

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**EFEITO DO GEL INTRAVAGINAL COM 4-VINILCICLOHEXENO DIEPÓXIDO
SOBRE OS OVÁRIOS DE RATAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ENDREO ALAN PAIL DOS SANTOS

Uruguaiana, Rio Grande do Sul, 2020

ENDREO ALAN PAIL DOS SANTOS

**EFEITO DO GEL INTRAVAGINAL COM 4-VINILCICLOHEXENO DIEPÓXIDO
SOBRE OS OVÁRIOS DE RATAS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Ligia de Arruda Mestieri

**Uruguaiiana
2020**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais)

d56e dos Santos, Endreo Alan Pail
Efeito do gel intravaginal com 4-vinilciclohexeno diepóxido sobre os ovários de ratas / Endreo Alan Pail dos Santos.
64 p.

Dissertação (Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa, MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL, 2020.
"Orientação: Maria Lígia de Arruda Mestieri".

1. Químicoesterilização . 2. Castração Química. 3. Ovotoxicidade. 4. Atresia Folicular. 5. 4-vinilciclohexeno diepóxido. I. Título.

ENDREO ALAN PAIL DOS SANTOS

**EFEITO DO GEL INTRAVAGINAL COM 4-VINILCICLOHEXENO
DIEPÓXIDO SOBRE OS OVÁRIOS DE RATAS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto sensu* em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Sanidade Animal.

Dissertação defendida e aprovada em: 17/12/2020

Banca examinadora:



Prof^ª. Dra. Maria Ligia de Arruda Mestieri
Orientadora
Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA



Prof. Dr. Rafael Gianella Mondadori
Universidade Federal de Pelotas – UFPel



Prof^ª. Dra. Francielli Weber Santos Cibin
Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA

Dedico este trabalho e também conquista aos meus pais que nunca mediram esforços para me apoiar e ajudar, durante toda minha trajetória. Às minhas avós, Dona Eva (*in memoriam*) e Dona Gelci (*in memoriam*), que sempre me ajudaram e estiveram presentes, incentivando e servindo como exemplo de caráter, determinação, dedicação e amor.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me permitir a vida, guiar minhas escolhas e caminhos. Obrigado pelos ensinamentos e proteção.

À minha família, que mesmo longe sempre esteve presente. Vocês são minha fonte de amor, alegria e inspiração. Nada seria possível sem o exemplo e o apoio de cada um. Em especial aos meus pais, que apesar das adversidades, sempre me ajudaram e incentivaram da melhor forma possível. Me faltam palavras para descrever minha gratidão.

À minha namorada Ana Funguetto, que esteve ao meu lado nesta etapa, contribuindo e dando suporte para seguir em frente. Muito obrigado pela paciência, dedicação e amor! Aos nossos “filhos de quatro patas”, em especial ao George que está sempre presente, inclusive nas longas horas de estudos, transmitindo amor incondicional. À toda família da Ana pelo carinho, amor e acolhimento durante esses anos, amenizando a distância de casa. Muito obrigado por fazerem parte da minha vida.

À minha orientadora Maria Lígia de Arruda Mestieri, por todos ensinamentos, pela orientação durante esses anos todos e por servir de inspiração. Muito obrigado pelas oportunidades concedidas, por confiar, permitir e contribuir para meu crescimento profissional e pessoal.

Agradeço aos colegas que sempre estiveram presentes e tornaram essa trajetória prazerosa, descontraída e repleta de conhecimentos e descobertas. Em especial, a Etiele Maldonado que sempre somou, dividimos tarefas árduas, aprendemos muitas coisas juntos, você tem uma parcela incalculável neste trabalho, muito obrigado pelo companheirismo e dedicação. Aos alunos e funcionários da UNIPAMPA que de alguma forma, estiveram presentes e, também permitiram essa conquista.

Aos laboratórios e profs. da UNIPAMPA que permitiram a realização deste trabalho: Biotech e professora Fran por contribuir para realização deste trabalho e também servir de inspiração, desde a iniciação científica em Bioquímica; ao LabFar pelo empenho em contribuir com conhecimento e o desenvolvimento deste projeto, em especial, a professora Sandra; ao LPV-UNIPAMPA e professora Maria Elisa que, com muita paciência, transmitiu seu conhecimento e abriu as portas do laboratório para realização deste trabalho; à profa. Fernanda Barbosa Lima da UFSC por nos conceder o 4-VCD e ao Igor Kniphoff pelo transporte.

À CAPES pelo suporte para realização deste trabalho.

Daqui a vinte anos você estará mais arrependido pelas coisas que não fez do que pelas que fez. Então solte suas amarras. Afaste-se do porto seguro. Agarre o vento em suas velas. Explore. Sonhe. Descubra.

Mark Twain

RESUMO

A superpopulação de cães e gatos errantes gera prejuízos a saúde pública, biodiversidade e aos próprios animais que sobrevivem sem condições de bem-estar. Para o controle reprodutivo, o método mais comumente empregado é a esterilização, sendo as opções cirúrgicas (orquiectomia e ovariectomia) as mais aplicadas. Porém, o método é ineficiente para o controle populacional em massa de animais errantes. Assim, métodos alternativos, menos invasivos vêm sendo estudados. Nesse interim, a esterilização química demonstra-se como alternativa promissora, mas com limitação de ter uso praticamente exclusivo em machos. Sabe-se que para o controle populacional eficaz, os métodos devem ser úteis em ambos os sexos. Neste contexto, o composto químico 4-vinilciclohexeno diepóxido (4-VCD), vem sendo utilizado em roedoras para induzir a perda de folículos ovarianos e mimetizar a menopausa humana. O composto apresenta ovotoxicidade seletiva, acelerando o processo de atresia em folículos primordiais e primários, culminando em falha ovariana prematura. Para tal, o composto é utilizado pela via intraperitoneal, considerada invasiva e passível de complicações. Vislumbrando a utilização do 4-VCD para o controle populacional de fêmeas errantes (cadelas e gatas) é necessário o estudo de uma via menos invasiva e eficaz. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do 4-VCD sobre os ovários e seu potencial quimioesterilizante, por meio de inoculação de gel intravaginal em modelos experimentais. Para tal, foram utilizadas 20 ratas Wistar, adultas, igual e aleatoriamente divididas em dois grupos, de acordo com o tratamento recebido: controle e tratadas com gel contendo 4-vinilciclohexeno diepóxido. O grupo controle recebeu 0,2mL de gel à base de quitosana e o grupo tratamento recebeu o mesmo gel, contendo 4-vinilciclohexeno diepóxido na dose de 160 mg/kg. As inoculações foram diárias por 15 dias consecutivos. As ratas foram avaliadas diariamente por citologia vaginal até a eutanásia. Os animais foram submetidos à eutanásia em dois momentos distintos (metade do grupo em cada): após 16 dias do início do tratamento (M1) ou após 30 dias (M2). Os ovários foram colhidos, preparados e avaliados à luz da microscopia óptica para contagem de folículos primordiais e primários e sua classificação em atrésicos ou saudáveis. Irregularidades no ciclo estral das ratas foram notadas no grupo tratado, com prolongamento nas fases de diestro em M1 e M2; em M2, observou-se ainda prolongamento da fase de estro. No grupo tratado com 4-VCD houve diminuição no número de ciclos estrais em relação ao controle. A avaliação folicular revelou aumento na proporção de folículos primordiais atrésicos no grupo tratado em comparação ao grupo controle nos dois momentos de avaliação. Em contrapartida, no grupo controle notou-se maior proporção

de folículos primordiais saudáveis, quando comparado ao grupo tratamento, nos dois momentos. Na contagem global de folículos em M2, o grupo tratado apresentou maior média de folículos primordiais atresícos comparado ao grupo controle. Deste modo, foi possível observar ação ovotóxica do 4-VCD pela via intravaginal em meio gel de quitosana. Contudo, o tratamento por 15 dias com gel intravaginal composto por 4-VCD na dose de 160 mg/kg não promoveu falha ovariana durante o período de experimento. Estudos futuros devem ser realizados com intuito de determinar tempo de exposição e dose ideal, suficiente para promover infertilidade em ratas.

Palavras-chave: 4-Vinilciclohexeno diepóxido. Químioesterilização. Castração química. Ovotoxicidade. Atresia folicular.

ABSTRACT

The overpopulation of stray dogs and cats damages public health, biodiversity, and the animals themselves that survive without conditions of well-being. For reproductive control, the most commonly used method is sterilization, with surgical options (orchietomy and ovariectomy) being the most applied. However, the method is inefficient for mass population control of stray animals. Thus, alternative and less invasive methods have been studied. Therefore, chemical sterilization shows it self as a promising alternative, but with the limitation of having practically exclusive use in males. It is known that for effective population control, the methods must be useful in both sexes. In this context, the chemical compound 4-vinylcyclohexene diepoxide (4-VCD), has been used in rodents to induce loss of ovarian follicles and mimic human menopause. The compound shows selective ovotoxicity, accelerating the atresia process in primordial and primary follicles, culminating in premature ovarian failure. For this, the compound is used by the intraperitoneal route, considered invasive and prone to complications. In order to use the 4-VCD for the population control of wandering females (bitches and cats) it is necessary to study a less invasive and effective route. Thus, the objective of the present study was to evaluate the effect of 4-VCD on the ovaries and their chemosterilizing potential, through inoculation of intravaginal gel in experimental models. For this purpose, 20 adult Wistar rats were used, equally and randomly divided into two groups, according to the treatment received: control and treated with gel containing 4-VCD. The control group received 0.2 mL of chitosan-based gel and the treatment group received the same gel, containing 4-VCD at a dose of 160 mg/kg. The inoculations were daily for 15 consecutive days. The rats were evaluated daily by vaginal cytology until euthanasia. The animals were euthanized at two different times (half of the group each): 16 days after the start of treatment (M1) or after 30 days (M2). The ovaries were collected, prepared, and assessed under light microscopy to count primordial and primary follicles and their classification into healthy or atretic. Irregularities in the estrous cycle of rats were noted in the treated group, with prolongation in the diestrus phases in M1 and M2; in M2, prolongation of the estrus phase was also observed. In the group treated with 4-VCD, there was a decrease in the number of estrous cycles compared to the control. The follicular evaluation revealed an increase in the proportion of primordial atresia follicles in the treated group compared to the control group at both times of evaluation. In contrast, in the control group, there was a higher proportion of healthy primordial follicles, when compared to the treatment group, at both times. In the global follicle

count in M2, the treated group had a higher mean of primordial atretic follicles compared to the control group. Thus, it was possible to observe the ovotoxic action of 4-VCD through the intravaginal route in chitosan gel. However, treatment for 15 days with intravaginal gel composed of 4-VCD at a dose of 160 mg/kg did not promote ovarian failure during the experiment period. Future studies should be carried out in order to determine the exposure time and ideal dose, sufficient to promote infertility in rats.

Keywords: 4-vinylcyclohexene diepoxide. Chemosterilization. Chemical castration. Ovotoxicity. Follicular atresia.