

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

PAULA NASCIMENTO SANTORO

POSSIBILIDADES E LIMITES DO USO DA AGULHA TRU-CUT PARA BIÓPSIA
TESTICULAR EM EQUINOS

CAMPOS DOS GOYTACAZES
FEVEREIRO 2014

PAULA NASCIMENTO SANTORO

POSSIBILIDADES E LIMITES DO USO DA AGULHA TRU-CUT PARA BIÓPSIA
TESTICULAR EM EQUINOS

Projeto de pesquisa apresentado ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal, com Área Biotecnologia da Reprodução.

Orientador: José Frederico Straggiotti Silva

CAMPOS DOS GOYTACAZES

FEVEREIRO 2014

PAULA NASCIMENTO SANTORO

POSSIBILIDADES E LIMITES DO USO DA AGULHA TRU-CUT PARA BIÓPSIA
TESTICULAR EM EQUINOS

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

Aprovada em 17 de Fevereiro de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Bruno Fagundes - Doutor em Ciência
Animal - UNIG

Paula Alessandra Di Fillipo – Doutora
em Cirurgia Veterinária – UENF

Eulógio Carlos Queiroz de Carvalho -
Doutor em Anatomia Patológica -
UENF

José Frederico Straggiotti Silva -
Doutor em Medicina Veterinária -
UENF (Orientador)

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por sempre me dar forças, paciência e sabedoria para continuar seguindo em frente e alcançar meus objetivos independentemente de quaisquer circunstâncias.

À minha querida e amada MÃE, que torce por mim com todo amor, carinho e dedicação. Sem ela, nem minha vida eu teria. Sem ela, nada eu seria. Meu escudo protetor, meu talismã. MINHA MÃE, MEU TUDO.

Aos meus verdadeiros amigos que estão ao meu lado na alegria e na tristeza, na saúde e na doença. Em especial, a Renata Pires Coura e família, companheiros desde os primeiros passos na terra goitacá; a Glacielle Gaspar Lemos e família, uma amizade iniciada neste Mestrado e que de certo permanecerá, sempre envolvida com muitas e muitas gargalhadas e lágrimas de humor; a Luciana Xavier Gomes (eterna Luuu) que, de vigilante do Hospital Veterinário, se transformou em vigilante de uma eterna e gostosa amizade para todo e sempre; e ao amigo inesperado Miguel Alejandro Silva Rua (Miguel Street), que, por estar sempre disposto a qualquer trabalho em prol do nosso crescimento profissional, foi possível nascer entre nós uma amizade verdadeira.

Ao meu querido João Gatto Brom de Luna, que com todo carinho se tornou parte da minha vida e da minha história, dando-me sempre suporte e incentivando-me a cada passo e a cada momento da minha vida.

Ao meu orientador, José Frederico Straggiotti Silva, por sua paciência e dedicação, mostrando-se um verdadeiro orientador, sem permitir que eu me perdesse pelos labirintos dos infindáveis artigos científicos, incentivando-me a ganhar o mundo e a não desistir diante de qualquer obstáculo.

Aos queridos professores: Eulógio Carlos Queiroz de Carvalho, Paula Alessandra Di Fillipo e Flávio Augusto Soares Graça, por estarem ao meu lado em cada necessidade, sempre prontos a ofertar seus saberes em suas respectivas especialidades, colaborando ativamente para a realização desta dissertação. Em especial, à querida Profa. Célia Raquel Quirino, que se tornou mais do que uma professora, uma verdadeira amiga e incentivadora de trabalhos e de vida. Agradeço também a carinhosa receptividade do professor Claudio Retamal (*in memoriam*), a quem tive a oportunidade de conhecer e ser orientada por seus conhecimentos, e a sua aluna, Lara Meneguelli, que se mostrou sempre disposta a colaborar em prol do conhecimento científico.

Ao meu queridíssimo e eterno 'cabrunco' Lério Gama Sales, meu amigo e mestre da vida! Meu orientador de Medicina Veterinária, de campo, de roça, de amizade, de carinho, de respeito ao próximo e, principalmente, de alegria de viver! Obrigada por fazer parte da minha vida!

A Mariane, Jovana e Conceição, queridas amigas da Secretaria do LRMGA e de Pós-Graduação, sempre pacientes e com um sorriso estampado no rosto para nos atender e ajudar!

A todos os estagiários e bolsistas da UAP (Unidade de Apoio à Pesquisa) e do HVUENF (Hospital Veterinário da UENF), por estarem sempre dispostos a colaborar e aprender em cada experimento.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), por prover subsídios ao nosso estudo e incentivar o aprimoramento profissional em cada área específica.

A todos os integrantes do Laboratório de Imunobiologia da UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINESE, pela parceria na realização de parte da pesquisa, assim como, por toda a receptividade e orientação desprendidas.

À minha querida UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO, pelo imenso orgulho de fazer parte integrante de sua historia e tê-la como parte integrante da minha. Agradeço imensamente a permissão para utilização de seu espaço desde minha graduação, transformando-me em uma profissional e me permitindo atuar no que mais amo na vida, a Medicina Veterinária.

E por fim, sem eles eu nada seria. Agradeço a TODOS OS ANIMAIS, que me permitem cuidar, que me acariciam apenas com seus olhares de gratidão e que acima de tudo me dão forças para continuar! SALVAR E GERAR VIDAS É UM PRIVILÉGIO! Obrigada!

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à vida de todos os animais que com sua aura esplendorosa nos alegam e nos amam cada um com seu jeitinho de ser. Vocês nos brindam com imensa luz e merecem todo o amor e respeito!

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
INTRODUÇÃO	11
OBJETIVOS	13
<i>OBJETIVOS GERAIS</i>	13
<i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	13
REVISÃO DE LITERATURA	14
<i>PARÊNQUIMA TESTICULAR E ESPERMATOGÊNESE</i>	14
<i>TÉCNICA DE BIÓPSIA</i>	16
<i>PATOLOGIAS REPRODUTIVAS INERENTES AO MACHO</i>	19
<i>IMUNOGENICIDADE ESPERMÁTICA</i>	22
MATERIAIS E MÉTODOS	24
<i>DELINEAMENTO EXPERIMENTAL</i>	24
<i>ANIMAIS</i>	24
<i>COLHEITA E PROCESSAMENTO DO SÊMEN</i>	24
<i>EXAME ULTRASSONOGRÁFICO</i>	27
<i>PROCEDIMENTO DE BIÓPSIA</i>	27
<i>ORQUIECTOMIA</i>	29
<i>PROCESSAMENTO DO MATERIAL</i>	30
<i>ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO - ELISA (ENZIME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)</i>	30
RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
<i>ANÁLISE ESPERMÁTICA</i>	41
<i>ULTRASSONOGRAFIA TESTICULAR</i>	47
<i>ANÁLISE HISTOLÓGICA</i>	49
<i>ENSAIO IMUNOLÓGICO</i>	52
ANÁLISES ESTATÍSTICAS	55
CONCLUSÕES	56
APÊNDICE	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

RESUMO

A biópsia testicular vem sendo amplamente difundida e apresenta como principal vantagem um diagnóstico rápido e eficaz. O trabalho objetivou avaliar a viabilidade da biópsia testicular por punção com agulha Tru-Cut, calibre 18G, em machos equinos, por análise espermática, avaliação ultrassonográfica das gônadas e teste de imunogenicidade espermática. Foram utilizados quatro animais, dois hígdos e dois criptorquidas. Realizaram-se dois períodos de estudo, Pré-Biópsia e Pós-Biópsia, com intervalo de 30 dias. Duas colheitas de sêmen foram realizadas com intervalo de 1 hora em cada período. Avaliaram-se as motilidades total e progressiva, e a concentração e cinemática espermática. Após as colheitas de sêmen, os animais foram contidos e examinados ultrassonograficamente, colhido sangue para obtenção de soro e realização de ensaio imunoenzimático. Os animais foram orquiectomizados no Período Pós-Biópsia. À análise espermática, não foi verificada diferença estatística significativa entre as colheitas e os períodos. Ao exame ultrassonográfico, foram observadas pequenas lesões difusas. À análise histológica, verificou-se a presença de tecido fibroso no material oriundo de peça cirúrgica em um dos animais, porém, as características seminais não foram alteradas. Com o material oriundo das punções, foi possível conduzir adequada análise histológica. No ensaio imunoenzimático, utilizaram-se três antígenos preparados com células espermáticas e plasma seminal, porém, não foi possível sugerir a presença de anticorpo. Constatou-se que a técnica foi segura e representativa para análise histológica, podendo ser indicada como exame complementar para diagnóstico.

Palavras-Chave: espermatogênese; garanhão; ELISA; patologia espermática.

ABSTRACT

Testicular biopsy has been widespread and has as main advantage a quick and effective diagnosis. The study aimed to evaluate the feasibility of testicular needle biopsy with Tru-Cut needle, gauge 18G, in horses by males sperm analysis, ultrasound evaluation of the gonads and sperm immunogenicity testing. Four animals, two healthy and two cryptorchids, were used. There were two periods of study, Pre-Biopsy and Post-Biopsy, at intervals of 30 days. Two ejaculates were performed with an interval of one hour each period. Were evaluated the Total and Progressive Motility, and sperm concentration and kinematics. After the ejaculates, the animals were restrained and examined by ultrasound, blood was collected to obtain serum and perform immunoassay. The animals were castrated in the Post-Biopsy. For sperm analysis did not reveal statistically significant differences between crops and periods. At ultrasonography, small diffuse lesions were observed. For histological analysis revealed the presence of fibrous tissue in the surgical specimen material from one of the animals, however, seminal characteristics were not changed. With material from the punctures, it was possible to conduct adequate histological analysis. Enzyme-linked immunosorbent assay, we used three antigens prepared with sperm cells and seminal plasma, however, not been possible to suggest the presence of antibody. It was found that the technique was safe and representative for histological analysis can be recommended as a complementary diagnostic test.

Keywords: spermatogenesis; stallion; ELISA; sperm pathology.

INTRODUÇÃO

A equinocultura apresenta grande importância no mercado nacional, com um efetivo de mais de 5 milhões de cabeças (IBGE, 2010), tornando o Brasil referência mundial em estudos e uso das biotecnologias aplicadas à Reprodução Equina. Aliados às biotecnologias, encontram-se os exames complementares que buscam utilizar técnicas específicas menos invasivas e capazes de alcançar um diagnóstico mais preciso em cada caso.

Na Clínica Reprodutiva, considera-se a fertilidade como requisito primordial quando o objetivo é a excelência do produto final. Seja a fertilidade da fêmea ou do macho, ambas são importantes quando se deseja aumentar um rebanho com qualidade, sem omitir o valor do melhoramento genético e da sanidade dos animais.

Causas de infertilidade/subfertilidade em machos equinos podem apresentar grande variedade, como criptorquidismo, degeneração testicular, hemospermia, varicocele, hematocele, neoplasias, traumas, e até mesmo falhas no manejo, nutrição e sanidade.

Diversas são as técnicas utilizadas para diagnóstico, durante o exame ginecológico/andrológico em animais, e a biópsia é uma delas. A técnica avalia diretamente o tecido, quando afetado ou suspeito de determinada patologia, e verifica a extensão da lesão (LEVIN, 1979). Existem diferentes classificações de biópsia de acordo com a forma como é realizada, por exemplo, a biópsia aberta ou incisional, biópsia por punção utilizando agulhas “Punch”, “Split” ou “Tru-Cut” e a punção aspirativa com agulha fina (PAAF), bastante utilizada na prática clínica. A biópsia aberta é assim classificada por ser a mais invasiva, já a PAAF, apesar de menos invasiva, apresenta um diagnóstico limitado (SARTORI et al., 2002a).

Em machos, a biópsia testicular vem sendo difundida em várias espécies, apresentando como principal vantagem o fato de oferecer um diagnóstico rápido, seguro e, principalmente, eficaz. Porém, algumas complicações podem ser encontradas na pós-biópsia, e comumente se apresentam como hemorragia, hematoma, mineralização, fibrose, inflamação, infecções, reações autoimunes e degeneração do epitélio germinativo e dos túbulos seminíferos (COHEN et al., 1984; LOPATE et al., 1989; THRELFALL; LOPATE, 1992).

Já utilizada em outras espécies como ovinos e no homem, a técnica obteve sua representatividade comprovada, mostrando-se rápida e de fácil execução, além de ser minimamente invasiva. Assim, diante da escassa literatura direcionada à espécie equina, desejou-se verificar a representatividade da biópsia testicular em equinos com agulha Tru-Cut, calibre 18G, por análise espermática, avaliação ultrassonográfica das gônadas e teste imunogenicidade espermática.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GERAIS

Verificar a representatividade da agulha Tru-Cut, calibre 18G, na biópsia testicular em equinos por meio da determinação histológica do parênquima testicular, e avaliar os efeitos da punção sobre as características espermáticas na espécie equina.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Análise espermática dos garanhões antes e após a realização da biópsia.

Análise ultrassonográfica do parênquima testicular antes e após a realização da biópsia.

Análise histológica das amostras de tecido colhidas para biópsia com agulha Tru-Cut, calibre 18G.

Análise histológica dos pontos de punção na peça cirúrgica após a orquiectomia.

Teste imunológico para detecção de reação autoimune a partir da produção de anticorpos antiespermatozoides.

REVISÃO DE LITERATURA

PARÊNQUIMA TESTICULAR E ESPERMATOGÊNESE

A espermatogênese é um processo complexo de produção das células espermáticas e é cada vez mais estudado devido a diversas causas que podem alterar seu perfeito funcionamento. É dividida em duas etapas: espermatocitogênese e espermiogênese. Na primeira, ocorre a formação e multiplicação das espermatogônias por mitose, as quais são sustentadas pelas células de Sertoli e se localizam na porção basal do túbulo seminífero. Após, as mesmas seguem para a fase de crescimento, apresentando diversos estádios até se diferenciarem em espermatócitos, quando iniciam a segunda etapa, espermiogênese. Nesta, ocorre a fase de maturação celular a partir das divisões meióticas dos espermatócitos, originando as espermátides e, por fim, os espermatozoides (JOHNSON, et al., 1997; JOHNSON et al., 2000; MONTEIRO et al., 2009; Silva, 2010). Uma vez formadas as células espermáticas, as mesmas sofrem o processo de espermiação no qual são conduzidas ao lúmen dos túbulos seminíferos.

A formação dos espermatozoides, no interior dos túbulos seminíferos, é regulada principalmente pelos hormônios luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH), que controlam a proliferação e diferenciação das células de Sertoli e Leydig, e os esteroides e fatores de crescimento têm ação direta ou indireta sobre o desenvolvimento das células germinativas (AGUIAR et al., 2006; JUBB; KENNEDY; PALMER, 2007; SCHATTEN; CONSTANTINESCU, 2007).

Em cada testículo, é possível encontrar a *rete testis*, uma rede de numerosos túbulos seminíferos e vasos sanguíneos que oferecem ambiente propício e único para cada fase do processo de formação das células espermáticas.

O laborioso parênquima testicular é dividido em tubular e intertubular. No primeiro, encontram-se as células germinativas e as células de Sertoli ou sustentaculares; no segundo, as células de Leydig ou intersticiais, todo o aporte de vasos sanguíneos e linfáticos, fibroblastos, macrófagos e mastócitos, todos participando ativamente do processo de espermatogênese, sendo os responsáveis

pela regulação hormonal, produção de proteínas, metabolização de esteroides, fagocitose, entre diversas outras funções.

As células envolvidas na produção das células espermáticas mantêm um sistema parácrino/autócrino que modula uma fabulosa rede de interação celular, fundamental para o adequado funcionamento testicular (MASCARENHAS, 2006). Transversalmente ao epitélio do túbulo seminífero, são arranjadas as gerações de células da linhagem espermatogênica em diferentes fases de desenvolvimento. As mais imaturas estão dispostas junto à base e as mais avançadas, próximo à luz do túbulo. Cada geração apresenta um desenvolvimento progressivo e sincronizado com as demais, formando um fluxo em direção à luz do túbulo, onde serão liberadas como espermatozoides.

Para uma adequada produção espermática, é importante que as células que compõem a arquitetura testicular interajam de forma harmoniosa e em ritmo adequado capaz de completar cada ciclo do epitélio seminífero.

Segundo Russell e Griswold (1993), as células de Sertoli conferem principalmente nutrição e suporte (daí sua denominação de células sustentaculares) às células germinativas em desenvolvimento, além de outras funções, como liberação de espermatozoides no lúmen tubular, compartimentalização do epitélio seminífero, fagocitose de células germinativas em degeneração e remoção do excesso de citoplasma das espermátides em espermição, e secreção de fluidos e proteínas. Já as células de Leydig, além de estimularem a produção de testosterona, também participam na conformação do interstício (SILVA, 2010).

Ainda sobre a importância que as células de Sertoli exercem sobre o processo da espermatogênese, deve-se ressaltar a presença da barreira hematotesticular (BHT) a partir das *tight junctions*, junções apertadas formadas pela união das células de Sertoli que evitam o transporte intercelular livre de água e solutos, formando um domínio entre o epitélio basal e adluminal para criar e manter a polaridade celular, além de manter a fisiologia e proteger as células germinativas do sistema imune, principalmente após a meiose. Porém, apesar das características já descritas na literatura sobre a morfologia da BHT, informações a respeito da arquitetura molecular das *tight junctions* ainda são pouco conhecidas (MOROI et al., 1998).

TÉCNICA DE BIÓPSIA

McEntee (1990) definiu biópsia como a técnica de remoção de um tecido colhido a partir de indivíduo vivo. A técnica é considerada por alguns autores como sendo altamente invasiva (BONNET et al., 1991), porém, a busca por diagnósticos mais precisos e menos invasivos, dentro da clínica reprodutiva equina, é um campo em ampla ascensão, logo, técnicas mais elaboradas e sofisticadas vêm sendo pesquisadas com o objetivo de melhores resultados para o tratamento.

Problemas reprodutivos em garanhões representam grande preocupação e geram interesses mais profundos nos pesquisadores.

Patologias como a degeneração testicular, neoplasias, orquite, entre vários outros problemas, podem levar à invalidez reprodutiva temporária ou definitiva, inutilizando o animal. Não somente para o estudo de patologias, dosagens hormonais e proteicas, além de análise de marcadores moleculares/genéticos, para investigações de apoptose e espermatogênese, são possíveis de serem realizados a partir da técnica de biópsia testicular (BLANCHARD; VARNER, 1996; MARMAR et al., 2005).

Na reprodução animal, o uso da biópsia vem ganhando espaço principalmente pelas promessas de técnicas menos invasivas. Como exemplo, têm-se as biópsias endometriais amplamente realizadas em éguas, assim como em vacas, porém com menor frequência.

A avaliação de machos pode ser realizada a partir de criteriosa análise seminal e espermática, bem como exame físico-clínico dos testículos. A obtenção de material diretamente do parênquima testicular a partir de biópsia facilita a avaliação andrológica sem que haja a necessidade de utilização do sêmen, principalmente quando existe a impossibilidade de colheita do mesmo ou quando a amostra não se mostra conclusiva (PARDO et al., 2005). Assim, a biópsia torna-se um meio prático, apresentando vantagens significativas quando comparada a outros métodos de diagnóstico e avaliação da função reprodutiva e fisiológica do macho, visto que é de fácil realização, com resultado rápido e apresenta baixo custo (BONNET et al., 1991; SARTORI et al., 2002b), fator muitas vezes questionado pelo proprietário diante do valor zootécnico e comercial do animal.

A técnica de biópsia retira parte de um tecido para fins de análise histológica, como na técnica padrão de colheita e a biópsia com agulha Tru-Cut, ou para fins de análise citológica, como a punção aspirativa por agulha fina (PAAF), mas também se mostra eficaz para estudo bioquímico, microbiológico, e até mesmo imunológico.

Tanto a biópsia com agulha Tru-Cut quanto a PAAF mostram-se vantajosas, podendo ser utilizadas durante o exame andrológico de diversas espécies, assim como descrito por Paz et al. (2003) em seu trabalho com onça pintada. Estes e outros autores ressaltam a boa prática da biópsia minimamente invasiva como ferramenta auxiliar no diagnóstico em casos de aumento de volume testicular, oligozoospermia ou azoospermia.

A diversidade dos tipos de biópsia é grande, porém as mais realizadas são a biópsia incisional, a excisional e, por fim, a biópsia aspirativa. A biópsia incisional é bastante difundida na reprodução equina, porém, com sua maior aplicabilidade em fêmeas quando em suspeita de endometrite e neoplasias uterinas e ovarianas. Em machos, o uso da biópsia gera especulações quanto às consequências desfavoráveis que a técnica pode vir a oferecer no pós-cirúrgico. Problemas como fibrose, inflamações, hematoma, entre outros, podem ocorrer após procedimentos invasivos como este.

Na literatura, encontram-se trabalhos referentes à biópsia em diferentes espécies como lhama, onça pintada, ovinos, bovinos e cães. Na tese de Cunha (2009), foi realizada análise comparativa entre dois métodos de biópsia, com a agulha a Tru-Cut e a PAAF, em testículos de cães, em que se concluiu que ambas são eficientes, porém a Tru-Cut conferiu maior trauma aos tecidos devido ao fragmento de tecido retirado, ainda que este tenha sido muito pequeno, embora tenha mostrado eficiência na análise histológica semelhante à da PAAF.

Outra técnica de biópsia e mais antiga é realizada por meio do método padrão de colheita, no qual se retira um fragmento com auxílio de cunha elíptica e que este apresente em torno de 1 cm de espessura para que possa ser fixado em solução de formol adequadamente. Frente ao tamanho necessário de material a ser colhido, esta técnica torna-se mais agressiva e ainda mais lesiva, visto que, para sua realização, na maioria dos casos, é necessário que haja retirada do órgão afetado. Em contraponto, o trabalho de Abreu (2010) promoveu um estudo comparativo entre

o método-padrão de colheita e a biópsia por Tru-Cut em ovário de éguas, no qual comprovou a representatividade da técnica de biópsia por Tru-Cut utilizando peças de abatedouro. Já em 2011, Abreu et al. mostraram a viabilidade da realização da técnica *in vivo* utilizando guia ultrassonográfica como auxílio, demonstrando, desse modo, que a retirada do órgão tornou-se desnecessária.

A biópsia com agulha Tru-Cut apresenta-se menos invasiva e lesiva ao tecido. Como comprovado no trabalho de Abreu (2011), a técnica apresentou-se tão representativa quanto à colheita padrão, assim, o fragmento retirado é de tamanho bastante reduzido quando comparado ao corte feito com cunha elíptica. O mecanismo de ação da agulha encontra-se ilustrado na Figura 2.

No âmbito da pesquisa, estudos demonstram que as técnicas de biópsia são utilizadas como uma ferramenta extra no exame andrológico em casos de infertilidade ou subfertilidade (LOPATE et al., 1989; OLSON et al., 1992; SARTORI et al., 2002). A andrologia é uma área de grande valia na reprodução equina, porém poucos são os estudos conduzidos acerca desse tema quando comparado aos demais estudos direcionados às éguas. Diante desse fato, nota-se a deficiência de literatura correlata diretamente ao estudo das patologias inerentes ao macho e, mediante a já comprovada ação da agulha Tru-Cut frente a ovários equinos, a inovação da utilização e a viabilidade da técnica em testículos da mesma espécie apresentam-se vantajosas, sendo uma ferramenta extra na conclusão do diagnóstico preciso, associada às técnicas convencionais de avaliação como palpação retal, ultrassonografia e espermiograma.

PATOLOGIAS REPRODUTIVAS INERENTES AO MACHO

Diversas são as patologias que acometem o sistema reprodutivo do macho, com algumas podendo ser espécie-específicas.

De acordo com o grau de acometimento do animal, as vertentes para diagnóstico e tratamento podem ser ampliadas ou reduzidas. A técnica de biópsia pode servir como auxílio no diagnóstico, porém apenas será válida se a patologia suspeita apresentar alterações histológicas passíveis de serem avaliadas.

As patologias reprodutivas inerentes ao macho podem apresentar origens variadas, como infecção, traumas e até mesmo o fator idade (BARUSELI, 2007). A seguir, estão relacionadas algumas das patologias mais comuns que podem ser diagnosticadas por meio da técnica de biópsia.

- Degeneração Testicular

A degeneração testicular ocorre quando o tamanho e a consistência dos testículos se apresentam alterados. É uma das principais causas de infertilidade ou subfertilidade dos machos acometidos dentre as espécies domésticas. As origens acima citadas podem ser uma das causas da degeneração testicular, mas o reconhecimento da causa primária é difícil, podendo, em certos casos, não ser possível. Outras causas de degeneração testicular ainda podem ser temperatura elevada, nutrição, fatores hormonais, agentes tóxicos, autoimunidade e outras. A patologia pode ocorrer progressivamente e variar de discreta a severa, além de se apresentar uni ou bilateralmente (NASCIMENTO; SANTOS; 2003). Alterações como a mineralização dos túbulos seminíferos e a degeneração das espermatídes são possíveis de serem detectadas ao exame histopatológico. O processo se instala rápido, porém a regeneração é lenta.

- Hipoplasia Testicular

O testículo mais acometido da hipoplasia testicular é o esquerdo, porém pode ocorrer bilateralmente. Esta apresenta caráter hereditário quando acomete bovinos, podendo ser classificada em moderada, intermediária ou total, provocando, em cada grau, consequências variadas na produção espermática, seja na quantidade ou na

morfologia das células. Ao exame histológico, nota-se diminuição do volume dos túbulos seminíferos e membrana basal espessa, às vezes, hialinizada (NASCIMENTO; SANTOS, 2003).

- Neoplasias

As neoplasias não são comuns em equinos, sendo mais frequentes em cães e touros velhos. Podem originar-se tanto de células germinativas quanto de não germinativas (NASCIMENTO; SANTOS, 2003; SAMPER et al., 2007; YOUNGQUIST; THRELFALL, 2007).

A ocorrência de neoplasias, mesmo sendo rara, é capaz de provocar alterações na espermatogênese do testículo afetado. Porém, segundo Samper et al. (2007), a compressão do tumor no testículo contralateral acarreta uma degeneração testicular, afetando, conseqüentemente, a espermatogênese contralateral.

Nascimento e Santos (2003) expuseram que a diferenciação macroscópica das neoplasias testiculares pode ser difícil, mas há parâmetros a serem seguidos com tal objetivo, como a palpação da consistência e a ecogenicidade do órgão ao exame ultrassonográfico.

Dentre as neoplasias reprodutivas mais relatadas nos machos da espécie equina, encontram-se o Teratoma, o Seminoma, o Sertolioma (ou Tumor das Células de Sertoli) e o Leydigocitoma (ou Tumor das Células de Leydig).

O Teratoma é a neoplasia mais relatada em equinos, com grande incidência em machos criptorquidas. É caracterizado pela presença de diversos tipos celulares. Quando ocorre em animais jovens, apresenta característica benigna mais marcante, já, em animais mais velhos, a malignidade sobressai (PETERSON, 1984). O Seminoma é o segundo tumor de maior ocorrência em garanhões, e também bastante comum em cães idosos. Apresenta células grandes com citoplasma granuloso e acidófilo, e núcleos grandes. Podem ser vistas, ao exame, células inflamatórias linfocitárias e áreas de necrose (NASCIMENTO; SANTOS; 2003). O Leydigocitoma pode ser uni ou bilateral, único ou múltiplo, e seu tamanho pode variar de milímetros a centímetros. Histologicamente, é composto por células arredondadas e com granulosos em seu citoplasma, intensa vacuolização e coloração parda. O Sertolioma ocorre com frequência nos testículos criptorquídicos

de cães, já em equinos, ocorre de forma extremamente rara. Por ser hormonalmente ativo, leva à feminilização do macho. Na histologia, se apresenta com estroma conjuntivo aumentado, o que confere resistência e consistência ao tumor.

Em equinos, quando ocorre neoplasia, é percebida uma atrofia do testículo acometido, sendo comum a presença concomitante de degeneração testicular. A ocorrência de ambas é comum em garanhões idosos e, com isso, não está perfeitamente elucidado se a causa dessa degeneração está diretamente relacionada à neoplasia, isto porque surge a hipótese de que a tumoração provoque compressão sobre o parênquima do órgão, levando-o à degeneração e, conseqüentemente, à necrose tecidual (SAMPER et al., 2007).

IMUNOGENICIDADE ESPERMÁTICA

As primeiras especulações sobre a autoimunidade espermática foram levantadas há mais de um século, porém apenas foram confirmadas entre os anos 1950 e 1955 (ROCHA, 2005).

Há autores que discorrem a respeito dessa incompatibilidade explicando que o não reconhecimento dos espermatozoides pelo organismo se dá pelo fato de estas células serem formadas após o período fetal ou neonatal, quando sistema imune do indivíduo já se encontra formado (CREWE et al., 1977; DEMESHEK, 1966; ROCHA, 2005). Os espermatozoides são células que possuem antígenos específicos únicos que não são reconhecidos pelo sistema imunológico. Estes antígenos encontram-se altamente organizados em diversos sítios na superfície das células espermáticas, como no acrossoma e na peça intermediária, sendo responsáveis pela autoimunização no homem (COCHRAN, 1974), e também exibem a função sobre a fecundação do óvulo, uma vez que os anticorpos podem inibir o espermatozoide no muco cervical, diminuir o grau de ligação do mesmo à zona pelúcida, facilitar a fagocitose do espermatozoide, diminuir a taxa de clivagem do zigoto e a taxa de implantação e redução da sobrevivência do embrião (GOLDEBERG, 1973; HENSLEIGH et al., 1996).

Dentre muitas formas de diagnóstico, a biópsia é um exame complementar que proporciona um resultado mais acurado sobre o que ocorre em determinado tecido microscopicamente. Porém, durante a biópsia testicular, o parênquima é lesionado, levando à ruptura da barreira hematotesticular (BHT) e permitindo que as células espermáticas entrem em contato com humores corporais do indivíduo. Diante deste fato, vale ressaltar que a imunidade mediada por células pode comprometer a espermatogênese de forma temporária, já a imunidade humoral confere uma reação às células espermáticas, impedindo que as mesmas exerçam sua função (MADAR, 2002).

A função de proteção da barreira hematotesticular, formada pelas *tight junctions* entre as células de Sertoli, consiste principalmente em impedir que as células espermáticas entrem em contato com os elementos circulantes do sistema imune, pois, uma vez em contato com as células B e T, podem induzir a formação de

anticorpos antiespermatozoides (CREWE et al., 1977; HJORT et al., 1974; LEMBRUGER; LOJA, 1997; ROCHA, 2005; ROSENBLATT et al., 2010). Hjort et al. (1974) concordam com esta afirmação em seu trabalho com humanos ao identificarem aumento de anticorpos antiespermatozoides no soro de pacientes que sofreram múltiplas biópsias testiculares.

É importante considerar as consequências que procedimentos diagnósticos podem causar. Pois, mesmo a biópsia com agulha Tru-Cut sendo menos invasiva, ainda assim ocorre lesão parenquimatosa. Assim sendo, a investigação sobre a formação de anticorpos deve ser conduzida de modo a evitar prejuízos à vida reprodutiva do garanhão.

MATERIAIS E MÉTODOS

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O experimento foi realizado em dois períodos com intervalo de 30 dias: Período Pré-Biópsia e Período Pós-Biópsia. As análises realizadas e a ordem de ocorrência se encontram esquematizadas na Tabela 1.

TABELA 1: Esquema das etapas realizadas em cada período do experimento, Campos dos Goytacazes, 2013.

PERÍODO PRÉ-BIÓPSIA	PERÍODO PÓS-BIÓPSIA
Coleta 1	Coleta 1
Análise Espermática	Análise Espermática
Coleta 2	Coleta 2
Análise Espermática	Análise Espermática
Ultrassonografia Testicular	Ultrassonografia Testicular
Colheita de sangue (soro)	Colheita de sangue (soro)
Punção	Orquiectomia
Processamento histológico do material	Processamento histológico do material

ANIMAIS

Foram utilizados quatro garanhões com idade entre 3 e 15 anos, sem predileção de raça. Todos os animais foram encaminhados à Unidade de Apoio à Pesquisa, na UENF, para condução do experimento.

COLHEITA E PROCESSAMENTO DO SÊMEN

Para as colheitas de sêmen, utilizou-se vagina artificial preenchida com água aquecida entre 42° e 45°C. A mucosa de látex foi revestida com mucosa plástica

descartável, lubrificada com gel à base de água estéril. O copo coletor foi revestido com saco plástico onde o sêmen foi depositado e protegido da luz e temperatura.

Em cada período, os ganhões foram submetidos a duas colheitas de sêmen, totalizando quatro colheitas por animal em todo o estudo. A Colheita 1 de cada período tinha por finalidade promover a limpeza dos condutos espermáticos e equilibrar os padrões espermáticos de cada animal. A Colheita 2 de cada período apresentou-se como foco do estudo sobre a espermatogênese. Entre as Colheitas 1 e 2, em cada período, houve um intervalo de 60 minutos.

Cada ejaculado foi filtrado no momento da colheita para a remoção da fração gelatinosa e sujidades. A fração livre de gel foi diluída em extensor¹ à base de leite e glicose na proporção de 1:3 (sêmen:meio). Foram analisados os seguintes parâmetros:

ANÁLISE MACROSCÓPICA

Cor – caracterizada em translúcido, cinza ou branco

Odor – *sui generis*

Aspecto – caracterizado em aquoso, seroso ou leitoso

Volume – variável

ANÁLISE MICROSCÓPICA

Análise Computadorizada² – foram dispostos 20µL de sêmen entre lâmina e lamínula previamente aquecidas em placa aquecedora a 37°C. A análise foi conduzida sobre a cinemática das células espermáticas. As variáveis analisadas pelo *software* foram: Velocidade de Trajetória Média em µm/s (VAP), Velocidade Progressiva em µm/s (VSL), Velocidade Curvilinear em µm/s (VCL), Amplitude Lateral da Cabeça em µm (ALH), Frequência de Batimento Flagelar em Hz (BCF), Índice de Retilinearidade em % (STR) e Índice de Linearidade em % (LIN).

¹ BotuSêmen, Botupharma, Botucatu, SP, Brasil

² *Computerized Assisted Semen Analysis* - CASA (HTM-IVOS 12; Hamilton-Thorne Research, Danvers, MA, USA)

Concentração Espermática – adotando-se a diluição 1:200, uma alíquota 50µL de sêmen *in natura* foi diluída em 9,95mL de solução formol-citrato 10%. Após homogeneização, cada retículo da câmara hematimétrica³ foi preenchido com esta solução, e os espermatozoides foram contados em microscópio óptico⁴ sob o aumento de 100X. Para cálculo da concentração, adotou-se a seguinte fórmula baseada em trabalhos anteriores (PAPA et al., 2011):

$$C = \frac{n}{\frac{1}{10} \times \frac{10}{25} \times \frac{1}{200}}$$

Onde:

C = Concentração espermática em 10⁶/mL

n = soma da contagem de espermatozoides dos dois retículos da câmara

1/10 = altura entre a lamínula e a câmara em mm

10/25: soma da contagem de espermatozoides de 5 quadrados do 1º retículo + 5 quadrados do 2º retículo (= 10) vezes a área do quadrado (= 1/25) em mm²

1/200 = diluição utilizada

O número total de espermatozoides (NTE) foi obtido a partir da multiplicação da concentração espermática pelo volume de ejaculado livre de gel, de acordo com o proposto pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998).

Morfologia Espermática – uma alíquota de 100µL ou uma quantidade suficiente de sêmen *in natura* para turvar 1000µL formol-citrato 10% em eppendorf. Depositava-se uma alíquota de 20µL da solução com 20µL de corante Rosa Bengala a serem homogeneizados entre lâmina e lamínula. A análise foi realizada em Microscópio de

³ Câmara de Neubauer

⁴ Microscópio OLYMPUS, modelo CH30, Japão.

Contraste de Fase, sob o aumento de 1000X com óleo de imersão, a partir da contagem de 200 células, seguindo os critérios de classificação adotados por Blom (1973).

EXAME ULTRASSONOGRÁFICO

Em cada período, os animais foram contidos fisicamente em bretes e, imediatamente antes da realização do procedimento de punção, realizou-se exame ultrassonográfico de cada testículo.

O sistema de ultrassom⁵ utilizado foi ajustado sob a frequência de onda de 7,5MHz, para melhor definição de imagem e deposição de carboximetilcelulose gel sobre a pele.

PROCEDIMENTO DE BIÓPSIA

Para o procedimento de biópsia, foi utilizada agulha tipo Tru-Cut semiautomática⁶, tamanho 18G x 15cm (Fig. 1). O modo de ação da agulha encontra-se ilustrado na Fig. 2.

O animal permaneceu no brete e foi contido farmacologicamente com Detomidina na dose $10\mu\text{mkg}^{-1}$, por via intravenosa (ENGLAND et al., 1992). Prosseguiu-se à antissepsia de toda a bolsa escrotal do animal com povidine degermante seguido de álcool iodado. Cada testículo a ser puncionado era tracionado ventrolateralmente e a agulha introduzida em local específico (Fig. 3).

⁵ Aparelho da marca MINDRAY®, modelo DP-2200, com transdutor eletrônico endorretal linear multifrequência 75L50EAV.

⁶ Fabricante Gallini S.R.I.; Itália.

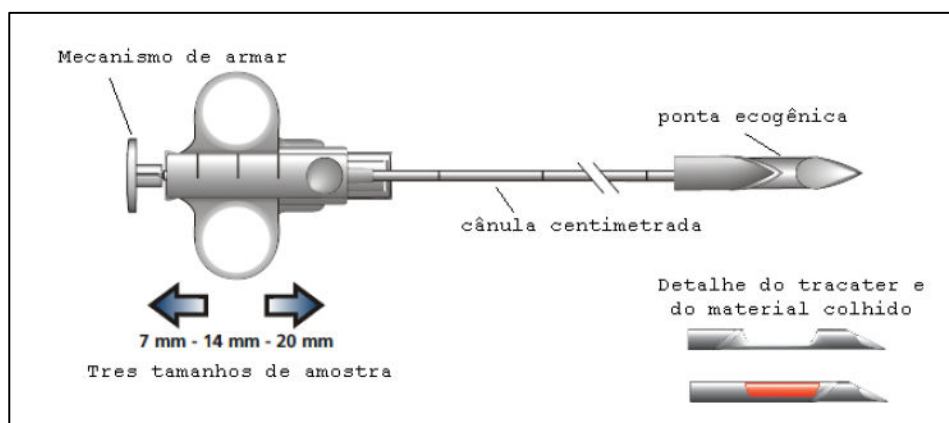


Fig. 1: Agulha tipo Tru-Cut semiautomática, tamanho 18G x 15cm.

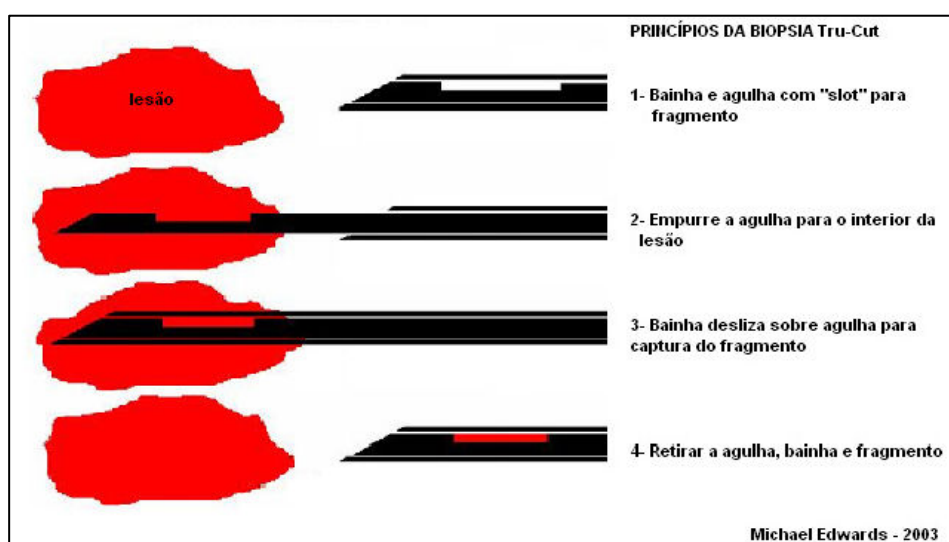


Fig. 2: Mecanismo de ação da agulha Tru-Cut.

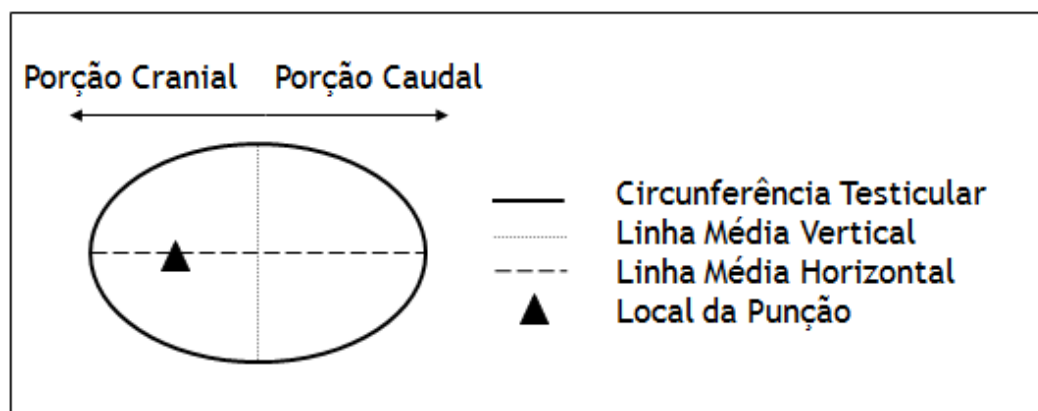


Fig. 3: Ponto de inserção da agulha Tru-Cut.

ORQUIECTOMIA

Transcorridos 30 dias da biópsia, cada animal foi orquiectomizado.

Utilizou-se a técnica de castração aberta para excisão dos testículos normais dos animais. Foi realizada adequada antissepsia do local com solução de povidine degermante e álcool. Os animais foram contidos farmacologicamente com acepromazina 1% (0,05 a 0,1mg/kg) e anestesia local, com infiltração no cordão espermático de 5 a 10mL de lidocaína 2% sem vasoconstritor (MASSONE, 2003) e posicionados em decúbito lateral, com o membro posterior superior fixado em flexão e abdução. Cada testículo foi firmado com uma das mãos de modo que a pele do escroto fosse firmemente esticada. Uma incisão de 7-10cm foi realizada através da pele e túnica dartos do escroto, paralela à rafe mediana, de modo a alcançar a túnica vaginal e permitir que o testículo e o epidídimo fossem expostos. O ligamento escrotal foi cortado com tesoura de dissecação, e o *mesorchium* cuidadosamente separado da túnica vaginal e do cordão espermático, procedendo-se à ligadura do cordão com fio absorvível e secção do mesmo. O coto e o mesorchium foram então verificados quanto à hemorragia (KERSJES; NÉMETH; RUTGERS, 1984).

Os testículos criptorquídicos foram removidos por criptorquidectomia inguinal. Uma incisão em torno de 10cm foi feita ao longo do anel inguinal externo através da pele e da fáscia escrotal. Procedeu-se à dissecação do tecido conjuntivo em direção ao canal inguinal. Nesta técnica, testículo e epidídimo podem ser encontrados adjacentes ao anel inguinal externo ou se localizarem no canal inguinal. A túnica vaginal é apreendida com uma pinça e feita incisão longitudinalmente. O testículo criptorquídico (geralmente muito menor que o testículo que desceu) e o epidídimo são expostos para fora da cavidade vaginal, e a castração semiaberta é então realizada. O cordão espermático, coberto pela túnica vaginal, é ligado e seccionado 2cm distal à ligadura. Atenta-se para possível hemorragia e, então, uma gaze estéril ou dreno de látex é colocado na ferida e a pele é fechada com ponto simples interrompido. O dreno é removido após 48 horas.

Após os procedimentos, as feridas cirúrgicas foram limpas com iodopovidona e protegidas com spray repelente para evitar presença de moscas no local.

A profilaxia de tétano e terapias antimicrobiana e anti-inflamatória foram realizadas em todos os animais.

PROCESSAMENTO DO MATERIAL

O material oriundo das punções e das peças cirúrgicas obtidas após a orquiectomia foi encaminhado para a análise histopatológica no Setor de Anatomia Patológica do Hospital Veterinário da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF). As amostras foram fixadas em formalina neutra tamponada a 10% por no mínimo 48 horas e, posteriormente, acondicionadas em histossetes devidamente identificados, submetidos ao processamento automático para inclusão em parafina, seguido da microtomia, coloração com Hematoxilina e Eosina (HE) e montagem das lâminas.

As lâminas foram avaliadas por microscopia óptica⁷, observando-se características morfológicas celulares e padrão tecidual da lesão.

Imagens fotográficas foram obtidas por câmera fotográfica digital⁸ acoplada ao microscópio.

ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO - ELISA (ENZIME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)

Antes do ensaio, foi realizada uma curva-padrão de diluição para determinar a titulação adequada de IgG anti-horse a ser utilizada no ensaio.

A realização do teste de ELISA consistiu no preparo e prosseguimento de diversas etapas, cada qual com soluções e procedimentos específicos. O protocolo utilizado para o experimento encontra-se descrito abaixo, discriminando cada etapa do processo.

⁷ Microscópio OLYMPUS BX41, modelo U-MDOB3, Japão

⁸ NIKON COOLPIX 995, Japão

MATERIAL UTILIZADO

1. ANTÍGENOS

Diante do fato das células espermáticas e o plasma seminal apresentaram abundante quantidade de proteínas específicas em suas composições, o experimento foi conduzido de forma a avaliar três vertentes que pudessem mostrar reações positivas para o ELISA. Para tanto, foram determinados três tipos de antígenos:

1.1 Sêmen Lavado – Contendo o máximo possível de proteínas das células espermáticas e o mínimo possível de proteínas do plasma seminal. Sêmen colhido (50mL) de garanhão indeterminado. Foi acrescentado volume equivalente de solução fisiológica (Ringer com Lactato – 50mL), estabelecendo-se a proporção 1:1 e apresentando volume final igual a 100mL. A mistura foi centrifugada a 4000G/10min e o sobrenadante descartado. Para lavagem da amostra, ao *pellet*, foi adicionado o mesmo volume final da primeira centrifugação (100mL) de Ringer com Lactato, sendo centrifugado novamente e o sobrenadante descartado, sendo o mesmo processo efetuado um total de quatro vezes. A intenção da lavagem do material foi manter o máximo de proteínas das células espermáticas e eliminar o máximo de proteínas não relacionadas oriundas do plasma seminal. Ao *pellet* final, foram adicionados 2mL de solução salina 0,85%, preparada em laboratório, procedendo-se à sonicação do material (20 ciclos de 30 segundos cada). O produto final foi então utilizado como o 1º antígeno.

1.2 Pool de Plasma Seminal – Contendo o máximo possível de proteínas do plasma seminal e o mínimo possível de proteínas das células espermáticas. O sêmen dos cinco animais utilizados no experimento foi misturado e armazenado a -20°C até o momento do ensaio imunoenzimático. O material foi centrifugado a 4000G/10min e o sobrenadante (plasma seminal) utilizado como 2º antígeno.

1.3 Sêmen Não-Lavado – Mantendo as quantidades de proteínas das células espermáticas e do plasma seminal desde a colheita de sêmen. O material (*pellet*) é oriundo da centrifugação do sêmen dos animais do experimento. Ao *pellet*, foi acrescentado plasma seminal (sobrenadante) na proporção de 1:3 (sêmen:plasma seminal). Procedeu-se à sonicação do material (20 ciclos de 30 segundos cada) e o produto final sonicado foi utilizado com 3º antígeno.

2. SOROS DOS GARANHÕES

Foram colhidos em dois momentos: o primeiro, no Período Pré-Biópsia; e o segundo, no Período Pós-Biópsia. Os sangues foram centrifugados a 4000G/10min e os soros, pipetados e armazenados em eppendorfs a -20°C.

3. CONTROLE POSITIVO

Para indução do controle positivo, uma alíquota de 0,5mL da amostra sonicada de sêmen não lavado foi inoculada, por via subcutânea (SC), em um equino, independente dos animais punccionados, quatro vezes em intervalos de 15 dias. Após 15 dias da última inoculação (SC), foi colhido sangue, e o soro obtido foi armazenado em eppendorfs a -20°C.

4. SOLUÇÕES-TAMPÃO

- I. Carbonato de Cálcio
- II. PBS gelatina

5. IgG ANTI-HORSE

O anticorpo IgG anti-horse, produzido em cabra, foi adquirido liofilizado do Laboratório Sigma Aldrich®, com apresentação em 2mg, armazenado em frasco âmbar. O conteúdo foi diluído em 2mL de água destilada para injeção (1mg/1mL).

Os protocolos utilizados e os procedimentos realizados seguem organizados na tabela a seguir:

ETAPAS	TITULAÇÃO DA CURVA PADRÃO	ELISA
DOSAGEM DE PROTEÍNAS		<p><u>Sêmen lavado</u> = 134,49 mg/mL</p> <p><u>Pool de plasma seminal</u> = 0,87 mg/MI</p> <p><u>Sêmen não lavado</u> = 54,60 mg/mL</p>
COATING e INCUBAÇÃO	Adicionados 100µL de tampão Carbonato de Cálcio. Incubação por 12 horas a 4°C	Estabelecido um total de 40µg/poço de dose proteica para cada antígeno + 100µL de tampão Carbonato de Cálcio. Incubação por 12 horas a 4°C
LAVAGEM	1X com 200µL/poço de solução de PBS 1% + TWEEN 20	1X com 200µL/poço de solução de PBS 1% + TWEEN 20
BLOQUEIO e INCUBAÇÃO	200µL/poço de PBS gelatina. Incubação por 1 hora e 30 minutos em temperatura ambiente	200µL/poço de PBS gelatina. Incubação por 1 hora e 30 minutos em temperatura ambiente
LAVAGEM	Solução de bloqueio desprezada e placa lavada 3X com 200µL/poço de solução de PBS 1% + TWEEN 20	Solução de bloqueio desprezada e placa lavada 3X com 200µL/poço de solução de PBS 1% + TWEEN 20

DILUIÇÃO SERIADA e INCUBAÇÃO		<p><u>1ª Linha:</u> 200µL (180µL PBS gel + 20µL soro)</p> <p><u>Demais linhas:</u> 100µL PBS gel/poço.</p> <p><u>Fator de diluição:</u> 1/3</p> <p><u>Diluição:</u> retiraram-se 50µL dos poços iniciais (1ª linha) que foram diluídos nos poços das linhas seguintes até o fim da placa.</p> <p>Incubação por 2 horas em temperatura ambiente.</p>
LAVAGEM		<p>Solução de diluição desprezada e placa lavada 3X com 200µL/poço de solução de PBS 1% + TWEEN 20</p>
SOLUÇÃO-CONJUGADO e INCUBAÇÃO	<p>Anticorpo IgG anti-horse diluído em PBS gel 1/10.000; 1/20.000; 1/30.000; 1/40.000 e 1/50.000.</p> <p>Incubação por 1 hora em temperatura ambiente.</p>	<p>Diluição 1/10.000 de 1µL IgG anti-horse em 10.000µL PBS gel.</p> <p>Incubação por 2 horas em temperatura ambiente.</p> <p>Incubação por 2 horas em temperatura ambiente.</p>
LAVAGEM	<p>Solução-conjugado desprezada e placa lavada 3X com 200µL/poço de solução de PBS 1% + TWEEN 20</p>	<p>Solução-conjugado desprezada e placa lavada 3X com 200µL/poço de solução de PBS 1% + TWEEN 20</p>

<p>SOLUÇÃO SUBSTRATO- CROMÓGENO</p>	<p><u>Fosfato de Sódio</u> (0,2M): 7,0 mL <u>Ácido Cítrico</u> (0,1M): 6,5 mL <u>H₂O₂</u> (3V): 11,5 mL OPD: 10 mg Incubação por 5 minutos em temperatura ambiente.</p>	<p><u>Fosfato de Sódio</u> (0,2M): 7,0 mL <u>Ácido Cítrico</u> (0,1M): 6,5 mL <u>H₂O₂</u> (3V): 11,5 mL OPD: 10 mg Incubação por 5 minutos em temperatura ambiente.</p>
<p>INTERRUPÇÃO DA REAÇÃO</p>	<p>Reação interrompida com ácido sulfúrico.</p>	<p>Reação interrompida com ácido sulfúrico.</p>
<p>LEITURA</p>	<p>Leitura realizada em aparelho computadorizado a partir da intensidade de cor gerada pelas reações (fotômetro).</p>	<p>Leitura realizada em aparelho computadorizado a partir da intensidade de cor gerada pelas reações (fotômetro).</p>

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os animais do estudo apresentavam-se com parâmetros reprodutivos dentro dos padrões fisiológicos ao longo do estudo. Dois dos quatro animais utilizados no ensaio eram criptorquidas unilaterais.

Ainda que a primeira colheita de sêmen (Colheita 1) tenha sido para a limpeza dos condutos espermáticos, e a segunda colheita de sêmen (Colheita 2) para a análise dos padrões espermáticos, os resultados de ambas encontram-se em concordância e sem discrepância dos valores normais encontrados na literatura (CBRA, 1998).

Os resultados encontram-se expostos nas Tabelas 2, 3, 4 e 5, podendo-se observar e comparar as colheitas por período e os períodos por colheita.

Tabela 2: Motilidade Total e Motilidade Progressiva de cada animal em cada coleta/período do estudo, Campos dos Goytacazes, 2013.

	Animal 1				Animal 2				Animal 3				Animal 4			
	Pré		Pós		Pré		Pós		Pré		Pós		Pré		Pós	
	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2
Motilidade Total	94	71	93	88	75	83	74	75	7	10	55	72	75	59	87	60
Motilidade Progressiva	54	49	56	64	51	57	41	40	1	2	22	32	43	29	2	35

Pré: Período Pré-Biópsia; Pós: Período Pós-Biópsia; C1: Colheita 1; C2: Colheita 2. Dados em %.

Tabela 3: Concentração e Número Total de Espermatozoides de cada animal em cada coleta/período do estudo, Campos dos Goytacazes, 2013.

	Animal 1				Animal 2				Animal 3				Animal 4			
	Pré		Pós		Pré		Pós		Pré		Pós		Pré		Pós	
	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2
Concentração	380	157	65	20	175	130	430	235	45	30	50	30	245	95	270	125
NTE	209000	2041	1365	300	1400	650	10750	3525	2250	2400	2750	600	15925	8740	7830	3000

Pré: Período Pré-Biópsia; Pós: Período Pós-Biópsia; C1: Coleta 1; C2: Coleta 2. Dados da Concentração em 10^6 /mL.

Tabela 4: Variáveis da Cinemática Celular obtidas por Análise Computadorizada (Hamilton Thorne), Campos dos Goytacazes, 2013.

	Animal 1				Animal 2				Animal 3				Animal 4			
	Pré		Pós		Pré		Pós		Pré		Pós		Pré		Pós	
	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2
VAP	97	82,2	79,1	77,6	75,1	74,7	76,9	69,2	29,8	32,6	48,5	53,3	76,8	54,7	78,7	81
VSL	69	63,8	58,2	60,8	61	56,2	55,8	51,1	22,9	21	36	38,8	55,7	40,9	58,5	59,3
VCL	184,5	158,7	146,9	143,7	123,9	135,9	140,6	119,9	41,9	73,6	109,6	109,1	147,7	107,1	147,4	154,4
ALH	8,1	7,2	7,1	7,3	5,7	6,6	6,6	5,7	7,1	5,3	6,7	6	7,3	6,6	6,9	7
BCF	23	24,5	22	23,9	23,2	19,8	25,9	17,5	33,2	23,5	35,4	26,8	22,6	23,7	25,5	27,7
STR	70	78	73	79	77	75	72	73	84	74	78	77	73	76	74	75
LIN	38	41	40	41	47	42	40	43	47	34	38	40	39	41	40	39

Pré: Período Pré-Biópsia; Pós: Período Pós-Biópsia; C1: Coleta 1; C2: Coleta 2; VAP: Velocidade Trajetória Média ($\mu\text{m/s}$); VSL: Velocidade Progressiva ($\mu\text{m/s}$); VCL: Velocidade Curvilínea ($\mu\text{m/s}$); ALH: Deslocamento Lateral de Cabeça (μm); BCF: Frequência de Batimento Flagelar (Hz); STR: Retilinearidade (%); LIN: Linearidade (%).

Tabela 5: Porcentagem da velocidade de deslocamento dos espermatozoides, Campos dos Goytacazes, 2013.

	Animal 1				Animal 2				Animal 3				Animal 4			
	Pré		Pós		Pré		Pós		Pré		Pós		Pré		Pós	
	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2
Rápido	93	65	87	82	70	80	68	66	3	5	35	53	67	45	81	53
Médio	2	5	6	6	5	3	7	9	5	5	19	18	8	14	5	7
Devagar	5	17	6	9	14	9	14	12	7	21	30	16	15	18	11	20
Estático	1	12	1	4	11	8	11	13	86	69	16	13	9	22	2	20

Pré: Período Pré-Biópsia; Pós: Período Pós-Biópsia; C1: Coleta 1; C2: Coleta 2.

Tabela 6: Porcentagem de Espermatozoides Normais, Defeitos Maiores, Defeitos Menores e Defeitos Totais encontrados nos ejaculados dos animais do estudo em cada colheita de cada período, Campos dos Goytacazes, 2013.

	Animal 1				Animal 2				Animal 3				Animal 4			
	Pré		Pós		Pré		Pós		Pré		Pós		Pré		Pós	
	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2	C1	C2
Normais	28	40	70,5	49	53,5	50,5	43,5	42	31	24	40	37	33	36	36	38,5
Maiores	18,5	9,5	11	25,5	14	19	41	40	42,5	40	17	24	18,5	12	15	25
Menores	53,5	50,5	18,5	25,5	32,5	30,5	15,5	18	26,5	36	43	39	48,5	52	49	36,5
Totais	72	60	29,5	60	46,5	49,5	56,5	58	69	76	60	63	67	64	64	61,5

Pré: Período Pré-Biópsia; Pós: Período Pós-Biópsia; C1: Coleta 1; C2: Coleta 2.

ANÁLISE ESPERMÁTICA

De acordo com os dados da Tabela 2, observou-se diferença acentuada entre os valores apenas no Animal 3. Sua baixa motilidade presente na colheita do Período Pré-Biópsia pode estar relacionada ao tempo prolongado de descanso reprodutivo, segundo histórico relatado pelo proprietário, o que pode ter acarretado deterioração das células espermáticas, levando-as à apoptose. Este fato pode ser confirmado pela maior porcentagem de células lentas ou estáticas no mesmo período observado.

Na Fig. 4, encontram-se ilustrados os valores das médias das Motilidades Total e Progressiva, respectivamente. Suspeitava-se que o trauma causado pela agulha no momento da punção sobre o parênquima testicular resultaria em diminuição das características seminais, porém, diante dos dados analisados, a biópsia com agulha Tru-Cut não causou alterações significativas desfavoráveis sobre a motilidade espermática.

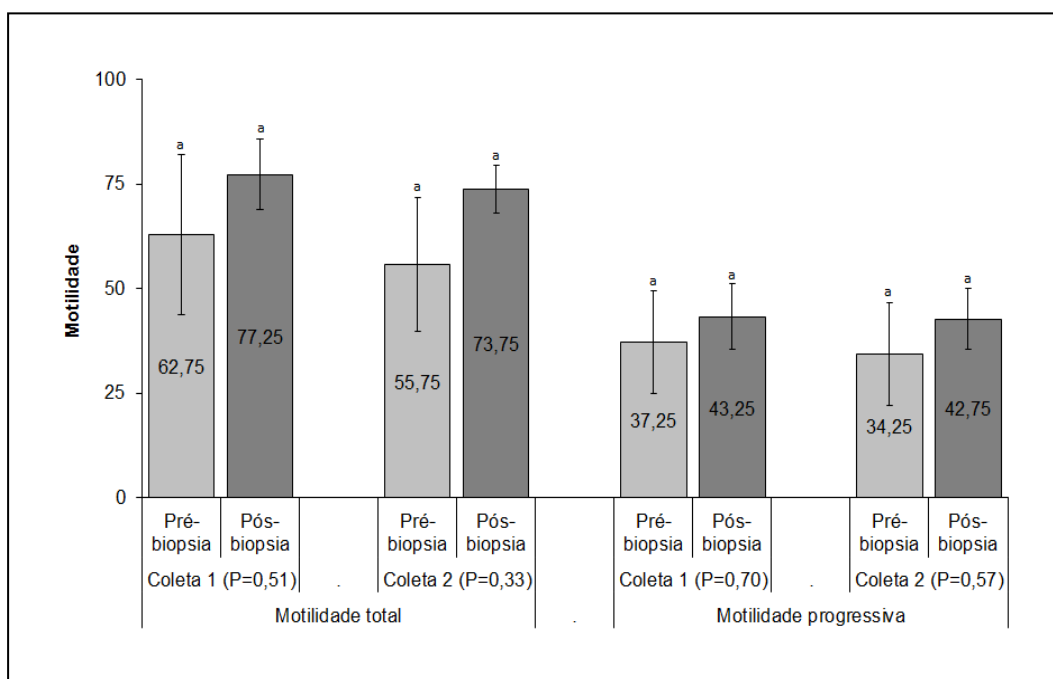


Fig. 4: Média da Motilidade Total e Motilidade Progressiva dos animais do estudo de acordo com cada coleta em cada período.

Os resultados das concentrações espermáticas analisadas (Tabela 3) não apresentaram discrepância quando comparados os Períodos Pré-Biópsia e Pós-Biópsia (Fig. 5). Os dados em sua totalidade mostraram-se dentro dos padrões dispostos na literatura (CBRA, 1998), com exceção do Animal 3 que, apesar de ter apresentado baixo valor em sua concentração espermática, a mesma manteve-se equilibrada entre os períodos. Já o Número Total de Espermatozoides (NTE) apresentou variações em todas as colheitas e períodos, visto que o mesmo depende do volume ejaculado pelo garanhão em cada colheita.

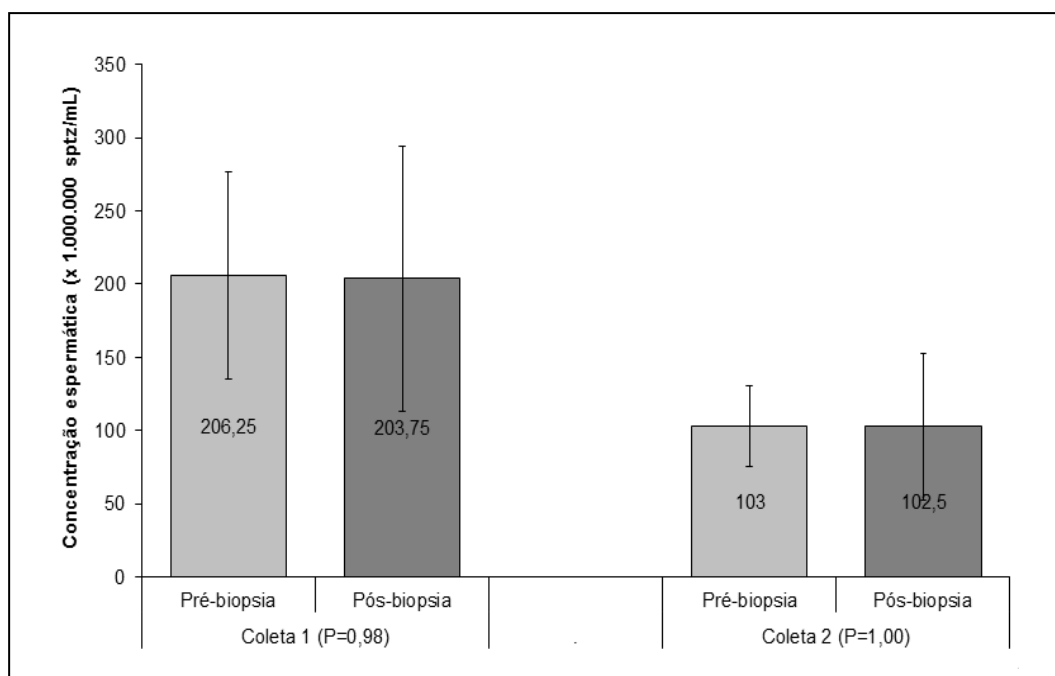


Fig. 5: Média da Concentração Espermática dos animais do estudo de acordo com cada coleta em cada período.

A partir da média obtida, pode-se dizer que, apesar das variações entre colheitas e períodos, e ainda o valor apresentado pelo Animal 3, não foi observada diferença estatística significativa, comprovando que a ação da biópsia não interferiu na produção espermática, corroborando os achados de Sartori et al. (2002a), ao realizarem biópsia testicular em ovinos.

A cinemática das células espermáticas compreendeu a mensuração das seguintes variáveis: VAP (Velocidade de Trajetória Média), VSL (Velocidade Progressiva), VCL (Velocidade Curvilnear), ALH (Deslocamento Lateral de Cabeça), BCF (Frequência de Batimento Flagelar), STR (Retilinearidade), LIN (Linearidade). Na Tabela 4, verificou-se que, em todas as variáveis, ocorreu ligeira variação entre as colheitas em cada animal, porém, não foram constatadas diferenças estatísticas significativas (Figs. 6, 7, 8 e 9).

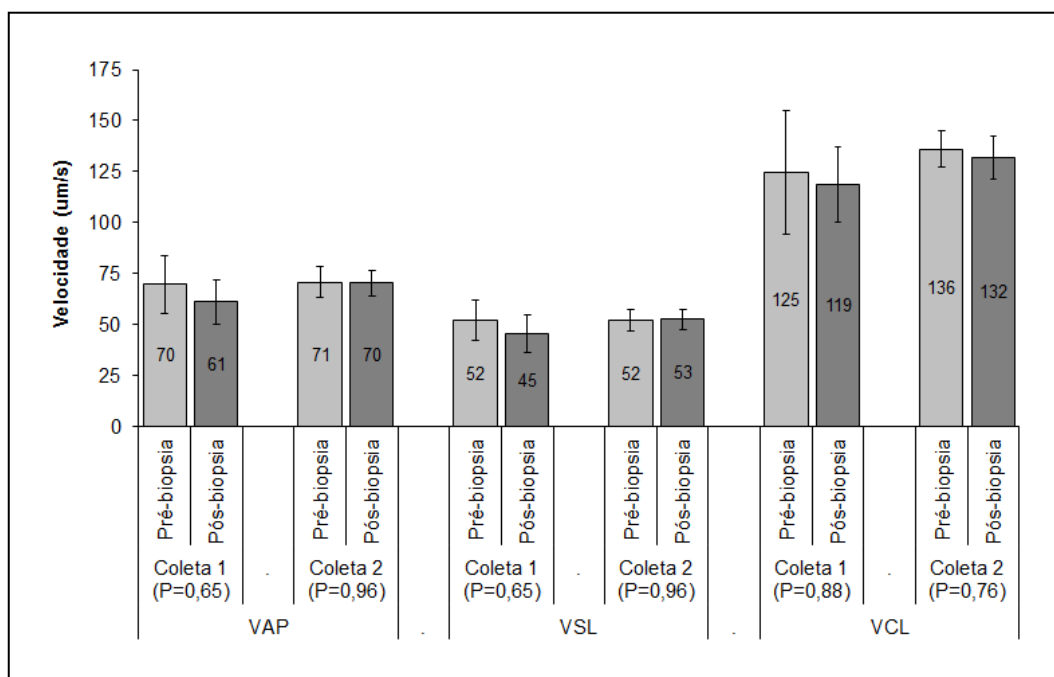


Fig. 6: Média das Velocidades mensuradas (VAP, VSL e VCL) de acordo com cada coleta de cada período.

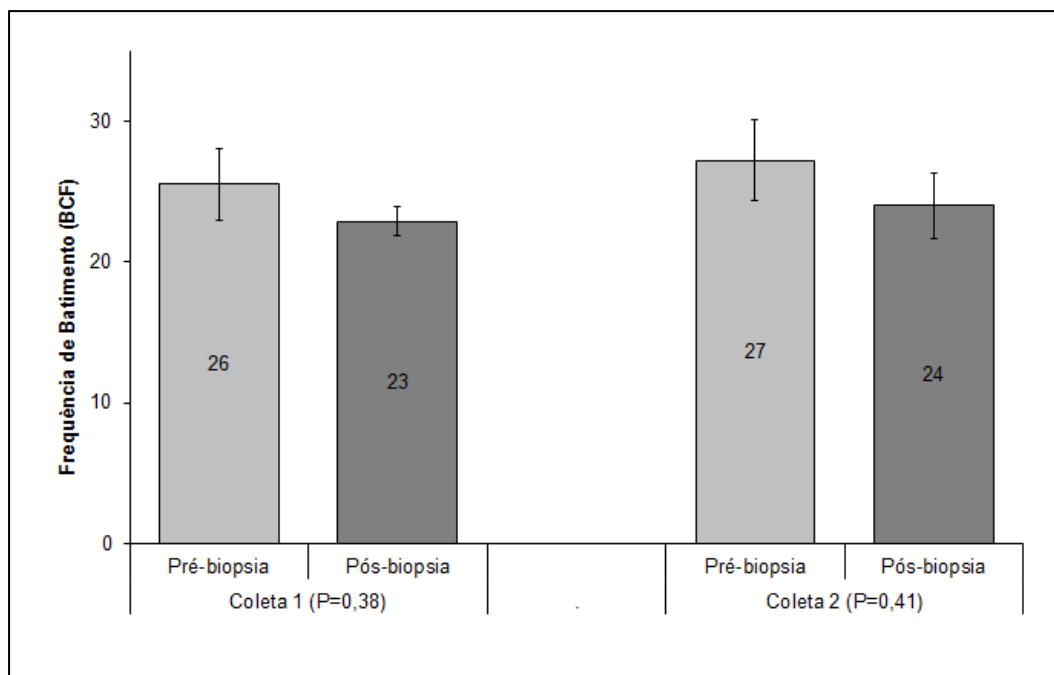


Fig. 7: Média da Frequência de Batimento Flagelar de acordo com cada coleta de cada período.

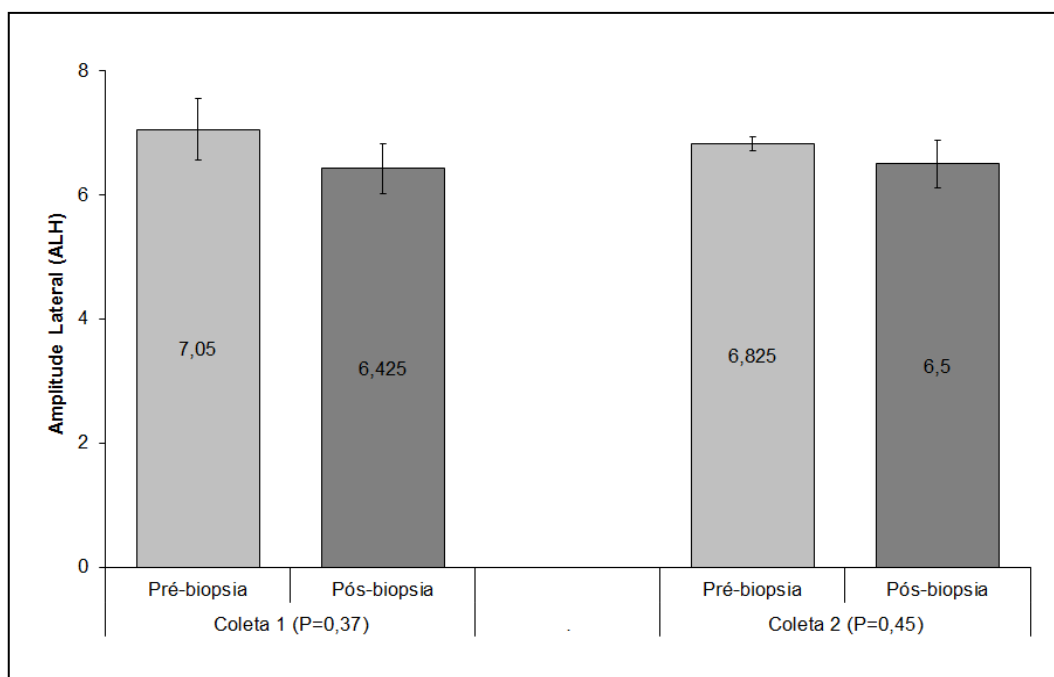


Fig. 8: Média da Amplitude Lateral de acordo com cada coleta de cada período.

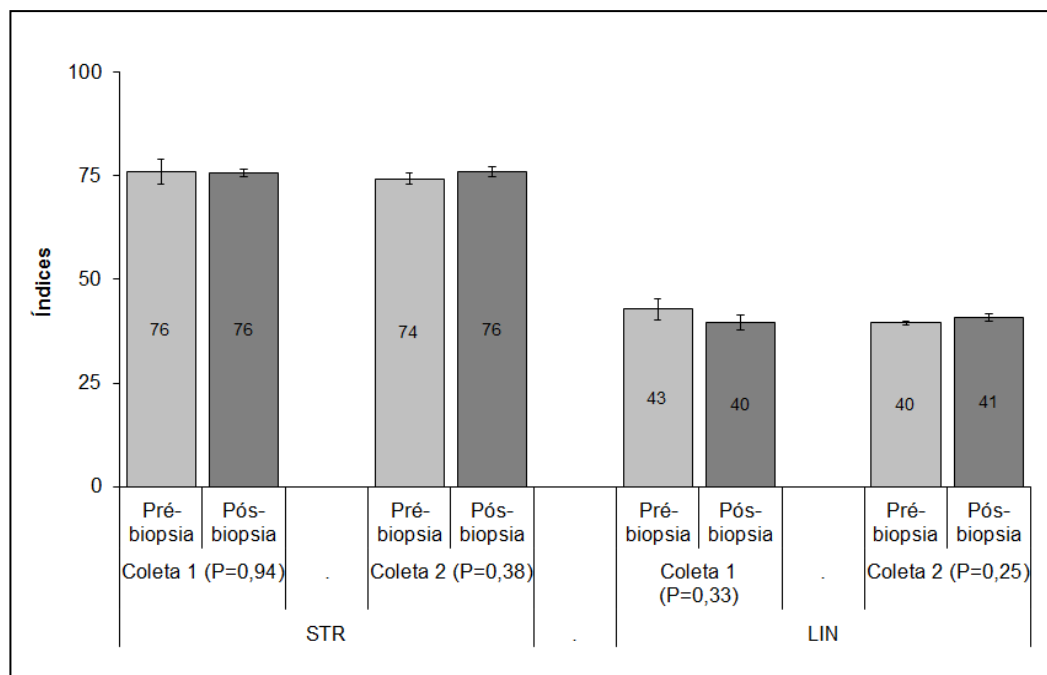


Fig. 9: Média dos Índices de Retilinearidade (STR) e Linearidade (LIN) de acordo com cada coleta de cada período.

As análises referentes à Morfologia Espermática foram baseadas na classificação de Blom (1973), considerando Defeitos Maiores, Menores e Totais. A Tabela 6 mostra a porcentagem de defeitos encontrada em cada animal e, na Figura 10, observa-se o gráfico que descreve a média obtida relativa a cada classificação dos defeitos.

Três dos quatro animais avaliados apresentaram maior número de defeitos maiores no Período Pós-Biópsia, com resultados iguais ou superiores ao tolerado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998) (25,5%). Estes dados concordam com os achados de Freitas et al. (2010), quando avaliaram os parâmetros fisiológicos e seminiais de garanhões Mangalarga Marchador, no decorrer das estações climáticas, e também encontraram mais de 25% de defeitos maiores em determinada estação do ano.

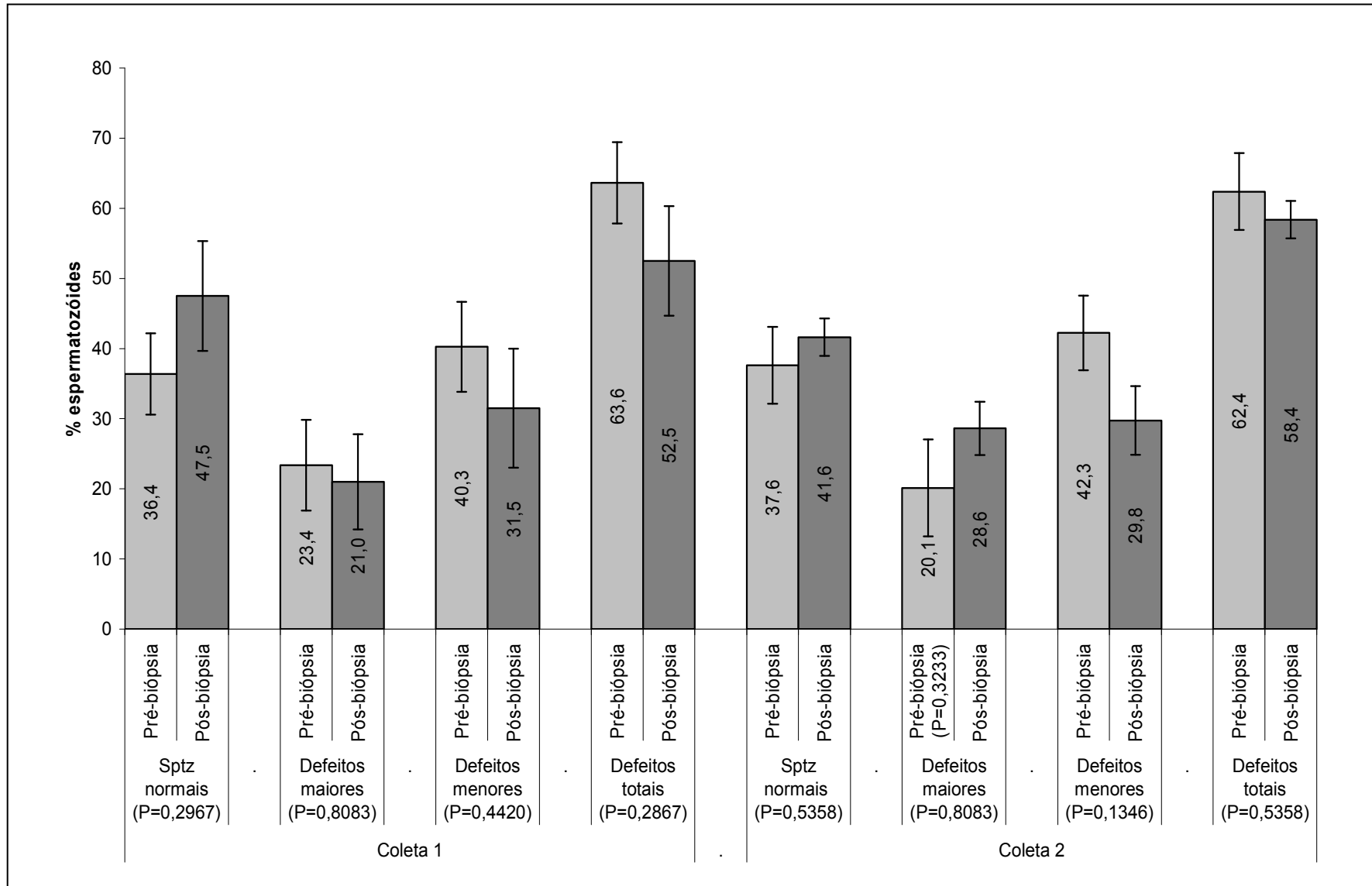


Fig. 10: Média dos Espermatozoides Normais, Defeitos Maiores, Defeitos Menores e Defeitos Totais encontrados nos ejaculados dos animais do estudo em cada colheita de cada período.

ULTRASSONOGRRAFIA TESTICULAR

No Período Pré-Biópsia, após as duas colheitas de sêmen, cada animal foi contido fisicamente em brete e, imediatamente antes da realização do procedimento de punção, realizou-se exame ultrassonográfico de cada testículo, avaliando-se o padrão de ecogenicidade e verificando-se a presença de possíveis lesões pré-biópsia. Já no Período Pós-Biópsia, os animais foram contidos igualmente e objetivou-se buscar e avaliar possíveis lesões causadas pela punção.

Ginther (1986) considera a ultrassonografia o maior avanço tecnológico no âmbito da pesquisa em reprodução animal, porém, embora seja uma excelente alternativa como exame complementar, ainda é pouco utilizada em machos (POZOR, 2005; FREITAS et al., 2010).

Para melhor condução do exame ultrassonográfico, alguns padrões de avaliação devem ser pré-estabelecidos a fim de minimizar erros causados pelo examinador. Assim, com base no trabalho de Del Vento et al. (1992) que, ao utilizarem transdutor de 5,0 MHz, falharam em identificar lesões testiculares após biópsia de cinco equinos, assim, elegeu-se a utilização de transdutor 7,5 MHz visando obter imagem de alta resolução em vista de o tamanho da lesão provocada ser reduzido.

A finalidade do estudo ultrassonográfico se ateve a pesquisar possíveis lesões presentes no parênquima testicular. Para tanto, o exame realizado no Período Pré-Biópsia buscou verificar, previamente, se os animais já apresentavam desordens patológicas para que as mesmas não causassem erro, durante o segundo exame após 30 dias do procedimento de punção, levando a um resultado falso-positivo.

Não foram verificadas lesões testiculares prévias nos quatro animais utilizados.

O exame foi conduzido de forma longitudinal, sagital e vertical em cada testículo, em ambos os períodos.

Além do parênquima testicular, foram avaliados o cordão espermático e o epidídimo, de forma a ampliar o exame andrológico. O parênquima mostrava-se

com ecogenicidade-padrão de forma homogênea, de acordo com o descrito por Freitas (2010), e todas as estruturas anatômicas mostravam-se preservadas.

Durante a ultrassonografia testicular no Período Pós-Biópsia de cada animal, foi possível observar uma linha hiperecogênica na gônada direita do Animal 1, sugerindo a formação de tecido fibroso no trajeto de incisão da agulha. Nos outros animais, foram observados pontos ligeiramente hiperecogênicos, também sugerindo formação de tecido fibroso. Porém, lesões, tais como, calcificação, hematomas, ou ainda sinais de inflamação, como acúmulo de líquido, não foram verificados. Estes dados divergem dos achados de alguns autores.

Sartori et al. (2002a) que trabalharam com ovinos, avaliando lesões ultrassonográficas, macroscópicas e histológicas também após procedimento de biópsia com agulha Tru-Cut, verificaram lesões cálcicas no parênquima testicular, além de formações lineares hipocogênicas extratesticulares, demonstrando pequeno derrame de líquido entre as túnicas, resultados semelhantes aos achados de Eilts et al. (1989), embora discretas formações lineares hipocogênicas possam ser observadas em testículos normais (AHMAD et al., 1991).

Outros autores, conduzindo os estudos 30 dias após lesão testicular, igualmente ao presente trabalho, também observaram presença de calcificação e líquido, apesar de não terem observado presença de sombra acústica durante o exame (EILTS et al., 1989; AHMAD; NOAKES, 1995).

Harrington et al. (1996) propuseram prognosticar fertilidade mediante biópsia testicular percutânea com agulha Tru-Cut em homens que apresentavam varicocele. Em seus resultados, verificaram que ocorreu hemorragia em 7% dos casos estudados, caracterizada por imagem hipocogênica na região puncionada. Já no presente trabalho, não foram verificadas lesões semelhantes em nenhum animal avaliado.

Em vista de trabalhos anteriores, constatou-se que, a partir da biópsia realizada com agulha Tru-Cut calibre 18G, não foram verificadas lesões no parênquima testicular dos equinos estudados. Vale ressaltar que o calibre utilizado colhe material com tamanho extremamente reduzido, fato que pode favorecer o não reconhecimento das lesões durante o exame ultrassonográfico, porém, no caso de

novos estudos a serem conduzidos utilizando agulha com maior calibre, ultrassonografias também devem ser realizadas.

ANÁLISE HISTOLÓGICA

A utilização da agulha Tru-Cut vem ganhando um espaço cada vez mais amplo e rápido no âmbito da pesquisa. As dimensões do material colhido conferem enorme vantagem à técnica, caracterizando-a como menos invasiva e lesiva. Vantagens como avaliações de fertilidade/subfertilidade, diagnóstico de neoplasias, acompanhamento de casos de oligospermia ou azoospermia podem ser alcançadas com o advento desta técnica (JUARÉZ-ALBARRAN et al., 2007; CARPI et al., 1999).

Assim, com base em trabalhos recentes que buscaram averiguar a representatividade do material oriundo de biópsia testicular em outras espécies, como ovinos (SARTORI et al., 2002a) e humanos (JUARÉZ-ALBARRAN et al., 2007), o presente trabalho visou verificar o quanto o procedimento afetaria a espermatogênese do garanhão e se o material colhido com a agulha permitiria conduzir a análise histológica adequadamente.

O local da punção foi baseado no protocolo utilizado por Leme e Papa (2010), que justificaram haver menor vascularização no ponto determinado, situado ao centro da porção cranial sobre a linha média horizontal de cada testículo (Figura 3).

Em todos os materiais colhidos com agulha Tru-Cut, apesar de oferecerem pouca área para análise devido ao reduzido tamanho, foi possível verificar perfeita disposição dos túbulos seminíferos com a espermatogênese ativa em todos, sendo possível também observar mais de um estágio de diferenciação celular. Verificou-se ainda, de forma clara, o arranjo das Células de Sertoli (ou Sustentaculares) e das Células de Leydig (ou Intersticiais). Sartori et al. (2002a), comparando as biópsias com agulha Tru-Cut e aberta em testículos ovinos, relataram que a aberta conferiu melhor aparência histológica, porém, a acurácia do diagnóstico com Tru-Cut não foi afetada. Assim, pode-se confirmar que esta técnica oferece material viável para análise histológica como já anteriormente comprovado (ABREU et al., 2011).

Na literatura, outros pesquisadores comprovaram a representatividade da técnica de biópsia utilizando a agulha Tru-Cut. Abdelrahim et al. (1993) realizaram

punções testiculares em humanos antes e depois de varicocelectomia, e diante dos resultados encontrados, foi possível conduzir adequado exame histológico em que puderam avaliar a diminuição da espermatogênese com a parada da maturação celular, o desprendimento do epitélio espermatogênico e o aumento das células de Leydig, o engrossamento da membrana basal tubular e das paredes dos vasos intersticiais com o estreitamento do lúmen, além de aumento da deposição de tecido fibroso intersticial.

Harrington et al. (1996), também realizando punções em humanos, compararam a biópsia com agulha Tru-Cut com a biópsia aberta da forma convencional, e verificaram que, em todos os materiais colhidos, a histologia não foi prejudicada pelo tamanho do material.

No Período Pós-Biópsia deste estudo, os animais passaram por exame clínico-reprodutivo e, à palpação, não foram verificadas alterações na simetria, consistência e mobilidade de cada testículo. Diante do exame clínico-reprodutivo, os animais foram avaliados ultrassonograficamente e orquiectomizados 30 dias após o procedimento de punção. A partir das peças cirúrgicas (gônadas), foram colhidos espécimes de parênquima testicular no mesmo local onde havia sido realizada a punção.

Diferentemente do trabalho de Sartori et al. (2002a) que encontraram lesões macroscópicas de calcificação distrófica nas peças frescas e fixadas, neste trabalho, apenas, nos Animais 1 e 4, foram verificadas lesões macroscópicas no trajeto da punção, características de derrame sanguíneo, as quais não foram possíveis de serem visualizadas durante o exame ultrassonográfico. Diante deste fato, supõe-se que a reação tecidual não apresentou dimensões significativas possíveis de serem visualizadas somente pela ultrassonografia, devido ao tamanho do fragmento colhido. Outros trabalhos também verificaram hematocisto como consequência da punção, ocorrendo em poucos casos em cada estudo, além de terem sido solucionados após determinado período de tempo do procedimento (HARRINGTON et al., 1996; CHAN et al., 2000) tão logo se pôde suspeitar que o hematocisto provocado pela agulha, nos testículos dos animais deste experimento, seria solucionado com maior tempo após a biópsia.

Na análise histológica do material oriundo das peças cirúrgicas, foram observados pequenos focos de lesão característicos de fibrose no parênquima testicular do Animal 4. Ainda assim, diante dos resultados dispostos na Tabela 2, é possível verificar que, apesar de a formação de tecido fibroso ser um processo irreversível, a espermatogênese não foi afetada, sendo este fato corroborado pelas análises estatísticas que mostraram não haver diferença significativa das variáveis frente aos períodos estudados. Já no material pertencente aos outros três animais, não foram verificadas lesões histológicas no parênquima testicular. Estes dados divergem dos achados de Sartori et al. (2002a), nos quais o procedimento provocou lesões focais, observando túbulos seminíferos atrofiados e desorganizados, e os mais severamente degenerados apresentaram-se com redução do diâmetro dos túbulos seminíferos e grandes espaços entre eles, algumas vezes, com fibrose peritubular, caracterizando total perda de células germinativas, restando apenas células de Sertoli.

Os mesmos autores relataram a presença de calcificação como outra lesão encontrada após punção, apesar de não terem verificado comprometimento nas características estruturais e seminais dos testículos.

Segundo Veeramachaneni et al. (1986), a deposição destes minerais pode estar relacionada com o acúmulo de espermatozoides mortos ou degenerados que obstruem os túbulos seminíferos. No presente trabalho, não foram observadas lesões cálcicas em nenhum material estudado, transcorridos 30 dias do procedimento de biópsia, assim, pode-se sugerir que estas lesões não foram encontradas provavelmente pelo reduzido tamanho do material colhido, com o qual não provocou lesões significativamente extensas, também sem provocar alto nível de morte celular e, conseqüentemente, formação de cristais minerais depositados no interior dos túbulos.

Os locais distantes do trajeto da punção, em todos os animais, mostraram-se livres de lesões macro e microscópicas. Os túbulos seminíferos encontravam-se adequadamente organizados e com atividade celular normal, e isto pode confirmar que não houve interferência negativa do procedimento de punção sobre a espermatogênese em nenhum estágio de diferenciação e maturação celular.

Diversos estudos são conduzidos em espécies diversas. Bovinos e ovinos se apresentam como as espécies mais problemáticas diante das biópsias testiculares, talvez pela fragilidade e alta vascularização da túnica albugínea que possuem e, por isso, hemorragias e outras lesões podem ser mais facilmente encontradas, ocorrendo durante e após a punção (GALINA, 1971; OLIVEIRA FILHO et al., 1984; LOPATE et al., 1989; McENTEE, 1990; SARTORI et al., 2002b;). Estudos e literatura sobre biópsia testicular, direcionados à espécie equina, ainda são muito escassos. Desta forma, a técnica com agulha Tru-Cut nesta espécie se apresenta como uma inovação, a qual necessita de mais estudos a fim de averiguar dados mais aprofundados, como por exemplo, o melhor calibre de agulha e averiguação das consequências encontradas, em diferentes tempos pré-determinados, após a realização do procedimento.

As pranchas contendo imagens histológicas testiculares, oriundas das punções e das peças cirúrgicas de cada animal, nos Períodos Pré e Pós-Biópsia, encontram-se ilustradas no ANEXO 1.

ENSAIO IMUNOLÓGICO

O procedimento de biópsia caracterizado pela retirada de um fragmento de tecido, seja ele patológico ou não, é considerado um procedimento cirúrgico. E como tal, acarreta consequências que podem trazer desvantagens ao tecido puncionado.

O parênquima testicular é formado por uma complexa rede de túbulos seminíferos onde são produzidas as células espermáticas, a *rete testis*. Neste parênquima, é possível notar a presença de uma barreira (barreira hematotesticular) a qual protege as células espermáticas, impedindo que as mesmas, além de solutos, atravessem do interior para o exterior do lúmen tubular.

Durante a biópsia testicular, seja ela aberta ou fechada (por punção – Tru-Cut), ocorre a ruptura da barreira hematotesticular. Assim, suspeita-se que, a partir do momento em que as células espermáticas alcançam os humores corporais e entram em contato com os elementos circulantes do sistema imune, estimulam as células B e T a induzir resposta imune, produzindo anticorpos antiespermatozoides, visto que as células espermáticas são produzidas a partir da puberdade do macho,

após a completa formação do sistema imunológico do indivíduo (DEMESHEK, 1966; CREWE et al., 1977; ROCHA, 2005).

Assim sendo, buscou-se verificar se a ruptura da barreira hematotesticular provocada pela agulha Tru-Cut acarretaria a produção de anticorpos específicos contra espermatozoides, visto que, em caso afirmativo, tal procedimento de diagnóstico poderia levar à infertilidade do macho examinado.

A partir da curva-padrão realizada, para determinação da titulação, a ser utilizada no Teste de ELISA (1:10.000), deu-se início aos procedimentos do ensaio imunológico.

Diante do protocolo estabelecido, não foram observadas reações que comprovassem a formação de anticorpos frente aos antígenos utilizados, fato que confere segurança na técnica de biópsia com agulha Tru-Cut, permitindo sua utilização em animais de alto custo, sem que acarrete a inviabilidade do animal.

Nas Figuras 11, 12 e 13, encontram-se as titulações nas placas do ensaio imunológico referente a cada antígeno.

Foi possível verificar que, em todos os antígenos utilizados, o Controle Positivo (C (+)) se apresentou com titulação semelhante ou maior que os soros dos animais biopsados, isto sugere a hipótese de que não houve diferença entre os soros dos dois períodos analisados, podendo conferir vantagem à técnica de biópsia com agulha Tru-Cut.

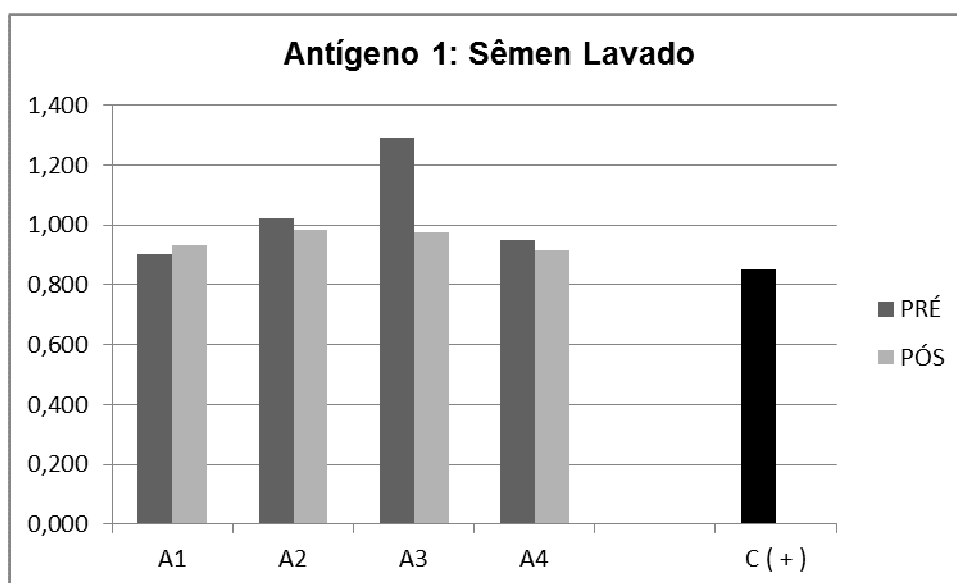


Fig. 11: Demonstração da Titulação de Anticorpo atingida com Antígeno 1.

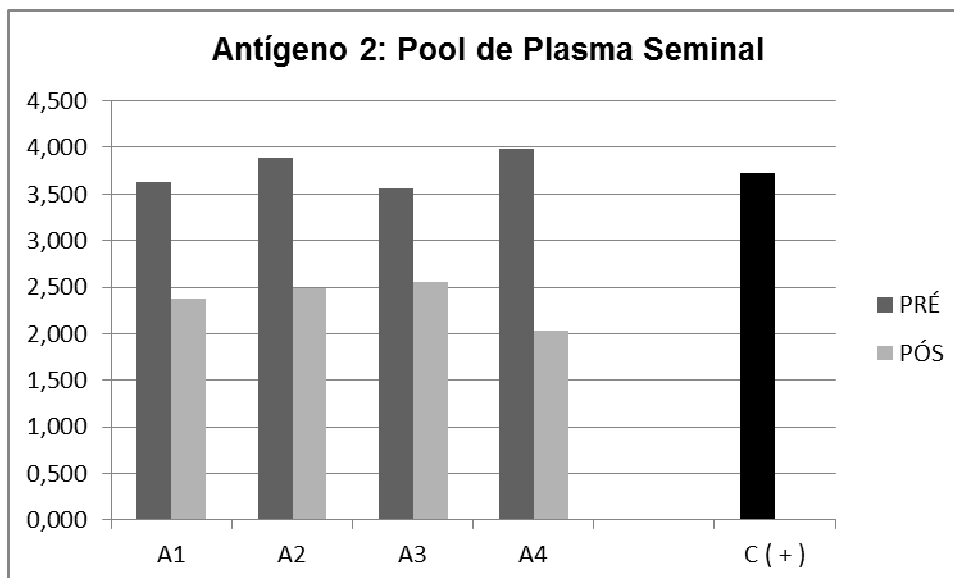


Fig. 12: Demonstração da Titulação de Anticorpo atingida com Antígeno 2.

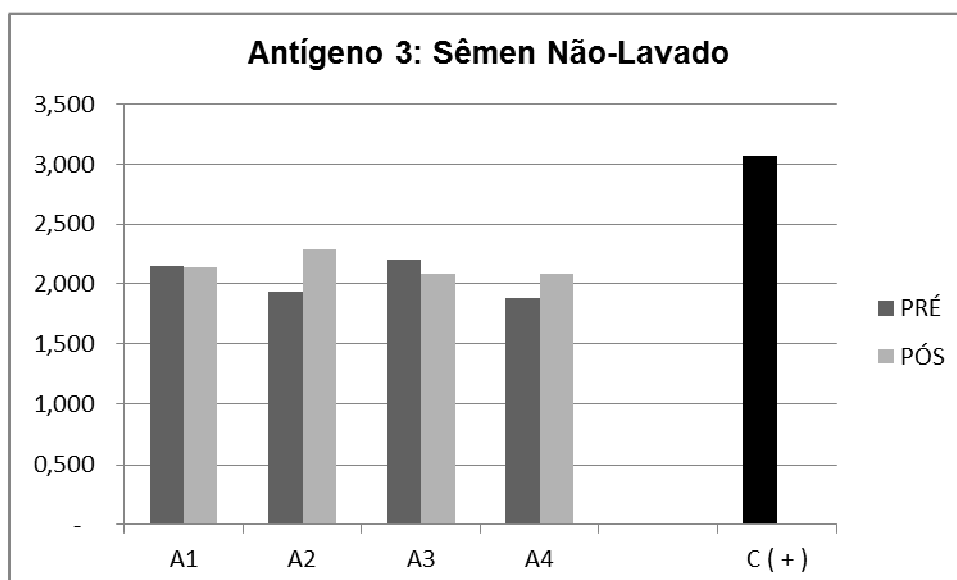


Fig. 13: Demonstração da Titulação de Anticorpo atingida com Antígeno 3.

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para cada Colheita (1 e 2) e para cada Período (Pré-Biópsia e Pós-Biópsia), foram calculadas as médias e erros-padrão das variáveis: Motilidade Total, Motilidade Progressiva, Concentração Espermática, Velocidade de Trajetória Média, Velocidade Progressiva, Velocidade Curvilínea, Deslocamento Lateral de Cabeça, Frequência de Batimento Flagelar, Retilinearidade e Linearidade. Em cada colheita, foram comparadas as médias entre os períodos, por meio do teste t de Student, sendo apresentadas as significâncias das comparações (valores de P). As análises estatísticas foram realizadas no aplicativo Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG, versão 9.1), adotando-se o nível de 5% de significância.

Quanto ao teste de Elisa, foram apresentados os valores individuais por animal (1 a 4) e por período (Pré e Pós-Biópsia).

No que se refere à morfologia espermática, foram obtidas as médias das frequências por tipo de morfologia (espermatozoides normais, com defeitos maiores, menores e totais de defeituosos), de acordo com a colheita (1 e 2) e por período (Pré e Pós-Biópsia). As médias dos períodos, estratificadas por tipo de morfologia e colheita foram comparadas pelo teste t de Student, adotando-se o nível de 5% de probabilidade.

CONCLUSÕES

A biópsia testicular com agulha Tru-Cut, calibre 18G, não alterou/prejudicou as características seminais de equinos.

Os materiais obtidos com a agulha apresentaram-se viáveis para a adequada análise histológica.

O exame ultrassonográfico permitiu identificar pequenas lesões sugestivas de tecido fibroso, confirmadas posteriormente durante a análise histológica.

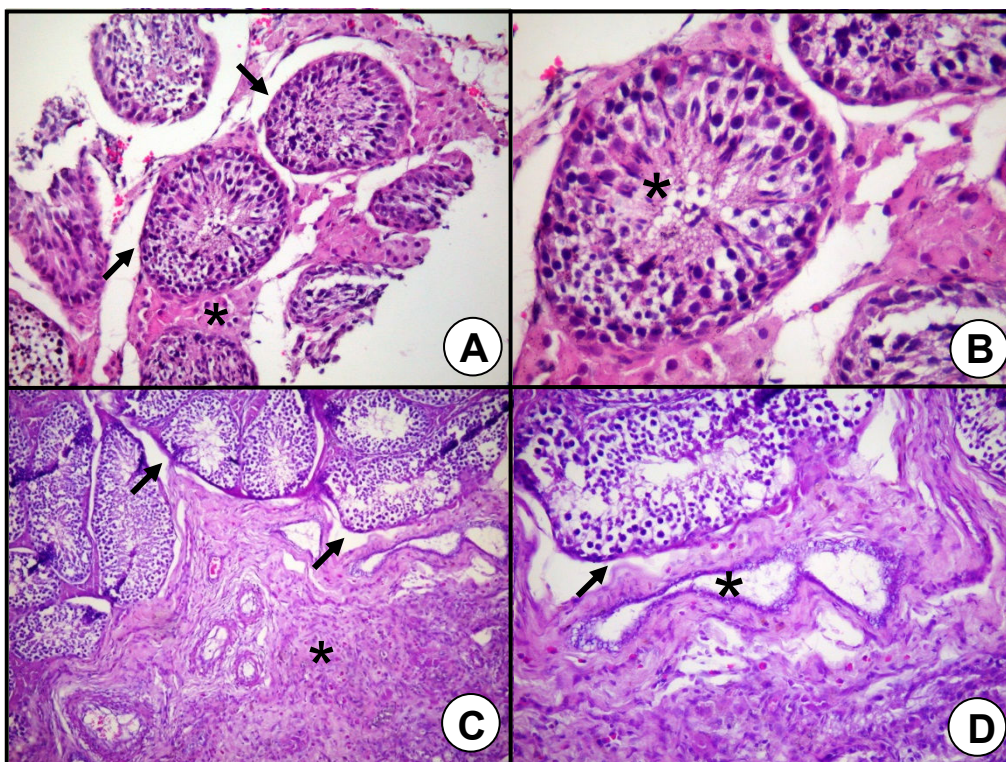
Lesões de hematoma observadas macroscopicamente, após a orquiectomia, não foram verificadas no exame ultrassonográfico.

Na análise histológica das peças cirúrgicas após a orquiectomia, não foram observadas lesões microscópicas no sítio de punção em três dos quatro animais ensaiados.

A técnica pode ser considerada segura, já que o ensaio imunoenzimático (ELISA) não sugeriu a formação de anticorpos antiespermatozoides nos soros dos animais utilizados.

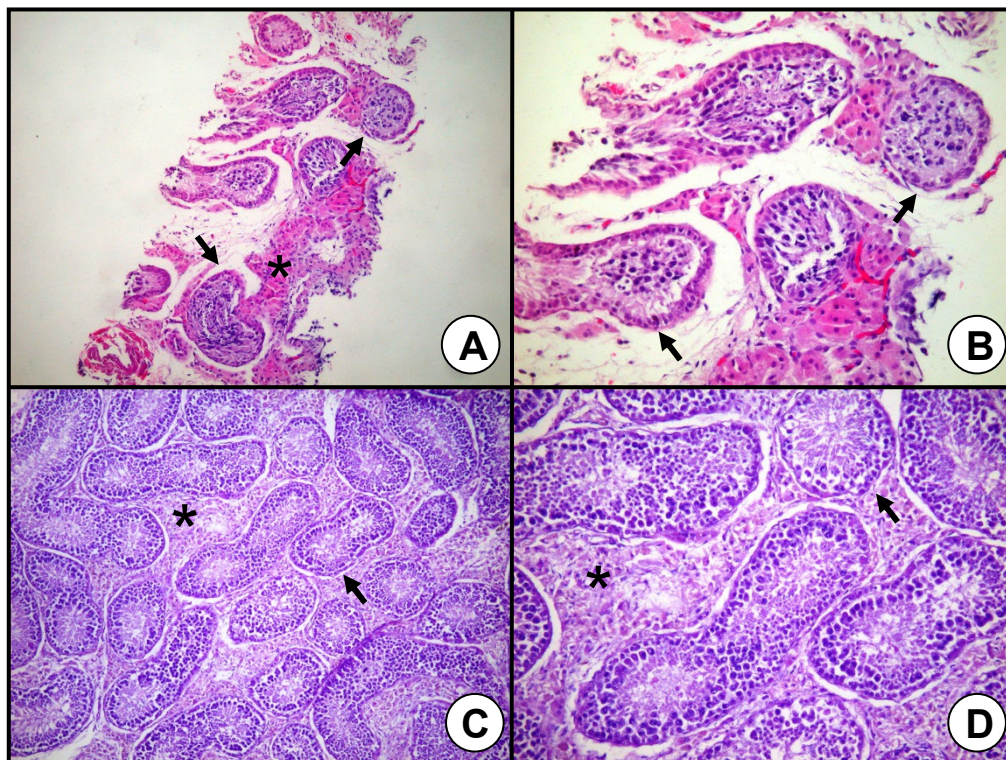
APÊNDICE

PRANCHA ANIMAL 1



PRANCHA ANIMAL 1: Fotomicrografia de amostra testicular equina obtida com Agulha Tru-Cut: **A** - Observam-se túbulos seminíferos (setas) e células intersticiais endócrinas (de Leydig) (*). H/E, obj. 10X. **B** - Ampliação da imagem anterior onde se verifica túbulo seminífero com diversos estágios da espermatogênese (*). H/E, obj. 20X. **Fotomicrografia de amostra testicular equina oriunda de Peça Cirúrgica:** **C** - Numerosos túbulos seminíferos (setas) associados a depósito de tecido conjuntivo fibroso (*). H/E, obj, 10X. **D** - Ampliação da imagem anterior onde se verificam espermatogênese ativa (seta) e túbulo seminífero degenerado, contendo somente as células sustentaculares ou Células de Sertoli (*). H/E, obj. 20X.

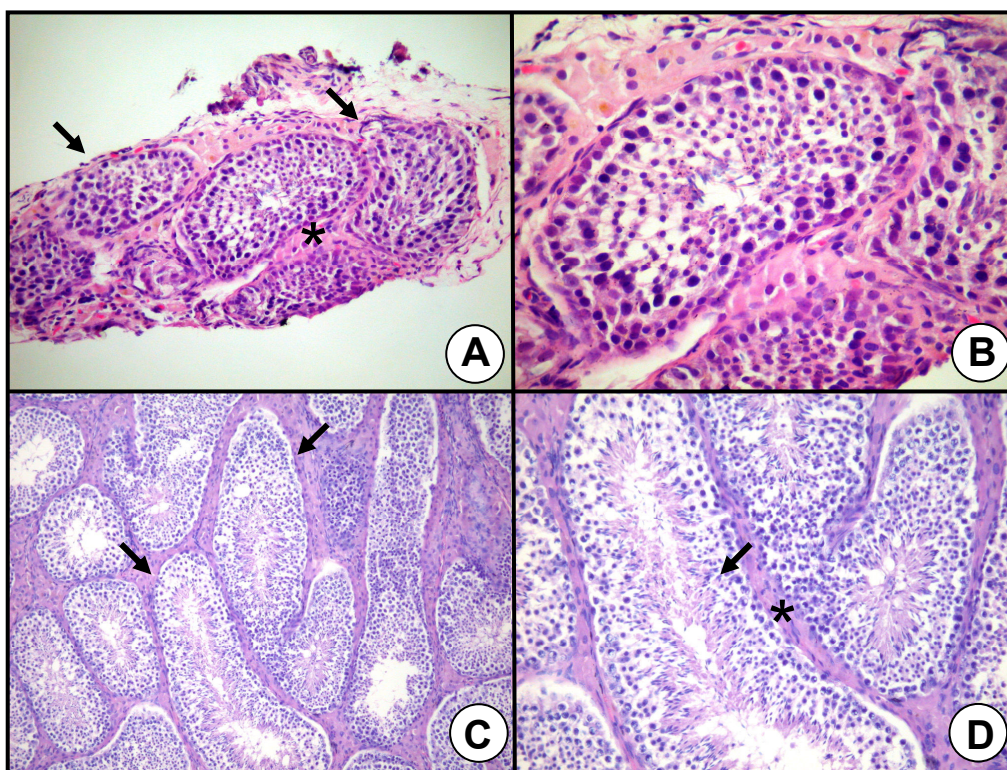
PRANCHA ANIMAL 2



PRANCHA ANIMAL 2: Fotomicrografia de amostra testicular equina obtida com Agulha Tru-Cut: **A** - Observam-se túbulos seminíferos (setas) e células intersticiais endócrinas (de Leydig) (*). H/E, obj. 4X. **B** - Ampliação da imagem anterior onde se verificam túbulos seminíferos (seta). Entre os túbulos, tecido conjuntivo com células intersticiais do testículo (de Leydig) (*) H/E, obj. 10X.

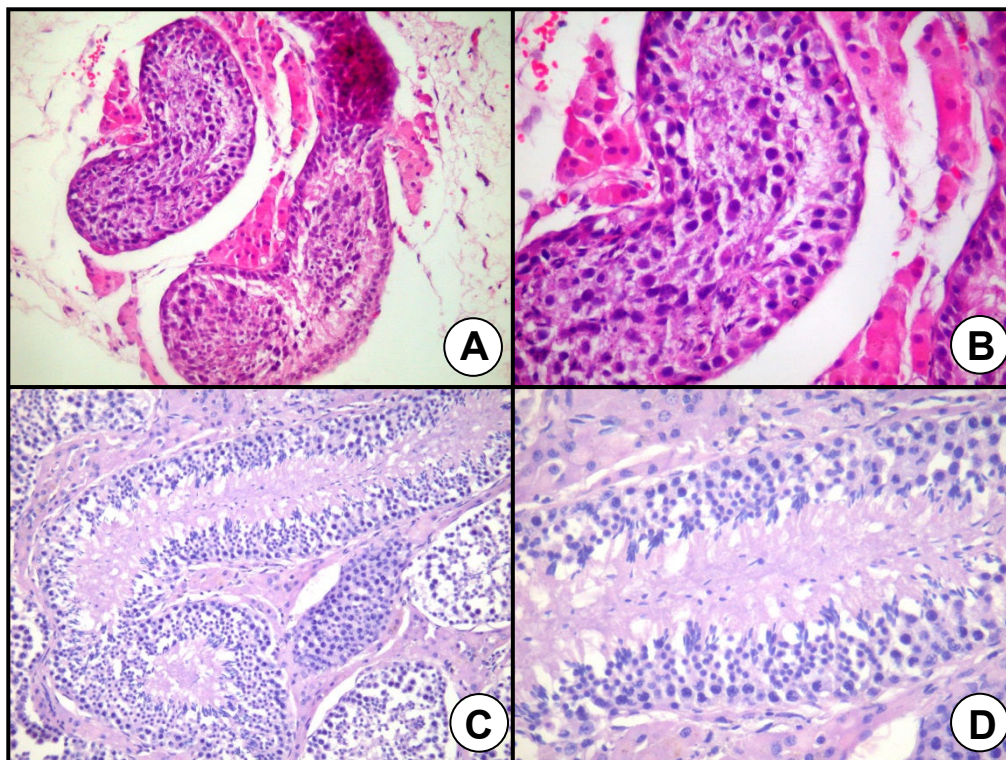
Fotomicrografia de amostra testicular equina oriunda de Peça Cirúrgica: **C** – Numerosos túbulos seminíferos (setas) e células de Leydig (*). H/E, obj, 4X. **D** – Ampliação da imagem anterior onde podem ser vistos os túbulos seminíferos e as células intersticiais (de Leydig) (*). H/E, obj. 10X.

PRANCHA ANIMAL 3



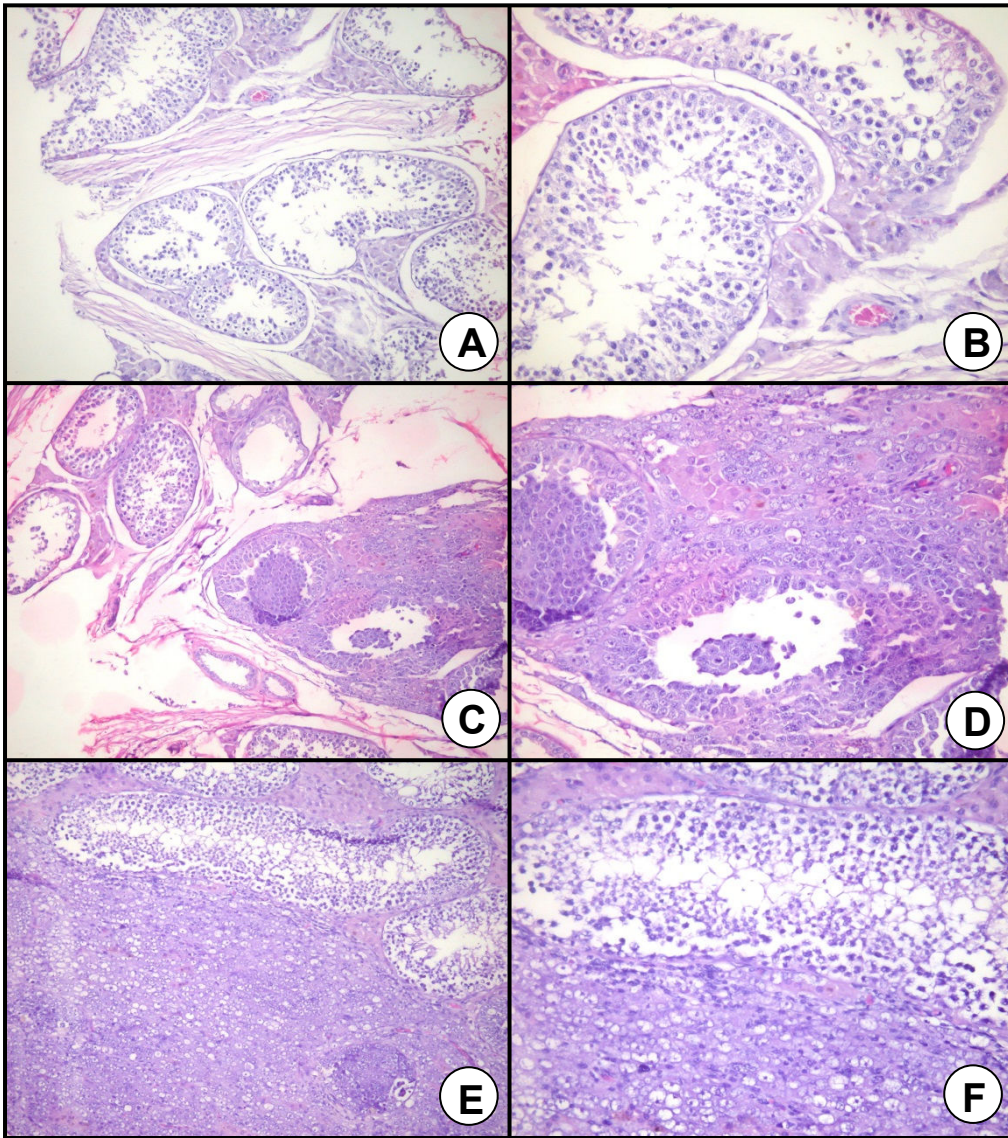
PRANCHA ANIMAL 3: Fotomicrografia de amostra testicular equina obtida com Agulha Tru-Cut: **A** - Observam-se túbulos seminíferos (setas) com espermatogênese ativa e células intersticiais endócrinas (de Leydig) (*). H/E, obj. 10X. **B** - Ampliação da imagem anterior onde se verifica túbulo seminífero com diversos estágios da espermatogênese (*). H/E, obj. 20X. **Fotomicrografia de amostra testicular equina oriunda de Peça Cirúrgica:** **C** – Numerosos túbulos seminíferos (setas). H/E, obj, 10X. **D** – Ampliação da imagem anterior onde se verificam espermatogênese ativa (seta) e células intersticiais endócrinas (de Leydig) (*). H/E, obj. 20X.

PRANCHA ANIMAL 4



PRANCHA ANIMAL 4: Fotomicrografia de amostra testicular equina obtida com Agulha Tru-Cut: **A** - Observam-se túbulos seminíferos (setas) com espermatogênese ativa e células intersticiais endócrinas (de Leydig) (*). H/E, obj. 20X. **B** - Ampliação da imagem anterior onde se verifica túbulo seminífero com diversos estágios da espermatogênese (*). H/E, obj. 40X. **Fotomicrografia de amostra testicular equina oriunda de Peça Cirúrgica:** **C** – Numerosos túbulos seminíferos (setas). H/E, obj, 20X. **D** – Ampliação da imagem anterior onde se verificam espermatogênese ativa (seta) e células intersticiais endócrinas (de Leydig) (*). H/E, obj. 40X.

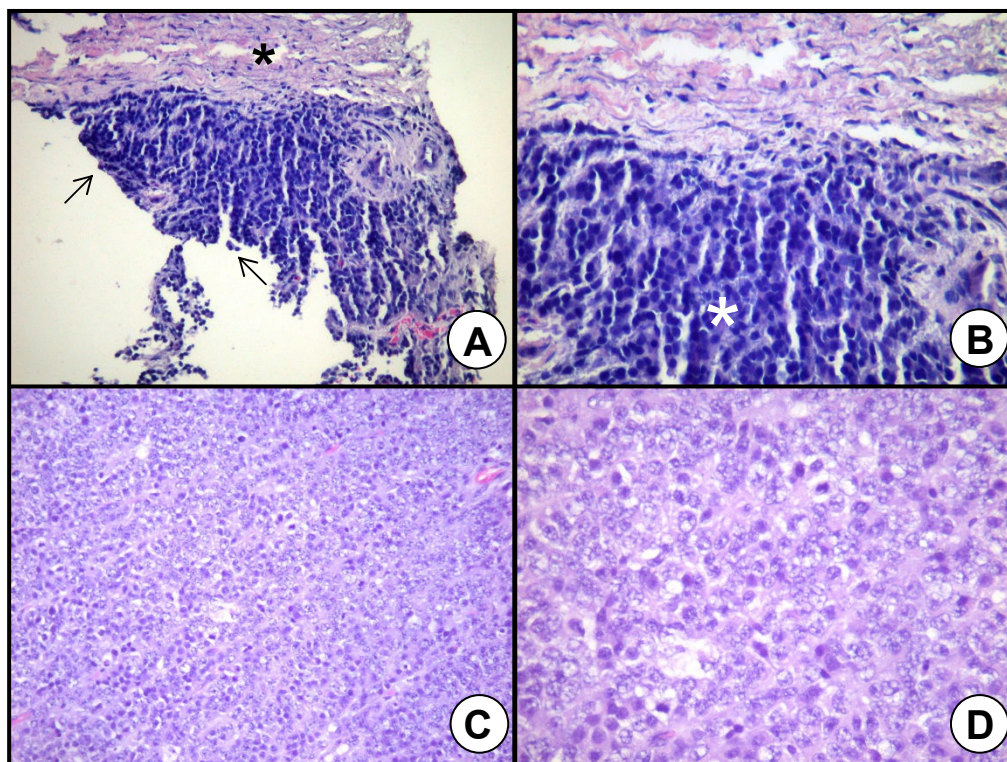
PRANCHA ANIMAL 5
TESTÍCULO DIREITO



PRANCHA ANIMAL 5 - TESTÍCULO DIREITO: Fotomicrografia de amostra testicular equina obtida com Agulha Tru-Cut: A - Observam-se túbulos seminíferos (setas) e células intersticiais endócrinas ou Células de Leydig (*). H/E, obj. 10X. **B** - Ampliação da imagem anterior onde se verifica túbulo seminífero com diversos estágios da espermatogênese (*). H/E, obj. 20X. **C** – Observam-se numerosas células germinativas neoplásicas no interior de túbulo seminífero (seta) ao lado de túbulo seminífero regular (*). H/E, obj.10X. **D** – Ampliação da imagem anterior onde podem ser vistas grandes células redondas contendo escassos citoplasmas e grandes núcleos com nucléolos singulares e proeminentes (*). H/E, obj.20X.

Fotomicrografia de amostra testicular equina oriunda de Peça Cirúrgica: E – Numerosas células redondas da linhagem germinativa demonstrando intenso hipercromatismo (seta). Acima, verifica-se túbulo seminífero regular com espermatogênese ativa. H/E, obj.10X. **F** – Ampliação da imagem anterior demonstrando numerosas células arredondadas hipercromáticas e com nucléolos evidentes (seta), caracterizando o seminoma. H/E, obj.20X.

PRANCHA ANIMAL 5
TESTÍCULO ESQUERDO



PRANCHA ANIMAL 5 – TESTÍCULO ESQUERDO: Fotomicrografia de amostra testicular equina obtida com Agulha Tru-Cut: **A** - Observam-se células arredondadas com núcleos centrais e hiper cromáticos (setas), sugestivas de neoplasia testicular. Túnica albugínea (*). H/E, obj.20X. **B** - Ampliação da imagem anterior onde se observam células arredondadas com escasso citoplasma e núcleos redondos hiper cromáticos e centralmente localizados (*). H/E, obj.40X. **Fotomicrografia de amostra testicular equina oriunda de Peça Cirúrgica:** **C** - Neoplasia testicular composta por células germinativas redondas com alta razão nuclear/citoplasmática. H/E, obj.20X. **D** - Maior aumento da imagem anterior onde se verificam células arredondadas demonstrando mitoses frequentes. H/E, obj.40X.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELRAHIM, F.; MOSTAFA, A.; HAMDY, A.; MABROUK, M.; EL-KHOLY, M.; HASSAN, O. Testicular morphology and function in varicocele patients: pre-operative and postoperative histopathology. **Brazilian Journal of Urology**, v. 72, n. 5, pt. 1, p. 643-647, 1993.

ABREU, R.G. **Coleta de amostra de ovário para biópsia com agulha Tru-Cut em éguas**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2010.

ABREU, R.G.; SILVA, J.F.S.; CARVALHO, E.C.Q.; SHIMODA, E. Técnica comparativa de biópsia ovariana em éguas. **PUBVET**, ed, 173, art. 1165, v. 5, n. 26, 2011.

AHMAD, N.; NOAKES, D.E. A clinical and ultrasonographic study of induced testicular and epididymal lesions in goats and a ram. *Animal Reproduction Science*, v. 39, p. 35-48, 1995.

AHMAD, N.; NOAKES, D.E.; SUBANDRIO, A.L. B-mode real time ultrasonographic imaging of the testis and epididymis of sheep and goats. *Vet. Rec.*, v. 128, p. 491-496, 1991.

BARUSELI, P. **Compêndio de Reprodução Animal**. Intervet, p.125-164, 2007.

BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D. Evaluating breeding soundness in stallions: Hormonal assay and testicular biopsy. **Veterinary Medicine**, v. 91, p. 358-365, 1996.

BLOM, E. Pathological conditions in the genital organs and in semen as ground for rejection of breeding bulls for import or export to and from Denmark. **Nordisk Veterinarian Medicin**, v. 35, p. 105-130, 1973.

BONNET, B.N. et al. Endometrial biopsy in Holstein-Friesian dairy cows II: Correlations between histological criteria. **Canadian Journal Veterinary Research**, v. 55, n. 2, p. 162-167, 1991.

CARPI, A.; MENCHINI, F.; GORINI, L.I.; GAETA, P.; ROMANI, R.; MARCHETTI, A. A percutaneous large-needle aspiration biopsy technique for histologic examination of the testis in infertile patients – Techniques and instrumentation. – *Fertility and Sterility*, v. 71, n. 4, p. 756-760, 1999.

CHAN, P.T.K.; SCHIEGEL, P.N. Diagnostic and Therapeutic Testis Biopsy. **Current Urology Reports**, v. 1, p. 266-272, 2000.

COCHRAN, J.S. Immunobiology of reproductive processes in men. Current concepts. **Urology**, v. 4, p. 367-377, 1974.

COHEN, M.S.; FRYE, S.; WARNER, R. S. et al. Testicular needle biopsy in diagnosis of infertility. **Urology**, v. 24, p. 439-442, 1984.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL – CBRA. **Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal**, Belo Horizonte, 2ª ed, 49p., 1998.

CREWE, O.; DAWSON, L.; BARNES, R.D.; TIDMASH, E.; CHANARIN, I.; HJORT, T. INGERSLEV, J. Lack of association of the development of anti-sperm antibodies and other autoantibodies as a consequence of vasectomy. **Int. J. Fertil.**, v. 22, n. 2, p. 104-109, 1977.

CUNHA, G.N. **Estudo da viabilidade do uso da punção biópsia aspirativa por agulhas fina comparada ao da “tru-cut”, em testículos de cães**. Tese de Doutorado – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal - SP, 2009.

EILTS, B.E.; PECHMAN, R.D.; TAYLOR, H.W. et al. Ultrasonographic evaluation of induced testicular lesions in male goats. **American Journal Veterinary Research**, v. 50, p. 1361-1364, 1989.

ENGLAND, G.C.W. et al. A comparison of the sedative effects of three alpha-2 adrenoceptor agonist (romifidine, detomidine and xylazine) in the horse. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 15, p. 194-201, 1992.

FOSTER, R.A.; LUDDS, P.W. Male Genital System. In: **Jubb, Kennedy, and Palmer's Pathology of Domestic Animals**. Saunders/Elsevier, Philadelphia, Ed. Maxie MG, 5^a ed., v. 3, p. 565-619, 2007.

GALINA, C.S. An evaluation of testicular biopsy in farm animals. **Veterinary Records**, v. 88, p. 628-631, 1971.

GINTHER, O.J. Ultrasonic imaging and reproductive events in the mare. Wisconsin, Cross Plains, 371p., 1986.

GOLDENERG, E. Infertility in female rabbits immunized with lactate dehydrogenase X. **Science**, v. 181, 458p., 1973.

OLIVEIRA FILHO, E.B.; FRANCESCHINI, P.H.; CARDOSO, V.L.; SANTOS, H.S.L.; BECHARA, G.H. Observações preliminares sobre biópsia de testículo em touros Gir (Preliminary observations of testicular biopsy in Gir bulls). In: **Proceedings of the 39th Encontro de Pesquisas Veterinárias**, Jaboticabal, 39p., 1984.

HARRINGTON, T.G.; SHAUER, D.; GILBERT, B.R. Percutaneous testis biopsy: an alternative to open testicular biopsy in the evaluation of the subfertile men. **Journal of Urology**, v. 156, n. 5, p. 1647-1651, 1996.

HENSLEIGH, H.C.; JAVKIN, P.D.; TAGATZ, G.E. Evaluation for antiesperm antibodies after storage of sperm in TEST-yolk buffer. **Fertility and Sterility**, v. 66, p. 454-458, 1996.

HJORT, T.; HUSTED, S.; LINNET-JEPSEN, P. The effect of testis biopsy on autosensitization against spermatozoal antigens. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 18, p. 201-212, 1974.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTIA – IBGE. **Produção da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro, v. 38, p. 1-65, 2010.

JOHNSON, L.; BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; SCRUTCHFIELD, W.L. Factors affecting spermatogenesis in the stallion. **Theriogenology**, n. 48, p. 1199-216, 1997.

JOHNSON, L.; VARNER, D.D.; ROBERTS, M.E; SMITH, T.L.; KEILLOR, G.E.; SCRUTCHFIELD, W.L. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. **Theriogenology**, n. 60, p. 471-80, 2000.

LEMBRUGER, I.; LOJA, C. Esterilidade de causa imunológica. In: TOGNOTTI, E.; PINOTTI, J. A. **A esterilidade na prática: da propedêutica básica à reprodução assistida**. Editora Roca, São Paulo, p. 317-323, 1997.

LEME, D.P.; PAPA, F.O. How to perform and interpret testicular fine needle aspiration in stallions. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 30, n. 10, 2010.

LEVIN, H.S. Testicular biopsy in the study of male infertility: Its current usefulness, histologic techniques, and prospects for the future. **Hum. Pathol.**, v. 10, p. 569-584, 1979.

LOPATE, C.; THRELFALL, W.R.; ROSOL, T.I. Histopathologic and gross effects of testicular biopsy in the dog. **Theriogenology**, v. 32, p. 585–602, 1989.

LOPATE, C.; THRELFALL, W.R.; ROSOL, T.I. Histopathologic and gross effects of testicular biopsy in the dog. **Theriogenology**, v. 32, p. 585-602, 1989.

MADAR, J.; URBANNECK, V.; CHALOUPKOVA, A.; NOUZA, K.; KINSKY, R. Role of sperm antibodies and cellular autoimmunity to sperm in the pathogenesis of male infertility. **Ceska Gynecol.**, v. 67, n. 1, p. 3-7, 2002.

MASCARENHAS, R.M.; REGO DE PAULA, T.A.; JÚNIOR, M.C.; RIBEIRO, E.C.S.; BORBOLETA, L.R.; MATTA, S.L.P. Efeitos da Biópsia Incisional Testicular sobre o Rendimento Intrínseco da Espermatogênese e Índices de Células de Sertoli em Cães, **Revista Ceres**, v. 53, n. 305, p. 107-112, 2006.

MASSONE, F. Atlas de Anestesiologia Veterinária. São Paulo, Ed. Roca, 172p, 2003.

McENTEE, K. Scrotum, spermatic cord, and testis: degenerative and inflammatory lesions. In: **Reproductive Pathology of Domestic Animals**. Academic Press, San Diego, CA, p. 252–278, 1990.

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

MONTEIRO, G.A. et al. Colheita e preservação de células espermáticas de garanhões recuperados da cauda do epidídimo. **Vet. e Zootec.**, v. 16, n. 3, p. 448-458, 2009.

NASCIMENTO, E.F.; SANTOS, R.L. **Patologia da Reprodução dos Animais Domésticos**. Editora Guanabara Koogan S.A., 2Ed, Rio de Janeiro, p. 93-104, 2003.

OLSON, P.N.; SCHULTHEISS, P.; SEIM III, H.B. Clinical and laboratory findings associated with actual or suspected azoospermia in dogs: 18 cases (1979-1990). **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 201, p. 478-482, 1992.

PARDO, F.J.D.; ASSIS, E.R.; MIYAZAWA, M.K.; BORGES, L.H.A.; LEME, D.P. Avaliação da Espermatogênese pela Citologia Aspirativa por Agulha Fina (Caaf) em Testículos de Cordeiros Pré-Púberes. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 4, 2005.

POZOR, M. Diagnostic applications os ultrasonography to stallion's reproductive tract. *Theriogenology*, v. 64, p. 505-509, 2005.

ROCHA, F.B.M. **Evolução e perfil de anticorpos antiespermatozóides nos 180 dias em indivíduos vasectomizados**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará, 2005.

ROSENBLATT, C.; FILHO, M.A.D.; DELGADO, D.R.; DELGADO, F.R. Infertilidade Masculina – Novos Conceitos. **Prática Hospitalar**. Ano XII, n. 71, 2010.

ROSER, J.F. Reproductive endocrinology of the stallion. In J.C. Samper (Ed.), **Equine breeding management and artificial insemination**. Missouri: Saunders ELSEVIER. 2ª ed., p. 17-31, 2009.

RUSSELL, L.D.; GRISWOLD, M.D. The Sertoli Cell. **Cache River Press**, Clearwater, Florida, 801p., 1993.

SAMPER, J.C.; PYCOCK, J.F.; MCKINNON, A.O. **Current Therapy in Equine Reproduction**, Elsevier Inc., 494p, 2007.

SARTORI, R.; PRESTES, N.C.; CANAVESSI, A.M.O.; KEMPINAS, W.G.; ROSA, G.J.M. Avaliações ultra-sonográfica, macroscópica e histológica da biópsia testicular em ovinos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 54, n. 3. Belo Horizonte, 2002a.

SARTORI, R.; PRESTES, N.C.; CANAVESSI, A.M.O.; CURI, P.R.; BERGFELT, D.R. Testicular biopsy with Tru-Cut needle in conjunction with fibrin adhesive or nylon

suture: assessment of post-biopsy testicular function in rams. **Small Ruminant Research**, v. 45, p. 25–31, 2002b.

SCHATTEN, H.; CONSTANTINESCU, G.M. **Comparative Reproductive Biology**. 1ª Ed, 402p., 2007.

SCHLATT, S.; MEINHARDT, A.; NIESCHLAG, E. Paracrine regulation of cellular interactions in the testis: factors in search of a function. **European Journal of Endocrinology**, v. 137, p. 107-117, 1997.

SILVA, C.M.B. **Efeito da Melatonina em Espermatozóides de Equinos**. Trabalho de Conclusão de Curso. Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa. 2010.

THRELFALL, W.R.; LOPATE, C. Testicular biopsy. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Philadelphia, London: Lea & Febiger, 1992. v. 1, chap. 104, p. 943-949.

VIRGINIA, R.B. **Equine Diagnostic Ultrassound**. Ed. W.B. Saunders Company, 556p., 1998.

YOUNGQUIST, R.S.; THRELFALL, W.R. **Current Therapy in Large Animal Theriogenology 2**, Elsevier Inc., 1120p., 2007.