

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

ROBERTO GEBE ABREU

UTILIZAÇÃO DE AGULHA Tru-cut ASSOCIADA À GUIA ULTRASSONOGRÁFICA  
PARA COLHEITA DE AMOSTRAS DE OVÁRIO EQUINO

Campos dos Goytacazes – RJ

2014

ROBERTO GEBE ABREU

UTILIZAÇÃO DE AGULHA Tru-cut ASSOCIADA À GUIA ULTRASSONOGRÁFICA  
PARA COLHEITA DE AMOSTRAS DE OVÁRIO EQUINO

Tese 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 **Doutor** em Ciência Animal, na Área de Concentração em Biotecnologia da Reprodução.

ORIENTADOR: Prof. José Frederico Straggioti Silva

Campos dos Goytacazes – RJ

2014

ROBERTO GEBE ABREU

UTILIZAÇÃO DE AGULHA Tru-cut ASSOCIADA À GUIA ULTRASSONOGRÁFICA  
PARA COLHEITA DE AMOSTRAS DE OVÁRIO EQUINO

Tese 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 **Doutor** em Ciência Animal, na Área de Concentração em Biotecnologia da Reprodução.

Aprovado em 26 de Maio de 2014

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Bárbara Freitas Rodrigues (UENF- Campos - RJ)

---

Prof. Dr. Eulógio Carlos Queiroz de Carvalho (UENF - Campos - RJ)

---

Prof. Dr. Eduardo Shimoda (UCAM - Campos - RJ)

---

Prof. Dr. Bruno Fagundes (UNIG - Itaperuna - RJ)

---

Prof. Dr. José Frederico Straggiotti Silva (UENF - Campos - RJ)

(Orientador)

## DEDICATÓRIA

Aos meus filhos, Julia e Lucas,  
cada um, na sua forma de ser, que continue sempre me ensinando...

Aos cavalos,  
que, num simples olhar, demonstram uma história e transmitem paz...

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, pela forma sonhadora e positiva de ver as novas ideias, e pelo exemplo em como superar barreiras, sempre imaginando algo bom num destino que ainda não se alcançou;

À Paula, que sempre incentivou meus estudos e demonstrou a ideia do ineditismo como uma aposta certa, baseada no conhecimento e na coragem;

À companheira Olinda, que transformou a distância num simples obstáculo transponível, trazendo amor e o Lucas como forma de energia para suportar essa fase de aprendizagem;

Aos colegas e amigos, que torceram por esta realização;

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

Ao “Tchê”, meu orientador, pela paciência e compreensão;

Ao Professor Eulógio, pelo positivismo e confiança até em momentos de trovoadas;

À Professora. Célia Raquel Quirino, grande incentivadora da pesquisa;

Aos amigos do laboratório de histopatologia, pela participação fundamental no desenvolvimento do projeto.

## RESUMO

ABREU, R. G., Msc. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Maio 2014. Utilização de agulha Tru-cut associada à guia ultrassonográfica para colheita de amostras de ovário equino. Prof. Dr. José Frederico Straggiotti Silva (orientador).

O sistema reprodutivo da fêmea equina é semelhante ao de outras espécies de monogástricos e ruminantes, porém apresenta características anatômicas única na espécie. A abordagem do sistema reprodutivo da fêmea equina apresenta, ao operador, barreiras anatômicas que dificultam exames mais detalhados dos órgãos do sistema reprodutivo, em especial aos dos ovários. Utilizou-se um grupo de éguas (n=10), no qual o uso de agulha Tru-cut associada à guia ultrassonográfica pela via transvaginal possibilitou a colheita de material ovariano em menor volume comparado ao da técnica de biopsia convencional. A comparação das imagens microscópicas do material coletado do grupo de éguas *in vivo* com as do grupo-controle *post mortem* não diferiram significativamente entre si ( $P>0,05$ ). As tramas teciduais do material ovariano coletado (celular, túrgida e colagenizada), definidas no material histológico, por meio da microscopia, por nível de celularidade e coloração de pixels, determinada pelo uso de *software* específico, diferiram entre si ( $P<0,05$ ), quando os resultados foram comparados com os do grupo controle (*post mortem*). Utilizou-se o grau de assimetria, nível organizacional e cromatismo do núcleo celular para a análise de dados. A utilização da agulha Tru-cut demonstrou uma técnica com representatividade nos resultados por meio da comparação das imagens microscópicas pela coloração de pixels. Também não foram observadas alterações nos padrões fisiológicos reprodutivos, pós-colheita, dos animais utilizados no experimento.

Palavras-chave: égua, ovário, biopsia.

## ABSTRACT

ABREU, R. G., MSc. State University of North Fluminense Darcy Ribeiro. Maio 2014. Use of Tru-cut needle associated with ultrasound to guide sampling of the equine ovary. Prof. Dr. José Frederico Silva Straggiotti (advisor).

The female reproductive system is similar to other equine species of monogastric and ruminant animals, but presents unique anatomical traits in species. The approach of the reproductive system of the female equine displays, operator, anatomical barriers that hinder more detailed examination of the organs of the reproductive system, especially the ovaries. We used a group of mares (n=10) in which the use of Tru-cut needle associated with transvaginal ultrasound guided by it possible to harvest material ovarian smaller volume compared to conventional biopsy technique. Comparison of microscopic images of the material collected from the group of mares *in vivo* and control group *postmortem* did not differ significantly ( $P>0,05$ ). The plots of the collected ovarian tissue materials (cellular, turgid and collagenized), defined in histological material by microscopy, by level of cellularity and staining pixels, determined by the use of specific software, differed ( $P<0,05$ ) compared to results of the control group (*postmortem*). We used the degree of asymmetry, organizational and chromaticity of the cell nucleus for data analysis. The use of Tru-cut needle technique showed a representation of the results by comparing the microscopic images for the color pixels. Also no changes in reproductive physiological patterns, post-harvest, the animals used in the experiment were observed.

Keywords: mare, ovary, biopsy.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	09
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1 Aparelho reprodutor feminino	10
2.2 Reprodução em equinos	11
2.3 Diagnóstico reprodutivo	12
2.4 Patologias do aparelho reprodutivo	13
2.5 Ovários e biopsia	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Dados amostrais	17
3.2 Colheita de amostras	18
3.3 Laboratório	19
3.3.1 Processamento do material	19
3.3.2 Análise Microscópica	21
3.3.3 Análise de imagens	21
3.4 Análise estatística	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 Resultado I	24
4.2 Resultado II	25
4.3 Resultado III	26
4.4 Resultado IV	27
CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33



## 1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de trabalhos relacionados à biopsia ovariana em éguas tem evoluído. As técnicas reprodutivas assistidas têm participação fundamental na evolução do processo, uma vez que alguns órgãos do complexo aparelho reprodutivo feminino (útero, trompas e ovários) permanecem localizados na cavidade abdominal, limitados por barreiras naturais. A abordagem clínica dos órgãos do aparelho reprodutor feminino pode apresentar alterações anatômicas, funcionais, inflamatórias, infecciosas ou não, responsáveis por grande número de éguas vazias ao final de uma temporada reprodutiva anual. Os ovários, em especial, devem ser mais bem avaliados, diminuindo-se o espaço entre o quadro clínico e o diagnóstico.

O exame histopatológico do fragmento obtido por biopsia de órgão suspeito é essencial para o estabelecimento de diagnósticos e prognósticos mais precisos (BUNCH *et al.*, 1985).

Néspoli *et al.* (2010), em estudo com órgão situado na cavidade abdominal, citam que, embora tenham sido obtidos resultados positivos com o uso de algumas técnicas e instrumentos diversos, não existem artigos disponíveis que comparem, de forma ampla, os efeitos das técnicas sobre os animais experimentais, nem que confrontem a representatividade e a qualidade das amostras obtidas mediante diferentes técnicas.

A utilização de agulha Tru-cut associada à guia ultrassonográfica procede à coleta de material ovariano, através da via natural transvaginal, com dimensões representativas suficientes para avaliação histopatológica e diagnóstico de melhor precisão.

O presente estudo comparou o método que utiliza a agulha Tru-cut associada à guia ultrassonográfica, para colheita de amostras de ovário equino (*in vivo*), com o do grupo-controle, composto por fragmentos *post mortem* colhidos anteriormente com agulha Tru-cut em abatedouro equino.

Como nas cirurgias minimamente invasivas, o manuseio exequível e preciso da técnica, para diagnóstico de alterações histopatológicas, torna-se uma ferramenta de diagnóstico.

O objetivo do presente estudo é comprovar a representatividade das amostras colhidas *in vivo* por guia ultrassonográfica e demonstrar a viabilidade do procedimento.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

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).

### 2.1 Aparelho reprodutor feminino

O sistema genital da égua apresenta-se com características gerais semelhantes às das demais espécies domésticas, mas com determinadas peculiaridades relacionadas ao tamanho, posição e estrutura macro e microanatômica. Este sistema é composto por ovários, tubas uterinas, útero, cérvix uterina, vagina e vulva, sendo os órgãos genitais internos sustentados por ligamentos (mesovário, mesossalpinge e mesométrio), os quais formam um conjunto denominado de ligamento largo do útero (GETTY, 1981).

Os ovários tem função direta no sucesso do processo reprodutivo por controlar detalhes fisiológicos primários: produção de hormônios (estrógeno, progesterona, inibina) e ovócitos.

O ovário da égua tem formato reniforme com aproximadamente 7 a 8 cm de comprimento e 3 a 4 cm de espessura, 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 à 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.

A atividade ovariana é caracterizada pela alternância de fases de crescimento e de regressão, as quais envolvem tanto as estruturas foliculares quanto as

luteínicas. Estas alterações cíclicas requerem angiogênese contínua – Fatores de crescimento (FRASER & LUNN, 2001).

As células da granulosa representam a principal fonte de fator angiogênico do folículo. Sabe-se que um folículo dominante possui maior vascularização tecal e suprimento sanguíneo do que os folículos subordinados (ZELEZNIK *et al.*, 1981; REDMER & REYNOLDS, 1996), e que a diminuição da vascularização no futuro folículo subordinado começa antes da diminuição da taxa de crescimento folicular.

O folículo dominante poderá alcançar o *status* pré-ovulatório e culminar com a ovulação. Isto ocorre como resultado da interação dinâmica entre o hormônio luteinizante (LH) e fatores foliculares locais, os quais promovem complexas mudanças estruturais e funcionais (AYRES & MINGOTI, 2012).

A maior vascularização do folículo pré-ovulatório tem sido associada com o aumento do diâmetro do folículo em éguas (SILVA *et al.*, 2006).

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

## 2.2 Reprodução em equinos

A 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 se refere apenas à

capacidade intrínseca dos machos e das fêmeas, mas também à do homem nas decisões de manejo, quando a eficiência reprodutiva passa a ser a fertilidade expressa no maior número de nascimentos, em menor período, o que reflete maior lucratividade ao sistema (MARTINS *et al.*, 2002).

Algumas éguas parecem ser verdadeiramente poliéstricas, podendo ficar prenhes em qualquer época do ano. Entretanto, a maioria é poliéstrica sazonal. O início da estação reprodutiva fértil está intimamente associado ao manejo a que os animais são submetidos. Apesar de algumas éguas, em certas latitudes, mostrarem ciclos estrais durante todo o ano, elas não concebem necessariamente durante todos os períodos estrais (HAFEZ, 2004).

### **2.3 Diagnóstico reprodutivo**

O descarte é inevitável nas fêmeas que apresentam ineficiência sem que, em muitas ocasiões, se tenha uma análise mais detalhada de cada caso. Este fato pode estar associado a vários fatores, tais 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 avançada e número de crias abaixo do padrão para o intervalo entre partos (FARIN & ESTILL; YOUNGQUIST & BRAUN, 1993).

O exame ginecológico torna-se indispensável para diagnosticar as 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), além dos exames de citologia e biopsia uterina.

Franco (2006) descreve que a realização de biopsia endometrial e de citologia uterina é indicada para garantir que a fertilidade não seja influenciada por patologias uterinas. Na espécie equina, a análise histopatológica de biopsias de endométrio é indicada como método auxiliar no prognóstico do futuro reprodutivo. As informações

obtidas são de grande importância na avaliação do potencial reprodutivo, portanto, indicada no exame ginecológico de qualquer égua não gestante em programa de reprodução assistida. Por meio de uma única biópsia, é possível chegar ao diagnóstico preciso das condições uterinas e ao prognóstico quanto à capacidade do endométrio de levar a gestação a termo (SILVA *et al.*, 1987; KENNEY, 1990). A biópsia do endométrio é de fácil execução e, além de segura, pode ser realizada pelo veterinário de campo e não afeta as taxas de concepção pós-coleta, desde que medidas adequadas de higiene sejam adotadas (WATSON & SERTICH, 1992).

## **2.4 Patologias do aparelho reprodutivo**

Das afecções que acometem o sistema reprodutivo dos equinos, a endometrite é considerada uma das principais causas de subfertilidade e infertilidade, podendo apresentar-se de forma clínica ou subclínica. É um processo infeccioso que acomete o útero das éguas e pode ser causado por processos não específicos, isto é, não venéreos, ou por germes que se instalam, por razão de sua transmissão venérea, durante a cobertura com garanhões infectados ou que tiveram contato sexual recente com éguas que apresentaram endometrite (THOMASSIAN, 2005). A endometrite engloba infecções agudas ou crônicas que ocorrem no endométrio. Alguns fatores intrínsecos dos equinos fazem com que essa espécie seja mais predisposta a infecções uterinas (RIET-CORREA *et al.*, 2007). Esta enfermidade resulta em falhas na concepção, levando a uma diminuição considerável das chances de uma gestação ir a termo.

Apesar de poucos estudos relacionados aos equídeos, as alterações dos ovários estão relacionadas com o desenvolvimento (hipoplasia, ovários afuncionais), e a circulação (hematoma). Tais alterações podem ainda ser regressivas (hipotrofia, fibrose, cistos), ou progressivas (neoplasias - Tumor das Células da Granulosa - TCG). 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 (hematocistos), abscessos ovarianos e as torções de ovário (SEDRISH *et al.*, 1997). Dentre as causas neoplásicas, o tecomoma é a mais rara (RAOOFI *et al.*, 2006).

Neoplasias primárias em ovários de espécies domésticas são achados relativamente comuns. No entanto, são mais comumente descritas em vacas e cadelas. Embora seja baixa a ocorrência de neoplasias ovarianas em éguas, o tipo mais frequente é o tumor das células da granulosa – TCG (MC CUE, 1998), que abrange 2,5% de todos os tumores que ocorrem nesta espécie (ABDERHALDEN, 2002). As neoplasias têm como origem o epitélio superficial. Os TCG têm origem no estroma especializado do ovário, sendo considerados como tumores do estroma dos cordões sexuais (JONES, 1997). Segundo McCue (2000), esse tipo de tumor ocorre sempre unilateralmente, e cresce de forma impressionante, podendo chegar a pesar 3,6 Kg, segundo Carneiro & Ferrero (2000). É um tipo de tumor de caráter benigno, que determina atrofia e, na maioria das vezes, inatividade do ovário contralateral (MCKINNON & VOSS, 1992). Essa inibição pode estar associada ao hormônio inibina produzido, que suprime a estimulação folicular pela pituitária do hormônio folículo estimulante (FSH), secretado (ABDERHALDEN, 2002). Avaliações da concentração hormonal no sangue podem ser de grande valia na conclusão do caso e associação à patologia.

## 2.5 Ovários e biopsia

Comumente, a biopsia ovariana em éguas realiza-se após exérese do órgão, tecnicamente por meio da ovariectomia (COUTINHO *et al.*, 2013) ou necropsia, usando o método Padrão (biopsia com bisturi convencional e material seccionado, na maioria das vezes, em forma de cunha elíptica), que é uma técnica extensamente aceita e demonstra poucas limitações na obtenção de amostras, que são de caráter excisional, com aproximadamente 15,0 x 5,0 x 5,0 mm, e alteração mínima na qualidade das lâminas histológicas.

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 *et al.*, 2006).

Sartori *et al.* (2002a) avaliaram a aplicabilidade de uma técnica menos invasiva (biopsia com agulha Tru-cut), em ovinos, na obtenção de material dos testículos para histologia e acompanharam as lesões posteriores. Exames

ultrassonográficos foram realizados pré e pós-biopsia. A ultrassonografia permitiu mapear as alterações ocorridas e acompanhar a evolução das sequelas.

Santoro (2014) trabalhou na realização de biopsia testicular por punção com agulha Tru-cut na espécie equina, com avaliação ultrassonográfica das gônadas, análise espermática e teste de imunogenicidade espermática.

Tostes & Bandarra (2002) compararam biopsias hepáticas realizadas com agulhas aspirativa, tipo Menghini, e cortante, tipo Tru-cut, utilizando técnica percutânea transabdominal em 60 cães portadores de afecções hepáticas. As amostras de tecido hepático colhidas com essas agulhas foram comparadas ao exame histológico *post-mortem* do fígado desses animais, havendo maior concordância de acertos (88,3%) com a agulha Tru-cut.

Estudo comparativo envolvendo pinça de biopsia de 5 mm e agulha Tru-cut em biopsias renais, guiadas por laparoscopia, foi realizado em dez equinos hípidos, distribuídos aleatoriamente em dois grupos (TABET *et al.*, 2005). Os autores consideraram a biopsia renal com o uso de pinça a mais adequada, em virtude da obtenção de fragmentos maiores para exame histológico.

A utilização de agulha Tru-cut e o acesso da técnica para colheita de amostras de ovário equino seguem os padrões da técnica de aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom (OPU). O primeiro grupo de pesquisadores que descreveu a aspiração folicular transvaginal em éguas foi o de Brück (1992). Os fundamentados na técnica utilizada, em programas humanos e bovinos, podem assim ser descritos: a equipe aspirou folículos pré-ovulatórios com um transdutor setorial conectado a um aparelho de ultrassom, cujo monitor indicava, em sua tela, a linha de punção (FERNANDES, 2002; FRANCO, 2006). A técnica foi descrita como sendo prática, pouco invasiva e repetível (VANDERWALL *et al.*, 2005).

Como na técnica de origem (OPU), os riscos de procedimentos infiltrativos podem ou não alterar o funcionamento do órgão envolvido.

Em 1993, a equipe de Bracher descreveu o efeito de quatro aspirações foliculares em ovários (*post-mortem*) de uma égua, 6 semanas após a última aspiração. O estudo revelou diversas aderências na superfície e pequenas e múltiplas áreas circulares de hemorragia no estroma. Já em 2001, Weber e colaboradores descreveram complicações clínicas em três éguas após a realização de procedimento semelhante (tratamento intraluteal). Eles descreveram sinais clínicos consistentes com infecção ovariana persistente, incluindo massa luteal



ecogênica, dor no ovário durante a palpação retal, cólica intermitente, pirexia, perda de peso e adesões entre o ovário afetado e estruturas adjacentes. Vanderwall e Woods (2002) relataram um caso de severa hemorragia interna após uma sessão de aspiração folicular. A hemorragia ocorreu possivelmente por rompimento da artéria uterina esquerda, causado pela agulha de punção. A eutanásia foi realizada devido ao prognóstico desfavorável. Em vacas, também já foram descritas complicações decorrentes da aspiração folicular. Em 2002, Snel-Oliveira *et al.* observaram lesões histológicas, evidenciando o efeito direto da intervenção, devido a microtraumas (fibrose capsular e possível atresia folicular patológica), ou a consequências secundárias (atresia folicular consequente de uma inibição da ovulação), sugerindo que alterações patológicas, quando em grande número, podem alterar a função ovariana.

Viana *et al.* (2003) avaliaram lesões no trato genital de fêmeas bovinas utilizadas como doadoras de oócitos, mediante a técnica de punção folicular, via transvaginal que, embora menos invasiva, também pode ocasionar alterações morfológicas e funcionais nos ovários. Sua significância está proporcionalmente relacionada ao número de sessões de punção, a que as doadoras são submetidas e ao número médio de estruturas recuperadas por sessão de coleta.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

A comissão de ética de uso de animais (CEUA – UENF), protocolo 164, autorizou o experimento que se iniciou em abril/2011, com os procedimentos de avaliação e escolha dos animais, seguidos da colheita de material ovariano.

#### 3.1 Dados amostrais

Foram utilizadas dez éguas mestiças na formação do grupo de éguas *in vivo*, criadas a campo, do lote de matrizes da tropa de serviço da Fazenda Fortaleza no Município de Rio Maria – PA. Características como aparelho reprodutor fisiologicamente ativo, gestações a termo anteriores, escore corporal, aspecto saudável e condição “vazia” foram fundamentais na escolha dos animais para a colheita de material e desenvolvimento do projeto. Os animais são identificados, com marca a quente, em numeral vertical na coxa direita, posição caudal superior.

Nos piquetes de manejo, limitados a 5 ha de área de pastejo, com plantio *Panicum maximun* CV Mombaça, em sistema de rodízio, água corrente natural e sal mineralizado para equídeos, dispostos regularmente em cocho apropriado. A idade das éguas variou entre 6 e 10 anos no início do experimento.

Os animais foram avaliados em condições de segurança, em tronco de contenção para equídeos, localizado na área coberta do curral de manejo.

Previamente à colheita do fragmento ovariano, as éguas foram submetidas ao exame ginecológico, estabelecendo-se a fase do ciclo estral, bem como as características individuais, em termos de função ovariana e uterina, e submetidas ainda à palpação retal e ao exame ultrassonográfico.

O grupo-controle *post mortem* constituiu-se por lâminas da histopatologia de estudo anterior, procedente de material colhido de ovários com agulha Tru-cut em abatedouro de equídeos, no ano de 2009, no Município de Itapetinga – BA.

Após o período de colheita de material para o experimento, o grupo de éguas permaneceu alojado na fazenda Fortaleza por um período de tempo relativo a duas temporadas de monta controlada. A temporada de monta controlada 2011/2012 teve início em outubro/2011, quando foram avaliados os animais coletados em abril/2011.

O mesmo procedimento se repetiu na temporada de monta controlada seguinte, 2012/2013.

### 3.2 Colheita de amostras

O procedimento, de forma geral, por ser invasivo, requer cuidados relacionados ao risco de contaminação. Na região da genitália externa, por ser a primeira área de contato, procedeu-se à descontaminação dos tecidos vivos por meio de dois processos coordenados: a) Degermação - solução detergente de clorhexidina a 4%, também em casos de alergia ao iodo. A ação germicida é melhor contra Gram-positivo e tem ação residual; e b) Antissepsia - solução degermante de PVPI a 10% (1% de iodo ativo), com ações bactericida, fungicida, virucida e residual.

O exame ultrassonográfico utilizou equipamento (MINDRAY, DP-2200, China) com transdutor endorretal linear, multifrequência 75L50EAV, ajustado na frequência de 5,0 Mhz para definição de imagem, nas avaliações inicial e subsequentes. No procedimento de colheita de fragmento ovariano, utilizou-se o transdutor setorial multiangular de 5,0 - 7,5 Mhz acoplado à guia de aspiração WTA (Watanabe – Produtos Veterinários). Além do transdutor, a guia também fixa a agulha de biopsia tipo Tru-cut semiautomática 14Gx600 mm.

Após lubrificação com gel inócuo, a guia com o transdutor acoplado era introduzido através da vagina até a região de fundo de saco (fórnice). O plano tecidual do fórnice, local da punção, respondeu bem à pré-anestesia (15 minutos), com anestésico à base de cloridrato de lidocaína 1% (Xylocaína - pomada; Hoechst Marion Roussel S.A., São Paulo, SP), em posição relativa ao lado que se manuseava (direito ou esquerdo), não interferindo diretamente no tempo do procedimento. Com o auxílio da mão oposta, introduzida no reto, a fim de tracionar o respectivo ovário, utilizou-se pressão digital, dando condições para que o procedimento de colheita fosse efetuado pela indicação da imagem ultrassonográfica, que orienta a introdução da agulha de biopsia no ovário, para a captura e retirada do fragmento (Fig. 1).

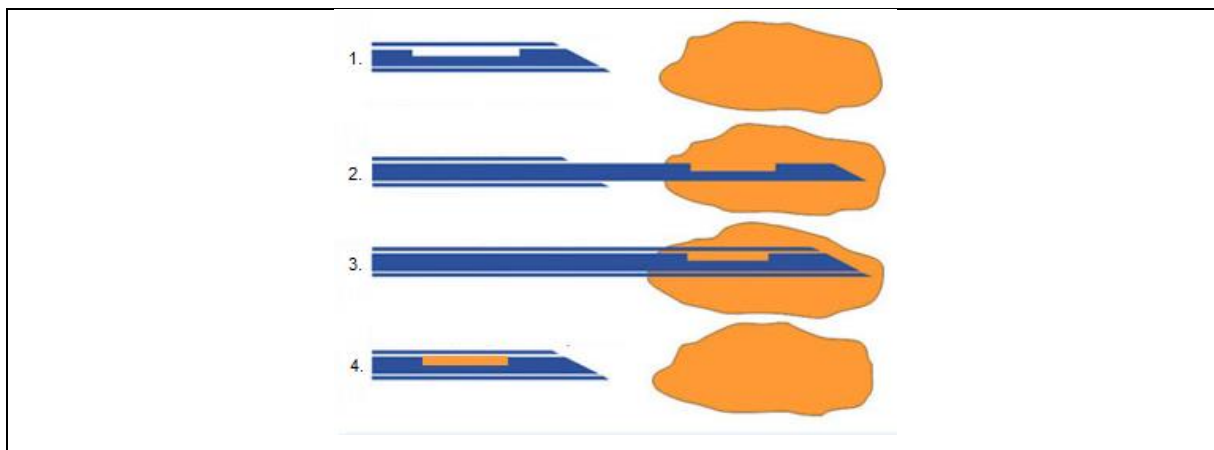


Figura 1 - Modo de ação da agulha de biopsia Tru-cut: 1. Bainha e agulha com “gaveta” para o fragmento; 2. A agulha é tracionada para o ponto desejado; 3. A bainha desliza sobre a agulha para captura do fragmento; 4. Retirar agulha, bainha e fragmento. Fonte: Michael Edwards, 2003.

### 3.3 Laboratório

As amostras colhidas e retiradas da “gaveta” da agulha Tru-cut foram acondicionadas em frascos com o número de identificação do animal, em solução de formalina neutra 10% tamponada, cujos frascos foram processados no Laboratório de Morfologia e Patologia Animal (LMPA), da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (UENF).

#### 3.3.1 Processamento do material

Após a fixação do material colhido em solução de formalina neutra 10% tamponada, por no mínimo 12 horas, as amostras passaram pelo processamento histopatológico de rotina para inclusão em parafina - desidratação, diafanização e impregnação (HUMASON, 1972). Cortes micrométricos foram realizados após, com 4,0 a 6,0  $\mu\text{m}$  de espessura, e as fitas colocadas em banho-maria. Após distensão destas, foram transferidas para lâminas de vidro recobertas com fina camada de albumina, facilitando a adesão e iniciando a montagem.

A técnica de coloração histológica constitui um conjunto de processos, no qual são submetidos os tecidos, para que estes sejam observados de maneira significativa e adequada, permitindo uma análise histológica. Esse procedimento consiste em uma etapa indispensável na confecção de lâminas histológicas e visa

contrastar as estruturas teciduais dos cortes histológicos que se apresentam incolores após a microtomia. Nesse processo, são coradas as diversas estruturas dos cortes histológicos em diferentes cores. Grande parte das técnicas atuais de coloração tem um custo elevado em razão do uso de corantes importados (GARTNER & HIATT, 1999; GENESER, 2003; SALAS *et al.*, 2004). A combinação mais comum de corantes usada em histologia e histopatologia é a Hematoxilina e Eosina (HE). A hematoxilina é um corante natural obtido da casca de *pau campeche*. Não é realmente um corante e deve ser oxidada em hemateína a fim de tornar-se um (GARTNER e HIATT, 1999). Enquanto o citoplasma é formado por componentes ácidos e básicos, no núcleo das células, predominam os ácidos nucleicos. O corante que reage com estas moléculas é a Hematoxilina, conferindo ao núcleo uma coloração azulada. Ademais, o corante que resulta (hematoxilina-hemateína) não tem afinidade para os tecidos. Neste caso, deve ser usado um mordente, como o alumínio ou o ferro, juntamente com a mistura de hematoxilina antes que ela possa corar os tecidos. A mistura cora em azul-púrpura. O segundo componente é a Eosina Y (eosina yellowish, eosina solúvel ou eosina amarelada). Eosina Y é uma tetrabromo fluoresceína, mas as formas derivadas, mono e dibromo, também podem estar presentes no corante, em proporções variáveis. Essas formas derivadas modificam seu tom avermelhado, que é proporcional ao íon Br presente no produto. O corante é utilizado, principalmente, na coloração de grânulos oxifílicos do citoplasma, que têm longa afinidade por corantes ácidos (SALAS *et al.*, 2004). A eosina é atraída pelos elementos básicos da proteína do citoplasma da célula, corando-o de róseo a vermelho. Os componentes dos tecidos que se coram prontamente com os corantes básicos são chamados basófilos; os que têm afinidade pelos corantes ácidos são chamados acidófilos. A hematoxilina comporta-se como um corante básico e, portanto, cora o núcleo de modo basófilo. A eosina é um corante ácido e cora os elementos básicos da proteína do citoplasma de maneira acidófila (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

A colocação de uma gota de resina líquida sobre o corte aderido à lâmina e a cobertura com lamínula encerraram o processamento das amostras para posterior análise por meio de microscopia óptica.

### 3.3.2 Análise Microscópica

As lâminas analisadas definiram parâmetros e rotulagem dos planos teciduais, à luz da microscopia óptica (OLYMPUS BX41, U-MDOB3, Japão), no aumento 200x. Em sequência, as imagens fotográficas das tramas teciduais foram obtidas por câmera fotográfica digital (NIKON COOLPIX, 995, Japão) acoplada, utilizando aumento 200x e Zoom 4.5.

As tramas teciduais ovarianas definidas inicialmente por Abreu (2010), como Celular, Túrgida e Colagenizada, para avaliação, foram utilizadas no grupo-controle e comparadas com as dos resultados obtidos das colheitas do grupo de éguas *in vivo*. A biopsia fornece maior fidelidade à histologia pela celularidade que corresponde à proporção entre tecidos ou áreas de um mesmo tecido avaliado. A celularidade define a uniformidade das células, oposto ao conjunto de células em que há perda da orientação arquitetural. Portanto, as tramas se definem como Celular: distribuição sem polaridade (+celularidade); Túrgida: distribuição monótona (celularidade intermediária); Colagenizada: distribuição em feixe modelado (-celularidade) (Fig. 2).

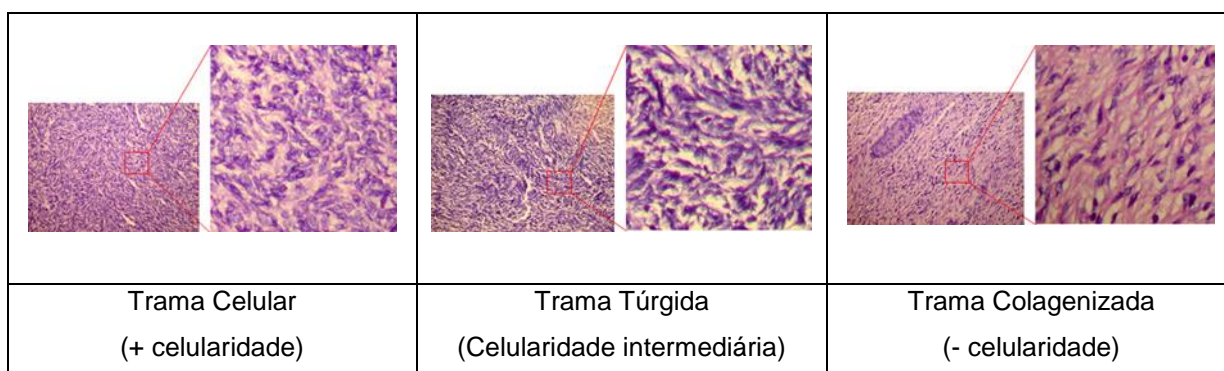


Fig. 2 – Visualização das tramas celulares (Celular, Túrgida e Colagenizada).

### 3.3.3 Análise de imagens

Foi realizada a formatação gráfica das lâminas histológicas para o tratamento de imagens, por frequência de tonalidade, quando se utilizou um *software* objetivo (*Pixel Analyser 6.6*) para avaliação destas imagens (análise da densidade de

coloração dos *pixels* pela celularidade nos planos teciduais – assimetria, nível organizacional das células, cromatismo do núcleo celular), e sua posterior comparação analítica.

De acordo com Fonseca (2011), dá-se a nomenclatura de assimetria ao grau de afastamento de uma distribuição da unidade de simetria. Uma distribuição é simétrica quando seus valores de Média, Mediana e Moda coincidem. A comparação entre o valor da Média e o valor da Moda oferece uma indicação da inclinação da distribuição. A avaliação dos *pixels* por assimetria determina maior ou menor concentração de núcleos celulares de acordo com a tonalidade, onde 0 (zero)=preto, e 10 (dez)=branco (x 100).

A avaliação do nível organizacional das células, de forma simples, padronizou uma escala de 0 – 5, para diferenciar as tramas teciduais numa interpretação:

De 0 – 1 = (-) celularidade – Trama colagenizada;

De 2 – 3 = celularidade intermediária – Trama túrgida;

De 4 – 5 = (+) celularidade – Trama celular.

A avaliação do cromatismo do núcleo celular, de forma simples, diferenciou as tramas teciduais numa escala padronizada de 0 – 5, interpretadas como:

De 0 – 1 = Hipocromatismo;

De 2 – 3 = Normocromatismo;

De 4 – 5 = Hiperchromatismo.

As imagens utilizadas, para comparação e frequência de tonalidade pelo *pixel analyser*, seguem na mesma configuração (474 x 474 *pixels*), Fig. 3 e Fig. 4.

### Imagem *Pixel Analyser* – Lâminas Tru-cut – *in vivo*

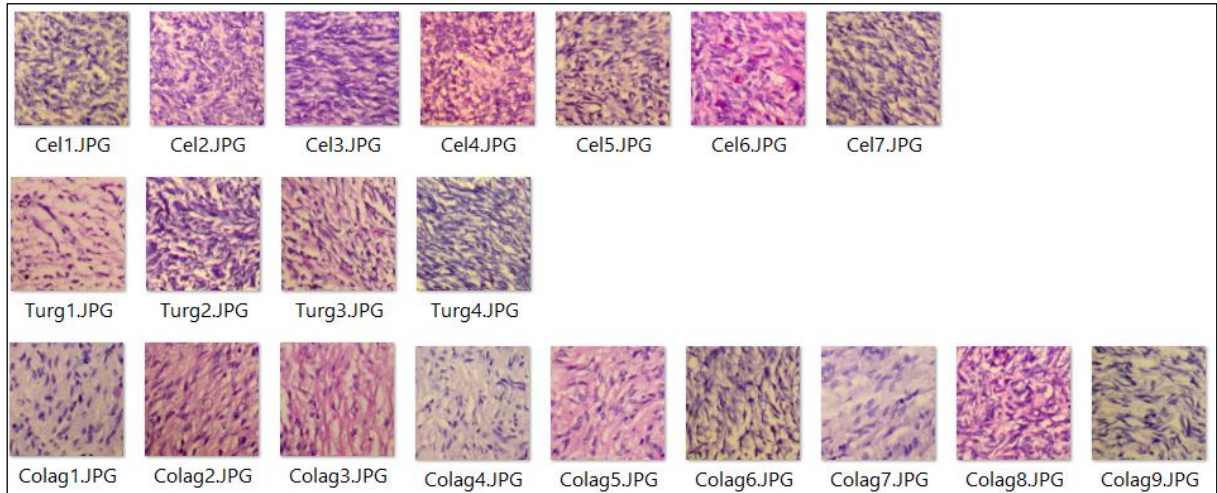


Fig. 3 – Imagem das tramas selecionadas (celular, túrgida, colagenizada), para avaliação pelo *software Pixel Analyser 6.6* – Colheita com agulha Tru-cut *in vivo*.

### Imagem *Pixel Analyser* – Lâminas Tru-cut – *post mortem*

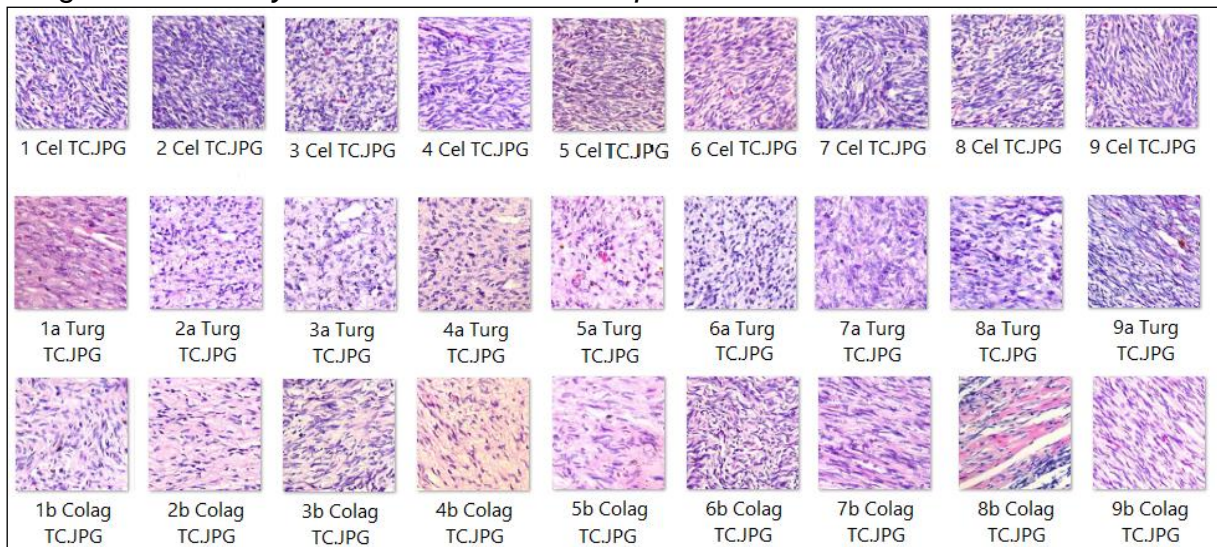


Fig. 4 – Imagem das tramas selecionadas (celular, túrgida, colagenizada), para avaliação pelo *software Pixel Analyser 6.6* – Colheita com agulha Tru-cut *post mortem*.

### 3.4 Análise estatística

A análise estatística utiliza o aplicativo SAEG 9.1 para obter parâmetros da estatística descritiva – Média (medida de tendência central, utilizada para obter a medida de posição que possui a maior estabilidade entre os valores observados na amostra); Erro-padrão (representa o quanto a média da amostra se aproxima da média da população); Intervalo de confiança ( $P=0,95$ ) (PIMENTEL GOMES, 1966)



em relação à tonalidade dos pixels, de acordo com a trama tecidual (celular, túrgida ou colagenizada), e modo de colheita (*in vivo* ou *post mortem*).

Utilizaram-se dez fêmeas equinas *in vivo*, cuja colheita de material, analisado microscopicamente, gerou duas tramas teciduais aleatórias entre celular, túrgida ou colagenizada, por animal *in vivo*. No grupo-controle (*post mortem*), a mesma avaliação gerou três tramas teciduais por animal.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Resultado I – Grau de assimetria das células em amostra de tecido ovariano de acordo com a trama tecidual e modo de colheita Tru-cut em éguas (Tab.1 e Gráf.1).

Tab. 1 – Grau de assimetria das células em amostra de tecido ovariano de acordo com a trama tecidual e modo de colheita Tru-cut em éguas.

Animal	Grau de assimetria (-1000 – 0)					
	Celular		Túrgida		Colagenizada	
	Post mortem	In vivo	Post mortem	In vivo	Post mortem	In vivo
1	-400	-390	- 279	-1624	-1344	-1503
2	163	-183	-1290	- 54	-1903	- 839
3	-505	73	-1272	- 735	- 933	- 813
4	-453	-171	-1123	- 93	-1728	-1698
5	-107	-610	-1547		-1442	-1135
6	-370	-376	-1104		- 694	- 696
7	-164	-337	- 555		- 645	-1210
8	-334		- 650		- 627	- 292
9	-294		- 399		- 986	- 938
X	-0,274	-0,284	-0,913	-0,627	-1,144	-1,013
± s(X)	±0,069	±0,081	±0,150	±0,367	±0,160	±0,142

X ± s(X): média ± erro-padrão.

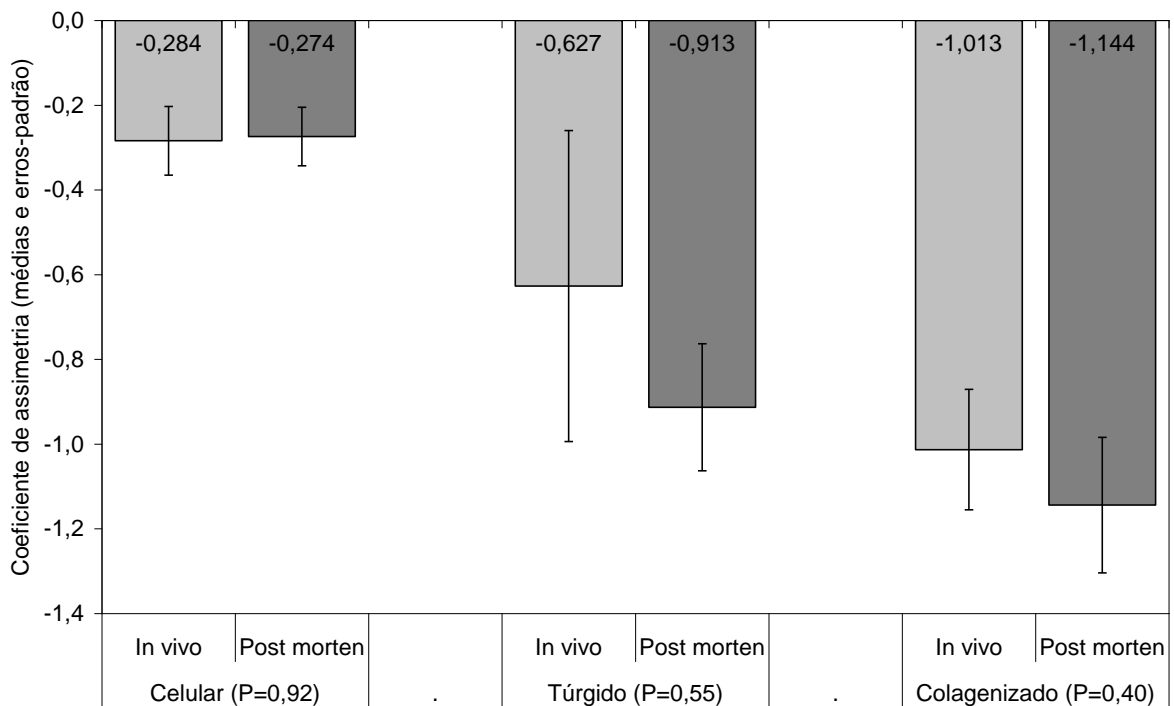


Gráfico 1 – Coeficiente de assimetria das células em amostra de tecido ovariano de acordo com a trama tecidual e o modo de colheita Tru-cut em éguas.

A determinação da tonalidade de *pixels* das imagens das tramas teciduais definidas e a frequência de distribuição das tonalidades foram comparadas entre os modos de colheita de material ovariano, com agulha Tru-cut, *in vivo* e *post mortem*. A comparação de dados não pareados demonstrou resultados que tendem à simetria com variação para assimetria à esquerda ou negativa, demonstrando maior ou menor concentração de *pixels* escuros ou claros, respectivamente, pela tonalidade nos núcleos celulares.

4.2 Resultado II – Nível organizacional das células em amostra de tecido ovariano de acordo com a trama tecidual e modo de colheita Tru-cut em éguas (Tab. 2 e Gráf. 2).

Tab. 2 – Nível organizacional das células em amostra de tecido ovariano de acordo com a trama tecidual e modo de colheita Tru-cut em éguas,

Animal	Nível organizacional das células (0 – 5)					
	Celular		Túrgido		Colagenizado	
	Post mortem	In vivo	Post mortem	In vivo	Post mortem	In vivo
1	5	5	3	2	1	1
2	4	4	3	3	0	1
3	4	4	3	3	0	0
4	5	5	3	3	1	1
5	4	5	3		1	0
6	5	5	2		0	1
7	5	4	2		0	0
8	5		2		0	1
9	5		2		0	0
X	4,66	4,57	2,56	2,75	0,33	0,56
± s(X)	± 0,17	± 0,20	± 0,18	± 0,25	± 0,17	± 0,18

X ± s(X): média ± erro-padrão

O resultado II demonstrou que o nível organizacional das células diferiu entre si em relação à diferença entre as tramas teciduais identificadas.

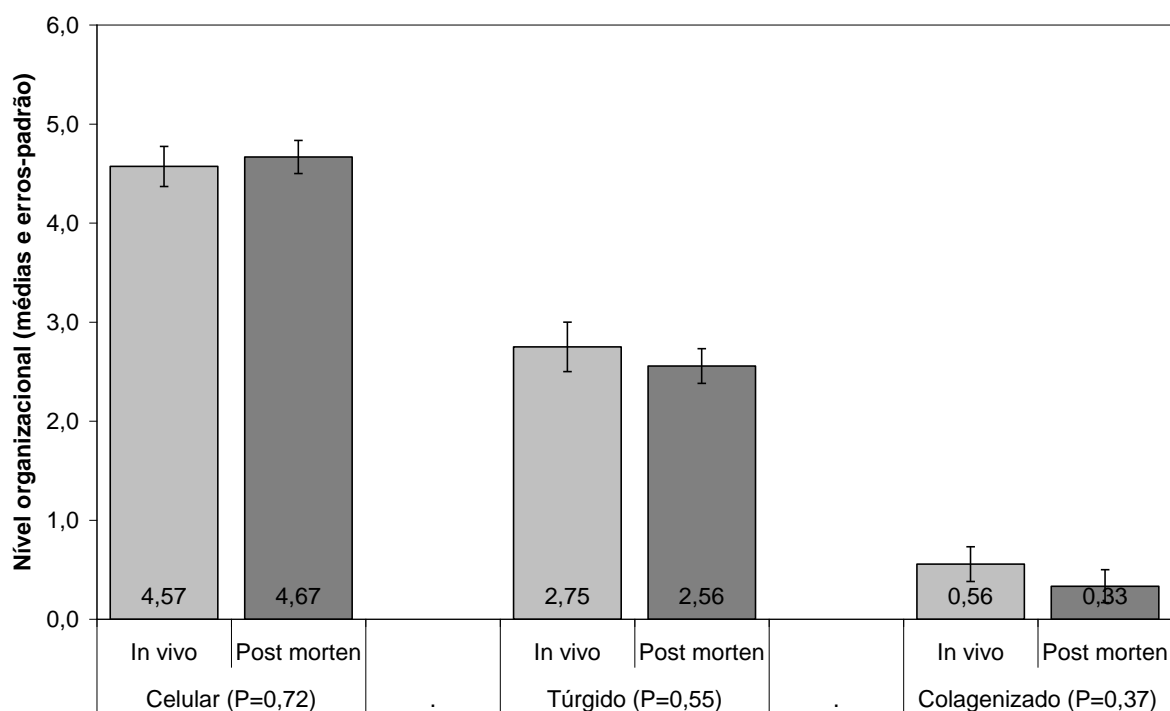


Gráfico 2 – Nível organizacional das células em amostra de tecido ovariano em éguas, de acordo com a trama tecidual e modo de colheita.

#### 4.3 Resultado III – Cromatismo do núcleo celular em amostra de tecido ovariano de acordo com a trama tecidual e modo de colheita Tru-cut em éguas (Tab. 3 e Gráf. 3).

Tab. 3 – Cromatismo do núcleo celular em amostra de tecido ovariano de acordo com a trama tecidual e modo de colheita Tru-cut em éguas.

Animal	Cromatismo do núcleo celular (0 – 5)					
	Celular		Túrgido		Colagenizado	
	Post mortem	In vivo	Post mortem	In vivo	Post mortem	In vivo
1	5	5	3	2	1	1
2	5	5	3	3	1	1
3	5	5	2	3	1	1
4	4	5	3	3	1	1
5	5	4	3		1	1
6	4	5	2		1	1
7	4	5	3		1	0
8	4		2		1	1
9	4		3		1	1
X	4,44	4,86	2,67	2,75	1,00	0,89
± s(X)	± 0,18	± 0,14	± 0,17	± 0,25	± 0,00	± 0,11

X ± s(X): média ± erro-padrão

Comparando-se os modos de colheita, em cada trama tecidual, não se verificaram diferenças significativas ( $P>0,05$ ) em nenhum dos casos, o que evidencia que tanto o modo de colheita Tru-cut *in vivo*, quanto o Tru-cut *post mortem*, apresentam similaridade no nível de cromatismo do núcleo celular, independentemente da trama tecidual (Gráf. 3).

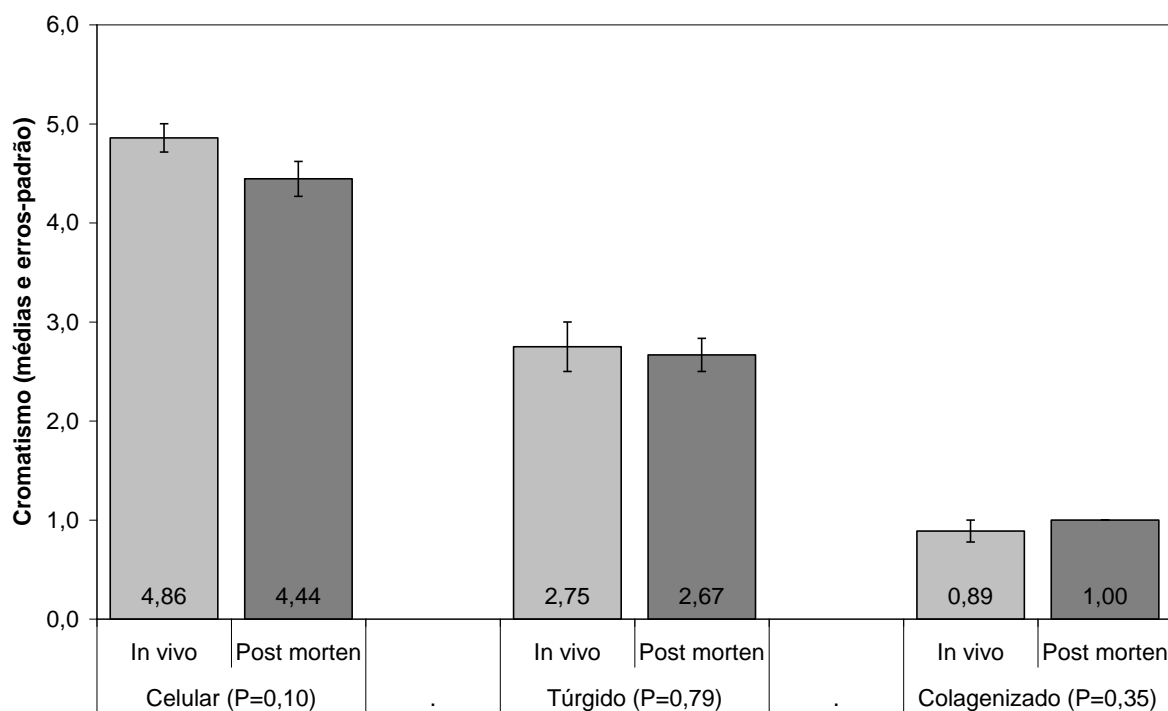


Gráfico 3 – Cromatismo do núcleo celular em amostra de tecido ovariano de acordo com a trama tecidual e modo de colheita em éguas.

#### 4.4 Resultado IV – Avaliação da fisiologia reprodutiva do grupo de éguas *in vivo*, nas temporadas de monta controlada de 2011/12 e 2012/13.

A temporada 2011/12 iniciou-se na segunda quinzena de outubro, com todas as dez éguas utilizadas na condição “vazia”. As respostas à indução hormonal foram razoáveis, mas, ainda assim, com ciclos pouco regulares. A estação das águas, ainda que tardia, colaborou com os resultados.

Na temporada 2012/13, iniciada um pouco mais tarde, a resposta às induções hormonais foi similar à do ano anterior, com ciclos mais regulares.

As avaliações realizadas, nas duas temporadas de monta seguintes, mediante o procedimento de colheita de material ovariano com agulha Tru-cut guiada ultrassonograficamente, estão representadas nos Gráficos 4 e 5, a seguir:

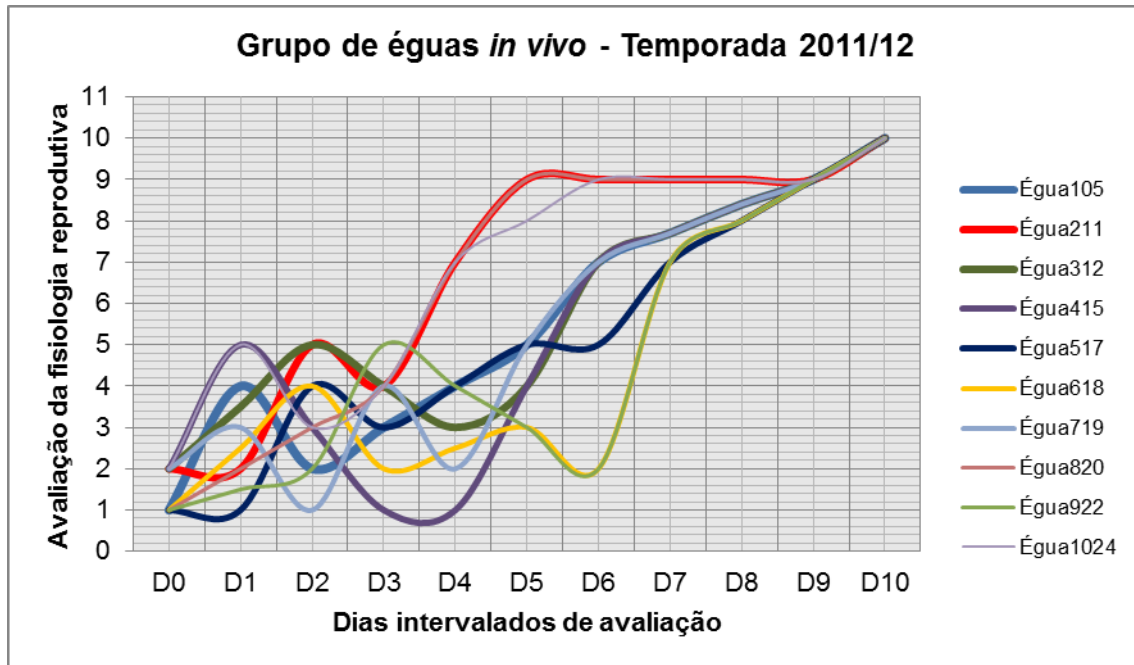


Gráfico 4 – **Eixo vertical** – Avaliação da fisiologia reprodutiva: 1=Ns (Nada significativo), 2=Girf (Folículos em crescimento), 3=CL (Corpo lúteo), 4=PGF2 $\alpha$  (Prostaglandina), 5=Cio, 6=Cob (Monta dirigida), 7=IA (Inseminação artificial), 8=Rep (Repalpe), 9=Prenhez (P<30d), 10=Prenhez+ (P>30d); **Eixo horizontal** – Dias intervalados de avaliação: D0=15/10/11, D1=21/10/11, D2=29/10/11, D3=05/11/11, D4=14/11/11, D5=26/11/11, D6=03/12/11, D7=09/12/11, D8=16/12/11, D9=23/12/11, D10=12/01/12.

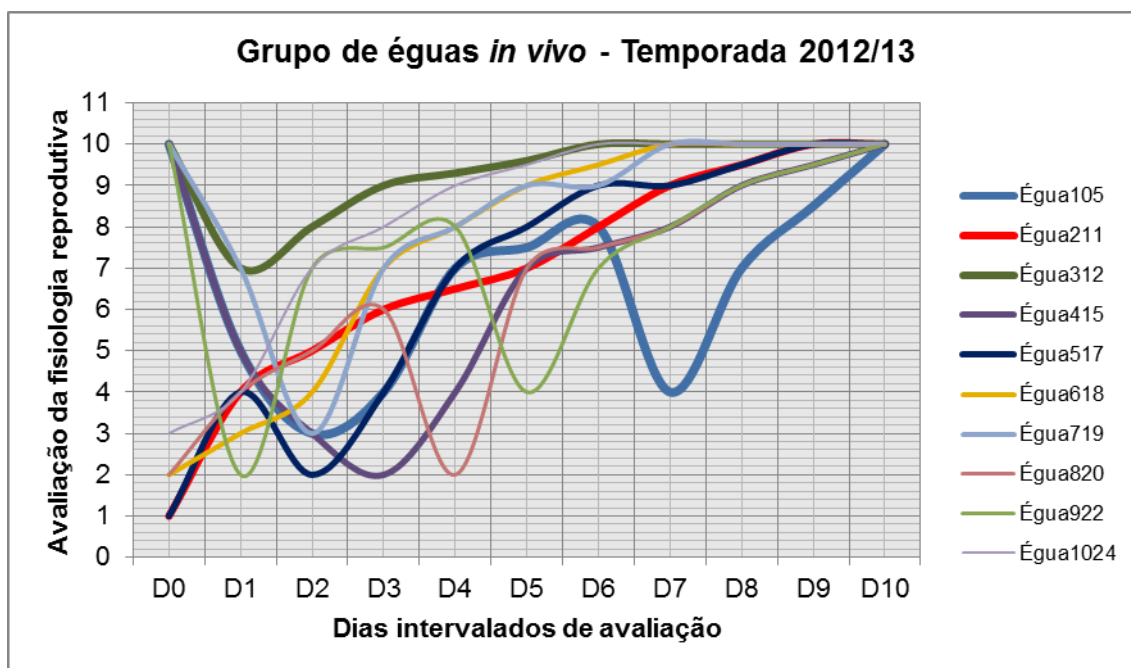


Gráfico 5 – **Eixo vertical** – Avaliação da fisiologia reprodutiva: 1=Ns (Nada significativo), 2=Girf (Folículos em crescimento), 3=CL (Corpo lúteo), 4=PGF2 $\alpha$  (Prostaglandina), 5=Cio, 6=Cob (Monta dirigida), 7=IA (Inseminação artificial), 8=Rep (Repalpe), 9=Prenhez (P<30d), 10=Prenhez+ (P>30d); **Eixo horizontal** – Dias intervalados de avaliação: D0=23/10/12, D1=22/11/12, D2=29/11/12, D3=06/12/12, D4=13/12/12, D5=20/12/12, D6=27/12/12, D7=03/01/13, D8=10/01/13, D9=18/01/13, D10=12/02/13.

O grupo de éguas *in vivo* observado e avaliado via ultrassom, nas duas temporadas de monta controlada (2011/12 e 2012/13), subsequentes ao procedimento de colheita de material ovariano com agulha Tru-cut, mediante a guia ultrassonográfica, demonstrou não apresentar quaisquer alterações do complexo reprodutivo. Em ambas as temporadas de monta controlada, foram obtidos resultados na ordem de 100% dos animais do experimento, com diagnóstico de prenhez positiva. Franco (2006) concluiu que as lesões ovarianas causadas pela agulha de aspiração não afetam a função ovariana no ciclo subsequente, em éguas crioulas, mesmo que o ovário que chega à ovulação seja o mesmo anteriormente aspirado.

Segundo Viana *et al.* (2003), um outro fator que pode dificultar o estabelecimento mais preciso da relação entre intensidade de punção e ocorrência de lesões é o tipo de agulha utilizado. É relatada a utilização de agulhas com calibres 17 (GIBBONS *et al.*, 1994; FRY *et al.*, 1998; SCHERNTHANER *et al.*, 1999); calibres 18 (STUBBINGS & WALTON, 1995; BONI *et al.*, 1997); calibres 19 (MACHATKOVÁ *et al.*, 2000); e calibres 20 (BOLS *et al.*, 1996b); Gauge

descartáveis (MACHATKOVÁ *et al.*, 2000) ou não (VOS *et al.*, 1994; STUBBINGS & WALTON, 1995; BONI *et al.*, 1997).

Agulhas de menor calibre apresentam menor área de corte, sendo potencialmente menos danosas ao tecido, enquanto agulhas descartáveis, por terem o bisel mais afiado, exercem menor pressão sobre as estruturas puncionadas (BOLS *et al.*, 1997). A baixa incidência de lesões em animais submetidos a até 20 sessões de punção é coerente com a observação de que o procedimento não causa, necessariamente, comprometimento da fertilidade (GIBBONS *et al.*, 1994). O uso de agulhas de menor diâmetro (19 e 20 G) e descartáveis pode ter contribuído para reduzir a extensão das lesões decorrentes das punções. Nos animais submetidos a mais de 20 sessões, a incidência de alterações macroscópicas e histológicas aumentou significativamente. A frequência das punções, neste caso, pode ter sido superior à capacidade de regeneração do órgão (SANTL *et al.*, 1998).

No trabalho de biopsia testicular em equinos utilizando agulha Tru-cut, Santoro (2014) dividiu o experimento em dois períodos (Pré e Pós-Biopsia). Na análise espermática, não foi verificada diferença estatística significativa entre as coletas, mostrando que a técnica não provoca alterações na espermatogênese do garanhão. Ao exame ultrassonográfico, foram observadas pequenas lesões, fato que corrobora outros autores (HARRINGTON *et al.*, 1996; SARTORI *et al.*, 2002a). Sugere-se que a técnica seja segura e capaz de colher material adequado para a análise histológica, podendo ser indicada como exame complementar para um diagnóstico.

Nas avaliações macro e microscópicas dos testículos de ovinos, após a orquiectomia, Sartori *et al.* (2002a) comentaram que a biopsia com agulha Tru-cut forneceu material suficiente para histologia, entretanto, ocasionou lesões focais restritas à área da biopsia. Apesar da possível ocorrência de calcificação, foi demonstrado que a biopsia com agulha Tru-cut em ovinos é um procedimento seguro, por não ter comprometido significativamente as características estruturais e funcionais dos testículos.

Em outro foco da discussão, foram avaliadas vacas da raça Gir (n=20) que participaram de diferentes experimentos envolvendo a realização de punções foliculares (VIANA *et al.*, 2000, 2001, 2002), realizados na Embrapa Gado de Leite (Set/1999 e Nov/2000). O grupo experimental incluía animais com histórico de 9 a 42 sessões de punção, com um total de estruturas recuperadas variando de 10 a 719.



Ao término de cada experimento, as vacas foram submetidas a exames ginecológicos por palpação retal, ultrassonografia e vaginoscopia, objetivando identificar a presença de eventuais alterações no trato genital e monitorar a sua evolução. Dos animais previamente monitorados, selecionou-se um grupo (n=8) para a avaliação histopatológica das lesões ovarianas. Foram escolhidos animais submetidos a um número variado de sessões de punção (11, 19, 23, 31, 33 e 42), de forma a se obter uma amostra representativa do conjunto. A ovariectomia foi realizada, por meio de laparotomia, na fossa paralombar ipsilateral, 72 horas após a última sessão de punção. A avaliação histopatológica demonstrou a presença de diferentes alterações morfológicas nos ovários, como pontos de perfuração na túnica albugínea, presença de áreas com hemorragia, infiltrados de células inflamatórias e fibrose no estroma ovariano, associado a cicatrizes no trajeto da agulha (VIANNA, 2003).

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, sendo o procedimento seguro, por não comprometer significativamente as características estruturais e funcionais dos testículos.

Deve-se 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 lúteo que se desenvolve é normal e não afeta a atividade ovariana (HUGHES *et al.*, 1972a; HUGHES *et al.*, 1972b). O hematoma, que, normalmente, se desenvolve após a ovulação, como ocorre com o corpo hemorrágico (MILLS *et al.*, 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, o hematoma 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).

## 5. CONCLUSÃO

O uso da tecnologia na comparação de imagens, por tonalidade de *pixels* do material tratado, propicia condições objetivas para a avaliação dos resultados.

A utilização de agulha Tru-cut associada à guia ultrassonográfica, para colheita de amostras de ovário equino *in vivo*, mostrou-se eficiente, com representatividade no comparativo com a colheita de amostras de ovário equino *post mortem*.

O procedimento, visto como ferramenta de diagnóstico, e o fato de ser realizada uma única punção não demonstraram alterações nos ciclos reprodutivos em duas temporadas de monta controlada subsequentes, com resultados positivos na reprodução: 100% de prenhez no grupo de éguas *in vivo*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDERHALDEN-TELFER, K., Class of 2002 – edited by Evan Janovitz, *ADDL Pathologist*.

ABREU, R. G. Colheita de amostra de ovário para biopsia (Tru-Cut) em éguas. 28f. 2010.

AYRES, H., MINGOTI, G. Z. Angiogênese, vascularização e uso do ultrassom Doppler colorido na avaliação de estruturas ovarianas. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, v. 36, n. 3, p. 174-180, jul./set. 2012

BOLS, P. E. J.; VAN SOOM, A.; YSEBAERT, M. T.; VANDENHEEDE, J. M. M. & DE KRUIF, A. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology* 45: 1001-1014, 1996b.

BOLS, P.E.J.; YSEBAERT, M.T.; VAN SOOM, A. & DE KRUIF, A. Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus oocyte complexes. *Theriogenology* 47: 1221-1236, 1997.

BONI, R.; ROELOFSEN, M. W. M.; PIETERSE, M. C.; KOGUT, J. & KRUIP, T. A. M. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows under going repeated follicular puncture. *Theriogenology* 48: 277- 289, 1997.

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

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.

BRACHER, V. Repeated transvaginal ultrasound-guided follicle aspiration in the mare. *Equine Veterinary Journal (Suppl.)*, v. 15, p. 75-78, 1993.

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

BUNCH S. E.; POLAK D. M. & HORNBUCKLE W. E. A modified laparoscopic approach for liver biopsy in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 187(10): 1032-1035, 1985.

CARNEIRO, G. F.; FERRERO, G. Measuring hormones to assess reproductive health. *California Thoroughbred Breeders Association Magazine*. Los Angeles, CA, v. 112(2), p. 118-119. February, 2000.

COUTINHO, I. F.; RODRIGUES, A. B. F.; DI FILIPPO, P. A.; CAMPOS, F. O.; SILVA, P. A. P. M.; CARVALHO, R. S.; ABREU, R. G.; SILVA, J. F. S. Descrição anatomotopográfica da técnica de ovariectomia através da fossa paralombar em duas éguas. *Revista Brasileira de Medicina Equina*, Ano 9, nº 50, p. 8-10, 2013.

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

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.

FERNANDES, C. A. Aspiração folicular transvaginal guiada por ultra-som em bovinos e equinos. *Monografia – Seminário I*, Programa de Pós-Graduação – Mestrado. FMVZ – UNESP. Botucatu, 2002.

FONSECA, J. S.; MARTINS, E. A. Curso de Estatística. São Paulo: *Atlas*, 2011.

FRANCO, V. C. L. Fertilidade de éguas crioulas após aspiração folicular. 2006. 41f. *Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)* – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

FRASER, H. M.; LUNN, S. F. Regulation and manipulation of angiogenesis in the primate corpus luteum. *Reproduction*, v. 121, p. 355-362, 2001.

FRY, R. C.; SIMPSON, T. L. & SQUIRES, T. J. Ultrasonic all y guided transvaginal oocyte recovery from calves treated with or without GnRH. *Theriogenology*, 49: 1077-1082, 1998.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. Tratado de histologia em cores. 1ª edição. Rio de Janeiro: *Guanabara Koogan*, 1999.

GENESER, R. J. Histologia. 3ª edição. Rio de Janeiro: *Guanabara Koogan*. 2003.

GETTY, R. Anatomia dos animais domésticos. Rio de Janeiro: Interamericana, p. 507-512, 1981.

GIBBONS, J. R.; BEAL, W. E.; KRISHER, R. L.; FABER, E. G.; PEARSON, R. E. & GWAZDAUSKAS, F. C. Effect of once versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. *Theriogenology* 42: 405-419, 1994.

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

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

HAFEZ, B., HAFEZ, E. S. E. Reprodução animal. 7. ed. Barueri-SP: *Manole*, p. 21-24, 59, 193-210, 2004.

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.

HUGHES, J. P.; STABENFELDT, G. H.; EVANS, J. W. Clinical 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*, 641p., 1972.

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.

JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N. W. *Veterinary Pathology*, 6. ed., Baltimore: Williams & Wilkins, 1997.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KENNEY, R. M. Aspiration of oocyte from mature and immature preovulatory follicles. *Theriogenology*, v. 34, p. 107-112, 1990.

MACHATKOVÁ, M.; JOKESOVÁ, E.; HORKY, F. & KREPELOVA, A. Utilization of the growth phase of the first follicular wave for bovine oocyte collection improves blastocyst production. *Theriogenology* 54: 543-550, 2000.

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.

MCCUR, P. Review of Ovarian Abnormalities in the Mare. IN: ANNUAL CONVENTION OF THE AAEP, 1998. Proceedings, 1998, v. 44, p. 125-133.

MCCUE, P. M., *Recent Advances in Equine Reproduction*, B. A. Ball (Ed.) Publisher: *International Veterinary Information Service*, Ithaca, New York, USA, 2000.

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

MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. *Equine Reproduction*. Philadelphia, London: *Lea & Febiger*, v. 1, chapter. 104, p. 943-949, 1992.

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

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.

NÉSPOLI, P. B.; GHELLER, V. A.; PEIXOTO, P. V.; FRANÇA, T. N.; CARVALHO, A. U.; GODOYDE ARAÚJO, D. K. & MALM C. Avaliação de técnicas de biópsia hepática em ovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 30(1): 29-36. Departamento de Clínica Médica Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2010.

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

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

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

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

REDMER, D. A.; REYNOLDS, L. P. Angiogenesis in the ovary. *Rev. Reprod.*, v. 1, p. 182-192, 1996.

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

RIET-CORREA, F.; SHILD, A. L.; LEMOS, R. A. A.; BORGES, J. R. J. *Doenças de Ruminantes e Equideos*. 3. ed. Santa Maria: *Palloti*, 722p., 2007.

SALAS, V. W. *et al.* Utilidad de técnicas histológicas para el diagnóstico de infección en piezas anatómicas. *Rev. Cubana Med. Milit.*; 33(2), 2004.



SANTL, B.; WENIGERKIND, H.; SCHERNTHANER, W.; MÖDL, J.; STOJKOVIC, M.; PRELLE, K.; HOLTZ, W.; BREM, G. & WOLF, E. Comparison of ultrasound-guided vs laparoscopic transvaginal ovum pick-up (OPU) in Simmental heifers. *Theriogenology* 50: 89-100, 1998.

SANTORO, P. N. Colheita de amostra testicular para biopsia em garanhões com agulha Tru-cut, 64f, *Dissertação (Mestrado em Ciência Animal)* – UENF – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes – RJ, 2014.

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

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

SCHERNTHANER, W.; WENIGERKIND, H.; STOJKOVIC, M.; PALMA, G. A.; MODL, J.; WOLF, E. & BREM, G. Pregnancy rate after ultrasound-guided follicle aspiration in non lactating cows from different breeds. *J. Vet. Med. A* 46: 33-37, 1999.

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, n. 4, p. 131-133, 1987.

SILVA, L. A.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Relationship between vascularity of the preovulatory follicle and establishment of pregnancy in mares. *Anim. Reprod.*, v. 3, p. 339-346, 2006.

SNEL-OLIVEIRA, M. V. *et al.* Histopathological ovum pick-up (OPU) in Nelore prepubertal calves. *Theriogenology*, v. 57, p. 687, 2002.

STUBBINGS, R. B. & WALTON, J. S. Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in Holstein cows. *Theriogenology* 43: 705-712, 1995.

TABET, A. F.; SILVA, L. C.; SHINHORINI, I. L. et al. Comparação entre duas técnicas de biópsia renal guiadas por laparoscopia em eqüinos. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 42, p. 150-156, 2005.

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

THOMASSIAN, A. Enfermidade dos cavalos. 4. ed. *Varela*, São Paulo–SP, p. 258-259, 2005.

TOSTES, R. A.; BANDARRA, E. P. Biopsia hepática em cães: relação entre qualidade da amostra e grau de conclusão do diagnóstico. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 54, p. 468-472, 2002.

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.

VANDERWALL, D. K.; WOODS, G. L. Severe internal hemorrhage resulting from transvaginal ultrasound-guided follicle aspiration in a mare. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 22, n. 2, p. 84-86, 2002.

VANDERWALL, D. K.; HYDE, K. J.; WOODS, G. L. Effect of repeated performance of transvaginal ultrasound-guided follicle aspiration on subsequent fertility in reproductively sound mares. *Theriogenology*, v. 64, p. 785, 2005.

VIANA, J. H. M.; FERREIRA, A. M.; CAMARGO, L. S. A.; SÁ, W. F.; ARAÚJO, M. C. C.; FERNANDES, C. A. C. & MARQUES JÚNIOR, A. P. Efeito da administração de progestágenos exógenos sobre a produção de oócitos em vacas submetidas à punção folicular. *Arq. Fac. Med. Vet. UFRGS* 28(1): 342, 2000.

VIANA, J. H. M.; FERREIRA, A. M.; CAMARGO, L. S. A.; SÁ, W. F.; ARAÚJO, M. C. C.; FERNANDES, C. A. C. & MARQUES JÚNIOR, A. P. Effect of the presence of non-regressed follicles after oocyte pick-up on follicular dynamics of *Bos indicus* cattle. *Theriogenology* 55: 334, 2001.

VIANA, J. H. M.; CAMARGO, L. S. A.; FERREIRA, A. M.; SÁ, W. F.; FERNANDES, C. A. C.; ARAÚJO, M. C. C.; RAMOS, A. A. & MARQUES JÚNIOR, A. P. Ovarian pre-stimulation with FSH, active immunization against inhibin and follicular aspiration results in Gir cattle (*Bos indicus*). *Theriogenology* 57: 630, 2002.

VIANA, J. H. M.; NASCIMENTO, A. A.; PINHEIRO, N. L.; FERREIRA, A. M.; CAMARGO, L. S. A.; SÁ, W. F.; JÚNIOR, A. P. M. Caracterização de sequelas subseqüentes à punção folicular em bovinos, *Pesq. Vet. Bras.*23(3): 119-124, jul./set. 2003.

VOS, P. L. A. M.; LOOS, F. A. M.; PIETERSE, M. C.; BEVERS, M. M.; TAVERNE, M. A. M. & DIELEMAN, S. J. Evaluation of transvaginal ultrasound-guided follicle puncture to collect oocytes and follicular fluids at consecutive times relative to the preovulatory LH surge in eCG/PG-treated cows. *Theriogenology* 41: 829-840, 1994.

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. D.; SERTICH, P.L. Effect of repeated collection of multiple endometrial biopsy specimens on subsequent pregnancy in mares. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 201, p. 438-440, 1992.

WEBER, J. A.; CAUSEY, R. C.; EMMANS, E. E. Induction of luteolysis in mares by ultrasound-guided intraluteal treatment with PGF<sub>2</sub>H. *Theriogenology*, v. 55, p. 1769-1776, 2001.

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.

ZELEZNIK, A. J.; SCHULER, H. M.; REICHERT, L. E. Gonadotropin-binding sites in the rhesus monkey ovary: role of the vasculature in the selective distribution of human chorionic gonadotropin to the preovulatory follicle. *Endocrinology*, v. 109, p. 356-362, 1981.