

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

MORFOMETRIA OVARIANA APLICADA AO USO DE QUIMIOESTERILIZANTE
EM CADELAS E GATAS

Dissertação de Mestrado

BRUNA GONZALEZ DOS SANTOS

Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brasil

2020

BRUNA GONZALEZ DOS SANTOS

**MORFOMETRIA OVARIANA APLICADA AO USO DE QUIMIOESTERILIZANTE
EM CADELAS E GATAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (*Stricto Sensu*) da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Ligia de Arruda Mestieri

Uruguaiana

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) .

d643m dos Santos, Bruna Gonzalez
Morfometria ovariana aplicada ao uso de quimioesterilizante
em cadelas e gatas / Bruna Gonzalez dos Santos.
52 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Pampa,
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL, 2020.

"Orientação: Maria Lígia de Arruda Mestieri".

1. intraovariana. 2. cloreto de cálcio. 3. volumetria. 4.
quimioesterilização. 5. mensurações. I. Título.

BRUNA GONZALEZ DOS SANTOS

**MORFOMETRIA OVARIANA APLICADA AO USO DE QUIMIOESTERILIZANTE
EM CADELAS E GATAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (*Stricto Sensu*) da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

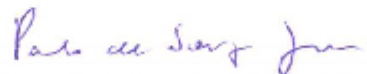
Área de concentração: Sanidade Animal

Dissertação defendida e aprovada em: 14 de Dezembro de 2020

Banca Examinadora:



Prof.(a) Dr.(a) Maria Ligia de Arruda Mestieri
Orientador(a)
(Universidade Federal do Pampa) – (UNIPAMPA)



Prof.(a) Dr.(a) Paulo de Souza Junior
(Universidade Federal do Pampa) – (UNIPAMPA)



Prof.(a) Dr.(a) Fabiana Ferreira de Souza
(Universidade Estadual Paulista) – (UNESP)

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, agradeço aos meus pais pelo constante apoio e confiança em mim, por sempre estarem dispostos a me auxiliarem para que eu conseguisse alcançar meus objetivos. Sem vocês nada disso seria possível. Amo vocês. Obrigada por sempre acreditarem em mim.

À minha orientadora, quem admiro e quem acreditou e me proporcionou essa oportunidade. Agradeço de coração pelos ensinamentos, paciência e pelo trabalho que construímos.

Aos meus colegas de mestrado e boas amizades que fiz, levo vocês e a nossa “salinha da pós” para sempre com muito carinho na memória. Um especial obrigada à minha colega, amiga e exemplo, Etiele Maldonado, que fez grande parte da minha trajetória.

Agradeço ao grupo de estudos GEOT, o qual tive o prazer de fazer parte por tanto tempo. Aos residentes, técnicos, auxiliares, professores e funcionários do HuVet e laboratórios da Unipampa, pela sua disponibilidade e auxílio sempre que precisei. À todos que de alguma forma, contribuíram para a construção deste trabalho, minha mais sincera gratidão.

“A gratidão é o único tesouro dos humildes”

- *William Shakespeare*

RESUMO

O controle populacional de cães e gatos errantes ainda é um desafio em diversos países. Estudos sobre a esterilização química em cães machos comprovaram ser uma opção à castração cirúrgica, com a possibilidade de abranger maior população e com menor custo. Dentre vários agentes, o cloreto de cálcio diluído em etanol demonstrou ser eficaz em induzir esterilidade em machos com menores efeitos adversos. Por hora, os estudos e ações de esterilização química concentram-se em machos, mas para que haja maior sucesso em estratégias de redução da superpopulação de animais, ambos os gêneros devem ser incluídos em programas de esterilização em massa. Assim, o presente trabalho teve como objetivo estudar a volumetria ovariana de cadelas e gatas, a fim de determinar os fatores que influenciam na decisão do volume de quimioesterilizante a ser injetado nesse órgão. Para isso, foram colhidos 31 ovários de gatas e 23 de cadelas após a ovariectomia eletiva, os quais foram mensurados quanto ao comprimento, largura e espessura antes e após a injeção intraovariana com cloreto de cálcio 20% diluído em etanol 95% e adição de corante azul de metileno. As variáveis mensuradas foram utilizadas para o cálculo do volume ovariano utilizando três diferentes fórmulas: OV1: fórmula empírica de Lambert ($LWH^{0,71}$); OV2: a fórmula de um elipsóide ($LWH^{0,52}$) e OV3: a fórmula de um prolato esférico ($LW^{20,52}$). Massa corporal, raça e idade também foram compilados para investigar a correlação com as medidas e volume ovariano. Em média, foi necessário 0,09 mL e 0,10 mL de volume de quimioesterilizante injetado nos ovários para as cadelas e gatas, respectivamente. Idade e massa corporal foram correlacionados às medidas e volumetria ovariana e OV1 ou OV2 foram mais confiáveis para este cálculo; OV1 e OV2, apresentaram aumento de 33% e 24% no volume ovariano nas cadelas; e 27% e 22%, nas gatas, respectivamente, após injeção. Concluiu-se que a largura foi a variável comum às duas espécies com correlação com o volume de quimioesterilizante injetado. Porém, não demonstrou resultados que comprovem que a utilização apenas desta mensuração seria totalmente acurado para servir como base para decisão do volume de quimioesterilizante a ser injetado nos ovários de fêmeas caninas e felinas. Outros fatores parecem influenciar nas medidas dos ovários e volumetria ovariana, como massa corporal e idade dos animais, por isso, futuros estudos devem considerar estes aspectos e realizar separação em grupos por espécie, faixa etária e faixa de massa corporal.

Palavras-chave: intraovariana, cloreto de cálcio, volumetria, quimioesterilização, mensurações

ABSTRACT

Population control of stray dogs and cats is still a challenge in several countries. Studies on chemical sterilization in male dogs have proven to be an option for surgical castration, with the possibility of covering a larger population and at a lower cost. Among several agents, calcium chloride diluted in ethanol has been shown to be effective in inducing sterility in males with less adverse effects. For now, studies and actions on chemical sterilization are focused on males, but in order for there to be greater success in strategies to reduce overpopulation of animals, both genders must be included in mass sterilization programs. Thus, the present study aimed to study the ovarian volumetry of bitches and cats, in order to determine the factors that influence the decision on the volume of chemosterilizer to be injected into this organ. For this, 31 ovaries were collected from cats and 23 from bitches after elective ovariohysterectomy, which were measured for length, width and thickness before and after intraovarian injection with 20% calcium chloride diluted in 95% ethanol and addition of dye methylene blue. The measured variables were used to calculate the ovarian volume using three different formulas: OV1: Lambert's empirical formula ($LWH^{0.71}$); OV2: the formula of an ellipsoid ($LWH^{0.52}$) and OV3: the formula of a spherical prolate ($LW^{20.52}$). Body mass, race and age were also compiled to investigate the correlation with ovarian measurements and volume. On average, 0.09 mL and 0.10 mL of volume of chemosterilant injected into the ovaries were required for bitches and cats, respectively. Age and body mass were correlated to the measurements and ovarian volume and OV1 or OV2 were more reliable for this calculation; OV1 and OV2, showed an increase of 33% and 24% in the ovarian volume in bitches; and 27% and 22%, in cats, respectively, after injection. It was concluded that the width was the variable common to both species with correlation with the volume of injected chemosterilizer. However, it has not shown results that prove that the use of this measurement alone would be totally accurate to serve as a basis for deciding the volume of chemosterilizer to be injected into the ovaries of canine and feline females. Other factors seem to influence the measurements of the ovaries and ovarian volume, such as body mass and age of the animals, therefore, future studies should consider these aspects and perform separation into groups by species, age group and body mass range.

Keywords: intraovarian, calcium chloride, volumetry, chemosterilization, measurements

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO CIENTÍFICO

- Figure 1** - Photomacrography of surgical specimen, showing ovary, fallopian tube and uterine horns. Canine ovaries completely stained after chemosterilant injection (A), Feline left ovary completely stained and the right presence of ovarian cysts (B) and ovarian blood vessels stained (C).....29
- Figure 2** - Linear dispersion representing correlation between ovarian width and total volume injected in bitches (A) (above) and queens (B) (below).....32

LISTA DE TABELAS

ARTIGO CIENTÍFICO

Table 1 - Description of ovarian measurements, pre and post chemosterilant injection (mean \pm SD) in cats and dogs.....	30
Table 2 - Correlations coefficient between ovarian pre injection measurements, volume of injected chemosterilant, animals' weight and age for canine and feline.....	31
Table 3 - Description of ovarian volumes in mL (mean \pm SD), calculated using the formulas OV1, OV2 and OV3 pre and post injection in cats and dogs.....	33
Table 4 - Correlations between ovarian measurements pre injection, ovarian volumes calculated by equations OV1, OV2 and OV3 pre injection, volume injected, weight and age in canine and feline specie.	34

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 Anatomia Ovariana da Cadela e da Gata.....	13
2.2 Superpopulação de Animais e Saúde Pública.....	14
2.3 Métodos de Esterilização em Animais.....	15
2.4 Esterilização Química em Fêmeas.....	18
2.5 Volumetria Testicular e Ovariana.....	19
3 OBJETIVOS.....	22
3.1 GERAL.....	22
3.2 ESPECÍFICOS.....	22
4 ARTIGO CIENTÍFICO.....	23
5 CONCLUSÃO.....	43
6 REFERÊNCIAS.....	44
7 ANEXOS.....	51

1 INTRODUÇÃO

A superpopulação de cães e gatos no mundo é um grave problema para a saúde pública (LIMA; LUNA, 2012), pois propicia disseminação de zoonoses e causa altas taxas de abandono de animais, afetando diretamente o bem-estar e a saúde dos mesmos. Segundo a Organização Mundial da Saúde, o método mais efetivo para a redução do número de cães e gatos abandonados é a esterilização em massa (BÖGEL et al., 1990). Atualmente, a ovariectomia eletiva é uma das cirurgias mais realizadas na clínica cirúrgica de pequenos animais (COE et al., 2006). Porém, para esterilização em massa, esta cirurgia é de difícil aplicação, principalmente em países em desenvolvimento (JOHNSTON; RHODES, 2015), pelos seus custos e manejo pós-operatório.

Métodos alternativos vêm sendo desenvolvidos para esterilização de animais de companhia, pensando-se em baixo custo e praticidade. Entre eles, destacam-se os quimioesterilizantes utilizados em machos por injeção intratesticular, incluindo o uso de cloreto de cálcio (JANA; SAMANTA, 2006; PARANZINI et al., 2018). Os estudos sobre quimioesterilização de machos são mais frequentes e estão bem avançados contrastando-se às fêmeas, pela facilidade de acesso aos testículos. Porém, também é necessária a busca de informações em fêmeas, para que haja sucesso em estratégias de quimioesterilizações em larga escala.

Além disso, há décadas são estudadas as melhores formas para se estimar volume testicular em diferentes espécies, e volume ovariano em humanas (BRIDGES et al., 1993; PALTIEL et al., 2002). Estudos relacionados à volumetria ovariana em cadelas e gatas com relação ao uso de quimioesterilizantes não foram encontrados, dificultando o avanço das pesquisas relacionadas à quimioesterilização por métodos minimamente invasivos em fêmeas nessas espécies.

Por essa razão, o presente trabalho visa definir o volume adequado de solução de cloreto de cálcio 20% diluído em etanol 95%, com adição de corante azul de metileno, à ser injetado no ovário de cadelas e gatas e buscar correlações entre volumetria e mensurações ovarianas com massa corporal e idade dos animais. Espera-se que ao final do estudo, os resultados obtidos possam servir de base e impulsionar avanços na quimioesterilização aplicada à cadelas e gatas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.2 Anatomia Ovariana da Cadela e da Gata

Em caninas e felinas os ovários estão localizados caudais aos rins (TOBIAS & SPENCER, 2011) e nas cadelas, se encontra dentro de um saco peritoneal fino, a bursa ovariana (FOSSUM, 2015). A média de tamanho de um ovário em um cão pesando 11 kg é de 15 mm de comprimento, 7 mm de largura e 5 mm de espessura; já nas gatas varia de 8 a 9 mm de comprimento (TOBIAS & SPENCER, 2011).

O pedículo do ovário inclui ligamento suspensor com sua artéria e veia ovariana e uma quantidade variada de gordura, a qual nas cadelas é em quantidade maior do que nas gatas, e tecido conjuntivo (FOSSUM, 2015). A parte medular do ovário (central) contém vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, fibras musculares e tecido conectivo, e o córtex (periferia) contém estroma de tecido conectivo com grande número de folículos (TOBIAS & SPENCER, 2011).

Um estudo sobre morfometria ovariana em cadelas, mostrou que o comprimento médio \pm erro padrão encontrado foi de $13,41 \pm 0,50$ mm e largura de $7,81 \pm 0,31$ (BIENFIELD et al., 2014). Em outro estudo, as médias das larguras ovarianas encontradas de acordo com o tamanho das cadelas foram de $12,0 \pm 0,6$ mm a $15,7 \pm 0,3$ mm e os ovários foram classificados em dois grupos considerando o peso dos animais. No mesmo estudo, os ovários das fêmeas felinas mediram cerca de 11 ± 2 mm de largura (CUNHA et al., 2019).

Segundo as análises de Moreira & Jacomini (2005), os ovários felinos tinham uma média \pm desvio padrão de $10 \pm 1,1$ mm de comprimento, $5,3 \pm 0,7$ mm de largura e $5,5 \pm 0,9$ mm de espessura. Assim, a variação das dimensões ovarianas para caninas e felinas encontrada na literatura parece ser discreta e pode ser atribuída a uma diversidade de fatores incluindo número de animais, idade, peso, alimentação, fase do ciclo estral, além do efeito do examinador na avaliação morfométrica dos órgãos e dos aparelhos utilizados.

2.2 Superpopulação de Animais e Saúde Pública

Estima-se que a população global de cães seja de 700 milhões (HUGHES; MACDONALD, 2013), sendo 400 milhões de cães domiciliados e 300 milhões cães de errantes/semidomiciliados em todo o mundo (ACC&D, 2013). Além do impacto em bem-estar dos próprios animais envolvidos devido à proporcional taxa de abandono, sabe-se que a superpopulação errante propicia a disseminação de zoonoses, acidentes de trânsito e mordeduras (LIMA; LUNA, 2012). Segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde), o método mais efetivo para a redução no número de cães e gatos abandonados é a esterilização em massa (BÖGEL et al., 1990).

Já na década de 90, Zawistowski et al. (1998) relatavam que à medida que mais estudos eram concluídos nesta área, profissionais precisariam se adequar ao desenvolvimento de novos programas que tenham como objetivo redução na superpopulação canina e felina. Sabe-se que existem diferentes políticas e estratégias de controle no número de animais dependendo de cada país e fundações associadas, incluindo: eutanásia de cães e gatos errantes, programas de esterilização em larga escala, implementação de leis na identificação de animais de companhia e punições em situações de abandono, entre outras (ACC&D, 2013).

Nos Estados Unidos, estima-se que 2,7 milhões de cães e gatos saudáveis são submetidos à eutanásia todos os anos por falta de adoção nos abrigos (JOHNSTON; RHODES, 2015). No Canadá, utilizou-se castração química em machos caninos e esterilização cirúrgica em fêmeas caninas, o que tem contribuído para redução geral na densidade populacional de cães (ACC&D, 2013). Na tentativa de minimizar a problemática da superpopulação de animais errantes, a esterilização muitas vezes é condição para a adoção de cães e gatos em países desenvolvidos como os EUA e o Reino Unido (ACC&D, 2013).

Em paralelo, existe discussão relacionada à esterilização cirúrgica. Em um estudo feito em São Paulo com proprietários de cães adotados de um abrigo, 56,5% foram contra a esterilização cirúrgica dos mesmos. Os motivos alegados foram por compaixão/piedade (58,1%), procedimento desnecessário (11,4%), custo (9,5%) e mudanças comportamentais (4,8%) (SOTO et al, 2005). A esterilização não cirúrgica também se torna uma opção aceitável para grupos que se opõem à contracepção e controle de fertilidade em cães e gatos por procedimentos cirúrgicos devido à crenças culturais e religiosas (ACC&D, 2013).

O baixo custo, facilidade de realização e aceitação social de um método de esterilização que não requer a remoção dos órgãos reprodutores, incentivam estudos e campanhas de esterilização química em grande escala, particularmente em áreas sem instalações hospitalares e presença de grande equipe especializada (KUTZLER, 2006). Segundo Massei & Miller (2013), integrar programas de controle de fertilidade por esterilização não cirúrgicas, relacionados à educação e saúde pública, são alguns dos principais fatores desafiadores do futuro controle da população de animais de companhia.

2.3 Métodos de Esterilização em Animais

Os métodos de esterilização podem ser classificados em três categorias: cirúrgico, imunizantes e químico. Métodos cirúrgicos incluem ovariectomia, ovariosterectomia e tubectomia (MOGHEISEH et al., 2017). Atualmente, a ovariosterectomia e orquiectomia eletivas são as cirurgias mais realizadas na clínica cirúrgica de pequenos animais (COE et al., 2006), sendo amplamente indicada para o controle populacional (BURROW et al., 2006). Essas técnicas ainda apresentam inúmeras vantagens além do controle populacional, como prevenção de neoplasia testicular e mamária, hipertrofia prostática, gestação indesejada, piometra e distocia. Porém, os custos, necessidade local/profissional capacitado para sua realização, tempo dispendido e cuidados pós-cirúrgicos a tornam impraticável quando se objetiva esterilização em massa e controle populacional (JOHNSTON; RHODES, 2015; SOTO et al., 2005; KUTZLER; WOOD, 2006).

Com relação à imun contracepção ou uso de imunizantes com objetivo de esterilização, o conceito se baseia no desenvolvimento da resposta imune humoral e celular contra proteínas ou tecidos específicos envolvidos na reprodução (MASSEI; MILLER, 2013). Na maioria, as pesquisas com imun contracepção envolvem a produção de vacinas contra proteínas da zona pelúcida e anti-GnRH, que fazem com que a resposta imune do animal cause supressão reprodutiva ao interagir com esses antígenos (JOHNSTON; RODES, 2015). Entretanto, algumas desvantagens são relatadas, especialmente em relação à falta de antigenicidade de muitas proteínas ou tecidos reprodutores, resposta inflamatória associada à reação imune podendo danificar tecidos ao redor, custos, reações granulomatosas no local da

injeção e a não eficácia da vacina em longo prazo, não proporcionando, portanto, esterilização definitiva e havendo necessidade de reaplicações periódicas (KUSTRITZ, 2018).

Por outro lado, estudos experimentais com esterilização química em cães machos são realizados há mais de cinco décadas (MASSEI; MILLER, 2013) e comprovam ser uma boa opção à castração cirúrgica (JANA; SAMANTA, 2006). Essa técnica consiste na injeção de diferentes substâncias via intratesticular ou intraepididimal, que culminam com a destruição das células germinativas, mas sem remoção das gônadas. Na maioria das situações, o mecanismo de ação se baseia em reação inflamatória e fibrosa local que impede a espermatogênese (KUSTRITZ, 2018). Ao longo dos anos, muitos compostos químicos foram estudados, incluindo cádmio, solução hipersaturada de cloreto de sódio e diepóxido de 4-vinilciclohexeno, porém dois quimioesterilizantes utilizados em machos se destacam pelo número de trabalhos publicados: o gluconato de zinco e o cloreto de cálcio (MASSEI; MILLER, 2013; CAVALIERI; HAYES, 2017).

O gluconato de zinco e arginina é estudado como quimioesterilizante em cães há décadas (FAHIM et al., 1993). O procedimento consiste basicamente na realização de uma injeção em cada testículo, em cães acima de três meses de idade (SOTO et al., 2009). Há relatos de efeitos adversos incluindo dois casos de orquite necrosupurativa e dermatite necrosante escrotal após injeção com o composto (Neutersol[®]/ EsterilSol[®]) (FORZÁN et al., 2014). A partir de 2003, outro composto utilizando o gluconato de zinco e arginina foi relatado (Testoblock[®]) sugerindo esterilização irreversível (OLIVEIRA et al., 2012).

Cães machos tratados na fase pré-puberal nunca se tornam férteis, já os sexualmente maduros podem permanecer férteis por até 6 semanas, por permanecer espermatozoides anterior ao tratamento no epidídimo e ducto deferente (ACC&D, 2013). Após esse período, é relatado a presença de degeneração e necrose tecidual testicular, diminuição das células de Sertoli, presença de áreas de atrofia dos testículos, epidídimos e túbulos seminíferos, seguidos por formação de tecido cicatricial e fibrose, o que impede movimento espermático, além de diminuição nos níveis de testosterona e ausência de espermatozoides (OLIVEIRA et al., 2012; DIGANG et al., 2017).

Em outro estudo, a castração química com o gluconato de zinco não foi método eficaz para esterilização de macacos rhesus machos. Ainda que houve evidência de perda dos túbulos seminíferos, a espermatogênese estava presente em 22 dos 24 testículos que receberam o medicamento (WOODWARD et al., 2017). Também foi estudada outra composição com o dobro da concentração de gluconato de zinco e com adição de dimetil sulfóxido, que atuaria como veículo otimizando a distribuição do fármaco nos testículos, esperando-se redução de

motilidade espermática (SOTO et al., 2009).

O cloreto de cálcio (CaCl_2), também administrado uma única vez por via intratesticular atua na esterilização induzindo edema, necrose e fibrose nos túbulos seminíferos e células de Leydig, causando azoospermia (JANA; SAMANTA, 2007; LEOCI et al, 2019). Foi estudado como quimioesterilizante para diferentes espécies em machos, incluindo bezerros (KOGER, 1978), touros (MITRA; SAMANTA, 2000; CANPOLAT et al., 2006), ratos (JANA; SAMANTA, 2006), asnos (ALI et al., 1991; IBRAHIM et al., 2016), cabras (JANA et al., 2005), cães (JANA;SAMANTA, 2007; SILVA et al., 2018) e gatos (BARAN et al., 2010; JANA; SAMANTA, 2011; PARANZINI et al., 2018)

Recentemente, o CaCl_2 demonstrou eficácia esterilizante sem os graves efeitos adversos relatados com uso de gluconato de zinco, em um período de nove meses de avaliação pós-aplicação (LEOCI et al., 2019). Diferentes concentrações foram estudadas para o cloreto de cálcio (0, 10, 20, 30 e 60%) e concluiu-se que a concentração de 20% causou azoospermia em 80% dos cães tratados, sem ocorrência de efeitos adversos (LEOCI et al, 2014b). Já em touros o cloreto de cálcio a 30% e 40% promoveu maior destruição do tecido testicular sem causar reações adversas (PEREIRA et al., 2018). Em cães, foi relatado ulceração escrotal e necrose testicular após administração de CaCl_2 nas concentrações de 30% e 60% (LEOCI et al., 2014b).

Além de diferentes concentrações, diferentes diluentes foram testados, como solução salina (JANA et al., 2002), lidocaína (JANA; SAMANTA, 2011), dimetilsulfóxido (DMSO) (SILVA et al., 2018; PARANZINI et al., 2018; PEREIRA et al., 2018) e etanol à 95% (LEOCI et al., 2014a). O cloreto de cálcio 20% diluído em etanol 95% demonstrou ser mais eficaz por causar azoospermia por maior período de tempo, em relação à diluição com lidocaína (LEOCI et al., 2014a). CaCl_2 também apresentou efeito dose dependente em machos, ou seja, observou-se que quanto maior a concentração administrada, mais significativos foram os resultados obtidos em relação a massa testicular em gatos (JANA; SAMANTA, 2011), esterilidade em ratos (JANA; SAMANTA, 2006) e touros (PEREIRA et al., 2018).

Outros estudos foram realizados para padronizar a formulação, dose e protocolos de administração para este quimioesterilizante (MASSEI; MILLER, 2013). Entretanto, relatos sobre o efeito da injeção intraovariana destes químicos em qualquer espécie animal não haviam sido publicados até 2017 (MOGHEISEH et al, 2017; CAVALIERI; HAYES, 2017). O volume a ser injetado via intratesticular destes compostos foi baseado na largura escrotal, que é mensurada com paquímetro, e já existe padrão estabelecido para o volume de quimioesterilizante a ser aplicado em machos (OLIVEIRA et al., 2012).

A esterilização química possui como vantagens: tratamento único, de baixo custo e

permanente, sem necessidade de reforços. Além disso, nenhuma ou pouca sedação é necessária, a preparação pré administração e cuidados após o procedimento são mínimos, o que facilita a esterilização em massa em curtos períodos de tempo, também proporcionando a volta do animal ao seu ambiente rapidamente (CAVALIERI, 2017). Também pode evitar complicações cirúrgicas como miíase cutânea, hemorragia e herniação (JANA; SAMANTA, 2007)

2.4 Esterilização Química em Fêmeas

Em 2017, foi avaliada a eficácia de esterilização por injeção intraovariana em vacas com cloreto de cálcio, gluconato de zinco e associação das duas substâncias, resultando em atrofia ovariana (CAVALIERI; HAYES, 2017). Os autores referiram ser um estudo preliminar e sugeriram que futuros experimentos seriam necessários para obtenção de doses eficazes e modo de aplicação da injeção no ovário, comparando com os resultados obtidos. Em outro estudo (2017), foi avaliada a eficácia esterilizante do gluconato de zinco por injeção intraovariana em cadelas, concluindo que foi possível causar alterações teciduais ovarianas sem complicações sistêmicas (MOGHEISEH et al., 2017).

Mogheiseh et al. (2017) referiram a aplicação de quimioesterilizante em ovários de cadelas, por meio de exposição cirúrgica, para tal, utilizaram para a determinação do volume a ser injetado, o padrão previamente descrito para injeção intratesticular em cães (NEUTERSOL, 2004, ACC&D, 2004; OLIVEIRA et al., 2012), extrapolando este conceito para fêmeas. Entretanto, não foram encontrados estudos comprovando que tal extrapolação de doses/volumes seria possível. No estudo com a utilização de quimioesterilizantes em vacas, a quantidade de volume a ser injetado foi obtida por prática prévia em frigorífico em tratos reprodutivos (CAVALIERI; HAYES, 2017). Mesmo assim, os autores referiram que, possivelmente, o volume injetado nos ovários tenha sido um dos limitantes para os resultados obtidos, não sendo os ideais pensando-se em esterilização.

Ao contrário do observado para machos, os estudos envolvendo quimioesterilizantes em fêmeas são recentes e poucos. Embora estudos sejam sendo conduzidos na tentativa de viabilizar uma via minimamente invasiva para a aplicação intraovariana de quimioesterilizante (GOMES, 2020), esses esforços esbarram em conhecimentos básicos como critérios, doses e volumes a

serem utilizados nessas aplicações. Com relação às cadelas e gatas, não se encontraram trabalhos que permitam concluir qual o volume de quimioesterilizantes pode ser utilizado pela via intraovariana ou mesmo como esse cálculo pode ser feito e que fatores o influenciariam. Este é um dos pontos que limita o progresso dos estudos envolvendo quimioesterilizantes em fêmeas.

2.5 Volumetria Testicular e Ovariana

Diversos estudos vêm sendo realizados há décadas para apontar a forma mais acurada de estimar a volumetria dos testículos em relação ao seu volume real. Foram comparados diferentes métodos de mensurações, incluindo: paquímetros, pinças, orquidômetros, fórmulas matemáticas associando comprimento, largura, espessura testicular com multiplicação por um fator de conversão, massa corporal e correlações com achados ultrassonográficos, tanto em humanos (DORNBERGER; DORNBERGER, 1987; SCHIFF; LI; GOLDSTEIN, 2003; HSIEH et al., 2009; SAKAMOTO et al., 2007; PILATZ et al., 2012;), como bovinos (BAILEY et al., 1997). galinhas (PRICKING, 2017) e cães (PALTIEL et al., 2002; GOULETSOU; GALATOS; LEONTIDES, 2008).

Entretanto, foi encontrada variação com base no examinador e na fórmula utilizada para calcular o volume (PALTIEL et al, 2002). Embora, muitos pesquisadores atualmente acreditem que as estimativas ultrassonográficas sejam mais precisas, o debate sobre os diferentes métodos para estimar o volume testicular ainda persiste (SCHIFF; LI; GOLDSTEIN, 2003). A determinação ultrassonográfica do volume nos testículos de cães (órgão isolado sem pele escrotal e túnica dartos) mostrou um erro médio de 15%, enquanto o paquímetro apresentou um erro médio de 9%, que foi o volume testicular mais próximo do real, cuja média de erro foi de 7% (DORNBERGER; DORNBERGER, 1987). A largura testicular estimada por paquímetro e ultrassonografia antes da castração não foram significativamente diferentes em cães (GOULETSOU; GALATOS; LEONTIDES, 2008).

O tamanho testicular é um critério importante para avaliar a função reprodutiva e se correlaciona com qualidade de sêmen e fertilidade em homens (TAKIHARA et al, 1983),

bovinos (CHACUR et al., 2017) e cães (WOODALL; JOHNSTONE, 1988). Além disso, é um importante parâmetro para a quimioesterilização, pois serve como base para decidir volume a ser injetado via intratesticular. A partir de 2004, foi estabelecido uma referência padrão, associando a largura escrotal e volume de quimioesterilizante a ser injetado (NEUTERSOL, 2004, ACC&D, 2004). Essa tabela é geralmente utilizada em estudos envolvendo quimioesterilização em machos desde então. Porém, não foi encontrado a descrição da metodologia utilizada para concluir essa associação entre dimensão e volume a ser injetado (NEUTERSOL, 2004).

A volumetria ovariana em humanas é bem discutida na literatura (SAMPLE; LIPPE; GYEPES, 1977; SCHILD et al., 2001). É aplicada tanto em pesquisas como na rotina clínica, como para diagnóstico de ovários policísticos e correlação com fatores biológicos (idade, altura, massa corporal) (BRIDGES et al., 1993; TEIXEIRA et al., 1999; JONARD; ROBERT; DEWAILLY, 2005; ALI; ELSADAWY; KHATER, 2015). Em mulheres, alterações no volume ovariano apresentaram correlação com a idade e não com o peso corporal (PAVLIK et al., 2000; HAUTH et al., 2006) e também se alteram com a fase folicular (CHRISTENSEN; BOLDSSEN; WESTERGARD, 1997). Em meninas da mesma idade, foram obtidos diferentes volumes ovarianos, mas notou-se que outros fatores podem influenciar os achados como: hormônios, nutrição, presença de folículos/cistos e estatura (BRIDGES, 1998; TEIXEIRA et al., 1999). Nas cadelas e gatas, estudos similares não foram encontrados.

A volumetria testicular e ovariana é geralmente calculada usando as três fórmulas mais comuns: Fórmula empírica de Lambert = Length (comprimento) x Width (largura) x Height (espessura) x 0,71 (LWH0,71), que se destacou em estudos com homens (LAMBERT, 1951; TAKIHARA et al, 1983; SCHIFF; LI; GOLDSTEIN, 2003); ou usando a fórmula de um elipsóide = $L \times W \times H \times 0,52$ (LWH0,52), muito utilizada para determinar volume ovariano em mulheres (BRIDGES et al., 1993; SAMPLE; LIPPE; GYEPES, 1997; SCHILD et al., 2001; JONARD; ROBERT; DEWAILLY, 2005); ou pela fórmula de um prolato esférico = $L \times W^2 \times 0,52$ (L2W0,52), que também é utilizada em estudos de volumetria em humanos e cães pois ao compararem as três formulas supracitadas, mostrou-se anteriormente ser a mais precisa em relação ao volume real do órgão (PALTIEL et al., 2002; SAKAMOTO et al., 2007; GOULETSOU; GALATOS; LEONTIDES, 2008; HSIEH et al., 2009; PILATZ et al., 2012).

Recentemente, a fórmula de Lambert foi referida como mais precisa em relação à estimativa do volume testicular *in vivo* de humanos e cães (SAKAMOTO et al., 2006; GOULETSOU; GALATOS; LEONTIDES, 2008). No entanto, fatores como: presença de pele

escrotal e epidídimo, reprodutibilidade do examinador, a metodologia e a fórmula utilizada podem influenciar nas estimativas volumétricas (BEHRE; NASHAN; NIESCHLAG, 1989; CARSLÉN et al., 2000). Ainda não há consenso sobre qual fórmula seria mais acurada para estimar o volume real de órgãos reprodutivos.

Diante do exposto, para maiores avanços no estudo de quimioesterilizante em fêmeas, muitas informações ainda precisam ser buscadas: quantificação dos volumes de quimioesterilizante que podem ser aplicados, a determinação das mensurações ovarianas e busca de sua relação com o volume de quimioesterilizante, a determinação dos volumes ovarianos e suas possíveis correlações com características biológicas (massa corporal, idade), que possam influenciar na decisão de volume de quimioesterilizante a ser injetado de forma apropriada no ovário.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Definir o volume de quimioesterilizante a ser injetado no ovário de cadelas e gatas.

3.2 ESPECÍFICOS

1. Definir o volume adequado de quimioesterilizante para repleção dos ovários, a partir de medidas de espessura, largura, comprimento e volume ovariano.
2. Verificar a correlação entre massa corporal e a idade com a volumetria ovariana.
3. Comparar três diferentes fórmulas de cálculo de volume ovariano com o volume de quimioesterilizante necessário para a repleção do órgão.
4. Quantificar o percentual de expansão do ovário após injeção de quimioesterilizante.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

OVARIAN MORPHOMETRY APPLIED TO THE USE OF CHEMOSTERILIZER IN BITCHES AND QUEENS

Bruna Gonzalez dos Santos^{1*} (ORCID: 0000-0001-5033-9166), Maria Ligia de Arruda Mestieri¹ (ORCID: 0000-0003-2130-9093), Etiele Maldonado Gomes¹ (ORCID: 0000-0002-3132-4759)

This article will be submitted to the journal "Anatomia, Histologia, Embryologia"

¹Postgraduate program in Animal Science, Federal University of Pampa (UNIPAMPA), Uruguaiana, RS, Brazil.

BITCHES AND QUEENS

Abstract

In order to achieve success in strategies for stray animals' population control, alternative methods to surgical castration, which reaches greater number of animals, have been studied. However, as an initial requirement, it is necessary to know adequate volumes of chemosterilizer to be injected into the ovary and biological factors that influence ovarian volumetry. This study aims to determine the volume of 20% calcium chloride solution diluted in 95% ethanol plus methylene blue dye to be injected into the ovary of bitches and queens. Furthermore, correlations between ovarian measures (length [L], width [W], height [H] and volume) and body weight, age and the volume of injected intraovarian chemosterilizer were analyzed. For this, 64 ovaries collected after elective ovariohysterectomy were used. All ovaries received an injection of calcium chloride solution. Ovarian measures were performed pre- and post-injection, and volume was calculated using OV1: Lambert's empirical formula ($LWH \times 0.71$), OV2: formula for an ellipsoid ($LWH \times 0.52$) and OV3: formula for spherical prolate ($LW \times 20.52$). The mean \pm standard error of the chemosterilizer volume injected in the ovary was 0.09 ± 0.02 mL for bitches and 0.10 ± 0.02 mL for queens; age showed a significant correlation to chemosterilant volume for both species and body weight showed a significant correlation to ovarian measurements and volumetry for bitches. Lambert's empirical formula and ellipsoid formula were more reliable for this assessment and respectively demonstrate an increase of 33% and 24% in ovarian volume in bitches post-injection; and 27% and 22% in queens post-injection.

Keywords: intraovarian, injection, calcium chloride, volumetry, chemosterilization

Introduction

The overpopulation of dogs and cats worldwide is a serious problem for public health (Lima & Luna, 2012). The most effective way to reduce the number of stray dogs and cats is massive sterilization (ACC&D, 2013). To replace surgical sterilization, alternative non-surgical methods have been developed to sterilize pets, such as immuno and chemical sterilization (Kutzler & Wood, 2006). For chemical sterilization, 20% calcium chloride diluted in 95% ethanol has been used as in dogs by intratesticular injection and induced the sterilization (Paranzini *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2018; Leoci *et al.*, 2019).

In males, the optimal volume of chemosterilizers to be injected in testis is based on its dimensions (Leoci *et al.*, 2014a, 2014b; Paranzini *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2018). Only one study was found referring chemical castration in bitches with zinc gluconate (Mogheiseh *et al.*, 2017) This based the chemosterilant volume considering the pattern of measurements previously determined for canine testicular injection (Neutersol, 2004; Oliveira *et al.*, 2012). However, no scientific data was referred or has been found that indicates this transposition is valid. Considering queens, no reports of use of ovarian chemosterilants was found.

Therefore, to study the effects of chemosterilants in ovaries of dogs and cats and minimally invasive procedure alternatives to deliver these chemosterilants, it is important to establish the volume for intraovarian injection. Also, research that used intraovarian injection in animals did not studied alterations in the volume of the organ pre and post-injection (Cavalieri & Hayes, 2017; Mogheiseh *et al.*, 2017), as it was done in males. In humans, ovarian volume suffers influence of age, height, and pubertal status (Pavlik *et al.*, 2000; Jonard, Robert, Dewailly, 2005; Ali, Elsadawy, Khater, 2016). In female animals, there is scarces studies on ovarian volumetry to any purpose, hindering the progress of studies involving chemosterilants.

Ovarian volumetry is generally calculated using the three most common formulas: Lambert's empirical formula (Lambert, 1951; Tahikara *et al.*, 1983; Schiff, Li, Goldstein, 2003); or using the formula of an ellipsoid (Sample, Lippe, Gyeppes, 1997; Schild *et al.*, 2001; Jonard, Robert, Dewailly, 2005); or by the formula of a spherical prolate (Gouletsou, Galatos, Leontides, 2008; Hsieh *et al.*, 2009; Pilatz *et al.*, 2012). However, there is no consensus on which formula would be more accurate to real organ volume.

We hypothesized that there are correlations between age and weight with ovarian volume that could interfere in the chemical sterilization of female dogs and cats. Then, this study aims to: (a) Define the appropriate volume of chemosterilant for repletion of the ovaries; (b) Check if body mass and age are factors that influence ovarian volume; (c) Compare three different formulas for calculating ovarian volume with the volume of chemosterilant required for organ repletion and (d) Quantify the percentage of ovarian expansion after injection of chemosterilant.

Material and methods

Ethical aspects

This study was approved (n° 025/2019) and followed the guidelines of the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA), and Normative Resolution No. 30/2016 of National Board of Control of Animal Experimentation (CONCEA).

Animals and design experimental

The study was carried out with 32 ovaries of bitches and 32 ovaries of queens of different breeds, considered clinically healthy and without signs of estrus, that underwent elective ovariohysterectomy as a sterilization method. Immediately after the ovariohysterectomy, ovaries, fallopian tubes and uterine horns was maintained in saline

solution (0,9% NaCl) and measurements were performed by the same technician. Ovarian length, width and thickness were measured with a digital electronic caliper (accuracy: ± 0.2 mm; margin of error: 0.01 mm) and compiled (pre-injection measurements). The exclusion criteria used was the presence of morphological changes in the ovaries. Weight, breed, and age were also compiled.

Following the measurements, the bursa of canine's ovaries were exposed and intraovarian injection was performed with a needle (26G) attached to a 1 mL syringe calibrated at 0.02 mL intervals. For standardization, the needle was inserted through the caudal pole of the ovary in a horizontal position, towards the cranial pole without any cranial perforation while the organ was digitally restraint. The injected solution was previously prepared and consisted of 20% calcium chloride diluted in 95% ethanol plus a drop of methylene blue dye for each 1 mL of solution.

The dye was used to evidence the total fill of the ovary and any leakage. Solution was injected as the needle was gradually removed from the organ, until fulfill and stain were noticed. The injection was interrupted, and the needle removed from the organ, so the injected volume was recorded. Then, the measurements (length, width and thickness) were undertaken and compiled again (post-injection).

From 32 ovaries, were included 31 canine and 23 feline ovaries in the study. The remaining ovaries were excluded because they had cysts. The presence of unilateral cystic structures was found mainly in cats (Figure 1B). In both groups, none of the animals presented clinical signs of estrous.

The mean body mass of the bitches was 11.96 ± 6.64 kg (minimum of 3.6 and maximum of 32.0 kg) and mean age 28.25 ± 23.52 months (minimum of 6 and maximum of 96 months). Different breeds were included: crossbred (n = 10), Lhasa (n = 1), Border Collie (n = 2), Australian Cattle Dog (n = 2) and Golden Retriever (n = 1).

In the feline group, mean body mass was 2.67 ± 0.48 kg (minimum of 2 and maximum of 3.6 kg) and mean age 13.82 ± 5.33 months (minimum of 7 and maximum of 24 months). Most of the cats were crossbred (n=15) and one was Persian.

The three variables measured were used to estimate the ovarian volume pre- and post-injections. Ovarian volumes were calculated using three different formulas (Paltiel *et al.*, 2002), as follows Lambert's empirical formula = (length) L x (width) W x (height) H x 0.71 (LWH0.71); Ellipsoid formula = L x W x H x 0.52 (LWH0.52); and Spherical prolate formula = L x W² x 0.52 (LW²0.52)

Statistical Analysis

The results of body mass, age, injected volume and ovarian measurements (length, width, thickness and volume) pre- and post-injection obtained were analyzed using descriptive statistics (mean \pm standard error, minimum and maximum). Correlations of the ovarian measurements, body mass, age, ovarian measurements and volumetry and volumes of chemosterilant injected were investigated. Normality tests (Shapiro-wilk and Kolmogorov-smirnov) were performed. When data were normally distributed, Student's T test was used to compare means and the Pearson test was used for correlations. When data was not normally distributed, Wilcoxon test was used to compare means and the Spearman test was used for correlations. The analyzes were performed using IBM SPSS[®] Statistics software (version 20.0). Significant differences were considered when $p < 0.05$ and the correlation values presented by the correlation coefficient "r" (-1 to 1). It was considered weak correlation when coefficient was (0.10-0.39), a moderate correlation (0.40-0.69), a strong correlation (0.70-0.89) and a very strong correlation (0.90-1.00). Linear graphs and percentage of increase of measures and volumes were made using the Microsoft Excel Software (version 2013).

RESULTS

The mean of the injected volume was 0.09 ± 0.02 mL (minimum of 0.06 and maximum of 0.18 mL) in the bitches, while in the queens, mean was 0.10 ± 0.02 mL (minimum of 0.06 and maximum of 0.15 mL).

A minimal leakage of the solution was observed in most ovaries. This leakage occurred when the ovary was already filled to its maximum capacity. When this capacity was exceeded, staining of blood vessels towards the uterine horns, broad ligaments and round ligaments occurred and then fluid overflowed out of the organ. In ovaries of queens there was a greater resistance of solutions overflow than in canine ovaries.



Figure 1. Photomacrography of surgical specimen, showing ovary, fallopian tube and uterine horns. Canine ovaries completely stained after chemosterilant injection (A), Feline left ovary completely stained and the right presence of ovarian cysts (B) and ovarian blood vessels stained (C).

The mean of length, width, thickness (observed pre- and post-injection) are compiled on Table 1 and were compared ($P < 0.05$) in a 95% confidence interval. In canine group the width and thickness showed significant increase post-injection (11% and 21%, respectively); while in feline group only thickness increased significantly (37%) post-injection. Length of felines ovaries showed a significant decrease post-injection (-5%).

Table 1 - Description of ovarian measurements, pre- and post-chemosterilant injection (mean \pm SD) in bitches and queens.

Species	Ovarian Measurements	Measurement Pre injection (mm)	Measurement Post injection (mm)	Variation (%)	P - Value
Canine	Length	11.86 \pm 2.72	11.54 \pm 2.61	-3%	0.245
	Width	6.35 \pm 1.86	7.02 \pm 1.69	+11%	0.001*
	Thickness	4.70 \pm 1.49	5.71 \pm 1.34	+21%	0.001*
Feline	Length	9.36 \pm 1.38	8.91 \pm 1.52	-5%	0.043*
	Width	4.93 \pm 0.77	4.86 \pm 0.88	-1%	0.637
	Thickness	3.50 \pm 0.79	4.81 \pm 0.86	+37%	0.001*

*Significant level at $p < 0.05$

In canine's group, width and thickness presented a positive moderate significant relation with injected volume, while in the feline group, length and thickness showed a positive moderate significant correlation with injected volume. Considering body mass, length showed a positive strong significant correlation with this variable in the canine's group, while width was moderate. Considering age, both length and width demonstrated a negative moderate significant correlation in the felines group, and there was a moderate significant correlation with injected volume in both species, whereas in the queens group, it was negative and in the bitches group, it was positive (Table 2).

Table 2. Correlations coefficient between ovarian pre injection measurements, volume of injected chemosterilant, body mass and age for canine and feline.

Species	Measure	Measure					
		Injected Volume	Length	Width	Thickness	Body mass	Age
Canine	Length	0.189	-	-	-	-	-
	Width	0.453*	0.448*	-	-	-	-
	Thickness	0.440*	0.227	0.724*	-	-	-
	Body mass	0.207	0.787*	0.445*	0.240	-	-
	Age	0.633*	0.096	0.038	0.160	-0.43	-
	Injected Volume	-	-	-	-	-	-
Feline	Length	0.462*	-	-	-	-	-
	Width	0.468*	0.593*	-	-	-	-
	Thickness	-0.043	0.486*	0.156	-	-	-
	Body mass	-0.63	-0.169	-0.077	0.253	-	-
	Age	-0.562*	-0.462*	-0.462*	0.248	0.222	-
	Injected Volume	-	-	-	-	-	-

*Significant difference ($p < 0.05$)

Among the ovarian measurements, the common variable to both species that showed significant correlation with the injected volume was the width (mm) (Table 2). For this reason, this variable was used in graphs, illustrating the linear dispersion between width (horizontal axis) and the injected volume (vertical axis) in each case. Each point shown in the graph refers to an ovary, marking its width and the volume injected corresponds (Figure 2).

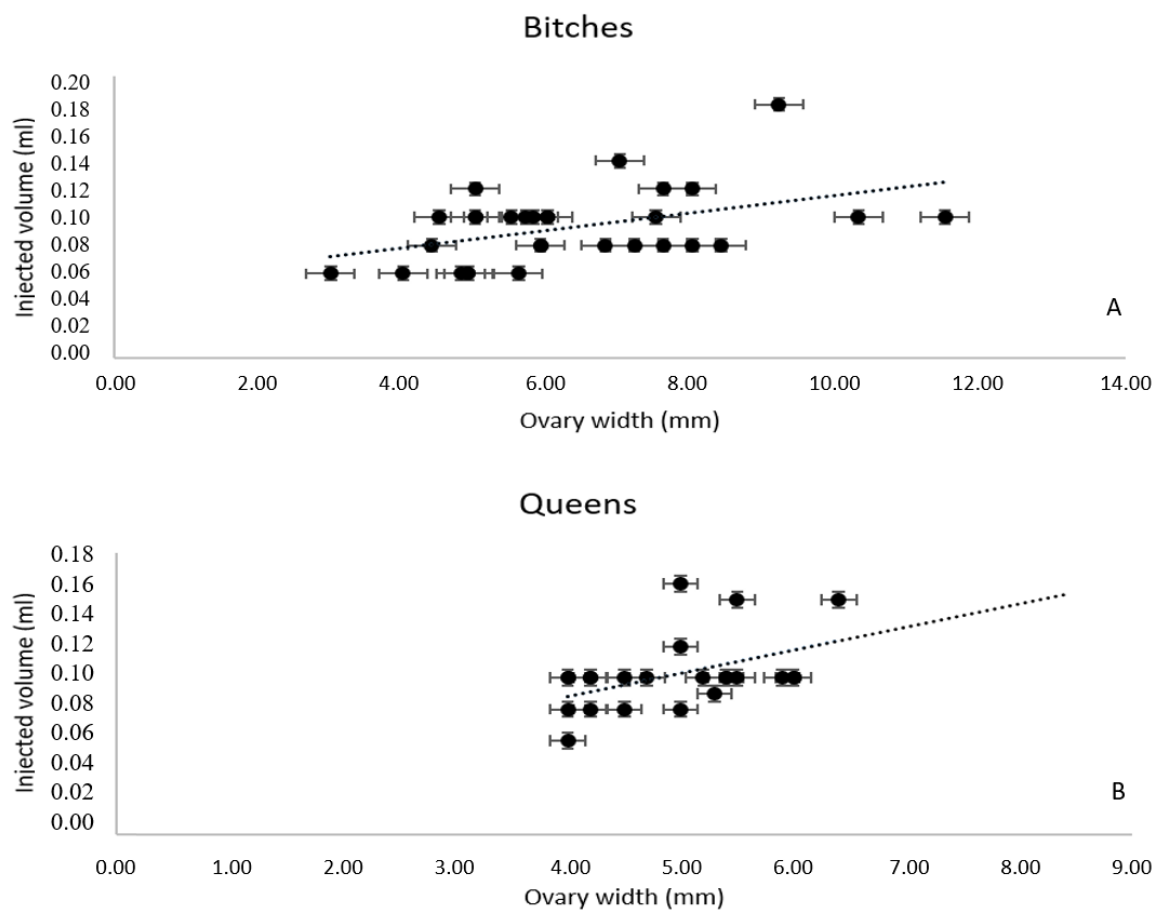


Figure 2. Linear dispersion representing correlation between ovarian width and total volume injected in bitches (A) (above) and queens (B) (below).

In the canines, there was a significant increase in ovarian volume post injection using all the three formulas; results showed respectively with OV1, OV2 and OV3, a 33%, 24% and 18% increase in organ volume post injection. In the felines, ovarian volumes calculated with the formulas OV1 and OV2 also showed a significant increase post injection; results showed 27% and 22%, respectively (Table 3).

Table 3 - Description of ovarian volumes in mL (mean \pm SD), calculated using the formulas OV1, OV2 and OV3 pre- and post-injection in bitches and queens.

Species	Calculated ovarian volumes	Volume Pre injection (mL)	Volume Post injection (mL)	Variation (%)	P - value
Canine	OV1	0.27 \pm 0.11	0.36 \pm 0.14	+33%	0.001*
	OV2	0.21 \pm 0.09	0.26 \pm 0.11	+24%	0.001*
	OV3	0.28 \pm 0.12	0.33 \pm 0.11	+18%	0.002*
Feline	OV1	0.20 \pm 0.04	0.24 \pm 0.07	+27%	0.001*
	OV2	0.15 \pm 0.03	0.18 \pm 0.04	+22%	0.001*
	OV3	0.22 \pm 0.04	0.23 \pm 0.05	-8%	0.386

* Significant level at $p < 0.05$

In canines, ovarian volumes calculated by all three formulas presented a positive moderate significant correlation with injected volumes. However, in felines group, only OV3 showed a positive moderate significant correlation with injected volume. Length, width and thickness were positive significant correlated to all equations in both species, except for thickness with OV3 in feline group. It is worth mentioning that width was the only variable that presented a strong relationship with OV3, in both species. Body mass of the bitches was positively correlated with ovarian volume obtained by three formulas. Considering age, in the felines group, it showed a positive moderate correlation to OV3 (Table 4).

Table 4 - Correlations between ovarian measures pre-injection and ovarian volume calculated by OV1, OV2 and OV3 formulas pre-injection, volume injected, body mass and age from bitches and queens.

Species	Equation of organ volume	Measurements					
		Injected Volume	Length	Width	Thickness	Body mass	Age
Canine	OV1	0.435*	0.621*	0.873*	0.840*	0.595*	0.112
	OV2	0.433*	0.624*	0.861*	0.845*	0.592*	0.110
	OV3	0.413*	0.672*	0.930*	0.633*	0.614*	-0.14
Feline	OV1	0.244	0.829*	0.635*	0.803*	0.107	-0.111
	OV2	0.252	0.848*	0.615*	0.793*	0.130	-0.074
	OV3	0.510*	0.773*	0.954*	0.256	-0.101	0.431*

*Significant difference ($p < 0.05$)

DISCUSSION

Width was the only variable in common to both species that was positively correlated with the injected volume. It is important to highlight that width presented strong correlation with ovarian volume in both species, which can stand out this variable for future studies in ovarian volumetry. Averages of the ovarian widths varied from 12.0 ± 0.6 mm to 15.7 ± 0.3 mm and were classified in two groups considering the weight of the animals (small or medium port) (Cunha *et al.*, 2019). In the same study, the ovaries of feline females measured about 11 ± 2 mm in width (Cunha *et al.*, 2019), values that also surpasses the ones in this study.

According to Moreira & Jacomini (2005), feline ovaries had a mean \pm standard deviation of 10 ± 1.1 mm in length, 5.3 ± 0.7 mm in width and 5.5 ± 0.9 mm in thickness, describing similar measures to the ones presented. A previous study of ovarian morphometric evaluation in bitches, showed higher dimensions, where the mean length \pm standard error found was 13.41 ± 0.50 mm and width of 7.81 ± 0.31 (Biensfield *et al.*, 2014). This study included a larger

number of ovaries, but the animals were in different stages of the estrous cycle, which can cause variation. The measures presented in our study serves as a basis and comparison for future studies about morphometry and volumetry in the ovaries of bitches and queens.

Although ovaries with the same width supported different amounts of volume of chemosterilant injected, it was possible to notice that there was a positive linear correlation, showed by the positive trend line, in both groups. This means that even if there was dispersion, probably caused by biological factors that will be discussed, a positive correlation between width and volume of chemosterilant was established in both species. This positive correlation was previously reported for the volume calculation of chemosterilants used in testicles (Oliveira *et al.*, 2012).

The ovarian volume decreases in according to age and there is no correlation with weight in women (Pavlik *et al.*, 2000). Also, in women, the volume and maximal diameter of ovaries differ significantly with age (Hauth *et al.*, 2006) and during menstrual cycle, with lower value in follicular phase and higher values in luteal phase (Christensen, Boldsen, Westergard, 1997). In girls of the same age, different ovarian volumes were obtained, but there are other associated factors to the ovarian volume besides age and weight; as hormones, nutrition, presence of follicles and cysts and stature (Bridges *et al.*, 1993. Teixeira *et al.*, 1999).

In a study using intraovarian injection of zinc gluconate in bitches, the volume of injection was determined by ultrasound measurement of ovarian diameters. It was reported that the injection reduced the size of the ovary by the end of the study in 30 days (13.09 to 9.45 mm), where mean of diameter was measured before and immediately post-injection and in the last day of the study (Mogheiseh *et al.*, 2017). The authors used as reference the volume of injection of zinc gluconate in accordance with testis volume in dogs. In that study, authors supposed that as the chemosterilant used in testis can be estimated by organ's width, the same parameter could be used for female, to estimate the volume of injection (Oliveira *et al.*, 2012).

It was considered about 0.1-0.2 mL of zinc gluconate for injection in each ovary (Mogheiseh *et al.*, 2017), values that surpasses the ones reported in the present study.

Although these authors (Mogheiseh *et al.*, 2017) did not describe leakage of the chemosterilant, our study observed that the minimum and maximum volume to be applied would be from 0.06 to 0.18 mL for bitches and from 0.06 to 0.15 mL for queens. However, the density of the applied chemosterilant in our study may interfere with the volume supported by the organ, since it is a different type from that mentioned by the author. The use of a volume of chemosterilant beyond the possible limits of the organ may leakage in the abdominal cavity and its clinical consequences are still unknown.

In a study of intraovarian injection of chemosterilant in cattle, the volume of calcium chloride administered into each ovary was 3 mL and the volume of zinc gluconate administered was 3 mL for the first application; but it was then reduced to 1.5 mL per ovary for the rests of replicates, since animals presented signs of pain (Cavalieri & Hayes, 2017). Practice on ovaries of cows from slaughter performed on that study suggested that 1-2 mL would be sufficient to distend most of the ovaries in cattle (Cavalieri & Hayes, 2017).

Results also show that canine body weight was positively and significantly correlated to ovarian length, width and volumes. The correlation was reported in a study in male cattle, with a positive strong correlation observed between testicular volume and body's weight, and with testicular volume and body's mass index. Also, scrotal circumference and the variables age, body weight, testicular length and testicular height showed a positive strong correlation (Chacur *et al.*, 2017). In male dogs, measurements of scrotal width were strongly correlated with testicular weight (Woodall & Johnstone, 1988). So, positive correlations between physical and testicular morphometry variables were expected.

Ovaries are three dimensional ovoid structures that can change position, size and volume through life (Hassen, 2013). The ovarian volumes may increase, even with the decrease

of two measures and increase of only one of them. For instance, in both species, thickness showed the greater variation before and after injection of chemosterilizer. In addition, in the feline group, length and width post-injection showed a decrease. The three-dimensional shape also explains why a decrease in ovarian volume was observed after the chemosterilant injection using formula of OV3 in the feline group. In OV3 the variable thickness is not present, influencing those results and showing contradictory decrease in organ volume, even this did not happen biologically.

Formulas to estimate the ovarian volume that do not include all those three variables would have more chances of error and should be avoided in further studies. For this reason, the Lambert's empirical formula and the formula of an ellipsoid should be more reliable to estimate and compare variations in ovarian volumes, rather than the formula for a spherical prolate. The authors believe that knowing the information of the ovarian volume expansion post-injection could be used as an indirect parameter to assess whether the injection caused total organ repletion in future studies.

Previous studies comparing the three formulas found that the empirical formula of Lambert provided better accuracy to estimate real volume of testicles than the other two formulas (Paltiel *et al.*, 2002; Sakamoto *et al.*, 2007; Gouletsou, Galatos, Leontides, 2008). Still, the calculation of ovarian volume is an estimative, because of its irregular shape, which may not be a perfect sphere or prolate ellipse (Jonard, Robert, Dewailly, 2005). In women, there is no consensus of the most suitable equation of estimating ovarian volume (Ali, Elsadawy, Khater, 2016).

In canine ovaries, leakage occurred more frequently than in cats, so it may be that the cats have greater capacity to retain volume inside the organ. However, a minimal leakage of the solution was observed in most ovaries of both species. Likewise, it was reported that fibrous tissue and the capsule around the ovary caused resistance to injection sometimes and could

contribute to the scape of fluid from the ovary in cows (Cavalieri & Hayes, 2017). In canine ovaries, leakage was reported, but also the bursa helped to contain the liquid (Parsemus Foundation, 2010). In this study, the bursa was removed from the canine ovaries to have a clearer view and more accurate measurements of the organs, so it was not possible to assess whether it would have such an action in the event of extravasation of chemosterilant.

Moreover, it was possible to notice that the solution stained the ovarian blood vessels towards the uterine horns, broad ligaments and round ligaments, which was also reported previously (Parsemus Foundation, 2010). This can be explained by the existence of anastomoses between uterine and ovarian arteries (Khafi *et al.*, 2018). Therefore, the solution cannot be harmful to other tissues in contact, as a stroke and/or a scape trough the blood vessel system should be expected after the injection. The choice of injection of calcium chloride in the present study was based on the fact that it is a chemosterilant with low cost and presenting good results currently (Cavalieri & Hayes, 2017; Leoci *et al.*, 2014b; Leoci *et al.*, 2019) but all the solutions should follow this care.

Although there are studies describing ovarian measurements, it has not been found yet data related to the volume of injection tolerated. Other factors beyond organ measurements seems to affect the volume of chemosterilant that is supported by ovaries. Future studies of ovary volumetry and chemosterilant volume determination should include a great number of animals, divided per groups considering: age range, weight range, estrous cycle, body score and, probably, breed. A low number of researches concerning chemical injection in ovaries has been published and further evaluation using a larger population, long time follow-up, adjustments of dose, site of administration and the components of treatment is important.

CONCLUSION

In this study, it was concluded that (a) An average of 0.09 mL for bitches and 0.1 mL for queens of volume of chemosterilant was injected intraovarian; (b) Age showed a significant correlation in chemosterilant volume for cats and dogs and body mass showed a significant correlation to ovarian measurements and volumetry for bitches; (c) Lambert's empirical formula ($L \times W \times H \times 0.71$) or The formula of an ellipsoid ($L \times W \times H \times 0.52$) were more reliable for organ volume calculation; (d) According to OV1 and OV2 formulas, an increase of 33% and 24% in ovarian volume was seen in bitches; in queens, the organ volume increased 27% and 22%, respectively.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

REFERENCES

- ACC&D. (2013). Alliance for Contraception in Cats & Dogs. *Contraception and Fertility Control in Dogs and Cats*. A Report of ACC&D. Disponível em: <https://acc-d.org/resource-library/ebook>
- Ali, H., Elsadawy, M., Khater, H. (2016). Ultrasound assessment of polycystic ovaries: Ovarian volume and morphology; which is more accurate in making the diagnosis?!. *The Egyptian Journal of Radiology and Nuclear Medicine*, v 47, Issue 1, 347-350.
- Bridges, N. A. et al. (1993). Standards for ovarian volume in childhood and puberty. *Fertility and Sterility*, [s. l.], v. 60, n. 3, p. 456–460.
- Cavaliere, J., Hayes, L. (2017). Examination of the use of intraovarian administration of CaCl₂ and zinc gluconate as potential chemosterilants in *Bos indicus* heifers. *Australian veterinary journal*, [s. l.], v. 95, n. 11, p. 403–415. doi:10.1111/avj.12644

Cavalieri, J. (2017). Chemical sterilisation of animals: A review of the use of zinc-and CaCl₂ based solutions in male and female animals and factors likely to improve responses to treatment. *Animal Reproduction Science*, v. 181, p. 1-8. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2017.03.010

Chacur, M. G. M., Miyasaki, A. A., Oba, E., Souza, C. D., & Gabriel Filho, L. R. A. (2017). Body and testicular development and serum testosterone concentrations in Brahman males. *Semina: Ciências Agrárias*, 38(4Supl1), 2561. doi:10.5433/1679-0359.2017v38n4supl1p2561

Christensen, J.T., Boldsen, J. and Westergaard J.G. (1997). Ovarian volume in gynecologically healthy women using no contraception, or using IUD or oral contraception. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 76,784–789.

Gouletsou, P. G., Galatos, A. D.; Leontides, L. S. (2008). Comparison between ultrasonographic and caliper measurements of testicular volume in the dog. *Animal Reproduction Science*, [s. l.], v. i, p. 1–12.

Hassen, C. (2013). A theoretical ovary position in link with the global anatomic structure of each human female body. *Int. J. Mod. Anthropol*, 6:78 -84

Hauth, E.A., Jaeger, H.J., Libera, H., Lange, S., Forsting M. (2006). Magnetic resonance imaging of the ovaries of healthy women: determination of normal values. *Acta Radiololoy*. 47(9): 986-92.

Hsieh, M. et al. (2009). The reliability of ultrasonographic measurements for testicular volume assessment : comparison of three common formulas with true testicular volume. *Asian Journal of Andrology* [s. l.], v. i, p. 261–265.

Jonard, S., Robert, Y, Dewailly, D. (2005). Revisiting the ovarian volume as a diagnostic criterion for polycystic ovaries. *Human Reproduction*. [s. l.], v. 20, n. 10, p. 2893-2898.

Khafi A., Mogheiseh A., Salavati S., Karimi S. (2018). Angiography of ovarian and uterine vessels of the dog. *Animal Reproduction Science*. (accepted manuscript).

Kutzler, M & Wood, A. (2006). Non-surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology*, [s. l.], v. 66, p. 514–525.

Lambert, B., (1951). The frequency of mumps orchitis and the consequences for sexuality and fertility. *Acta Genetics Statatistics Medicine*. 2,1-166.

Leoci, R., Aiudi, G., Silvestre, F., Lissner, E., Lacalandra, G., (2014a). A dose-finding, longterm study on the use of calcium chloride in saline solution as a method of non-surgical sterilization in dogs: Evaluation of the most effective concentration with the lowest risk. *Acta*

Vet. Scand. 56, 63.

Leoci, R., Aiudi, G., Silvestre, F., Lissner, E.A., Lacalandra, G.M., (2014b). Alcohol diluente provides the optimal formulation for calcium chloride non-surgical sterilization in dogs. *Acta Vet. Scand.* 56, 62.

Leoci, R. et al. (2019) Effects of intratesticular vs intraepididymal calcium chloride sterilant on testicular morphology and fertility in dogs. *Theriogenology*. [s. l.], v. 127, p. 153–160. *Doi*:10.1016/j.theriogenology.2019.01.006

Lima, M, Luna, L. (2012). Algumas causas e consequências da superpopulação canina e felina: acaso ou descaso? *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP*, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 32–38.

Mogheiseh, A. et al. (2017). Ultrasonographic and histopathologic changes following injection of neutral zinc gluconate in dog's ovaries. *Comparative Clinical Pathology*, [s. l.], v. 26, n. 5, p. 1093–1098.

Neutersol WM. (2004). From laboratory to market. Second International Symposium on Non-Surgical Methods for Pet Population Control. p. 165–9.

Oliveira, E.C.S. et al. (2012). Permanent contraception of dogs induced with intratesticular injection of a Zinc Gluconate-based solution. *Theriogenology*, [s. l.], v. 77, n. 6, p. 1056–1063.

Paltiel, H.J. et al. (2001). Experimental Studies Testicular Volume: Comparison of Orchidometer and US Measurements in Dogs 1. *Radiology*, [s. l.], n. 11. *doi*:10.1148/radiol.2221001385

Paranzini, C.S., Sousa A.K., Cardoso G.S., Perencin F.M., Trautwein L.G.C., Bracarense A.P.F.R.L., Martins M.I.M. (2017). Effects of chemical castration using 20% CaCl₂ with 0.5% DMSO in tomcats: Evaluation of inflammatory reaction by infrared thermography and effectiveness of treatment. *Theriogenology*. (accepted manuscript). *doi*:10.1016/j.theriogenology.2017.10.013.

Parsemus Foundation. (2010) Background and history of parsemus foundation research on female sterilization using ultrasound guided injection. Available at: <<https://www.parsemus.org/>> Accessed: 21/07/2020.

Pavlik, E. J., DePriest, P. D., Gallion, H. H., Ueland, F. R., Reedy, M. B., Kryscio, R. J., & van Nagell, J. R. (2000). Ovarian Volume Related to Age. *Gynecologic Oncology*, 77(3), 410–412. *doi*:10.1006/gyno.2000.5783.

Pilatz, A., Rusz, A., Wagenlehner, F., Weidner, W., Altinkilic, B. (2012). Reference Values for Testicular Volume, Epididymal Head Size and Peak Systolic Velocity of the Testicular Artery

in Adult Males Measured by Ultrasonography. *Ultraschall in Med*, [s.l.], n. 34:, p. 349–354.

Sakamoto, H. et al. (2007). Testicular Volume Measurement: Comparison of Ultrasonography, Orchidometry, and Water Displacement. *Adult Urology*, [s. l.], v. 69 (1), p. 134-139.

Sample, F., Lippe, M., Gyeppes, T. (1977). Grey scale ultrasonography of the normal female p elvis. *Radiology* 125: 477-83.

Schiff, J. D., Li, P. S.; Goldstein, M. (2003). Correlation of ultrasonographic and orchidometer measurements of testis. *Andrology*. [s. l.], p. 1015–1017.

Schild, L. et al. (2001). The role of ovarian volume in an in vitro fertilization programme as assessed by 3D ultrasound. *Archives of Gynecology and Obstetrics* [s. l.], p. 67–72.

Silva, R.,Paranzini C., Franco L., Miguel M., Honsho C., Souza F. (2018). Calcium chloride combined with dimethyl sulphoxide for the chemical sterilization of dogs. *Reproduction in domestic animals*. 53:1330–1338. doi: 10.1111/rda.13252.

Teixeira, J., Silva, V., Freitas, J., Henriques, J., Guimar es, M. (1999). Ultrasonografia p elvica em 140 meninas normais pr e e p os-puberais. *Arquivo Brasileiro Endocrinologia Metabologia*. v 43, 1999.

Woodall, P.F., Johnstone, I.P. (1988) Scrotal width as an index of testicular size in dogs and its relationship to body size. *Journal of small Animal Practice*. v. 29, p. 543-547.

5 CONCLUSÃO

No presente estudo, foi possível quantificar volume a ser injetado em ovários de felinas e caninas. Concluiu-se que a largura foi a variável comum às duas espécies com correlação significativa com o volume de quimioesterilizante injetado, porém não demonstrou resultados que comprovem que a utilização apenas desta mensuração seria totalmente acurado para servir como base para decisão do volume de quimioesterilizante à ser injetado nos ovários de fêmeas caninas e felinas. Outros fatores parecem influenciar nas medidas dos ovários e volumetria ovariana, como massa corporal e a idade, por isso, futuros estudos devem levar em conta estes aspectos e realizar separação em grupos por espécie, faixa etária e faixa de massa corporal.

6 REFERÊNCIAS

ACC&D. Alliance for Contraception in Cats & Dogs. Non-surgical Contraceptive methods for pet population control. 2004. Disponível em: <https://acc-d.org/resource-library/ebook>

ACC&D. Alliance for Contraception in Cats & Dogs. Contraception and Fertility Control in Dogs and Cats. **A Report of ACC&D**, 2013. Disponível em: <https://acc-d.org/resource-library/ebook>

ALI, H.I.; ELSADAWY, M.E.; KHATER, N.H. Ultrasound assessment of polycystic ovaries: Ovarian volume and morphology; which is more accurate in making the diagnosis?!. **The Egyptian Journal of Radiology and Nuclear Medicine**, v. 47, p. 347-350, 2016.

ALI, M. et al. Calcium chloride castration in 370 donkeys (an experimental study). **Assiut Veterinary Medical Journal**, v. 25, p. 196-202, 1991.

BAILEY, T. L. et al. Caliper and ultrasonographic measurements of bovine testicles and a mathematical formula for determining testicular volume and weight in vivo. **Theriogenology**, [s. l.], n. 98, p. 581–594, 1997.

BARAN, A. et al. Pilot study: intratesticular injection induces sterility in male cats. In: **4th International Symposium on Non-Surgical Methods of Pet Population Control**, Dallas, Texas, USA, April 8–10, 2010.

BEHRE, H.M., NASHAN, D., NIESCHLAG, E. Objective measurement of testicular volume by ultrasonography: evaluation of the technique and comparison with orchidometer estimates. **International Journal Andrology**, v. 12, p. 395–403, 1989.

BINSFELD L., DARRIBA R., BORGES J., OTUTUMI L., SANTOS I., LEAL L. Avaliação ovariana morfométrica e recuperação de complexos Cumulus oophorus de cadelas em diferentes fases do ciclo estral. **Archives of Veterinary Science**, [s. l.], p. 31–39, 2014

BURROW, R. et al. Prospective evaluation of postoperative pain in cats undergoing ovariohysterectomy by a midline or flank approach. **Veterinary Record**, [s. l.], v. 158, n. 19, p. 657–661, 2006

BRIDGES, N. A. et al. Standards for ovarian volume in childhood and puberty *. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 60, n. 3, p. 456–460, 1993.

CANPOLAT, I. et al. An evaluation of the outcome of bull castration by intra-testicular injection of ethanol and calcium chloride. **Revue de Médecine Veterinaire (Toulouse)**, v. 157, p. 420-425, 2006.

CARLSEN, E. et al. Inter-observer variation in the results of the clinical andrological examination including estimation of testicular size. **International Journal Andrology**, v. 23, p. 248–253, 2000.

CAVALIERI, J.; HAYES, L. Examination of the use of intraovarian administration of CaCl₂ and zinc gluconate as potential chemosterilants in *Bos indicus* heifers. **Australian veterinary journal**, [s. l.], v. 95, n. 11, p. 403–415, 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/avj.12644>>.

CAVALIERI, J. Chemical sterilisation of animals: A review of the use of zinc-and CaCl₂ based solutions in male and female animals and factors likely to improve responses to treatment. **Animal Reproduction Science**, v. 181, p. 1-8, 2017. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2017.03.010

CHACUR, M.G. et al. Desenvolvimento corpóreo, testicular e concentrações séricas de testosterona em machos Brahman. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 38, n. 4, suplemento 1, p. 2561-2580, 2017

CHRISTENSEN, J.T.; BOLDSSEN, J.; WESTERGAARD, J.G. Ovarian volume in gynecologically healthy women using no contraception, or using IUD or oral contraception. **Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica**, v. 76, p. 784–789, 1997.

COE, R. J. et al. Comparison of flank and midline approaches to the ovariohysterectomy of cats. **Veterinary Record**, [s. l.], v. 159, n. 10, p. 309–313, 2006.

CUNHA, Rodrigo Oliveira et al. Efeito da técnica de coleta e do estágio do ciclo estral na recuperação de oócitos de boa qualidade em felinos e caninos domésticos. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, [s. l.], p. 104–110, 2019

DIGANGI, B. A. et al. Post-operative outcomes of surgical and chemical castration with zinc

gluconate in dogs presenting to veterinary field clinics. **The Veterinary Journal**, v. 229, p. 26–30, 2017.

DORNBERGER, V.; DORNBERGER, G. Comparative volumetry of human testes using special types of testicular sonography, Prade's orchidometer, Schirren's circle and sliding caliper. **Andrologia**, v. 19, p. 487-496, 1987.

FAHIM, M. S. et al. Sterilization of dogs with intra-epididymal injection of zinc arginine. **Contraception**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 107–122, 1993.

FORZÁN, M. J. et al. Necrosuppurative Orchitis and Scrotal Necrotizing Dermatitis Following Intratesticular Administration of Zinc Gluconate Neutralized With Arginine (EsterilSol) in 2 Mixed-Breed Dogs. **Veterinary Pathology**, [s. l.], v. 51, n. 4, p. 820–823, 2014.

FOSSUM, T.W. **Cirurgia de Pequenos Animais**. 5ed. Missouri: Mosby - Elsevier, 2015. P 787

GOMES, E. M. **Effect of percutaneous ultrasound-guided intraovarian injection of calcium chloride in rats**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana/RS, 2020.

GOULETSOU, P. G.; GALATOS, A. D.; LEONTIDES, L. S. Comparison between ultrasonographic and caliper measurements of testicular volume in the dog. **Animal Reproduction Science**, [s. l.], v. i, p. 1–12, 2008.

HAUTH, E.A. et al. Magnetic resonance imaging of the ovaries of healthy women: determination of normal values. **Acta Radiologica**, v. 47(9), p. 986-92, 2006.

HUGUES, J.; MACDONALD, D.W. A review of the interactions between free-roaming domestic dogs and wildlife. **Biological Conservation**, v 157: 341–51, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.07.016>>

HSIEH, Ming-li et al. The reliability of ultrasonographic measurements for testicular volume assessment : comparison of three common formulas with true testicular volume. **Asian Journal of Andrology**, [s. l.], v. i, p. 261–265, 2009.

IBRAHIM, A. et al. Evaluation of chemical castration with calcium chloride versus surgical castration in donkeys: testosterone as an endpoint marker. **BMC Veterinary Research**, v. 12, n. 46, 2016. DOI: 10.1186/s12917-016-0670-3

JANA, K.; SAMANTA, P.K.; GHOSH, D. Dose dependent response to an intratesticular injection of calcium chloride for induction of chemosterilization in adult albino rats. **Veterinary Research Communications**, v.26, p.651-673, 2002.

JANA, K.; SAMANTA, P.K.; GHOSH, D. Evaluation of single intratesticular injection of calcium chloride for nonsurgical sterilization of male black Bengal goats (*Capra hircus*): a dosedependent study. **Animal Reproduction Science**, v.86, n. 1-2, p.89–108, 2005. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2004.05.021.

JANA, K.; SAMANTA, P. K. Evaluation of single intratesticular injection of calcium chloride for nonsurgical sterilization in adult albino rats. **Contraception**, [s. l.], v. 73, n. 3, p. 289–300, 2006.

JANA, K.; SAMANTA, P. K. Sterilization of male stray dogs with a single intra-testicular injection of calcium chloride: a dose-dependent study. **Contraception**, v.75, n, p.390-400, 2007.

JANA, K.; SAMANTA, P. K. Clinical evaluation of non-surgical sterilization of male cats with single intra-testicular injection of calcium chloride. **BMC veterinary research**, v. 7, n. 1, p. 39, 2011.

JOHNSTON, S.; RHODES, L. No surgery required: the future of feline sterilization. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, [s. l.], v. 17, n. 9, p. 777–782, 2015.

JONARD, S.; ROBERT, Y.; DEWAILLY, D. Revisiting the ovarian volume as a diagnostic criterion for polycystic ovaries. **Human Reproduction**, [s. l.], v. 20, n. 10, p. 2893-2898, 2005.

KOGER, L. M. Calcium chloride castration. **Modern Veterinary Practice**, v. 59, n.2, p. 119-121, 1978.

KUSTRITZ, M. V. Population Control in Small Animals. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, [s. l.], v. 48, n. 4, p. 721–732, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2018.02.013>

KUTZLER, M.; WOOD, A. Non-surgical methods of contraception and sterilization. **Theriogenology**, [s. l.], v. 66, n. 3 SPEC. ISS., p. 514–525, 2006.

LAMBERT, B. The frequency of mumps orchitis and the consequences for sexuality and

fertility. **Acta Genetics Statistics Medicine**, v. 2, p. 1-166, 1951.

LEOCI, R. et al. Alcohol diluent provides the optimal formulation for calcium chloride non-surgical sterilization in dogs. **Acta Veterinaria Scandinavica**, [s. l.], v. 56, n. 1, p. 1–7, 2014a.

LEOCI, R. et al. A dose-finding, long-term study on the use of calcium chloride in saline solution as a method of nonsurgical sterilization in dogs: evaluation of the most effective concentration with the lowest risk. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 56, n.63, 2014b. DOI: 10.1186/s13028-014-0063-1

LEOCI, R. et al. Effects of intratesticular vs intraepididymal calcium chloride sterilant on testicular morphology and fertility in dogs. **Theriogenology**, v. 127, p. 153-160, 2019. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2019.01.006

LIMA, M.; LUNA, L. Algumas causas e consequências da superpopulação canina e felina: acaso ou descaso? **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 32–38, 2012.

MASSEI, G.; MILLER, L. A. Nonsurgical fertility control for managing free-roaming dog populations: A review of products and criteria for field applications. **Theriogenology**, [s. l.], v. 80, n. 8, p. 829–838, 2013. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2013.07.016

MITRA, B.; SAMANTA, P. Testicular degeneration of scrub bulls by calcium chloride. **Indian Journal of Veterinary Surgery**. V. 21, p. 37-38, 2000.

MOGHEISEH, A. et al. Ultrasonographic and histopathologic changes following injection of neutral zinc gluconate in dog's ovaries. **Comparative Clinical Pathology**, [s. l.], v. 26, n. 5, p. 1093–1098, 2017.

MOREIRA C.; JACOMINI J. Morphometric classification, ovarian follicles counting and embryonic recovery of taurine supplemented domestic cats *Felis catus* – Linnaeus, 1758. **Ciência Animal**, 15(2):107-114, 2005.

NEUTERSOL WM. From laboratory to market. **Second International Symposium on Non-Surgical Methods for Pet Population Control**. p. 165–9, 2004.

OLIVEIRA, E. C. S. et al. Permanent contraception of dogs induced with intratesticular injection of a Zinc Gluconate-based solution. **Theriogenology**, [s. l.], v. 77, n. 6, p. 1056–1063, 2012.

PALTIEL, H. J. et al. Experimental Studies Testicular Volume : Comparison of Orchidometer and US Measurements in Dogs 1. **Radiology**, [s. l.], n. 11, 2002.

PARANZINI, C. S. et al. Effects of chemical castration using 20% CaCl₂ with 0.5% DMSO in tomcats: Evaluation of inflammatory reaction by infrared thermography and effectiveness of treatment. **Theriogenology**, v.106, p. 253-258, 2018. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2017.10.013

PAVLIK, E.J. et al. Ovarian volume related to age. **Gynecology and Oncology**, v. 77, p. 410-412, 2000.

PEREIRA, L. F. et al. Testicular histological evaluation and serum testosterone concentrations of bulls after chemical castration with calcium chloride. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 38, n. 8, p. 1554-1563, 2018. DOI: 10.1590/1678-5150-pvb-4945

PILATZ, A. et al. Reference Values for Testicular Volume , Epididymal Head Size and Peak Systolic Velocity of the Testicular Artery in Adult Males Measured by Ultrasonography. **Ultraschall in Medicine**, [s.l.], n. 34:, p. 349–354, 2012.

PRICKING, S. et al. Testicular volumetry and prediction of daily sperm output in stallions by orchidometry and two- and three-dimensional sonography, **Theriogenology**, 2017. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2017.08.015.

SAKAMOTO, H. et al. Testicular Volume Measurement: Comparison of Ultrasonography, Orchidometry, and Water Displacement. **Adult Urology**, [s. l.], v. 69 (1), p. 134-139, 2007.

SAMPLE, F.; LIPPE, M.; GYEPPE, T. Grey scale ultrasonography of the normal female pelvis. **Radiology**, v. 125, p. 477-83, 1977.

SCHIFF, J. D.; LI, P. S.; GOLDSTEIN, M. Correlation of ultrasonographic and orchidometer measurements of testis. **Andrology**, [s. l.], p. 1015–1017, 2003.

SCHILD, L. et al. The role of ovarian volume in an in vitro fertilization programme as assessed by 3D ultrasound. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 265 [s. l.], p. 67–72, 2001.

SILVA, R. C. A. et al. Calcium chloride combined with dimethyl sulphoxide for the chemical sterilization of dogs. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, n.6, p. 1330-1338, 2018. DOI: 10.1111/rda.13252

SOTO, F. R. et al. Adoption of Shelter Dogs in a Brazilian Community: Assessing the Caretaker Profile. **Journal of Applied Animal Welfare Science**, [s. l.], p. 105–116, 2005.

TAKIHARA, H. et al. Significance of testicular size measurement in andrology. A new orchimeter and its clinical application. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 39, n. 6, p. 836–840, 1983. DOI:10.1016/S0015-0282(16)47126-8

TEIXEIRA, R.J. et al. Ultra-Sonografia Pélvica em 140 meninas normais Pré e Pós-Puberais. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 43, n3, 1999.

TOBIAS, K. M.; SPENCER, A. J. **Veterinary Surgery: Small Animal: 2-Volume Set**, 1ed., 2011. Editora: ELSEVIER.

WHO. Guidelines for dog population management. **World Health Organization**, 1990. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/handle/10665/61417>

WOODALL, P.F; JOHNSTONE, I.P. Scrotal width as an index of testicular size in dogs and its relationship to body size. **Journal of small Animal Practice**, v. 29, p. 543-547, 1988.

WOODWARD, K.N. et al. Evaluation of a Zinc Gluconate Neutralized with Arginine Product as a Nonsurgical Method for Sterilization of Rhesus Macaques (*Macaca mulatta*). **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 56, No 5, p. 520–526, 2017.

ZAWISTOWSKI, S. et al. Population Dynamics, Overpopulation, and the Welfare of Companion Animals: New Insights on Old and New Data. **Journal of Applied Animal Welfare Science**, 1:3, 193-206, 1998. DOI: 10.1207/s15327604jaws0103_1

7 ANEXOS

DADOS CADELAS

ovário	peso corporal (kg)	idade animal (m)	raça	Comprimento (L) Pré (mm)	Largura (W) pré (mm)	Espessura (H) pré (mm)	Volume Injetado (ml)	Comprimento pós injeção (mm)	Largura pós (mm)	Espessura pós (mm)
1	10	24	SRD	11	5	3	0,1	13	7	5,5
2	9,2	36	SRD	14,8	10,3	7	0,1	16	11	8,7
3	13	24	SRD	12	7,6	5,5	0,1	12	8,2	6,8
4	13	24	SRD	14,5	11,5	7	0,1	16	10	7,8
5	16	60	SRD	16,5	9,2	7,2	0,2	15	10	7,9
6	16	60	SRD	13,5	6	7,8	0,1	13	9,1	8
7	8	6	SRD	9,4	4,9	3	0,1	9,4	5,6	4,4
8	8	6	SRD	10,7	4,9	3,8	0,1	9,4	6	4,5
9	6	8	SRD	10,7	7,2	6,4	0,1	11	8,1	7
10	6	8	SRD	9	7,6	6	0,1	11	6,1	6,2
11	4	36	Lhasa	7,5	4,4	4,5	0,1	8,3	5,6	4,5
12	4	36	Lhasa	7,5	5,9	4,1	0,1	8	5,9	4,9
13	3,8	24	SRD	10,4	5	2,5	0,1	10	5,2	4,6
14	3,8	24	SRD	10,4	5,7	2,4	0,1	10	7,2	4,5
15	21	12	Border Collie	15	8	5	0,1	14	8,8	4,8
16	21	12	Border Collie	14,5	8,4	4	0,1	8,4	7,5	6
17	14	7	SRD	11,5	6,8	5	0,1	11	7,6	6,9
18	14	7	SRD	11	5,9	5	0,1	10	6,9	5,9
19	12	24	SRD	11	4	2,3	0,1	10	5,2	3,3
20	12	24	SRD	14,9	3	2,2	0,1	13	5	3,3
21	14	9	Border Collie	14,5	4,8	3,8	0,1	13	5,8	4,8
22	14	9	Border Collie	12,2	5,6	4	0,1	11	6	4,6
23	19	108	Australian Cattle Dog	15	8	4,6	0,1	16	8	5,9
24	19	108	Australian Cattle Dog	12,9	5	4	0,1	13	6,7	5,9
25	18	24	Australian Cattle Dog	16	6	5,7	0,1	16	6,5	6,6
26	18	24	Australian Cattle Dog	14,4	7,5	5,7	0,1	15	8,5	6,9
27	3,6	48	SRD	9,2	4,5	4,7	0,1	11	4,5	4,9
28	3,6	48	SRD	8,9	5,5	4,5	0,1	9,8	5,6	5,3

29	8	24	SRD	7,2	5,8	5,8	0,1	7,1	5,1	5,9
30	8	24	SRD	8,2	6	4,3	0,1	7,5	6,2	5
31	32	12	Golden Retriever	13,6	7	5	0,1	13	8,4	6

DADOS GATAS

ovário	peso corporal (kg)	idade animal (m)	raça	Comprimento (L) pré (mm)	Largura (W) pré (mm)	Espessura (H) pré (mm)	Volume Injetado (ml)	Comprimento pós (mm)	Largura pós (mm)	Espessura pós (mm)
1	2,7	12	SRD	8	4	3	0,08	7,5	4	4,2
2	2,7	12	SRD	8	4,2	2,9	0,06	7,6	4	3,7
3	3,6	12	SRD	9	6	3	0,1	9,4	6,2	5,7
4	3,6	12	SRD	10	5,4	5	0,1	9,8	5,4	5,9
5	2,8	10	SRD	10	5	4	0,06	9,8	6	5
6	2	12	SRD	8,8	4,5	4,5	0,06	9,1	4,4	5
7	2	4	SRD	9,6	6,4	2,6	0,08	8	4,2	4,5
8	2	4	SRD	10	5,5	2,6	0,08	8,9	4,4	4,2
9	3	9	Persa	11	5,9	4,3	0,1	9,7	6	6,5
10	3	9	Persa	11	5,5	4,2	0,1	10,6	5,7	5,9
11	2,6	16	SRD	6	4	2	0,08	5,8	3	3
12	2,6	16	SRD	8	5,3	3,4	0,12	10,4	5,4	4,5
13	3	15	SRD	10	5,2	4,3	0,16	10,4	5,4	4,5
14	3	15	SRD	10	4,7	3,8	0,1	10	5	5
15	2,2	12	SRD	11	6	3,4	0,09	11	6	4,1
16	2,2	12	SRD	10	4,2	3	0,1	9,1	4,2	4
17	3,3	24	SRD	7,6	4	3	0,1	6,9	4,5	4,5
18	3,3	24	SRD	7,1	4,2	4,2	0,1	6,4	4	4,5
19	2,3	10	SRD	9,4	5,4	3,4	0,15	10	5	6
20	2,3	24	SRD	11	5	5	0,1	9,8	6	6
21	2,3	24	SRD	10	5	4	0,1	9,8	5	5
22	2,5	12	SRD	9	4,5	4	0,1	9	4	5
23	2,5	12	SRD	9	4	3	0,15	6	4	4