

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA ‘JÚLIO DE MESQUITA FILHO’
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
UNESP - *CAMPUS* JABOTICABAL**

**ESTUDO DA VIABILIDADE DO USO DA PUNÇÃO
BIÓPSIA ASPIRATIVA POR AGULHAS FINA COMPARADA
AO DA “TRU-CUT”, EM TESTÍCULOS DE CÃES.**

Guilherme Nascimento Cunha

Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Julho de 2009

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA ‘JÚLIO DE MESQUITA FILHO’
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
UNESP - *CAMPUS* JABOTICABAL**

**ESTUDO DA VIABILIDADE DO USO DA PUNÇÃO
BIÓPSIA ASPIRATIVA POR AGULHAS FINA COMPARADA
AO DA “TRU-CUT”, EM TESTÍCULOS DE CÃES.**

Guilherme Nascimento Cunha

Orientador: Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Cirurgia Veterinária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Julho de 2009

C972e CUNHA, Guilherme Nascimento
Estudo da viabilidade do uso da punção biópsia aspirativa por agulhas fina comparada ao da “tru-cut”, em testículo de cães.
/ Guilherme Nascimento Cunha. — Jaboticabal, 2009
ix, 45f.; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2009.

Orientador: Wilter Ricardo Russiano Vicente

Banca examinadora: Marcelo Emílio Beletti, José Octávio Jacomini, Maria Rita Pacheco, Paulo Henrique Franceschini

Bibliografia

1. Punção biópsia por agulha fina. 2. “tru-cut”. 3. Cães. 4. Testículo. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:617:636.7

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Campus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

GUILHERME NASCIMENTO CUNHA – nascido em 31 de dezembro de 1975, na cidade de Uberlândia–MG, onde concluiu o Ensino Médio em dezembro de 1993. Ingressou em julho de 1994 no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia – Uberlândia–MG concluindo em julho de 1999. Foi bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (CNPq) na área de Parasitologia. Graduiu-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Uberlândia – Uberlândia –MG em Julho de 1999. Em agosto de 1999 iniciou residência Médico Veterinária em Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da UFU, concluindo em Fevereiro de 2001. Em Março de 2002 iniciou mestrado em Medicina Veterinária (Ciências Veterinárias) na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, concluindo em março de 2004. Ingressou em março de 2005 no curso de doutorado em Cirurgia Veterinária na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP – Campus de Jaboticabal.

O CAMINHO NÃO TRILHADO

Num bosque de folhas amareladas
dois caminhos haviam e eu não podia
ser dos dois caminhante, fiquei ali
a concentrar-me num deles,
olhando fixamente até perdê-lo de vista
nessa curva da folhagem distante.

Mas foi pelo outro que fui igualmente bom
e até certo ponto talvez melhor,
porque cheio de erva e a pedir que o usassem;
embora quem por ele passasse
ainda mais usado se sentisse.

Tanto um como o outro ali estavam,
de folhas no chão que nenhum pé escurecera.
Oh, deixei o primeiro para outro dia!
Mas sabendo como um caminho a outro leva,
duvido que lá possa voltar um dia.

Isto direi com um suspiro na alma
no tempo que durar a minha vida:
Havia nesse bosque dois caminhos, e
eu fui pelo menos utilizado,
e aí reside toda a diferença.

Robert Frost

DEDICO

A Deus, pela vida e oportunidades

Aos meus pais, Mario e Martha pelo apoio e dedicação.

Aos meus irmãos, Henrique e Raquel e minha cunhada Carolina pela presença constante, nos dias bons e ruins.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Prof. Wilter Ricardo Russiano Vicente pela paciência, dedicação e orientação cautelosa e presente, durante todas as etapas do curso.

Ao Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti, da Universidade Federal de Uberlândia – UFU, pela ajuda inestimável e colaboração prestada durante todo o percurso do experimento.

Ao Prof. Dr. José Octávio Jacomini, da Universidade Federal de Uberlândia – UFU, pela grande boa vontade e ajuda prestada em todos os momentos.

Ao Técnico Rui, do Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Morfologia – Histologia/Embriologia da UFU pela caprichosa ajuda no preparo do material coletado.

Aos caros amigos Hugo, Hudson, Luciana, Aline, Fabiana, José e Érika pelo ombro amigo presente durante todo o tempo.

À Aracéle, pela palavra amiga e ajuda nos momentos de aperto em todo o longo percurso.

À Maricy e Eliandra pela ajuda, conselhos e disponibilidade nestes últimos anos.

À Karine, Paulo e Afonso, pela valiosa e indispensável ajuda prestada para a realização da parte experimental da pesquisa.

À Associação Protetora dos Animais pela liberação dos animais utilizados.

Aos animais cuja participação indispensável tornou possível a realização desse experimento.

Ao Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia pela oportunidade e colaboração para a execução do experimento, disponibilizando a estrutura dos laboratórios de Patologia Clínica e Centro Cirúrgico Experimental.

À Daise, Dâmaso e Ana Cláudia do Instituto de Imunologia da UFU pela oportunidade e colaboração e idéias para a execução do experimento, disponibilizando a estrutura dos laboratórios de Imunologia.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	I
LISTA DE ABREVIATURAS	III
LISTA DE TABELAS.....	IV
LISTA DE FIGURAS.....	VI
ESTUDO DA VIABILIDADE DO USO DA PUNÇÃO BIÓPSIA ASPIRATIVA POR AGULHAS FINA COMPARADA AO DA 'TRU-CUT', EM TESTÍCULOS DE CÃES	VIII
STUDY OF VIABILITY OF THE USE OF FINE NEEDLE ASPIRATION COMPARED TO THE "TRU-CUT 'IN TESTICLES OF DOGS	IX
1 INTRODUÇÃO	1
OBJETIVO GERAL.....	2
<i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</i>	<i>2</i>
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
3. MATERIAL E MÉTODOS	7
3.1 ANIMAIS	7
3.2 COLHEITA E ANÁLISE DO SÊMEN	7
3.3 OBTENÇÃO DO SORO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-ESPERMATOZÓIDES	8
3.4 PROCEDIMENTOS PRÉ-CIRÚRGICOS	8
3.5 AVALIAÇÃO DAS MEDIDAS DO ESCROTO	9
3.6 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	9
3.6.1 Grupo 1	9
3.6.2 Grupo 2	10
3.6.3 Técnica cirúrgica de orquiectomia – G1 e G2	11
3.7 ENSAIO IMUNOLÓGICO	11
3.7.1 Inoculação do antígeno e colheita dos soros controles positivos e negativos	12
3.7.2 Técnica de ELISA indireta	12
3.8 ANÁLISE CITOLÓGICA E HISTOLÓGICA.....	12
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	13

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
4.1 ESPERMIOGRAMA	15
4.2 AVALIAÇÃO DAS MEDIDAS DO ESCROTO	18
4.3 CITOLOGIA DO TESTÍCULO (PAAF)	20
4.4 HISTOLOGIA DO TESTÍCULO (“TRU-CUT”)	23
4.5 AVALIAÇÃO QUALITATIVA DO PROCESSO INFLAMATÓRIO E CICATRICAL	24
4.5.1 G1a (PAAF) e G2a (“tru-cut”) aos 3 dias	24
4.5.2 G1b (PAAF) e G2b (“tru-cut”) aos 7 dias	25
4.5.3 G1c (PAAF) e G2c (“tru-cut”) aos 14 dias	27
4.5.4 G1d (PAAF) e G2d (“tru-cut”) aos 62 dias	29
4.7 PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI ESPERMATOZÓIDES PELO TESTE ELISA INDIRETO	31
5 CONCLUSÕES	34
6 REFERÊNCIAS	35
7 APÊNDICE	42
APÊNDICE A – ESPERMIOGRAMA	42
APÊNDICE B – TÉCNICAS IMUNOLÓGICAS	43
B1 OBTENÇÃO DAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA DOS ESPERMATOZÓIDES	43
B2 MENSURAÇÃO POR ELETROFORESE/ SDS-PAGE	43
B3 TÉCNICA DE ELISA INDIRETA	44

LISTA DE ABREVIATURAS

ACF - Adjuvante Completo de Freud

APA – associação de proteção aos animais

xg – vezes a gravidade

G – gauge

HE – hematoxilina e eosina

Ig – imunoglobulina

Kg - quilograma

M - molar

mM – milimolar

mg - miligrama

mL – mililitro

N - normal

PAAF – punção aspirativa com agulha fina

SPAg - antígeno solúvel de espermatozóide de cão

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

UI – unidade internacional

μm – micrômetro

μL - microlitros

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Grupos, subgrupos, número de animais e datas das orquiectomias pós-procedimento experimental (biópsias com punção por agulha fina e por agulha “tru-cut”) em cães. Jaboticabal, 2009	p. 8
Tabela 2.	Medianas, quartilhos menores e maiores do vigor espermático de cães, intra e entre grupos, antes e após 3, 7, 14 e 62 dias das biópsias testiculares por punção com agulha fina (PAAF) e “tru-cut”. Jaboticabal-SP, 2009	p. 16
Tabela 3.	Medianas, quartilhos menores e maiores da molitidade espermática de cães, intra e entre grupos, antes e após 3, 7, 14 e 62 dias das biópsias testiculares por punção com agulha fina (PAAF) e “tru-cut”. Jaboticabal-SP, 2009	p. 17
Tabela 4.	Medianas, quartilhos menores e maiores da concentração ($\times 10^6$ espermatozoides/mL) espermática de cães, antes e após 3, 7, 14 e 62 dias das biópsias testiculares por punção com agulha fina (PAAF) e “tru-cut”. Jaboticabal-SP, 2009	p. 17
Tabela 5.	Medianas, quartilhos menores e maiores dos defeitos maiores (%) dos espermatozoides de cães, intra e entre grupos, antes e após 3, 7, 14 e 62 dias das biópsias testiculares por punção com agulha fina (PAAF) e “tru-cut”. Jaboticabal-SP, 2009	p. 18
Tabela 6.	Medianas, quartilhos menores e maiores dos defeitos menores (%) dos espermatozoides de cães, intra e entre grupos, antes e após 3, 7, 14 e 62 dias das biópsias testiculares por punção com agulha fina (PAAF) e “tru-cut”. Jaboticabal-SP, 2009	p. 18

Tabela 7.	Médias e desvios padrão intra e entre grupos do comprimento do escroto mensurada por paquímetro, antes e após 3, 7, 14 e 62 dias das biópsias testiculares por punção com agulha fina (PAAF) e “tru-cut”. Jaboticabal-SP, 2009	p. 19
Tabela 8.	Médias e desvios padrão intra e entre grupos da largura do escroto mensurada por paquímetro, antes e após 3, 7, 14 e 62 dias das biópsias testiculares por punção com agulha fina (PAAF) e “tru-cut”. Jaboticabal-SP, 2009	p. 20
Tabela 9.	Médias e desvios padrão do número de células da linhagem germinativa e de Sertoli obtidas por punção biópsia com agulha fina em cães, Jaboticabal-SP, 2009	p. 22
Tabela 10.	Médias, desvios padrão, coeficientes de variação, mínimo e máximo da quantidade de túbulos normal, parcial ou totalmente lesados presentes na biópsia com agulha “tru-cut” em cães, Jaboticabal-SP, 2009	p. 23

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Testículo. A - (cr- terço cranial; m- terço médio; ca- terço caudal; e- epidídimo). B- Local da punção (seta) p. 10
- Figura 2. Fotomicrografias de células obtidas por punção biópsia com agulha fina (PAAF) de testículos de cães. A- Espermátócito I (S1), Espermátide inicial (Ei), Espermátide final (Ef), Células de Sertoli (Sc). B- Nota-se: Espermatogônia (Sg), Células de Sertoli (Sc), Espermátide inicial (Ei). Coloração: May-Grunwald-Giensa p. 21
- Figura 3. Fotomicrografias do testículo de cão colhido após a biópsia por punção com agulha fina. A- Área de lesão do parênquima testicular com 3 dias pós biópsia (L). B – 7 dias após biópsia (L). C – 14 dias após biópsia (L). D – 62 dias após a biópsia. Coloração: Hematoxilina-eosina p. 26
- Figura 4. Fotomicrografias de testículo de cão colhido no 7º dia após a biópsia com agulha fina em A e agulha “Tru-cut” em B e C. A- Presença de células germinativas (Ge) degeneradas no interstício; adjacente a este nota-se tecido conjuntivo fibroso em reorganização com abundância de fibroblastos (seta) e túbulos seminíferos (T). B- Nota-se processo degenerativo testicular por presença de células gigantes multinucleadas (Gi) no interior dos túbulos seminíferos (T). C- Área de infiltrado de células inflamatórias Coloração: Hematoxilina-eosina p. 28
- Figura 5. Fotomicrografia do testículo de cão colhido após a biópsia por agulha “Tru-cut”. A- Área de lesão do parênquima testicular com 3 dias pós biópsia (L), Hemorragia (H). B – 7 dias após biópsia (L). C – 14 dias após biópsia (L). D – 62 dias após a biópsia. Coloração: Hematoxilina-eosina p. 29

- Figura 6. Fotomicrografias do testículo de cão colhido no 14º dia após a biópsia aspirativa com agulha fina. A - Nota-se presença de tecido conjuntivo fibroso em reorganização com abundância de fibroblastos (cabeça de seta), fibras colágenas (seta preta) e macrófagos (seta azul). B – Presença de tecido conjuntivo rico em fibras colágenas (seta preta) já organizado e com poucos núcleos de células (cabeça de seta) colhido no 62º dia após biópsia. Coloração: Hematoxilina-eosina (A e B - Barra corresponde a 50 µm) p. 30
- Figura 7. Representação gráfica da concentração de anticorpos IgG anti-SPAg (antígeno solúvel de espermatozóide de cão) expressos em índice ELISA (IE) em amostras de soros de cães submetidos à técnica de biópsia por punção com agulha fina, colhida antes e após 3 (A), 7 (B), 14 (C) e 62 (D) dias do procedimento p. 32
- Figura 8. Representação gráfica da concentração de anticorpos IgG anti-SPAg (antígeno solúvel de espermatozóide de cão) expressos em índice ELISA (IE) em amostras de soros de cães submetidos à técnica de biópsia por agulha “tru-cut”, colhida antes e após 3 (A), 7 (B), 14 (C) e 62 (D) dias do procedimento p. 33
- Figura 9. Histograma da concentração de anticorpos IgG anti-SPAg (antígeno solúvel de espermatozóide de cão) expressos em índice ELISA (IE) em amostras de soros de cães submetidos às técnicas de biópsias por punção com agulha fina (PAAF) e agulha “tru-cut”, colhida após 3, 7, 14 e 62 dias de cada procedimento p. 33
- Figura 10. Representação gráfica da concentração de anticorpos IgG anti-SPAg (antígeno solúvel de espermatozóide de cão) expressos em índice ELISA (IE) em amostras de soros controles de cães pré e pós-imunização p. 45

ESTUDO DA VIABILIDADE DO USO DA PUNÇÃO BIÓPSIA ASPIRATIVA POR AGULHAS FINA COMPARADA AO DA “TRU-CUT”, EM TESTÍCULOS DE CÃES.

RESUMO – O objetivo deste estudo foi avaliar histologicamente as biópsias testiculares de cães obtidas por punção aspirativa por agulhas fina (PAAF) e “tru cut”. Foram utilizados 40 cães, adultos, hígidos, distribuídos em 2 grupos: G1 - punção biópsia aspirativa; e G2 - biópsia com agulha “tru-cut”. Cada grupo foi dividido em quatro subgrupos (Ga, Gb, Gc e Gd) com cinco animais cada, sendo estes orquiectomizados 3, 7, 14 e 62 dias após as biópsias PAAF ou “Tru-cut”. O material colhido pela PAAF foi submetido à avaliação citológica, e o proveniente da biópsia “tru-cut” e orquiectomia submetidos à histopatologia. Foram avaliados os espermiogramas e mensuração de comprimento e largura do escroto e colhido o soro para pesquisa de anticorpo anti-espermatozóides. Referente ao espermiograma e a mensuração do escroto não foram observados diferenças ($p \geq 0,05$) significativas. A amostra direcionada para citologia e histologia obtida pelas duas técnicas foi considerada de quantidade suficiente para diagnóstico. Na histopatologia a PAAF apresentou menor área de lesão e reação inflamatória comparada a “tru cut”, no entanto esta última apresentou maior quantidade de material, preservando a arquitetura dos túbulos seminíferos e interstício. Não foi observado diferença ($p \geq 0,05$) na produção de anticorpos anti-espermatozóides, após as biópsias. Concluímos que apesar das biópsias fornecerem material em qualidade e quantidade adequadas, e da PAAF ter se mostrado menos traumática, a escolha da técnica a ser empregada dependerá da finalidade para o qual o material se destina.

PALAVRAS-CHAVE: punção biópsia por agulha fina, “tru cut”, cão, testículo

STUDY OF VIABILITY OF THE USE OF FINE NEEDLES ASPIRATION COMPARED TO THE 'TRU-CUT' IN TESTICLES OF DOGS.

SUMMARY – The aim of this study it was evaluate hystologically the testicular biopsies in dogs obtained by aspirative puncture by fine needle and “tru-cut”. Forty males dogs, adults, healthies were used, distributed in 2 groups: G1 – Fine Needle aspiration; and G2- biopsy by “Tru-cut”. Each group were shared in four groups (Ga, Gb, Gc e Gd) with 5 animals each, and all of then were orchiectomized after 3, 7, 14, 62 days after the biopsies by FNA and “tru-cut” being performed. The samples collected by FNA were submitted to cytology evaluate, and the sample from tru-cut biopsy and orchiectomy submitted to histopathology. The spermiograms were evaluated, the testicular length and with were measure, and the animal's blood were collected to the anti-sperm antibody quantification. About the spermogram and measurement of scrotal bag any significative difference was observed ($p>0,05$). The sample to cytology and histology obtained from two techniques showed be in quantity enough to diagnostic. In histopathology, the biopsy FNA showed smaller damage area and inflammatory reaction compared to tru-cut, however this one showed biggest quantity of material, preserving the seminiferous tubules architerture and interstitium. It was not observed significative difference at anti-sperm antibodies production. We concluded that althought the biopsies provide material in quantity and quality appropriate, and the PAAF showed less traumatic, the choose of the technique to be used will depend the purpose for which the material is intended.

KEY WORDS: biopsy fine needle aspiration, tru-cut, dog, testicle.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente é inegável a importância da criação de cães tanto sob o aspecto econômico como o social, pois, particularmente nos grandes centros urbanos, estes animais cada vez mais são considerados um “ente” da família e exercem diversas funções a serviço do homem.

Neste contexto, ganha relevância estudos sobre aspectos da reprodução e de métodos de diagnóstico que permitam obter resultados confiáveis com rapidez e baixo custo. Assim, técnicas específicas ou auxiliares para procedimentos de investigação clínica têm sido desenvolvidas com o objetivo de atender as necessidades de interesse veterinário para elucidação de problemas orgânicos.

Para os animais machos, sempre houve alguma limitação em termos de meios e métodos para a realização de diagnóstico sobre disfunções reprodutivas, sendo que na clínica, o espermiograma ainda é o procedimento mais empregado no primeiro momento de avaliação da higidez do sistema reprodutor do cão.

A técnica de biópsia incisional é, sem dúvida, método de importância diagnóstica e de uso freqüente nos mais diferentes órgãos. Contudo, em se tratando de testículo, a relevância deste procedimento oferece importante restrição. Assim, alternativamente, a punção biópsia aspirativa pode suprimir a lacuna existente para se obter material desta gônada pelo método convencional.

A punção biópsia aspirativa é utilizada em homens e animais dentre os quais o cavalo, cão, onça pintada e lhama. Contudo, particularmente para o cão, é pouco empregada, não fazendo parte da rotina de investigação clínica sobre problemas reprodutivos havendo, portanto, pouquíssima informação científica a respeito de seu uso.

Sendo assim a necessidade do estudo comparativo das técnicas de biópsia por punção aspirativa com agulha fina (PAAF) e “tru-cut” se tornou principal objeto de nossa investigação.

OBJETIVO GERAL

Avaliar e comparar, as técnicas de biópsias por punção aspirativa com agulha fina (PAAF) e “tru-cut” em testículos de cães, como método diagnóstico de alterações na fertilidade ou histopatológicas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a- Verificar comparativamente se os procedimentos fornecem material citológico e histológico adequado.
- b- Analisar o processo inflamatório e cicatricial;
- c- Avaliar a qualidade do sêmen obtido pré e pós biópsias;
- d- Investigar a presença ou não de anticorpos anti-espermatozóides pós biópsias.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A infertilidade nos machos pode ser conseqüente à patologias, de origem congênita ou adquirida, de localização pré-testiculares, testiculares ou pós-testiculares (JOHNSTON, 2001). A pré-testicular usualmente deve-se a alterações na hipófise ou adrenal; a testicular envolve o testículo propriamente e a pós-testicular consiste da obstrução do ducto espermático (AL-JITAWI et al., 1997).

Sendo assim torna-se imprescindível a pesquisa de métodos para diagnóstico da causa de infertilidade no homem e animais domésticos. Esta análise pode ser realizada por exame clínico, avaliação seminal, dosagens hormonais, ultrassonografia e biópsia testicular (AL-JITAWI; AL-RAMAHI e HAKOOZ, 1997; CRAFT et al., 1997; MANSOUR; SENNA; AHMED, 1999).

O aprimoramento nesta área ainda conta outras metodologias para diagnóstico como a imunologia, radioimunoensaio, bioquímica, criobiologia, cultura de tecidos e células, bioengenharia genética e técnicas empregadas para estudo de sêmen (JAINUDEEN e HAFEZ, 1995).

Devido ao grande número de alternativas que podem provocar alterações da fertilidade no homem, a biópsia incisional tem merecido destaque como ferramenta diagnóstica de acordo com os relatos de Craft et al., (1997).

Segundo PIANTON et al. (1985) uma alternativa à biópsia incisional testicular na investigação das afecções reprodutivas é a opção pela biópsia por punção aspirativa com agulha fina (PAAF), porém tem sido pouco utilizada desde a publicação original de HUHNER (1928).

PERSSON; AHRÉN e OBRANT (1971) compararam a biópsia PAAF com a incisional no homem, encontrando completa concordância entre os resultados em testículos normais. De outra parte, MALLIDIS e BAKER (1994) descreveram para este tipo de comparação que apenas 56% dos pacientes avaliados apresentaram resultados em completo acordo diagnóstico de fertilidade, 38% revelaram pequenas diferenças e 3,7% mostraram completa diferença. RAMMOU-KINIA et al. (1999) relataram que 88,5% dos casos estudados em humanos tiveram excelente relação entre os resultados das biópsias e o diagnóstico citológico. A especificidade e sensibilidade da biópsia

PAAF foi de 100%. MAHAJAN et al. (1999) encontraram, no homem, similaridade de 97% entre os diagnósticos por histologia e citologia. ARIDOGAN et al. (2002) trabalhando com pacientes humanos portadores de azoospermia ou severa oligospermia, encontraram em 90% dos testes de citopatologia compatibilidade com os achados histológicos.

No homem a biópsia PAAF é utilizada com êxito em casos de carcinoma *in situ* em testículos (BRACKENBURY et al., 1993), e infertilidade por alterações hormonais, obstrutivas, infecções, hidrocele, cistos e tumores (RAMMOU-KINIA et al., 1999). Também tem sido relatada como técnica de diagnóstico eficiente para microfilária (MEHROTRA e SINGH, 2000).

A biópsia aspirativa, considerada como excelente procedimento para diagnóstico de infertilidade no homem, vem sendo pouco difundido na prática veterinária (MANSOUR; SENNA e AHMED, 1989; ZAHN et al., 1999). Nota-se que as investigações clínicas na infertilidade de machos caninos são limitadas, não sendo possível ao clínico realizar diagnóstico preciso (DAHLBOM; MAKINEN; SUOMINET, 1997).

A citologia testicular obtida por aspiração foi utilizada como auxiliar no diagnóstico clínico em casos de azoospermia e afecções testiculares em cães (DAHLBOM; MAKINEN e SUOMINET et al. 1997; LEME e PAPA, 1997), equinos (MANSOUR; SENNA e AHMED, 1999), lhamas (HEATH et al., 2002) e em onça pintada (PAZ et al., 2003).

Em equinos, a PAAF testicular foi utilizada para avaliar as características celulares após aquecimento dos testículos (LEME e PAPA, 1999), na comparação de diferentes métodos de coloração utilizados na citologia aspirativa (ZAHN et al., 1999) e também para avaliar a influência da estação de monta nas células espermatogênicas e de Sertoli (LEME; PAPA e TRINCA, 2002).

Nos cães, estudos da fertilidade em casos de injúria aguda da medula espinhal têm sido investigados com uso da PAAF, mediante quantificação da espermatogênese por análise da citologia testicular (OHL et al., 2001). Porém, vários fatores influenciam os clínicos a optarem pela não utilização como método de rotina na reprodução humana, por receio de trauma, hematomas, hemorragias e implantação de tumores nos

locais puncionados. Outro importante fator limitante para o emprego desta técnica é a falta de patologistas experientes nas análises citológicas (ARİDOGAN et al., 2002).

Ainda, para a espécie humana, a biópsia por agulha fina testicular é técnica de diagnóstico simples, confiável, menos invasiva e com poucas complicações, sendo bem tolerada. Seu uso pode evitar investigação clínica desnecessária e de alto custo (PERSSON; AHRÉN; OBRANT, 1971; MALLIDIS e BAKER, 1994; AL-JITAWI; AL-RAMAHI e HAKOOZ, 1997; ARİDOGAN et al., 2002;). Com a citologia torna-se possível também obter avanços na citometria. Assim, o diagnóstico para malignidade de tumores pode ser feito por patologistas capacitados usando técnicas histológicas sem utilizar método de coloração especial. Quanto à biópsia incisional, esta é mais invasiva, dolorosa e requer sala e materiais cirúrgicos adequados (PERSSON; AHRÉN e OBRANT, 1971).

No homem vantagens diferenciais são observadas na biópsia aspirativa comparada à convencional. Devido às várias punções, em diferentes áreas, a amostra obtida é mais representativa que a biópsia incisional. Outro fato é que o uso da biópsia convencional nos testículos, devido a sua estrutura delicada, causa muitos artefatos nos cortes histológicos, podendo levar à falha do diagnóstico correto, fato este não visto na citologia (GOTTSHALK-SABAG et al., 1993).

Apesar das várias vantagens, a citologia possui algumas limitações como a perda da padronização sobre a qualidade e a quantidade dos achados, tal conclusão pode ser observada em equinos (LEME e PAPA, 2000). Tem-se verificado que em cães, a quantidade de tecido obtido por biópsia aspirativa é menor que a biópsia incisional e que cortes histológicos dos túbulos seminíferos fornecem avaliação mais precisa da atividade espermatogênica em tecidos obtidos por biópsia. Em esfregaços citológicos, diferentes tipos celulares espermáticos estão dispersos sobre a lâmina e o contato normal entre as células é perdido (DAHLBOM; MAKINEN e SUOMINET, 1997).

A biópsia testicular tem em cães consequências que podem levar a danos no parênquima que afetam diretamente a espermatogênese. Tem-se observado em animais submetidos a procedimentos cirúrgicos como biópsia testicular e aspiração de espermatozóides, que a produção de anticorpos anti-espermatozóides ocorre cerca de duas semanas após com duração transitória e sem ter efeito prejudicial na produção

total dos espermatozóides ou na sua motilidade (ATTIA et al., 2000). MALLIDIS e BAKER (1994) observaram que a biópsia incisional no homem tem como limitação a presença dos artefatos de técnica, como uma ou mais formas de ruptura da arquitetura dos túbulos seminíferos. Entre as alterações associadas relataram a coloração ou fixação pobre, contração e distorção do tecido, bem como células vacuolizadas e destruídas.

Com o uso da histologia, CRAFT et al. (1997) avaliaram o parênquima testicular de pacientes humanos submetidos à biópsia aspirativa por agulha fina, e encontraram evidências de ruptura tubular com células espermatogênicas e restos de material nuclear no interstício. A presença de hemorragia foi relatada em alguns pacientes, sem interferir na arquitetura dos túbulos; observaram ainda o espessamento das membranas basais tubulares e túbulos hialinizados indicando cicatriz, a qual foi identificada na coloração pelo Tricrômico de Masson.

De acordo com SHUFARO et al. (2002) a natureza multifocal da PAAF em ratos causou severo, progressivo e irreversível dano sobre a arquitetura dos túbulos no trajeto da agulha e eventualmente levou à hipotrofia tubular ampla que é proporcional à sua extensão. No entanto, HEATH et al. (2002) trabalhando com PAAF em lhamas, relataram na avaliação histológica do parênquima testicular, a presença de tecido fibroso localizado correspondendo ao trajeto da agulha utilizada em 10 das 16 biópsias aspirativas realizadas. Túbulos seminíferos anormais somente foram observados nas áreas próximas das fibroses. Descreveram ainda alterações como vacuolização citoplasmática das células de Sertoli e necrose das células espermáticas, debris hipercromáticos e material eosinofílico foram achados no lume dos túbulos seminíferos. Finalizando estes autores consideram este procedimento seguro, e indicaram seu uso em lhamas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 40 machos de aproximadamente 10 Kg e duas fêmeas ovário-histerecotomizadas, adultos, da espécie canina, sem predileção por raça, provenientes da Associação de Proteção aos Animais de Uberlândia (APA). Os animais selecionados foram considerados sadios após exame clínico e laboratorial (hemograma, bioquímica sanguínea, urinálise). Todos os procedimentos (colheita de sêmen, biópsias e orquiectomia) foram realizados nas dependências do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). O experimento foi executado mediante a autorização da Comissão de Ética, processo nº 005888-06 (FCAV- UNESP - Jaboticabal).

Os cães foram distribuídos randômica e igualitariamente em dois grupos experimentais: grupo 1 (G1)- biópsia PAAF (punção aspirativa com agulha fina) e grupo 2 (G2)- biópsia com agulha “tru-cut”. Cada grupo foi dividido em quatro subgrupos, conforme o período próprio de avaliação temporal (Tabela 1).

3.2 Colheita e análise do sêmen

Em todos os animais as colheitas de sêmen foram realizadas imediatamente antes de cada procedimento, obtendo-se um total de 80 amostras. O sêmen foi colhido, identificado e analisado segundo técnica descrita por CHISTIANSEN (1988) (Apêndice A).

Tabela 1. Grupos, subgrupos, número de animais e dias das orquiectomias pós-procedimento experimental (biópsias com punção por agulha fina e por agulha “tru-cut”) em cães. Jaboticabal, 2009.

Grupo/Procedimento	Subgrupo	Número de animais	Orquiectomia*
			(Pós-procedimento) Dias
G1*	G _{1a}	5	3
Punção biópsia aspirativa por agulha fina	G _{1b}	5	7
	G _{1c}	5	14
	G _{1d}	5	62
	G _{1d}	5	62
G2*	G _{2a}	5	3
Biópsia com agulha tipo “tru-cut”	G _{2b}	5	7
	G _{2c}	5	14
	G _{2d}	5	62
	G _{2d}	5	62

* Os procedimentos foram sempre realizados bilateralmente.

3.3 Obtenção do soro para detecção de anticorpos anti-espermatozóides

Imediatamente antes de cada procedimento (biópsias com punção por agulha fina ou “tru-cut” e orquiectomia) foram colhidos 5mL de sangue de cada indivíduo, nos dias pré-estabelecidos. No Laboratório de Patologia Clínica da UFU o sangue foi centrifugado a 720xg por 10 minutos, e em seguida o soro aliquoteado no volume de 0,5mL em “eppendorfs” devidamente identificados, seguindo-se o armazenamento em freezer a -20°C.

3.4 Procedimentos pré-cirúrgicos

Os animais foram mantidos em jejum hídrico e alimentar de 12 horas. A pré-anestesia foi feita pela administração de acepromazina¹ e buprenorfina², por via

¹ Univet, São Paulo, SP.

² Schering-Plough S.A., São Paulo, SP.

intramuscular, nas doses de 0,025mg/Kg e 0,01mg/Kg, respectivamente. Os cães foram contidos em decúbito dorsal para realização da tricotomia e assepsia do campo cirúrgico (região pré-escrotal, escroto e face medial proximal dos membros pélvicos) com povidona-iodo³.

Todos os animais foram submetidos à anestesia dissociativa, pela aplicação de 5mg/Kg de tiletamina associado a 5 mg/Kg de zolazepam (Zoletil 50[®])⁴, por via intramuscular.

3.5 Avaliação das medidas do escroto

A largura e o comprimento do escroto foram obtidos pelo uso de paquímetro (Mitutoyo). As avaliações foram realizadas imediatamente antes de cada procedimento nos dias pré-estabelecidos.

3.6 Procedimento cirúrgico

3.6.1 Grupo 1

O testículo foi mantido entre os dedos indicador e polegar. Foi utilizada agulha hipodérmica⁵ de 22G (0,70X25mm) adaptada a uma seringa⁶ de 20mL, perfurando desde a cútis do escroto até 2 cm do parênquima testicular. A punção foi feita no terço médio do testículo, oposto ao corpo do epidídimo (Figura 1). A agulha acoplada a seringa foi movimentada para frente e para trás, com o êmbolo tracionado, promovendo a formação de vácuo, perfazendo cinco punções. Terminado o procedimento, foi feita pressão digital suave no local da aspiração. O procedimento foi realizado bilateralmente. O material aspirado foi distribuído em três lâminas e corados (ROSENLUND et al., 1998; LEME;PAPA, 1999).

³ Rioquímica, São José do Rio Preto, SP.

⁴ Virbac do Brasil, São Paulo, SP.

⁵ Becton, Dickinson and Company (BD), Curitiba, PR.

⁶ Indústrias Cirúrgicas Ltda, Ourinhos, SP.

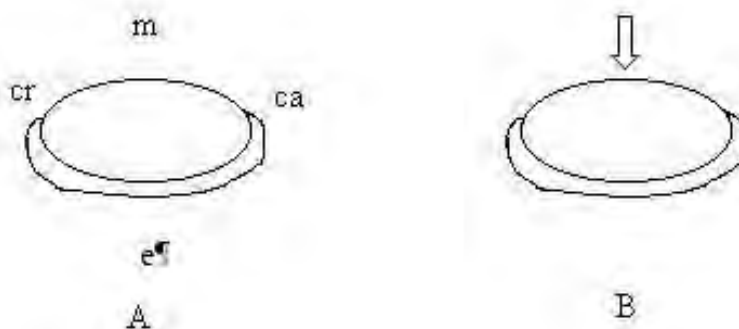


Figura 1. Testículo. A - (cr- terço cranial; m- terço médio; ca- terço caudal; e- epidídimo). B- Local da punção (seta).

3.6.2 Grupo 2

O testículo foi mantido entre os dedos indicador e polegar. A agulha com calibre 14G, comprimento 15 cm, tipo “tru-cut”⁷ de biópsia semi-automática descartável foi introduzida no terço médio do testículo, oposto ao corpo do epidídimo, transpassando as túnicas até 2 cm do parênquima, acionando-se então o disparo automático (Figura 1). Terminado o procedimento, foi feita pressão digital suave no local da aspiração. O procedimento foi realizado bilateralmente. O material obtido foi imerso em solução de Bouin. (LOPATE; THRELFALL e ROSOL, 1989).

No pós-operatório os animais receberam, por três dias consecutivos, dipirona⁸ sódica na dose de 25mg/Kg, a cada 8 horas, por via oral. O curativo tópico foi realizado com povidona-iodo, a cada 12 horas por sete dias consecutivos.

⁷ Medical Device Technologies, Flórida, EUA.

⁸ International Vitamins, São Paulo, SP.

3.6.3 Técnica cirúrgica de orquiectomia – G1 e G2

A técnica cirúrgica para a realização da orquiectomia foi a descrita por CRANE (1996). Após a cirurgia, retiraram-se com bisturi fragmentos das extremidades *capitata* e *caudata*, bem como as faces lateral, medial e epididimária dos testículos. Estes foram então devidamente identificados, seguido de sua imersão em solução de Bouin por 24 horas, e processados para análise histológica.

Foram administrado nos animais flumixin meglumina⁹, na dose de 1,1mg/Kg uma vez ao dia, por 4 dias consecutivos, por via oral e três aplicações em dias alternados de penicilina benzatina¹⁰, na dose de 40.000UI/Kg, por via intramuscular. O curativo tópico foi realizado com povidona-iodo, a cada 12 horas por sete dias consecutivos e também foi utilizado colar elizabetano durante sete dias.

3.7 Ensaio Imunológico

Após a análise do sêmen, este foi armazenado em freezer a -20 °C. Posteriormente, a obtenção das proteínas de superfície dos espermatozóides foi realizada conforme técnicas descritas no Apêndice B1.

As proteínas de superfície foram submetidas ao processo de separação eletroforética/SDS-PAGE realizado no Laboratório de Biofísica da UFU para determinar as bandas protéicas dos diferentes antígenos descritas por Laemmli (1970); TOWBIN; STAEHELIN e GORDON (1979). A técnica encontra-se descrita no Apêndice B2.

A concentração protéica do antígeno foi determinada pelo método de LOWRY et al. (1951) e alíquotas de SPAG (antígeno solúvel de espermatozóide de cão) foram armazenadas a -20oC até serem utilizadas nos ensaios de ELISA indireto.

⁹ Chemitec, São Paulo, SP.

¹⁰ Eurofarma, São Paulo, SP.

3.7.1 Inoculação do antígeno e colheita dos soros controles positivos e negativos

Para obtenção do controle negativo foi colhido um volume de 5mL de sangue das cadelas imediatamente antes da imunização (tempo zero). Em seguida, foram realizadas duas aplicações de antígeno SPAg em combinação com adjuvante. Na primeira dose com ACF (Adjuvante Completo de Freud) e na segunda dose com AIF (Adjuvante Incompleto de Freud), com intervalo de 15 dias. Após 30 dias da última aplicação foi colhido 5ml de sangue obtendo o controle positivo. O sangue obtido antes e após a imunização foi levado ao Laboratório de Imunologia da UFU, centrifugado a 720xg por 10 minutos, separando-se o soro, que foi devidamente identificado e armazenado em freezer a -20°C.

3.7.2 Técnica de ELISA indireta

O método ELISA indireto foi realizado para a detecção de anticorpos IgG anti - SPAg (antígeno solúvel de espermatozóide de cão), em amostras de cães antes e após a técnica de biópsia, segundo o protocolo anteriormente descrito (SILVA et al., 2007). A técnica encontra-se descrita no Apêndice B3.

3.8 Análise Citológica e Histológica

Referente à citologia, o material aspirado foi dividido em três lâminas histológicas (26x76mm), identificadas e secas em temperatura ambiente. Em seguida foi fixado e corado empregando-se a técnica de May-Grunwald-Giensa. A avaliação das lâminas foi feita no laboratório de Histologia da UFU.

As três lâminas foram avaliadas em microscopia de luz (objetiva de 100x) contando-se randomicamente um total de 100 células em cada. Foram encontrados: espermatogônia, espermatócito, espermátide, espermatozóide, células de Sertoli, células não identificadas, hemácias e leucócitos. Não foi realizada a diferenciação dos espermatócitos em primários e secundários e das espermátides nas fases inicial e final

da espermatogênese. A identificação das células foi realizada seguindo o critério descrito por LEME e PAPA (1997). Já a presença das hemácias e leucócitos, foi avaliada utilizando-se de um escore de zero a três cruces, conforme a quantidade presente nas mesmas.

Quanto à histologia, os fragmentos de tecidos colhidos pela biópsia por agulha “tru-cut” e da orquiectomia dos testículos direito e esquerdo de cada animal foram devidamente identificados e imersos em solução de Bouin e fixado por 24 horas, seguido pelos processos de desidratação em álcool, diafanização por xilol e inclusão em parafina. Em seguida, realizou-se a microtomia, obtendo-se três cortes semi-seriados de 5µm por testículo com intervalo de 50 µm entre eles, e corados com HE (hematolixa-eosina). A preparação e leitura do material histológico foram realizadas no Laboratório de Histologia da UFU.

A avaliação histológica das lâminas da biópsia por agulha tipo “tru-cut”, foi realizada determinando-se o número de túbulos seminíferos presentes no material colhido bem como a sua integridade.

As lâminas obtidas por ambas as técnicas de biópsias foram submetidas à avaliação descritiva observando-se os seguintes parâmetros: área de lesão, hemorragia, células mononucleares, células polimorfonucleares, destruição de túbulos seminíferos, presença de fibras colágenas (fibrose) e degeneração, mediante microscopia de luz com objetiva de 10x e 40x.

3.9 Análise estatística

Para a análise estatística dos valores referentes aos parâmetros espermáticos foi aplicado o teste não paramétrico de Wilcoxon, e para as medidas do escroto (cm) utilizou-se o teste de Tukey ($p \leq 0,05$) (FLEMING e HARRINGTON, 1991).

Na análise citológica, determinou-se o valor qualitativo absoluto das quantidades de células germinativas e de Sertoli pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para este material. Para as hemácias e leucócitos foi utilizado o teste não paramétrico de Wilcoxon ($p < 0,05$) (FLEMING e HARRINGTON, 1991).

O teste de T de Student ($p < 0,05$) foi empregado para averiguar a presença de anticorpos IgG anti-SPAg realizados pelo método ELISA indireto causadas pelas diferentes técnicas de biópsias (FLEMING e HARRINGTON, 1991).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Espermograma

Todas as amostras de sêmen obtidas nos diferentes momentos de avaliação, nos dois métodos utilizados, não revelaram diferenças significativas ($p \geq 0,05$), intra e entre grupos; no que se refere ao vigor, motilidade e concentração espermática, além dos defeitos maiores e menores. Estes dados estão reunidos, respectivamente, nas tabelas de 2 a 6. Nossos achados encontram similaridade nas descrições feitas por DALHBOM, MAKINEN e SUOMINEN (1997) em cães, HEATH et al. (2001) em touros pelo método PAAF, e nas de “tru-cut”, como relatado por SATORI et al. (2002) em ovinos. HUNT e FOOT (1997) descreveram discreto e temporário decréscimo na concentração espermática, fenômeno oposto ao por nós verificado, ainda que não tenha havido diferença significativa. Este aumento da concentração espermática se deve possivelmente a mudança no manejo e dieta alimentar, uma vez que após a biópsia esses animais que inicialmente viviam em canis, passaram a residir em domicílio, com conseqüente melhora da dieta em qualidade e quantidade bem como na qualidade de vida. De outra parte SOUZA et al. (2004) relataram, em cães, alteração irreversível no espermograma em um único animal, provavelmente, conseqüência de degeneração testicular, o que não foi por nós observado. Em referência as diferenças biológicas, notamos que em alguns animais os defeitos nos espermatozóides tenderam a aumentaram provavelmente em decorrência do trauma provocado nos túbulos seminíferos, resultando em processo inflamatório com aumento da temperatura local, o que pode ter causado alterações na espermatogênese, no entanto esse aumento não foi significativo.

Aos três dias após biópsias, todos os animais apresentavam diminuição da libido e desconforto durante a compressão digital do pênis, revelando manifestação de dor para a colheita do sêmen, previamente a realização das orquiectomias. Este fato, acreditamos, decorreu da edemaciação do escroto conseqüente ao processo inflamatório causado pelas biópsias. Dos trabalhos por nós cotejados somente os de COHEN e WARNER (1987) e ARIDOGAN *et al.* (2002), descreveram, no homem,

sensibilidade dolorosa nos primeiros três dias. De outra parte, não encontramos relatos de manifestação dolorosa em animais, fato que em nosso entendimento é importante e deve ser considerado em todas as espécies animais domésticas.

Nas avaliações subsequentes realizadas neste estudo o fenômeno dor não mais foi observado, episódio que a nosso ver é coerente com a diminuição do processo inflamatório, condizendo com Hansen (1994), onde citou que a dor diminui nos primeiros três dias após procedimento cirúrgico no cão.

Tabela 2. Medianas, quartilhos menores e maiores do vigor espermático de cães, intra e entre grupos, antes e após 3, 7, 14 e 62 dias das biópsias testiculares por punção com agulha fina (PAAF) e “tru-cut”. Jaboticabal-SP, 2009.

Dias	PAAF		“tru-cut”	
	Antes	Após	Antes	Após
3	3,5 (3,5 - 4,0)	4,0 (3,5 - 4,0)	5 (4,0 - 5,0)	4 (3,5 - 4,5)
7	4,5 (2,7- 4,5)	3,7 (2,0 - 4,5)	4 (3,5 - 4,5)	3 (1,0 – 4,0)
14	4,0 (4,0 - 4,0)	2,7 (2,5 - 3,5)	4 (3,5 - 4,5)	2 (2,0 - 3,0)
62	3,5 (3,0 - 4,5)	3,5 (3,5 - 4,0)	4 (4,0 - 4,5)	4 (2,5 - 4,5)

As medianas não diferem entre si ($p \geq 0,05$).

() – intervalos entre quartilhos maior e menor.

Tabela 3. Medianas, quartilhos menores e maiores da molitidade espermática de cães, intra e entre grupos, antes e após 3, 7, 14 e 62 dias das biópsias testiculares por punção com agulha fina (PAAF) e “tru-cut”. Jaboticabal-SP, 2009.

Dias	PAAF		“tru-cut”	
	Antes	Após	Antes	Após
3	80 (75 - 85)	80 (75 - 85)	95 (85 - 95)	80 (75 - 87)
7	90 (60 - 90)	70 (40 - 90)	90 (90 - 90)	90 (90 - 95)
14	85 (85 - 90)	85 (40 - 99)	80 (80 - 95)	50 (42 - 67)
62	75 (75 - 90)	85 (80 - 90)	80 (80 - 90)	90 (40 - 95)

As medianas não diferem entre si ($p \geq 0,05$).

() – intervalos entre quartilhos maior e menor.

Tabela 4. Medianas, quartilhos menores e maiores da concentração ($\times 10^6$ espermatozoides/mL) espermática de cães, intra e entre grupos, antes e após 3, 7, 14 e 62 dias das biópsias testiculares por punção com agulha fina (PAAF) e “tru-cut”. Jaboticabal-SP, 2009.

Dias	PAAF		“tru-cut”	
	Antes	Após	Antes	Após
3	20 (09 - 25)	28 (26 - 60)	37 (17 - 92)	29 (18 - 98)
7	24 (11 - 31)	21 (30 - 60)	50 (38 - 56)	37 (22 - 44)
14	27 (25 - 50)	31 (13 - 45)	75 (15 - 86)	54 (15 - 64)
62	47 (42 - 51)	31 (21 - 39)	75 (43 - 97)	61 (25 - 97)

As medianas não diferem entre si ($p \geq 0,05$).

() – intervalos entre quartilhos maior e menor.

Tabela 5. Medianas, quartilhos menores e maiores dos defeitos maiores (%) dos espermatozóides de cães, intra e entre grupos, antes e após 3, 7, 14 e 62 dias das biópsias testiculares por punção com agulha fina (PAAF) e “tru-cut”. Jaboticabal-SP, 2009.

Dias	PAAF		“tru-cut”	
	Antes	Após	Antes	Após
3	1 (1 - 2)	2 (1 - 4)	3 (2 - 3)	1 (1 - 2)
7	1 (1 - 4)	2 (1 - 3)	1 (1 - 4)	1 (1 - 1)
14	3 (1 - 3)	1 (1 - 4)	2 (2 - 5)	3 (2 - 5)
62	1 (1 - 1)	2 (1 - 4)	2 (1 - 2)	2 (1 - 3)

As medianas não diferem entre si ($p \geq 0,05$).

() – intervalos entre quartilhos maior e menor.

Tabela 6. Medianas, quartilhos menores e maiores dos defeitos menores (%) dos espermatozóides de cães, intra e entre grupos, antes e após 3, 7, 14 e 62 dias das biópsias testiculares por punção com agulha fina (PAAF) e “tru-cut”. Jaboticabal-SP, 2009.

Dias	PAAF		“tru-cut”	
	Antes	Após	Antes	Após
3	1 (1 - 3)	2 (1 - 2)	1 (1 - 3)	2 (1 - 3)
7	1 (1 - 2)	2 (1 - 3)	2 (1 - 5)	2 (1 - 2)
14	3 (1 - 3)	2 (1 - 4)	1 (1 - 2)	1 (1 - 3)
62	2 (1 - 2)	1 (1 - 3)	1 (1 - 3)	2 (1 - 4)

As medianas não diferem entre si ($p \geq 0,05$).

() – intervalos entre quartilhos maior e menor.

4.2 Avaliação das medidas do escroto

Referente às avaliações realizadas antes e após as biópsias em todos os momentos de observação intra e entre grupos, não observamos diferença significativa ($p \geq 0,05$) quanto ao comprimento e largura do escroto. Estes resultados estão contidos, respectivamente, nas tabelas 7 e 8. Nossos achados foram semelhantes aos

encontrados por LOPATE, THRELFALL e ROSOL (1989), em cães e MANSUOR, SENNA e AHMED (1999) em equinos; no que diz respeito as avaliações proporcionais do perímetro do escroto no pré e pós procedimento de biópsia, o que reforça nossa observação de que o edema decorrente do manuseio invasivo não chega a comprometer as dimensões desta estrutura anatômica ainda que tenha havido variações individuais mais exacerbadas. É interessante ressaltar ainda que HEMEIDA et al. (1980), relataram que esse parâmetro (edema), não pode ser usado como indicação segura de comprometimento da produção espermática.

Apenas um animal a ser orquiectomizado no 14° dia, pertencente ao grupo de biópsia com agulha tru-cut, manifestou além de uma sensibilidade dolorosa de maior grau em relação aos demais do seu grupo, um aumento das medidas de comprimento e largura da escroto. Entretanto, após a retirada do testículo a mensuração desta gônada revelou uma diminuição em seu tamanho e ao exame histopatológico verificou-se a ocorrência de hipotrofia, também descrita por LOPATE, THRELFALL e ROSOL (1989) com agulha “tru- cut”. Considera-se prudente destacarmos que esta avaliação foi feita somente neste cão devido as características peculiares de sensibilidade e tamanho, em todos os outros animais em uma avaliação macroscópica não houve nenhum indício de alteração significativa.

Tabela 7. Médias e desvios padrão intra e entre grupos do comprimento do escroto mensurado por paquímetro, antes e após 3, 7, 14 e 62 dias das biópsias testiculares por punção com agulha fina (PAAF) e “tru-cut”. Jaboticabal-SP, 2009.

Dias	PAAF		“tru-cut”	
	Antes	Após	Antes	Após
3	3,42 ± 0,66	3,47 ± 0,80	3,84 ± 0,64	3,88 ± 0,73
7	3,32 ± 0,31	3,44 ± 0,46	3,67 ± 0,68	3,86 ± 0,69
14	3,43 ± 0,27	3,50 ± 0,50	3,80 ± 0,34	3,92 ± 0,34
62	3,50 ± 0,50	3,72 ± 0,66	4,20 ± 0,59	4,05 ± 0,58

As médias não diferem entre si ($p \geq 0,05$).

Tabela 8. Médias e desvios padrão intra e entre grupos da largura do escroto mensurada por paquímetro, antes e após 3, 7, 14 e 62 dias das biópsias testiculares por punção com agulha fina (PAAF) e “tru-cut”. Jaboticabal-SP, 2009.

Dias	PAAF		“tru-cut”	
	Antes	Após	Antes	Após
3	2,38 ± 0,48	2,25 ± 0,52	2,34 ± 0,34	2,54 ± 0,59
7	1,91 ± 0,27	2,02 ± 0,42	2,27 ± 0,19	2,54 ± 0,59
14	2,05 ± 0,33	2,19 ± 0,58	2,70 ± 0,69	2,70 ± 0,69
62	2,13 ± 0,32	2,22 ± 0,42	4,19 ± 5,27*	2,34 ± 0,44

As médias não diferem entre si ($p \geq 0,05$).

* Variável transformada em Log (da observação + 1)

4.3 Citologia do testículo (PAAF)

A média percentual das células obtidas na PAAF foi: espermatogônia (4,74%), espermatócito (5,57%), espermátide (42,10%), espermatozóide (7,00%), células de Sertoli (11,23%) e células não identificadas (5,73%) (Figura 2). Estes resultados foram similares ao de GOTTSCHAKK-SABAG; CLICK e WEISS (1993), MAHAJAN et al. (1999) e BATRA et al. (1999) no homem, SARTORI FILHO, LEME e CUNHA (1996), LEME e PAPA (1997), SOUZA et al. (2004) em cães e LEME e PAPA (1999), ZAHN et al. (1999), LEME e PAPA (2000) e LEME, PAPA e TRINCA (2002) em eqüinos. No entanto, esses autores, com exceção de BATRA et al. (1999), subdividiram os espermatócitos e espermátides em primários e secundários, o que não foi adotado por nós. Conforme LEME e PAPA (1997) e BATRA et al. (1999) os espermatócitos secundários são difíceis de serem identificados devido à curta duração desta fase celular. As células não identificadas neste estudo podem ter sido rompidas durante a confecção dos esfregaços ou devido a intenso aglomerado celular, não sendo possível sua diferenciação. Quanto às células de Leydig, estas não foram identificadas principalmente devido às dificuldades em seu reconhecimento nos exames citológicos (PAPIC et al., 1988; LEME e PAPA, 1999; LEME e PAPA, 2000).

A análise quantitativa do esfregaço citológico se mostrou viável sendo possível identificar as linhagens celulares da espermatogênese. Encontramos uma grande variação na quantidade de células entre estes tipos celulares, achados similares aos descritos por FORESTA et al. (1993) e LEME e PAPA (1999). A quantidade de espermátides por nós analisada foi maior do que qualquer outra da linhagem espermatogênica fato também relatado por FORESTA, VAROTTO e SCANDELLARI (1992) e BATRA et al. (1999) no homem; LEME e PAPA (1999) em eqüinos e SOUZA et al. (2004) em cães. No entanto, em indivíduos normozoospermicos observa-se aumento gradual do número das espermatogônias até os espermatozóides, revelando o processo espermatogênico normal, enquanto que mudanças em sua contagem sugerem alterações da espermatogênese (FORESTA, VAROTTO e SCANDELLARI, 1992; SOUZA et al., 2004).

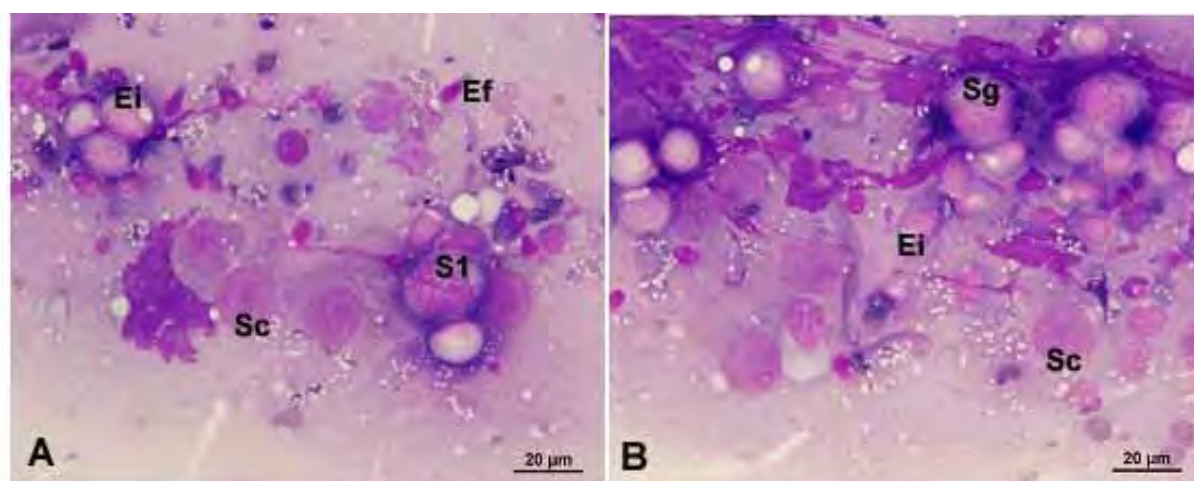


Figura 2. Fotomicrografias de células obtidas por punção biópsia com agulha fina (PAAF) de testículos de cães. A- Espermatócito I (S1), Espermátide inicial (Ei), Espermátide final (Ef), Células de Sertoli (Sc). B- Nota-se: Espermatogônia (Sg), Células de Sertoli (Sc), Espermátide inicial (Ei). Coloração: May-Grunwald-Giemsa.

É interessante destacarmos as vantagens da biópsia PAAF por ser de fácil execução na rotina clínica e a obtenção de uma amostragem celular mais representativa da gônada, por puncionar várias regiões desta, promovendo assim uma

boa avaliação da linhagem espermatogênica e das células de Sertoli. Porém, como fator limitante esta técnica não permite a visualização dos túbulos semíneferos e interstício, aspecto que pode comprometer a realização de um diagnóstico adequado, opinião corroborada por ARIDOGAN et al. (2002). Complementarmente, outro aspecto que pode comprometer a avaliação do material obtido é a presença de hemácias (contaminação), podendo até, na dependência da quantidade destas células, inviabilizar a avaliação do material. Assim, recomenda-se a atenção do técnico na execução deste procedimento no sentido de verificar visualmente a presença ou não de sangue no equipamento da punção. A presença de sangue também foi mencionada como um inconveniente importante por MAHAJAN et al. (1999), MALLIDIS e BAKER (1994) e ARIDOGAN et al. (2002).

Quando foi comparada a quantidade de células destinadas a verificação da homogeneidade da amostra, não foi constatada diferença ($p > 0,05$) para os tipos celulares pesquisados entre as lâminas (Tabela 9), incluindo hemácias e leucócitos, o que demonstrou homogeneidade do material, assegurando seu uso para realização do diagnóstico.

Tabela 9. Médias e desvios padrão dos números de células da linhagem germinativa e de Sertoli obtidas por punção biópsia com agulha fina em cães, Jaboticabal-SP, 2009.

Células	Lâmina 1	Lâmina 2	Lâmina 3
Espermatogônia	05,80 ± 07,60	04,27 ± 05,46	04,25 ± 06,68
Espermatócito	06,72 ± 12,79	05,95 ± 13,80	04,15 ± 11,75
Espermátide	45,57 ± 22,05	36,45 ± 24,92	35,28 ± 26,42
Espermatozóide	10,92 ± 09,08	08,85 ± 07,19	10,41 ± 10,58
Sertoli	13,72 ± 09,81	10,50 ± 09,45	9,71 ± 08,73
Células não identificadas	07,27 ± 05,29	05,10 ± 04,33	04,94 ± 05,37

As médias não diferem entre si ($p \geq 0,05$).

Todas as variáveis acima transformadas em Log (da observação + 1)

4.4 Histologia do testículo (“tru-cut”)

Após avaliar a quantidade de túbulos seminíferos classificados como íntegros, em relação aos danificados, evidenciamos que a média dos íntegros foi de 33,5 túbulos por amostra, indicando que este método fornece quantitativa e qualitativamente material suficiente e adequado para a realização de diagnóstico (Tabela 10). De acordo com ODABAS et al. (1997) a quantidade de túbulos viáveis presentes para um seguro diagnóstico é de no mínimo 10 por fragmento. Nossos resultados mostraram-se superior aos descritos por estes autores que verificaram 14 túbulos em pacientes humanos e aos de HEATH et al. (2001) que obtiveram 20,5 em Lhamas, porém, inferior aos 55 túbulos relatados por SARTORI et al. (2002) em ovinos.

É importante destacar ainda que esta técnica fornece material para que se faça com segurança além da avaliação dos túbulos, a pesquisa dos tipos celulares e do interstício da gônada, fornecendo assim, uma visão mais completa e um melhor subsídio para a realização do diagnóstico.

Tabela 10. Médias, desvios padrão, coeficientes de variação, mínimo e máximo da quantidade de túbulos normais, parciais ou totalmente lesados presentes na biópsia com agulha “tru-cut” em cães, Jaboticabal-SP, 2009.

Parâmetro	Íntegro	Lesionado	
		Parcial	Total
Média	33,56	2,52	1,00
Desvio Padrão	18,60	1,84	1,22
Coeficiente Variação	55,43	72,98	121,72
Mínimo	6,67	0,00	0,00
Máximo	94,00	8,33	5,33

Entretanto, é interessante destacar que na maioria dos casos embora se tenha boa qualidade do material colhido, esta técnica pode não fornecer material adequado na dependência de problemas decorrentes de imperícia do operador, fato este também relatado por SARTORI et al. (2002).

4.5 Avaliação qualitativa do processo inflamatório e cicatricial

4.5.1 G1a (PAAF) e G2a (“tru-cut”) aos 3 dias

Nos achados histológicos do G1a, verificamos lesões não bem delimitadas provocadas pela introdução da agulha, onde as áreas destruídas e adjacentes mostraram-se hemorrágicas (Figura 3A). Notamos também destruição de túbulos seminíferos com liberação das células germinativas para o interstício testicular em 70% dos testículos avaliados (Figura 4A). Evidenciamos infiltrado de células inflamatórias mono e polimorfonucleares, no local da lesão e adjacente a esta.

Analizando os achados do G2a (Figura 5A), comprovamos área de lesão circunscrita, com hemorragia, não se limitando apenas ao local lesionado. Constatamos presença de células germinativas no interstício em 10% dos casos, e destruição e degeneração de túbulos seminíferos em áreas adjacentes à lesão em 60% dos testículos. Quanto ao infiltrado de células inflamatórias, estes também abrangeram área além do local da lesão.

Os achados histopatológicos decorrentes da PAAF tais como hemorragia local, ruptura de túbulos seminíferos com liberação de células germinativas para o interstício foram encontrados também por CRAFT et al. (1997) em humanos imediatamente após a biópsia. O processo inflamatório apesar de discreto foi similarmente relatado por LEME e PAPA (1999) em garanhões. Já os achados referentes à biópsia “tru-cut” neste estudo como hemorragia e processo inflamatório foram semelhantes aos descritos por LOPATE, THRELFALL e ROSOL (1989) em cães. A hemorragia ocorreu devido a ruptura dos vasos sanguíneos presentes no parênquima testicular. Quanto à presença do infiltrado inflamatório, supomos este ser consequente à ruptura das células do interstício e túbulos seminíferos durante inserção da agulha. Estas uma vez rompidas, liberam e acionam mediadores químicos com atividade quimiotóxica sobre as células inflamatórias, promovendo seu acúmulo no local da lesão.

Comparando os resultados dos dois grupos, as lesões foram similares, diferindo apenas na intensidade, sendo que nos animais submetidos à biópsia “tru-cut” mostraram um grau lesivo superior revelado pela hemorragia e degeneração dos túbulos com resposta inflamatória mais intensa. Destacamos também a presença de células germinativas no interstício do testículo de cães do grupo da biópsia PAAF, fato este devido, provavelmente, à pressão negativa criada pela retração do êmbolo da seringa no momento da aspiração do tecido.

4.5.2 G1b (PAAF) e G2b (“tru-cut”) aos 7 dias

No G1b (Figura 3B), sete dias após a biópsia, 30% dos testículos revelaram a presença de fibroblastos na área de lesão, com início de formação de tecido conjuntivo e de processo de cicatrização. Evidenciamos neste local túbulos destruídos, além de 10% dos casos apresentarem degeneração testicular, caracterizada pela descamação das células germinativas superficiais e presença de células gigantes multinucleadas no interior do túbulo seminífero (Figura 4B). Foram verificadas células com núcleos característicos de espermatócitos e espermatídes em distintos estágios de diferenciação. Já as células germinativas no interstício apresentaram-se em apenas 10% dos casos, decorrente do processo de cicatrização e reorganização tecidual. Com relação às hemácias conseqüentes da hemorragia, estas estiveram presentes em 50% dos testículos; e o infiltrado de células inflamatórias manteve-se constante.

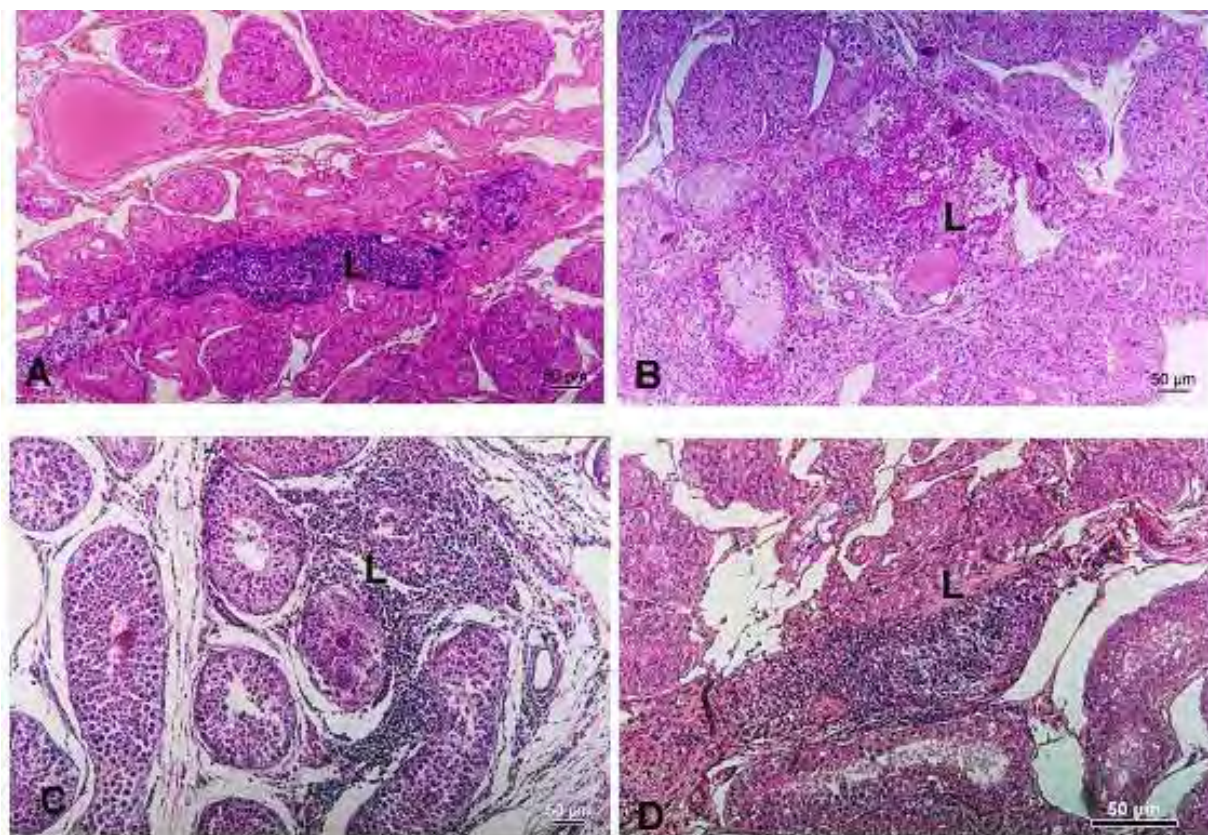


Figura 3. Fotomicrografias do testículo de cão colhido após a biópsia por punção com agulha fina. A- Área de lesão do parênquima testicular com 3 dias pós biópsia (L). B – 7 dias após biópsia (L). C – 14 dias após biópsia (L). D – 62 dias após a biópsia. Coloração: Hematoxilina-eosina.

Na leitura das lâminas do G2b (Figura 5B) a lesão delimitada mostrou-se ainda hemorrágica com a presença de fibroblastos, iniciando formação de fibras colágenas desorganizadas (cicatriz). Os túbulos seminíferos localizados na área adjacente à lesão apresentaram a sua estrutura morfológica parcialmente destruída e com características de degeneração testicular em 60% dos testículos avaliados. O infiltrado de células inflamatórias (Figura 4C) estava presente tanto na área de lesão como também na periferia desta.

Os dados avaliados, referentes à PAAF mostraram-se similares aos de MANSOUR; SENNA e AHMED (1999) onde encontraram uma semana após o procedimento, região de lesão com túbulos seminíferos irregulares e desorganizados,

compatíveis com degeneração, bem como infiltrado de células inflamatórias mononucleares em garanhões. Em nosso estudo, achados semelhantes foram encontrados em decorrência do uso da biópsia “tru-cut”, e também próximos dos encontrados por LOPATE, THRELFALL e ROSOL (1989) em cães. Para nós o trauma decorrente da realização dos procedimentos levou a um processo inflamatório na área da lesão e adjacências, resultando em aumento da temperatura local e, desse modo, provavelmente causando degeneração testicular. Observamos então o início do processo cicatricial com fibras colágenas desorganizadas, no entanto os animais submetidos à PAAF apresentaram também túbulos degenerados, fato este já constatado nos animais orquiectomizados três dias após a biópsia. Vale ressaltar que a resposta inflamatória e cicatricial se mostrou superior nos cães submetidos à biópsia “tru-cut” do que na PAAF, possivelmente devido ao trauma ser maior.

4.5.3 G1c (PAAF) e G2c (“tru-cut”) aos 14 dias

No G1c (Figura 3C), verificamos áreas em processo de cicatrização com aumento na quantidade de fibroblastos levando a formação de fibras colágenas (cicatriz), revelando processo de reorganização (Figura 6A). Na região da lesão e adjacente a esta, foi registrada discreta presença de células germinativas no interstício bem como de células inflamatórias, ambas em 30% dos casos.

Na área lesionada dos testículos dos animais do G2c (Figura 5C) evidenciamos intensa presença de fibroblastos com produção de fibras colágenas ainda em reorganização. Notamos ainda presença de túbulos seminíferos destruídos, bem como em processo de degeneração em 60% dos casos. Já o infiltrado de células mono e polimorfonucleares estavam ainda presente em 70% das lâminas avaliadas.

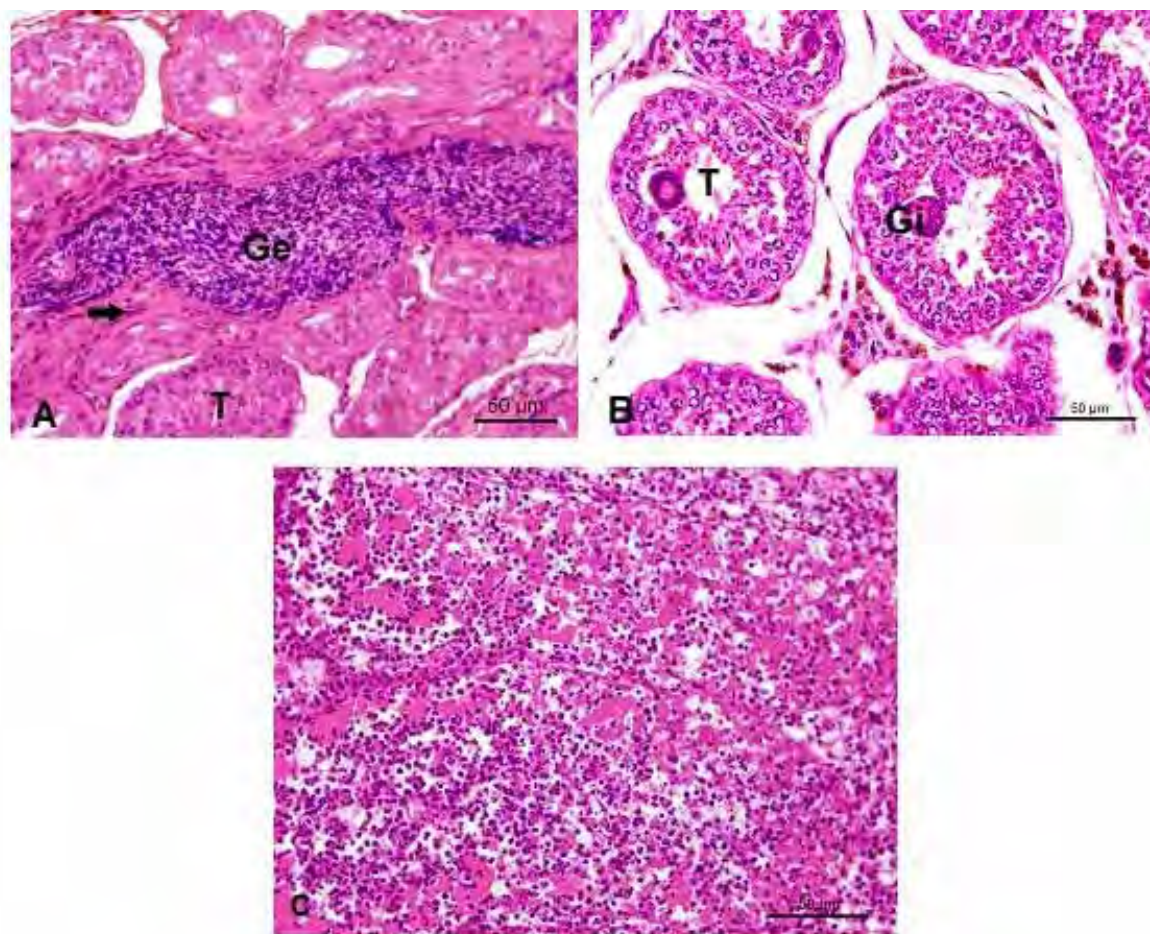


Figura 4. Fotomicrografias de testículo de cão colhido no 7º dia após a biópsia com agulha fina em A e agulha “Tru-cut” em B e C. A - Presença de células germinativas (Ge) degeneradas no interstício; adjacente a este nota-se tecido conjuntivo fibroso em reorganização com abundância de fibroblastos (seta) e túbulos seminíferos (T). B - Nota-se processo degenerativo testicular por presença de células gigantes multinucleadas (Gi) no interior dos túbulos seminíferos (T). C - Área de infiltrado de células inflamatórias. Coloração: Hematoxilina-eosina.

LEME e PAPA (1999) avaliando garanhões observaram aos 35 dias após a biópsia apenas pequena região de lesão com túbulos seminíferos irregulares e desorganizados compatíveis com degeneração, bem como infiltrado de células inflamatórias mononucleares. Ainda aos 14 dias após as biópsias encontramos dados

similares a este autor. Relacionando os achados do G1c e G2c, podemos acompanhar a progressão do processo cicatricial após a lesão, onde novamente enfatizamos que a diferença entre eles possivelmente reside na intensidade deste processo. Assim, diferente dos animais biopsados por PAAF, os submetidos à “tru-cut” demonstraram a presença, ainda, marcante de degeneração dos túbulos e do processo inflamatório, indicada pela presença do infiltrado de células mono e polimorfonucleares.

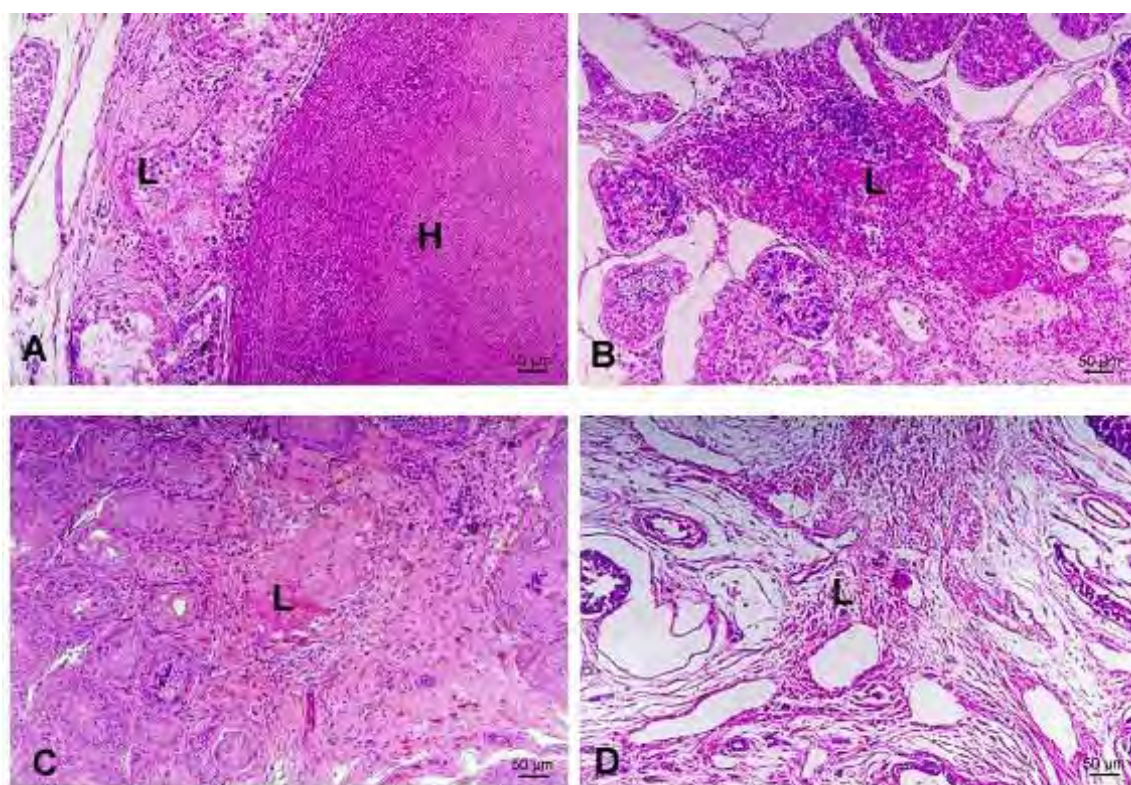


Figura 5. Fotomicrografias do testículo de cão colhido após a biópsia por agulha “Tru-cut”. A- Área de lesão do parênquima testicular com 3 dias pós biópsia (L), Hemorragia (H). B – 7 dias após biópsia (L). C – 14 dias após biópsia (L). D – 62 dias após a biópsia. Coloração: Hematoxilina-eosina.

4.5.4 G1d (PAAF) e G2d (“tru-cut”) aos 62 dias

No G1d (Figura 3D), 62 dias após biópsia, os locais lesionados se encontravam cicatrizados com fibras colágenas organizadas, fibroblastos em pequena quantidade

(Figura 6B). Notamos em um caso, área de reabsorção do coágulo com formação de fibrina e fibras colágenas com grande infiltrado inflamatório.

A análise do material do G2d (Figura 5D), revelou na região das lesões intensa proliferação de fibras colágenas organizadas, com poucos fibroblastos presentes, indicando processo cicatricial mais avançado entre túbulos seminíferos regenerados ou destruídos, incorporando-os à cicatriz. Não observamos presença de infiltrado de células inflamatórias.

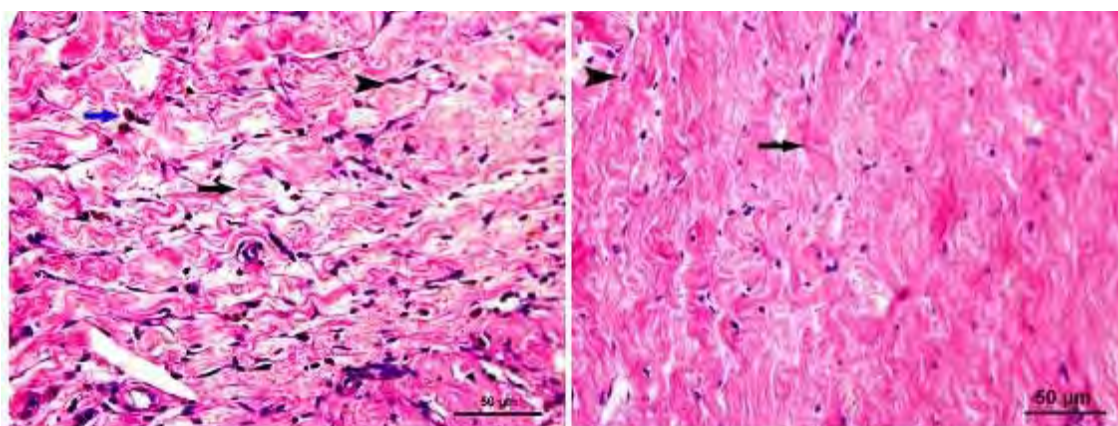


Figura 6. Fotomicrografias do testículo de cão colhido no 14º dia após a biópsia aspirativa com agulha fina. A - Nota-se presença de tecido conjuntivo fibroso em reorganização com abundância de fibroblastos (cabeça de seta), fibras colágenas (seta preta) e macrófagos (seta azul). B – Presença de tecido conjuntivo rico em fibras colágenas (seta preta) já organizado e com poucos núcleos de células (cabeça de seta) colhido no 62º dia após biópsia. Coloração: Hematoxilina-eosina.

Finalmente, quando avaliamos os dados dos G1d e G2d, registramos um processo cicatricial avançado, com recuperação de túbulos alterados, em ambas as técnicas estudadas. Uma das alterações verificadas em nosso estudo foi durante o período de 14 a 62 dias após a biópsia, onde constatamos a presença de tecido conjuntivo, que inicialmente estava desorganizado, finalizando em um tecido organizado (cicatriz). Notamos que as alterações decorrentes do uso das biópsias se deram ao redor da lesão infligida pelo caminho da agulha. No entanto a “tru-cut” mostrou-se mais lesiva do que a PAAF, mesmo esta sendo realizada com múltiplas punções.

Consideramos que todas as modificações histopatológicas encontradas nas duas técnicas, em momentos diferentes, mostraram-se por fim transitórias finalizando com cicatrização e recuperação do parênquima testicular.

4.7 Pesquisa de anticorpos anti espermatozóides pelo teste ELISA indireto

Esta pesquisa não revelou diferença estatística ($p \geq 0,05$) nas concentrações de anticorpos IgG anti-SPAg (antígeno solúvel de espermatozóide de cão) expressos em Índice ELISA (IE) em amostras de soros de cães submetidas à técnica de biópsia por agulha fina (Figura 7) e “tru-cut” (Figura 8), coletada antes e após 3, 7, 14 e 62 dias do procedimento. Quando comparamos também as concentrações de anticorpos entre as amostras colhidas de ambas as biópsias, não constatamos diferenças significativas ($p < 0,05$) entre elas (Figura 9). Com referência à PAAF, os resultados mostraram-se similares aos de MALLIDIS e BAKER (1994); HARRINGTON, SCHAUER e GILBERT (1996) e WESTLANDER et al. (2001) onde encontraram traços da presença de IgA e IgG em pacientes humanos, porém, não significativos. Em relação à “tru-cut” nossos dados também coincidiram com os de COHEN e WARNER (1987) que não encontraram presença de anticorpos no homem, após o procedimento. Porém, diferem das descrições feitas por ATTIA et al. (2000) que observaram em cães a presença de anticorpos 16 dias após a biópsia com a persistência por nove dias seguida de diminuição. Ainda segundo ATTIA et al. (2000) este aumento dos anticorpos, por ser transitório, não possui valor significativo clínico para os animais estudados. Essa diferença com os achados de ATTIA et al. (2002) pode ser devido ao fato destes autores terem investigado os anticorpos três vezes por semana por oito semanas consecutivas, enquanto nós tivemos um intervalo de 38 dias entre a colheita realizada no 14º dia e a do 62º dia.

Vários autores relatam que traumas ou procedimentos que sejam capazes de afetar a integridade da barreira hematotesticular, constituída pelas junções entre as células de Sertoli, permitem que células de defesa tenham acesso aos espermatozóides, produzindo anticorpos contra estes (DYM e FAWCETT, 1970; HAAS e BEER, 1986; ATTIA et al., 2000). Constatamos que apesar de não ter ocorrido

diferença estatística entre as concentrações de anticorpos antes e após os procedimentos, evidenciamos uma diferença biológica com aumento das concentrações de anticorpos em dois animais submetidos à PAAF e um da “tru-cut”, aos 62 e 3 dias após biópsia respectivamente. Este fato nos permite inferir, que o trauma infligido pela agulha na barreira hematotesticular, no momento da realização das biópsias (PAAF e “tru-cut”), não foi fator predisponente para induzir uma resposta imunológica significativa, quer pela velocidade em que se procedeu o processo cicatricial ou pelo tamanho e local da lesão feita para a obtenção do material testicular. Assim, entendemos que estes dois motivos podem ter corroborado em separado ou em conjunto pela discreta e fugaz reação imunológica.

Em última análise, em posse dos dados obtidos por nós neste trabalho, propõe-se para esta linha de pesquisa que em estudos subseqüentes se faça a avaliação da fertilidade dos machos submetidos a este tipo de tratamento, utilizando-se do sêmen destes animais para a fecundação de fêmeas.

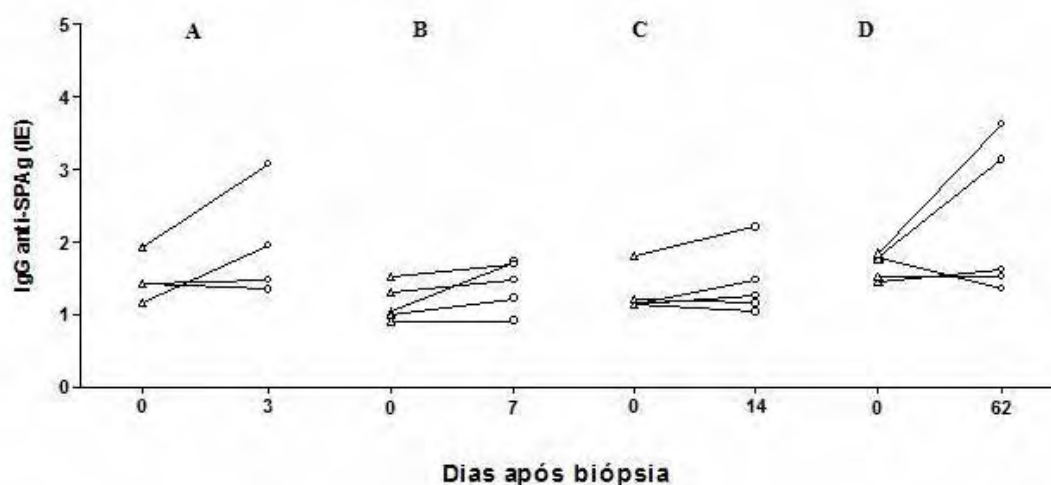


Figura 7. Representação gráfica da concentração de anticorpos IgG anti-SPAg (antígeno solúvel de espermatozóide de cão) expressos em Índice ELISA (IE) em amostras de soros de cães submetidos à técnica de biópsia por punção aspirativa com agulha fina, colhida antes e após 3 (A), 7 (B), 14 (C) e 62 (D) dias do procedimento.

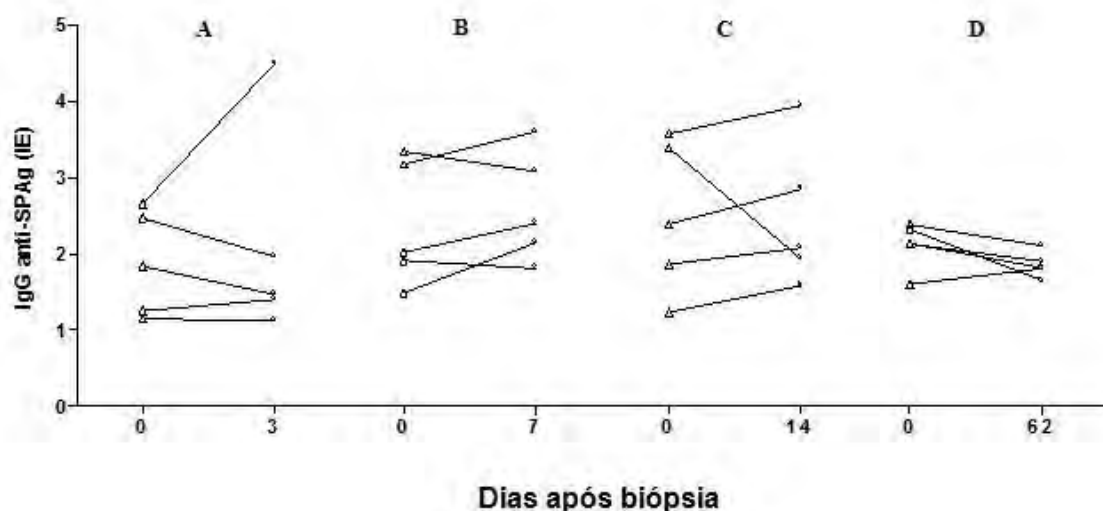


Figura 8. Representação gráfica da concentração de anticorpos IgG anti-SPAg (antígeno solúvel de espermatozóide de cão) expressos em Índice ELISA (IE) em amostras de soros de cães submetidos à técnica de biópsia por agulha “tru-cut”, colhida antes e após 3 (A), 7 (B), 14 (C) e 62 (D) dias do procedimento.

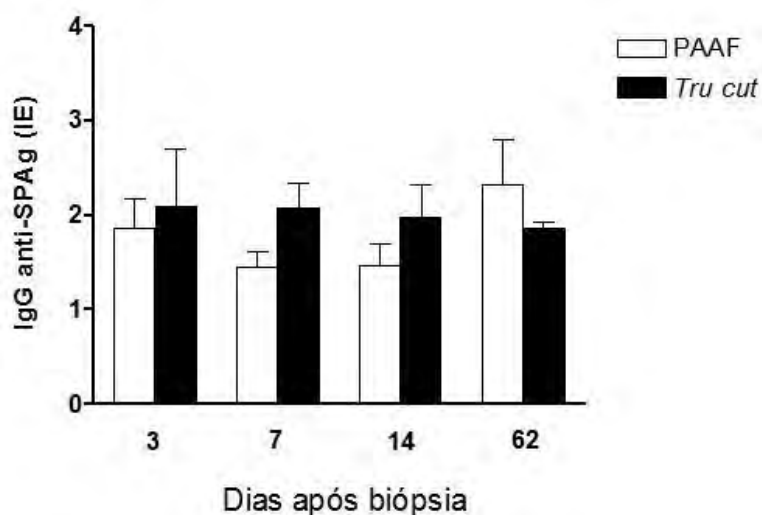


Figura 9. Histograma da concentração de anticorpos IgG anti-SPAg (antígeno solúvel de espermatozóide de cão) expressos em Índice ELISA (IE) em amostras de soros de cães submetidos às técnicas de biópsias por punção com agulha fina (PAAF) e agulha “tru-cut”, colhida após 3, 7, 14 e 62 dias de cada procedimento.

5 CONCLUSÕES

- As técnicas de biópsia revelaram-se de fácil execução e seguras com relação à recuperação do animal pós-intervenção.
- Ambas as técnicas fornecem material suficiente para realização diagnóstica de fertilidade e ou histopatológica, porém a PAAF é indicada principalmente para análises citológicas e a “tru-cut” para histológicas.
- A biópsia “tru-cut” causa trauma superior ao da PAAF, desenvolvendo um processo inflamatório e cicatricial, porém os eventos regenerativos temporais foram similares em ambas.
- Os procedimentos de biópsias não interferiram na qualidade do sêmen, fato que corrobora no sentido de se poder utilizar estas técnicas como importante auxílio diagnóstico.
- O uso das técnicas não resultou na produção significativa de anticorpos anti espermatozóides.

6 REFERÊNCIAS¹¹

AL-JITAWI, S. A., AL-RAMAHI, S. A., HAKOOZ, A. B. Diagnostic role of testicular fine needle aspiration biopsy in male infertility. *Acta Cytologica*, St. Louis, v. 41, n. 6, p. 1705-1708, 1997.

ATTIA, K. A., ZAKI, A. A., EILTS, B. E., PACCAMONTI, D. I., HOSGOOD, G., DIETRICH, M. A., HOROHOF, D. W., BLOUIN, D. C. Anti-sperm antibodies and seminal characteristics after testicular biopsy or epididymal aspiration in dogs. *Theriogenology*, Stoneham, v. 53, p. 1355-1363, 2000.

ARİDOĞAN, İ. A., BAYAZIL, Y., YAMAN, M., ERSÜS, C., DORAN, S. Comparison of fine-needle aspiration and open biopsy of testis in sperm retrieval and histopathologic diagnostic. *Andrologia*, Berlin, v. 35, p. 121-125, 2003.

BATRA, V. V., KHADGAWAT, R., AGARWAL, A., KRISHNANI, N., MISHRA, S. K., MITHAL, A. Correlation of cell counts and indices in testicular FNAC with histology in male infertility. *Acta Cytologica*, St. Lois, v. 43, n. 4, p. 617-623, 1999.

BRACKENBURY, E. T., JARGREAVE, T. B., HOWARD, G. C. W., MCINTYRE, M. A. Seminal fluid analysis and fine-needle aspiration cytology in the diagnosis of carcinoma in situ of the testis. *European Urology*, Basel, v. 23, n. 1, p. 123-128, 1993.

Christiansen, I. J. *Reprodução no cão e no gato*. São Paulo: Editora Manole, 1988.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 2ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.

COHEN, M. S., WARNER, R. S. Needle biopsy of testes: a safe outpatient procedure. *The Journal of Urology*, Baltimore, v. 19, n. 3, p. 279-281, 1987.

¹¹ ABNT NR 6023

CRAFT, I., TSIRIGOTIS, M., COURTAULD, E., FARRER-BROWN, G. Testicular needle aspiration as an alternative to biopsy for the assessment of spermatogenesis. *Human Reproduction*, Oxford, v. 12, n. 7, p. 1483, 1997

CRANE, S. W. Orquiectomia de testículos descidos e retidos no cão e no gato. In: BOJHAB, M. J. *Técnicas atuais em cirurgia de pequenos animais*. São Paulo: Roca, 1996. p. 391-394.

DAHLBOM, M., MAKINEN, A., SUOMINET, J. Testicular fine needle aspiration cytology as a diagnostic tool in dog infertility. *Journal of Small Animal Practice*, Oxford, v.38, p. 506-512, 1997.

DYM, M., FAWCETT, D. W. The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biology of Reproduction*, Pisttsburgh, v. 3, p. 308-326, 1970.

FLEMING, T., HARRINGTON, D. *Counting processes and survival analisis*. New York: Wiley, 1991.

FORESTA, C., VAROTTO, A. SCANDELLARI, C. Assessment of testicular cytology by fine needle aspiration as a diagnostic parameter in the avaluation of oligospermic subject. *Fertility and Sterility*, Birmirgham, v. 58, p. 1028-1033, 1992.

FORESTA, C., VAROTTO, A., MIONI, R. *Citologia tersticolare poer agoaspiriazione nella diagnostic dell'infertilità maschile*. Padova: Piccin Nuova Libreria, 1993. 152p.

GOTTSCALK-SABAG, S., GLICK, T., WEISS, D. B. Fine needle aspiration of the testis and correlation with testicular open biopsy. *Acta Cytologica*, St. Lois, v. 37, n.1, p. 67-72, 1993.

GOTTSCALK-SABAG, S., GLICK, T., BAR-ON, E., WEISS, D. B. Testicular fine needle aspiration as a diagnostic method. *Fertility and Sterility*, Birmirgham, v. 59, p. 1129-1131, 1993.

HAAS, G. G., BEER, A. E. Immunologic influences on reproductive biology sperm gametogenesis and maturation in the male and female genital tracts. *Fertility and Sterility*, Birmirgham, v. 46, p. 753-765, 1986.

HANSEN, B. D. Therapeutics in practice: Analgesic therapy. *The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian – Small animal*, v. 16, n. 7, p. 869 – 785, 1994.

HARRINGTON, T. G., SHAUER, D., GILBERT, B. Percutaneous testis biopsy: an alternative to open testicular biopsy in the avaluation of the subfertilite man. *The Journal of Urology*, Baltimore, v.156, n. 5, p. 1647-1651, 1996.

HEATH, A., PUGH, D. G., SARTIN, E. A., NAVARRE, B., PUROHIT, R. C. Evaluation of the safety and efficacy of testicular biopsies in llamas. *Theriogenology*, Stoneham, v. 58, p. 1125-1130, 2000.

HEATH, A. M., CARSON, R. L., PUROHIT, R. C., SARTIN, E. M., WENZEL, G. W., WOLFE, D. E. Effects of testicular biopsy in clinically normal bulls. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, Schaumburg, v. 220, n. 4, p. 507-511, 2001.

HEMEIDA, N. A., ABOU-AHMED., EL-WISHY, A. B. Rerproductive capacity of horses in Egypt: Effect of breed and age on testes characteristics and sperm production. *Egyptian. Journal of Veterinary Science*, Cairo, v. 17, n. 2, p. 14-169, 1980.

HUHNER, M. Aspiration of the testicle in the diagnosis and prognosis of sterility. *The Journal of Urology*, Baltimore, v. 19, p. 31-41, 1928.

HUNT, W. L., FOOTE, R. H. Wffect of repeated testicular biopsy on testis function and sêmen quality in dogs. *Journal of Andrology*, Madison, v. 18, n. 6, p. 740-744, 1997.

JAINUDEEN, M. R., HAFEZ, E. S. E. Distúrbios reprodutivos nos machos. In: HAFEZ, E. S. E. *Reprodução Animal*. São Paulo: Manole, 1995. p. 291-301.

JOHNSON, C. A. Distúrbios da fertilidade masculina. In: NELSON, R. W., COUTO, C. G. *Medicina Interna de Pequenos Animais*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p.701-711.

JOHNSTON, S. D., ROOT KUSTRITZ, M. V., OLSON, P. N. S. Clinical approach to infertility in the male dog. In:_____. *Canine e feline Theriogenology*. Philadelphia: W.B.Sauders, 2001. p.374-378.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LEME, D. P., PAPA, F. O. Identificação das células testiculares de cão através da punção aspirativa por agulha fina (PAAF). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.21, n.2, p. 67-68, 1997.

LEME, D. P., PAPA, F. O. Características citológicas de testículo de garanhões após estresse calórico testicular induzido. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 23, n. 3, p. 451-453, 1999.

LEME, D. P., PAPA, F. O. Cytology identification and quantification of testicular cell types using fine needle aspiration in horses. *Equine Veterinary Journal*, London, v. 32, n. 5, p. 444-446, 2000.

LEME, D. P., PAPA, F. O., TRINCA, L. A. Assessment of seasonal influence on equine spermatogenic cells and Sertoli cells by testicular fine needle aspiration cytology. *Theriogenology*, Stoneham, v. 58, p. 269-272, 2002.

LINSK, J. A., FRANZEN, S. Aspiration biopsy of the testis. In:_____ *Clinical Aspiration Cytology*. Philadelphia: Lippincott, p 267-279, 1983.

LOPATE, C., THRELFALL, W. R., ROSOL, T. J. Histopathologic and gross effects of biopsy in the dog. *Theriogenology*, Stoneham, v. 32, n. 4, p. 585—602, 1989.

LOWRY, O.H., ROSENBOROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v. 193, n.1, p. 265-275, 1951.

MAHAJAN, A. K., IMDAD ALI N, N., WALWALKAR, S. J., REGE, J. D., PARTHAK, H. R. The role of fine-needle aspiration cytology in the diagnostic evaluation of infertility. *British Journal of Urology International*, Oxford, v. 84, p. 485-488, 1999.

MALLIDIS, C., BAKER, H. W. G. Fine needle tissue aspiration biopsy of the testis. *Fertility and Sterility*, Birmirgham, v. 61, n. 2, p. 367-375, 1994.

MANSOUR, M. M., SENNA, N. A., AHMED. Evaliation of needle aspiration cytology (FNAC) as an aid for diagnosis of testicular affeccion in stallions. *Veterinary Medical Giza*, Cairo, v. 47, n. 1, p. 107-116, 1999.

MEHROTRA, R., SINGH, M. Diagnosis of microfilariae in testicular fine needle aspiration biopsy. *Acta Cytologica*, St. Lois, v. 44, n. 2, p. 282-284, 2000.

OHL, D. A., SONKSEN, J., WEDEMEYER, G., ZABORNIK, M. C., DAM, T. N., MENGE, A. C., PUTZI, M. J., PAPADOPOULOS, S. M. Canine modelo f infertility after spinal cord injury: time course of acute changes in semen quality and spermatogenesis. *The Journal of Urology*, Baltimore, v. 166, p. 1181-1184, 2001.

ODABAS, O., UGRAS, S., YILMAZ, Y., AYDIN, S., ATILLA, M. K. Testicular needle biopsy: Is it a safe adequate method? *International Urology and Nephrology*, Berlin, v. 29, n. 5, p. 591-595, 1997.

PAPIC, Z., KATONA, G., SKRABALO, Z., The cytological identification and quantification of testicular cell subtypes: reproductibility and relation to histologic finding in the diagnosis of male infertility. *Acta Cytologica*, St. Lois, v. 32, p. 697-706, 1988.

PAZ, R. C. R., LEME, D. P., ZÜGE, R. M., PESSUTI, C., SANTOS, E. F., BARNABE, R. C. Citologia aspirativa por agulha fina (CAAF), em testículo de onça pintada (*Panthera onça*), utilizada como ferramenta no diagnóstico de infertilidade. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, v. 40, p. 100-107, 2003.

PERSSON, S. P., AHRÉN, C., OBRANT, K. O. Aspiration biopsy smear of testis in azoospermia. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology*, Stockholm, v. 5, n. 1, p. 22-26, 1971.

PIATON, E., FENDLER, J. P., BERGER, N., PERRIN, P., DEVONEC, M. Clinical value of fine-needle aspiration cytology and biopsy in the evaluation of male infertility. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, Chicago, v. 119, p. 722-726, 1995.

RAMMOU-KINIA, R., ANAGONSTOPOULOU, I., TASSIOPOULOS, F., LYKOURINAS, M. Fine needle aspiration of the testis: correlation between cytology and histology. *Acta Cytologica*, St. Louis, v. 43, p. 991-998, 1999.

ROSENLUND, B., KVIST, U., PLÖEN, L., ROZELL, B. L., SJÖBLOM, P., HILLENSJO, T. A comparison between open and percutaneous needle biopsies in men with azoospermia. *Human Reproduction*, Oxford, v. 13, n. 5, p. 1266-1271, 1998.

SARTORI, R., PRESTES, N. C., CANAVESSI, A. M. O., KEMPINAS, W. G., ROSA, G. J. M. Avaliações ultra-sonográfica, macroscopic e histological da biópsia testicular em ovinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v. 54, n. 3, p. 233-241, 2002

SARTORI FILHO, R., LEME, D. P., CUNHA I. C. N. Comparação entre punção aspirativa com agulha fina e punção com agulha Tru-Cut na biópsia testicular em cão. In: *Congresso Brasileiro de Clínicos Veterinários de Pequenos Animais*, 18, 1996, Olinda. Abstracts...Olinda, 1996.

SHUFARO, Y., PRUS, D., LAUFER, N., SIMON, A. Impact of repeated testicular fine needle aspiration (TEFNA) and testicular sperm extraction (TESE) on the microscopic morphology of the testis: an animal model. *Human Reproduction*, Oxford, v. 17, n. 7, p. 1795-1799, 2002.

SILVA, D. A. O., LOBATO, J., MINEO, T. W. P., MINEO, J. R. Evaluation of serological tests for the diagnosis of *Neospora caninum* infection in dogs: Optimization of cut off titers and inhibition studies of cross-reactivity with *Toxoplasma gondii*. *Veterinary Parasitology*, Amsterdam, v. 143, n. 3-4, p. 234-244, 2007.

SOUZA, F. F., LEME, P. D., UECHI, E., TRINCA, L. A., LOPES, M. D. Evaluation testicular fine needle aspiration cytology and serum testosterone levels in dogs. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, v. 41, n. 2, p. 98-105, 2004.

TOWBIN, H., STAEGELIN, T., GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington DC, v. 76, n. 9, p. 4350-4356, 1979.

ZAHN, F. S., LEME, D. P., PAPA, F. O., ROCHA, N. S. Citologia aspirativa por agulha fina em testículos de eqüinos: comparação entre diferentes métodos de coloração. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 23, n. 3, p. 291-293, 1999.

WESTLANDER, G., EKERHOVD, E., GRANBERG, S., LYCKE, N., NILSSON, L., WERNER, C., BERGH, C. Serial ultrasonography, hormonal profile and antisperm antibody response after testicular sperm aspiration. *Human reproduction*, Oxford, v. 16, n. 12, p. 2621-2627, 2001.

7 APÊNDICE

APÊNDICE A – ESPERMIOGRAMA

Foi realizada a higienização do pênis e prepúcio com solução salina NaCl 0,9% previamente a colheita. O sêmen foi colhido por massagem digital do pênis.

Após a colheita o ejaculado foi mantido em banho-maria a 37°C, para análises macroscópica e microscópica de acordo com CHRISTIANSEN (1988). A mensuração do volume e da coloração do ejaculado foram realizadas imediatamente após a colheita do sêmen.

Todas as avaliações microscópicas foram realizadas utilizando microscópio de luz. Primeiramente realizou-se a avaliação da motilidade e vigor espermático mediante exame de uma gota de sêmen fresco sobre lâmina, coberta com lamínula, previamente aquecidas a 37°C, e observada em microscópio (com objetiva de 10x). A motilidade espermática foi avaliada de forma subjetiva (porcentagem de espermatozóides móveis), sendo que 0 era equivalente a nenhum espermatozóide móvel e 100 todos os espermatozóides com movimento progressivo. O vigor espermático é relatado de acordo com a qualidade do movimento dos espermatozóides e foi classificado de 0 a 5. A concentração espermática foi realizada em câmara hematóimétrica de Newbauer após diluição do sêmen com formol salina na proporção de 1:100. A contagem foi realizada em microscópio de luz, em aumento de 40x.

A morfologia dos espermatozóides (% de 200 células) foi avaliada por microscopia de contraste de fase, utilizando-se objetiva de 100x (imersão). Os defeitos de morfologia espermática foram classificados em defeitos maiores e menores segundo o Manual para Exame Andrológico e Avaliação do Sêmen de Animal do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998).

APÊNDICE B – TÉCNICAS IMUNOLÓGICAS

B1 Obtenção das proteínas de membrana dos espermatozóides

As proteínas de superfície dos espermatozóides foram obtidas utilizando o sêmen colhido dos animais usados durante o experimento.

Inicialmente, cerca de 2,0mL de sêmen foi centrifugado a 10.000xg durante 10 minutos a 4°C. O “pellet” obtido foi ressuscitado em 2mL a 0,1 M da solução de Tris/HCl, pH 7,5.

Os espermatozóides presentes na formação do primeiro “pellet” foram lavados duas vezes com tampão Tris/HCl 0,05M, pH 7, contendo sacarose 0,025M com centrifugações de 10.000xg por 10 minutos, a 4°C. O novo “pellet” formado foi novamente ressuscitado em 100 µL de H₂SO₄ 0,18N e mantido em temperatura ambiente por 30 minutos. As proteínas do conteúdo dos espermatozóides foram encontradas no sobrenadante obtido por meio de uma nova centrifugação por 10.000xg por 20 minutos, a 4°C, sendo estas em seguida desprezadas.

O “pellet” resultante do procedimento anterior foi lavado duas vezes com tampão fosfato por meio de centrifugações a 10.000xg por 10 minutos, a 4°C. Em seguida, o novo “pellet” formado foi ressuscitado em 400 µL de KCl 0,6M e PMSF 2mM (Fenilmetilsulfonilfluoreto) mantido em baixa temperatura, por 30 minutos. As proteínas de membrana dos espermatozóides foram encontradas no sobrenadante obtido por meio de uma nova centrifugação por 10.000xg por cinco minutos, a 4°C e armazenadas em “eppendorf” em freezer a -20 °C.

B2 Mensuração por eletroforese/ SDS-PAGE

Antígeno SPAg (antígeno solúvel de espermatozóide de cão) foi diluído em tampão de amostra (Tris-HCl 0,1M pH 6,8, dodecil sulfato de sódio [SDS] a 4%, azul de bromofenol a 0,2%, glicerol a 20%) e incubados por 5 minutos a 100°C para análise por

eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a 12% sob condições redutoras (Laemmli, 1970; TOWBIN; STAEHELIN e GORDON, 1979) utilizando sistema de eletroforese vertical em mini-gel (Hoefer Pharmacia Biotech Inc., San Francisco, EUA). Um volume de 150 μ L (200 μ g proteína) de cada amostra foi aplicado em paralelo aos padrões de pesos moleculares (Sigma Marker, Sigma Chemical Co.). Após a separação eletroforética, as amostras foram coradas por Comassie Blue e o perfil de bandas protéicas dos diferentes antígenos foi analisado.

B3 Técnica de ELISA indireta

O método ELISA indireto foi realizado para a detecção de anticorpos IgG anti - SPAg (antígeno solúvel de espermatozóide de cão), em amostras de cães antes e após a técnica de biópsia, segundo o protocolo anteriormente descrito (SILVA et al., 2007), com algumas modificações. Placas de microtitulação de poliestireno de alta afinidade foram sensibilizadas com antígeno SPAg (1 μ g/well) diluído em tampão carbonato-bicarbonato 0,06 M (pH 9,6) durante 18 horas a 4°C. Após três lavagens com PBS contendo Tween 20 a 0,05% (PBS-T), as placas foram incubadas com amostras de soros diluídas 1:25 com PBS-T contendo 5% de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé, São Paulo) (PBS-TM) por 1 hora a 37°C. Após seis lavagens com PBS-T, as placas foram incubadas com o conjugado anti- IgG de cão marcado com peroxidase (Sigma Chemical Co.) na diluição 1:1000 em PBS-TM. Após incubação por 1 hora a 37°C, as placas foram novamente lavadas seis vezes com PBS-T e a reação foi revelada com 0,01 M 2,2'-azino-bis-3-ethyl-benzthiazoline sulfonic acid (ABTS) e 0,03% H₂O₂ (ambos da Sigma Chemical Co.) e a densidade óptica (DO) foi determinada a 405 nm em leitor de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, McLean, EUA). Soros controles positivos e negativos foram incluídos em cada placa (Figura 10).

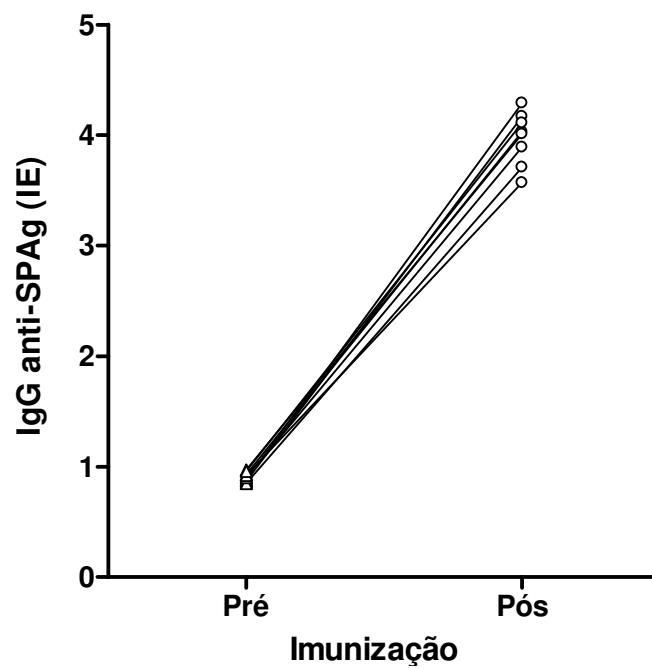


Figura 10. Representação gráfica da concentração de anticorpos IgG anti-SPAg (antígeno solúvel de espermatozóide de cão) expressos em índice ELISA (IE) em amostras de soros controles de cães pré e pós-imunização.