



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CÂMPUS DE BOTUCATU

**VESICULITE SEMINAL EM GARANHÕES: DIAGNÓSTICO,
EVOLUÇÃO E TRATAMENTO COM SUBSTÂNCIA
CAUTERIZANTE**

VERÔNICA FLORES DA CUNHA SCHEEREN

Botucatu, São Paulo
Fevereiro/2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CÂMPUS DE BOTUCATU

**VESICULITE SEMINAL EM GARANHÕES: DIAGNÓSTICO,
EVOLUÇÃO E TRATAMENTO COM SUBSTÂNCIA
CAUTERIZANTE**

VERÔNICA FLORES DA CUNHA SCHEEREN

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa

Botucatu – São Paulo
Fevereiro/2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Scheeren, Verônica Flores da Cunha.

Vesiculite seminal em garanhões : diagnóstico, evolução
e tratamento diagnóstico com substância cauterizante /
Verônica Flores da Cunha Scheeren. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia

Orientador: Frederico Ozanam Papa

Capes: 50504037

1. Equino - Reprodução. 2. Gônadas. 3. Vesícula
seminal. 4. Tratamento veterinário.

Palavras-chave: Equino; Garanhão; Glândula sexual
acessória; Lotagen®; Vesícula seminal.

Nome do autor (a): Verônica Flores da Cunha Scheeren

Data de Defesa da Dissertação: 8 de fevereiro de 2019.

Título: VESICULITE SEMINAL EM GARANHÕES: DIAGNÓSTICO, EVOLUÇÃO E TRATAMENTO COM SUBSTÂNCIA CAUTERIZANTE.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa

Presidente e Orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ - UNESP -
Botucatu / SP

Dr^a. Camila de Paula Freitas Dell'Aqua

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ - UNESP -
Botucatu / SP

Dr. Márcio Teoro do Carmo

Membro

Haras LUB Breeding – Cesário Lange / SP

*“A dor faz você mais forte,
o medo faz você mais corajoso,
a paciência faz você mais sábio.”*

Regina Souza

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Ernesto Pedro Scheeren e Josefina da Cunha Scheeren, meus irmãos Augusto e Marôla, por todo o incentivo, apoio e amor dedicado a mim esses anos todos. Esta conquista dedico a vocês.

À minha tia, Maria Luiza, pelo amor insubstituível, sei que estás me cuidando daí de cima. Às minhas “filhas”, Mulita e Guapa, meus grandes amores.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos, por sempre torcerem por mim nesta jornada e apoiarem minhas escolhas. Em especial ao meu irmão Augusto, por ter sido o responsável pela escolha na minha profissão e ter me proporcionado experiência na área desde pequena. És meu maior exemplo de profissional. Amo muito vocês.

À toda minha família, que mesmo de longe, sempre torceu por mim.

Às minhas amigas-irmãs, Bruna e Sarah, que há anos me acompanham e estão sempre em meu coração.

Às Mari's da minha vida, Mariana Gobato e Mariana Andrade, pela amizade e cumplicidade dedicada estes anos, vocês foram e são essenciais na minha vida!

Ao meu orientador, Prof. Frederico Ozanam Papa, por ter me aceitado em seu grupo de pesquisa e acreditado na minha capacidade. Muito obrigada pelos ensinamentos e conversas! Sempre terás minha admiração e respeito!

Ao Bruno, pelo apoio, amor, companheirismo e por ter me auxiliado nos meses de experimento.

Aos colegas e amigos do CERAN, Mariana, Thaís, Lucas Canuto, Lucas Troncarelli e Pati pela ajuda no desenvolvimento deste projeto. Serei sempre grata a todo o auxílio de vocês.

Aos amigos, Ramona, Alexande, Rafa, Lorenzo, Eriky, Guilherme e Aldine, pela amizade que construímos e que me trouxeram muitas alegrias e ensinamentos.

À Tia Marilu e Tio Fran, que me acolheram em sua família e amenizaram a minha saudade de casa.

À Camila e Zé Dell'Aqua pela amizade, ensinamentos e ajuda na execução deste trabalho.

Ao Prof. Marcos Watanabe, por me acompanhar nesses dois anos, sempre disposto a ajudar, ensinar e pelo excelente convívio e amizade.

À Yamê, por ter sempre se mostrado tão solícita e me auxiliado no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Marco, Prof. João, Prof. Nereu e Prof^a. Fabiana pela amizade e conhecimentos transmitidos.

Ao Laboratório de Microbiologia, em especial a Fernando Paganini e Prof. Márcio Garcia, pelos cultivos microbiológicos.

À Prof^ª. Noeme e Carlos Eduardo, pela colaboração na descrição histopatológica e ensinamentos transmitidos.

A todos os residentes, estagiários e funcionários, em especial ao Felipe e Edivaldo, que auxiliaram durante esta pesquisa.

À Universidade Federal de Santa Maria pela minha formação acadêmica, a todos os professores que participaram desta etapa e aos amigos que fiz, que até hoje os carrego no coração e sinto saudades.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Unesp – Botucatu/SP pelas oportunidades oferecidas e pelo meu crescimento profissional.

À Botupharma, que muito auxiliou no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Haras Agromen, em especial ao Dr Cássio, pelo empréstimo dos animais. Eles foram fundamentais para o desenvolvimento desta pesquisa. Assim como, ao Apolo e Paladino, que tanto me ajudaram para a concretização deste trabalho.

Aos membros da banca, Márcio e Camila, por terem aceitado o convite e fazerem parte de um momento tão importante da minha vida.

À CAPES pela bolsa de Mestrado, fundamental à realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

CASA: análise computadorizada do movimento espermático;
cm³: centímetro cúbico;
CRISP₃: cisteína do tipo 3
DIC: microscopia de contraste de interferência diferencial de fase;
FMVZ: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia;
HTMO: Hamilton Thorne Research;
IMPA: integridade de membrana plasmática;
IP: iodeto de propídio;
mL: mililitro;
mM: milimolar;
mm³: milímetro cúbico;
mOsm: miliosmol;
MP: motilidade progressiva;
MT: motilidade total;
RAP: porcentual de espermatozoides rápidos
ROS: espécies reativas de oxigênio;
SEM: semana;
SPTZ: espermatozoides;
UNESP: Universidade Estadual Paulista;
v/v: volume por volume;
μL: microlitro;
μm: micrômetro;
° C: graus Celsius.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Características seminais, aspectos ultrassonográficos e endoscópicos das vesículas seminais do Garanhão 1.....	37
TABELA 2 - Características seminais, aspectos ultrassonográficos e endoscópicos das vesículas seminais do Garanhão 2.....	38
TABELA 3 - Características seminais, aspectos ultrassonográficos e endoscópicos das vesículas seminais do Garanhão 3.....	39

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Desenho experimental.....	29
FIGURA 2 - Classificação das diferentes colorações dos ejaculados. (A) Normospermia – N. (B) Piospermia – P. (C) Ejaculado com coloração alaranjada após tratamento experimental – L. (D) ejaculado com coloração parcialmente alaranjada –PL. (E) Hemospermia leve -H1. (F) Hemospermia acentuada- H2.....	30
FIGURA 3 - Classificação das imagens ultrassonográficas conforme a quantidade e característica do conteúdo (setas). (A) Vesícula seminal com ausência de conteúdo – SC. (B) Vesícula seminal com discreto conteúdo ($\leq 14\text{mm}$) hipoecogênico –DC. (C) Vesícula seminal com presença abundante de conteúdo ($\geq 15\text{mm}$) hipoecogênico –AC. (D) Vesícula seminal com presença moderada de conteúdo hiperecogênico – CH.....	32
FIGURA 4 - Classificação do aspecto endoscópico das vesículas seminais por meio da endoscopia. (A) Vesícula seminal com aspecto normal – VN. (B) Vesícula seminal contaminada, apresentando secreção purulenta –VI. (C) Vesícula seminal parcialmente fechada após o tratamento experimental –VPF. (D) Vesícula seminal com aspecto fibrosado após o tratamento experimental -VPT.....	33
FIGURA 5 - Testículo e epidídimo esquerdo apresentando epididimite do garanhão 1.....	41
FIGURA 6 – Características histopatológicas das vesículas seminais. (A) Corte histológico de vesícula seminal sadia (-9Sem), apresentando epitélio colunar simples não ciliado e estroma fibromuscular, com áreas de hemorragia discreta (seta) (3/3). (B) Atrofia do epitélio secretório da vesícula seminal associado a inflamação mononuclear intensa após 7 semanas de infecção (-1Sem) (3/3). (C) Estroma fibromuscular com discreto infiltrado inflamatório (seta) após 30 dias do tratamento (4Sem) (2/3). (D) Displasia do epitélio glandular (seta) com infiltrado inflamatório misto após 30 dias do tratamento (4Sem) (1/3).....	44

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	1
INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	2
REVISÃO DE LITERATURA	4
1. Glândulas sexuais acessórias na espécie equina.....	4
2. Vesiculite seminal.....	6
2.1 Etiopatogenia.....	7
2.2 Sinais clínicos.....	8
2.3 Diagnóstico	9
2.3.1 Palpação e exame ultrassonográfico.....	10
2.3.2 Exame endoscópico.....	11
2.4 Tratamento.....	12
2.4.1 Ácido metacresolsulfônico e formaldeído.....	13
2.5 Prognóstico.....	14
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	15
REFERÊNCIAS.....	16
HIPÓTESE.....	22
OBJETIVOS.....	22
CAPÍTULO 2	23
ARTIGO 1: UTILIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIA CAUTERIZANTE (LOTAGEN®) NO TRATAMENTO DA VESICULITE SEMINAL EM GARANHÕES	

SCHEEREN, V.F.C. VESICULITE SEMINAL EM GARANHÕES: DIAGNÓSTICO, EVOLUÇÃO E TRATAMENTO COM SUBSTÂNCIA CAUTERIZANTE. Botucatu – SP. 2018. 62p. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

RESUMO

Os garanhões possuem um conjunto completo de glândulas sexuais acessórias, compostas pelas bulbouretrais, a próstata, vesículas seminais e ampolas dos ductos deferentes. Dentre as afecções que acometem essas estruturas, a vesiculite seminal é a de maior ocorrência, consistindo na colonização de uma ou ambas as vesículas por bactérias, sendo a *Pseudomonas aeruginosa* a mais frequente. No ejaculado é observada uma grande percentagem de neutrófilos e hemácias podem estar presentes, caracterizando os quadros de piospermia e hemospermia, respectivamente. O diagnóstico definitivo é realizado por meio da endoscopia das vesículas, onde é possível visualizar o conteúdo purulento, associado à cultura bacteriana do lavado da glândula. O tratamento é desafiador, pois a antibioticoterapia apresenta baixa eficácia. Visto a importância desta enfermidade e a dificuldade do tratamento, este estudo teve como objetivo abordar os principais aspectos e avaliar a eficácia do ácido metacresolsulfônico e formaldeído para o tratamento da vesiculite seminal em garanhões, considerando os parâmetros seminais e características histopatológicas das vesículas seminais. Três garanhões adultos (n=3), com aspectos reprodutivos normais, tiveram a vesiculite seminal induzida por *Pseudomonas aeruginosa* através da endoscopia. Após 8 semanas de infecção, foi realizado tratamento local utilizando solução a 30% do ácido metacresolsulfônico e formaldeído (Lotagen®). O experimento consistiu em avaliações semanais, antes e após infecção experimental e após tratamento. Foram avaliadas as características do sêmen e das vesículas seminais, e cultura bacteriana do ejaculado e lavado vesicular. Alterações na coloração do sêmen foram observadas (3/3), enquanto que volume do ejaculado, concentração e motilidade espermática apresentaram variações fisiológicas (2/3), com redução no percentual de neutrófilos no sêmen e oscilações na integridade de membrana plasmática e acrossomal (3/3). A cultura bacteriana do sêmen após tratamento foi negativa (2/3), e um garanhão apresentou cultura positiva para *Streptococcus equi* subsp *zooepidemicus*, que desenvolveu epididimite bilateral. A ultrassonografia das vesículas mostrou variações no tamanho, quantidade e característica do conteúdo, com valores dentro da normalidade. Na endoscopia após infecção, as vesículas continham conteúdo purulento e posteriormente ao tratamento verificou-se a oclusão parcial das glândulas (2/3) e a mucosa mostrou-se fibrosada (1/3). As vesículas sadias apresentaram epitélio colunar simples, que após a infecção sofreu atrofia associado a intenso infiltrado inflamatório (3/3). Após 4 semanas do tratamento, observou-se um estroma fibromuscular com discreta inflamação (2/3) e displasia epitelial com infiltrado inflamatório misto (1/3). A cultura do lavado vesicular foi negativo após tratamento (3/3). A solução com ácido metacresolsulfônico e formaldeído a 30% foi eficaz para o tratamento da vesiculite seminal em garanhões, evitando o crescimento bacteriano de *P.aeruginosa*, diminuindo a porcentagem de neutrófilos no ejaculado e mantendo a qualidade seminal dos garanhões (2/3).

Palavras-chave: equino, garanhão, glândula-sexual-acessória, Lotagen®, vesícula-seminal.

SCHEEREN, V.F.C. SEMINAL VESICULITIS IN STALLIONS: DIAGNOSTIC, EVOLUTION AND TREATMENT WITH CAUTERIZING SUBSTANCE. Botucatu – SP. 2018. 62p. São Paulo State University - School of Veterinary Medicine and Animal Science.

ABSTRACT

Stallions have a complete set of accessory sex glands, composed of the bulbourethral, prostate gland, seminal vesicles and ampullae. Among the diseases that affect these structures, seminal vesiculitis is the most frequent, consisting the colonization of one or both vesicles by bacteria, whose *Pseudomonas aeruginosa* is the most frequent. In ejaculate is observed a large percentage of neutrophils and erythrocytes may be present, characterizing piospermia and hemospermia, respectively. The definitive diagnosis is made through the endoscopical evaluation of the seminal vesicles, where it is possible to visualize the purulent contents, associated to gland lavage and bacterial culture. Treatment is challenging because antibiotic therapy is ineffective. Considering the importance of this disease and the difficulty of treatment, this study aims to address the most important aspects and evaluate the efficacy of metacresolsulfonic acid and formaldehyde for the treatment of vesiculitis in stallions, considering seminal parameters and histopathological characteristics. Three adult stallions (n = 3), with normal reproductive aspects, had seminal vesiculitis induced by *Pseudomonas aeruginosa* through endoscopy. After 8 weeks of infection, local treatment was performed using 30% solution of metacresolsulfonic acid and formaldehyde (Lotagen®). The experiment consisted of weekly evaluations, before and after experimental infection and after treatment. The characteristics of semen and seminal vesicles, and bacterial culture of ejaculate and vesicular lavage were evaluated. Changes in semen color were observed (3/3), while ejaculate volume, concentration and sperm motility presented physiological variations (2/3), with reduction in the percentage of neutrophils in the semen and oscillations in plasma and acrosomal membrane integrity (3/3). The bacterial culture of semen after treatment was negative (2/3), and a stallion presented a positive culture for *Streptococcus equi* subsp *zooepidemicus*, which developed bilateral epididymitis. Ultrasonography of the vesicles showed variations in the size, quantity and characteristic of the contents, with values within normality. In endoscopy after infection, the vesicles contained purulent contents and after treatment the partial occlusion of the glands (2/3) was verified and the mucosa was fibrosed (1/3). The healthy vesicles presented simple columnar epithelium, which after the infection suffered atrophy associated with intense inflammatory infiltrate (3/3). After 4 weeks of treatment, a fibromuscular stroma with mild inflammation (2/3) and epithelial dysplasia with mixed inflammatory infiltrate (1/3) was observed. Vesicular lavage culture was negative after treatment (3/3). The solution with 30% of metacresolsulfonic and formaldehyde was effective for the treatment of seminal vesiculitis in stallions, avoiding the bacterial growth of *P.aeruginosa*, reducing the percentage of neutrophils in the ejaculate and maintaining the seminal quality of stallions (2/3).

Key-words: accessory-sex-gland, equine, Lotagen®, seminal-vesicle, stallion.

“A lei da mente é implacável.

O que você pensa, você cria;

O que você sente, você atrai;

O que você acredita, torna-se realidade.”

Buda.



CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As biotecnologias da reprodução, tais como a coleta de sêmen e inseminação artificial são cada vez mais frequentes. Essas técnicas possuem vantagens que vão desde a segurança para os animais, evitando a transmissão de doenças sexualmente transmissíveis e acidentes durante a monta natural, até a otimização dos garanhões e disseminação do material genético, pelo transporte do sêmen criopreservado. Muitos estudos são desenvolvidos com o objetivo de aumentar as taxas de concepção, uma vez que grande parte dos animais quando se tornam campeões da raça, apresentam idade avançada, assim existe uma alta incidência de garanhões subférteis, resultando em perdas genéticas e econômicas importantes.

Inúmeros fatores etiológicos podem causar subfertilidade em garanhões, o que dificulta o diagnóstico. Dentre eles, a vesiculite seminal é caracterizada pela infecção bacteriana da vesícula seminal, uma das quatro glândulas sexuais acessórias do garanhão. Apesar de ser uma enfermidade pouco frequente na espécie equina, ocasiona perdas importantes e oferece um alto risco ao garanhão e às éguas envolvidas no programa reprodutivo devido à contaminação bacteriana (VARNER et al, 2000). O histórico geralmente é associado com subfertilidade ou infertilidade e alterações nas características do ejaculado, como hemospermia e/ou piospermia. A alta concentração de bactérias, polimorfonucleares e hemácias no sêmen levam à diminuição da motilidade espermática, aglutinação, precipitação e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio. Todas essas alterações afetam negativamente a qualidade e longevidade dos espermatozoides (BAUMBER et al., 2002; VARNER; SCHUMACHER, 2011).

O tratamento convencionalmente preconizado é a antibioticoterapia sistêmica, que tem pouca eficácia devido à baixa vascularização das glândulas, à farmacocinética e farmacodinâmica dos antibióticos utilizados. Dessa forma, a baixa concentração medicamentosa no interior da glândula é incapaz de controlar o crescimento bacteriano. Atualmente, a melhor indicação terapêutica é a antibioticoterapia local guiada por endoscópio, podendo estar ou não associada à terapia sistêmica. Ainda assim, os resultados são inconsistentes e as taxas de recidiva da infecção são altas (FENNEL et al., 2010; MIRAGAYA et al., 2011).

Na tentativa de estabelecer uma nova terapêutica, o estudo propôs a utilização do ácido metacresolsulfônico e formaldeído (Lotagen[®]) para o tratamento local da vesiculite seminal em garanhões. Salienta-se que tais fármacos já são utilizados para tratamento da endometrite em fêmeas bovinas (GILBERT et al., 1985) e de camelos (ALI et al., 2012) com ótimas taxas de sucesso.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Glândulas sexuais acessórias na espécie equina

O conjunto de glândulas sexuais acessórias do garanhão inclui um par de glândulas bulbouretrais, a próstata, um par de vesículas seminais e um par de ampolas dos ductos deferentes. Todas produzem secreções que irão compor o plasma seminal (TIBARY, 2007). A composição e o volume do plasma seminal variam conforme as espécies (HAFEZ; HAFEZ, 2004), assim como seus efeitos na longevidade do sêmen na espécie equina, diferenciando entre indivíduos (KAREKOSKI; KATILA, 2008).

As glândulas sexuais acessórias estão localizadas no interior da cavidade pélvica do macho, com aberturas voltadas para o interior da uretra pélvica e dimensões que variam conforme a raça. As bulbouretrais estão posicionadas lateralmente à uretra, próximo ao arco isquiático, medindo cerca de 3,8 x 2,4 cm (POZOR; McDONNELL, 2002). A próstata é firme e nodular, com lobos medindo cerca de 7 x 4 x 1 cm cada e estão ligados por um istmo de aproximadamente 3 cm de comprimento (AMANN, 2011). As ampolas são dilatações dos ductos deferentes, localizadas medialmente às vesículas seminais, apresentando cerca de 1 cm de diâmetro (POZOR; MCDONNEL, 2002). Já as vesículas seminais, também denominadas de glândulas vesiculares, estão localizadas laterais ao colo da bexiga e às ampolas, se estendendo craniolateralmente até a região posterior do abdômen (VARNER et al., 2000).

As vesículas seminais são saculações de formato piriforme medindo de 12 a 20 cm de comprimento e 5 cm de diâmetro (MONTEIRO, 2017). Cada vesícula se abre no lúmen da uretra pélvica por uma dilatação da mucosa localizada dorsalmente, denominada de colículo seminal (VARNER et al., 2000), onde também é o local de excreção das ampolas dos ductos deferentes (BALL, 2008). Em cada lado do colículo seminal há uma abertura das glândulas, podendo ser de maneira independente, ou pode haver uma união destes, formando um ducto comum, denominado de ducto ejacatório. Logo, podem estar presentes quatro ou duas aberturas no colículo seminal, respectivamente (CHENIER, 2009).

Tanto a estrutura quanto as características histológicas da vesícula seminal variam entre as espécies. No bovino, são compactas e lobuladas (BLANCHARD et al.,

2001), e possuem epitélio pseudo-estratificado, no qual as glândulas tubuloalveolares são separadas por abundante musculatura lisa (BACHA Jr, 2003). No equino, as vesículas apresentam epitélio colunar estratificado, separado por um delgado tecido conjuntivo e vasos de diferentes calibres ao redor (SCHEEREN et al., 2018).

Pelo exame transretal é difícil palpar as vesículas seminais (CHENIER, 2009), assim como identificá-las pela ultrassonografia, quando estão desprovidas de fluido (WEBER; WOODS, 1993). O tamanho e a quantidade de conteúdo no interior das glândulas acessórias são afetados diretamente pelo grau de estímulo sexual do garanhão e intervalo de tempo entre a última ejaculação e o exame (POZOR; McDONNELL, 2002). Monteiro (2017) mostrou que após estimulação sexual há alterações no tamanho, forma e aparência ultrassonográfica de todas as glândulas.

A vesícula seminal de um garanhão sadio em repouso possui aparência ultrassonográfica homogênea, as paredes musculares permanecem achatadas dorso-ventralmente, sendo mais hiperecóticas que os tecidos adjacentes, e quantidades variáveis de fluido podem ser observadas (TURNER, 1998; TURNER, 2014). Após a excitação, há aumento da quantidade de líquido no lúmen, as vesículas se distendem e adotam formato mais arredondado. O fluido geralmente é anecóico (MONTEIRO, 2009), mas foram observadas variações na ecogenicidade do conteúdo entre garanhões (POZOR; McDONNELL, 2002).

As secreções produzidas pelas glândulas sexuais acessórias e pelos epidídimos constituem a porção fluida do sêmen, o plasma seminal, que junto dos espermatozoides, constituem o ejaculado. O processo ejaculatório no garanhão é constituído por uma série de jatos, variando em concentração espermática, volume e composição bioquímica (KAREKOSKI, 2011). A fração pré-espermática é responsável pela limpeza da uretra e possui aspecto aquoso, proveniente das glândulas bulbouretrais e próstata. A fração rica em espermatozoides é composta pelos três primeiros jatos ejaculados, proveniente da secreção da rede *testis*, epidídimos e ampolas dos ductos deferentes, com uma contribuição pequena das secreções das glândulas acessórias. A fração pobre em espermatozoides se caracteriza pelos jatos remanescentes, secretados pelas vesículas seminais, que eliminam as poucas células espermáticas restantes ao longo da uretra (TURNER, 2011), formando a fração gel do ejaculado, cujo volume varia entre garanhões (MANCILL, 2010) e a sazonalidade (POZOR; McDONNELL, 2002).

Essa secreção é transparente ou ligeiramente opaca, com característica viscosa. Nas demais espécies, as vesículas secretam grandes quantidades de ergotioneína e frutose, todavia, no garanhão, os ácidos láctico e cítrico são mais prevalentes (KAREKOSKI, 2011), sendo este último considerado marcador de fluido vesicular (MAGISTRINI et al., 1995). Também estão presentes na secreção das vesículas seminais algumas enzimas, como as glicosidases, envolvidas nas alterações espermáticas que antecedem a fertilização, e três tipos de anidrase carbônica, relacionadas à regulação do pH seminal e concentração de bicarbonato.

Dentre as proteínas presentes no plasma seminal, a proteína rica em Cisteína Tipo III (CRISP-3) é produzida pelas glândulas vesiculares (KAREKOSKI, 2011). Segundo Troedsson et al. (2010) essa proteína possui a função de proteger os espermatozoides vivos da ação por polimorfonucleares, permitindo sua sobrevivência e chegada até a tuba uterina. Os íons cálcio e magnésio são produzidos pela vesícula seminal e são importantes na regulação da fisiologia espermática, relacionados ao processo de capacitação (GUASTI et al., 2012). O magnésio também é considerado um marcador de secreção das vesículas (WONG et al., 2001).

2. Vesiculite seminal

Dentre as afecções envolvendo as glândulas sexuais acessórias em equinos, a vesiculite seminal é a mais frequente (TIBARY et al., 2009). Consiste na colonização de uma ou ambas vesículas por bactérias, nas quais há acúmulo de conteúdo purulento no interior da(s) glândula(s), que pode ser excretado no sêmen durante a ejaculação (TIBARY; RODRIGUEZ, 2011).

Esta alteração se caracteriza por inflamação difusa da vesícula, causando alterações físico-químicas seminais e, em alguns casos, distúrbios ejaculatórios. Isso leva a redução da longevidade e fertilidade do sêmen, classificando o animal acometido como impróprio à atividade reprodutiva, por se tornar disseminador de patógenos transmissíveis sexualmente (SANCLER-SILVA, 2014).

A porção distal da uretra e o pênis são fisiologicamente colonizados por uma população de bactérias não patogênicas, que representam a flora normal (ROTA et al., 2011), sendo estas *Escheria coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus alfa*, *beta*, e

não hemolítico, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium*, *Proteus* spp., *Bacillus* spp. (PICKET et al., 1999; EDWARDS, 2008). Os fatores que predisõem a colonização do pênis não estão esclarecidos, porém é sabido que a lavagem e a desinfecção do órgão estão associadas à remoção da flora comensal, favorecendo o crescimento de bactérias oportunistas como a *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* (BOWEN et al., 1982; LU; MORRESEY, 2006).

Quando as bactérias estão presentes em outras regiões do trato reprodutivo, caracterizam uma alteração (ROTA et al., 2011). Apesar de pouco comum em garanhões, a vesiculite seminal assume importante papel pelo seu caráter persistente e de difícil tratamento (VARNER et al., 2000). Além do mais, o risco de transmissão venérea é alto, assim como os efeitos deletérios na qualidade seminal e fertilidade (SAMPER; TIBARY, 2006).

2.1 Etiopatogenia

Dentre as bactérias encontradas colonizando a vesícula seminal estão *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *E.coli* e *P. vulgaris* (SAMPER; TIBARY, 2006; PINTO et al., 2014), sendo a *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* as mais frequentes (BLANCHARD et al., 1988; MALMGREN; SUSSEMILCH, 1992; LU; MORRESSEY, 2006; CONBOY, 2006). Há relatos de vesiculite seminal por *Brucella abortus* e *Acinetobacter calcoaceticus*, apesar de pouco frequentes (VARNER et al., 2000; VARNER; SCHUMACHER, 2011).

Outros agentes etiológicos como protozoários, vírus, clamídia, micoplasma e ureaplasma podem estar associados com o desenvolvimento de vesiculite seminal em outras espécies, assim como em humanos (VIGNERA et al., 2011), porém em equinos esses microorganismos nunca foram isolados nas vesículas seminais de garanhões com a enfermidade (VARNER; SCHUMACHER, 2011).

A *P. aeruginosa* é uma bactéria oportunista, Gram-negativa, aeróbia e formadora de biofilme, sendo responsável por infecções em diversos sistemas do organismo, tanto em humanos quanto em animais. Possui um especializado *quorum sensing*, capaz de debelar o sistema imune do hospedeiro (KARIMINIK et al., 2017). É

multirresistente aos antimicrobianos disponíveis e está desenvolvendo resistência aos fármacos mais modernos, como o imipenem (HE et al., 2018).

A *E. coli* e *K. pneumoniae* são bactérias Gram-negativas, aeróbia ou anaeróbia facultativa, respectivamente. Assim como a *P. aeruginosa*, são multirresistentes aos antibióticos disponíveis, estando envolvidas em casos de pacientes septicêmicos (STOESSER et al., 2013).

A patogenia desta infecção permanece desconhecida (PEARSON et al., 2013), todavia acredita-se que existam potenciais rotas de contaminação, que são através da via ascendente pela uretra, da via descendente pelo trato urinário, da via hematógena e linfática ou pela invasão direta do tecido periglandular (VARNER; SCHUMACHER, 2011).

2.2 Sinais clínicos

Na maioria dos casos, os garanhões acometidos pela vesiculite seminal não demonstram sinais clínicos, se apresentam sem hipertermia e nenhuma alteração nos parâmetros vitais. Geralmente os animais não manifestam dor durante a micção, defecação ou cópula (VARNER; SCHUMACHER, 2011). Todavia, algumas alterações são relatadas em poucos animais, como disfunção ejaculatória, evidenciando dor no momento da ejaculação, o que pode tornar o garanhão relutante a realizar coberturas (TIBARY & RODRIGUEZ, 2011). Freestone et al. (1993) relataram um caso de um garanhão que apresentou sinais de cólica por um período de quatro meses em decorrência de vesiculite unilateral. Ainda, McDonnell (2008) afirma que a infecção da glândula pode induzir ao comportamento de auto-mutilação, como rolar, pinotear, escoicear o abdômen, morder e olhar para o flanco.

A suspeita da enfermidade geralmente ocorre quando há histórico de subfertilidade ou infertilidade, associado com alterações nas características do ejaculado (SAMPER; TIBARY, 2006). O sêmen de um garanhão saudável apresenta coloração branca ou branco-acinzentada (TIBARY et al., 2009) e quando acometido pela vesiculite a coloração pode variar de amarelado a avermelhado devido ao conteúdo

purulento e sangue, denominados de piospermia e hemospermia, respectivamente (VARNER; SCHUMACHER, 2011).

Pelo exame citológico do sêmen, podem ser identificadas quantidade variável de polimorfonucleares e bactérias. O sêmen logo após a ejaculação pode apresentar boa qualidade, porém a longevidade geralmente é reduzida (VARNER et al., 2000). Isso se deve, principalmente, à presença de neutrófilos que induzem a precipitação e aglutinação das células, afetando negativamente a cinética espermática (TIBARY; RODRIGUEZ, 2011).

Os efeitos provocados pelos neutrófilos no sêmen estão relacionados com o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), uma vez que os leucócitos são capazes de produzir EROs cem vezes mais que os espermatozoides (BAUMBER et al., 2002). As EROs possuem efeito prejudicial às células espermáticas, como lesões na membrana, capacitação precoce, fragmentação do DNA e injúrias mitocondriais. Ainda, as bactérias presentes no sêmen, junto das ROS, podem induzir à apoptose espermática (VIGNERA et al., 2011).

2.3 Diagnóstico

O diagnóstico presuntivo da vesiculite seminal é feito após as análises macro e microscópicas do sêmen. Para determinar a origem dos neutrófilos presentes no ejaculado deve-se examinar todo o trato reprodutivo, pois essas células podem ter origem de lesões penianas, da uretra ou do trato urinário (VARNER et al., 2000).

A cultura e isolamento de bactérias do pênis, uretra e sêmen devem ser realizadas. Garanhões com suspeita de vesiculite seminal possuem uma flora potencialmente patogênica no pênis e prepúcio (VARNER, 2016). O sêmen deve ser coletado de forma higiênica, prevenindo contaminação iatrogênica. O crescimento massivo e isolado de uma bactéria em todas as amostras é consistente com infecção do trato reprodutivo interno (VARNER, SCHUMACHER, 2011).

Ainda, outra técnica de auxílio diagnóstico para identificar a fonte contaminação do sêmen é a coleta fracionada (TIBARY; RODRIGUES, 2011). Por este método é feita a separação do sêmen em fração rica em espermatozoides (primeiros dois

a três jatos) e fração pobre (jatos posteriores) (OLIVEIRA et al., 2017). Mediante a visualização, citologia e cultura de cada fração é sugestivo um quadro de vesiculite seminal ou ampulite, porém sem especificar o local exato da infecção (LU; MORRESEY, 2006). A principal vantagem é que esta é uma técnica não invasiva e que permite o diagnóstico presuntivo desta enfermidade.

2.3.1 Palpação e exame ultrassonográfico

O exame dos órgãos genitais internos pode ser realizado pela palpação e ultrassonografia transretal. É imprescindível uma adequada contenção do garanhão para que se proceda o exame, e a sedação ou tranquilização podem ser necessárias em garanhões nervosos (BRINSKO, 2011).

Dentre as alterações encontradas na palpação retal em garanhões com vesiculite seminal o aumento de tamanho é o mais frequente, seguido por consistência firme (MALMGREN & SUSSEMILCH, 1992; PINTO et al., 2014) e sensibilidade ao toque nas vesículas seminais (FREESTONE et al., 1993). As glândulas podem se apresentar com característica lobulada, no entanto, a palpação geralmente não fornece informações diagnósticas suficientes. Alterações no tamanho, forma e consistência podem não ser observadas, o que não exclui a presença da infecção (VARNER, 2000; FENNEL et al., 2010).

Em garanhões acometidos por essa enfermidade, pode ser observado um espessamento da parede da glândula e o conteúdo em seu interior é de caráter hiperecogênico (MALMGREN & SUSSEMILCH, 1992), ou conteúdo anecóico, de característica normal (BALL, 2008). O acúmulo de conteúdo purulento é visto pelo aumento de tamanho do lúmen glandular em corte transversal e variações na ecogenicidade e presença de floculações no líquido, representadas por pontos hiperecogênicos (EDWARDS, 2008; MANCILL, 2010). Em casos crônicos, as vesículas podem se tornar firmes, diminuídas e sem conteúdo (SAMPER; TIBARY, 2006).

Alterações no tamanho e característica do conteúdo entre as vesículas seminais de um mesmo garanhão e entre garanhões foram observadas por Pozor e McDonnell (2002). Alguns animais, sabidamente saudáveis, apresentaram aumento da ecogenicidade no lúmen glandular, sugerindo que não necessariamente a

hiperrecogenicidade indica infecção. Os autores ainda sugerem que as alterações podem estar relacionadas à estação do ano e intervalo de coleta de sêmen, previamente ao exame.

Embora em alguns casos a ultrassonografia não revele alterações decorrentes de vesiculite, esta deve ser utilizada no exame andrológico (BALL, 2008). Essa ferramenta auxilia no diagnóstico da vesiculite seminal, porém não é crucial já que existem inúmeras variações no mesmo e entre animais (POZOR, 2005).

2.3.2 Exame endoscópico

O diagnóstico definitivo da vesiculite seminal é feito pela endoscopia das vesículas seminais (VARNER et al., 2000). Utilizando o equipamento é possível acessar as glândulas, colher material para cultura e antibiograma e infundir medicamentos e/ou substâncias em seu interior mediante a cateterização dos ductos ejaculatórios (TIBARY; RODRIGUEZ, 2011).

Para realização do exame é necessário um fibroscópio ou videoendoscópio flexível, de no mínimo 100 cm de comprimento e diâmetro de no máximo 10 mm. Para garanhões de grande porte, um endoscópio mais longo seja necessário para acesso das vesículas, assim como um endoscópio mais fino para animais de pequeno porte. Cateter de polietileno, pinça de biópsia, solução fisiológica, seringa e tubos estéreis são necessários para coleta de material e envio para cultura (VARNER, 2014).

Com o animal sedado é feita a higienização do pênis, o endoscópio é inserido na uretra peniana, progredindo até que se alcance a uretra pélvica e sejam visualizadas as aberturas das glândulas sexuais acessórias. Dentre as quatro glândulas sexuais acessórias, apenas a vesícula seminal é passível de ser acessada, por conter um lúmen amplo e complacente (TIBARY, 2007).

O acesso a cada vesícula seminal é feito pela cateterização do seu ducto na abertura no colículo seminal, passando um cateter pelo canal de biópsia do endoscópio. O lúmen é inspecionado e pode se observar o acúmulo de conteúdo purulento, erosões no epitélio da vesícula (PINTO, 2014), e quantidade variáveis de sangue (PEARSON et al., 2013).

Amostras do interior da glândula podem ser colhidas para citologia e cultura (VARNER, 2014), e biopsia para exame histopatológico do epitélio (SCHEEREN et al., 2018). Com base nos resultados encontrados é confirmado o diagnóstico de vesiculite seminal (TIBARY, 2007).

2.4 Tratamento

O tratamento da vesiculite seminal geralmente é difícil e sem sucesso, sendo relatado por vários autores (BLANCHARD et al., 1988; MALMGREN; SUSSEMILCH, 1992; FENNEL et al., 2010), evoluindo para uma condição crônica (BLANCHARD et al., 1988). A efetividade no tratamento é pouco relatada (VARNER; SCHUMACHER, 2011; PINTO et al., 2014).

A dificuldade se deve a características de farmacodinâmica e farmacocinética dos medicamentos disponíveis. A maioria dos antimicrobianos utilizados não alcança a glândula em concentrações adequadas para serem efetivos (SAMPER; TIBARY, 2006). O antibiótico escolhido deve possuir alguns atributos para chegar no interior da vesícula, como: alto pKa e alta solubilidade em lipídeos (PEARSON et al., 2013), baixa massa molecular e afinidade de ligação a proteínas plasmáticas (WAGENLEHNER et al., 2005).

O tratamento antimicrobiano em garanhões leva em consideração, além das características mencionadas acima, à sensibilidade da bactéria na escolha do antibiótico utilizado. De modo geral, os fármacos que possuem melhor penetração na vesícula seminal são a enrofloxacin e sulfonamida-trimetropim. (VARNER; SCHUMACHER, 2011), por outro lado, a gentamicina se mostra incapaz de penetrar nas vesículas seminais de garanhões (BLANCHARD et al., 1988).

Estudos posteriores relatam sucesso com a utilização de sulfonamida-trimetropin (FREESTONE et al., 1993) e enrofloxacin (BLANCHARD et al., 2002) via sistêmica. A utilização de penicilina procaína também se mostrou efetiva em alguns garanhões (FENNEL et al., 2010). Entretanto, Blanchard et al. (2002) relataram um caso em que o tratamento com enrofloxacin não foi eficaz para combater a vesiculite seminal por *Acinetobacter calcoaceticus*.

Outra opção terapêutica é a infusão local do antimicrobiano na vesícula seminal. Segundo Miragaya et al. (2011) esta é a técnica de eleição para tratamento da enfermidade, via endoscopia. Inicialmente, as vesículas seminais são lavadas com um alto volume de solução fisiológica, para remover o conteúdo purulento e debris no interior da glândula. Em seguida, o antibiótico é instilado diretamente no lúmen. Essas aplicações devem ser repetidas por no mínimo cinco dias consecutivos (TIBARY; RODRIGUEZ, 2011).

Recentemente, Pinto et al. (2014) relataram um caso de sucesso no tratamento de um garanhão com vesiculite seminal por *Klebsiella pneumoniae*, utilizando imipenem-cilastatina local. Entretanto, em outro estudo, a antibioticoterapia local guiada por endoscópio em cinco garanhões mostrou eficácia temporária, com recidiva 30 dias após final do tratamento em todos os indivíduos testados (SANCLER-SILVA, 2014).

Existe ainda a associação das terapias local e parenteral, relatadas por alguns autores. Gay e Perrini (1999) utilizaram a sulfonamida-trimetropin via oral com infusão local de amicacina, com melhora clínica na infecção causada por *P. vulgaris*. Já Fennell et al. (2010) realizaram a administração de sulfonamida-trimetropin via oral e infusão local de penicilina procaína em vesiculite causada por *Streptococcus* spp., resultando em melhora clínica, permitindo a congelação de sêmen. Porém, o garanhão apresentou piospermia aproximadamente 21 dias após o término do tratamento.

Alguns autores relatam a vesiculectomia seminal como método terapêutico em equinos (KLUG et al., 1979), todavia é considerada radical e não tem sido utilizada rotineiramente (MIRAGAYA et al., 2011). Existem inúmeras complicações trans e pós-operatórias, que incluem o difícil acesso às vesículas, hemorragia, lesão em nervos ou musculatura e infecção, que predis põem à disfunção ejaculatória (VARNER; SCHUMACHER, 2011). Apenas um relato de sucesso existe na literatura, no qual a técnica utilizada para vesiculectomia foi a mesma utilizada em touros (DEEGEN et al., 1979).

2.4.1 Ácido metacresolsulfônico e formaldeído

Este composto é um produto de condensação do ácido metacresolsulfônico e formaldeído em solução aquosa. Possui coloração avermelhada e acidez elevada (pH

0,6). É indicado para utilização na ginecologia, obstetrícia e cirurgia veterinária (informações do fabricante).

Esta substância possui ação adstringente, cauterizante e atua coagulando tecidos alterados e necróticos, assim como secreções e muco, auxiliando no processo de demarcação e regeneração tecidual, estimulando a granulação e a epitelização. A mucosa sadia sofre uma ação adstringente, tornando-se hiperêmica, porém sem perder a viabilidade, e há o estímulo contrátil da musculatura lisa. Ainda, possui ação bactericida e fungicida, atacando a parede celular dos microorganismos, bem como de leveduras e protozoários (SCHNYDER et al., 1990).

A utilização desta solução para tratamento de afecções uterinas e ovarianas é feito por infusão intrauterina em diferentes espécies. Os primeiros relatos que abordam o uso da substância foram em vacas, para tratamento de infecções uterinas e retenção de placenta (DANIELS et al., 1976; GILBERT et al., 1985). Luvizotto (1992) utilizou uma solução à 4% de Lotagen[®] para tratamento de endometrite crônica em éguas, que foi capaz de reduzir a intensidade do infiltrado inflamatório e grau de fibrose endometrial nas fêmeas tratadas. A lavagem e infusão uterina com esta substância em éguas com endometrite mostrou resultados satisfatórios (Dados não publicados).

Ainda, esta solução foi utilizada para tratamento de endometrite em camelos fêmeas, com infusão intrauterina à 4% do ácido. Também nesta espécie, a aplicação da substância, via intrauterina, foi utilizada para o tratamento da hidrobursite ovariana (ALI et al., 2012). Em um estudo retrospectivo recente, Ali et al. (2015) avaliaram 7300 casos de camelos fêmeas com problemas reprodutivos, no qual 34,7% apresentavam endometrite clínica e a grande maioria tratada com infusão de desta droga, obtendo sucesso após infusão.

2.5 Prognóstico

O prognóstico reprodutivo da vesiculite seminal é reservado, devido à ineficácia da antibioticoterapia e alta taxa de recorrência (TIBARY & RODRIGUEZ, 2011; SANCLER-SILVA, 2014). Muitas vezes, a vesiculite está relacionada a infecção de outras porções do trato reprodutivo, sendo os testículos e epidídimos os mais afetados, provocando orquite e epididimite (PINTO et al., 2014). Além dessas

estruturas, as ampolas também podem ser acometidas, causando ampulite (BLANCHARD et al., 1988; COMEFORD et al., 2011).

Em todos os relatos, a infecção dos demais órgãos foi por via ascendente e com resoluções distintas. Pinto et al. (2014) após o tratamento sistêmico e local conseguiram controlar a infecção e obtiveram melhora clínica do garanhão. Enquanto que Comeford et al. (2011), o garanhão não conseguiu eliminar a infecção dos testículos após diversas tentativas de tratamento, sendo submetido a orquiectomia bilateral.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A vesiculite seminal é uma alteração grave e de difícil tratamento, que pode levar ao afastamento do garanhão em sua vida reprodutiva. A infecção concomitante de outros órgãos reprodutivos, como a orquite e epididimite, pode afetar drasticamente a fertilidade deste animal. O exame endoscópico é uma importante ferramenta para confirmação do diagnóstico de vesiculite seminal, porém exige cautela em sua realização, pelo risco de contaminação iatrogênica de outras porções do trato reprodutivo.

REFERÊNCIAS

ALI, A.; AL-SOBAYIL, F.; AL-HAWAS, A. Evaluating the effectiveness of different treatments of uterine infections in female camels (*Camelus dromedarius*). **Theriogenology**, v.74, p.40-44, 2010.

ALI, A.; AL-SOBAYILA, F.; HASSANEINB, K.M.; AL-HAWAS,A. Ovarian hydrobursitis in female camels (*Camelus dromedarius*): The role of *Chlamydophila abortus* and a trial for medical treatment. **Theriogenology**, v.77, p.1754–1758, 2012.

ALI, A.; DERAR, R.; AL-SOBAYIL, F.; AL-HAWAS, A.; HASSANEIN. A. Retrospective study on clinical findings of 7300 cases (2007–2014) of barren female dromedaries. **Theriogenology**, v.84, p.452-456, 2015.

AMANN, R.P. Functional anatomy of the adult male. In: MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. **Equine reproduction**. 2ed. United Kingdom: Wiley-Blackwell, v.1, 2011. Cap. 95, p.867-880.

BACHA, W.J.; BACHA, L.M. **Atlas colorido de histologia veterinária**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2003.

BALL, B.A. Diagnostic methods for evaluation of stallion subfertility: A Review. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.28, n.11, p.650-655, 2008.

BAUMBER, J.; VO, A.; SABEUR, K; BALL, B.A. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.57, p.1025-1033, 2002.

BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; BRETZLAFF, K.N. Seminal vesiculitis. In: Smith BP, editor. **Large animal internal medicine**. 2nd ed. 2001. St. Louis: Mosby. p. 1574-1575.

BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; HURTGEN, J.P.; LOVE, C.C.; CUMMINGS, M.R.; STREZMIENSKI, P.J.; BENSON, C.; KENNY, R.M. Bilateral seminal vesiculitis and ampullitis in a stallion. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.192, p.525–526, 1988.

BLANCHARD, T.L.; WOODS, J.A.; BRINSKO, S.P.; VARNER, D.D.; BOOTHE, D.M. Theriogenology question of the month. Treatment options for erosive seminal vesiculitis caused by *Acinetobacter calcoaceticus*. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.15, p.221-226, 2002.

BOWEN, J.M.; TOBIN, N.; SIMPSON, R.B.; LEY W.B.; ANSARI, M.M. Effects of washing on the bacterial flora of the stallion's penis. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 32, p.41–45, 1982.

BRINSKO, S.P.; BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C.C.; HINRICHS, K.; HARTMAN, D. 3rd ed: **Manual of Equine Reproduction**. Mosby. 2011.

CAVALIERI, J.; VAN CAMP, S.D. Bovine seminal vesiculitis: a review and update. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.13, n.2, p.233-241, 1997.

CHENIER, T.S. Anatomy and physical examination of the stallion, In: **Equine Breeding Management and Artificial Insemination**, J. SAMPER, W.B. 2nd Ed. Saunders, Philadelphia, PA. 2009.

COMERFORD, K.L.; VOGEL, J.L.; LOVE, C.C.; VARNER, D.D. Epididymitis, ampullitis and periorchitis due to an ascending seminal vesiculitis caused by *Pseudomonas aeruginosa* in as stallion. **Clinical Theriogenology**, v.3, n.3, p.366, 2011.

CONBOY, H.S. Significance of bacteria affecting the stallion's reproductive tract. Cap.37. p.231-236. In: **Current Therapy in Equine Reproduction**. SAMPER, J.C; PYCOCK, J.F.; MCKINNON, A.O. 1st Ed, Saunders, Philadelphia, PA. 2007.

DANIELS, W.H.; MORROW, D.A.; PICKETT, B.W.; BALL, L. Effects of intrauterine infusion of gentamicin sulfate on bovine fertility. **Theriogenology**, v.6, n.1, p.61-68, 1976.

DEEGEN, E.; KLUG, E.; LIESKE, R. Surgical treatment of chronic purulent seminal vesiculitis in the stallion. **DtsheTierarztl Wochensh**, v.86, p.140-144, 1979.

EDWARDS, J.F. Pathologic conditions of the stallion reproductive tract. **Animal Reproduction Science**, v.107, p.197-207, 2008.

FENNEL, L.C.; MCKINNON, A.O.; SAVAGE, C.J. Cryopreservation of semen from a stallion with seminal vesiculitis. **Equine Veterinary Education Equine**, v.22, n.5, p.215-219, 2010.

FREESTONE, J.F.; PACCAMONTI, D.L; EILTS, B.E.; MCCLURE, J.J.; SWIDERSKI, C.E.; CAUSEY, R.C. Seminal vesiculitis as a cause of signs of colic in a stallion. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.15, n.203, p.556-557, 1993.

GAY, Y.; PERRIN, R. Deux cas d'étalons présentant une vésiculite, **Practice Veterinary Equine**, v.31, p.57-60, 1999.

GILBERT, R.O.; COUBROUGH, R.I.; VENTER, B.J.; WITCOMB, M.A. Successful transfer of embryos recovered from a cow with chronic cervicitis of mixed aerobic and anaerobic bacterial aetiology. **Theriogenology**, v.23, n.4, p.593-596, 1985.

GUASTI, P.N.; MONTEIRO, G.A.; PAPA, F.O. Componentes do plasma seminal e sua influência sobre a criopreservação e fertilidade de espermatozóides eqüinos. **Veterinária e Zootecnia**, v.19(2), p.169-180, 2012.

HAFAZ, E.S.E.; HAFAZ, B. **Reprodução animal**. 7.ed. São Paulo: Manole. 2004. 513p.

HE, J.; JIA, X.; YANG, S.; XU, X.; SUN, K.; LI, C.; YANG, T.; ZHANG, L. Heteroresistance to carbapenems in invasive *Pseudomonas aeruginosa* infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.51, p.413-421, 2018.

HULL, B.L.; MONKE, D.R.; ROHDE, R. A new technique for seminal vesiculectomy. In: **Proceedings of the 14th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction**. Milwaukee (Wisconsin), p.100-103, 1992.

HULL, B.L.; VOGEL, S.R. Seminal vesiculitis. **Veterinary Clinics Food Animal Practice**, v.24, p.267–272, 2008.

KARESKOSKI, M.; KATILA, T. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. **Animal Reproduction Science**, v.107, p.249-256, 2008.

KARESKOSKI, M. Components of fractionated stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. **PhD thesis** – Department of Production Animal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine University of Helsinki, Finland, p.83, 2011.

KARIMINIK, A.; BASERI-SALEHI, M.; KHEIRKHAH, B. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing modulates immune responses: na update review article. **Immunology Letters**, v.190, p.1-6, 2017.

KLUG, E.; DEEGEN, E.; LIESK, R.; FREYTAG, K.; MARTIN, J.C; GUNZEL, A.R; BADER, H. The effect of vesiculectomy on seminal characteristics in the stallion. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v.27, p.61-66, 1979.

LU, K.G.; MORRESEY, P.P. Reproductive tract infections in horses. **Veterinary Clinics Equine Practice**, v.22, p.519–552, 2006.

LUVIZOTTO, M.C.R. Endometrite crônica em éguas: estudo histopatológico antes e após infusão intra-uterina. **Tese de Doutorado** - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Unesp – Botucatu/SP. p.109, 1992.

MAGISTRINI, M.; SEGUIN, F.; BEAU, P.; AKOKA, S.; LE PAPE, A.; PALMER, E. 1H nuclear magnetic resonance analysis of stallion genital tract fluids and seminal plasma: contribution of the accessory sex glands to the ejaculate. **Biology of Reproduction**, v.1, p.599-607, 1995.

MALMGREN, L; SUSSEMILCH, B.I. Ultrasonography as a diagnostic tool in a stallion with seminal vesiculitis: A case report. **Theriogenology**, v.37, n.4, p.935-938. 1992.

MANCILL, S.S. Clinical and sub-clinical seminal vesiculitis in the stallion. **Equine Veterinary Education**, v.22, n.5, p.220-222, 2010.

MIRAGAYA, M.H.; PINTO, M.R.; NEILD, D.M. Muestreo y lavage de glândulas vesiculares en el padrillo. In: **II Congresso n Equine Reproduction**, p.71-72, 2011.

MONTEIRO, G.A.; GUASTI, P.N.; MELO, C.M.; MARTIN, J.C; DELLAQUA JUNIOR, J.A.; ALVARENGA, M.A; MAZIEIRO R.R.D.; AVANZI, B.R.; PAPA, F.O. Comparison Between Cryopreservation of Stallion Semen Obtained From Ejaculate and Epididymis cauda In: 11th Congress of the World Equine Veterinary Association - **WEVA**, p.297, 2009.

MONTEIRO, G.A. Ultrassonografia aplicada ao exame andrológico em garanhões. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.41, n.1, p.157-168, 2017.

OLIVEIRA, S.N.; ARAUJO, E.A.B.; SILVA, L.F.M.C.; DALANEZI, F.M.; PAPA, P.M.; PINTO, B.M.; ANDRADE Jr, L.R.P.; PAPA, F.O. Colheita fracionada e seus principais benefícios na criopreservação do sêmen de garanhões. **Veterinária e Zootecnia**. v.24, n.3, p.435-443, 2017

PEARSON, L.K.; CAMPBELL, A.J.; TIBARY, A. How to diagnose and treat hemospermia: a review and case series. **Proceedings of the AAEP Annual Convention**, v.59, p.40-50, 2013.

PICKETT, B.W.; VOSS, J.L.; JONES, R.L. Control of bacteria in stallions and their semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.19, n.7, p.424-469, 1999.

PINTO, M.R.; NEILD, D.M.; BENEGAS, D.; VIEYRA, D.H.; MIRAGAYA, M.H. Successful Treatment of Seminal Vesiculitis with Imipenem-Cilastatin in a Stallion. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.34, p.544-548, 2014.

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

POZOR, M.A.; McDONNELL, S.M. Ultrasonographic measurements of accessory sex glands, ampullae, and urethra of normal stallions of various size types. **Theriogenology**, v.58, p.1425-1423, 2002.

ROTA, A.; CALICCHIO, E.; NARDONI, S.; FRATINI, F.; EBANI, V.V.; SGORBINI, M.; PANZANI, D.; CAMILLO, F.; MANCIANTI, F. Presence and distribution of fungi and bacteria in the reproductive tract of healthy stallions. **Theriogenology**, v.76, p.464-470, 2011.

ROVARY, H.; BARTH, A.D.; CHIRINO-TREJO, M. Update on treatment of vesiculitis in bulls. **Theriogenology**, v.70, p.495-503, 2008.

SAMPER, J.; TIBARY, A. Disease transmission in horses. **Theriogenology**, v.66, p.551-559, 2006.

SANCLER-SILVA, Y.F.R. **Efeito do tratamento local de vesiculite seminal sobre a qualidade e longevidade do sêmen eqüino**. 2014. 124f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Curso de Pós-graduação em Biotecnologia Animal, Unesp-Botucatu/SP.

SCHEEREN, V.F.C.; GOBATO, M.L.M.; PAPA, P.M.; CAVALERO, T.M.S.; CANUTO, L.E.F.; RODRIGUES, L.T.; BANDEIRA, R.S.; WATANABE, M.J.; ROCHA, N.S.; ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O. The use of endoscopic biopsy to compare histological finds of stallions with and without seminal vesiculitis. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.66, p.50, 2018.

SCHNYDER, D.; KU'PFER, U.; ZWAHLEN, R.; SCHNYDER, D.; KU'PFER, U.; ZWAHLEN, R. Changes in the endometrium of the cow after intrauterine administration of different drugs. **Schweiz Arch Tierheilkd**, v.64, p.132-353, 1990.

STOESSER, N.; BATTY, E.M.; EYRE, D.W.; MORGAN, M.; WYLLIE, D.H.; DEL OJO ELIAS, C.; JOHNSON, J.R.; WALKER, A.S.; PETO, T.E.A.; CROOK, W. Predicting antimicrobial susceptibilities for *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates using whole genomic sequence data. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.68, p.2234-2244, 2013.

TIBARY, A. Endoscopy of the reproductive tract in the stallion. Cap.33. p.214-219. In: **Current Therapy in Equine Reproduction**. SAMPER, J.C; PYCOCK, J.F.; MCKINNON, A.O. 1st Ed, Saunders, Philadelphia, PA. 2007.

TIBARY, A.; RODRIGUEZM, J.; SAMPER, J.C. Microbiology and Diseases of Semen. In: **Equine Breeding Management and Artificial Insemination**. SAMPER, J.C. 2nd Ed., Saunders, Philadelphia, PA. 2009.

TIBARY, A.; RODRIGUEZ, J.S. Causas e Manejo de lãs subfertilidad em padrillos. In: **II Congresso on Equine Reproduction**, p.55-69, 2011.

TROEDSSON, M.H.T.; DOTY, A; MACPHERSON, M.L.; CONNOR, M.C.; VERSTEGEN, J.P.; POZOR, M.A.; BUHI, W.C. CRISP-3 in equine seminal plasma is involved in selective uterine sperm transport. **Animal Reproduction Science**, v.121, p.192-193, 2010.

TURNER, R.M.O. Ultrasonography of the genital tract of the stallion. In: Reef VB (ed). **Equine Diagnostic Ultrasound**. WB Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, p.446-479, 1998.

TURNER, R. M. O. Abnormalities of the ejaculate. In: MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. **Equine Reproduction**. 2nd. Ed Willey-Blackwell, cap.108, p.1119-1129, 2011.

TURNER, R.M.O. How to Perform an Examination of the Internal Reproductive Tract of the Stallion. **Proceedings of the AAEP Annual Convention**, v.60, p.294-301, 2014.

VARNER, D.D. Approaches to breeding soundness examination and interpretations of results. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.43, p.37-44, 2016.

VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L.; BRINSKO, S. P.; LOVE, C. C.; TAYLOR, T. S.; JOHNSON, L. Techniques for evaluating selected reproductive disorders of stallions. **Animal Reproduction Science**, v.60–61, p.493–509, 2000.

VARNER, D.D.; SCHUMACHER, J. Abnormalities of the accessory sex glands. In: MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. **Equine reproduction**. 2ed. United Kingdom: Wiley-Blackwell, v.1, Cap. 95, p.867-880, 2011.

VARNER, D.D. How to perform urethral endoscopy in the stallion for diagnostic purposes. **Proceedings of the AAEP Annual Convention**, v.60, p.309-315, 2014.

VIGNERA, S.; VICARI, E.; CONDORELLI, R.A.; D'AGATA, R.; CALOGERO, D.A.E. Male accessory gland infection and sperm parameters (review). **International Journal of Andrology**, v.34, p.330–347, 2011.

WAGENLEHNER, F.M.E.; WEIDNER, W.; SORGEL, F.; NABER, K.G. The role of antibiotics in chronic bacterial prostatitis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.26, p.1-7, 2005

WAGUESPACK, R.W.; SCHUMACHER, J.; WOLFE, D.F. Preliminary study to evaluate the feasibility of chemical ablation of the seminal vesicles in the bull. In: Smith R, editor. **Proceedings of American Association of Bovine Practitioners**, p.295–296, 2004.

WEBER, J.A.; WOODS, G.L. Transrectal ultrasonography for the evaluation of stallion accessory sex glands. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.8, p.183-190, 1993.

WONG, W.Y.; FLIK, G; GROENEN, P.M.W.; SWINKLES, D.W.; THOMAS, C.M.G.; COPIUS-PEEREBOOM, J.H.; MERKUS, H.M.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P. The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. **Reproductive Toxicology**, v.15, p.131-136, 2001.

HIPÓTESE

O ácido metacresolsulfônico e formaldeído (Lotagen[®]) é eficaz para o tratamento da vesiculite seminal de garanhões, a fim de eliminar a contaminação bacteriana e provocar a reepitelização da vesícula seminal, bem como manter as características seminais.

OBJETIVOS

- Avaliar a eficácia do ácido metacresolsulfônico e formaldeído (Lotagen[®]) no tratamento da vesiculite seminal de garanhões;
- Analisar os parâmetros seminais antes e após o tratamento da vesiculite seminal e verificar a interferência do tratamento na qualidade espermática;
- Comparar as características histopatológicas do epitélio da vesícula seminal em garanhões antes e após o tratamento.

*“Frente ao caminho me calo,
E o pensamento sofreno
O mundo é muito pequeno,
Prás patas do meu cavalo.”*

Luiz Marengo.



CAPÍTULO 2

Artigo redigido segundo as normas da Animal Reproduction Science, ISSN 0378-4320, ranqueada como A2 pelo QUALIS – CAPES quadriênio 2013 - 2016. <https://www.elsevier.com/journals/animal-reproduction-science/0378-4320/guide-for-authors>

UTILIZAÇÃO DE SUBSTÂNCIA CAUTERIZANTE (LOTAGEN[®]) NO TRATAMENTO DA VESICULITE SEMINAL EM GARANHÕES

Verônica F. C. Scheeren^{1*}, Frederico O. Papa¹

¹Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, FMVZ, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Botucatu, Brasil

*Autor para correspondência: veronica_fcs@hotmail.com

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do ácido metacresolsulfônico e formaldeído (Lotagen[®]) para o tratamento da vesiculite em garanhões. Três garanhões adultos (n=3), com aspectos reprodutivos normais, tiveram a vesiculite seminal induzida por *Pseudomonas aeruginosa* através da endoscopia. Após 8 semanas de infecção, foi realizado tratamento local utilizando solução a 30% de Lotagen[®]. O experimento consistiu em avaliações semanais, antes e após infecção experimental e após tratamento por sete semanas. Foram avaliadas as características do sêmen e das vesículas seminais, e cultura bacteriana do ejaculado e lavado vesicular. Alterações na coloração do sêmen foram observadas (3/3), enquanto que volume do ejaculado, concentração e motilidade espermática apresentaram variações fisiológicas (2/3), com redução no percentual de neutrófilos no sêmen e oscilações na integridade de membrana plasmática e acrossomal (3/3). A cultura bacteriana do sêmen após tratamento foi negativa (2/3), e um garanhão apresentou cultura positiva para *Streptococcus equi* subsp *zooepidemicus*, que

desenvolveu epididimite bilateral. A ultrassonografia das vesículas mostrou variações no tamanho, quantidade e característica do conteúdo, com valores dentro da normalidade. Na endoscopia após infecção, as vesículas continham conteúdo purulento e posteriormente ao tratamento verificou-se a oclusão parcial das glândulas (2/3) e a mucosa mostrou-se fibrosada (1/3). As vesículas antes da infecção apresentaram epitélio colunar simples, que após a infecção sofreu atrofia associado a intenso infiltrado inflamatório(3/3). Após 4 semanas do tratamento, observou-se um estroma fibromuscular com discreta inflamação (2/3) e displasia epitelial com infiltrado inflamatório misto (1/3). A cultura do lavado vesicular foi negativo após tratamento (3/3). A solução com ácido metacresolsulfônico e formaldeído à 30% foi eficaz para o tratamento da vesiculite seminal em garanhões, evitando o crescimento bacteriano de *P.aeruginosa*, diminuindo a porcentagem de neutrófilos no ejaculado e mantendo a qualidade seminal dos garanhões (2/3).

Palavras-chave: ácido metacresolsulfônico e formaldeído, biopsia, endoscopia, equino, vesícula seminal

1. Introdução

O garanhão possui um conjunto de glândulas sexuais acessórias completo, composto pelas ampolas dos ductos deferentes, vesículas seminais, glândulas bulbouretrais e próstata, responsáveis pela secreção do plasma seminal (Tibary, 2007). As vesículas seminais são saculações de formato piriforme medindo de 15 a 20 cm de comprimento e 5 cm de diâmetro (Pozor, 2005), que desembocam de maneira individual dorsalmente na uretra pélvica por uma dilatação da mucosa, denominada colículo seminal (Varner et al., 2000). Quanto ao aspecto histológico, elas apresentam epitélio colunar estratificado, separado por um delgado tecido conjuntivo e vasos de calibres diferentes ao redor (Scheeren et al., 2018; Stewart et al., 2016).

Dentre as afecções que acometem as glândulas sexuais acessórias, a vesiculite seminal é a principal, apesar de ser pouco frequente (Ball, 2008). Essa infecção consiste na colonização de uma ou ambas as vesículas seminais por bactérias, havendo acúmulo de conteúdo purulento ou sangue no seu interior, causando piospermia associada ou não à hemospermia (Pearson et al., 2013; Tibary and Rodriguez, 2011). As bactérias mais comuns isoladas em casos de vesiculite seminal são *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Brucella abortus* (Samper and Tibary, 2006; Varner et al., 2000).

O diagnóstico definitivo da vesiculite seminal é realizado por meio da endoscopia das vesículas, no qual é possível observar seu interior e coletar material para cultura e antibiograma (Varner, 2014). Porém, as características do ejaculado, como alta concentração de neutrófilos e acúmulo de conteúdo hipercogênico nas vesículas visualizados durante exame ultrassonográfico, sugerem a infecção (Ball, 2008; Pozor and McDonnell, 2002).

O tratamento da vesiculite seminal é desafiador em vista da dificuldade dos antimicrobianos alcançarem as glândulas em concentrações adequadas, quando utilizados via sistêmica (Tibary and Rodriguez, 2011). Segundo Miragaya et al. (2011) o tratamento local é a técnica de eleição para tratamento da enfermidade, utilizando o acesso endoscópico para infusão de antibióticos (Pinto et al., 2014). Entretanto, devido à capacidade de formação de biofilme da maioria das bactérias envolvidas (He et al., 2018; Stoesser et al., 2013), o tratamento local nem sempre é efetivo (Sancler-Silva, 2014).

A remoção cirúrgica da vesícula seminal já foi descrita como alternativa terapêutica (Klug et al., 1979; Miragaya et al., 2011). Porém, a dificuldade do procedimento cirúrgico associada às complicações pós-operatórias, como infecção, hemorragia e lesões na musculatura e inervação pélvica, tornam a técnica impraticável em ganhões (Varner and Schumacher, 2011), havendo apenas um relato de sucesso (Deegen et al., 1979). O ácido metacresolsulfônico e formaldeído é uma substância com ação adstringente e cauterizante, bactericida e fungicida, que atua em

tecidos necróticos, auxiliando no processo de demarcação e regeneração tecidual (Schnyder et al., 1990). A utilização desta solução para tratamento de afecções uterinas e ovarianas é feito por infusão intrauterina em fêmeas bovinas (Daniels et al., 1976; Gilbert et al., 1985) e de camelos (Ali et al., 2015).

Devido ao fácil acesso endoscópico das vesículas seminais e a baixa efetividade das terapias já existentes, o objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia da infusão de solução à 30% de Lotagen[®] na vesícula seminal para o tratamento da vesiculite seminal em garanhões, analisando os parâmetros seminais e comparando as características da vesícula seminal antes e após o tratamento.

2. Material e métodos

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (FMVZ – Unesp – Botucatu/São Paulo) , sob Protocolo # 0160/2018.

2.1 Animais e local de pesquisa

Foram utilizados três garanhões com idade entre 5 e 6 anos, da raça Brasileiro de Hipismo, que tiveram seus parâmetros reprodutivos avaliados. O estudo foi desenvolvido no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Unesp – Botucatu/SP – Brasil. Os animais foram mantidos em baias com livre acesso a feno, água e sal mineral *ad libitum*, durante o estudo.

2.2 Delineamento experimental

O estudo foi desenvolvido conforme a Figura 1.

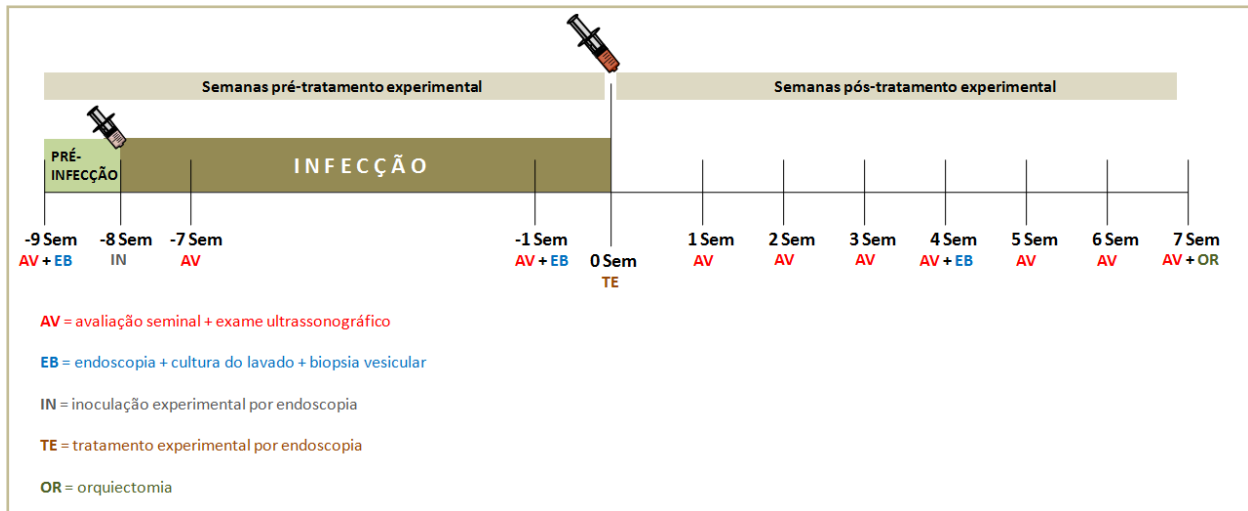


Fig. 1. Desenho experimental. Semanas pré-tratamento experimental. -9Sem: coleta de sêmen para avaliação das características seminais macro e microscópicas, cultura do ejaculado, ultrassonografia, endoscopia e biópsia das vesículas seminais. -8Sem: inoculação de *P. aeruginosa* nas vesículas seminais dos garanhões para indução da vesiculite seminal. -7Sem: coleta de sêmen para avaliação das características seminais macro e microscópicas, cultura do ejaculado, ultrassonografia das vesículas seminais. -1Sem: coleta de sêmen para avaliação das características seminais macro e microscópicas, cultura do ejaculado, ultrassonografia, endoscopia e biópsia das vesículas seminais. 0Sem: instilação de 60mL de solução à 30% de Lotagen® em cada vesícula seminal. 1-7Sem: coleta de sêmen para avaliação das características seminais macro e microscópicas, cultura do ejaculado, ultrassonografia das vesículas seminais. 4Sem: endoscopia e biópsia das vesículas seminais. 7Sem: orquiectomia bilateral.

2.3 Coleta e avaliação seminal

Para coleta do ejaculado foi utilizada vagina artificial modelo Botucatu (Botupharma, Botucatu, São Paulo, Brasil). Após a coleta, o sêmen foi filtrado em filtro de nylon uma parte do sêmen foi mantida *in natura* e outra parte, diluída em diluente comercial a base de leite desnatado (Botusemen Special®, Botupharma, Botucatu, São Paulo, Brasil) a uma concentração de 50 milhões de espermatozoides/mL para as avaliações de cinética. A amostra *in natura* foi utilizada para avaliação da concentração, morfologia e citologia espermática, cultura microbiana e citometria de fluxo.

No espermograma foram avaliadas características como aspecto macroscópico (volume e cor), classificados conforme a figura 2, e microscópicos como: cinética, concentração, integridade de membrana plasmática e acrossomal (IMPA) e morfologia espermática. Além disso, foi avaliado o percentual de neutrófilos em relação à celularidade total do esfregaço citológico do sêmen.

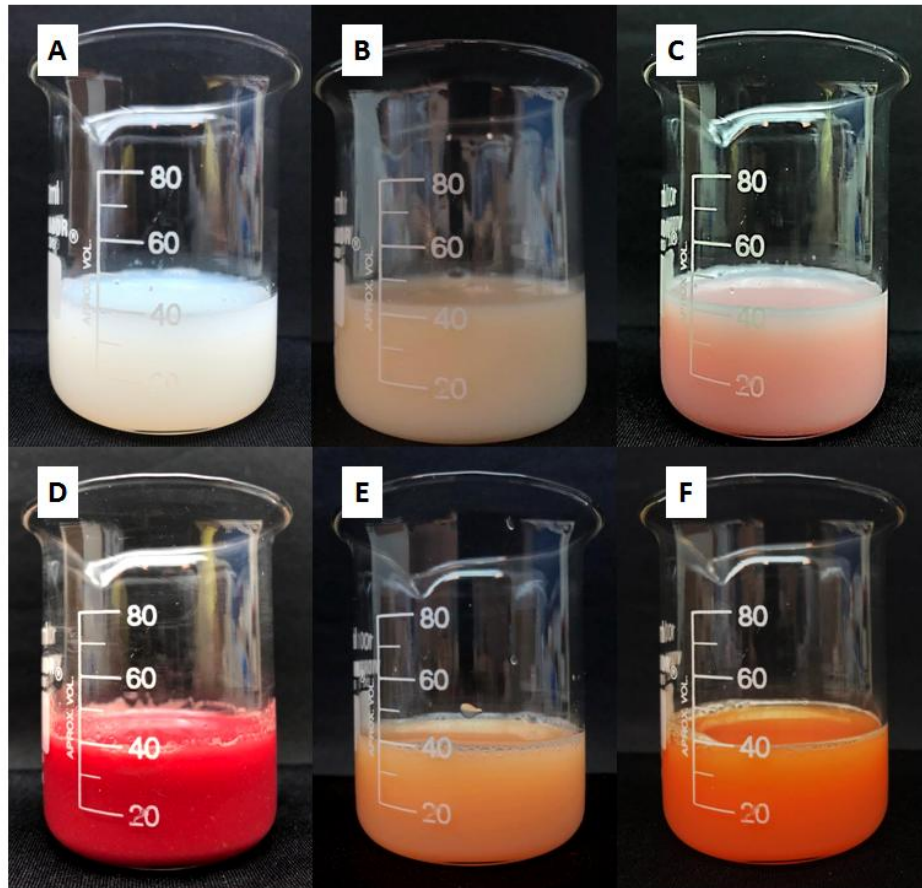


Fig. 2. Classificação das diferentes colorações dos ejaculados. (A) Normospermia – N. (B) Piospermia – P. (C) Ejaculado com coloração alaranjada após tratamento experimental – L. (D) ejaculado com coloração parcialmente alaranjada –PL. (E) Hemospermia leve -H1. (F) Hemospermia acentuada- H2.

2.3.1 Cinética e concentração espermática

A cinética espermática foi avaliada pelo método computadorizado – CASA (HTM-IVOS 12, Hamilton Thorne Research, Massachusetts, EUA), avaliando-se três campos aleatórios, quanto aos parâmetros de motilidade total (MT; %), motilidade progressiva (MP; %) e espermatozóides rápidos (RAP; %). As configurações usadas no CASA neste estudo foram de acordo com Carneiro et al. (2018).

A concentração espermática ($\times 10^6$ spz/mL) foi determinada em câmara de Neubauer (Optik Labor, Lancing, Inglaterra), sob microscopia de contraste de fase (Jenamed 2 Zeiss: Carls Zeiss, Munique, Alemanha) em aumento de 200x.

2.3.2 Morfologia espermática

Para avaliação da morfologia espermática, o sêmen *in natura* foi diluído (1:1) em solução de formol salina 10%. A preparação úmida foi avaliada em microscopia de contraste de interferência diferencial de fase (DIC – Leica DM 2500: Leica Microsystems, São Paulo, Brasil), em objetiva de imersão (100x).

Foram analisadas 100 células quanto às alterações morfológicas de cabeça, peça intermediária e cauda, como descrito por Blom (1973), resultando no percentual de defeitos maiores, menores e totais. Para expressar os resultados foi contabilizado o percentual de defeitos totais.

2.3.3 Citologia espermática

Foi realizado um esfregaço do sêmen *in natura*, corado com Panótico rápido. Em microscopia óptica de imersão (100x), foram contadas 100 células, identificando espermatozoides e neutrófilos. Ao final da contagem, obteve-se a porcentagem de neutrófilos no ejaculado (Sancler-Silva, 2014).

2.3.4 Cultura microbiológica do sêmen

Um volume de 5mL de sêmen *in natura*, previamente à filtração, foi armazenado em tubo graduado estéril e encaminhado para cultura microbiológica no Laboratório de Microbiologia da FMVZ – Unesp/Botucatu. A cultura do ejaculado foi realizada antes e após a infecção, bem como nas semanas seguintes ao tratamento experimental (Sancler-Silva, 2014).

2.3.5 Citometria de fluxo

Para a avaliação espermática por citometria de fluxo foi utilizado o equipamento BD LSR Fortessa (Becton Dickinson, Mountain View, California, EUA) equipado com lasers de

excitação: azul 488-nm, 100 mW e filtros de emissão 530/30nm e 695/40nm; vermelho 640-nm, 40 mW com filtro 660/20nm; e o violeta 405-nm, 100 mW, com o filtro 450/50nm. No mínimo 10.000 células por amostra foram analisadas e os dados foram avaliados pelo software BD FACSDiva™ software v 6.1.

As amostras foram diluídas em TALP-PVA (Parrish et al.,1988) modificado: 100mM NaCl, 3,1mM KCl, 25,0mM NaHCO₃, 0,3mM NaH₂PO₄, 21,6mM DL-lactato de sódio 60%,2,0mM CaCl₂, 0,4mM MgCl₂, 10,0mM Hepes-livre de ácido, 1,0mM piruvato de sódio, 1,0mg/mL álcool polivinil-PVA e 25µg/mL gentamicina) na concentração de 5x10⁶ espermatozoides/mL.

Para a avaliação da IMPA utilizou-se a associação de Hoechst 33342, iodeto de propídio e FITC-PSA (aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocianato de fluoresceína) de acordo Freitas-Dell'Aqua et al. (2012). Assim em uma amostra de 200µL de sêmen diluído foi acrescentado de 7µM de Hoechst 33342, 1,5µM de iodeto de propídeo e 2ng de FITC-PSA, incubada durante 5 minutos à 37°C ao abrigo da luz.

2.4 Exame ultrassonográfico

Para a ultrassonografia modo-B foi utilizado o equipamento MyLab™Five (ESAOTE S.p.A. – Pie Medical, Florença, Itália), acoplado a um transdutor linear transretal de 7,5 MHz. Inicialmente, foi realizada a palpação transretal das glândulas sexuais acessórias para verificar presença ou ausência de sensibilidade dolorosa. Em seguida, as vesículas seminais foram mensuradas quanto ao tamanho (comprimento e altura), espessura da parede, conteúdo e característica do conteúdo, que foram classificadas conforme descrito na Figura 3.

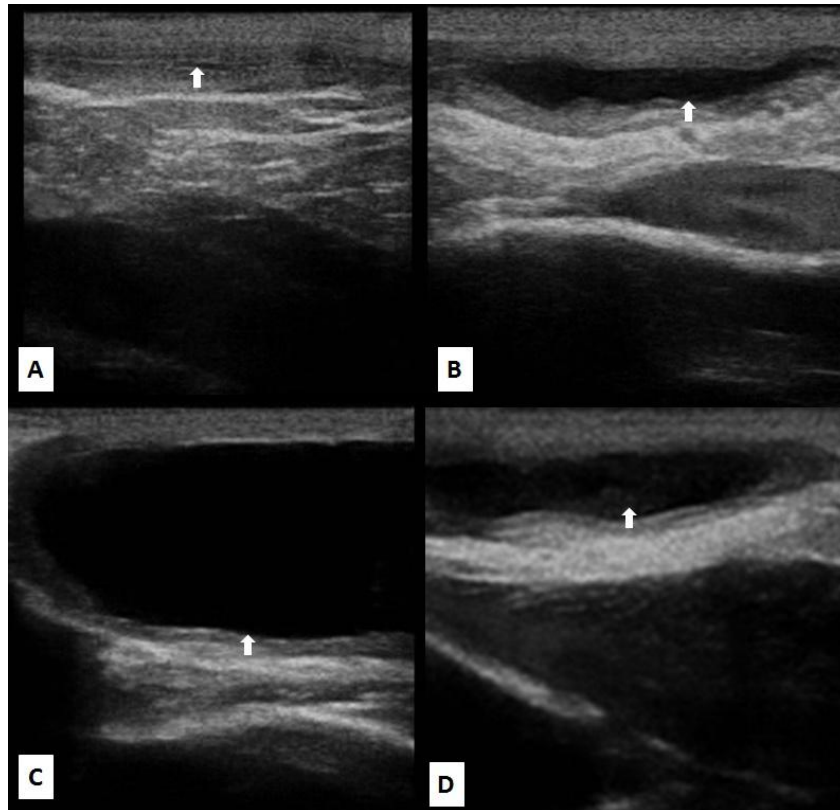


Fig. 3. Classificação das imagens ultrassonográficas conforme a quantidade e característica do conteúdo (setas). (A) Vesícula seminal com ausência de conteúdo – SC. (B) Vesícula seminal com discreto conteúdo ($\leq 14\text{mm}$) hipocogênico –DC. (C) Vesícula seminal com presença abundante de conteúdo ($\geq 15\text{mm}$) hipocogênico –AC. (D) Vesícula seminal com presença moderada de conteúdo hiperecogênico -CH.

2.5 Exame endoscópico

O exame endoscópico foi conduzido com vídeoendoscópio flexível de 300 cm de comprimento e 9,8mm de diâmetro (Porta Scope PVS93M System: PortaScope™, Orlando, FL, EUA). Para realização do procedimento os animais foram colocados em tronco de contenção e sedados com 0,6 mg/kg de cloridrato de xilazina a 10% e 0,01 mg/kg cloridrato de detomidina a 1%, ambos por via intravenosa.

Um cateter de polietileno estéril foi utilizado para guiar a entrada do endoscópio em cada vesícula seminal. Ao acessar o lúmen, foi observado o aspecto da mucosa glandular, a presença ou não de conteúdo e sua característica, que foram classificados de acordo com a Figura 4.

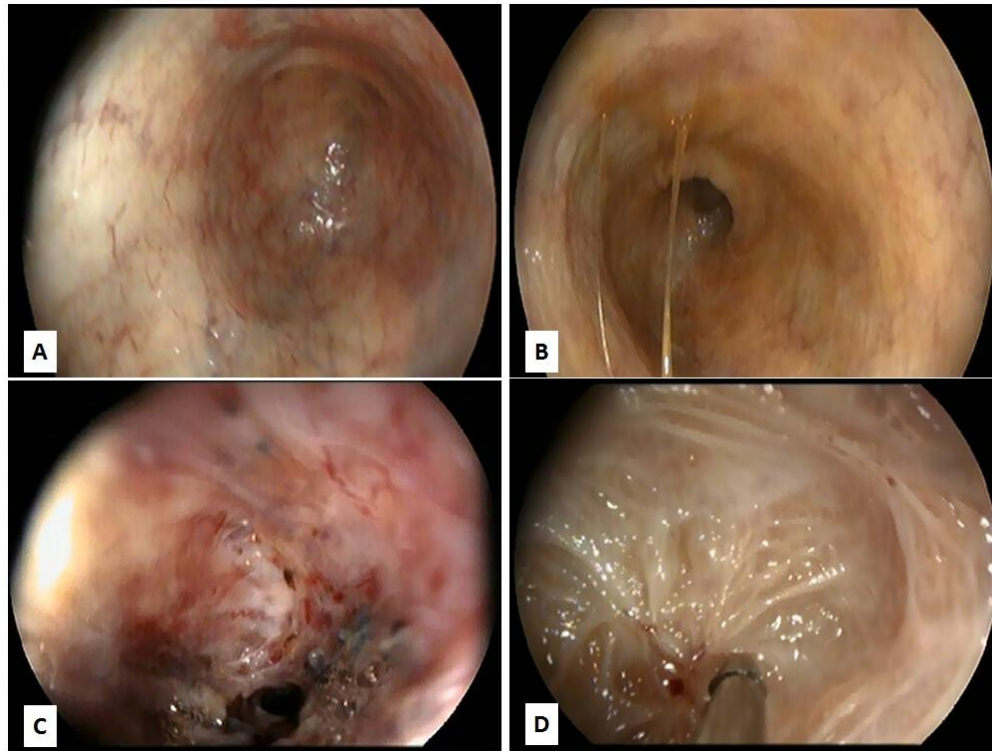


Fig. 4. Classificação do aspecto endoscópico das vesículas seminais por meio da endoscopia. (A) Vesícula seminal com aspecto normal – VN. (B) Vesícula seminal contaminada, apresentando secreção purulenta –VI. (C) Vesícula seminal parcialmente fechada após o tratamento experimental –VPF. (D) Vesícula seminal com aspecto fibrosado após o tratamento experimental -VPT.

2.5.1 Cultura microbiológica do lavado vesicular

Com um cateter de polietileno foi instilado 60 a 100mL de solução de NaCl 0,9% estéril no interior da vesícula seminal, de modo a preencher o interior da glândula. Em seguida, a solução foi aspirada, armazenada em tubo graduado estéril e encaminhada para realização de cultura e antibiograma no Laboratório de Microbiologia da FMVZ – Unesp/Botucatu.

2.5.2 Biópsia

Após realizada a lavagem da glândula para cultura, procedeu-se a biópsia em ambas as vesículas. No canal de trabalho do endoscópio, foi introduzida uma pinça de biópsia (2x2mm) e dois fragmentos do epitélio glandular foram retirados para análise histológica, os quais foram armazenados em formol 10% tamponado. Os fragmentos foram incluídos em bloco de parafina.

Foram realizados cortes de 5µm de espessura e corados com hematoxilina e eosina (H&E). A leitura da lâmina foi realizada em microscopia em imersão (1000x).

2.6 Infecção experimental

Na segunda semana de experimento (-8Sem), foi realizada a inoculação experimental de *P. aeruginosa* nas vesículas seminais, para desencadear a vesiculite. Por endoscopia, 1×10^6 UFC de cultura viva em 10 mL foi inoculado em cada vesícula. A cepa utilizada, ATCC (*American Type Culture Collection*) número 15442, foi cultivada no Laboratório de Microbiologia da FMVZ – Unesp/Botucatu, assim como a solução para inoculação.

2.7 Tratamento local

Oito semanas após a inoculação (0Sem), procedeu-se o tratamento local. Para isso, um novo exame endoscópico foi realizado, como descrito no item 2.4. Através do cateter de polietileno, foi instilado no interior de cada vesícula seminal 60mL de solução contendo 30% de ácido metacresolsulfônico e formaldeído (Lotagen[®], MSD, Segré, França).

A solução foi preparada a partir da mistura de 42 mL de água destilada estéril e 18 mL do ácido metacresolsulfônico e formaldeído. Após a infusão em ambas as vesículas, o videoendoscópio foi removido.

2.8 Monitoramento dos animais e terapia de suporte

Os animais foram monitorados quanto aos parâmetros vitais (frequência cardíaca e respiratória e temperatura retal), assim como a avaliação da bolsa testicular por inspeção e palpação, diariamente, desde o início do estudo.

Após o exame endoscópico durante todo o estudo, foi realizada uma aplicação de 1,1 mg/kg de flunixin meglumine (Banamine, MSD, São Paulo, Brasil) IV para controlar o desconforto causado pelo procedimento.

2.9 Orquiectomia

A orquiectomia foi realizada com os garanhões em estação após sedação com 0,6 mg/kg de cloridrato de xilazina a 10% e 0,05 mg/kg cloridrato de detomidina a 1%. A antisepsia da região escrotal foi conduzida com polivinilpirrolidona iodo. A anestesia local foi realizada injetando 10 mL cloridrato de lidocaína a 2% via subcutânea em cada bolsa testicular seguindo a linha de incisão. Em seguida foi realizada uma incisão de aproximadamente 8cm paralela à rafe escrotal mediana. O testículo foi exposto pela incisão da túnica dartos e da túnica vaginal parietal, tracionados e efetuada a hemostasia do funículo espermático com emasculador por 4 minutos. A seguir, foi realizada a transfixação e ligadura do cordão espermático com fio catgut 2 (Shalon, Goiás, Brasil).

Após a castração, todos os animais receberam uma aplicação profilática de soro antitetânico liofilizado (5.000 UI, Vencosat, Venco, São Paulo, Brasil), Benzilpenicilina benzatina 30.000UI/kg (Pentabiótico Veterinário, Fort Dodge, São Paulo, Brasil) por via intramuscular e 1,1 mg/kg de flunixin meglumine por via intravenosa, uma vez ao dia, por três dias. Os animais foram monitorados por uma semana após o procedimento, até cicatrização das feridas cirúrgicas.

2.10 Análise estatística

Estatística descritiva referente às avaliações das características do ejaculado e das vesículas seminais foi utilizada para representar os resultados.

3. Resultados e Discussão

A vesiculite seminal em garranhões vem sendo relatada ao longo dos anos (Blanchard et al., 1988; Malmgren and Sussemilch, 1992), porém na maioria dos casos a antibioticoterapia possui resultados pouco eficazes (Fennell et al., 2010). Baseado na literatura consultada pelos autores, este é o primeiro estudo que realiza a infecção experimental de vesiculite e avalia a eficácia da infusão local com o ácido metacresolsulfônico e formaldeído como nova alternativa terapêutica. A escolha da *P. aeruginosa* se deve ao fato desta ser uma das bactérias mais patogênicas que habitam o trato reprodutivo de garranhões e que é capaz de colonizar as vesículas seminais (Blanchard et al., 1987; Comeford et al., 2011; Edwards, 2008; Malmgren and Sussemilch, 1992; Rota et al., 2011).

Em relação ao aspecto do ejaculado, diferentes características foram observadas nos três garranhões ao longo do experimento (Tabela 1, 2 e 3). No período de pré-infecção, os três animais apresentaram normospermia, enquanto que durante a infecção foi observada piospermia, com uma alta porcentagem de neutrófilos e crescimento bacteriano, assim como descrito na literatura (Mancill, 2010). Após o tratamento, o ejaculado apresentou uma coloração alaranjada, que associamos à terapia local e à característica do produto, que possui cor avermelhada. A hemospermia observada em alguns momentos nos garranhões foi atribuída a diferentes causas. Nos garranhões 1 e 3, a hemospermia acentuada visualizada no ejaculado na segunda semana após tratamento (2Sem), foi relacionada a descamação do epitélio das vesículas, levando em consideração o pH baixo do produto e a concentração utilizada. Transcorridos 7 dias (3Sem), o garranhão 1 apresentou normospermia (Tabela 1), enquanto que no garranhão 3 visualizou-se coloração parcialmente alaranjada do ejaculado (Tabela 3). Esta alteração pode ser associada ao comportamento individual em eliminar o produto e ao sangramento, já que o sangue quando originário de inflamações da vesícula seminal possui aspecto hemolisado (Tibary et al., 2009). Na quinta semana após o tratamento (5Sem), os três garranhões apresentaram hemospermia leve,

295

Tabela 1 - Características seminais, aspectos ultrassonográficos e endoscópicos das vesículas seminais do Garanhão 1.

Semanas	-9Sem	-7Sem	-1Sem	1Sem	2Sem	3Sem	4Sem	5Sem	6Sem	7Sem
Características seminais										
Aspecto do ejaculado	N	P	P	L	H2	N	N	H1	N	N
Volume (mL)	25	30	20	55	20	55	15	25	20	15
Concentração (x10 ⁶ sptz/mL)	350	320	312	145	270	150	145	150	100	70
Total de sptz no ejaculado (x10 ⁶)	8750	9600	6240	8470	5400	8250	2175	3750	2000	1050
MT (%)	76	60	68	60	60	72	76	54	46	40
MP (%)	44	35	39	32	26	31	31	30	28	25
RAP (%)	66	49	61	52	44	60	65	43	34	32
Patologia espermática (%)	50	52	55	57	55	42	38	57	62	65
% Neutrófilos	0	40	17	4	2	1	5	6	4	4
IMPA (%)	58,2	37,6	34,4	35,2	49,5	51,2	59,6	57,9	50,8	48,3
Cultura do sêmen	neg	posi <i>Pa</i>	posi <i>Pa</i>	neg	neg	neg	neg	posi Sz	posi Sz	posi Sz
Características da vesícula seminal										
Sensibilidade palpação	aus	aus	aus	aus	aus	aus	aus	aus	aus	aus
Tamanho VSE (mm)	62x8	62x14	68x10	60x18	44x15	40x12	47x15	44x13	45x13	47x15
Tamanho VSD (mm)	56x11	59x15	64x10	49x18	53x11	48x10	60x11	51x12	52x11	49x15
Espessura parede VSE (mm)	3	5	4	2	8	4	7	8	7	9
Espessura parede VSD (mm)	4	4	5	2	3	2	4	5	5	8
Coluna conteúdo VSE (mm)	0	9	1	16	4	3	4	5	5	6
Coluna conteúdo VSD (mm)	0	11	2	18	8	8	7	7	6	7
Conteúdo VS (mm)	SC	DC	CH	AC	DC	DC	DC	CH	DC	DC
Aspecto endoscópico	VN	nr	VI	nr	nr	nr	VPF	nr	nr	nr
Cultura do lavado VS	neg	nr	posi <i>Pa</i>	nr	nr	nr	neg	nr	nr	nr

296

297

298

299

300

301

Aspecto do ejaculado: N= normospermia; P= piospermia; L= ejaculado com coloração alaranjada após infusão do Lotagen; PL=ejaculado com coloração parcialmente alaranjada; H1=hemospermia leve; H2=hemospermia acentuada. Sptz= espermatozoides. MT=motilidade total; MP=motilidade progressiva; RAP=espermatozoides rápidos; IMPA = integridade de membrana plasmática e acrossomal. Neg= negativo; posi Pa=positivo P.aeruginosa; posi Sz=positivo S. zooepidemicus. Aus=ausente. Conteúdo VS (vesículas seminal): SC=vesícula seminal com ausência de conteúdo; DC=vesícula seminal com discreto conteúdo (≤ 14 mm) hipoeocogênico; AC=vesícula seminal com presença abundante de conteúdo (≥ 15 mm) hipoeocogênico; CH=vesícula seminal com presença moderada de conteúdo hipereocogênico. Aspecto endoscópico: VN=vesícula seminal com aspecto normal; VI=vesícula seminal contaminada, apresentando secreção purulenta; VPF= vesícula seminal parcialmente fechada após o tratamento experimental; VPT=vesícula seminal com aspecto fibrosado após o tratamento experimental. nr=não realizado.

302 **Tabela 2** – Características seminais, aspectos ultrassonográficos e endoscópicos das vesículas seminais do Garanhão 2.

Semanas	-9Sem	-7Sem	-1Sem	1Sem	2Sem	3Sem	4Sem	5Sem	6Sem	7Sem
Características seminais										
Aspecto do ejaculado	N	P	P	L	N	N	N	H1	N	N
Volume (mL)	35	35	30	23	25	40	55	35	25	30
Concentração (x10 ⁶ spz/mL)	375	180	175	180	300	140	120	195	230	287
Total de spz no ejaculado (x10 ⁶)	13125	6300	5250	4140	7500	5600	6600	6825	5750	8610
MT (%)	85	83	84	81	88	82	82	80	83	77
MP (%)	47	45	49	48	50	38	40	41	38	39
RAP (%)	81	72	79	73	84	58	74	69	68	67
Patologia espermática (%)	44	47	46	43	34	47	36	46	40	43
% Neutrófilos	0	43	24	6	10	13	4	7	6	4
IMPA (%)	81,2	65,3	69,7	56,9	70,9	72,0	76,3	80,4	77,4	78,4
Cultura do sêmen	neg	posi Pa	posi Pa	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Características da vesícula seminal										
Sensibilidade palpação	aus	aus	aus	aus	aus	aus	aus	aus	aus	aus
Tamanho VSE (mm)	50x10	59x11	58x8	47x11	61x14	56x19	56x17	57x17	56x14	57x13
Tamanho VSD (mm)	45x14	57x18	56x13	52x13	53x14	51x20	57x22	56x18	53x15	54x13
Espessura parede VSE (mm)	2	2	3	1	3	3	3	2	3	3
Espessura parede VSD (mm)	3	2	2	2	6	5	2	4	5	4
Coluna conteúdo VSE (mm)	8	9	2	7	9	15	14	15	11	10
Coluna conteúdo VSD (mm)	11	16	11	9	10	15	2	14	10	9
Conteúdo VS (mm)	DC	DC	CH	DC	DC	AC	DC	CH	DC	DC
Aspecto endoscópico	VN	nr	VI	nr	nr	nr	VPF	nr	nr	nr
Cultura do lavado VS	neg	nr	posi Pa	nr	nr	nr	neg	nr	nr	nr

303 Aspecto do ejaculado: N= normospermia; P =piospermia; L= ejaculado com coloração alaranjada após infusão do Lotagen; PL=ejaculado com coloração parcialmente alaranjada;
 304 H1=hemospermia leve; H2=hemospermia acentuada. Sptz= espermatozoides. MT=motilidade total; MP=motilidade progressiva; RAP=espermatozoides rápidos; IMPA = integridade de
 305 membrana plasmática e acrossomal. Neg= negativo; posi Pa=positivo P.aeruginosa; posi Sz=positivo S. zooepidemicus. Aus=ausente. Conteúdo VS (vesículas seminal): SC=vesícula seminal com
 306 ausência de conteúdo; DC=vesícula seminal com discreto conteúdo (≤14mm) hipocogênico; AC=vesícula seminal com presença abundante de conteúdo (≥15mm) hipocogênico; CH=vesícula
 307 seminal com presença moderada de conteúdo hipercogênico. Aspecto endoscópico: VN=vesícula seminal com aspecto normal; VI=vesícula seminal contaminada, apresentando secreção
 308 purulenta; VPF= vesícula seminal parcialmente fechada após o tratamento experimental; VPT=vesícula seminal com aspecto fibrosado após o tratamento experimental. nr=não realizado.

309

Tabela 3 – Características seminais, aspectos ultrassonográficos e endoscópicos das vesículas seminais do Garanhão 3.

Semanas	-9Sem	-7Sem	-1Sem	1Sem	2Sem	3Sem	4Sem	5Sem	6Sem	7Sem
Características seminais										
Aspecto do ejaculado	N	P	P	L	H2	PL	N	H1	H1	PL
Volume (mL)	42	44	40	45	30	20	35	60	25	35
Concentração (x10 ⁶ spzt/mL)	210	220	150	135	230	155	194	160	300	140
Total de spzt no ejaculado (x10 ⁶)	8820	9680	6000	6075	6900	3100	6790	9600	7500	4900
MT (%)	84	85	86	80	84	89	80	74	88	70
MP (%)	44	32	42	35	35	45	42	26	39	24
RAP (%)	73	78	80	71	79	79	74	59	83	57
Patologia espermática (%)	35	37	28	28	38	39	26	27	31	32
% Neutrófilos	0	46	18	2	3	2	4	4	3	1
IMPA (%)	76,4	59,7	62,1	50,8	61,4	77,2	69,8	59,3	73,7	72,4
Cultura do sêmen	neg	posi <i>Pa</i>	posi <i>Pa</i>	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Características da vesícula seminal										
Sensibilidade palpação	aus	aus	aus	aus	aus	aus	aus	aus	aus	aus
Tamanho VSE (mm)	73x5	72x17	73x8	55x21	64x13	58x13	56x13	57x16	56x14	58x16
Tamanho VSD (mm)	74x12	75x18	72x10	72x21	62x18	50x10	60x12	58x14	59x15	60x14
Espessura parede VSE (mm)	3	4	3	4	5	7	5	6	5	6
Espessura parede VSD (mm)	3	5	4	2	4	6	5	5	5	5
Coluna conteúdo VSE (mm)	2	13	5	17	7	6	8	10	9	10
Coluna conteúdo VSD (mm)	9	13	6	19	14	4	7	9	10	9
Conteúdo VS (mm)	DC	DC	CH	AC	DC	DC	DC	CH	DC	DC
Aspecto endoscópico	VN	nr	VI	nr	nr	nr	VPT	nr	nr	nr
Cultura do lavado VS	neg	nr	posi <i>Pa</i>	nr	nr	nr	neg	nr	nr	nr

310 Aspecto do ejaculado: N= normospermia; P =piospermia; L= ejaculado com coloração alaranjada após infusão do Lotagen; PL=ejaculado com coloração parcialmente alaranjada;
311 H1=hemospermia leve; H2=hemospermia acentuada. Sptz= espermatozoides. MT=motilidade total; MP=motilidade progressiva; RAP=espermatozoides rápidos; IMPA = integridade de
312 membrana plasmática e acrossomal. Neg= negativo; posi Pa=positivo P.aeruginosa; posi Sz=positivo S. zooepidemicus. Aus=ausente. Conteúdo VS (vesículas seminal): SC=vesícula seminal com
313 ausência de conteúdo; DC=vesícula seminal com discreto conteúdo (≤14mm) hipocogênico; AC=vesícula seminal com presença abundante de conteúdo (≥15mm) hipocogênico; CH=vesícula
314 seminal com presença moderada de conteúdo hipercogênico. Aspecto endoscópico: VN=vesícula seminal com aspecto normal; VI=vesícula seminal contaminada, apresentando secreção
315 purulenta; VPF= vesícula seminal parcialmente fechada após o tratamento experimental; VPT=vesícula seminal com aspecto fibrosado após o tratamento experimental. nr=não realizado.

atribuída ao exame endoscópico e biopsia, já que a retirada de fragmentos, mesmo de pequenas dimensões, causa sangramento local (Fritscher-Ravens et al., 2013) e devido aos garranhões apresentarem normospermia na semana anterior (4Sem). Nas semanas seguintes (6Sem e 7Sem), os garranhões 1 e 2 voltaram à normospermia, entretanto o garranhão 3 seguiu apresentando alterações no aspecto do ejaculado.

O volume e concentração dos ejaculados oscilaram ao longo das semanas, com valores similares durante o experimento (Tabela 1, 2 e 3). Apesar da inflamação das vesículas resultar em acúmulo de material purulento e/ou sangue, que pode levar ao aumento do volume e menor concentração espermática (Miragaya et al., 2011), os valores estavam dentro dos limites normais para espécie equina (Pickett et al., 1987), exceto para o garranhão 1 (Tabela 1).

A cinética espermática (MT, MP e RAP) foi semelhante quando comparados os momentos pré-infecção (-9Sem) até término do experimento (7Sem) para os garranhões 2 e 3 e até a quarta semana após tratamento (4Sem) para o garranhão 1 (Tabela 1, 2 e 3), com variações fisiológicas ao longo deste período (Sancler-Silva et al, 2016). A similaridade entre esses resultados pode ser relacionada ao momento de avaliação, já que a cinética foi avaliada logo após a diluição do sêmen. Nesse momento, a qualidade seminal de garranhões com vesiculite pode estar inalterada, porém a longevidade das células espermáticas poderá ser reduzida (Varner, 2000).

O porcentual de neutrófilos teve uma redução de 90% após o tratamento nos três garranhões, permanecendo uma pequena porcentagem no ejaculado ao final do experimento (Tabela 1, 2 e 3), o mesmo já observado em outros estudos (Fennel et al., 2010; Pinto et al., 2014). Em contrapartida, Sancler-Silva (2014) no qual observou que a terapia antimicrobiana local foi capaz de reduzir o porcentual de neutrófilos em aproximadamente 50% uma semana após tratamento, porém esses valores se elevaram 30 dias após a terapia, caracterizando a recidiva da vesiculite seminal.

A IMPA foi menor durante a infecção, possivelmente devido à ação negativa dos neutrófilos no ejaculado. Os efeitos provocados pelos neutrófilos no sêmen estão relacionados ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Baumber et al., 2002), que induzem a lesões na membrana, capacitação precoce, fragmentação do DNA e injúrias mitocondriais (Vignera et al., 2011). Após o tratamento, a IMPA aumentou gradativamente, enquanto que a porcentagem de neutrófilos decresceu, atingindo valores semelhantes quando comparados os períodos pré-infecção (-9Sem) e final do experimento nos três animais (Tabela 1, 2 e 3).

Os garanhões 2 e 3 após o tratamento experimental, não apresentaram crescimento bacteriano nas amostras de ejaculado até o término do experimento (7Sem). O garanhão 1, após o exame endoscópico na quarta semana pós tratamento (4Sem), manifestou um quadro de epididimite bilateral com crescimento de *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* no sêmen, responsável pelas alterações seminais observadas (5, 6 e 7Sem) (Ball, 2008). O garanhão apresentou aumento de temperatura local e corporal e sensibilidade à palpação. Após a orquiectomia pode ser visualizado o aumento de volume e congestão dos epidídimos (Figura 5), caracterizando uma epididimite. O *S. zooepidemicus* é uma bactéria comensal do trato reprodutivo de garanhões encontrada na flora peniana e uretral (Rota et al., 2011). Porém, ela possui potencial patogênico e pode colonizar outras porções do sistema reprodutor, já relatada como causadora de epididimite (Held et al 1990), orquite (Wilson et al., 2007) e vesiculite seminal (Varner et al., 2000).

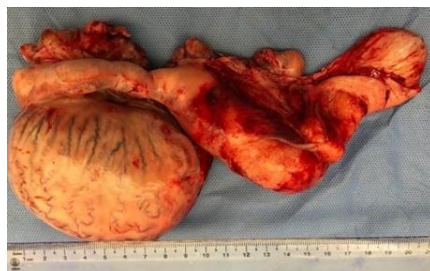


Fig. 5. Testículo e epidídimo esquerdo apresentando epididimite do garanhão 1.

O desenvolvimento de epididimite e/ou orquite concomitante à inflamação das vesículas seminais já foi descrita por alguns autores (Comeford et al., 2011; Pinto et al., 2014; Sancler-Silva, 2014). No caso do garanhão 1, acredita-se que a manipulação endoscópica possa ter favorecido a migração ou inoculado a bactéria no colículo seminal, provocando a epididimite por infecção ascendente (Wilson et al., 2007). O fato do animal não ter apresentado recidiva da infecção da vesícula seminal, pode estar atribuído ao poder residual do produto utilizado para o tratamento, que não permitiu o crescimento bacteriano no interior da glândula.

As mensurações ultrassonográficas das vesículas estiveram dentro dos valores fisiológicos (Fennel et al., 2010; Pinto et al., 2014) e sem sensibilidade dolorosa à palpação, uma vez que esta poderia estar presente (Freestone et al., 1993) assim como alterações no formato e consistência (Varner et al., 2000). A característica hipoeecogênica do conteúdo foi predominante nos três animais, porém uma semana após o estabelecimento da infecção (-1Sem), foi observado conteúdo com pontos hiperecogênicos (Tabela 1, 2 e 3). Essa alteração está associada ao acúmulo de conteúdo purulento no interior das vesículas, frequentemente relatada em garanhões com vesiculite (Edwards, 2008; Fennel et al., 2010; Pinto et al., 2014).

Na quinta semana após o tratamento (5Sem), o aumento na ecogenicidade também foi observado, que pode estar relacionado à manipulação endoscópica e biopsia realizados na semana anterior (4Sem), que causa pequeno sangramento. Além disso, a presença de conteúdo hiperecogênico no lúmen glandular não necessariamente indica infecção, visto que garanhões sabidamente saudáveis apresentam essa característica (Pozor e McDonnell, 2002).

Inicialmente, o aspecto endoscópico das vesículas mostrou uma mucosa uniforme e rosada, com quantidades variáveis de gel límpido. Após uma semana da infecção experimental (-1Sem), as vesículas apresentaram conteúdo purulento e pontos hiperêmicos na mucosa, cujas alterações são descritas em garanhões com vesiculite. Descarga purulenta e sangramento no colículo seminal podem estar associados (Pinto et al., 2014; Varner, 2014), porém não foram observados

387 neste estudo. No exame endoscópio após quatro semanas do tratamento experimental (4Sem),
388 observou-se a oclusão parcial das vesículas seminais nos ganhões 1 e 2, o que dificultou a
389 inserção do endoscópio no interior das vesículas. Essa alteração foi relacionada à característica
390 cauterizante do produto, bem como seu pH baixo (SCHNYDER et al., 1990), utilizado para o
391 tratamento. Da mesma forma, a palidez e rugosidade no epitélio glandular das vesículas seminais
392 observadas no ganhão 3, também foram associadas à infusão local.

393 Quanto às características histopatológicas das vesículas seminais sadias (-9Sem), foi
394 observado epitélio colunar simples não ciliado e estroma fibromuscular com áreas multifocais de
395 hemorragia discreta a moderada, provavelmente provocadas pelo procedimento de biópsia.
396 Verificou-se no tecido conjuntivo a presença de fibroblastos que apresentam morfologia
397 fusiforme e ausência de células inflamatórias (Figura 6.a) (Scheeren et al., 2018).

398 Após 7 semanas de infecção (-1Sem), foi possível observar atrofia do epitélio secretório
399 com presença de duas ou mais camadas de células, associado a inflamação mononuclear intensa.
400 Observou-se ainda, áreas de reatividade de fibroblastos, hiperplasia das glândulas com formação
401 de vacúolos intracitoplasmáticos e pleomorfismo nuclear moderado. Notou-se presença de áreas
402 de atrofia proliferativa associadas a infiltrado inflamatório (Figura 6.b). Essa alteração já foi
403 descrita em outras espécies, como cão (Palmieri et al., 2018) e homem (De Marzo et al., 1999;
404 De Marzo et al., 2007), porém acometendo a próstata.

405 Quatro semanas após o tratamento (4Sem), foi possível observar nos fragmentos de biópsia
406 dos ganhões 1 e 3 a presença de estroma fibromuscular, com colágeno abundante em formato
407 linear e fibroblastos com morfologia fusiforme, indicando regeneração e resolução do processo
408 inflamatório. Diferentemente do observado no período de infecção, notou-se que após o
409 tratamento a presença de infiltrado inflamatório mononuclear foi discreta e raras glândulas, que
410 podem ter diminuído devido à infecção, apresentando hemorragia discreta e vacuolização
411 citoplasmática (Figura 6.c) (Hashem et al., 2015). A vesícula seminal é responsável pela

produção do maior volume do ejaculado (Blanchard et al., 2002), e mesmo após a instilação do produto e seu efeito cauterizante, pôde-se sugerir que o epitélio glandular não perdeu sua função secretora. No garanhão 2 foi possível observar displasia intensa do epitélio glandular, com presença de infiltrado inflamatório misto (mononuclear e polimorfonuclear) (Figura 6.d), sugerindo que o período de 4 semanas após o tratamento não foi suficiente para completo restabelecimento da glândula, porém sem alterar as características seminais.

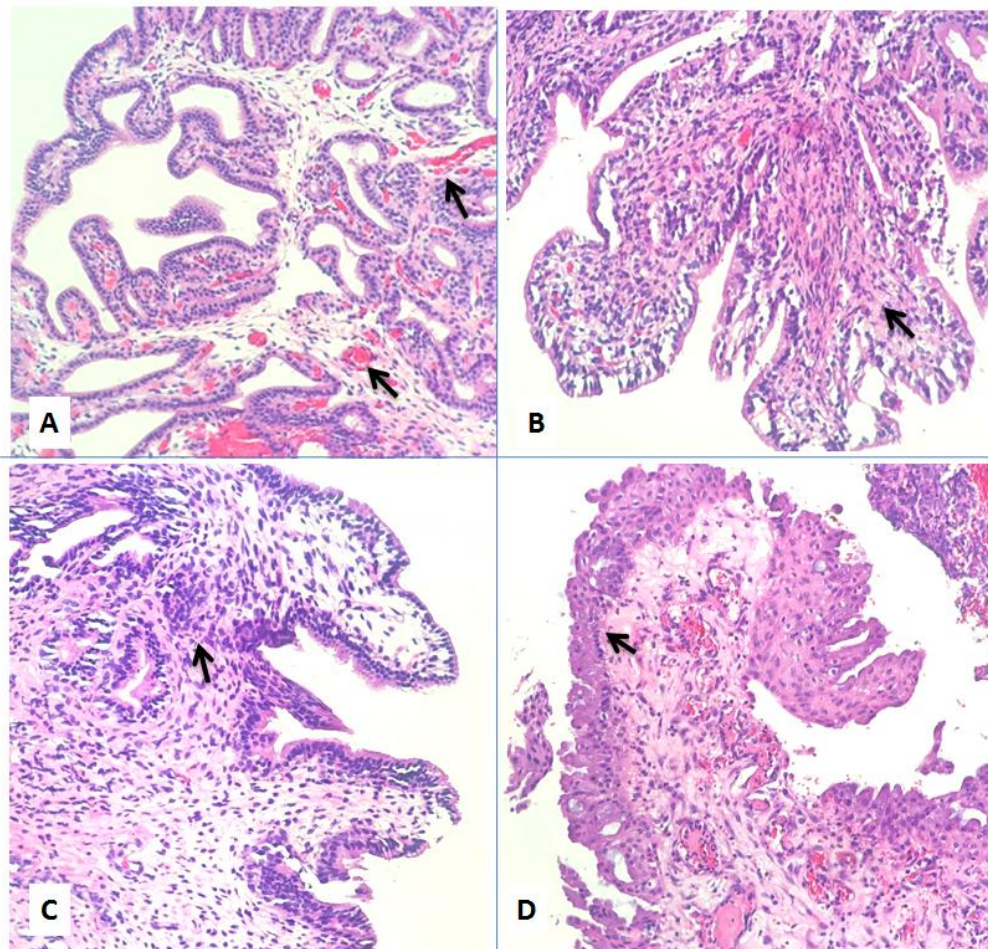


Fig. 6. Características histopatológicas das vesículas seminais. (A) Corte histológico de vesícula seminal sadia (-9Sem), apresentando epitélio colunar simples não ciliado e estroma fibromuscular, com áreas de hemorragia discreta (seta) (3/3). (B) Atrofia do epitélio secretório da vesícula seminal associado a inflamação mononuclear intensa após 7 semanas de infecção (-1Sem) (3/3). (C) Estroma fibromuscular com discreto infiltrado inflamatório (seta) após 30 dias do tratamento (4Sem) (2/3). (D) Displasia do epitélio glandular (seta) com infiltrado inflamatório misto após 30 dias do tratamento (4Sem) (1/3).

A utilização do ácido metacresolsulfônico e formaldeído à 4% foi recentemente relatada na infusão intrauterina em camelos fêmeas e apresentou resultados satisfatórios para o tratamento

de endometrite (Ali et al., 2012; Ali et al., 2015). Estudos posteriores relataram o uso em vacas, para tratamento de metrite e retenção de placenta com resultados eficazes (Daniels et al., 1976; Gilbert et al., 1985). Na experiência dos autores, a terapia local com este produto à 4% já foi testada em dois garanhões para tratamento da vesiculite seminal por *P. aeruginosa*, porém sem eficácia e recidiva da infecção em 30 dias. Ainda, em outros dois garanhões com vesiculite, também por *P. aeruginosa*, foi realizado o tratamento local com o ácido metacresolsulfônico e formaldeído à 50%. Estes animais não apresentaram crescimento bacteriano no ejaculado, porém foi observada a oclusão total das vesículas seminais em um dos garanhões, que teve as características seminais avaliadas e as vesículas monitoradas via palpação e ultrassonografia transretal, sem alterações ao longo de um ano. A escolha da concentração à 30% para infusão nas vesículas neste estudo, levou em consideração esses resultados, associado ao comportamento da *P. aeruginosa* e ao reduzido número de animais envolvidos, uma vez que foi realizada a infecção experimental, em condições controladas.

A *P. aeruginosa* é uma bactéria oportunista, gram-negativa, aeróbia e formadora de biofilme, que possui um especializado *quorum sensing*, sendo capaz de debelar o sistema imune do hospedeiro (Kariminik et al., 2017). Segundo He et al. (2018), é um agente multirresistente aos antimicrobianos disponíveis, e há descrição do desenvolvimento de resistência aos novos antibióticos, como o imipenem. A baixa eficácia da terapia antimicrobiana da vesiculite (Hamn, 1978; Johnson et al., 1980) está relacionada com a falha na destruição do biofilme (Ferris et al., 2017), que mesmo após o tratamento há crescimento bacteriano (Malmgren and Sussemilch, 1992). Neste estudo, a cultura bacteriana realizada a partir do lavado vesicular através da endoscopia na quarta semana após a infusão do produto (4Sem) foi negativa, mostrando que o tratamento foi eficaz, associada às culturas negativas do ejaculado nos garanhões 2 e 3.

4. Conclusões

A solução à 30% de ácido metacresolsulfônico e formaldeído mostrou-se eficaz para o tratamento da vesiculite seminal em garanhões, sendo capaz de evitar o crescimento da *P. aeruginosa* até 7 semanas após o tratamento e diminuir consideravelmente a porcentagem de neutrófilos no ejaculado, mantendo a qualidade seminal dos garanhões (2/3). O desenvolvimento de epididimite bilateral em um dos garanhões sugere cautela na realização do exame endoscópico, pelo risco de contaminação iatrogênica. Após o tratamento, a presença de infiltrado inflamatório foi discreta e raras glândulas foram observadas na histopatologia das vesículas seminais. Mais estudos devem ser desenvolvidos a fim de testar novas concentrações de Lotagen[®] para tratamento desta enfermidade.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

467 **Referências**

- 468 Ali, A., Al-Sobayila, F., Hassaneinb, K.M., Al-Hawas, A. 2012. Ovarian hydrobursitis in female
469 camels (*Camelus dromedarius*): The role of *Chlamydophila abortus* and a trial for medical
470 treatment. Theriogenology. 77, 1754–1758.
- 471 Ali, A., Derar, R., Al-Sobayil, F., Al-Hawas, A., Hassanein, K. 2015. A retrospective study on
472 clinical findings of 7300 cases (2007–2014) of barren female dromedaries. Theriogenology. 84,
473 452-456.
- 474 Ball, B.A. 2008. Diagnostic methods for evaluation of stallion subfertility: a review. J. Equine Vet.
475 Sci. 28, 650-655.
- 476 Baumber, J., Vo, A., Sabeur, K., Ball, B.A. 2002. Generation of reactive oxygen species by equine
477 neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. Theriogenology. 57, 1025-1033.
- 478 Blanchard, T.L., Varner, D.D., Hurtgen, J.P., Love, C.C., Cummings, M.R., Strezmienski, P.J.,
479 Benson, C., Kenny, R.M. 1988. Bilateral seminal vesiculitis and ampullitis in a stallion. J. Am. Vet.
480 Med. Assoc. 192, 525–26.
- 481 Blanchard, T.L., Varner, D.D., Love, C.C., Hurtgen, J.P., Cummings, M.R., Kenney, R.M. 1987.
482 Use of a semen extender containing antibiotic to improve the fertility of a stallion with seminal
483 vesiculitis due to *Pseudomonas aeruginosa*. Theriogenology. 28, 541–546.
- 484 Blanchard, T.L., Woods, J.A., Brinsko, S.P., Varner, D.D., Boothe, D.M. 2002. Theriogenology
485 question of the month: treatment options for erosive seminal vesiculitis caused by *Acinetobacter*
486 *calcoaceticus*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 15, 221-226.
- 487 Blom, E. 1973. Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new
488 classification of the bull spermogram. Nord. Vet. Med. 25, 383-391.
- 489 Carneiro, J.A., Canisso, I.F., Bandeira, R.S., Scheeren, V.F.C., Freitas-Dell'Aqua, C.P., Alvarenga,
490 M.A., Papa, F.O., Dell'Aqua Jr, J.A. 2018. Effects of coenzyme Q10 on semen cryopreservation of
491 stallions classified as having good or bad semen freezing ability. Anim. Reprod. Sci. 192, 107-118.
- 492 Comerford, K.L., Voge, J.L., Love, C.C., Varner, D.D. 2011. Epididymitis, ampullitis and
493 periorchitis due to an ascending seminal vesiculitis caused by *Pseudomonas aeruginosa* in as
494 stallion. Clinical Theriogenology. 3, 366.
- 495 Daniels, W.H., Morrow, D.A., Pickett, B.W., Ball, L. 1976. Effects of intrauterine infusion of
496 gentamicin sulfate on bovine fertility. Theriogenology. 6, 61-68.
- 497 Deegen, E., Klug, E., Lieske, R. 1979. Surgical treatment of chronic purulent seminal vesiculitis in
498 the stallion. Dtshe. Tierarztl. Wochensh. 86, 140-144.
- 499 De Marzo, A.M., Marchi, V.L., Epstein, J.I., Nelson, W.G. 1999. Proliferative inflammatory
500 atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. Am. J. Pathol. 155, 1985-1992.
- 501 De Marzo, A.M., Nakai, Y., Nelson, W.G. 2007. Inflammation, atrophy, and prostate
502 carcinogenesis. Urol Oncol. 25, 398-400.
- 503 Edwards, J.F. 2008. Pathologic conditions of the stallion reproductive tract. Anim. Reprod. Sci. 107,
504 197–207.

- 505 Fennel, L.C., McKinnon, A.O., Savage, C.J. 2010. Cryopreservation of semen from a stallion with
506 seminal vesiculitis. *Equine Vet. Education*. 22, 215-219.
- 507 Ferris, R.A., McCue, P.M., Borlee, G.I., Glapa, K.E., Martin, K.H., Mangalea, M.R., Hennet, M.L.,
508 Wolfe, L.M., Broeckling, C.D., Borlee, B.R. 2017. A model of equine endometritis involving
509 *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Infect. Immun.* 1, 1-47.
- 510 Freestone, J.F., Paccamonti, D.L., Eilts, B.E., McClure, J.J., Swiderski, C.E., Causey, R.C. 1993.
511 Seminal vesiculitis as a cause of signs of colic in a stallion. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 15, 556-557.
- 512 Freitas-Dell'aqua, C.P., Guasti, P.N., Monteiro, G.A., Maziero, R.R.D., Dell'Aqua Jr, J.A., Papa,
513 F.O. Flow cytometric analysis of fertile and subfertile frozen stallion spermatozoa. *Anim. Reprod.*
514 9, 941.
- 515 Fritscher-Ravens, A., Milla, P., Ellrichmann, M., Hellwig, I., Böttner, M., Hadel, K.G., Wedel, T.
516 2013. A novel endoscopic prototype device for gastric full-thickness biopsy for the histopathologic
517 diagnosis of GI neuromuscular pathology: in vivo porcine long-term survival study (with videos).
518 *Gastrointest. Endosc.* 77, 262–271.
- 519 Gilbert, R.O., Coubrough, R.I., Venter, B.J., Witcomb, M.A. 1985. Successful transfer of embryos
520 recovered from a cow with chronic cervicitis of mixed aerobic and anaerobic bacterial etiology.
521 *Theriogenology*. 23:593-96.
- 522 Hamn, D.G. 1978. Gentamycin therapy of genital tract infections in stallions. *J. Eg. Med. Surg.* 2,
523 243-245.
- 524 Hashem, H.E., Abd El-Haleema, M.R., Abassb, M.A. 2015. Epithelial and stromal alterations in
525 prostate after cypermethrin administration in adult albino rats (histological and biochemical study).
526 *Tissue Cell*. 47, 366–372.
- 527 He, J., Jia, X., Yang, S., Xu, X., Sun, K., Li, C., Yang, T., Zhang, L. 2018. Heteroresistance to
528 carbapenems in invasive *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 51, 413-
529 421.
- 530 Held, J.P., Adair, S., McGavin, M.D., Adams, W.H., Toal, R. and Henton, J. 1990 Bacterial
531 epididymitis in two stallions. *J. Am. vet. med. Ass.* 197, 602-604.
- 532 Johnson, T.L., Kenney, R.M., McGee, W.R., Polk, H.C. 1980. *Pseudomonas* infection in a stallion:
533 case report. *Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Equine. Pract.* 111-116.
- 534 Kariminik, A., Baseri-Salehi, M., Kheirkhah, B. 2017. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing
535 modulates immune responses: an update review article. *Immunology Letters*. 190, 1-6.
- 536 Klug, E., Deegen, E., Liesk, R., Freytag, K., Martin, J.C., Gunzel, A.R., Bader, H. 1979. The effect
537 of vesiculectomy on seminal characteristics in the stallion. *J. Reprod. Fertility Suppl.* 27, 61-66.
- 538 Malmgren, L., Sussemilch, B.I. 1992. Ultrasonography as a diagnostic tool in a stallion with
539 seminal vesiculitis: a case report. *Theriogenology*. 37, 935-938.
- 540 Mancill, S.S. 2010. Clinical and sub-clinical seminal vesiculitis in the stallion. *Equine. Vet.*
541 *Education*. 22, 220-222.

- 542 Miragaya, M.H., Pinto, M.R., Neild, D.M. 2011. Muestreo y lavage de glândulas vesiculares en el
543 padrillo. In: II Congress on Equine Reprod. 71-72.
- 544 Palmieri, C., Story, M., Lean, F.Z.X., Akter, S.H., Grieco, V., De Marzo, A.M. 2018. Diagnostic
545 utility of cytokeratin-5 for the identification of proliferative inflammatory atrophy in the canine
546 prostate. *J. Comparative Patho.* 158, 1-5.
- 547 Parrish, J.J., Susko-Parrish, J., Winer, M.A., First, N.L., 1988. Capacitation of bovine sperm by
548 heparin. *Biol. Reprod.* 38, 1171–1180.
- 549 Pearson, L.K., Campbell, A.J., Tibary, A. 2013. How to diagnose and treat hemospermia: a review
550 and case series. *Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Equine Pract.* 59, 40-50.
- 551 Pickett, B.W., Voss, J.L., Bowen, R.A., Squires, E.L., McKinnon, A.O. 1987. Seminal
552 characteristics and total scrotal width (T.S.W.) of normal and abnormal stallions. *Proc. Annu. Meet.*
553 *Am. Assoc. Equine Pract.* 487–518.
- 554 Pinto, M.R., Neild, D.M., Benegas, D., Vieyra, D.H., Miragaya, M.H. 2014. Successful treatment of
555 seminal vesiculitis with imipenem-cilastatin in a stallion. *J. Equine Vet. Sci.* 34, 544-548.
- 556 Pozor, M.A. Diagnostic applications of ultrasonography to stallion's reproductive tract. 2005.
557 *Theriogenology.* 64, 505–509.
- 558 Pozor, M.A., McDonnell, S.M. 2002. Ultrasonographic measurements of accessory sex glands,
559 ampullae, and urethra of normal stallions of various size types. *Theriogenology.* 58, 1425-1433.
- 560 Rota, A., Calicchio, E., Nardoni, S., Fratini, F., Ebani, V.V., Sgorbini, M., Panzani, D., Camillo, F.,
561 Mancianti, F. 2011. Presence and distribution of fungi and bacteria in the reproductive tract of
562 healthy stallions. *Theriogenology.* 76, 464–470.
- 563 Samper, J., Tibary, A. 2006. Disease transmission in horses. *Theriogenology.* 66, 551-9.
- 564 Sancler-Silva, Y.F.R., Cavaleiro, T.M.S., Rodrigues-Junior, E., Papa, F.O. 2016. The effect of
565 season on semen parameters in stallions from the southeastern region of Brazil. *J. Equine Vet. Sci.*
566 43, S79.
- 567 Sancler-Silva, Y.F.R. Efeito do tratamento local de vesiculite seminal sobre a qualidade e
568 longevidade do sêmen equino. 2014. 124f. Dissertation (Master in Veterinary Medicine) – São
569 Paulo State University.
- 570 Scheeren, V.F.C., Gobato, M.L.M., Papa, P.M., Cavaleiro, T.M.S., Canuto, L.E.F., Rodrigues, L.T.,
571 Bandeira, R.S., Watanabe, M.J., Rocha, N.S., Alvarenga, M.A., Papa, F.O. 2018. The use of
572 endoscopic biopsy to compare histological finds of stallions with and without seminal vesiculitis. *J.*
573 *Equine Vet. Sci.* 66, 50.
- 574 Schnyder, D., Ku"pfer, U., Zwahlen, R., Schnyder, D., Ku"pfer, U., Zwahlen, R. 1990. Changes in
575 the endometrium of the cow after intrauterine administration of different drugs. *Schweiz Arch*
576 *Tierheilkd.* 64, 132-353.
- 577 Stewart, J., Ellerbrock, R., Schlafer, D., Lima, F., Canisso, I. 2016. Histologic features of accessory
578 sex glands throughout equine development. *J. Equine Vet. Sci.* 43, S74.
- 579 Stoesser, N., Batty, E.M., Eyre, D.W., Morgan, M., Wyllie, D.H., Del Ojo, C.E., Johnson, J.R.,
580 Walker, A.S., Peto, T.E.A., Crook, W. 2013. Predicting antimicrobial susceptibilities for

- 581 *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates using whole genomic sequence data. J.
582 Antimicrobial Chemotherapy. 68, 2234–2244.
- 583 Tibary, A. 2007. Endoscopy of the reproductive tract in the stallion, in: Samper, J.C., Pycck, J.F.,
584 McKinnon, A.O. Saunders, Current Therapy in Equine Reproduction, Philadelphia, pp. 214-219.
- 585 Tibary, A., Rodriguez, J.S. 2011. Causas e manejo de lãs subfertilidad em padrillos. In: II Congress
586 Equine Reprod. 55-69.
- 587 Tibary, A., Rodriguez, J., Samper, J.C. 2009. Microbiology and diseases of semen, in: Samper, J.C.
588 Saunders, Equine Breeding Management and Artificial Insemination. Philadelphia, pp.99-112.
- 589 Varner, D.D., Blanchard, T.L., Brinsko, S.P., Love, C.C., Taylor, T.S., Johnson, L.
590 2000. Techniques for evaluating selected reproductive disorders of stallions. Anim. Reprod. Sci. 60,
591 493–509.
- 592 Varner, D.D. 2014. How to perform urethral endoscopy in the stallion for diagnostic purposes. Proc.
593 Annu. Meet. Am. Assoc. Equine. Pract. 60, 309-315.
- 594 Varner, D.D., Schumacher, J. 2011. Abnormalities of the accessory sex glands, in: McKinnon,
595 A.O., Squires, E.L., Vaala, W.E., Varner, D.D. Wiley-Blackwell, Equine reproduction. United
596 Kingdom, pp.867-880.
- 597 Vignera, S., Vicari, E., Condorelli, R.A., D'Agata, R., Calogero, D.A.E. 2011. Male accessory
598 gland infection and sperm parameters (review). Int. J. Androl. 34, 330–47.
- 599 Wilson, K.E., Dascanio, J.J., Dunca, R., Delling, U., Ladd, S.M. 2007. Orchitis, epididymitis and
600 pampiniforme phlebitis in a stallion. Equine Vet. Edu. 19, 5, 239-243.