

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

ROBERTO GEBE ABREU

COLHEITA DE AMOSTRA DE OVÁRIO PARA BIOPSIA COM AGULHA Tru-Cut
EM ÉGUAS

Campos dos Goytacazes – RJ

2010

ROBERTO GEBE ABREU

COLHEITA DE AMOSTRA DE OVÁRIO PARA BIOPSIA COM AGULHA Tru-Cut
EM ÉGUAS

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre** em Ciência Animal, na Área de Concentração em Biotecnologia da Reprodução.

ORIENTADOR: Prof. José Frederico Straggioti Silva

Campos dos Goytacazes – RJ

2010

ROBERTO GEBE ABREU

COLHEITA DE AMOSTRA DE OVÁRIO PARA BIOPSIA COM AGULHA Tru-Cut
EM ÉGUAS

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre** em Ciência Animal, na Área de Concentração em Biotecnologia da Reprodução.

Aprovado em 12 de Fevereiro de 2010

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Rosemary Bastos (UENF)

Prof. Dr. Eulógio Carlos Queiroz de Carvalho (UENF)

Prof. Dr. Eduardo Shimoda (UCAM-Campos)

Prof. Dr. José Frederico Straggiotti Silva (UENF)

Orientador

DEDICATÓRIA

A minha filha Julia,
para que a distância não deixe mais tanta saudade...

Aos cavalos,
companheiros e professores de uma vida, e que fazem as distâncias se tornarem
uma simples caminhada...

AGRADECIMENTOS

A minha família, que, de alguma forma, sempre incentivou novos projetos na minha vida, e de forma especial, a minha irmã Paula, que me apoiou nesta idéia principal, mostrando as oportunidades, sempre com a percepção de que se pode fazer do limão uma limonada.

Às pessoas que, direta ou indiretamente, participaram desse período dentro da Universidade Estadual do Norte Fluminense.

Ao “Tchê”, meu orientador, pela ideia principal e por acreditar que o ineditismo seja o estímulo principal da pesquisa.

Aos amigos do laboratório de histopatologia que tiveram participação fundamental no desenvolvimento do projeto.

RESUMO

GEBE, R. A., Msc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Fevereiro 2010. Colheita de amostra de ovário para biopsia com agulha Tru-Cut em éguas. Prof. Dr. José Frederico Straggiotti Silva (orientador).

Os resultados, no setor reprodutivo animal, em geral, são presumíveis na sua maioria, uma vez que, pequenos detalhes podem provocar grandes transtornos na reprodução equina, em que muitos estudos se desenvolvem ainda em caráter experimental. As peculiaridades do aparelho reprodutivo das éguas, em especial, necessitam de abordagem mais específica dos ovários, *in vivo*, para que novos métodos diagnósticos das patologias debilitantes tenham prognóstico rápido. A colheita de amostra de ovário para biopsia, com uso de agulha cortante tipo Tru-Cut, foi experimentada em peças anatômicas escolhidas aleatoriamente no Frigorífico Itapetinga – BA. Para efeito da amostra para biopsia com agulha Tru-Cut, foram definidos planos teciduais (celular denso, turgido e colagenizado), para a comparação com os planos teciduais de amostras do mesmo ovário *et vivo*, em relação ao método de coleta convencional (Padrão). Três modos de avaliação foram utilizados para comparar os planos teciduais: porcentagem de área ocupada por células, nível organizacional das células, cromatismo do núcleo celular, resultando em diferenças significativas. A técnica que utilizou agulha Tru-Cut para colheita de material para biopsia de ovários de éguas foi eficiente. Os resultados, que não diferiram significativamente, demonstraram a representatividade da técnica na comparação com a técnica de biopsia Padrão. É uma nova abordagem no uso de procedimentos menos invasivos e traumáticos, incluindo-se futuramente numa nova categoria em evolução, as cirurgias minimamente invasivas, denominada NOTES (Natural Orifice Transluminal Endoscopic Surgery).

Palavras-chave: Biopsia, Tru-Cut, ovário, éguas.

ABSTRACT

GEBE, R. A., Msc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. February 2010. Sampling for ovarian biopsy with Tru-Cut needle in mares. Prof. Dr. José Frederico Straggiotti Silva (advisor).

Most results of animal breeding studies are, in general, doubtful, since small details can cause major problems in equine reproduction, an area in which many studies are still developed on experimental basis. Peculiarities of the reproductive tract of mares, in particular, need a more specific approach of the ovaries, *in vivo*, so that new diagnostic methods of debilitating diseases leads to a fast prognostic. The collection of samples for ovarian biopsy with the use of biopsy needle Tru-Cut was performed in randomly selected anatomical parts at the Frigorífico Itapetinga, in Bahia state. For the purpose of the sample for biopsy with Tru-Cut needle, tissue levels were defined (cell dense, turgid and collagenized), for comparison with those of tissue sampling from the same ovary *et vivo*, performed through the conventional collection method (standard). Three evaluation methods were used to compare the tissue levels (percentage of area occupied by cells, the organizational level of cells, chromaticism of the cell nucleus), resulting in significant differences. The technique in which Tru-Cut needles were used to collect material for biopsy of the ovaries of mares was efficient. The results, which did not differ significantly, demonstrated the representativeness of the technique in comparison with the standard biopsy technique. It is a new approach in the use of less invasive and traumatic procedures, which will be included in a new and evolving category of minimally invasive surgeries called NOTES (Natural Orifice Transluminal Endoscopic Surgery).

Keywords: Biopsy, Tru-Cut, ovary, mares.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	4
AGRADECIMENTOS	5
RESUMO	6
ABSTRACT	7
SUMÁRIO	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	10
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1 Fertilidade	11
3.2 Aparelho reprodutor em éguas	12
3.3 Exame ginecológico	14
3.4 Técnicas reprodutivas assistidas	15
4. MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 Local e período	16
4.2 Animais	16
4.3 Material colhido	16
4.4 Procedimento com o material	17
4.5 Laboratório	18
4.6 Microscopia	18
4.7 Análise estatística	19
5. RESULTADOS	21
5.1. Resultado I	21
5.2. Resultado II	22
5.3. Resultado III	24
6. DISCUSSÃO	26
7. CONCLUSÕES	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

1. INTRODUÇÃO

Prejuízos à reprodução equina podem ser causados por afecções ovarianas, dentre elas: hematomas, abscessos, torções de ovário e distúrbios neoplásicos (tumores de células germinativas, tumores mesenquimatosos, tumores das células da granulosa – TCG, e tumores das células da teca). Estas afecções podem causar alterações no comportamento e no ciclo estral das éguas, relacionadas ao metabolismo hormonal envolvido.

As avaliações clínicas nos ovários ficam restritas ao quadro clínico associado, e, usando ferramentas como a palpação via retal, ultrassonografia e colheita de material para histopatologia de peça cirúrgica (PC), ou peça de necropsia (PN), mostra-se claro o amplo espaço entre o quadro clínico e o diagnóstico.

Na busca por dados estatísticos, relacionados às fêmeas eqüinas com potencial reprodutivo que deixam de conceber a cada ano, mostra-se a escassez de informações na área de biopsia ovariana. Isso significa que um grande percentual de fêmeas de alto padrão zootécnico, muitas vezes, é mantido na reprodução, sem chances de concepção, resultando em maiores custos.

Utilizando-se uma técnica inédita em ovários equinos, com agulha de biopsia Tru-Cut, foram colhidos fragmentos dos ovários, muito menores, com alta representatividade para avaliação. Com caráter menos invasivo e sem excisão ovariana, poderão ser realizadas, num futuro próximo, cirurgias com animais *in vivo*.

O aprimoramento de cirurgias minimamente invasivas resulta em melhores resultados pós-operatórios, tais como: melhor cicatrização, melhor aspecto estético, e, conseqüentemente, em alta precoce. A cirurgia endoscópica transluminal por orifícios naturais (NOTES) é alternativa à cirurgia laparoscópica, com a vantagem de eliminar incisões abdominais, uma vez que se combinam técnicas laparoscópicas e endoscópicas, para acessar a cavidade abdominal, através de orifícios naturais (boca, uretra, vagina e ânus).

2. OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho, por meio da colheita de material ovariano, para biopsia com agulha Tru-Cut são:

- ✓ Determinar as histopatologias e sua relação com as alterações reprodutivas;
- ✓ Comprovar que a amostra colhida pelo novo método tenha resultados representativos, comparados aos do procedimento Padrão de colheita em peça cirúrgica (PC), ou peça de necropsia (PN), quando se utiliza uma lâmina cortante para retirada do fragmento;
- ✓ Conceber metodologia estatística para análise objetiva de dados histológicos, de forma a demonstrar a representatividade da amostra colhida pelo método Tru-Cut, comparada ao do procedimento Padrão;
- ✓ Eleger e consolidar uma técnica de manuseio exequível e precisa.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Fertilidade

Fertilidade é um termo genérico que define apenas a capacidade dos indivíduos de procriar ou perpetuar as espécies. Porém, em termos de produtividade, em sistemas de criação, em que se associam os efeitos, não apenas da capacidade intrínseca dos machos e da fêmea, mas também do homem, nas decisões de manejo, a eficiência reprodutiva passa a ser a fertilidade expressa no maior número de nascimentos, em menor período, refletindo maior lucratividade ao sistema. (MARTINS *et al.*, 2002)

A reprodução é considerada uma função fisiológica elitista, por requerer o adequado funcionamento dos demais sistemas e funções biológicas, para que a mesma possa acontecer normalmente, e assim, quaisquer que sejam as origens dos distúrbios que afetem os demais sistemas corporais, em geral, terão potenciais efeitos sobre a reprodução. (RICKETTS, 2005)

A vida reprodutiva da fêmea equina pode ser resumida em passos, como: nascimento, puberdade, maturidade reprodutiva, estro, coberturas, gestação, parto, lactação, estro, coberturas e gestação. Assim, este ciclo – estro, cobertura, gestação, parto e lactação - pode repetir-se inúmeras vezes durante a vida útil de uma égua reprodutora até evoluir para senilidade reprodutiva. (DAVIES-MOREL, 2003)

Esses passos não acontecem sem causar sequelas (alterações do metabolismo e fisiologia da reprodução), que se acumulam ao longo dos anos. (WATSON, 2005)

Nas fêmeas que apresentam ineficiência, o descarte é inevitável para a reprodução sem que, em muitas ocasiões, se tenha uma análise mais detalhada de cada caso. Este fato pode estar associado a vários fatores, como: falha na detecção precoce de indivíduos com alguma patologia reprodutiva, doenças sexualmente transmissíveis (DST), sêmen de má qualidade, adversidade no manejo reprodutivo e ainda, fatores intrínsecos à fêmea: deficiência nos mecanismos de defesa uterina (WAGNER, 1991); baixa capacidade de resposta às terapias adotadas (MARQUES,

1991); anormalidades congênitas ou adquiridas do aparelho reprodutivo; idade; número de crias, entre outros. (FARIN & ESTILL; YOUNGQUIST & BRAUN, 1993)

3.2 Aparelho reprodutor em éguas

No caso do ovário equino, este difere daqueles de outras espécies de mamíferos domésticos por desenvolver modificações expressivas durante a fase fetal. As gônadas na fase pré-natal apresentam tamanho expressivo, resultante do elevado número de células intersticiais. Há marcante semelhança entre células luteais, hepáticas e intersticiais das gônadas de fetos dessa espécie, e as gônadas de fetos equinos de sete a oito meses são maiores do que os ovários da égua no mesmo período de gestação. (GINTHER, 1992)

O ovário da égua tem formato de grão de feijão com aproximadamente 7 a 8 cm de comprimento e 3 a 4 cm de espessura, são recobertos pelo peritônio, exceto na borda inserida onde os vasos e nervos penetram; a borda livre é marcada por uma depressão; a fossa da ovulação, única área coberta pelo epitélio cúbico superficial, local de liberação do ovócito, devido à peculiaridade do ovário da égua, que é a inversão das camadas medular e cortical (parte central do parênquima corresponde ao tecido cortical, limitado à fossa de ovulação) do ovário. (DELLMANN & BROWN, 1982)

Nota-se também abundante estroma fibroso e, frequentemente, tecido adrenocortical ectópico. (MCENTEE, 1993) O estroma cortical é constituído por tecido conjuntivo frouxo.

Segundo Dellmann & Brown (1982), os folículos primários, ou “primordiais”, são compostos de uma oogônia e circundados por uma única camada de epitélio simples, pavimentoso ou cúbico. Os folículos secundários consistem de um epitélio estratificado de células granulosas foliculares poliédricas que circundam uma oogônia. O antro ainda não está presente entre as células epiteliais.

Desenvolve-se uma camada glicoproteica, a zona pelúcida (ZP), ao redor da membrana plasmática da oogônia, circundando-a. Esta camada é secretada pelas células granulosas foliculares e, em parte, pela própria oogônia. Prolongamentos citoplasmáticos das células da camada granulosa penetram na ZP. Nos estágios

antrais posteriores, as células granulosas que, imediatamente circundam o oócito, tornam-se cilíndricas e dispostas radialmente, denominando-se corona radiata. Observa-se, ao redor das células granulosas foliculares, a formação de uma camada de tecido conjuntivo, a teca. (DELLMANN & BROWN, 1982)

Os folículos terciários desenvolvem uma cavidade central, o antro, formado pelos espaços cheios de líquidos entre as células da granulosa. O oócito, situado mais próximo do centro do folículo, num acúmulo de células granulosas, denomina-se *cumulus oophorus*. As células granulosas são organizadas no estrato granuloso, que forma o revestimento parietal do antro e que repousa sobre uma membrana basal. A maior parte das células granulosas parietais é poliédrica, porém, a camada basal pode ser constituída de células cilíndricas. Algumas células granulosas podem conter inclusões PAS-positivas, os corpos de Call-Exner (precursores intracelulares do líquido folicular). (DELLMANN & BROWN, 1982)

A teca diferencia-se em duas camadas: a teca interna vascular e a teca externa de sustentação. As células da teca interna são fibroblastos fusiformes modificados, localizados num delicado tecido conjuntivo reticular. Algumas das células fusiformes aumentam de tamanho e assumem a forma epitelióide poliédrica, com padrão de cromatina mais claro e nucléolos mais evidentes, abundantes nos folículos maduros durante o proestro, estro e início da regressão. Na teca externa, há uma fina camada de tecido conjuntivo frouxo disposto, concentricamente, ao redor da teca interna. A teca externa possui limites indistintos. (DELLMANN & BROWN, 1982)

Segundo Nascimento & Santos (2003), na ovulação, o folículo entra em colapso e se enrugua à medida que a pressão é reduzida, conhecido por corpo hemorrágico. O estrato granuloso torna-se vascularizado por vasos da teca interna. As células granulosas aumentam, tornam-se luteínicas, e sofrem hipertrofia e, provavelmente, hiperplasia de ambos os tipos celulares, contribuindo para a população das grandes células luteínicas, do corpo lúteo, que são poligonais.

Na égua, o corpo lúteo, formado após a ovulação, é incluso, por isso não se projeta na parede do ovário, como observado nas fêmeas de bovinos. As células epitelióides da teca interna espalham-se no interior do estroma ovariano. Mastócitos e eosinófilos ocorrem comumente entre as células da teca durante este período. Na regressão, os tecidos conjuntivos, frouxo e vascular, do corpo lúteo tornam-se

conspícuos, gerando uma cicatrização denominada *corpus albicans*. (DELLMANN & BROWN, 1982)

As alterações dos ovários estão relacionadas com o desenvolvimento (hipoplasia, ovários afuncionais) e a circulação (hematoma), que podem ser ainda regressivas (hipotrofia, fibrose, cistos), progressivas (neoplasias - TCG), apesar de poucos estudos relacionados aos equídeos. Há uma grande variedade de causas para o aumento no tamanho dos ovários em éguas, incluindo causas neoplásicas e não-neoplásicas. (NIE & MOMONT, 1992)

Entre as causas não-neoplásicas, estão os hematomas e abscessos ovarianos e as torções de ovário. (SEDRISH *et al.*, 1997) Dentre as causas neoplásicas, o tecoma é a mais rara. (RAOOFI *et al.*, 2006)

3.3 Exame ginecológico

Este procedimento torna-se indispensável para diagnosticar alterações presentes, estabelecer um prognóstico e, se possível, orientar a terapêutica correta. O exame consiste basicamente na avaliação do histórico reprodutivo da fêmea, inspeção geral e específica, palpação retal e ultrassonografia. (GRUNERT & GREGORY, 1984; VAN CAMP, 1992; PIMENTEL *et al.*, 1998)

Segundo Petterson (2000), a indicação da biopsia aplica-se a uma parte representativa ou particular da lesão. Neste aspecto, a biopsia, por agulha cortante (BAC), é um método incisional, caracterizado por remover fragmentos com o auxílio de uma agulha cortante para análise histopatológica.

A biopsia endometrial em éguas tem sido utilizada como ferramenta indispensável na avaliação da função reprodutiva. (KENNEY, 1978; SILVA, 1987; PIMENTEL, 1996)

Estudos sobre a biopsia ovariana em éguas não têm demonstração na literatura, impossibilitando uma comparação, além do já citado em peça cirúrgica (PC), ou peça de necropsia (PN).

3.4 Técnicas reprodutivas assistidas

Diversas técnicas e equipamentos podem ser empregados com esta finalidade. Há casos de éguas que podem não ser beneficiadas por técnicas assistidas, como a transferência de embrião (TE), devido a uma série de problemas reprodutivos, que incluem falhas na ovulação, infecções uterinas, lesões cervicais e outras anomalias não diagnosticadas. (CARNEVALE, 2005)

A técnica de aspiração folicular transvaginal, guiada por ultrassom (OPU), vem sendo utilizada em éguas desde o início dos anos 90 (BRÜCK, 1992), entretanto, no Brasil, seu uso permanece experimental.

A biopsia com agulha Tru-Cut é utilizada para expressar técnicas de obtenção de uma amostra tecidual mediante a utilização de agulhas especiais que seccionam um hemcilindro de lesão, permitindo a avaliação histológica por esta técnica minimamente invasiva, que é a punção transcutânea. (IRION, K. 2006)

Os primeiros relatos experimentais em NOTES, utilizando animais, pela via transgástrica, foram publicados pelo Dr Tony Kalloo, do Johns Hopkins Hospital, Baltimore, em 2004. (KALLO *et al.*, 2004)

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local e período

Os procedimentos iniciais de colheita do material foram realizados no Frigorífico Itapetinga, em Itapetinga – BA, no período de 18 a 22 de outubro de 2009.

No frigorífico, a metodologia empregada, para procedimento de abate, guia-se pela Instrução Normativa 3, de 17 de janeiro de 2000, com anexo do regulamento técnico de métodos de insensibilização para o abate humanitário de animal de açougue, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Também por se tratar de empresa exportadora para a Comunidade Econômica Européia, guia-se pela Diretiva 119, de 22 de dezembro de 1993, relativa à proteção dos animais no abate e/ou occisão, do Conselho da União Europeia.

Os procedimentos seguintes foram realizados no *campus* da UENF.

4.2 Animais

Foram utilizadas 20 éguas SRD, com idades que variam de cinco a 15 anos, escolhidas aleatoriamente do lote diário da linha de abate do frigorífico.

4.3 Material colhido

Depois da retirada das vísceras da cavidade abdominal, no momento em que as mesmas estavam na esteira de separação de partes, os aparelhos reprodutores foram colhidos (vulva, vagina, cérvix, útero, ovários), e encaminhados à área reservada para manuseio. As peças anatomicamente intactas foram avaliadas para posterior colheita de material dos ovários.

4.4 Procedimento com o material

Os ovários numerados e fotografados foram, individualmente, manipulados para a introdução de agulha de biopsia tipo Tru-Cut semiautomática (18-14G x 100 mm), direcionada e posicionada no ovário escolhido, que permitiu proceder-se à colheita do material (Fig.1).

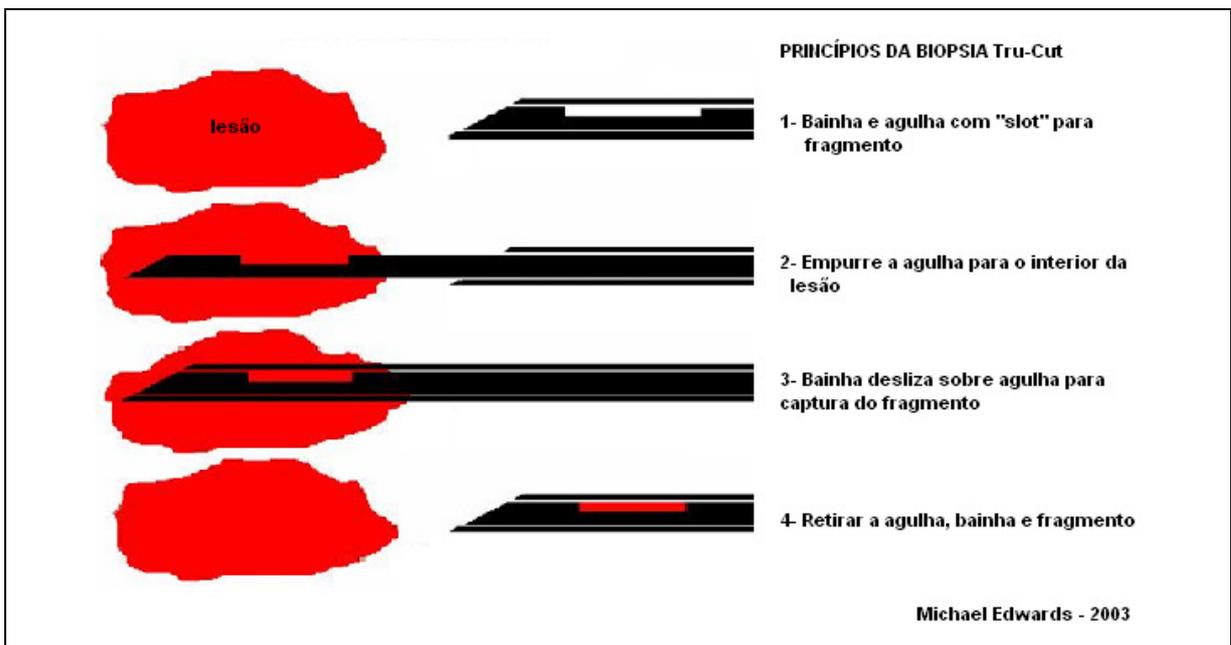


Fig.1- Modo de ação da agulha de biópsia Tru-Cut para a colheita de fragmento tecidual.

A amostra para biópsia é retirada cuidadosamente e acondicionada em frascos identificados com solução de formol 10% tamponado. Da mesma forma, fragmentos dos mesmos ovários colhidos, pelo método Padrão, também foram acondicionados e identificados para avaliação comparativa.

O método Padrão, ou biópsia com bisturi convencional, é uma técnica extensamente aceita e que mostra poucas limitações na obtenção de amostras, de caráter excisional, com dimensões aproximadas de 5 mm x 10 mm, com alteração mínima na qualidade das lâminas histológicas.

Os fragmentos de biópsia foram processados no laboratório de histopatologia do Curso de Medicina Veterinária, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

4.5 Laboratório

Seguindo o procedimento laboratorial: Fixação – Formol 10% Tamponado; Processamento histológico – métodos de rotina para inclusão em parafina - blocos (HUMASON, G.L., 1972); Microtomia (4,0 a 6,0 μm de espessura); Montagem da lâmina; Coloração – HE (hematoxilina-eosina); Análise em microscópio ótico binocular.

4.6 Microscopia

Com Microscópio OLYMPUS BX41, modelo U-MDOB3, as lâminas foram observadas e, com câmera fotográfica digital NIKON COOLPIX 995 acoplada, foram examinadas e documentadas utilizando Obj. 20x e Zoom F4.5.

Foram definidos parâmetros pela variação morfológica e disposição celular, elegendo-se diferentes planos teciduais, presentes nas lâminas comparativas de colheita Tru-Cut e colheita Padrão.

Três planos teciduais foram definidos por sua constância absoluta:

- 1- Celular denso (distribuição sem polaridade, núcleo ovoide, não se modela);
- 2- Turgido (distribuição monótona, núcleo rarefeito, próxima ao folículo);
- 3- Colagenizado (distribuição em feixe modelado, núcleo fusiforme).

Dos 20 animais colhidos (40 ovários), foram geradas 80 lâminas de colheita (Tru-Cut e Padrão), e, após a rotulação dos planos teciduais, foram selecionadas nove lâminas e suas correspondentes (18), com três imagens de planos teciduais por lâmina (Fig.2), que geraram 54 imagens comparativas para a avaliação estatística.

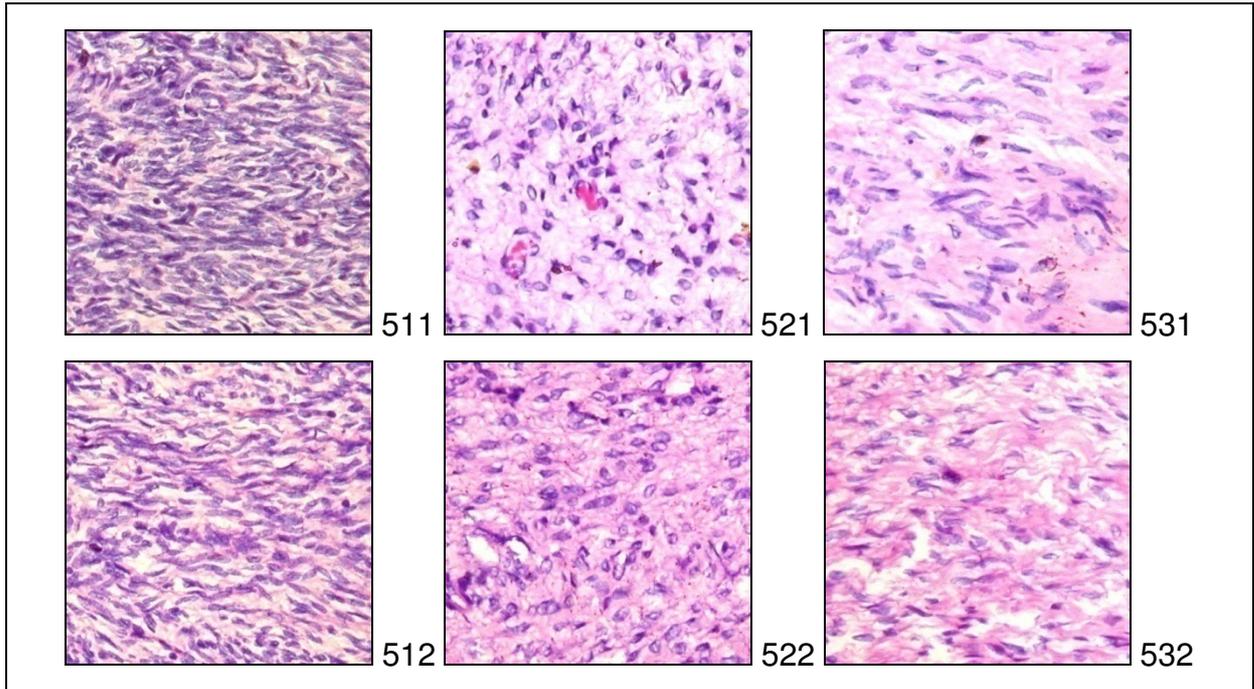


Fig.2- Imagens comparativas identificadas por três números. O primeiro indica o animal ao que pertencem as imagens; O segundo indica o plano tecidual (1-celular denso, 2-turgido, 3-colagenizado); O terceiro indica o método de colheita (1-Tru-Cut, 2-Padrão).

4.7 Análise estatística

Inicialmente, utilizou-se o aplicativo *PIXEL ANALYSER* 6.6, para determinação da tonalidade de cada *pixel* na imagem escolhida (foto da lâmina com corte histológico).

O aplicativo SAEG 9.1 gerou a distribuição de frequência de *pixels* com cada tonalidade de cor, onde 0 (zero) corresponde ao preto, e 1 (hum) corresponde ao branco. E, por dispersão simples, obteve-se o gráfico para a determinação do limiar a partir de curva de 4° grau (Limiar = 0,70), determinando, assim, o percentual de *pixels* pretos e brancos na imagem.

Numa segunda fase, o aplicativo SAEG 9.1 foi utilizado para determinação da média, erro-padrão, intervalo de confiança ($P=0,95$) e coeficiente de variação (PIMENTEL GOMES, 1966) dos parâmetros, de acordo com o plano tecidual e o método de coleta:

- Percentagem de área ocupada por células;
- Nível organizacional das células;
- Cromatismo do núcleo celular.

Para comparação entre as médias das variáveis utilizadas para a caracterização dos planos teciduais, foi utilizado o teste de Tukey. A comparação entre as médias dos métodos de colheita, em um mesmo plano tecidual, foi realizada por meio do teste “t” de Student. Em ambos os casos, adotou-se o nível de 5% de significância.

5. RESULTADOS

5.1 Resultado I – Percentagem da área ocupada por células, em amostras de ovários de éguas, de acordo com o plano tecidual e o método de colheita.

Após determinação da tonalidade de cada *pixel* das imagens escolhidas e frequência de distribuição destas tonalidades, em que 0 (zero) corresponde ao preto, e 1 (hum) corresponde ao branco ($\times 100$), comparou-se, de cada animal, a colheita ovariana realizada pelo método testado, o Tru-Cut, e o método Padrão, nos três planos teciduais definidos (Tab. 1 e Fig. 3).

Tab. 1 – Percentagem da área ocupada por células, em amostras de ovários de éguas, de acordo com o plano tecidual e o método de colheita.

Animal	Área (%) ocupada por células de acordo com plano tecidual e método de colheita					
	Celular denso		Turgido		Colagenizado	
	Tru-Cut	Padrão	Tru-Cut	Padrão	Tru-Cut	Padrão
1	44,05	31,77	35,42	16,05	17,67	17,42
2	56,48	32,04	18,96	20,09	13,57	17,47
3	35,45	32,65	17,82	18,25	29,36	20,29
4	35,89	43,68	23,89	12,56	13,61	15,05
5	49,07	38,92	15,98	29,42	17,16	18,57
6	40,94	50,15	26,66	21,87	39,81	29,69
7	47,29	46,21	37,41	21,44	33,88	17,48
8	41,01	49,25	38,52	22,08	28,55	17,11
9	42,68	39,98	45,42	23,84	21,71	13,69
X \pm s(X)	43,7 \pm 2,2	40,5 \pm 2,4	28,9 \pm 3,5	20,6 \pm 1,6	23,9 \pm 3,1	18,5 \pm 1,5
CV (%)	15,2	18,0	36,7	23,2	39,3	24,8
IC	38,6 – 48,8	34,9 – 46,1	20,7 – 37,1	16,9 – 24,3	16,7 – 31,1	15,0 – 22,0

X \pm s(X): média \pm erro-padrão; CV (%): coeficiente de variação; IC: intervalo de confiança (P=0,95).

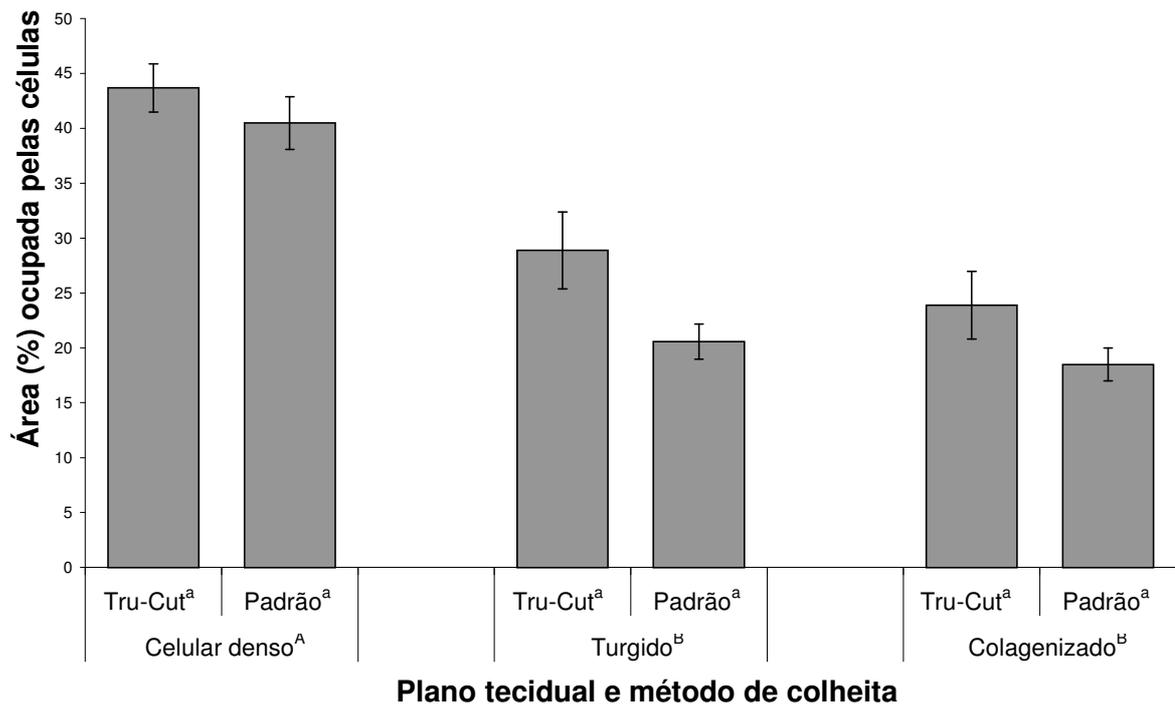


Fig.3 – Percentagem da área ocupada por células, em amostras de ovários de éguas, de acordo com o plano tecidual e o método de colheita. Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula, comparando planos teciduais, e minúscula, comparando métodos de colheita, não diferem significativamente entre si, em nível de 5% de probabilidade.

A aplicação do teste Tukey não evidenciou diferença significativa entre os dois planos teciduais (turgido e colagenizado), mostrando a necessidade de novos parâmetros para o comparativo, uma vez que a percentagem de área ocupada por células não serviu como diferencial para estes dois planos teciduais.

5.2 Resultado II – Nível organizacional das células em amostras de tecido ovariano em éguas, de acordo com o plano tecidual e o método de colheita.

Partindo-se de uma avaliação simples, que pode diferenciar os três planos teciduais, utilizou-se uma escala de 0 – 5, em relação ao nível organizacional das células, numa distribuição que pode ser interpretada (Tab. 2):

- De 0 – 1 = Distribuição em feixe modelado, núcleo fusiforme;
- De 2 – 3 = Distribuição monótona, núcleo rarefeito;
- De 4 – 5 = Distribuição sem polaridade não se modela.

Tab. 2 – Nível organizacional das células em amostras de tecido ovariano em éguas, de acordo com o plano tecidual e o método de colheita.

Animal	Nível organizacional das células (0 – 5)					
	Celular denso		Turgido		Colagenizado	
	Tru-Cut	Padrão	Tru-Cut	Padrão	Tru-Cut	Padrão
1	5	4	3	3	1	0
2	4	5	3	3	0	1
3	4	5	3	3	0	1
4	5	4	3	2	1	1
5	4	5	3	3	1	1
6	5	4	2	3	0	1
7	5	5	2	3	0	1
8	5	4	2	3	0	0
9	5	5	2	3	0	1
X ± s(X)	4,66 ± 0,17	4,66 ± 0,18	2,56 ± 0,18	2,89 ± 0,11	0,33 ± 0,17	0,78 ± 0,15
CV (%)	10,7	11,6	20,6	11,5	150,0	56,7
IC	0,38	0,41	0,41	0,26	0,39	0,34

X ± s(X): média ± erro-padrão; CV (%): coeficiente de variação; IC: intervalo de confiança (P=0,95).

Esta avaliação demonstrou que o nível organizacional das células dos tecidos difere entre si, não em relação ao método de colheita, mas sim em relação à diferença entre os planos identificados na colheita (Fig.4).

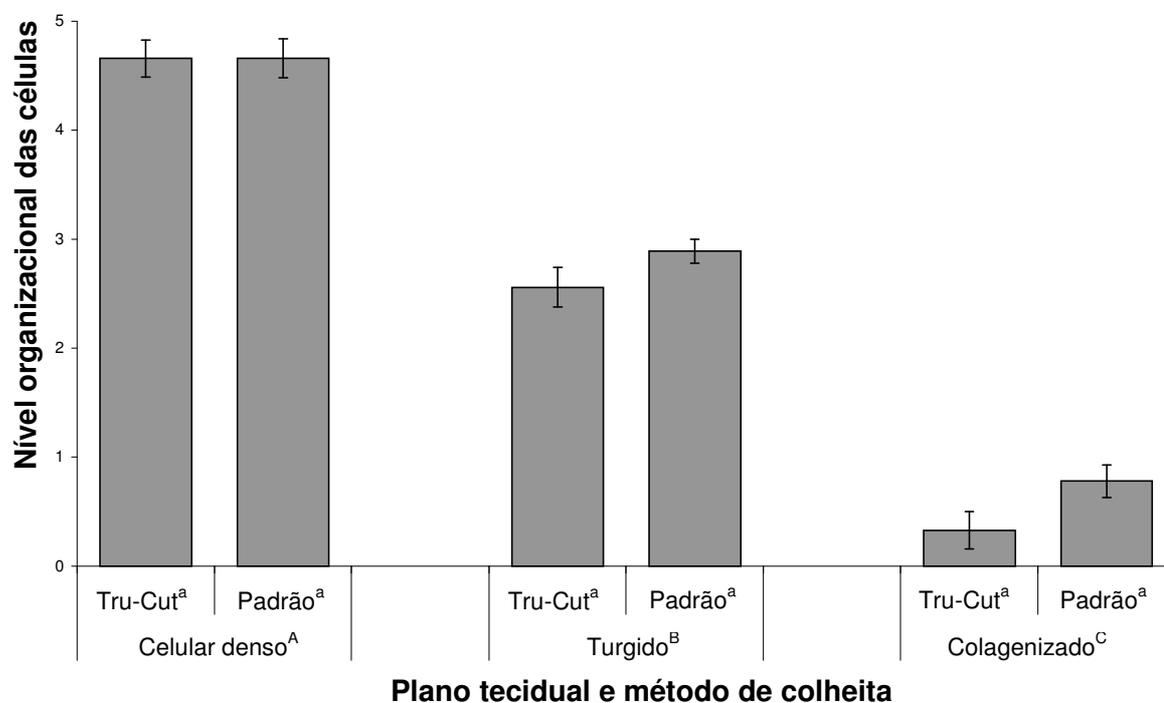


Fig.4 – Nível organizacional das células em amostras de tecido ovariano em éguas, de acordo com o plano tecidual e o método de colheita. Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula, comparando planos teciduais, e minúscula, comparando métodos de colheita, não diferem significativamente entre si, em nível de 5% de probabilidade.

Os resultados dos testes de Tukey e “t” de Student confirmam a diferenciação entre os planos teciduais com relação ao nível organizacional das células em amostras de tecido ovariano em éguas, e que também o método de colheita não influenciou diretamente o resultado.

5.3 Resultado III – Cromatismo do núcleo celular de amostras de tecido ovariano de éguas, de acordo com o plano tecidual e o método de colheita.

Partindo-se novamente de uma avaliação simples, que também pode diferenciar os três planos teciduais, utilizou-se uma escala de 0 – 5, em relação ao cromatismo do núcleo celular, numa distribuição que pode ser interpretada (Tab. 3):

- De 0 – 1 = Hipocromatismo;
- De 2 – 3 = Normocromatismo;
- De 4 – 5 = Hiperchromatismo.

Tab. 3 – Cromatismo do núcleo celular de amostras de tecido ovariano de éguas de, acordo com o plano tecidual e o método de colheita.

Animal	Cromatismo do núcleo celular (0 – 5)					
	Celular denso		Turgido		Colagenizado	
	Tru-Cut	Padrão	Tru-Cut	Padrão	Tru-Cut	Padrão
1	5	4	3	2	1	0
2	5	4	3	3	1	0
3	5	5	2	2	1	0
4	4	5	3	2	1	0
5	5	4	3	3	1	1
6	4	5	2	2	1	1
7	4	4	3	2	1	2
8	4	5	2	2	1	1
9	4	5	3	2	1	0
X ± s(X)	4,44 ± 0,18	4,56 ± 0,18	2,67 ± 0,17	2,22 ± 0,15	1,00 ± 0,00	0,56 ± 0,24
CV (%)	11,9	11,6	18,8	19,8	0	130,8
IC	0,41	0,41	0,39	0,34	0	0,56

X ± s(X): média ± erro-padrão; CV (%): coeficiente de variação; IC: intervalo de confiança (P=0,95).

Os valores mensurados pelo cromatismo do núcleo celular demonstram, nas médias (X), que há diferença na comparação entre os três planos teciduais. Com o CV (%), no plano celular, comparando-se os dois métodos de colheita, não ocorreu diferença significativa ($P>0,05$), confirmado pelo IC (0,41), que foi o mesmo para ambos.

Ocorreu diferença significativa ($P<0,05$) entre as médias dos planos teciduais quanto ao cromatismo do núcleo celular, tanto se analisando o método de colheita Padrão como o Tru-Cut. Comparando-se os métodos de coleta, em cada plano tecidual, não se verificaram diferenças significativas ($P>0,05$) em nenhum dos casos, o que evidencia que tanto o método Padrão quanto o Tru-Cut apresentam mesmo nível de cromatismo do núcleo, independente do plano tecidual (Fig.5).

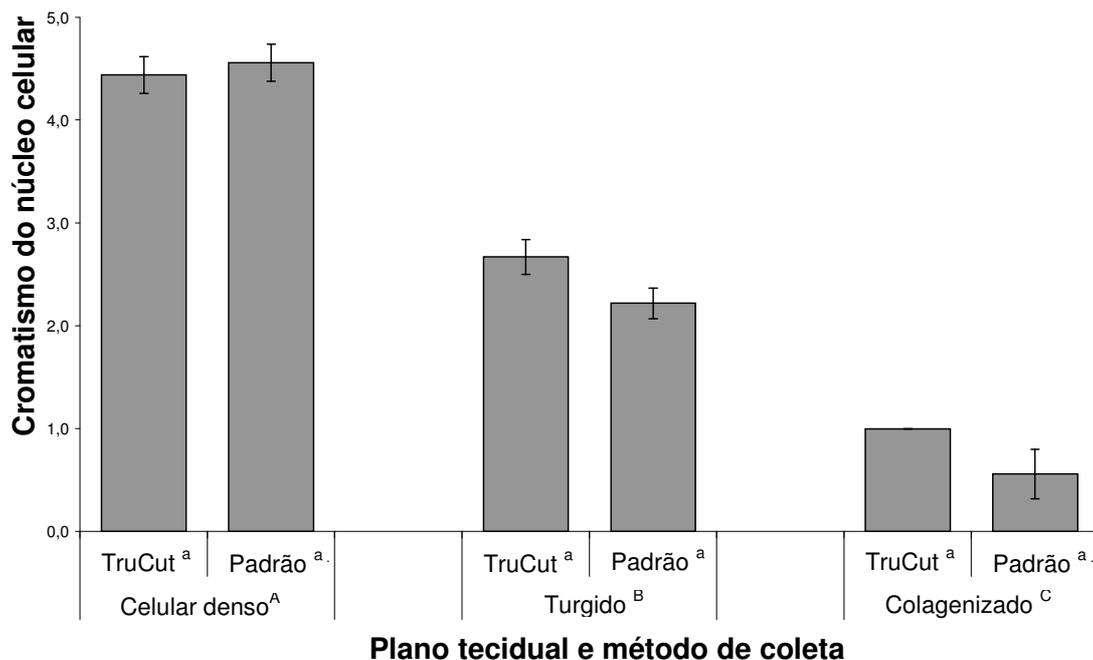


Fig.5 – Cromatismo do núcleo celular de amostras de tecido ovariano de éguas, de acordo com o plano tecidual e método de colheita. Médias seguidas por uma mesma letra maiúscula, comparando planos teciduais, e minúscula, comparando métodos de colheita, não diferem significativamente entre si, em nível de 5% de probabilidade.

6. DISCUSSÃO

É importante ressaltar o que Parker *et al.* (1989) dispuseram em seus estudos, que um fator muito importante na biopsia, por agulha cortante, vem a ser o tamanho da lesão, sendo que as de tamanho muito pequeno, ou seja, menores que o diâmetro ou do comprimento mínimo da secção cortante da agulha, não são passíveis de biopsias por tal método.

Isso foi demonstrado na avaliação do diâmetro das agulhas utilizadas, uma vez que os fragmentos colhidos com Gauge 18 apresentavam pouca consistência, deformando-se rapidamente na montagem dos blocos parafinados e também no corte pelo micrótomo, com posterior insignificância na avaliação ao microscópio. O Gauge 14 colheu fragmentos com precisão, tornando-se titular no procedimento. Outras medidas devem ser avaliadas.

Foi realizado por Sartori *et al.* (2002) o procedimento em órgão reprodutivo similar *in vivo*, quando se demonstrou que a biopsia com agulha Tru-Cut em ovinos forneceu material suficiente para histologia, cujo procedimento é seguro, por não ter comprometido significativamente as características estruturais e funcionais dos testículos, o que a avaliação comparativa das técnicas de colheita, no presente trabalho, corrobora tais resultados.

No preparo das lâminas para avaliação histológica, podem acontecer tecnopatias (artefatos relativos ao procedimento de montagem ou reativos às técnicas de coloração utilizadas), que, no presente trabalho, direcionaram a padronização e a seleção das lâminas, de acordo com a distribuição celular. Não ocorreu comprometimento significativo no “n” de dados que alterassem os resultados ou até a conclusão do trabalho. Por fim, ocorreram a adequação e a calibração do procedimento de colheita, facilitando o detalhamento da avaliação.

Também se deve avaliar o que mais cortes histológicos seriados significariam nos resultados, dependendo do momento fisiológico das estruturas envolvidas na localização do fragmento colhido pela agulha de biopsia Tru-Cut. Isso porque os cortes são realizados em profundidades diferentes, visto que a variação de planos teciduais nos ovários das éguas não obedece a uma distribuição regular.

Em determinados casos, durante um ciclo estral, após ovulação, a hemorragia distende a cavidade folicular, resultando em hematoma (THRELFALL, 1990). Nesta

situação, persiste por tempo variável e frequentemente ultrapassa a próxima ovulação, uma vez que o tecido luteo que se desenvolve é normal e não afeta a atividade ovariana (HUGHES, 1972a, HUGHES, 1972b). O hematoma, que normalmente se desenvolve após a ovulação, como ocorre com o corpo hemorrágico (MILLS, 1996), pode atingir dimensões consideráveis (>10 cm) e permanecer por vários ciclos antes de ser absorvido, resultando em uma área firme e calcificada no ovário (DAELS & HUGHES, 1993). Em geral, persiste por período de um a dois ciclos (BOSU & SMITH, 1993), sem interferir com a atividade normal do ciclo estral (BOSU *et al.*, 1982; GINTHER, 1988), razão pela qual a remoção cirúrgica do ovário comumente não é indicada (THRELFALL, 1990).

O procedimento com agulha de biopsia Tru-Cut, convém para a situação descrita anteriormente, diferenciando os vários estádios fisiológicos, além dos estádios patológicos.

Nota-se uma variação morfológica da disposição celular no ovário equino, como demonstrado por Dellmann & Brown (1982). Esta foi observada nas várias disposições celulares, de acordo com os estádios em que os folículos se encontravam. Isto enfatiza a dificuldade clínica de avaliação sem ferramentas de acesso para auxílio do diagnóstico, além das já conhecidas (palpação, ultrassonografia e dosagem hormonal).

Ressalta-se a importância da história clínica, desde que bem elaborada, como fator imprescindível na conclusão dos diagnósticos, e a inclusão da biopsia ovariana como ferramenta definitiva no diagnóstico de alterações ovarianas em éguas.

Estudos futuros são imperiosos para que a biopsia por agulha cortante torne-se uma técnica cirúrgica que ofereça praticidade, segurança e confiabilidade aos profissionais veterinários.

7. CONCLUSÕES

A colheita de amostra de ovário para biopsia em éguas, por agulha cortante, tipo Tru-Cut, mostrou-se eficiente, com representatividade no comparativo com a biopsia pela técnica Padrão.

A utilização de metodologia relacionada à análise de imagens, por meio de avaliação objetiva da tonalidade de *pixels*, propiciou condições para comparação de planos teciduais e métodos de colheita.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOSU, W. T. K.; SMITH, C. A. Ovarian abnormalities. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. *Equine Reproduction*. Malvern. Lea & Febiger, 1993, p. 401.

BOSU, W. T. K.; VAN CAMP, S. C.; MILLER, R. B.; OWEN, R. Ovarian disorders: clinical and morphological observations in 30 mares. *Can Vet Journal*, v. 23, p. 6-14, 1982.

BRÜCK, I. Follicle aspiration in the mare using a transvaginal ultrasound-guided technique. *Equine Veterinary Journal*. Suffolk, v. 24, p. 58-59, 1992.

CARNEVALE, E. M. Factors affecting the success of oocytes transfer in a clinical program for subfertile mare. *Theriogenology*. Los Altos, v. 64, p. 519-527, 2005.

DAELS, P. F.; HUGHES, J. P. The abnormal estrous cycle. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. *Equine reproduction*. Malvern. Lea & Febiger, 1993, p. 150-151.

DAVIES-MOREL, M. C. G. *Equine reproductive physiology breeding and stud management*. Wallingford: CABI Publishing, 2003, 374 p.

DELLMANN & BROWN. *Histologia Veterinária*. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, p. 255-266, 1982.

FARIN, P. W.; ESTILL, C. T. Infertility due to abnormalities of the ovaries in cattle. *The Veterinary Clinics of North American*. Food Animal Practice, v. 9, n. 2, p. 291-308, 1993.

GINTHER, O. J. Ultrasonic imaging of ovarian follicles and corpora lutea. *Veterinary Clinical of North American Equine Practitioner*. v. 4, p. 197-213, 1988.

GINTHER, O. J. *Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects*. 2a ed. Wisconsin. Cross Plaines: Equiservices, 1992, p. 397-403.

GRUNERT, E.; GREGORY, R. M. *Diagnóstico e terapêutica da infertilidade na vaca*. Porto Alegre. Sulina, 1984, 174 p.

HUGHES, J. P.; STABENFELDT, G. H.; EVANS, J. W. Clínical and endocrine aspects of the estrous cycle of the mare. *Proc American Association of Equine Practitioner*, p.119-148, 1972a.

HUGHES, J. P.; STABENFELDT, G. H.; EVANS, J. W. Estrous cycle and ovulation in the mare. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 161, p. 1367-1374, 1972b.

HUMASON, G. L. *Animal tissue techniques*. 3a ed. San Francisco. WH Freeman, 1972, 641 p.

IRION, K. L.; IRION, L. D.; HOCHHEGGER, B. Core Biópsia, Tru-Cut biópsia, punção lancetante ou biópsia por punção com agulha fragmentante tecidual (punção fragmentante - Pfrag) ?. *Radiol Bras*, v. 39, n. 4, 2006.

KALLOO, A. N.; SINGH, V. K.; JAGANNATH, S. B. *et al.* Flexible transgastric peritoneoscopy: a novel approach to diagnostic and therapeutic interventions in the peritoneal cavity. *Gastrointest Endos*. Baltimore, v. 60, p. 114-117, 2004.

KENNEY, R. N. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 172, p. 241-262, 1978.

MARQUES, JR. A. P. Tratamento de infecções uterinas na vaca: análise crítica. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 1, n. 3, p. 154-163, 1991.

MARTINS, C. F. *et al.* Biopsia endometrial em vacas bos indicus em regime extensivo de criação com problemas de fertilidade. *Ensaio e Ciência*, v. 6, n. 2, p. 13-33, 2002.

MCENTEE, K. Embryology of the reproductive organs. In: *Reproductive pathology of domestic mammals*. New York: Academic, chapt. 1, p.1-7, 1993.

MICHAEL EDWARDS, F. R. C. S. *TruCut needle Biopsy*. Woodlands Hospital. Pantogen® Customizable Script, 2003, p. 5, il color.

MILLS, M. L.; HANSEN, A. E. K.; BROWN, D. W. Ovarian hematoma as a cause of small colon obstruction in a six-month-old foal. *Equine Practitioner*, v. 18, p. 25-27, 1996.

NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. Patologia da Reprodução dos Animais Domésticos. Rio de Janeiro. *Guanabara Koogan*, 2a ed., p. 15-39, 2003.

NIE, G. J. & MOMONT, H. Ovarian mass in three mares with regular estrous cycles. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 201, p. 1043-1044. 1992.

PARKER *et al.* Image-directed percutaneous biopsies with a biopsy Gun. *Easten. Radiology*, v. 171, p. 663-669, 1989.

PETTERSON, L. J. Cirurgia oral e maxilofacial contemporânea. 3a ed. Rio de Janeiro. *Guanabara Koogan*, 2000.

PIMENTEL, C. A. *et al.* Interpretação da biópsia endometrial ao manejo reprodutivo de eqüinos. In: CONGRESSO INTERNACIONAL, 1. CONGRESSO NACIONAL, 7. CONGRESSO ESTADUAL DE ZOOTECNIA, 14. Porto Alegre. Anais, 1996, p. 149-160.

PIMENTEL, C. A. Infertilidade em bovinos. In: CORREA, F. R.; SCHILD, A. L.; MENDEZ, M. C. *Doenças de ruminantes e eqüinos*. Pelotas. UFPEL, 1998, cap. 11, p. 559-589.

PIMENTEL GOMES, F. Curso de Estatística Experimental. 3ª Ed. Piracicaba. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, 1966, 404 p.

RAOOFI A. *et al.* Tecoma in a Mare: Case Report. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 12, p. 588-591, 2006.

RICKETTS, S. W. Uterine structural normality and abnormalities. In: RICKETTS, S. W. *Equine stud medicine course*. British Equine Veterinary Association: 10a Ed. Newmarket, 2005, p. 70-77.

SARTORI, R.; PRESTES, N. C.; CANAVESSI, A. M. O.; KEMPINAS, W. G.; ROSA, G. J. M. Avaliações ultra-sonografica, macroscópica e histológica da biopsia testicular em ovinos. *Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia*, v. 54, n. 3, p. 233-241, 2002.

SEDRISH S. A. *et al.* Ovarian torsion associated with granulosa-theca cell tumor in a mare. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v. 211, p. 1152-1154, 1997.

SILVA, C. A. M. *et al.* A biópsia endometrial na avaliação da fertilidade na égua. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 7, p. 131-133, 1987.

THRELFALL, W. R. Ovariectomy. In: WHITE, N. A.; MOORE, J. N. *Current practice of equine surgery*. Philadelphia. Lippincott Company, p. 706, 1990.

VAN CAMP, S. D. Ancillary tests for assessment of the reproductive system. *The Veterinary Clinics of North American*. Food Animal Practice, v. 8, n. 2, p. 347-360, 1992.

WAGNER, W. Immunologic aspects of the uterus of the cow. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 1, n. 3, p. 93-107, 1991.

WATSON, E. Normal uterine function and the principles of uterine defence. In: RICKETTS, S. W. *Equine stud medicine course*. British Equine Veterinary Association: 10a ed. Newmarket, 2005, p. 78-81.

YOUNGQUIST, R. S.; BRAUN, W. F. Abnormalities of the tubular genital organs, *The Veterinary Clinics of North American*. Food Animal Practice, v. 9, n. 2, p. 309-322, 1993.