(2)</sup> = 0,236
Tempo 4 <sup>(4)</sup>	29,20 ± 6,14 <sup>(AB)</sup>	39,00 ± 9,46 <sup>(A)</sup>	26,60 ± 4,88 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> = 0,040*
Tempo 5 <sup>(4)</sup>	31,80 ± 8,79	31,40 ± 10,31	24,80 ± 5,26	p <sup>(2)</sup> = 0,365
<b>T1 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,184</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,129</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,477</b>	
<b>T2 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,188</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,019*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,589</b>	
<b>T3 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,005*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,101</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,542</b>	
<b>T4 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,067</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,098</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,128</b>	
<b>T5 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,281</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,848</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,026*</b>	

(\*) – Diferença significativa a 5,0%.

(1) – DP = Desvio Padrão.

(2) – Teste F (ANOVA).

(3) – Teste t-Student pareado.

(4) – Tempo 0 = mensuração antes da injeção da droga; Tempo 1 = mensurações realizadas dois dias após a injeção da droga; Tempo 2 = mensurações realizadas oito dias após a injeção da droga; Tempo 3-5 = mensurações realizadas mensalmente.

Obs: Se todas as letras entre os parêntesis são distintas existe diferença significativa entre os grupos correspondentes através do teste de Tukey.

**Tabela 5.** Valores bioquímicos referentes à função renal de cães SRD, controle e tratados com injeção intratesticular de solução à base de zinco (Média e desvio padrão).

Parâmetro/ Tempo	Grupo			Valor de p
	Controle	Tratado Jovem	Tratado Adulto	
	<i>Média ± DP<sup>(1)</sup></i>	<i>Média ± DP<sup>(1)</sup></i>	<i>Média ± DP<sup>(1)</sup></i>	
<b>• Uréia</b>				
<b>(12-25mg/dl)</b>				
Tempo 0 <sup>(4)</sup>	32,00 ± 7,58	27,00 ± 4,95	27,40 ± 11,89	p <sup>(2)</sup> = 0,608
Tempo 1 <sup>(4)</sup>	26,40 ± 5,86	30,80 ± 7,69	26,40 ± 13,41	p <sup>(2)</sup> = 0,709
Tempo 2 <sup>(4)</sup>	31,00 ± 8,34	30,00 ± 5,10	27,20 ± 11,37	p <sup>(2)</sup> = 0,776
Tempo 3 <sup>(4)</sup>	25,70 ± 5,83	26,24 ± 4,68	32,80 ± 17,88	p <sup>(2)</sup> = 0,552
Tempo 4 <sup>(4)</sup>	35,20 ± 9,15	43,00 ± 7,42	47,00 ± 25,19	p <sup>(2)</sup> = 0,516
Tempo 5 <sup>(4)</sup>	34,60 ± 6,66	31,80 ± 8,61	29,00 ± 14,28	p <sup>(2)</sup> = 0,702
<b>T1 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,324</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,371</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,794</b>	
<b>T2 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,890</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,142</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,749</b>	
<b>T3 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,232</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,625</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,366</b>	
<b>T4 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,653</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,005*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,081</b>	
<b>T5 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,650</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,140</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,450</b>	
<b>• Creatinina</b>				
<b>(0,5-1,5mg/dl)</b>				
Tempo 0 <sup>(4)</sup>	0,85 ± 0,12 <sup>(A)</sup>	1,03 ± 0,06 <sup>(B)</sup>	1,03 ± 0,10 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> = 0,019*
Tempo 1 <sup>(4)</sup>	0,81 ± 0,13	0,99 ± 0,08	0,91 ± 0,15	p <sup>(2)</sup> = 0,1086
Tempo 2 <sup>(4)</sup>	0,98 ± 0,11	1,02 ± 0,14	1,04 ± 0,09	p <sup>(2)</sup> = 0,749
Tempo 3 <sup>(4)</sup>	0,93 ± 0,12	1,08 ± 0,12	0,93 ± 0,16	p <sup>(2)</sup> = 0,173
Tempo 4 <sup>(4)</sup>	1,22 ± 0,36	1,32 ± 0,25	1,02 ± 0,13	p <sup>(2)</sup> = 0,236
Tempo 5 <sup>(4)</sup>	0,88 ± 0,18	0,98 ± 0,09	0,98 ± 0,17	p <sup>(2)</sup> = 0,535
<b>T1 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,506</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,420</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,016*</b>	
<b>T2 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,075</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,776</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,733</b>	
<b>T3 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,235</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,327</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,067</b>	
<b>T4 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,053</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,051</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,894</b>	
<b>T5 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,729</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,104</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,522</b>	

(\*) – Diferença significativa a 5,0%.

(\*\*) – Não foi determinado devido a ocorrência do Desvio Padrão nulo.

(1) – DP = Desvio Padrão.

(2) – Teste F (ANOVA).

(3) – Teste t-Student pareado.

(4) – Tempo 0 = mensuração antes da injeção da droga; Tempo 1 = mensurações realizadas dois dias após a injeção da droga; Tempo 2 = mensurações realizadas oito dias após a injeção da droga; Tempo 3-5 = mensurações realizadas mensalmente.

Obs: Se todas as letras entre os parêntesis são distintas existe diferença significativa entre os grupos correspondentes através do teste de Tukey

**Tabela 6.** Valores bioquímicos referentes à concentração sérica de fibrinogênio de cães SRD, controle e tratados com injeção intratesticular de solução à base de zinco (Média e desvio padrão).

Fibrinogênio (200-400mg/dl)	Grupo			Valor de p
	Controle	Tratado Jovem	Tratado Adulto	
	<i>Média ± DP<sup>(1)</sup></i>	<i>Média ± DP<sup>(1)</sup></i>	<i>Média ± DP<sup>(1)</sup></i>	
• Mensuração antes da injeção da droga	273,20 ± 27,35	231,60 ± 102,05	260,00 ± 42,28	p <sup>(2)</sup> = 0,605
• Mensurações realizadas dois dias após a injeção da droga	373,80 ± 90,81	403,00 ± 135,52	363,40 ± 42,83	p <sup>(2)</sup> = 0,804
• Mensurações realizadas oito dias após a injeção da droga	340,80 ± 39,12	397,60 ± 52,41	403,40 ± 105,35	p <sup>(2)</sup> = 0,344
<b>T1 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,041*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,083</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,012*</b>	
<b>T2 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,040*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,028*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,020*</b>	

(\*) – Diferença significativa a 5,0%.

(1) – DP = Desvio Padrão.

(2) - Teste F (ANOVA).

(3) – Teste t-Student pareado.

**Tabela 7.** Análise do sêmen ao final de 150 dias após a injeção intratesticular de solução à base de zinco.

Dose por testículo (ml)	Número de animais injetados/dose	Aspermia	Azoospermia	Necrospermia	Oligospermia	Espermatozóides no ejaculado encontram-se com motilidade
0,2	0	0	0	0	0	0
0,3	0	0	0	0	0	0
0,5	0	0	0	0	0	0
0,7	0	0	0	0	0	0
0,8	7	0	6	0	1	1*
1,0	2	0	2	0	0	0
1,24	1	0	0	0	1	1**
*						70%
**						60%

Aspermia: ausência de ejaculado

Azoospermia: ausência de espermatozóides no ejaculado

Necrospermia: os espermatozóides ejaculados encontram-se mortos ou imóveis

Oligospermia: <10 milhões de espermatozóides/ml

**Tabela 8.** Concentração espermática de cães SRD, controle e tratados com injeção intratesticular de solução à base de zinco (Média e desvio padrão).

Parâmetro/Tempo	Grupo			Valor de p
	Controle	Tratado Jovem	Tratado Adulto	
	<i>Média ± DP<sup>(1)</sup></i>	<i>Média ± DP<sup>(1)</sup></i>	<i>Média ± DP<sup>(1)</sup></i>	
<b>• Concentração</b>				
<b>Espermática (x 10<sup>6</sup>/ml)</b>				
Tempo 0 <sup>(4)</sup>	508,10 ± 210,79	545,00 ± 323,93	439,90 ± 275,84	p <sup>(2)</sup> = 0,830
Tempo 1 <sup>(4)</sup>	248,50 ± 143,44	351,48 ± 171,31	244,50 ± 152,11	p <sup>(2)</sup> = 0,491
Tempo 2 <sup>(4)</sup>	190,00 ± 159,38	176,00 ± 104,05	157,00 ± 83,58	p <sup>(2)</sup> = 0,910
Tempo 3 <sup>(4)</sup>	58,90 ± 32,42	114,50 ± 114,64	61,60 ± 48,51	p <sup>(2)</sup> = 0,436
Tempo 4 <sup>(4)</sup>	19,40 ± 6,51	28,10 ± 21,33	27,50 ± 41,61	p <sup>(2)</sup> = 0,855
Tempo 5 <sup>(4)</sup>	5,00 ± 7,07	8,40 ± 18,78	14,50 ± 15,85	p <sup>(2)</sup> = 0,601
Tempo 6 <sup>(4)</sup>	22,40 ± 33,19	13,00 ± 19,87	9,00 ± 20,12	p <sup>(2)</sup> = 0,696
Tempo 7 <sup>(4)</sup>	250,60 ± 89,37 <sup>(A)</sup>	5,00 ± 11,18 <sup>(B)</sup>	6,00 ± 13,42 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> < 0,001*
Tempo 8 <sup>(4)</sup>	349,50 ± 123,89 <sup>(A)</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>(B)</sup>	10,00 ± 22,36 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> < 0,001*
Tempo 9 <sup>(4)</sup>	339,40 ± 105,10 <sup>(A)</sup>	0,10 ± 0,22 <sup>(B)</sup>	11,98 ± 24,14 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> < 0,001*
Tempo 10 <sup>(4)</sup>	392,30 ± 104,71 <sup>(A)</sup>	0,10 ± 0,22 <sup>(B)</sup>	3,80 ± 6,50 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> < 0,001*
Tempo 11 <sup>(4)</sup>	358,50 ± 59,12 <sup>(A)</sup>	0,10 ± 0,22 <sup>(B)</sup>	4,60 ± 8,71 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> < 0,001*
Tempo 12 <sup>(4)</sup>	359,00 ± 42,72 <sup>(A)</sup>	0,10 ± 0,22 <sup>(B)</sup>	4,00 ± 7,38 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> < 0,001*
Tempo 13 <sup>(4)</sup>	404,90 ± 92,00 <sup>(A)</sup>	0,10 ± 0,22 <sup>(B)</sup>	2,70 ± 4,35 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> < 0,001*
<b>T1 x T0</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,011*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,144</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,060</b>	
<b>T2 x T0</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,074</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,039*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,047*</b>	
<b>T3 x T0</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,012*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,040*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,037*</b>	
<b>T4 x T0</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,007*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,023*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,034*</b>	
<b>T5 x T0</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,005*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,020*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,029*</b>	
<b>T6 x T0</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,007*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,021*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,029*</b>	
<b>T7 x T0</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,028*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,020*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,025*</b>	
<b>T8 x T0</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,040*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,020*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,025*</b>	
<b>T9 x T0</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,187</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,020*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,026*</b>	
<b>T10 x T0</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,325</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,020*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,024*</b>	
<b>T11 x T0</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,106</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,020*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,024*</b>	
<b>T12 x T0</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,160</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,020*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,024*</b>	
<b>T13 x T0</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,165</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,020*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,024*</b>	

(\*) - Diferença significativa a 5,0%.

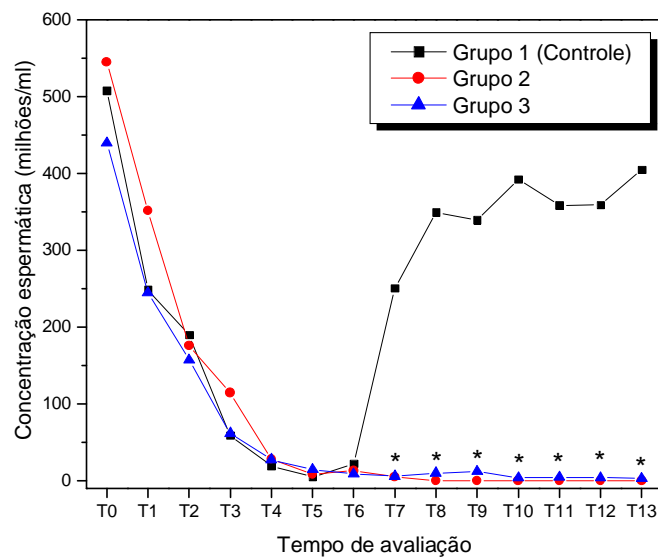
(1) - DP = Desvio Padrão.

(2) - Teste F (ANOVA).

(3) - Teste t-Student pareado.

(4) - Tempo 0 = avaliação realizada antes da injeção da droga; Tempo 1 = avaliação realizada 4 dias após a injeção da droga; Tempo 2 = avaliação realizada 7 dias após a injeção da droga; Tempo 3 a 13 = avaliações semanais.

Obs: Se todas as letras entre os parêntesis são distintas existe diferença significativa entre os grupos correspondentes através do teste de Tukey.



**Figura 12.** Média da concentração espermática de cães SRD, controle e tratados com injeção intratesticular de solução à base de zinco segundo o grupo e o tempo de avaliação.

**Tabela 9.** Motilidade espermática de cães SRD, controle e tratados com injeção intratesticular de solução à base de zinco (Média e desvio padrão).

Parâmetro/Tempo	Grupo			Valor de p
	Controle	Tratado Jovem	Tratado Adulto	
<b>• Motilidade espermática (%)</b>	<i>Média ± DP<sup>(1)</sup></i>	<i>Média ± DP<sup>(1)</sup></i>	<i>Média ± DP<sup>(1)</sup></i>	
Tempo 0 <sup>(4)</sup>	90,00 ± 0,00	89,00 ± 8,22	90,00 ± 5,00	p <sup>(2)</sup> = 0,948
Tempo 1 <sup>(4)</sup>	89,00 ± 5,48	90,00 ± 3,54	91,00 ± 2,24	p <sup>(2)</sup> = 0,735
Tempo 2 <sup>(4)</sup>	91,00 ± 2,24	90,00 ± 6,12	83,00 ± 7,58	p <sup>(2)</sup> = 0,097
Tempo 3 <sup>(4)</sup>	88,00 ± 2,74	76,00 ± 9,62	69,00 ± 38,79	p <sup>(2)</sup> = 0,447
Tempo 4 <sup>(4)</sup>	90,00 ± 0,00 <sup>(A)</sup>	34,00 ± 30,29 <sup>(B)</sup>	38,00 ± 38,99 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> = 0,016*
Tempo 5 <sup>(4)</sup>	90,00 ± 0,00 <sup>(A)</sup>	3,00 ± 6,71 <sup>(B)</sup>	23,00 ± 26,36 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> < 0,001*
Tempo 6 <sup>(4)</sup>	88,00 ± 2,74 <sup>(A)</sup>	15,40 ± 33,32 <sup>(B)</sup>	0,20 ± 0,45 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> < 0,001*
Tempo 7 <sup>(4)</sup>	88,00 ± 2,74 <sup>(A)</sup>	13,00 ± 29,07 <sup>(B)</sup>	14,00 ± 31,30 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> = 0,001*
Tempo 8 <sup>(4)</sup>	88,00 ± 2,74 <sup>(A)</sup>	14,00 ± 31,30 <sup>(B)</sup>	16,00 ± 35,78 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> = 0,002*
Tempo 9 <sup>(4)</sup>	90,00 ± 3,54 <sup>(A)</sup>	10,00 ± 22,36 <sup>(B)</sup>	32,00 ± 43,96 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> = 0,002*
Tempo 10 <sup>(4)</sup>	90,00 ± 3,54 <sup>(A)</sup>	10,00 ± 22,36 <sup>(B)</sup>	25,00 ± 36,40 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> = 0,001*
Tempo 11 <sup>(4)</sup>	88,00 ± 4,47 <sup>(A)</sup>	10,00 ± 22,36 <sup>(B)</sup>	12,00 ± 26,83 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> < 0,001*
Tempo 12 <sup>(4)</sup>	89,00 ± 5,48 <sup>(A)</sup>	11,00 ± 24,60 <sup>(B)</sup>	29,00 ± 40,68 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> = 0,002*
Tempo 13 <sup>(4)</sup>	88,00 ± 4,47 <sup>(A)</sup>	8,00 ± 17,89 <sup>(B)</sup>	26,00 ± 35,78 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> < 0,001*
<b>T1 x T0</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,704</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,704</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,704</b>	
<b>T2 x T0</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,374</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,621</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,080</b>	
<b>T3 x T0</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,178</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,007*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,262</b>	
<b>T4 x T0</b>	<b>**</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,008*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,035*</b>	
<b>T5 x T0</b>	<b>**</b>	<b>p<sup>(3)</sup> &lt; 0,001*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,004*</b>	
<b>T6 x T0</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,178</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,006*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> &lt; 0,001*</b>	
<b>T7 x T0</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,178</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,003*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,004*</b>	
<b>T8 x T0</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,178</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,004*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,008*</b>	
<b>T9 x T0</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 1,000</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,001*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,030*</b>	
<b>T10 x T0</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 1,000</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,001*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,011*</b>	
<b>T11 x T0</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,374</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,001*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,002*</b>	
<b>T12 x T0</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,704</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,001*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,020*</b>	
<b>T13 x T0</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,374</b>	<b>p<sup>(3)</sup> &lt; 0,001*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,010*</b>	

(\*) – Diferença significativa a 5,0%.

(\*\*) – Não foi determinado devido a ocorrência de desvio padrão nulo.

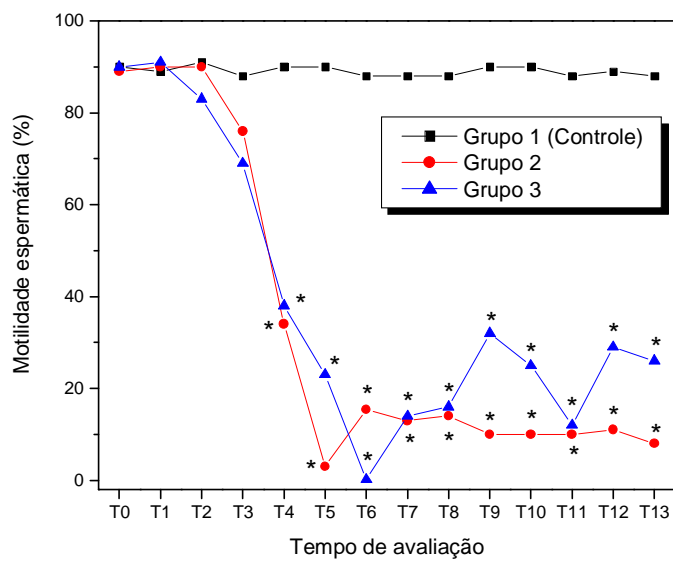
(1) – DP = Desvio Padrão.

(2) – Teste F (ANOVA).

(3) – Teste t-Student pareado.

(4) – Tempo 0 = avaliação realizada antes da injeção da droga; Tempo 1 = avaliação realizada 4 dias após a injeção da droga; Tempo 2 = avaliação realizada 7 dias após a injeção da droga; Tempo 3 a 13 = avaliações semanais.

Obs: Se todas as letras entre os parêntesis são distintas existe diferença significativa entre os grupos correspondentes através do teste de Tukey.



**Figura 13.** Média da motilidade espermática (%) de cães SRD, controle e tratados com injeção intratesticular de solução à base de zinco segundo o grupo e o tempo de avaliação.

**Tabela 10.** Percentual de espermatozoides morfologicamente normais de cães SRD, controle e tratados com injeção intratesticular de solução à base de zinco (Média e desvio padrão).

Parâmetro/Tempo	Grupo			Valor de p
	Controle	Tratado Jovem	Tratado Adulto	
	<i>Média ± DP<sup>(1)</sup></i>	<i>Média ± DP<sup>(1)</sup></i>	<i>Média ± DP<sup>(1)</sup></i>	
<b>• Espermatozoides morfologicamente normais (%)</b>				
Tempo 0 <sup>(4)</sup>	89,60 ± 3,65	88,20 ± 5,40	89,20 ± 7,56	p <sup>(2)</sup> = 0,925
Tempo 1 <sup>(4)</sup>	86,80 ± 2,59 <sup>(A)</sup>	76,60 ± 4,34 <sup>(B)</sup>	85,60 ± 7,02 <sup>(A)</sup>	p <sup>(2)</sup> = 0,014*
Tempo 2 <sup>(4)</sup>	87,40 ± 2,97	89,60 ± 4,83	91,80 ± 5,45	p <sup>(2)</sup> = 0,342
Tempo 3 <sup>(4)</sup>	88,40 ± 2,70 <sup>(A)</sup>	53,20 ± 27,59 <sup>(B)</sup>	79,20 ± 13,83 <sup>(AB)</sup>	p <sup>(2)</sup> = 0,024
Tempo 4 <sup>(4)</sup>	85,20 ± 3,56 <sup>(A)</sup>	19,20 ± 10,80 <sup>(B)</sup>	34,00 ± 22,19 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> < 0,001*
Tempo 5 <sup>(4)</sup>	86,80 ± 3,90 <sup>(A)</sup>	5,40 ± 12,07 <sup>(B)</sup>	8,00 ± 11,16 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> < 0,001*
Tempo 6 <sup>(4)</sup>	86,00 ± 4,95 <sup>(A)</sup>	6,20 ± 9,34 <sup>(B)</sup>	3,60 ± 8,05 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> < 0,001*
Tempo 7 <sup>(4)</sup>	87,00 ± 5,39 <sup>(A)</sup>	3,00 ± 6,71 <sup>(B)</sup>	3,40 ± 7,60 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> < 0,001*
Tempo 8 <sup>(4)</sup>	85,80 ± 4,71 <sup>(A)</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>(B)</sup>	2,00 ± 4,47 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> < 0,001*
Tempo 9 <sup>(4)</sup>	84,80 ± 5,36 <sup>(A)</sup>	12,00 ± 26,83 <sup>(B)</sup>	4,00 ± 5,48 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> < 0,001*
Tempo 10 <sup>(4)</sup>	86,00 ± 3,08 <sup>(A)</sup>	11,20 ± 25,04 <sup>(B)</sup>	2,00 ± 4,47 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> < 0,001*
Tempo 11 <sup>(4)</sup>	85,60 ± 4,93 <sup>(A)</sup>	2,00 ± 4,47 <sup>(B)</sup>	2,00 ± 4,47 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> < 0,001*
Tempo 12 <sup>(4)</sup>	84,00 ± 2,24 <sup>(A)</sup>	2,80 ± 6,26 <sup>(B)</sup>	2,00 ± 4,47 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> < 0,001*
Tempo 13 <sup>(4)</sup>	84,00 ± 5,34 <sup>(A)</sup>	2,00 ± 4,47 <sup>(B)</sup>	5,00 ± 7,07 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> < 0,001*
<b>T1 x T0</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,108</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,011*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,502</b>	
<b>T2 x T0</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,387</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,736</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,458</b>	
<b>T3 x T0</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,178</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,049*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,313</b>	
<b>T4 x T0</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,022*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> &lt; 0,001*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> &lt; 0,001*</b>	
<b>T5 x T0</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,335</b>	<b>p<sup>(3)</sup> &lt; 0,001*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> &lt; 0,001*</b>	
<b>T6 x T0</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,355</b>	<b>p<sup>(3)</sup> &lt; 0,001*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> &lt; 0,001*</b>	
<b>T7 x T0</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,454</b>	<b>p<sup>(3)</sup> &lt; 0,001*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> &lt; 0,001*</b>	
<b>T8 x T0</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,121</b>	<b>p<sup>(3)</sup> &lt; 0,001*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> &lt; 0,001*</b>	
<b>9 x T0</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,272</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,002*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> &lt; 0,001*</b>	
<b>T10 x T0</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,274</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,002*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> &lt; 0,001*</b>	
<b>T11 x T0</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,058</b>	<b>p<sup>(3)</sup> &lt; 0,001*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> &lt; 0,001*</b>	
<b>T12 x T0</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,022*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> &lt; 0,001*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> &lt; 0,001*</b>	
<b>T13 x T0</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,130</b>	<b>p<sup>(3)</sup> &lt; 0,001*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> &lt; 0,001*</b>	

(\*) – Diferença significativa a 5,0%.

(1) – DP = Desvio Padrão.

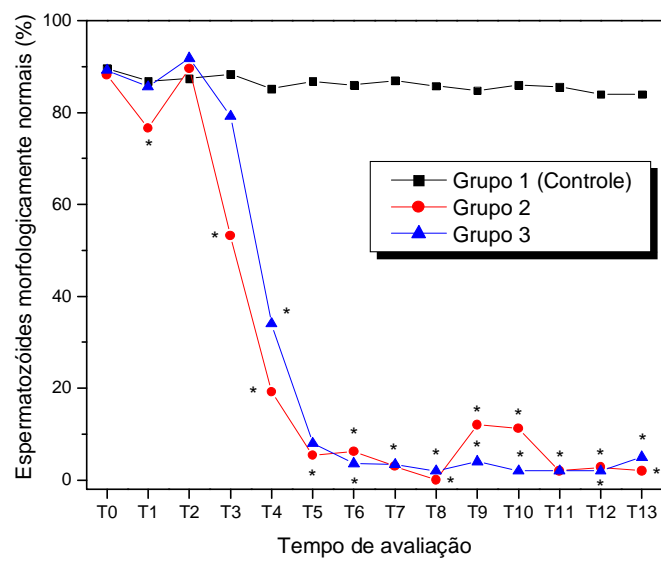
(2) – Teste F (ANOVA).

(3) – Teste t-Student pareado.

(4) – Tempo 0 = avaliação realizada antes da injeção da droga; Tempo 1 = avaliação realizada 4 dias após a injeção da droga; Tempo 2 = avaliação realizada 7 dias após a injeção da droga; Tempo 3 a 13 = avaliações semanais.

Obs: Se todas as letras entre os parêntesis são distintas existe diferença significativa entre os grupos correspondentes através do teste de Tukey.





**Figura 14.** Média do percentual de espermatozóide morfológicamente normais de cães SRD, controle e tratados com injeção intratesticular de solução à base de zinco

**Tabela 11.** Volume ejaculado de cães SRD, controle e tratados com injeção intratesticular de solução à base de zinco (Média e desvio padrão).

Parâmetro/Tempo (ml)	Grupo			Valor de p
	Controle	Tratado Jovem	Tratado Adulto	
• Volume do ejaculado	<i>Média ± DP<sup>(1)</sup></i>	<i>Média ± DP<sup>(1)</sup></i>	<i>Média ± DP<sup>(1)</sup></i>	
Tempo 0 <sup>(4)</sup>	1,98 ± 0,90	2,70 ± 1,57	2,52 ± 1,18	p <sup>(2)</sup> = 0,647
Tempo 1 <sup>(4)</sup>	1,13 ± 0,95	2,50 ± 1,58	2,28 ± 1,71	p <sup>(2)</sup> = 0,379
Tempo 2 <sup>(4)</sup>	1,54 ± 1,34	2,56 ± 1,29	2,76 ± 1,98	p <sup>(2)</sup> = 0,441
Tempo 3 <sup>(4)</sup>	1,22 ± 0,89	2,38 ± 1,40	1,98 ± 1,48	p <sup>(2)</sup> = 0,377
Tempo 4 <sup>(4)</sup>	1,12 ± 1,08	1,74 ± 0,84	1,84 ± 1,07	p <sup>(2)</sup> = 0,492
Tempo 5 <sup>(4)</sup>	1,06 ± 0,83	1,88 ± 1,25	1,70 ± 0,89	p <sup>(2)</sup> = 0,425
Tempo 6 <sup>(4)</sup>	1,30 ± 0,91	1,84 ± 0,81	1,20 ± 0,91	p <sup>(2)</sup> = 0,483
Tempo 7 <sup>(4)</sup>	1,54 ± 0,62	1,70 ± 0,76	2,54 ± 1,73	p <sup>(2)</sup> = 0,367
Tempo 8 <sup>(4)</sup>	1,52 ± 0,75	1,64 ± 0,74	1,94 ± 1,06	p <sup>(2)</sup> = 0,736
Tempo 9 <sup>(4)</sup>	1,76 ± 0,96	1,40 ± 0,65	1,66 ± 0,84	p <sup>(2)</sup> = 0,779
Tempo 10 <sup>(4)</sup>	1,58 ± 0,66	1,50 ± 0,50	1,70 ± 1,18	p <sup>(2)</sup> = 0,930
Tempo 11 <sup>(4)</sup>	1,44 ± 0,75	1,88 ± 1,03	1,48 ± 1,04	p <sup>(2)</sup> = 0,725
Tempo 12 <sup>(4)</sup>	1,50 ± 0,71	1,30 ± 0,76	1,44 ± 1,04	p <sup>(2)</sup> = 0,930
Tempo 13 <sup>(4)</sup>	1,40 ± 0,97	1,40 ± 0,65	1,66 ± 0,98	p <sup>(2)</sup> = 0,866
<b>T1 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,393</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,477</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,584</b>	
<b>T2 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,312</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,624</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,685</b>	
<b>T3 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,067</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,466</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,170</b>	
<b>T4 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,028*</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,093</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,059</b>	
<b>T5 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,012*</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,143</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,017*</b>	
<b>T6 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,102</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,134</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,031*</b>	
<b>T7 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,374</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,103</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,976</b>	
<b>T8 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,286</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,122</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,079</b>	
<b>T9 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,604</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,112</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,015*</b>	
<b>T10 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,432</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,080</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,112</b>	
<b>T11 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,184</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,198</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,010*</b>	
<b>T12 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,224</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,031*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,009*</b>	
<b>T13 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,115</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,081</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,049*</b>	

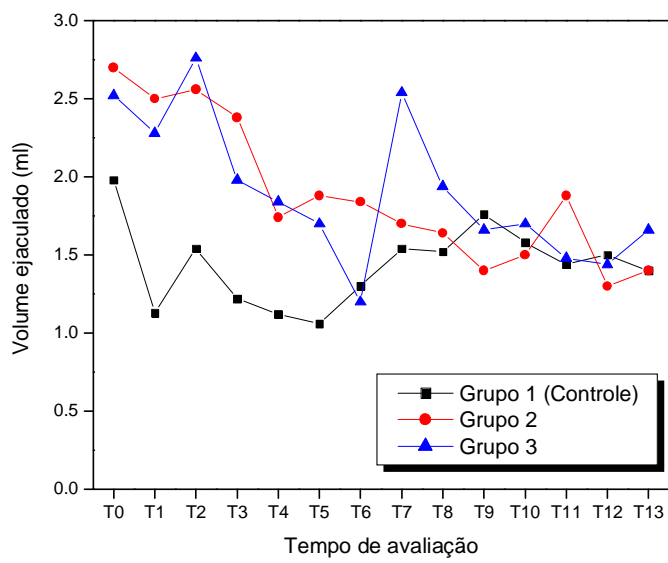
(\*) - Diferença significativa a 5,0%.

(1) - DP = Desvio Padrão.

(2) - Teste F (ANOVA).

(3) - Teste t-Student pareado.

(4) - Tempo 0 = avaliação realizada antes da injeção da droga; Tempo 1 = avaliação realizada 4 dias após a injeção da droga; Tempo 2 = avaliação realizada 7 dias após a injeção da droga; Tempo 3 a 13 = avaliações semanais.



**Figura 15.** Média do volume ejaculado (ml) de cães SRD, controle e tratados com injeção intratesticular de solução à base de zinco.

**Tabela 12.** Concentração de testosterona plasmática de cães SRD, controle e tratados com injeção intratesticular de solução à base de zinco (Média e desvio padrão).

Parâmetro/Tempo	Grupo			Valor de p
	Controle	Tratado Jovem	Tratado Adulto	
<b>Testosterona (pg/ml)</b>	<i>Média ± DP<sup>(1)</sup></i>	<i>Média ± DP<sup>(1)</sup></i>	<i>Média ± DP<sup>(1)</sup></i>	
Tempo 0 <sup>(4)</sup>	3765,66 ± 3782,59	3732,16 ± 317,65	3018,76 ± 2011,64	p <sup>(2)</sup> = 0,867
Tempo 1 <sup>(4)</sup>	3280,42 ± 2105,56	4232,44 ± 2469,40	2243,22 ± 481,72	p <sup>(2)</sup> = 0,289
Tempo 2 <sup>(4)</sup>	3181,62 ± 1384,41	1966,90 ± 841,50	1717,38 ± 1359,42	p <sup>(2)</sup> = 0,170
Tempo 3 <sup>(4)</sup>	3685,62 ± 1922,86	1723,12 ± 1800,56	1467,22 ± 716,80	p <sup>(2)</sup> = 0,090
Tempo 4 <sup>(4)</sup>	2374,64 ± 1699,98	2025,66 ± 2476,04	1923,74 ± 1083,86	p <sup>(2)</sup> = 0,922
Tempo 5 <sup>(4)</sup>	2248,32 ± 1230,20	1641,96 ± 1504,68	896,98 ± 777,28	p <sup>(2)</sup> = 0,248
Tempo 6 <sup>(4)</sup>	2398,02 ± 1705,28	2003,94 ± 1864,04	968,28 ± 746,71	p <sup>(2)</sup> = 0,341
Tempo 7 <sup>(4)</sup>	2260,82 ± 1091,83	1719,58 ± 1211,84	1416,82 ± 1809,98	p <sup>(2)</sup> = 0,641
Tempo 8 <sup>(4)</sup>	3064,18 ± 2499,42	1856,78 ± 2207,55	1064,56 ± 612,93	p <sup>(2)</sup> = 0,303
Tempo 9 <sup>(4)</sup>	1698,06 ± 769,12	829,66 ± 1215,37	1828,96 ± 1977,49	p <sup>(2)</sup> = 0,498
Tempo 10 <sup>(4)</sup>	2380,22 ± 1420,07 <sup>(A)</sup>	803,34 ± 670,29 <sup>(AB)</sup>	578,04 ± 449,00 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> = 0,021*
Tempo 11 <sup>(4)</sup>	1715,70 ± 1050,98	1799,94 ± 1908,17	1619,36 ± 1993,71	p <sup>(2)</sup> = 0,987
Tempo 12 <sup>(4)</sup>	2639,66 ± 1254,13	1804,08 ± 2160,11	1146,14 ± 1522,84	p <sup>(2)</sup> = 0,403
Tempo 13 <sup>(4)</sup>	2094,15 ± 1277,11	1478,04 ± 2044,57	1754,76 ± 1234,43	p <sup>(2)</sup> = 0,902
<b>T1 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,784</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,634</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,396</b>	
<b>T2 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,670</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,012*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,270</b>	
<b>T3 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,969</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,062</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,190</b>	
<b>T4 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,506</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,190</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,424</b>	
<b>T5 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,408</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,041*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,102</b>	
<b>T6 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,319</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,085</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,054</b>	
<b>T7 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,483</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,019*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,141</b>	
<b>T8 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,796</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,118</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,129</b>	
<b>T9 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,264</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,005*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,401</b>	
<b>T10 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,528</b>	<b>p<sup>(3)</sup> &lt; 0,001*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,039*</b>	
<b>T11 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,318</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,085</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,167</b>	
<b>T12 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,622</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,108</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,121</b>	
<b>T13 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,330</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,061</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,307</b>	

(\*) – Diferença significativa a 5,0%.

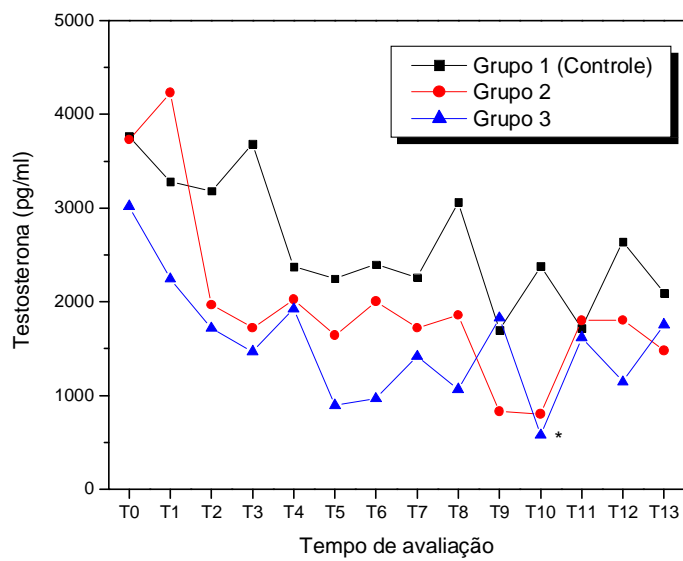
(1) – DP = Desvio Padrão.

(2) – Teste F (ANOVA).

(3) – Teste t-Student pareado.

(4) – Tempo 0 = mensuração antes da injeção da droga; Tempo 1 = mensuração realizada 2 dias após a injeção da droga; Tempo 2 = mensuração realizada 8 dias após a injeção da droga; Tempo 3 a 13 = mensurações semanais.

Obs: Se todas as letras entre os parêntesis são distintas existe diferença significativa entre os grupos correspondentes através do teste de Tukey.



**Figura 16.** Média da concentração de testosterona plasmática de cães SRD, controle e tratados com injeção intratesticular de solução à base de zinco.

**Tabela 13.**Diâmetro testicular direito de cães SRD, controle e tratados com injeção intratesticular de solução à base de zinco (Média e desvio padrão)

Testículo	Grupo			Valor de p
	Controle	Tratado Jovem	Tratado Adulto	
	Média ± DP <sup>(1)</sup>	Média ± DP <sup>(1)</sup>	Média ± DP <sup>(1)</sup>	
<b>• Direito</b>				
Tempo 0 <sup>(4)</sup>	22,80 ± 1,92	23,00 ± 1,00	24,40 ± 3,85	p <sup>(2)</sup> = 0,572
Tempo 1 <sup>(4)</sup>	23,40 ± 1,52 <sup>(A)</sup>	28,10 ± 0,55 <sup>(B)</sup>	28,40 ± 2,19 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> < 0,001*
Tempo 2 <sup>(4)</sup>	23,00 ± 1,87 <sup>(A)</sup>	27,20 ± 1,44 <sup>(B)</sup>	27,20 ± 2,86 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> = 0,013*
Tempo 3 <sup>(4)</sup>	23,40 ± 1,67	26,80 ± 1,64	26,00 ± 3,39	p <sup>(2)</sup> = 0,101
Tempo 4 <sup>(4)</sup>	23,40 ± 1,82 <sup>(A)</sup>	26,80 ± 1,79 <sup>(B)</sup>	27,00 ± 2,92 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> = 0,044*
Tempo 5 <sup>(4)</sup>	21,60 ± 0,89 <sup>(A)</sup>	25,80 ± 1,64 <sup>(B)</sup>	25,40 ± 3,85 <sup>(AB)</sup>	p <sup>(2)</sup> = 0,37*
Tempo 6 <sup>(4)</sup>	21,60 ± 1,34	25,20 ± 2,49	24,80 ± 3,27	p <sup>(2)</sup> = 0,081
Tempo 7 <sup>(4)</sup>	22,40 ± 1,14	24,80 ± 2,59	24,40 ± 3,21	p <sup>(2)</sup> = 0,295
Tempo 8 <sup>(4)</sup>	21,80 ± 1,79	23,80 ± 2,05	24,80 ± 4,02	p <sup>(2)</sup> = 0,266
Tempo 9 <sup>(4)</sup>	21,80 ± 1,30	22,20 ± 1,30	24,20 ± 3,27	p <sup>(2)</sup> = 0,214
Tempo 10 <sup>(4)</sup>	21,80 ± 1,30	22,00 ± 1,41	24,00 ± 3,39	p <sup>(2)</sup> = 0,271
Tempo 11 <sup>(4)</sup>	21,60 ± 0,89	22,20 ± 1,79	23,60 ± 4,28	p <sup>(2)</sup> = 0,512
Tempo 12 <sup>(4)</sup>	22,00 ± 1,22	21,20 ± 2,59	23,40 ± 3,71	p <sup>(2)</sup> = 0,453
Tempo 13 <sup>(4)</sup>	21,80 ± 0,84	22,00 ± 3,00	22,60 ± 3,05	p <sup>(2)</sup> = 0,873
Tempo 14 <sup>(4)</sup>	21,80 ± 1,30	20,80 ± 2,95	23,80 ± 2,77	p <sup>(2)</sup> = 0,187
Tempo 15 <sup>(4)</sup>	21,80 ± 0,84	21,60 ± 1,67	23,60 ± 3,44	p <sup>(2)</sup> = 0,338
Tempo 16 <sup>(4)</sup>	22,0 ± 1,22	20,60 ± 2,79	22,60 ± 2,61	p <sup>(2)</sup> = 0,403
<b>T1 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,634</b>	<b>p<sup>(3)</sup> &lt; 0,001*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,014*</b>	
<b>T2 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,871</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,001*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,045*</b>	
<b>T3 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,621</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,001*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,016*</b>	
<b>T4 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,666</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,003*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,049*</b>	
<b>T5 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,178</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,009*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,034*</b>	
<b>T6 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,388</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,063</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,477</b>	
<b>T7 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,749</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,105</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 1,000</b>	
<b>T8 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,473</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,338</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,477</b>	
<b>T9 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,460</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,178</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,621</b>	
<b>T10 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,430</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,298</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,587</b>	
<b>T11 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,305</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,456</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,016*</b>	
<b>T12 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,456</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,244</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,034*</b>	
<b>T13 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,298</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,546</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,037*</b>	
<b>T14 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,430</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,216</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,529</b>	
<b>T15 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,394</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,135</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,374</b>	
<b>T16 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,456</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,170</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,088</b>	

(\*) – Diferença significativa a 5,0%.

(1) – DP = Desvio Padrão.

(2) – Teste F (ANOVA).

(3) – Teste t-Student pareado.

(4) – Tempo 0 = mensuração antes da injeção da droga; Tempo 1 = mensuração realizada 24h após a injeção da droga; Tempo 2 = mensuração realizada 48h após a injeção da droga; Tempo 3 = mensuração 72h após a injeção da droga; Tempo 4 a 16 = mensurações semanais.

Obs: Se todas as letras entre os parêntesis são distintas existe diferença significativa entre os grupos correspondentes através do teste de Tukey.

**Tabela 14.** Diâmetro testicular esquerdo de cães SRD, controle e tratados com injeção intratesticular de solução à base de zinco (Média e desvio padrão)

Testículo/Tempo	Grupo			Valor de p
	Controle	Tratado Jovem	Tratado Adulto	
	Média ± DP <sup>(1)</sup>	Média ± DP <sup>(1)</sup>	Média ± DP <sup>(1)</sup>	
<b>• Esquerdo</b>				
Tempo 0 <sup>(4)</sup>	22,80 ± 1,48	23,60 ± 1,67	24,90 ± 3,54	p <sup>(2)</sup> = 0,410
Tempo 1 <sup>(4)</sup>	23,60 ± 2,19 <sup>(A)</sup>	29,20 ± 2,39 <sup>(B)</sup>	30,20 ± 2,17 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> = 0,001*
Tempo 2 <sup>(4)</sup>	23,80 ± 2,17 <sup>(A)</sup>	28,20 ± 2,68 <sup>(B)</sup>	28,80 ± 2,68 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> = 0,017*
Tempo 3 <sup>(4)</sup>	23,80 ± 2,05	28,00 ± 3,54	27,60 ± 3,05	p <sup>(2)</sup> = 0,082
Tempo 4 <sup>(4)</sup>	23,60 ± 2,19	27,40 ± 3,13	27,00 ± 2,92	p <sup>(2)</sup> = 0,098
Tempo 5 <sup>(4)</sup>	22,50 ± 1,29	26,20 ± 2,49	25,60 ± 3,78	p <sup>(2)</sup> = 0,164
Tempo 6 <sup>(4)</sup>	22,60 ± 1,52	25,40 ± 2,88	25,00 ± 3,54	p <sup>(2)</sup> = 0,264
Tempo 7 <sup>(4)</sup>	23,00 ± 1,41	25,40 ± 2,97	25,60 ± 3,21	p <sup>(2)</sup> = 0,265
Tempo 8 <sup>(4)</sup>	22,20 ± 1,92	25,60 ± 2,97	24,60 ± 3,13	p <sup>(2)</sup> = 0,171
Tempo 9 <sup>(4)</sup>	22,40 ± 0,89	23,60 ± 2,70	24,00 ± 3,46	p <sup>(2)</sup> = 0,609
Tempo 10 <sup>(4)</sup>	22,40 ± 1,14	24,00 ± 2,65	24,80 ± 4,38	p <sup>(2)</sup> = 0,466
Tempo 11 <sup>(4)</sup>	22,40 ± 1,14	23,80 ± 2,59	24,20 ± 4,76	p <sup>(2)</sup> = 0,656
Tempo 12 <sup>(4)</sup>	22,00 ± 1,00	23,80 ± 3,42	24,00 ± 4,80	p <sup>(2)</sup> = 0,613
Tempo 13 <sup>(4)</sup>	23,00 ± 1,87	23,60 ± 1,95	22,80 ± 3,70	p <sup>(2)</sup> = 0,885
Tempo 14 <sup>(4)</sup>	22,40 ± 1,14	23,40 ± 2,41	23,60 ± 3,51	p <sup>(2)</sup> = 0,732
Tempo 15 <sup>(4)</sup>	22,40 ± 2,30	23,80 ± 3,03	23,40 ± 4,04	p <sup>(2)</sup> = 0,780
Tempo 16 <sup>(4)</sup>	23,40 ± 2,41	23,20 ± 2,17	23,00 ± 4,12	p <sup>(2)</sup> = 0,979
<b>T1 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,405</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,002*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,017*</b>	
<b>T2 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,351</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,004*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,022*</b>	
<b>T3 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,298</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,011*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,002*</b>	
<b>T4 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,405</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,007*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,067</b>	
<b>T5 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,604</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,007*</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,135</b>	
<b>T6 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,815</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,105</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,778</b>	
<b>T7 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,828</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,137</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,475</b>	
<b>T8 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,529</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,089</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,468</b>	
<b>T9 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,621</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 1,000</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,021*</b>	
<b>T10 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,621</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,587</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,924</b>	
<b>T11 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,621</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,799</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,351</b>	
<b>T12 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,242</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,828</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,255</b>	
<b>T13 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,828</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 1,000</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,003*</b>	
<b>T14 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,621</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,749</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,193</b>	
<b>T15 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,717</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,799</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,040*</b>	
<b>T16 x T0</b>	<b>P<sup>(3)</sup> = 0,468</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,670</b>	<b>p<sup>(3)</sup> = 0,009*</b>	

(\*) – Diferença significativa a 5,0%.

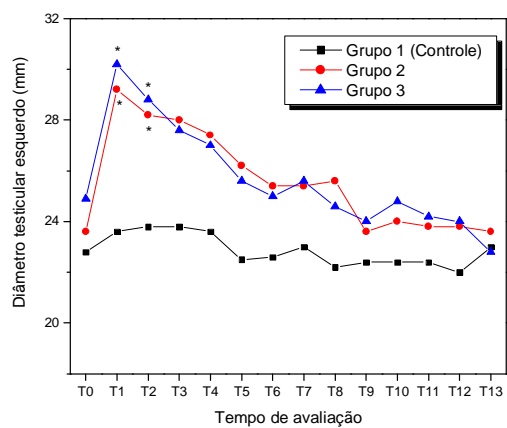
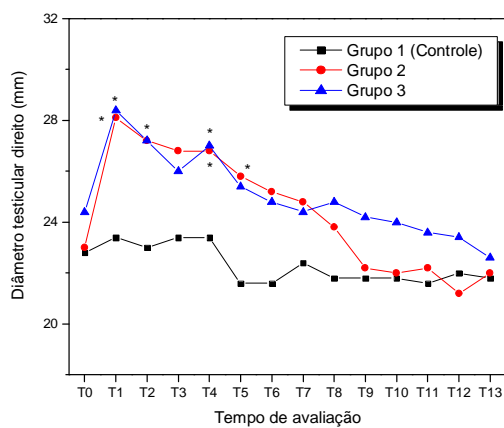
(1) – DP = Desvio Padrão.

(2) – Teste F (ANOVA).

(3) – Teste t-Student pareado.

(4) – Tempo 0 = mensuração antes da injeção da droga; Tempo 1 = mensuração realizada 24h após a injeção da droga; Tempo 2 = mensuração realizada 48h após a injeção da droga; Tempo 3 = mensuração 72h após a injeção da droga; Tempo 4 a 16 = mensurações semanais.

Obs: Se todas as letras entre os parêntesis são distintas existe diferença significativa entre os grupos correspondentes através do teste de Tukey.



(a) (b)  
**Figura 17.** Média do diâmetro testicular (a) direito (mm) e (b) esquerdo (mm) de cães SRD, controle e tratados com injeção intratesticular de solução à base de zinco.



**Tabela 15.**Diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero de túbulos seminíferos no estágio V do ciclo do epitélio seminífero, em cães SRD, controles e tratados com injeção intratesticular de solução à base de zinco (Média e desvio padrão).

Parâmetros	Grupo			Valor de p
	Controle	Tratado Jovem	Tratado Adulto	
	<i>Média ± DP<sup>(1)</sup></i>	<i>Média ± DP<sup>(1)</sup></i>	<i>Média ± DP<sup>(1)</sup></i>	
Peso testicular (g)	8,17 ± 1,68	7,34 ± 1,96	8,00 ± 4,29	p <sup>(2)</sup> = 0,8829
Peso epididimário (g)	2,26 ± 0,84	1,83 ± 0,65	1,90 ± 0,41	p <sup>(2)</sup> = 0,5661
• Diâmetro tubular (µm)	258,02 ± 11,81 <sup>(A)</sup>	226,26 ± 15,61 <sup>(B)</sup>	227,34 ± 8,12 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> = 0,002*
• Altura do epitélio Seminífero (µm)	79,00 ± 8,80	70,40 ± 4,16	77,40 ± 12,92	p <sup>(2)</sup> = 0,335

(\*) – Diferença significativa a 5,0%.

(1) – DP = Desvio Padrão.

(2) – Teste F (ANOVA).

Obs: Se todas as letras entre os parêntesis são distintas existe diferença significativa entre os grupos correspondentes através do teste de Tukey.

**Tabela 16.**População celular corrigida por secção transversal de túbulo seminífero no estágio V do ciclo do epitélio seminífero, em cães SRD, controles e tratados com injeção intratesticular de solução à base de zinco (Média e desvio padrão).

Contagem celular	Grupo			Valor de p
	Controle	Tratado Jovem	Tratado Adulto	
	<i>Média ± DP<sup>(1)</sup></i>	<i>Média ± DP<sup>(1)</sup></i>	<i>Média ± DP<sup>(1)</sup></i>	
• Nucléolo de célula de Sertoli	7,10 ± 1,49	5,82 ± 0,96	5,72 ± 1,68	p <sup>(2)</sup> = 0,264
• Espermatogonia	1,82 ± 0,67	1,32 ± 0,47	1,18 ± 0,64	p <sup>(2)</sup> = 0,248
• Espermatócito em pré-Leptóteno	19,12 ± 4,19 <sup>(A)</sup>	13,44 ± 2,26 <sup>(B)</sup>	13,70 ± 1,03 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> = 0,012*
• Espermatócito em paquíteno	21,08 ± 1,51 <sup>(A)</sup>	13,52 ± 2,24 <sup>(B)</sup>	13,84 ± 2,06 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> < 0,001*
• Espermátide arredondada	51,40 ± 5,81 <sup>(A)</sup>	29,30 ± 5,68 <sup>(B)</sup>	30,18 ± 3,94 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> < 0,001*
• Índice de células de Sertoli	7,50 ± 1,86	5,16 ± 1,50	5,62 ± 1,63	p <sup>(2)</sup> = 0,103

Números corrigidos segundo a fórmula de Abercrobie (1946) modificada por Amann (1962)

(\*) – Diferença significativa a 5,0%.

(1) – DP = Desvio Padrão.

(2) – Teste F (ANOVA).

Obs: Se todas as letras entre os parêntesis são distintas existe diferença significativa entre os grupos correspondentes através do teste de Tukey.

**Tabela 17.** Proporção volumétrica dos componentes testiculares em cães SRD, controles e tratados com injeção intratesticular de solução à base de zinco (Média e desvio padrão).

Parâmetro	Lado do testículo	Grupo			Valor de p
		Controle	Tratado Jovem	Tratado Adulto	
		Média ± DP <sup>(1)</sup>	Média ± DP <sup>(1)</sup>	Média ± DP <sup>(1)</sup>	
<b>Testículo líquido (parênquima)</b>					
<b>TÚBULOS SEMINÍFEROS</b>					
• Epitélio seminífero	Direito	78,50 ± 4,69 <sup>(A)</sup>	72,38 ± 3,34 <sup>(AB)</sup>	69,00 ± 2,60 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> = 0,005*
	Esquerdo	78,50 ± 4,69 <sup>(A)</sup>	71,34 ± 3,88 <sup>(B)</sup>	71,96 ± 2,64 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> = 0,022*
Valor de p		**	p <sup>(3)</sup> = 0,753	p <sup>(3)</sup> = 0,158	
• Lume	Direito	8,02 ± 4,69	10,52 ± 3,67	13,00 ± 1,96	p <sup>(2)</sup> = 0,136
	Esquerdo	8,02 ± 4,69	10,14 ± 4,14	10,96 ± 2,02	p <sup>(2)</sup> = 0,472
Valor de p		**	p <sup>(3)</sup> = 0,910	p <sup>(3)</sup> = 0,155	
• Túnica própria	Direito	4,58 ± 0,46 <sup>(A)</sup>	6,48 ± 0,60 <sup>(B)</sup>	7,04 ± 0,69 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> < 0,001*
	Esquerdo	4,58 ± 0,46 <sup>(A)</sup>	7,06 ± 0,73 <sup>(B)</sup>	7,36 ± 0,81 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> < 0,001*
Valor de p		**	p <sup>(3)</sup> = 0,092	p <sup>(3)</sup> = 0,368	
<b>ESPAÇO INTERSTICIAL</b>					
• Células de Leydig	Direito	3,18 ± 1,22	4,04 ± 0,65	4,56 ± 0,48	p <sup>(2)</sup> = 0,068
	Esquerdo	3,18 ± 1,22	4,52 ± 0,83	4,38 ± 1,43	p <sup>(2)</sup> = 0,188
Valor de p		**	p <sup>(3)</sup> = 0,296	p <sup>(3)</sup> = 0,791	
• Tecido conjuntivo	Direito	1,78 ± 0,86	2,80 ± 0,73	3,26 ± 1,05	p <sup>(2)</sup> = 0,060
	Esquerdo	1,78 ± 0,86 <sup>(A)</sup>	3,54 ± 0,84 <sup>(B)</sup>	3,46 ± 1,17 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> = 0,023*
Valor de p		**	p <sup>(3)</sup> = 0,095	p <sup>(3)</sup> = 0,826	
• Vasos sanguíneos	Direito	1,56 ± 1,06	1,76 ± 0,72	1,38 ± 0,59	p <sup>(2)</sup> = 0,768
	Esquerdo	1,56 ± 1,06	2,08 ± 0,61	1,08 ± 0,45	p <sup>(2)</sup> = 0,153
Valor de p		**	p <sup>(3)</sup> = 0,370	p <sup>(3)</sup> = 0,463	
• Vasos linfáticos	Direito	2,32 ± 0,97	2,00 ± 1,09	1,34 ± 1,09	p <sup>(2)</sup> = 0,354
	Esquerdo	2,31 ± 0,97 <sup>(A)</sup>	1,22 ± 0,75 <sup>(AB)</sup>	0,82 ± 0,43 <sup>(B)</sup>	p <sup>(2)</sup> = 0,021*
Valor de p		**	p <sup>(3)</sup> = 0,137	p <sup>(3)</sup> = 0,473	

(\*) – Diferença significativa a 5,0%.

(\*\*) – Não foi determinado devido à igualdade dos dois lados.

(1) – DP = Desvio Padrão.

(2) – Teste F (ANOVA).

(3) – Teste t-Student pareado.