

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese/dissertação será disponibilizado somente a partir de 25/04/2021.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**EFEITOS DA CASTRAÇÃO QUÍMICA COM CLORETO DE
CÁLCIO ASSOCIADO COM DMSO SOBRE A
ESPERMATOGÊNESE E FERTILIDADE DE RATOS**

CRISTIANE SELLA PARANZINI

Botucatu - SP
ABRIL 2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**EFEITOS DA CASTRAÇÃO QUÍMICA COM CLORETO DE
CÁLCIO ASSOCIADO COM DMSO SOBRE A
ESPERMATOGÊNESE E FERTILIDADE DE RATOS**

CRISTIANE SELLA PARANZINI

Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia Animal da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade Estadual
Paulista como pré-requisito para obtenção
do título de Doutora

Orientadora: Dra. Fabiana Ferreira de
Souza

Botucatu – SP

Abril 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Paranzini, Cristiane Sella.

Efeitos da castração química com cloreto de cálcio associado com DMSO sobre a espermatogênese e fertilidade de ratos / Cristiane Sella Paranzini. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Orientador: Fabiana Ferreira de Souza
Capes: 50504037

1. Dimetilsulfóxido. 2. Cloreto de cálcio. 3. Biomarcadores. 4. Fertilidade. 5. Infecundidade masculina. 6. Orquite. 7. Proteômica.

Palavras-chave: Agente esclerosante; Biomarcador de fertilidade; Infertilidade Masculina; Orquite Aguda; Proteômica.

Nome do autor (a): Cristiane Sella Paranzini

Título: EFEITOS DA CASTRAÇÃO QUÍMICA COM CLORETO DE CÁLCIO ASSOCIADO COM DMSO SOBRE A ESPERMATOGÊNESE E FERTILIDADE DE RATOS

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Fabiana Ferreira de Souza

Presidente e Orientadora

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – FMVZ - UNESP, Botucatu/SP.

Profa. Dra. Maria Denise Lopes

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária - FMVZ- UNESP, Botucatu/SP.

Profa. Dra. Maria Isabel Mello Martins

Membro

Departamento de Clínicas Veterinárias – UEL, Londrina/Pr

Profa. Dra. Denise Tavares

Membro

Faculdade de Medicina Veterinária – UNIP, Bauru/SP

Dra. Caroline Scott

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária - FMVZ - UNESP, Botucatu/SP.

Data da defesa de tese: 25 de abril de 2019.

Dedico este trabalho aos meus pais, Luiz e Lairce, meus irmãos e cunhados Gu e Flávia, Ise e Migs, Ana Claudia e Burg e meus filhos/sobrinhos (por ordem de ocupação) Tatá, Ana Lú, Belatriz, Tui, Bebelá, Antô e Quisco.

AGRADECIMENTOS

Sempre ao bom e grande Deus e aos Orixás, e não menos importante minha família que é meu porto seguro e alicerce.

À orientadora e amiga de todas as horas, profa. Dra. Fabiana Ferreira de Souza, que teve papel essencial nessa caminhada, dando suporte e apoio, dividindo seus conhecimentos !

Aos parceiros de longa data e curta data, companheiros do laboratório e a toda equipe equipe do departamento de Reprodução Animal da FMVZ, UNESP, Botucatu/SP. Todos que contribuíram tecnicamente para esse estudo, e aqueles que contribuíram dividindo sua amizade, seu carinho ou seu sorriso fazendo o meu dia melhor. Verônica, Marê, Gui Schiess, Annê, Krol, Denaise, Otavio, Débora, meu povo da TAC UEL, pois foram apoio importante ao meu psicológico e fazem parte da minha equipe de trabalho.

Aos professores do departamento de Reprodução Animal desta instituição, pelos ensinamentos do dia a dia, oportunidades de aprendizado, empréstimo dos laboratórios/materiais e equipamentos.

Prof. Dra. Maria Denise Lopes pelo carinho, ensinamentos, oportunidades e aquelas deliciosas histórias.

Prof. Dra. Maria Isabel, grande amiga, parceira, me ensinou muito que eu sei hoje sobre sêmen e gatos.

Dra. Camila de Paula Freitas Dell'Aqua pela parceria e aceite dos desafios nas diversas empreitadas

Laíza, Paulinho, Felipe e Bizarro por contribuírem de forma ímpar, nessa pesquisa.

À D. Raquel, D. Lurdes e Kelly, guardo na memória seus sorrisos.

Sempre a equipe que cuidou muito bem dos meus animais: S. Zé, Rosângela, Thiago e as equipes da manutenção.

À Capes pela concessão da bolsa e ao programa de Pós Graduação em Biotecnologia Animal, e em especial, ao pessoal do apoio aos alunos da pós sempre nos dando suporte e atendimento com carinho e respeito.

As empresas J.A. Saúde Animal, Special cats, Aqua Brasil e Zoetis, pois sem o vosso apoio, esta e as outras pesquisas realizadas por mim e minha equipe, não teriam se concretizado...

Àqueles que deram a vida pelo avanço da ciência ...



“Não sei se a vida é curta ou longa para nós, mas sei que nada do que vivemos tem sentido, se não tocarmos o coração das pessoas.

Muitas vezes basta ser: colo que acolhe, braço que envolve, palavra que conforta, silêncio que respeita, alegria que contagia, lágrima que corre, olhar que acaricia, desejo que sacia, amor que promove.

E isso não é coisa de outro mundo, é o que dá sentido à vida. É o que faz com que ela não seja nem curta, nem longa demais, mas que seja intensa, verdadeira, pura enquanto durar.

Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

Cora Coralina

Sumário

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Sistema Reprodutivo Masculino e a Espermatogênese.....	2
2.2. Células Espermáticas e suas Funções	4
2.3. Proteômica Espermática.....	6
2.4. Métodos Contraceptivos em Machos	8
2.5. Inflamação testicular: Orquite e Degeneração Testicular	11
2.6. Termografia Infravermelha para Detectar Orquite	15
2.7. Perspectivas Futuras.....	16
3. REFERÊNCIAS	20
4. HIPÓTESES	38
5. OBJETIVOS.....	38
5.1. Objetivo Geral.....	38
5.2. Objetivos Específicos.....	38

CAPÍTULO II

INSIGHTS ON INFLAMMATORY REACTION CAUSED BY CHEMICAL CASTRATION ON TESTICULAR FUNCTION AND FERTILITY IN RATS	40
ABSTRACT	41
1. INTRODUCTION.....	42
2. MATERIAL AND METHODS	43
3. RESULTS	45
4. DISCUSSION	53
6. REFERENCES.....	58

PROTEOMICS OF SPERMATOZOA AND EPIDYDIMAL FLUID AFTER ACUTE TESTICULAR INFLAMMATION IN RATS (<i>Rattus norvegicus</i>)	64
ABSTRACT	65
1. INTRODUCTION.....	65
2. MATERIAL AND METHODS	66
3. RESULTS	69
4. DISCUSSION	82
6. REFERENCES.....	90

CAPÍTULO III

CONSIDERAÇÕES FINAIS	108
-----------------------------------	------------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg	Microgramas
μL	Microlitros
Ca^+	Cálcio
CaCl_2	Cloreto de cálcio
Conc.	Concentração
CTR	Grupo controle
DMSO	Dimetilsulfoxido
EROs	Espécies Reativas ao Oxigênio
FDA	US Food and Drug Administration
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GnRH	Hormônio Liberador da Gonadotrofina
IL1	Interleucina 1
IL6	Interleucina 6
LH	Hormônio Luteinizante
Mot.	Motilidade
NaCl	Cloreto de sódio
$\text{TNF}\alpha$	Fator de necrose tumoral

RESUMO

PARANZINI, C. S. EFEITOS DA CASTRAÇÃO QUÍMICA COM CLORETO DE CÁLCIO ASSOCIADO COM DMSO SOBRE A ESPERMATOGÊNESE E FERTILIDADE DE RATOS. Botucatu – SP. 2019. 108p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da ação imediata e por 10 dias consecutivos, da injeção intratesticular de 20% de CaCl_2 associada a 0,5% de DMSO nas características espermáticas, na temperatura, biometria e histologia testicular, nas alterações macroscópicas do escroto e tecidos subjacentes, na proteômica do líquido epididimal e do espermatozóides, e nos efeitos tardios sobre a fertilidade em ratos Wistar. Foram utilizados 96 ratos machos e 24 fêmeas, com 80 a 90 dias de idade, respectivamente. Os machos foram divididos em dois grupos (controle e tratado), pesados e, as temperaturas corporal e escrotal aferidas (tempo 0). Os ratos receberam uma injeção intratesticular de 0,1 mL de NaCl a 0,9% (controle/CTR; n = 6) ou 0,1 mL de 20% de CaCl_2 associado com 0,5% de DMSO (grupo tratado; n = 90); o grupo tratado foi dividido em 15 subgrupos, de acordo com o momento da eutanásia (2, 4, 8 e 12 h; D1-D10 e D100; n = 6/grupo). A temperatura corpórea e testicular, parâmetros seminais, biometria testicular, dor, avaliação testicular macroscópica e histológica foram realizadas às 2, 4, 8 e 12 h, a cada 24 h por 10 dias consecutivos e aos 100 dias. A análise proteômica dos espermatozóides foi realizada 2 h e D1, enquanto a proteômica do fluído epididimal às 2 h, D1, D5, D7 e D10. Aos 80 dias, os machos (CTR e tratado D100) foram pareados com 3 fêmeas para o teste de fertilidade. O tratamento com 20% de CaCl_2 associado com 0,5% de DMSO prejudicou os parâmetros seminais com mínimos efeitos sistêmicos e aumentou a temperatura escrotal as 2, 4, 8 e 12 h no grupo tratado. No D100 do grupo tratado, houve azoospermia, atrofia testicular e o teste de fertilidade foi negativo. Os ratos do grupo CTR no D100 eram normospermicos e férteis. Adicionalmente, a avaliação proteômica forneceu a descrição e quantificação das proteínas do líquido epididimário e das células espermáticas de amostras de ratos férteis e após a indução da orquite. A injeção intratesticular de 20% de CaCl_2 associado com 0,5% de DMSO prejudicou imediatamente a função testicular (2 h) e causou reação inflamatória testicular intensa que prejudicou a fertilidade, mas não interferiu no bem-estar animal. Além disso, proteínas identificadas na proteômica poderiam ser usadas como biomarcadores de fertilidade/infertilidade ou alvo das vacinas imun contraceptivas.

Palavras chave: Infertilidade masculina, Orquite aguda, Agente esclerosante, Biomarcador de fertilidade, Proteômica

ABSTRACT

PARANZINI, C. S. EFFECTS OF CALCIUM CHLORIDE WITH DMSO INJECTION ON SPERMATOGENESIS AND FERTILITY IN RATS. 2019. 108p. Thesis (PhD Degree in Animal Biotechnology) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

This study aimed to evaluate immediate effect of intratesticular injection of CaCl₂ 20% associated with DMSO 0.5% on sperm characteristics, testicular temperature, biometry and histology, macroscopic scrotal and adjacent tissue changes, epididymal fluid and spermatozoa proteomics, and the late effect of fertility on Wistar rats. We used 96 male and 24 female Wistar rats, 80 to 90 days old respectively. Males were divided into two groups (control and treated); weighed, and body and scrotal temperatures measured (time 0). Rats received an intratesticular injection of 0.1 mL of NaCl 0.9% (control/CTR; n = 6) or CaCl₂ 20% associated with DMSO 0.5% (treated group; n = 90); treated group was divided into 15 subgroups depending on euthanasia time (2, 4, 8 and 12 h; D1–D10 and D100; n = 6). Body and testicular temperature, seminal characteristics, testicular biometry, pain, macroscopic and histological testicular evaluations were performed at 2, 4, 8 and 12 h, every 24 h for 10 consecutive days and at 100 days. Spermatozoa proteomics analysis was done 2 h and D1 while epididymal fluid at 2 h, D1, D5, D7 and D10. At 80th day, male (CTR and treated D100) were couple with 3 female. The treatment with CaCl₂ 20% associated with DMSO 0.5% impaired seminal parameters with minimal systemic effects and increased scrotal temperature at 2, 4, 8 and 12 h in the treated group. At D100 was azoospermia, testicular atrophy and negative fertility test. Rats in the CTR group at D100 were normospermic and fertile. The proteomic evaluation provided epididymal fluid and sperm cell quantity and baseline proteins description of samples with normal seminal parameters and after acute testicular inflammatory reaction. Intratesticular injection of CaCl₂ 20% with DMSO 0.5% immediately (2 h) impaired testicular function and caused testicular inflammatory reactions that harmed fertility, but did not interfere with animal welfare. Furthermore, the presented proteins can be used as fertility/infertility biomarker or immunocontraceptive vaccine target.

Keywords: Male infertility, Acute orchitis, Sclerosing agent, Fertility biomarker, Proteomic



CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Métodos de contracepção são estudados em diferentes espécies, incluindo humanos, espécies de animais de produção, silvestres e animais de companhia. Porém, apesar de diversos estudos e das preocupações com o bem-estar animal, o desafio atual é encontrar método contraceptivo eficiente, sem efeitos adversos, de baixo custo e com manejo reduzido.

Com esse propósito, estudos focados na esterilização de machos, utilizando agentes esclerosantes intratesticulares se intensificaram nos últimos 10 anos. É um método de fácil utilização, custo relativo baixo e de única aplicação em alguns casos, com mínimos efeitos adversos para esterilização de machos errantes e ferais. De fato, alguns produtos já estudados ocasionam lesões ulcerativas testiculares importantes e dor, e em vista disso, o cloreto de cálcio (CaCl_2) associado com outros produtos tem sido recomendado para esterilização animal, sem efeitos adversos. Este composto químico causa reação inflamatória testicular, orquite, que leva a lesão tecidual por necrose e peroxidação lipídica devido à produção de radicais livres (JANA; SAMANTA, 2011), acarretando em infertilidade permanente (PARANZINI et al., 2018; SILVA et al., 2018).

Os relatos de literatura disponíveis citam as alterações causadas pela epidídimo-orquite aguda, de maneira tardia (LUDWIG, 2008; RUSZ et al., 2012; AZENABOR; EKUN; AKINLOYE, 2015). Assim, em vista da necessidade de maior entendimento da fisiopatogenia da inflamação testicular e dos mecanismos moleculares envolvidos na infertilidade/fertilidade masculina, este estudo tem como objetivo avaliar os efeitos da orquite aguda imediatamente e por 10 dias consecutivos, após a indução da reação inflamatória local pela aplicação intratesticular de CaCl_2 20% associado com DMSO 0,5% sobre as características das células espermáticas, temperatura testicular, biometria testicular, alterações macroscópicas, histologia, proteínas do fluído epididimário e espermatozoides e, sobre os efeitos tardios na fertilidade em ratos Wistar.



CAPÍTULO III

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esta revisão de literatura teve como objetivo central resumir brevemente o funcionamento do sistema reprodutivo masculino interno e os possíveis mecanismos envolvidos na infertilidade masculina após a injeção intratesticular do CaCl_2 , que está sendo utilizado em pesquisas de controle populacional em massa de cães e gatos errantes. Com isso, considera-se que o objetivo principal desta revisão, foi alcançado.

Com relação aos objetivos secundários, a revisão de literatura foi consistente com o tema que incluiu conceitos importantes da patofisiologia da reprodução do macho, mecanismos da inflamação testicular e consequências sobre a fertilidade, do método de diagnóstico da orquite empregado neste estudo, a importância do estudo molecular e perspectivas futuras para o controle populacional diante dos avanços tecnológicos.

Com toda esta pesquisa de doutoramento, foi possível identificar e entender melhor as implicações clínicas imediatas da injeção intratesticular do CaCl_2 20% associado com DMSO 0,5% no testículo, sobre a célula espermática e sobre a fertilidade de ratos. Também foi importante no apontamento dos efeitos tóxicos imediatos do composto químico na célula espermática. Outro ponto importante do estudo foi em relação a alteração proteômica da célula espermática e fluído epididimal após a inflamação testicular aguda.

Espera-se que esse estudo tenha contribuído para o melhor entendimento dos mecanismos que influenciam a alteração da capacidade fertilizante do espermatozoide e que no futuro, estudos como estes permitam o desenvolvimento de técnicas diagnósticas precoces da inflamação testicular reduzindo impacto econômico e no desenvolvimento de métodos contraceptivos mais efetivos.