

EXERCÍCIO TEÓRICO-PRÁTICO SOBRE O PAPEL DE ESTERÓIDES GONADAIS EM RATOS

Os esteróides sexuais são sintetizados e secretados principalmente por células especializadas gonadais, ou seja, as células intersticiais de Leydig nos testículos em animais machos, e as células foliculares ovarianas em animais fêmeas. Sob a regulação dos hormônios gonadotrópicos de origem adenohipofisária, tais como o hormônio folículo estimulante (FSH) e o luteinizante (LH), estes tecidos produzem andrógenos e estrógenos, respectivamente, a partir de progesterona, um derivado do colesterol. Tais esteróides sexuais por sua vez retromodulam a atividade secretora adenohipofisária gonadotrópica e a atividade neurosecretora hipotalâmica, origem do neurohormônio adenohipofisiotrópico, FSH/LH-RH, o hormônio de liberação das gonadotropinas.

A testosterona, além de proporcionar a funcionalidade do trato reprodutivo masculino, exibe atividade metabólica geral, especialmente quanto à síntese protéica. A orquidectomia, isto é, a remoção dos testículos, fonte principal de testosterona, leva à atrofia dos órgãos sexuais acessórios e a alterações do comportamento sexual, como também traz modificações no metabolismo de gorduras e de proteínas do organismo macho.

A secreção de estrógenos pelo folículo ovariano ocorre de maneira cíclica conhecida como ciclo estral, e mantém o trato reprodutivo em um estado funcional bastante característico. A ovariectomia ou remoção do ovário como fonte predominante de estrógeno leva à atrofia do aparelho reprodutor feminino e também a alterações no metabolismo de gorduras e proteínas.

No presente exercício serão usados dados gerados em aulas práticas anteriores onde foi monitorado o ganho de peso corporal e o de diversos órgãos, após a castração ou não, em ratos jovens de ambos os sexos, ao longo de um período experimental de aproximadamente três semanas (ver E-disciplinas FCSEM 2023). Ao término desse período, avaliar-se-ão os efeitos da castração sobre o desenvolvimento das vesículas seminais e da próstata ventral em ratos machos, e do útero bicornes em ratas, bem como sobre a massa corpórea. A alça de retromodulação hipofisária será avaliada, pesando-se a hipófise em ambos os sexos, procurando evidenciar alterações como a hiperplasia adenohipofisária.

MATERIAL E PROCEDIMENTOS

É imprescindível o uso de avental ou jaleco de laboratório durante a aula prática. Para favorecer a sobrevivência dos ratos após a cirurgia, todas as manipulações dos mesmos devem ser feitas usando luvas cirúrgicas. Os grupos de alunos, previamente estabelecidos, devem empregar seu próprio material de dissecação, lavado em álcool. Após a pesagem dos animais e cálculo individual

dos volumes de anestésico e inibidor de secreção pulmonar necessários, estes serão aplicados pelo pessoal de apoio técnico.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL (refere-se à classe como um todo; cada um dos cinco grupos previamente estabelecidos utilizar-se-á de apenas quatro animais, um em cada categoria)

Após pesar a massa corporal, faça uma orquidectomia em 5 ratos anestesiados conforme a técnica descrita abaixo. *Este é o grupo experimental.* Em outros 5 ratos faça uma cirurgia fictícia, consistindo em apenas a anestesia, incisão e sutura. *Este é o grupo falso operado que servirá de controle.* Cada grupo deve preparar apenas um rato em cada categoria, *iniciando-se pela cirurgia fictícia.*

Após pesar a massa corporal, faça uma ovariectomia dupla em 6 ratas anestesiadas (*grupo experimental*). Em outras 5 ratas (*grupo controle*) faça uma operação fictícia, consistindo em apenas a anestesia, incisão e sutura. Cada grupo deve preparar apenas uma rata em cada categoria, *iniciando-se pela cirurgia fictícia.*

Como analgésico pós-operatório, aplicar algumas gotas de Tylenol diretamente na boca do animal apenas após este recuperar a consciência. Colocar os animais individualmente identificados com marcas de ácido pícrico (consultar pessoal de apoio técnico a respeito da codificação) em gaiolas devidamente identificadas, juntando-se animais de um mesmo sexo que sofreram a mesma intervenção (ou experimental ou controle). Cuidar dos ratos e monitorar seu peso depois das cirurgias, de 3 em 3 dias. Matar os animais com excesso de anestésico aproximadamente 21 dias após a intervenção. Retirar e pesar os seguintes órgãos: vesículas seminais e próstata *juntas*, de cada rato separadamente; o útero bicone sem ovário de cada rata; a hipófise individual de cada animal.

TÉCNICA DA ORQUIDECTOMIA (Remoção dos testículos, ver *Esquema 1*)

1. Colocar o rato devidamente anestesiado (com Thiopentax [tiopental sódico] a 50 mg/kg de peso corporal, *ver item sobre atuação desse composto ao final desse roteiro*) seguido de Atropion [sulfato de atropina] a 1,5 mg/kg para reduzir a secreção pulmonar, em decúbito dorsal com as patas presas por fita crepe em uma placa de dissecação. O Thiopentax será fornecido em solução salina contendo 25 mg/ml, e o Atropion em solução contendo 0,5 mg/ml, *sendo necessário realizar cálculos apropriados para determinar os volumes a serem aplicados em cada animal.*
2. Com uma tesoura faça uma pequena, porém profunda, incisão na linha mediana do bolso escrotal que deve atingir até a túnica vaginalis do testículo. O testículo de um lado deverá ser separado dos tecidos que o rodeiam por divulsão. *A intervenção cirúrgica no grupo falso operado termine aqui. Para esse grupo, passe agora para etapa 6.*
3. Por compressão, externalize o testículo de dentro da sua cavidade.
4. Faça uma ligadura em torno do cordão espermático, interrompendo a irrigação sanguínea. Em seguida, remova o testículo, cortando o cordão entre a ligadura e o testículo.
5. Remova o testículo do lado oposto por processo similar.

6. Faça uma sutura no bolso escrotal *com dois ou três pontos separados*, usando linha passada no álcool.
7. Identifique cada rato com uma marca individual de ácido pícrico e acompanhe-o atentamente no período pós-cirúrgico até a completa recuperação de acordo com a orientação do pessoal de apoio técnico. Providenciar massagem cardíaca e/ou respiração artificial com um canudo caso necessário.

TÉCNICA DA OVARIECTOMIA (Remoção dos ovários, ver *Esquema 2*)

1. Após devidamente anestesiadas (com Thiopentax [tiopental sódico] a 50 mg/kg de peso corporal, seguido de Atropion [sulfato de atropina] a 1,5 mg/kg para reduzir secreção pulmonar), raspar o abdômen das ratas a serem utilizadas para retirar o pêlo.
2. Coloque a rata em decúbito dorsal e faça uma *curta incisão* de 1,5 cm de comprimento na pele na linha mediana da região abdominal. Faça uma segunda incisão na camada muscular da linha mediana, abrindo a cavidade peritoneal. Os ovários, na forma de alguns pequenos nódulos amarelados (folículos), aparecerão lateralmente embaixo do intestino, envoltos em uma massa de gordura branca, distalmente ao oviduto, em cada ápice do útero bicornes, encostado na musculatura. *A intervenção cirúrgica no grupo falso operado termine aqui. Para esse grupo, passe agora para etapa 5.*
3. Pince o ovário e faça uma ligadura em volta do oviduto. Extirpe o ovário, seccionando entre este e a ligadura. Repita a manobra no outro lado.
4. Recoloque o útero dentro da cavidade abdominal embaixo do intestino.
5. Suturar a incisão do músculo abdominal e da pele em planos separados com pontos pequenos usando linha passada no álcool.
6. Identifique cada rata com uma marca individual de ácido pícrico e acompanhe-a atentamente no período pós-cirúrgico de acordo com a orientação do pessoal de apoio (*ver item 7 acima*).

PROCEDIMENTO CIRÚRGICO PARA REMOÇÃO DAS VESÍCULAS SEMINAIS/PRÓSTATA E ÚTERO APÓS O PERÍODO EXPERIMENTAL

1. Matar os animais com 1 ml de Thiopentax a 50 mg/kg de peso corporal injetado intraperitonealmente de acordo com a orientação do pessoal de apoio técnico.
2. Nos ratos, abra o abdômen inferior e retirar *juntas* as vesículas seminais e os lóbulos da próstata de acordo com o esquema 1; sem deixar secar, pese-as imediatamente na balança eletrônica fornecida.
3. Nas ratas, abra o abdômen e retirar o útero bicornes, sem a vagina, seccionando-o na junção distal com a vagina de acordo com o esquema 2; limpo de gordura e sem deixar secar, pese-o imediatamente na balança eletrônica fornecida.

PROCEDIMENTO CIRÚRGICO PARA REMOÇÃO DA HIPÓFISE (**REALIZAR COM EXTREMO CUIDADO JUNTO AO PESSOAL DE APOIO TÉCNICO APÓS EXAMINAR A FOTOGRAFIA 1 E O ESQUEMA 3**)

1. Decapitar o animal já morto na altura da coluna cervical.

2. Rebater a pele da cabeça fazendo uma incisão na linha mediana, começando do focinho (ver esquema distribuído).
3. Com um alicate, retire a calota craniana expondo o cérebro. Para realizar isso, percorra as suturas ósseas, primeiro a fronto-nasal e em seguida a escamosa (entre os ossos parietal e temporal).
4. Retire cuidadosamente os hemisférios cerebrais com uma pinça, destacando-os de qualquer tecido conectivo remanescente.
5. A hipófise é um órgão pequeno (2 x 4 mm) e róseo, localizada na base do crânio numa pequena fossa óssea, a sela túrcica do osso esfenóide, logo posterior ao quiasma óptico. Encontra-se presa ao piso do 3º ventrículo por um fino pedúnculo.
6. Destacar cautelosamente as membranas em volta do interior da sela túrcica com uma agulha, seccionar o pedúnculo e cuidadosamente retire a hipófise inteira com uma pinça fina, *sem quebrá-la em pedaços*.
7. Coloque um pouco de soro fisiológico numa placa de Petri e limpe a hipófise de tecido conectivo, caso necessário, com o auxílio de uma pinça e bisturi de ponta fina antes de transferí-la para soro fisiológico em um recipiente individual rotulado para a pesagem numa microbalança eletrônica (Ohaus AP250D, 10 µg precisão).

ANÁLISE EXPERIMENTAL

Tabule os seus valores individuais para os pesos corporais dos ratos machos e fêmeas, controles e operados, em função dos intervalos pós-operatórios, *junto com os dos demais grupos*. Calcule os valores médios e os erros padrões associados para cada grupo, para cada intervalo de tempo pós-operatório. Transfira estes valores para um gráfico de peso dos 4 grupos de ratos versus o tempo pós-operatório em dias.

Execute uma análise de variância de três fatores (tempo, tratamento e sexo) de medidas repetidas para determinar o efeito relativo do tempo pós-operatório, tipo de intervenção cirúrgica e do sexo sobre o peso corporal. Caso haja efeito de um dos fatores, teste as diferenças entre as médias dos pesos para cada grupo para os diferentes intervalos pós-operatórios, usando um teste *a posteriori* de médias múltiplas do tipo Tukey ou Newman-Keuls.

Transforme os pesos dos órgãos retirados (próstata e vesículas seminais; útero; hipófise) em peso de órgão em mg/100 g de peso corporal, padronizando o peso dos mesmos para cada grupo (machos controles e operados, fêmeas controles e operadas), evitando assim o efeito de diferenças decorrentes dos pesos finais diferentes dos diferentes animais.

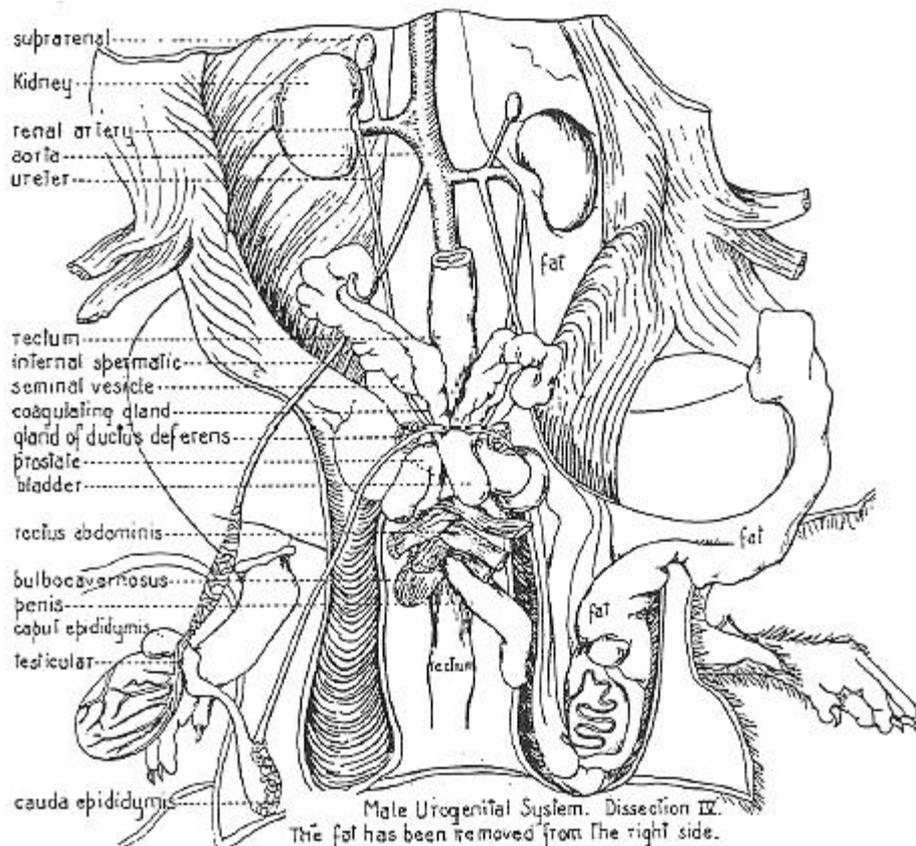
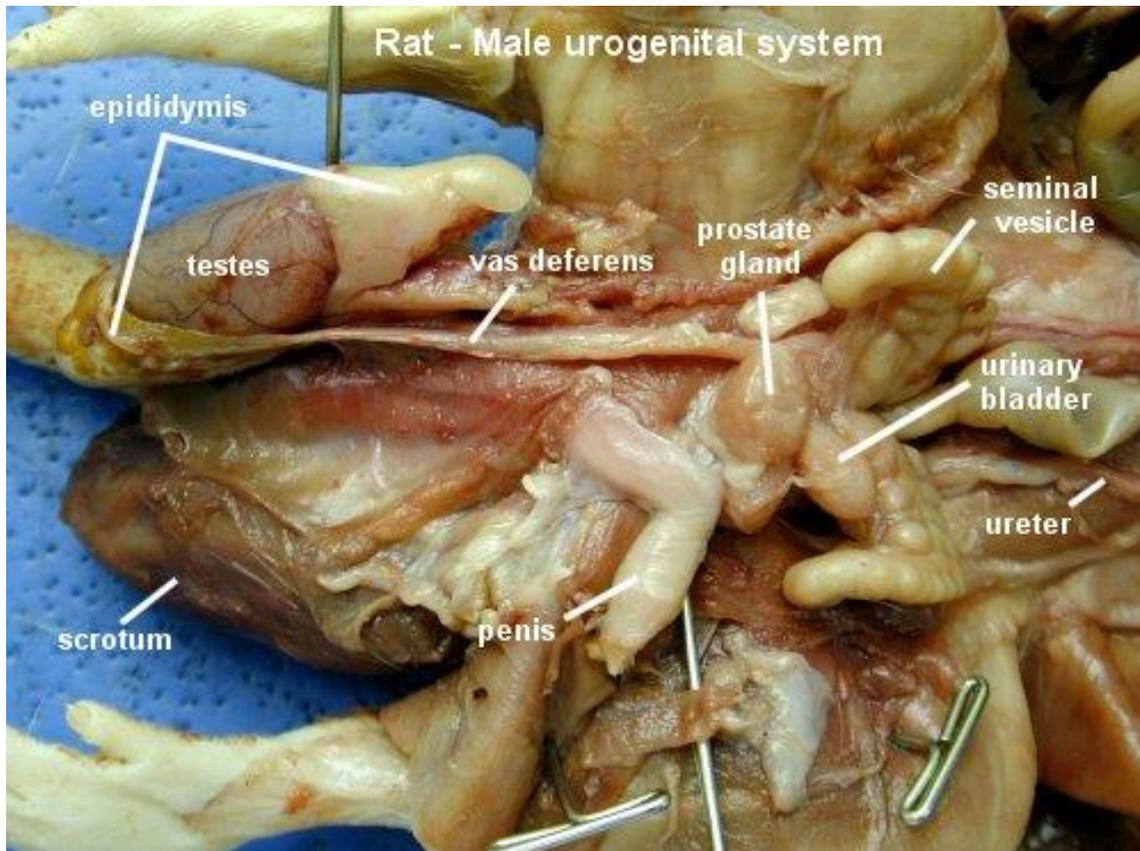
Caso necessário, normalize estes dados. Calcule as médias e os erros padrões desses índices e execute um teste-t não-pareado para comparar os pesos relativos médios dos órgãos dos animais operados com os seus respectivos controles para cada sexo.

RELATÓRIO

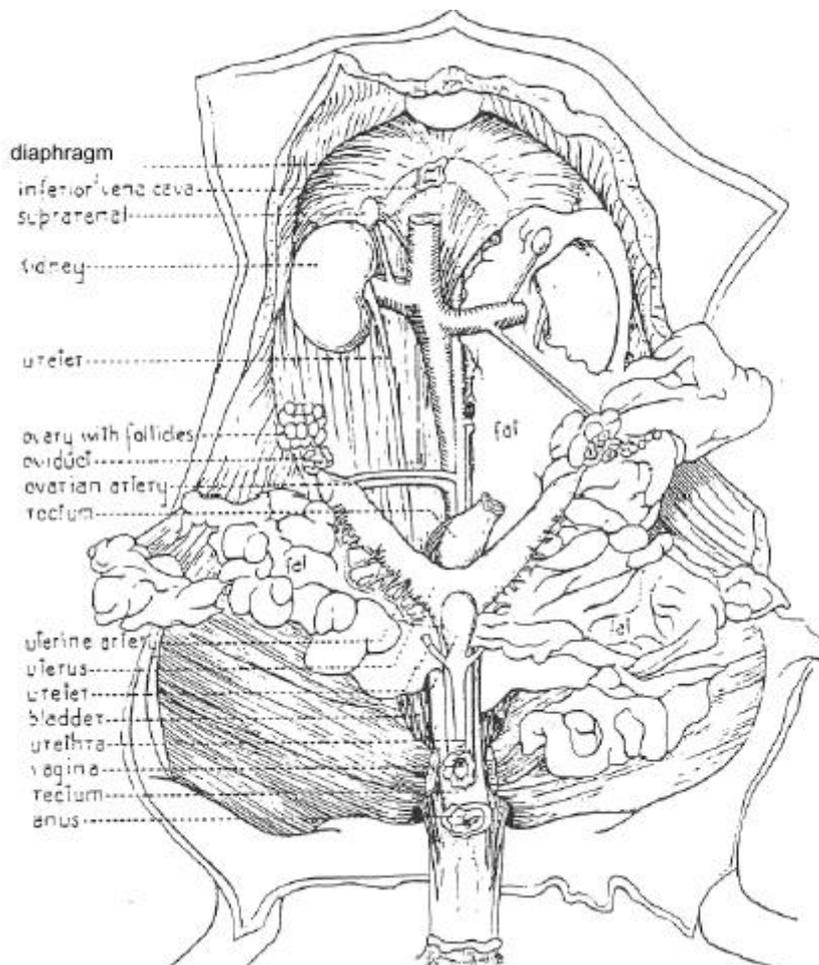
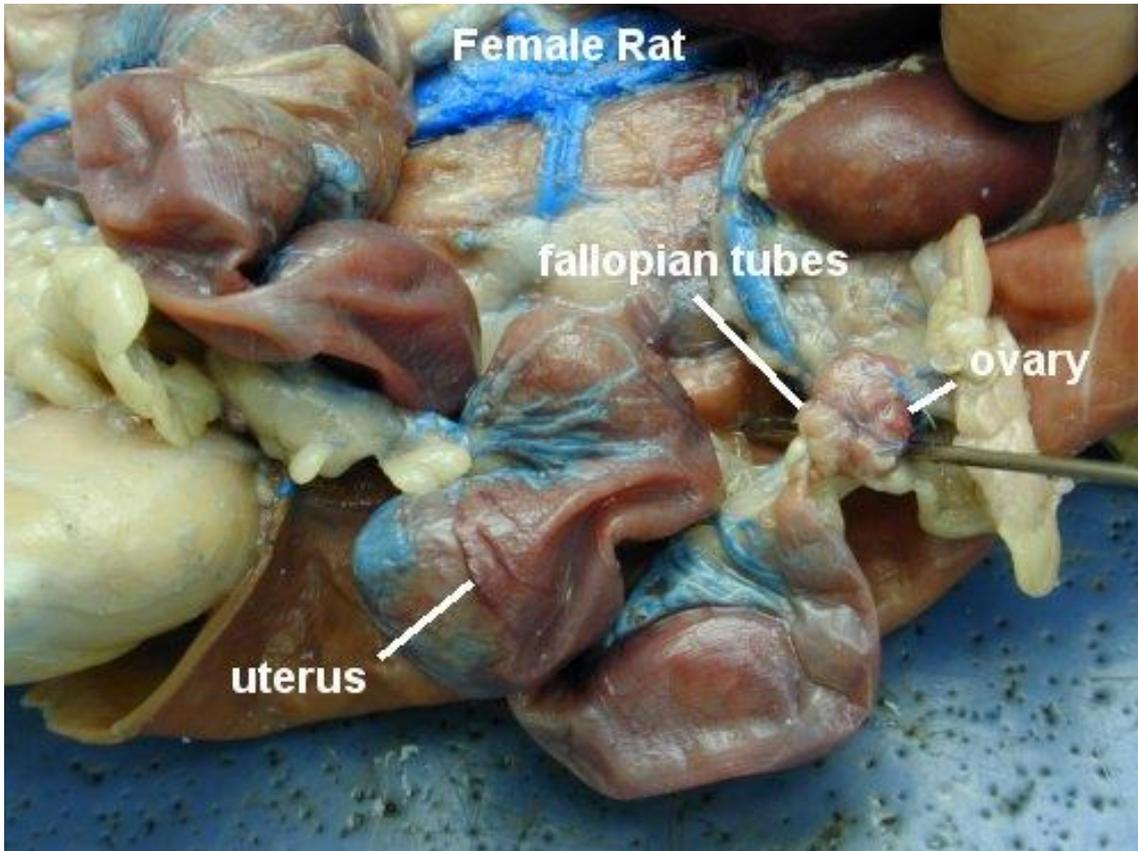
Escolhe um conjunto de dados referente a *um* dos 5 grupos de alunos. Use as massas iniciais dos dois ratos e das duas ratas para calcular os respectivos volumes de Thiopentax e de Atropion necessários e apresente-os junto às contas no relatório do grupo.

Apresente um relatório padrão *sucinto* por grupo, *com os integrantes do mesmo claramente identificados*, baseando-se no conjunto de dados experimentais obtidos pela *classe como um todo*, devidamente introduzido do ponto de vista endócrino teórico, descrevendo resumidamente os experimentos realizados e os dados obtidos. Estes também devem ser apresentados, sob a forma de gráficos ou tabelas onde julgar conveniente, com legendas e cabeçalhos descritivos apropriados.

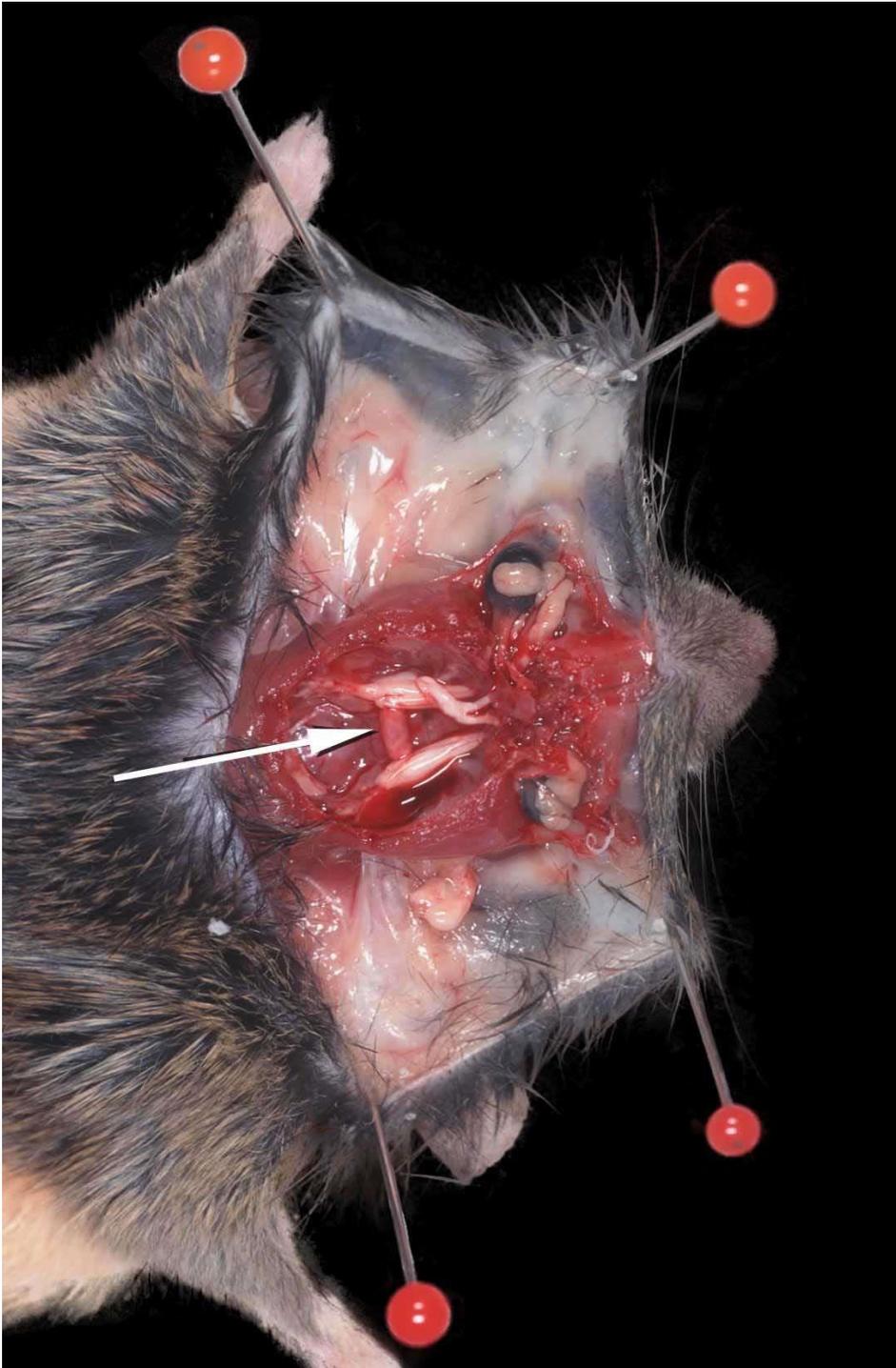
Apresente as suas conclusões baseadas nos resultados dos testes estatísticos, e devidamente calçadas na literatura pertinente. Discuta com particular atenção o papel dos hormônios esteroides gonadais no desenvolvimento e na manutenção dos sistemas reprodutivos masculino e feminino, incluindo menção do papel da adenohipófise e do efeito observado sobre o crescimento corporal.



Esquema 1. Diagrama do sistema urogenital do rato macho, mostrando vesículas seminais e próstata.



Esquema 2. Diagrama do sistema urogenital da rata, mostrando útero bicorn e ovários.



Fotografia 1. Dissecção de camundongo mostrando a hipófise (seta) em vista dorsal, após a abertura da calota craniana e remoção dos hemisférios cerebrais. A hipófise, encontrada logo atrás do quiasma óptica (rebatida na figura), é dividida em uma porção central esbranquiçada (neurohipófise, perto da ponta da seta) e em abas laterais circundantes (adenohipófise). O pedúnculo hipofisário e as membranas (dura mater) foram removidos.

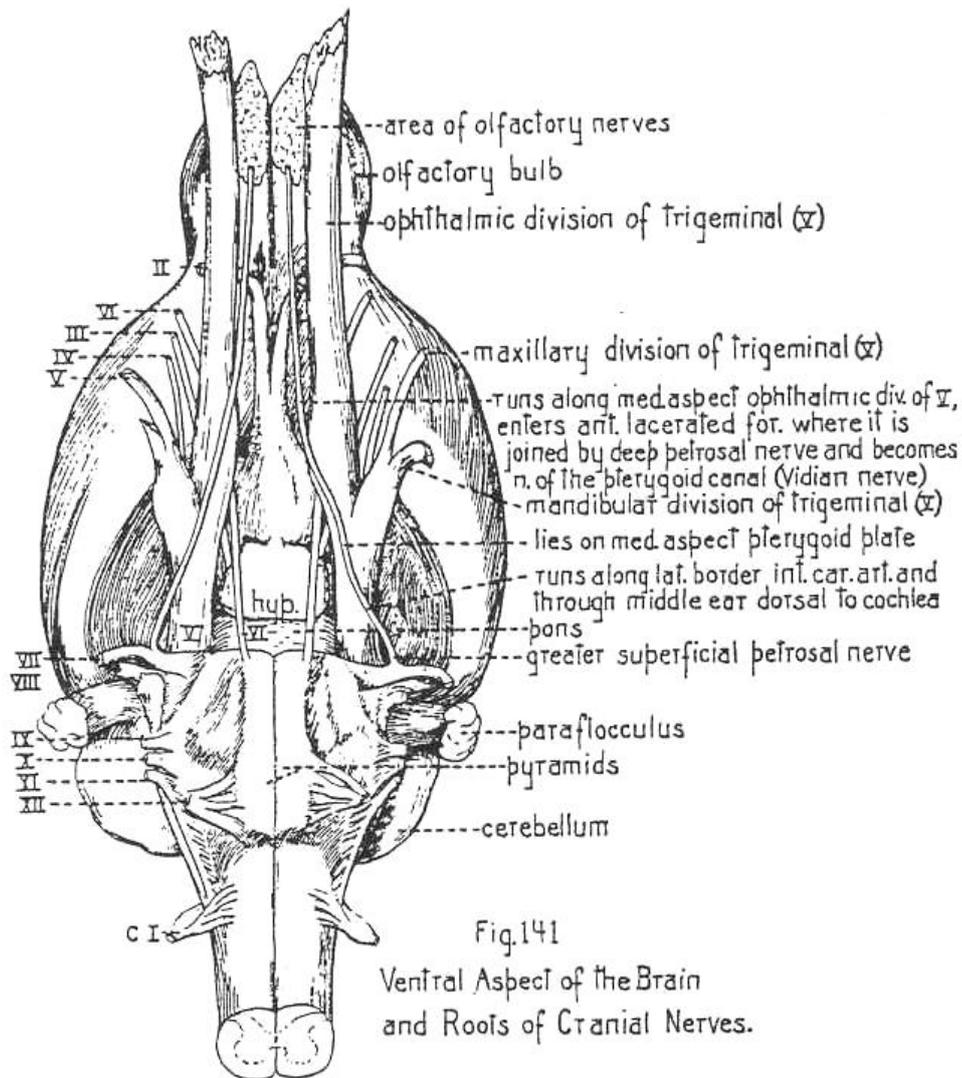


Fig.141
Ventral Aspect of the Brain
and Roots of Cranial Nerves.

*Esquema 3. Diagrama do aspecto ventral do cérebro do rato e das raízes dos nervos cranianos, com os hemisférios e cerebelo no plano inferior. Destaque-se a **hipófise** (hyp.) no centro do diagrama entre os nervos trigeminais esquerdo (V) e direito.*

Efeitos e mecanismo de ação do anestésico Tiopentax[®]

O tiopental sódico, tiopentato de sódio ou Tiopentax[®] é um fármaco extremamente lipofílico que atravessa rapidamente a barreira hematoencefálica e potencializa o efeito inibitório do neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA). Possui estreita margem terapêutica e a superdose pode provocar depressão cardiorespiratória grave. É administrado na forma de sal sódico (C₁₁H₁₇N₂NaO₂S) e produz hipnose rápida, suave e de curta duração. Pequenas doses podem aumentar a sensibilidade à dor ocasionando um efeito antianalésico.

Trata-se de um barbitúrico (derivado de ácido barbitúrico, C₄H₄N₂O₃) de ação rápida e depressor do sistema nervoso central. Atua principalmente sobre os receptores do GABA do tipo A, que são canais iônicos de cloreto ativados por GABA (receptor acoplado a canais iônicos ou receptor ionotrópico), aumentando o efeito inibitório desse neurotransmissor, o que leva à inibição do sistema nervoso central, causando a sedação. Aparentemente, o tiopental atua por dois mecanismos: (i) mantém os receptores GABA/canais de cloreto presentes na membrana neuronal, previamente abertos pelo GABA, no estado aberto por mais tempo; e (ii) abre os receptores GABA/canais de cloreto de forma independente da presença do GABA. O resultado desse influxo de cloreto é a hiperpolarização da membrana pós-sináptica e o afastamento do potencial de repouso do neurônio do seu limiar, impedindo o disparo de um potencial de ação.

O tiopental possui, portanto, uma ação depressora do sistema nervoso central, levando à diminuição do metabolismo cerebral, do consumo de oxigênio e do fluxo sanguíneo cerebral, com consequente diminuição da pressão intracraniana (efeito benéfico em determinadas situações clínicas). A depressão central se manifesta no córtex, tálamo, áreas motoras, centros termorreguladores, vagal, respiratórios e vasomotores. Afeta particularmente o sistema respiratório, causando depressão respiratória, apneia de 30 a 90 segundos e diminuição da sensibilidade ao CO₂. No sistema cardiovascular, provoca hipotensão arterial por depressão miocárdica e vasodilatação periférica levando à taquicardia compensatória.

O tiopental é metabolizado no fígado, promovendo a indução enzimática, levando à tolerância e interferindo com a ação de outras drogas que dependem do sistema microsomal hepático para a sua metabolização.

Os cuidados pós-operatórios solicitados aos discentes no roteiro dessa aula prática (aquecimento, acompanhamento atento de sinais vitais, massagem cardíaca, respiração artificial) têm o intuito de evitar a morte desnecessária dos animais em consequência dos efeitos acima explicitados.