

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**EFEITO DO TRATAMENTO LOCAL DE VESICULITE
SEMINAL SOBRE A QUALIDADE E LONGEVIDADE
DO SÊMEN EQUINO**

YAMÊ FABRES ROBAINA SANCLER DA SILVA

BOTUCATU – SP

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**EFEITO DO TRATAMENTO LOCAL DE VESICULITE
SEMINAL SOBRE A QUALIDADE E LONGEVIDADE
DO SÊMEN EQUINO**

YAMÊ FABRES ROBAINA SANCLER DA SILVA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Animal para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa

BOTUCATU – SP

2014

Nome da Autora: Yamê Fabres Robaina Sancler da Silva

Título: EFEITO DO TRATAMENTO LOCAL DE VESICULITE SEMINAL SOBRE
A QUALIDADE E LONGEVIDADE DO SÊMEN EQUINO

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa
Presidente e Orientador
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu/SP

Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu/SP

Prof. Dr. André Maciel Crespilho
Membro
Departamento de Reprodução Animal
FMVA – UNISA – Santo Amaro, São Paulo/SP

Data da Defesa: 26 de fevereiro de 2014

Dedico este trabalho...

Aos meus queridos e doces pais, Inês e Sancler, por me apoiarem sempre em todos os meus sonhos, por me amarem de forma incondicional e por serem minha fonte de inspiração de lutas e conquistas. Eu sei o quanto batalharam por minha educação, portanto essa vitória é de vocês também.

Aos meus amáveis avós, exemplos de vida, honestidade e humildade.

Ao meus irmãos Cairê, por ter dividido comigo, desde o útero de nossa mãe, todas as experiências da vida e Allan, por ter dividido comigo desde sempre o videogame, detalhe fundamental para meu desempenho nas endoscopias desse projeto.

Mesmo longe, sinto vocês aqui perto todos os dias. Amo mais que o infinito!

“De tudo, ficaram três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando...

A certeza de que é preciso continuar...

A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...

Portanto, devemos...

Fazer da interrupção um caminho novo...

Da queda, um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro...”

Fernando Sabino

Agradecimentos

A Deus e o amor que rege a vida por ter guiado meus passos até aqui, sempre com muita saúde, proteção, fé e esperança. Por ter colocado em meu caminho uma família linda e pessoas muito especiais. Minha eterna gratidão!

Aos meus pais pelo enorme sacrifício que sempre fizeram para me proporcionar o melhor. Pelo exemplo de vida e por entenderem que a educação é a maior e melhor herança que poderão me deixar, mesmo não tendo tido as mesmas oportunidades que tive. Por compreenderem minha ausência nos bons e maus momentos e ainda assim me fornecerem todo o suporte material e psicológico necessário. A vocês todo o meu amor e admiração.

Aos meus irmãos, pela amizade, companheirismo e por torcerem sempre pela minha felicidade. Juntos pro que der e vier!

Aos meus avós pelo carinho e exemplo. Por me manterem sempre com os pés no chão enquanto almejo alcançar vãos altos.

À Selma, um anjo que foi colocado em meu caminho. A você meu respeito e gratidão por cuidar de mim e da minha família com tamanha doação.

Ao Toninho e Cláudia, pais que tive a oportunidade de ter. O amor de vocês ultrapassa a barreira dos laços de sangue.

À toda minha família (tios, tia, primos e primas) pela torcida e apoio em minhas escolhas. Vocês preenchem meu coração de alegria a cada reencontro!

Às minhas amigas irmãs Deusas do Olimpo, por terem feito parte dos melhores anos da minha vida. A gente era feliz e sabia! Vocês estão guardadas do lado esquerdo do peito pra toda vida.

Ao meu orientador Frederico Ozanam Papa por ter acreditado em meu potencial e minhas idéias desde a época da residência e ter me dado a oportunidade e a honra de integrar seu grupo de pesquisa. Muito obrigada por toda a confiança, ensinamentos, exemplo de profissionalismo e amizade!

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP, Campus de Botucatu, pelo acolhimento e oportunidade de avanços profissionais tão preciosos. Hoje eu visto a camisa dessa escola e aqui me sinto verdadeiramente em casa.

À minha amada e querida Universidade Federal de Viçosa pela formação acadêmica e por ter me feito “gente grande”. Motivo de muito orgulho em minha vida!

À professora Maria Verônica de Souza, pela amizade, ensinamentos, por ter acreditado em minha capacidade e por me estimular a sempre fazer o melhor que eu posso em tudo que me for proposto.

Ao professor João Carlos Pinheiro Ferreira pela confiança e amizade, desde a época da residência, e ensinamentos que muito contribuíram no meu crescimento acadêmico.

Ao professor Antônio Carlos Paes, por ter me auxiliado diversas vezes na interpretação dos exames microbiológicos e por ter as portas de sua sala e laboratório sempre abertas para ensinamentos e conversas.

À professora Maria Clara Caldas Bussiere por ter sido tão atenciosa e solícita na realização das dosagens de óxido nítrico.

Aos professores do Departamento de Reprodução e Radiologia Veterinária, pela amizade e ensinamentos.

Aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária pelos bons momentos de convívio e amizade.

Aos irmãos que fiz em Botucatu, Gabriel e Rombudo, pela amizade na alegria e na tristeza, na saúde e na doença. Pela ajuda intensa e fundamental na realização desse projeto. Não tenho palavras pra dizer o quanto vocês foram importantes até aqui.

Aos integrantes do “Tabernáculo” (mais conhecido como CERAN), grupo de pesquisa o qual tenho muito orgulho de fazer parte: Ian, Camila, Gabriel, Rombudo, Priscilla, Patrícia, Pedro, Felipe e Fernando. Agradeço pelo ótimo convívio, amizade e troca de experiências.

À Camila por ter me auxiliado nas análises de citometria de fluxo e em tudo mais que fosse necessário.

Ao André Crespilho por ter realizado a análise estatística de forma brilhante e sempre me atender com bom humor em tudo que pedi.

Ao funcionário Fernando e a pós-graduanda Marília do Laboratório de Microbiologia da FMVZ – UNESP – Botucatu, pelo auxílio nos exames microbiológicos.

Aos residentes e estagiários pela contribuição na realização das endoscopias e por serem sempre muito solícitos.

Às amigas que aqui fiz pra vida inteira: Isabelle, Stephane e Mariana. Pela mão estendida, conselhos sinceros e o sorriso no rosto sempre que necessitei.

Aos amigos de Botucatu: Fernanda, Paula, Guta, Loreta, Hélène, Priscilla, Aline, Patrícia, Raíssa, Ian, Jair, Bianca, Juliana e Natália. Vocês amenizam a distancia da família e alegram meus dias!

Aos colegas de pós-graduação pelo excelente convívio e troca de experiências.

Aos animais que inocentemente tanto me ajudaram e foram os maiores colaboradores desse trabalho.

À família Andrade, Dani Montequesi, Alisson, Zezé, Paccola, residentes do Equicenter, Daniel Zago e Lorena de Carli, por disponibilizarem os animais e pela confiança no meu trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de estudo e auxílio financeiro concedidos para a realização desse projeto de pesquisa.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram na elaboração e desenvolvimento deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

*“Agradecer o bem que recebemos
é retribuir um pouco do bem que
nos foi feito.”*

Augusto Branco

Lista de Abreviaturas

CASA: análise computadorizada do movimento espermático;
CERAN: Centro de Biotecnologia e Diagnóstico em Reprodução Animal;
CFDA: diacetato de carboxifluoresceína;
CLSI: Manual Clinical and Laboratory Standards Institute;
cm³: centímetro cúbico;
CRISP3: cisteína do tipo 3
DIC: microscopia de contraste de interferência diferencial de fase;
DNA: ácido desoxiribonucléico;
FMVZ: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia;
Fn2: fibronectina do tipo 2
HTMO: Hamilton Thorne Research;
H₂O₂: peróxido de hidrogênio;
IL 6: interleucina 6;
IL 8: interleucina 8;
IM: integridade de membrana plasmática;
IP: iodeto de propídio;
M: mol;
M0: momento pré-tratamento;
M1: momento após uma semana do término do tratamento;
M2: momento após um mês do término do tratamento;
mL: mililitro;
mM: milimolar;
mm³: milímetro cúbico;
mOsm: miliosmol;
MP: motilidade progressiva;
MT: motilidade total;
nm: nanômetro;
N₂: nitrogênio líquido;
NO: óxido nítrico;
NO₂⁻: nitrito;
NO₃⁻: nitrato;
nOsm: nanoosmol;

PBS: tampão fosfato salino;
PERO: índice de peroxidação lipídica;
RAP: espermatozóides rápidos;
ROS: espécies reativas de oxigênio;
SPTZ: espermatozóides;
TnF α : fator de necrose tumoral F α ;
UA: unidade arbitrária;
UNESP: Universidade Estadual Paulista;
VAP: velocidade média de trajeto;
VCL: velocidade curvilínea;
VSL: velocidade linear progressiva;
v/v: volume por volume;
UFC: unidade formadora de colônia;
 μ L: microlitro;
 μ m: micrômetro;
° C: graus Celsius.

Lista de Tabelas

TABELA 1	Número de animais triados, diagnóstico definitivo da enfermidade e a coloração do sêmen no momento do exame reprodutivo.....	59
TABELA 2	Idade (em anos), raça, tempo de evolução da enfermidade (em meses) e o manejo reprodutivo dos animais com vesiculite seminal.....	60
TABELA 3	Médias e erros-padrão ($X \pm EP$) da porcentagem de leucócitos, ocorrência de distúrbio ejaculatório e histórico de orquite, periorquite e/ou epididimite.....	60
TABELA 4	Histórico de tratamento com antibiótico antes do presente estudo e a forma de tratamento (sistêmico e/ou local).....	61
TABELA 5	Microorganismos isolados da vesícula seminal e do sêmen de garanhões com vesiculite seminal.....	62
TABELA 6	Drogas de eleição para o tratamento local de vesiculite seminal e a dose por infusão, para cada caso avaliado.....	63
TABELA 7	Médias e erros-padrão ($X \pm EP$) da concentração espermática (mm^3), volume (mL), pH e osmolaridade (mOsm) do sêmen fresco de garanhões pré-tratamento (M0), uma semana pós-tratamento (M1) e um mês pós-tratamento (M2).....	64
TABELA 8	Médias e erros-padrão ($X \pm EP$) da MT (%), MP (%), VAP ($\mu\text{m/s}$), VSL ($\mu\text{m/s}$), VCL ($\mu\text{m/s}$), RAP (%) e IM (%) de espermatozoides do sêmen fresco de garanhões em três momentos de avaliação (M0, M1 e M2).....	65
TABELA 9	Médias e erros-padrão ($X \pm EP$) dos defeitos morfológicos de cabeça (%) e defeitos morfológicos de cauda (%) de espermatozóides do sêmen fresco de garanhões em três momentos de avaliação (M0, M1 e M2).....	65

TABELA 10	Médias e erros-padrão ($X \pm EP$) da porcentagem de leucócitos, número de UFC/mL e teor de NO no sêmen fresco e plasma seminal de garanhões em três momentos de avaliação (M0, M1 e M2).....	66
TABELA 11	Análises de correlação e valor de p das variáveis MT (%), MP (%), IM (%), RAP (%) e contagem de UFC ($10^3/\text{mL}$) em relação a porcentagem de leucócitos (%), contagem de UFC ($10^3/\text{mL}$), teor de NO (nMol) e defeitos de cauda (%)......	66
TABELA 12	Médias e erros-padrão ($X \pm EP$) da MT (%), MP (%), VAP ($\mu\text{m/s}$), VSL ($\mu\text{m/s}$), VCL ($\mu\text{m/s}$), RAP (%) e IM (%) de espermatozoides do sêmen equino fresco, refrigerado a 5°C e a 15°C por 24 horas no momento pré-tratamento (M0).....	67
TABELA 13	Médias e erros-padrão ($X \pm EP$) da MT (%), MP (%), VAP ($\mu\text{m/s}$), VSL ($\mu\text{m/s}$), VCL ($\mu\text{m/s}$), RAP (%) e IM (%) de espermatozoides do sêmen refrigerado a 5°C por 24 horas de garanhões em três momentos de avaliação (M0, M1 e M2).....	68
TABELA 14	Médias e erros-padrão ($X \pm EP$) da MT (%), MP (%), VAP ($\mu\text{m/s}$), VSL ($\mu\text{m/s}$), VCL ($\mu\text{m/s}$), RAP (%) e IM (%) de espermatozoides do sêmen equino refrigerado a 5°C e a 15°C por 24 horas em três momentos de avaliação (M0, M1 e M2).....	69
TABELA 15	Médias e erros-padrão ($X \pm EP$) da MT (%), MP (%), VAP ($\mu\text{m/s}$), VSL ($\mu\text{m/s}$), VCL ($\mu\text{m/s}$), RAP (%) e IM (%) de espermatozoides do sêmen congelado de garanhões em três momentos de avaliação (M0, M1 e M2).....	70
TABELA 16	Médias e erros-padrão ($X \pm EP$) do índice de peroxidação lipídica da população total (células espermáticas e leucócitos) avaliado em unidade arbitrária (PERO TOTAL, UA) e teor de ROS da população total (células espermáticas e leucócitos) avaliado em unidade arbitrária (ROS TOTAL, UA) do sêmen congelado de garanhões em três momentos de avaliação (M0, M1 e M2).....	70

TABELA 17	Médias e erros-padrão ($X \pm EP$) do índice de peroxidação lipídica da população de espermatozoides, avaliado em unidade arbitrária (PERO SPTZ, UA), teor de ROS da população de espermatozoides, avaliado unidade arbitrária (ROS SPTZ, UA) do sêmen congelado de garanhões em três momentos de avaliação (M0, M1 e M2).....	71
-----------	--	----

Lista de Figuras

FIGURA 1	A) Ilustração das quatro glândulas sexuais acessórias presentes no garanhão. B) Esquema das aberturas das glândulas sexuais acessórias na uretra pélvica visualizadas por endoscopia. Em azul as aberturas dos ductos das glândulas bulbouretrais, em verde as aberturas dos ductos da próstata, em vermelho e amarelo o colículo seminal, local onde se abrem os ductos ejaculatórios (formado pela união dos ductos das vesículas seminais e ampolas dos ductos deferentes). C) Esquema de um corte transversal do colículo seminal. Em vermelho os ductos das vesículas seminais, em amarelo os ductos das ampolas dos ductos deferentes e em azul o resquício do útero masculino.....	24
FIGURA 2	A) Imagem ultrassonográfica de uma glândula vesicular normal. B) Imagem de uma glândula vesicular acometida por vesiculite seminal contendo partículas hiperecóicas, decorrentes do processo inflamatório.....	30
FIGURA 3	A) Imagem endoscópica do momento em que a abertura de um dos ductos ejaculatórios é cateterizada para posterior introdução do endoscópio na vesícula seminal. B) Aspecto de uma vesícula seminal normal. C e D) Aspecto de duas vesículas seminais apresentando conteúdo purulento, decorrente de vesiculite seminal.....	31
FIGURA 4	Avaliação hemodinâmica por ultrassonografia Color-Doppler, demonstrando baixa vascularização da parede da glândula vesicular de um garanhão saudável.....	33
FIGURA 5	A) Cultura bacteriana de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . B) Antibiógrama caracterizado pelos halos de inibição ao redor dos discos impregnados com os antibióticos avaliados.....	62

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	200
2. REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1. Vesícula seminal na espécie equina.....	23
2.2. Vesiculite seminal no garanhão	26
2.2.1. Incidência.....	26
2.2.2. Patogenia.....	27
2.2.3. Diagnóstico	27
2.2.4. Prognóstico	32
2.2.5. Tratamento de vesiculite seminal e processamento do sêmen contaminado	33
2.2.6. Influência da vesiculite seminal na qualidade do sêmen equino	35
3. OBJETIVOS.....	40
4. MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1. Experimento I	42
4.1.1. Animais e local da pesquisa.....	42
4.1.1.1. Métodos de inclusão dos animais do estudo	42
4.1.2. Exame microbiológico.....	43
4.1.2.1. Coleta do conteúdo vesicular para exame microbiológico	43
4.1.2.2. Cultura bacteriana e antibiograma	44
4.2. Experimento II	46
4.2.1. Animais e local da pesquisa.....	46
4.2.2. Coletas e processamento do sêmen antes do tratamento local.....	46
4.2.3. Tratamento local de vesiculite seminal.....	47
4.2.4. Coletas e processamento do sêmen após o tratamento local	48
4.2.5. Análise do sêmen fresco	48
4.2.5.1. Características físico-químicas	48
4.2.5.2. Cinética espermática do sêmen fresco	49
4.2.5.3. Integridade de membrana plasmática do sêmen fresco	49
4.2.5.4. Morfologia espermática	49
4.2.5.5. Porcentagem de leucócitos.....	50
4.2.5.6. Dosagem de óxido nítrico (NO).....	50
4.2.5.7. Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL)	50
4.3. Experimento III.....	51
4.3.1. Animais e local da pesquisa.....	511

4.3.2. Coletas e processamento do sêmen antes do tratamento local.....	52
4.3.3. Tratamento local de vesiculite seminal.....	52
4.3.4. Coletas e processamento do sêmen após o tratamento local	521
4.3.5. Análise do sêmen refrigerado	54
4.3.5.1. Cinética espermática	54
4.3.5.2. Integridade de membrana plasmática	54
4.4. Experimento IV.....	42
4.4.1. Animais e local da pesquisa.....	54
4.4.2. Coletas e processamento do sêmen antes do tratamento local.....	52
4.4.3. Tratamento local de vesiculite seminal.....	53
4.4.4. Coletas e processamento do sêmen após o tratamento local	53
4.4.5. Análise do sêmen congelado.....	53
4.4.5.1. Cinética espermática	54
4.4.5.2. Integridade de membrana plasmática	54
4.4.5.3. Avaliação morfofuncional por citometria de fluxo.....	54
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	57
6. RESULTADOS	59
6.1. Experimento I – Avaliação das principais bactérias envolvidas e fatores de risco relacionados à vesiculite seminal em garanhões.....	59
6.2. Experimento II - Efeito do tratamento local de vesiculite seminal sobre a qualidade do sêmen equino a fresco	64
6.3. Experimento III - Impacto da vesiculite seminal e efeito do tratamento local sobre a qualidade do sêmen equino refrigerado	67
6.4. Experimento IV - Efeito do tratamento local sobre a qualidade do sêmen equino congelado	69
7. DISCUSSÃO.....	73
7.1. Experimento I	73
7.2. Experimento II	79
7.3. Experimento III.....	83
7.4. Experimento IV.....	86
8. CONCLUSÕES.....	89
REFERENCIAS.....	91
ARTIGO CIENTÍFICO	105
ANEXOS.....	119

Resumo

A vesiculite seminal possui grande relevância na clínica reprodutiva devido à dificuldade de tratamento, elevados índices de recidiva, risco de contaminação de fêmeas com agentes patogênicos, inutilização de animais e baixos índices de fertilidade. O tratamento local tem sido apontado por diversos autores como a melhor alternativa terapêutica, porém nenhum estudo avaliou seus efeitos na qualidade e longevidade seminal. Nesse sentido, os objetivos do presente estudo incluíram: investigar quais são as principais bactérias envolvidas na enfermidade e os principais fatores de risco para os garanhões; avaliar e comparar o efeito do tratamento local de vesiculite seminal quanto aos índices de cinética e morfologia espermática, integridade de membrana plasmática, porcentagem de leucócitos e contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) de amostras seminais frescas, refrigeradas e congeladas e o teor de óxido nítrico no plasma seminal, antes (M0), após uma semana (M1) e um mês (M2) da terapia. Os resultados obtidos permitiram inferir que a vesiculite seminal foi mais prevalente em animais adultos e idosos, a evolução da enfermidade ocorreu de forma crônica em todos os animais selecionados, a monta natural constituiu um fator predisponente para o surgimento da doença, a coloração amarelada do sêmen e a dificuldade na ejaculação são sinais indicativos de alteração da glândula e a bactéria mais prevalente envolvida na etiopatogenia da infecção foi a *Pseudomonas aeruginosa*. De maneira geral, o tratamento local levou a uma melhora da qualidade seminal após uma semana (M1), no sêmen a fresco, refrigerado e congelado, quanto aos índices de cinética espermática e integridade de membrana plasmática ($p < 0,05$). No sêmen a fresco promoveu redução do volume seminal, incremento da concentração espermática, redução da porcentagem de leucócitos e de UFC/mL no M1 em relação aos demais momentos ($p < 0,05$). No sêmen congelado promoveu redução da peroxidação lipídica e do teor de ROS no M1 em relação aos demais momentos ($p < 0,05$). As temperaturas de refrigeração de 5°C e 15°C por um período de 24 horas apresentaram eficiência similar nos momentos pré e pós-tratamento. Entretanto, a melhora da qualidade seminal não se manteve após um mês (M2) da terapia, uma vez que os parâmetros seminais nesse momento se assemelham ao momento pré-tratamento, o que pode ser justificado pela recidiva da doença.

Palavras-chave: vesiculite seminal, piospermia, ROS, sêmen equino.

Abstract

Seminal vesiculitis has great relevance in reproductive clinic due to the difficulty of treatment, high rates of recurrence, risk of female contamination with pathogenic agents, retirement of animals and low fertility rates. Local treatment has been reported as the best therapeutic alternative, although no other studies have evaluated its effects on seminal quality and longevity. The aims of this study included: to investigate what are the main bacteria involved in the disease and the risk factors for stallions; to evaluate and to compare the effect of local treatment of seminal vesiculitis on the sperm kinetic parameters, morphology and viability (plasma membrane integrity), percentage of leukocytes and counting colony forming units (CFU) of fresh, cooled and frozen semen samples and the content of nitric oxide in the seminal plasma, before (M0) and after one week (M1) and one month (M2) therapy. The results allow us to infer that the seminal vesiculitis was more prevalent in adults and aged animals, the evolution of the disease appeared chronically in all selected animals, natural breeding was a risk factor for onset of the disorder, the beige color of semen and ejaculatory dysfunction were signs indicative of abnormalities in the gland and the most common bacteria involved in the pathogenesis of the infection was *Pseudomonas aeruginosa*. In general, the local treatment produced an improvement in semen quality after a week (M1) in fresh, cooled and frozen semen on the kinetic parameters and sperm viability ($p < 0.05$). In fresh semen promoted reduction in the volume of ejaculate, sperm concentration increased, reducing the percentage of leukocytes and CFU/mL in M1 compared to the other moments ($p < 0.05$). In frozen semen promoted reduction of lipid peroxidation and of ROS content in M1 compared to other moments ($p < 0.05$). The cooled semen for 24 hours at 5°C and 15°C demonstrated similar efficiency in the pre and post-treatment moments. However, the improvement in sperm quality was not maintained after one month (M2) therapy, presenting similar results to the pre-treatment moment (M0), which can be justified by disease recurrence.

Key-words: seminal vesiculitis, pyospermia, ROS, equine semen.

“O esforço precisa ser diário, e o processo, respeitado. As pessoas sempre colhem o que semeiam. Não existe atalho.”

Stephen R. Covey

Introdução

1. INTRODUÇÃO

O interesse no estudo da reprodução equina é fomentado cada vez mais como ferramenta para acelerar o ganho genético e competitividade na indústria do cavalo. Esses estudos têm se focado no desenvolvimento de melhores taxas de concepção de indivíduos idosos, portadores de subfertilidade, além de maximizar o aproveitamento de animais férteis de alto valor genético.

A redução da fertilidade no garanhão resulta em importantes perdas econômicas para a indústria equina. Entretanto, apesar da alta incidência de garanhões subférteis, poucas vezes se consegue identificar, na prática, o principal fator desencadeador dessa queda na fertilidade, em razão da variedade de fatores etiológicos.

A infecção bacteriana da vesícula seminal, denominada vesiculite seminal, é uma das possíveis causas de redução de fertilidade no garanhão e a despeito de ser descrita como uma enfermidade de baixa ocorrência na espécie equina é ainda pouco diagnosticada na rotina, uma vez que apenas o exame clínico, a palpação transretal e o exame ultrassonográfico podem ser insuficientes no estabelecimento do seu diagnóstico definitivo, necessitando de um exame mais específico, o exame endoscópico.

O garanhão acometido pela doença apresenta histórico de infertilidade ou subfertilidade, distúrbio ejaculatório, disseminação de patógenos sexualmente transmissíveis e alterações físico-químicas do sêmen, que levam à redução na qualidade e longevidade seminal. Essas alterações são causadas pela presença de polimorfonucleares, hemácias e bactérias no ejaculado que promovem aglutinação, precipitação, redução da motilidade espermática, incremento da produção de espécies reativas de oxigênio e citocinas pró-inflamatórias, que estimulam a apoptose da célula espermática e consequente perda de sua função.

A vesiculite seminal possui grande relevância na clínica reprodutiva devido à dificuldade de tratamento, elevados índices de recidiva, risco de contaminação de fêmeas com agentes patogênicos sexualmente transmissíveis e inutilização de animais, gerando considerável prejuízo econômico ao criador e frustração ao médico veterinário.

O tratamento convencionalmente preconizado utiliza antibióticos por via sistêmica e é quase sempre ineficaz, devido à farmacodinâmica e farmacocinética da maioria dos medicamentos disponíveis, uma vez que eles não atingem as glândulas sexuais acessórias em concentrações adequadas. Dessa forma, o tratamento local tem sido apontado por diversos autores como a melhor alternativa terapêutica. Apesar disso,

raros estudos foram conduzidos no intuito de avaliar a eficácia do tratamento local em garranhões com vesiculite seminal e seu impacto na qualidade do sêmen, sendo a literatura disponível baseada em relatos de casos.

Nesse sentido, os objetivos do presente estudo incluíram: avaliar e comparar o efeito do tratamento local de vesiculite seminal em garranhões quanto aos índices de cinética e morfologia espermática, integridade de membrana plasmática, porcentagem de leucócitos, contagem de unidades formadoras de colônias, índice de peroxidação lipídica e de espécies reativas de oxigênio (ROS) de amostras seminais, sobre o sêmen a fresco, refrigerado e congelado antes e após o tratamento; avaliar e comparar o teor de óxido nítrico no plasma seminal antes e após o tratamento, como indicador de inflamação; investigar quais são as principais bactérias envolvidas na enfermidade e os fatores de risco para os garranhões.

"Nenhum trabalho de qualidade pode ser feito sem concentração, auto-sacrifício, esforço e dúvida."

Max Beerbohm

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Vesícula seminal na espécie equina

O garanhão possui um conjunto completo de glândulas sexuais acessórias (Figura 1A) composto por duas ampolas, duas vesículas seminais, também denominadas glândulas vesiculares, uma próstata bilobada e duas glândulas bulbouretrais (SACK E HACKETT, 2001). Há diferenças marcantes entre as espécies quanto à presença dessas glândulas e na quantidade de secreções produzidas pelas mesmas (KARESKOSKI & KATILA, 2008). Devido a estas diferenças, a comparação entre as espécies é raramente produtiva, pois o plasma seminal varia drasticamente quanto à composição e quanto à contribuição de cada glândula para o volume final do ejaculado (HAFEZ & HAFEZ, 2004). Essa variabilidade reflete no volume ejaculado pelo macho, que no garanhão varia de 50 a 100 ml. Na espécie equina as glândulas sexuais acessórias são responsáveis por 95% do volume do ejaculado (BLANCHARD & VARNER, 1992).

As vesículas seminais possuem em média cerca de 15 a 20 cm de comprimento e entre 5 a 6 cm de diâmetro (POZOR, 2005). Possuem formato piriforme, paredes finas, e estão localizadas dorsalmente à bexiga e lateralmente às ampolas dos ductos deferentes. Podem ser divididas em colo, corpo e fundo, e são capazes realizar de considerável distensão (BLANCHARD & VARNER, 1992). São difíceis de serem palpadas no exame transretal, a menos que estejam distendidas após estímulo sexual (CHENIER, 2009; BRINSKO *et al.*, 2011).

Na região da uretra pélvica é possível visualizar a maioria das aberturas das glândulas sexuais acessórias (Figura 1B). As vesículas seminais estão situadas dentro da prega genital e seus ductos convergem para se abrir no colículo seminal (POZOR, 2005). O colículo seminal consiste em uma elevação da mucosa presente no teto da uretra pélvica (MENZIES-GOW, 2011), onde terminam os ductos deferentes e se abrem as glândulas vesiculares (BALL, 2008). Quatro aberturas podem estar presentes, quando os ductos das glândulas vesiculares e dos ductos deferentes se abrem de maneira independente e duas aberturas são vistas quando ocorre união prévia de um ducto deferente e um ducto da vesícula seminal correspondente, formando um ducto comum (Figura 1C), denominado ducto ejaculatório (CHENIER, 2009).

As glândulas vesiculares são responsáveis pela produção da última fração do ejaculado. O volume e a composição dessa fração podem variar entre os garanhões (TIBARY, 2007). A secreção proveniente da glândula vesicular é fluida e transparente ou ligeiramente opaca e viscosa (POZOR, 2005) e contém poucos espermatozoides e grande quantidade de ácido cítrico e gel, que arrastam os poucos espermatozoides que restam na uretra durante a ejaculação (AMANN & GRAHAM, 1993). A sazonalidade influencia no volume de secreção produzida por essas glândulas, sendo maior durante os meses de atividade reprodutiva mais intensa (TIBARY, 2007). Este efeito pode ser associado com mudanças nos níveis de esteróides sexuais, que variam de acordo com a época do ano no sangue e no plasma seminal (KARESKOSKI & KATILA, 2008).

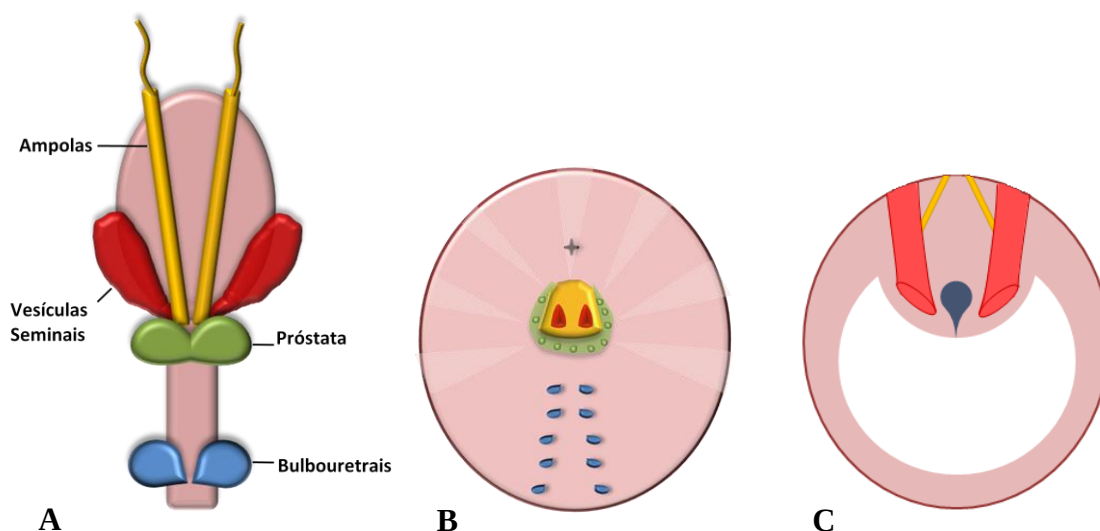


FIGURA 1. A) Ilustração das quatro glândulas sexuais acessórias presentes no garanhão. B) Esquema das aberturas das glândulas sexuais acessórias na uretra pélvica visualizadas por endoscopia. Em azul as aberturas dos ductos das glândulas bulbouretrais, em verde as aberturas dos ductos da próstata, em vermelho e amarelo o colículo seminal, local onde se abrem os ductos ejaculatórios (formado pela união dos ductos das vesículas seminais às ampolas dos ductos deferentes). C) Esquema de um corte transversal do colículo seminal. Em vermelho os ductos das vesículas seminais, em amarelo os ductos das ampolas dos ductos deferentes e em azul o resquício do útero masculino.

Em outras espécies, as vesículas seminais secretam grandes quantidades de frutose e ergotioneína, enquanto os ácidos cítrico e láctico são mais prevalentes no garanhão (HAFEZ & HAFEZ, 2004). Diversos tipos de glicosídeos foram identificados na secreção das vesículas seminais de garanhões, e baseado em estudos em humanos, acredita-se que esses glicosídeos atuam na membrana acrossomal antes e durante o processo de fertilização (KARESKOSKI & KATILA, 2008).

Algumas enzimas também estão presentes na fração do plasma seminal produzidas pelas glândulas vesiculares, dentre elas estão três tipos de anidrase carbônica, que parecem regular a concentração de bicarbonato e o pH do plasma seminal (KARESKOSKI & KATILA, 2008). Além das enzimas, o plasma seminal de animais domésticos contém inúmeras proteínas similares as do plasma sanguíneo (POLAKOSKI & KOPTA, 1982). As funções sugeridas para as proteínas do plasma seminal incluem a participação em diversos mecanismos fundamentais à fertilização, tais como a regulação da capacitação espermática, formação de reservatório espermático no oviduto, modulação da resposta imune do útero, transporte espermático no trato genital feminino, e também na interação dos gametas durante o processo de fusão (TROEDSSON *et al.*, 2010).

As glândulas vesiculares produzem diversos tipos de proteínas, entre elas, proteínas estruturais como a Fibronectina Tipo II (Fn-2), que atua na capacitação espermática, bem como a proteína rica em Cisteína Tipo III (CRISP-3), que possui alta correlação com fertilidade em equinos (KARESKOSKI & KATILA, 2008). Estudos recentes demonstraram que a CRISP-3 é responsável pela proteção seletiva de espermatozoides viáveis contra a ação de polimorfonucleares, permitindo a sobrevivência e transporte das células espermáticas até o oviduto, mesmo após processo inflamatório do endométrio pós-cobertura (TROEDSSON *et al.*, 2010).

Diversos micro e macroelementos também são produzidos pelas glândulas sexuais acessórias, como cálcio, magnésio, potássio, cobre, ferro, zinco, sódio e cloro (KARESKOSKI & KATILA, 2008). O plasma seminal de garanhões contém, ainda, inúmeras outras substâncias secretadas pelas glândulas sexuais acessórias, como hormônios, pequenas quantidades de amônia e uréia, aminoácidos livres, e diversas formas de lipídios, como o colesterol (POLAKOSKI & KOPTA, 1982).

Alguns estudos têm questionado a necessidade do plasma seminal no processo de fecundação, já que diversos trabalhos utilizando espermatozoides da cauda do epidídimo sem contato com estas secreções foram capazes de fertilizar (PAPA *et al.*,

2008; MONTEIRO *et al.*, 2009; MONTEIRO *et al.*, 2013). Algumas pesquisas relataram que o plasma seminal pode causar prejuízos à fertilidade e congelabilidade do sêmen. Estes trabalhos demonstraram que proteínas presentes no plasma seminal podem levar a alterações bioquímicas, que promovem um aumento na permeabilidade da membrana, causando injúria celular (MOORE & HIBBIT, 1976; MOUSTAFA & MESZAROS, 1981).

Sieme *et al.* (2004) demonstraram que as últimas frações do ejaculado, principalmente a produzida pela vesícula seminal, possuem um efeito negativo mais pronunciado sobre a longevidade do sêmen. Webb *et al.* (1990) estudaram os efeitos da secreção proveniente da glândula vesicular sobre o sêmen, mediante vesiculectomia em garanhões. De acordo com os autores, os principais resultados obtidos após a ablação das glândulas vesiculares foram: redução do volume total ejaculado e do gel; maiores taxas de motilidade espermática e de espermatozoides com movimento progressivo no sêmen descongelado; e menores taxas de aglutinação.

2.2. Vesiculite seminal no garanhão

A vesiculite seminal consiste na inflamação difusa de caráter infeccioso da mucosa de uma ou ambas as vesículas seminais, que pode levar à redução parcial ou total da fertilidade do reprodutor (BLANCHARD *et al.*, 1988; FREESTONE *et al.*, 1993) e, em alguns casos, pode ocasionar também distúrbios ejaculatórios (MIRAGAYA *et al.*, 2011).

2.2.1. Incidência

No garanhão a vesiculite seminal é considerada pouco frequente, entretanto é a afecção mais comum entre as desordens envolvendo as glândulas sexuais acessórias (BLANCHARD & VARNER, 2002; TIBARY *et al.*, 2009; TIBARY & RODRIGUEZ, 2011).

Apesar de não ser muito diagnosticada na rotina, como ocorre na espécie bovina, esta patologia tem sido relatada por diversos autores (HOLST, 1976; DEEGEN, 1979; SOJKA *et al.*, 1985; BLANCHARD, 1987; BLANCHARD *et al.*, 1988; FREESTONE *et al.*, 1993; GAY & PERRIN, 1999; BLANCHARD & VARNER, 2002; FENNEL *et al.*, 2010; MANCILL, 2010; COMERFORD *et al.*, 2011; SANCLER-SILVA *et al.*, 2013; PINTO *et al.*, 2014).

2.2.2. Patogenia

Os agentes patogênicos mais comumente relacionados à vesiculite seminal são *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus spp.* e *Staphylococcus spp.*, embora já tenham sido relatados casos causados por *Proteus vulgaris*, *Brucella abortus* e *Acinetobacter calcoaceticus* (TIBARY *et al.*, 2011; VARNER *et al.*, 2011; PINTO *et al.* 2014).

Embora *Mycoplasma*, *Ureaplasma*, *Clamídia*, protozoários e vírus tenham sido associados com vesiculite seminal em outras espécies de animais, estes microorganismos não foram isolados a partir de vesículas seminais de garanhões acometidos (VARNER & SCHUMACHER, 2011).

A patogenia dessa enfermidade ainda não está completamente elucidada, mas acredita-se que as rotas potenciais para a infecção das glândulas vesiculares incluem: via ascendente a partir da uretra, via descendente a partir do trato urinário, via hematogênica e linfática, ou secundária a infecções em outras glândulas sexuais acessórias (VARNER *et al.*, 2011).

2.2.3. Diagnóstico

Classicamente a avaliação reprodutiva de garanhões tem sido realizada com a associação de exame andrológico e espermiograma. Ao longo de vinte anos um grande número de outros métodos diagnósticos se tornaram disponíveis para facilitar essa avaliação (BRINSKO *et al.*, 2011). Esses métodos permitem uma análise mais crítica da capacidade reprodutiva desses animais, como a ultrassonografia, que disponibiliza avaliação do trato genital externo e interno e a endoscopia, que permite uma avaliação mais detalhada deste último (BALL, 2008).

O diagnóstico de vesiculite seminal é geralmente estabelecido por análise macroscópica e microscópica do sêmen e cultura microbiana do lavado do lúmen da vesícula seminal, coletado mediante endoscopia (VARNER & SCHUMACHER, 2011).

Sinais clínicos

Em geral, a infecção bacteriana das vesículas seminais não é acompanhada por sinais clínicos sistêmicos, embora alguns garanhões apresentem disfunção ejacutória evidenciada por dor aparente na ejaculação, com relutância à cobertura. Os garanhões

afetados não exibem febre e sinais de dor no momento da micção ou defecação na maioria dos casos (FREESTONE *et al.*, 1993; TIBARY & RODRIGUEZ, 2011).

A palpação transretal pode não revelar achados significativos (BLANCHARD *et al.*, 1988). Em alguns animais as glândulas vesiculares se encontram aumentadas de tamanho, firmes, e o garanhão demonstra sensibilidade ao toque (MALMGREN & SUSSEMILCH, 1992).

Contudo, segundo McDonnell (2008), a vesiculite seminal pode ser uma das possíveis causas do comportamento de auto-mutilação em cavalos, como olhar e morder o flanco, rolar, pinotear e escoicear o abdômen.

Freestone *et al.* (1993) relataram um caso incomum de vesiculite seminal unilateral em um garanhão que apresentou sinais intermitentes de cólica durante um período de quatro meses.

Espermiograma

Na espécie equina o sêmen possui coloração branca ou branco-acinzentada e outros tipos de colorações podem indicar alterações. Amostras contaminadas com sangue ou material purulento, levam à suspeita de vesiculite seminal (TIBARY *et al.*, 2009).

A infecção da glândula vesicular resulta em acúmulo de material purulento e/ou sanguinolento no interior das vesículas seminais, que é lançado no sêmen no momento da ejaculação (MIRAGAYA *et al.*, 2011). Dessa forma, a alteração das vesículas pode ser identificada pela presença de células polimorfonucleares e/ou hemácias no ejaculado, denominados piospermia e hemospermia, respectivamente. A presença de células inflamatórias causa aglutinação, precipitação, e redução da motilidade espermática (TIBARY & RODRIGUEZ, 2011; VARNER *et al.*, 2011).

Exame ultrassonográfico

A imagem bidimensional das glândulas sexuais pode ser obtida com o uso da ultrassonografia. Embora a avaliação ultrassonográfica tenha sido introduzida na prática veterinária na década de oitenta, este exame ainda hoje não é rotineiramente realizado durante a avaliação do trato reprodutor de garanhões (POZOR, 2005), sendo somente utilizado quando há indicação clínica (MALMGREN & SUSSEMILCH, 1992).

Esse exame pode ser utilizado em associação com a palpação transretal quando se deseja obter informações do trato genital interno, na avaliação do tamanho, consistência, ecogenicidade e conteúdo das estruturas (BLANCHARD & VARNER, 1992).

O conhecimento da aparência ultrassonográfica normal é fundamental quando se deseja detectar possíveis anormalidades (MALMGREN & SUSSEMILCH, 1992). As vesículas seminais apresentam-se como sacos achatados dorsolaterais à bexiga de formato variando de oval a triangular, dependendo do grau de atividade sexual do animal (MALMGREN & SUSSEMILCH, 1992; POZOR & MCDONNELL, 2002). A parede muscular delgada é discretamente mais hiperecogênica em relação à mucosa que reveste o interior da glândula. O conteúdo luminal apresenta-se geralmente hipoecogênico quando a vesícula seminal apresenta-se distendida por fluído (BLANCHARD & VARNER, 1992), porém a aparência ultrassonográfica da secreção vesicular pode variar, dependendo de sua composição, entre garanhões (MALMGREN & SUSSEMILCH, 1992).

Pozor & McDonnell (2002) demonstraram considerável variabilidade no tamanho, forma e aparência ultrassonográfica das glândulas sexuais acessórias de garanhões saudáveis. Essas diferenças variaram tanto entre garanhões, quanto no próprio garanhão. Grande parte desta variabilidade pode ser atribuída a diferenças na estimulação sexual e frequência de coberturas entre os animais. Em repouso sexual a glândula apresenta-se achatada e alongada (Figura 2A), sendo difícil sua visualização à ultrassonografia. Quando preenchida por fluído durante a estimulação sexual, torna-se arredondada, sendo facilmente visualizada na imagem ultrassonográfica.

No caso de vesiculite seminal o exame ultrassonográfico pode revelar uma glândula com parede espessada e conteúdo variando de anecóico a hiperecóico. O acúmulo de líquido pode conter detritos e partículas de fibrina (Figura 2B) (BLANCHARD & VARNER, 1992). O tamanho da glândula pode estar bastante aumentado e seu posicionamento alterado (SAMPER & TIBARY, 2006). Entretanto, a aparência ultrassonográfica de vesiculite seminal pode variar entre os animais acometidos (MALMGREN & SUSSEMILCH, 1992; POZOR, 2005). Em casos de vesiculites crônicas, as glândulas vesiculares podem se tornar diminuídas, firmes e desprovidas de conteúdo (SAMPER & TIBARY, 2006).

Dessa forma, a ultrassonografia contribui para detectar possíveis alterações nas glândulas vesiculares, sobretudo quando há alterações grosseiras. Contudo não é

suficiente para estabelecimento do diagnóstico de vesiculite seminal, uma vez que fornece um número elevado de diagnósticos inconclusivos (POZOR, 2005).

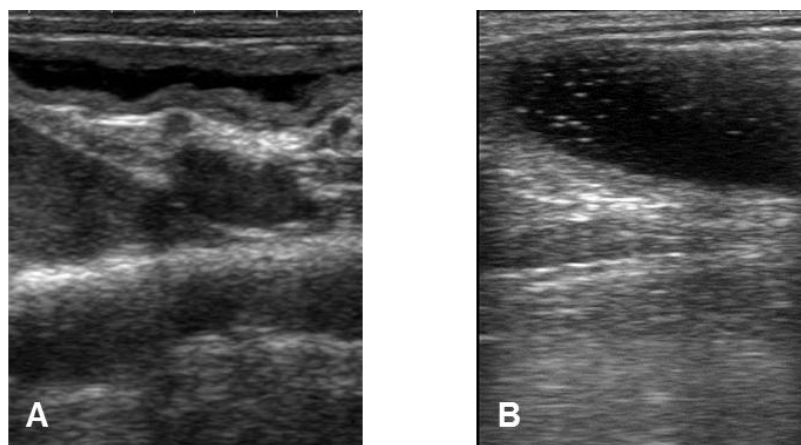


FIGURA 2. A) Imagem ultrassonográfica de uma glândula vesicular normal. B) Imagem de uma glândula vesicular acometida por vesiculite seminal contendo partículas hiperecóticas decorrentes do processo inflamatório.

Exame endoscópico

Videoendoscópios flexíveis ou de fibra óptica de no mínimo 100 cm de comprimento e com um diâmetro não superior a 10 mm podem ser utilizados para um exame completo do trato urogenital de garanhões (TIBARY, 2007; SCHUMACHER & VARNER, 2008; CHENIER, 2009; MENZIES-GOW, 2011), incluindo a visualização da uretra peniana, uretra pélvica, glândula vesicular e bexiga urinária (BALL, 2008).

A mucosa uretral possui coloração rósea pálida, e contém numerosas dobras longitudinais. Sua aparência e a técnica de avaliação são semelhantes as do esôfago (BERTONE, 1998). A vascularização do tecido submucoso torna-se mais evidente conforme o endoscópio progride em direção à bexiga. Quando o aparelho alcança o arco isquiático, o operador consegue perceber o trajeto curvilíneo que o equipamento realiza (BRINSKO *et al.* 2011), e a imagem endoscópica torna-se invertida (TIBARY, 2007). Ocorre um alargamento da uretra e as aberturas dos múltiplos ductos das glândulas bulbouretrais podem ser visualizadas em duas fileiras ao longo do teto da uretra pélvica, que na imagem endoscópica, situa-se ventralmente. Imediatamente após estas aberturas encontra-se uma elevação da mucosa, que consiste no colículo seminal (TIBARY, 2007; MENZIES-GOW, 2011). As aberturas das glândulas vesiculares podem ser canuladas neste local com um cateter de polietileno de pequeno diâmetro, permitindo a coleta de

amostra do conteúdo dessas glândulas, bem como a instilação de medicamentos no interior das mesmas (TIBARY, 2007; CHENIER, 2009; BRINSKO *et al.*, 2011).

A endoscopia é o exame de eleição para estabelecimento do diagnóstico definitivo de vesiculite seminal, uma vez que permite a visualização do lúmen da glândula e a coleta de amostras para cultura bacteriana e antibiograma (BALL, 2008; BRINSKO *et al.*, 2011). Além disso, possibilita o diagnóstico de lesões uretrais que levam à presença de sangue no ejaculado, sendo esse um diagnóstico diferencial de vesiculite seminal (MENZIES-GOW, 2011).

Dentre as quatro glândulas sexuais acessórias, apenas a vesícula seminal possui acesso endoscópico (Figura 3 A e B), devido ao seu ducto complacente e amplitude do lúmen (TIBARY, 2007).

A lavagem do lúmen das glândulas vesiculares seguida de instilação de antibióticos parece ser o tratamento mais efetivo nos casos de vesiculite em garanhões (CHENIER, 2009; BRINSKO *et al.*, 2011; MIRAGAYA *et al.*; 2011).

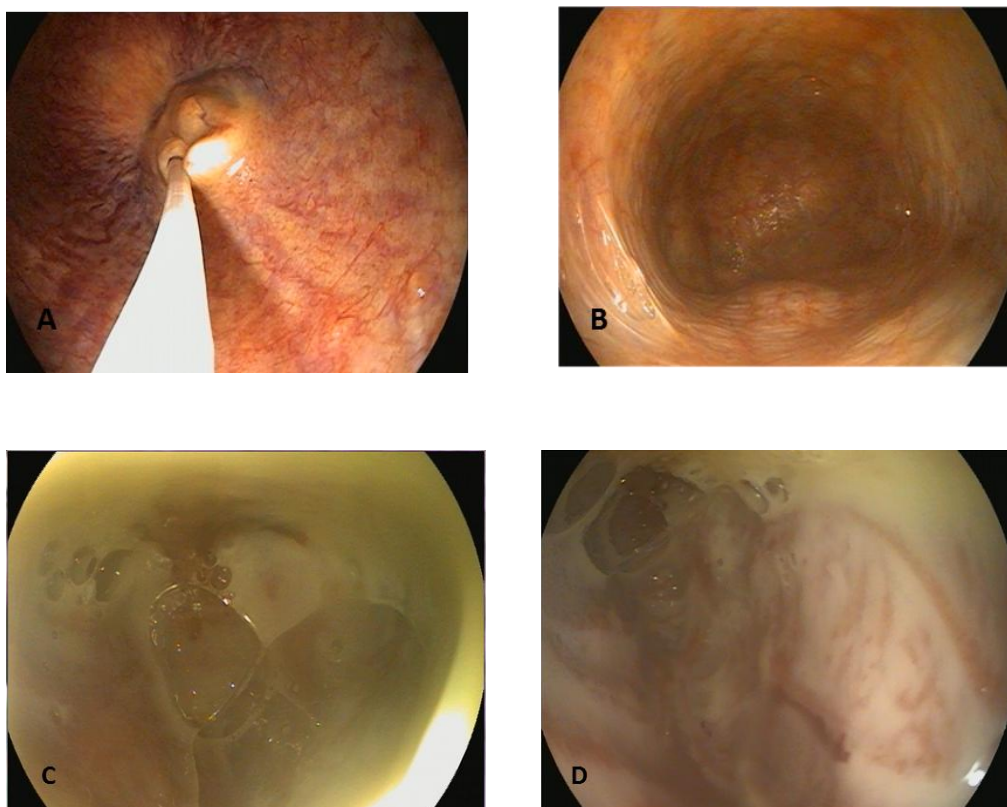


FIGURA 3. A) Imagem endoscópica do momento em que a abertura de um dos ductos ejaculatórios é cateterizada para posterior introdução do endoscópio na vesícula seminal. B) Aspecto de uma vesícula seminal normal. C e D) Aspecto de duas vesículas seminais apresentando conteúdo purulento decorrente de vesiculite seminal.

Coleta fracionada de sêmen

Durante o processo de ejaculação, ocorre o preenchimento da uretra pélvica com os fluídos das glândulas anexas, isto desencadeia sinais sensoriais eferentes que levam à uma resposta do sistema nervoso parassimpático motor, promovendo a expulsão do sêmen pela uretra por contrações rítmicas e vigorosas dos músculos isquiocavernoso, bulboesponjoso e uretral (McDONNELL, 1992).

No garanhão a ejaculação é constituída por cinco a oito jatos, sendo estes divididos em frações pré-espermáticas, frações ricas em espermatozoides e frações pobres em espermatozoides. As primeiras frações são compostas pelas secreções da próstata e glândulas bulbo-uretrais, apresentam aspecto fluído e translúcido e contém raros ou nenhum espermatozoide. Em seguida as frações ricas em espermatozoides, são compostas pelas secreções da rede testis, epidídimos e ampolas dos ductos deferentes. As últimas frações, pobres em espermatozoides, são compostas principalmente pela secreção das vesículas seminais (AMANN & GRAHAM, 1993).

Dessa forma, a coleta fracionada do sêmen pode ser utilizada na tentativa de localizar a fonte de contaminação, mediante visualização do aspecto de cada fração do ejaculado e cultura bacteriana (CHENIER, 2009; TIBARY & RODRIGUEZ, 2011).

2.2.4. Prognóstico

O prognóstico de vesiculite seminal em garanhões é reservado, devido à ineficiência de protocolos terapêuticos convencionais e altas taxas de recorrência, levando, muitas vezes, a retirada dos animais acometidos da atividade reprodutiva (SAMPER & TIBARY, 2006).

Comerford *et al.* (2011) relataram um caso de vesiculite seminal em um garanhão causada por *Pseudomonas aeruginosa* que culminou em epididimite, orquite e periorquite, por contaminação ascendente. Após diversas tentativas de tratamento local e sistêmico com antibióticos, o animal não conseguiu eliminar a infecção e foi submetido à orquiectomia bilateral.

Pinto *et al.* (2014) relataram um caso semelhante de epididimite e orquite, secundárias à vesiculite seminal, causados por *Klebsiella pneumoniae*. Nesse caso após tratamento sistêmico e local o animal obteve melhora clínica, apesar de não ter eliminado completamente a piospermia.

2.2.5. Tratamento de vesiculite seminal e processamento do sêmen contaminado

O tratamento da vesiculite seminal apresenta alguns obstáculos para se tornar eficiente, sendo o primeiro deles a farmacocinética e farmacodinâmica da maioria dos medicamentos disponíveis (SAMPER & TIBARY, 2006) e o segundo diz respeito à baixa vascularização da glândula (Figura 4) (Dados não publicados).

A maioria dos antibióticos não chega às glândulas sexuais acessórias em concentrações adequadas por não atingirem boa penetração no trato genital interno, quando administrados sistemicamente (CHENIER, 2009; MIRAGAYA *et al.*, 2011; TIBARY & RODRIGUEZ, 2011; VARNER *et al.*, 2011). Características favoráveis de antimicrobianos para a penetração em glândulas sexuais acessórias incluem alta solubilidade em lipídeos, pequeno tamanho molecular, pouca afinidade de ligação a proteínas plasmáticas e um pKa elevado. Entretanto, poucos antibacterianos possuem tais características (FENNELL *et al.*, 2010).

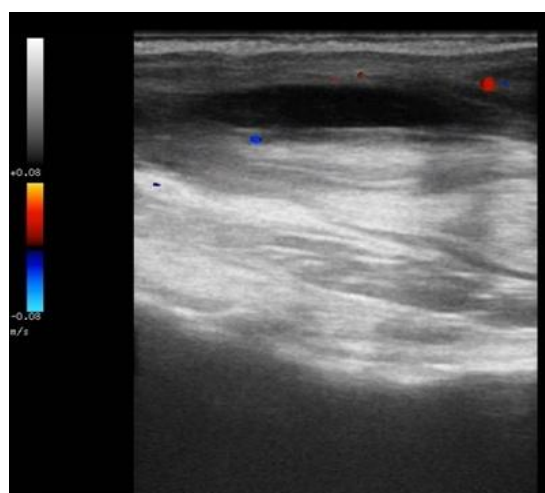


FIGURA 4. Avaliação hemodinâmica por ultrassonografia Color-Doppler, demonstrando baixa vascularização da parede da glândula vesicular de um garanhão saudável.

Os estudos que envolvem outras espécies têm revelado que sulfonamida-trimetoprim e enrofloxacin possuem boa passagem para a próstata e vesícula seminal, e, portanto, podem ser os antibióticos de escolha para a terapia parenteral de garanhões com vesiculite seminal causada por bactérias sensíveis a estes fármacos (VARNER & SCHUMACHER, 2011).

O tratamento sistêmico em bovinos acometidos por vesiculite seminal é descrito por um período prolongado de duas a quatro semanas (BRUCE *et al.*, 2008). Alguns relatos de tratamento de vesiculite seminal em equinos que obtiveram sucesso clínico foram descritos por Freestone *et al.* (1993), no qual utilizaram sulfonamida-trimetoprim e por Blanchard *et al.* (1988), que utilizaram enrofloxacin. No entanto, Blanchard *et al.* (2002) relataram o caso de um garanhão com vesicule seminal causada por *Acinetobacter calcoaceticus*, susceptível à enrofloxacin no antibiograma, que não obteve melhora clínica após tratamento parenteral por 15 dias com o fármaco.

A lavagem direta do lúmen glandular com solução fisiológica, seguida de infusão com antibiótico é considerada o método terapêutico de eleição. Essa terapia requer repetições por período prolongado (MIRAGAYA *et al.*, 2011; TIBARY & RODRIGUEZ, 2011). As glândulas afetadas são previamente lavadas com uma grande quantidade de solução salina e em seguida a droga antimicrobiana apropriada é instilada diretamente no lúmen glandular. Algumas drogas devem ser tamponadas para evitar reação local e este protocolo é geralmente repetido diariamente durante no mínimo cinco dias consecutivos (VARNER & SCHUMACHER, 2011).

Alguns autores associaram a terapia local à terapia sistêmica, na tentativa de aumentar a biodisponibilidade da droga no trato reprodutor (TURNER, 2011). A lavagem direta da glândula vesicular e infusão com amicacina combinados com o tratamento oral utilizando sulfonamida-trimetoprim, durante oito dias consecutivos, foi descrito para o tratamento de um animal que apresentava vesiculite seminal causada por *Proteus vulgaris*, o qual obteve sucesso clínico ao término do tratamento (GAY & PERRIN, 1999).

A vesiculectomia seminal foi descrita como um método terapêutico, porém não tem sido utilizada rotineiramente (MIRAGAYA *et al.*, 2011; TIBARY & RODRIGUEZ, 2011). O procedimento cirúrgico é considerado difícil e pode resultar em complicações pós-operatórias, incluindo hemorragia, infecção e danos aos nervos ou músculos pélvicos, que podem interferir na ejaculação (VARNER & SCHUMACHER, 2011). Há apenas um relato na literatura por Deegen *et al.*, (2009) de sucesso terapêutico em um garanhão com vesiculite seminal, onde foi utilizada a técnica de vesiculectomia descrita em touros.

A inclusão de antibióticos no diluente do sêmen de garanhões afetados tem sido descrita como auxílio no controle de crescimento bacteriano no sêmen e no trato genital da égua, minimizando os efeitos deletérios ao sêmen e reduzindo os riscos para a fêmea

(FENNEL *et al.*, 2010). Entretanto, estudo realizado por Ortega-Ferrusola *et al.* (2009) demonstrou que microorganismos patogênicos apresentaram crescimento no sêmen diluído em extensor comercial, após refrigeração e congelação.

Estudo realizado por Ramires-Neto *et al.* (Dados não publicados) demonstrou menor contaminação bacteriana e superioridade do sêmen diluído com Botusemen[®] em relação ao sêmen diluído com INRA96[®] para alguns parâmetros de cinética espermática. Esta observação já havia sido descrita por Brinsko *et al.* (2011), sugerindo que a concentração de antibióticos nesse diluente pode ser insuficiente, indicando a inclusão de 1 mg/mL de Ticarcilina. Esse fato reafirma a necessidade de uma seleção adequada de antibióticos no diluente e do desenvolvimento de técnicas para remoção ou minimização da carga bacteriana antes do armazenamento do sêmen.

Estudo realizado por Sancler-Silva *et al.* (2012), demonstrou que o processamento do sêmen com alta carga de leucócitos proveniente de um garanhão com vesiculite seminal, através de filtragem em filtro de membrana hidrofóbica sintética de 2 µm de diâmetro (SpermFilter[®]) e posterior centrifugação em um gradiente de densidade à base de partículas de sílica, obteve bons resultados de fertilidade em programas de inseminação artificial.

Estudo realizado pelo mesmo grupo de pesquisa demonstrou superioridade da porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra do sêmen filtrado em SpermFilter[®] em comparação ao sêmen não filtrado, após 24 horas de refrigeração. Além disso, esse mesmo estudo revelou maiores contagens de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) para o sêmen puro, seguido do sêmen diluído e uma menor contagem para o sêmen diluído e filtrado em hidrofóbica sintética de 2µm de diâmetro, sugerindo uma minimização da carga bacteriana no último grupo avaliado (Dados em publicação).

2.2.6. Influência da vesiculite seminal na qualidade do sêmen equino

Diversos estudos em humanos (ELEY *et al.*, 2005; SATTA *et al.*, 2006; VIGNERA *et al.*, 2011) e estudos recentes em equinos (ORTEGA-FERRUSOLA *et al.*, 2009; FENNEL *et al.*, 2010) demonstraram que a presença de leucócitos e bactérias no sêmen levam ao aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) e produção de citocinas pró-inflamatórias afetando, com isso, a integridade de membranas, função mitocondrial e integridade de DNA, acarretando em aumento da expressão de marcadores de apoptose na célula espermática. Como resultado desse efeito deletério,

observa-se redução da motilidade espermática, da longevidade e fertilidade do sêmen (VIGNERA *et al.*, 2011).

Os efeitos da hemospermia em um programa de reprodução equina são devastadores, uma vez que garanhões com hemospermia severa apresentam subfertilidade ou infertilidade. A contaminação significativa do ejaculado com sangue reduz drasticamente as taxas de concepção (VOSS *et al.*, 1976).

O mecanismo exato pelo qual o sangue interfere na qualidade e fertilidade seminal ainda não é bem definido (TURNER, 2011). Um estudo em equinos sugere que a série vermelha do sangue é responsável pela redução da qualidade seminal e consequente redução da fertilidade em casos de hemospermia. Nesse estudo 50% de éguas inseminadas com sêmen contaminado apenas com soro foram capazes de gestar, em contrapartida, apenas 7,7% de éguas inseminadas com sêmen contaminado com sangue total desenvolveram uma gestação (VOSS *et al.*, 1976). Voss & Wotowey (1972) demonstraram que 20% de sangue total no ejaculado de equinos foram deletérios para a fertilidade.

Estudo realizado por Sancler-Silva *et al.* (2013) avaliou a influencia da adição de 2% v/v de sangue total ao sêmen após incubação a 37°C por 15 minutos e após centrifugação a 600 x g por 10 minutos. No momento pós-incubação não houve diferenças quanto aos parâmetros de cinética espermática entre o grupo acrescido de 2% de sangue e o grupo controle (sem adição de sangue). Entretanto, após a centrifugação o sêmen contaminado apresentou menores valores de motilidade total, motilidade progressiva e porcentagem de espermatozoides rápidos, sugerindo um efeito deletério da centrifugação quando há presença de sangue, que pode estar relacionado à lise de hemácias.

Rijsselaere *et al.* (2004) demonstraram que a hemospermia é ainda mais prejudicial ao sêmen canino congelado e concluíram que quando as amostras são congeladas ocorre a lise de hemácias liberando elevadas quantidades de hemoglobina. A hemoglobina constitui 90% das hemácias, e é composta por proteínas e ferro. O ferro quando livre atua diretamente nas membranas lipídicas causando danos peroxidativos e gerando grande quantidade de ROS.

A presença de leucócitos no sêmen de garanhões é considerada uma condição incomum e indica um processo infeccioso no trato genital (VOSS & MCKINNON, 1993). Até mesmo em baixas quantidades os leucócitos podem interferir na função espermática (BAUMBER *et al.*, 2002).

Em alguns casos, a motilidade espermática pode parecer adequada, mesmo na presença de grandes números de glóbulos brancos. No entanto, durante o processo de armazenamento ocorre redução gradativa da viabilidade dos espermatozoides, reduzindo dessa forma a fertilidade do garanhão (VOSS & MCKINNON, 1993).

A contaminação leucocitária do sêmen é uma importante fonte de ROS. Em um ejaculado contaminado por leucócitos existem duas fontes produtoras de ROS, os espermatozoides e os leucócitos. Em ambas as células o mecanismo de geração de ROS é similar durante o metabolismo celular, sendo a membrana plasmática e mitocôndrias os dois maiores sítios produtores. Entretanto, os leucócitos podem produzir até cem vezes mais ROS do que a célula espermática (BAUMBER *et al.*, 2002).

Existem poucos estudos sobre os efeitos deletérios que os leucócitos exercem no sêmen de garanhões. Estudo realizado por Baumber *et al.* (2002) demonstrou resultados semelhantes aos encontrados em humanos. Amostras de sêmen incubadas com neutrófilos ativados à 38°C durante 30 minutos demonstraram aumento significativo na produção de ROS e decréscimo proporcional da motilidade espermática.

A contaminação do ejaculado por bactérias patogênicas, pode induzir à ativação de caspases nos espermatozoides, promovendo perda da função espermática e indução da apoptose. Tal deterioração é mais expressiva durante o processo de armazenamento do sêmen. Além disso, o fenômeno de apoptose da célula espermática pode também ser induzido pela produção excessiva de ROS e por lipopolissacarídeos de membrana, especialmente no caso de bactérias Gram-negativas (BAUMBER *et al.*, 2002; VIGNERA *et al.*, 2011)

Os glóbulos brancos normalmente produzem ROS em quantidades muito elevadas, sobretudo H_2O_2 . A presença, de até mesmo, discretas quantidades de glóbulos brancos no sêmen equino pode ter um impacto prejudicial sobre a qualidade seminal (BALL, 2011).

O estresse oxidativo é um importante componente da citopatologia espermática em equinos, sobretudo durante o processo de armazenamento (BALL, 2008). Embora todas as células necessitem de oxigênio para gerar energia e desempenhar suas funções vitais, esse processo também gera um número elevado de metabólitos, dentre eles as espécies reativas de oxigênio, que são tóxicas às células (BALL, 2011).

Entre os danos que as ROS promovem aos espermatozoides estão as lesões mitocondriais, fragmentação do DNA, capacitação espermática precoce, peroxidação lipídica de membranas celulares e indução da apoptose (VIGNERA *et al.*, 2011).

O plasma seminal contém enzimas capazes de degradar as ROS, como a catalase, a superóxido dismutase e a glutathione peroxidase (BALL, 2011). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) parece ser a espécie reativa de oxigênio mais deletéria aos espermatozoides. A catalase possui papel fundamental na degradação do H_2O_2 , protegendo os espermatozoides aos danos oxidativos. Essa enzima está presente, normalmente, em quantidades elevadas no sêmen equino (BAUMBER *et al.*, 2002).

Qualquer desequilíbrio entre a produção ou degradação de ROS no sêmen pode ter efeitos graves sobre a função espermática (BALL, 2008). Os efeitos do estresse oxidativo são particularmente importantes durante o processo de armazenagem do sêmen, uma vez que nessas situações o plasma seminal é praticamente todo removido, reduzindo sua capacidade antioxidante. Além disso, espermatozoides anormais também produzem níveis mais elevados de ROS (BAUMBER *et al.*, 2002).

*"A distância entre o sonho e a
realidade chama-se disciplina"*

Bernardo R. De Rezende

Objetivos

3. OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo foram:

Experimento I – Avaliação de fatores predisponentes e principais bactérias envolvidas na etiopatogenia de vesiculite seminal em garanhões

✓ Avaliar o histórico de garanhões com vesiculite seminal e os principais fatores predisponentes para o surgimento da enfermidade, observando características como idade, tempo de evolução, manejo reprodutivo, parâmetros seminais e bactérias envolvidas.

Experimento II - Efeito do tratamento local de vesiculite seminal sobre a qualidade do sêmen equino a fresco

✓ Avaliar a eficácia do tratamento local e sua influência sobre os parâmetros seminais de pH, osmolaridade, volume, cinética e morfologia espermática, integridade de membrana plasmática, porcentagem de leucócitos, número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL) e de teor de óxido nítrico no plasma seminal, sobre a qualidade do sêmen fresco.

Experimento III - Impacto da vesiculite seminal e efeito do tratamento local sobre a qualidade do sêmen equino refrigerado

✓ Avaliar o impacto de vesiculite seminal e do tratamento local sobre o aproveitamento biotecnológico do sêmen equino refrigerado, quanto à cinética espermática e integridade de membrana plasmática;

✓ Avaliar qual temperatura de armazenagem (5°C ou 15°C) é mais eficiente em manter a qualidade seminal antes e após o tratamento local de vesiculite seminal.

Experimento IV - Efeito do tratamento local sobre a qualidade do sêmen equino congelado

✓ Avaliar o impacto de vesiculite seminal e do tratamento local sobre o aproveitamento biotecnológico do sêmen equino congelado, quanto à cinética espermática, integridade de membrana plasmática, índice de peroxidação lipídica e teor de ROS;

*"Tornar o impossível possível, o
possível fácil e o fácil elegante."*

Moshe Feldenkrais

Material e Métodos

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi subdividido em quatro experimentos complementares, de acordo com os objetivos propostos anteriormente, a fim de melhorar a organização e compreensão dos resultados. Em todos os experimentos foram utilizadas as mesmas partidas seminais, mudando basicamente, com exceção do primeiro experimento, o modo de processamento do sêmen (fresco, refrigerado ou congelado).

4.1. Experimento I

4.1.1. Animais e local da pesquisa

Foram utilizados 6 garanhões com idades entre 7 e 19 anos (média de $11,8 \pm 1,83$), sendo três da raça Quarto de Milha, um da raça Apaloosa, um da raça Crioula e um da raça Mangalarga Paulista.

Cinco garanhões eram provenientes de propriedades localizadas no estado de São Paulo (municípios de Cesário Lange, Tatuí, Guareí, Botucatu e Avaré) e um garanhão proveniente do estado do Paraná (município de Curitiba).

Dos seis animais, dois foram atendidos no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ – UNESP – Botucatu, os demais foram avaliados na propriedade de origem.

O animal número 6 não pode ser utilizado nos experimentos II, III e IV por manifestar durante o período de seleção, epididimite e orquite agudas, concomitante ao processo de vesiculite seminal. Dessa forma, cinco animais foram selecionados para os demais estudos.

4.1.1.1. Método de inclusão dos animais no estudo

O critério para inclusão dos animais no presente estudo foi o histórico de contaminação do sêmen com sangue ou pus. A partir dessa informação foi realizado o exame andrológico completo com anamnese (histórico clínico e reprodutivo), coleta e avaliação do sêmen, palpação transretal, ultrassonografia e endoscopia das vesículas seminais.

No espermograma foi avaliado o volume, coloração, concentração e motilidade espermática e presença de células sanguíneas (leucócitos ou hemácias). O sêmen foi coletado utilizando materiais estéreis em vagina artificial modelo Botucatu¹. Uma alíquota sem adição de diluente era acondicionada em tubo falcon estéril para posterior realização de cultura bacteriana (conforme descrito no item 4.1.2.2.).

Na palpação transretal foi avaliado se o animal apresentava sensibilidade dolorosa e se as glândulas vesiculares possuíam aumento de volume.

No exame ultrassonográfico foram avaliados espessura de parede e o aspecto do conteúdo das vesículas seminais direita e esquerda.

No exame endoscópico foram avaliados o aspecto da mucosa e do conteúdo (caso houvesse) das duas glândulas vesiculares, adicionalmente foi realizado o lavado vesicular para coleta de material para cultura e antibiograma (conforme descrição nos item 4.1.2.1. e 4.1.2.2., respectivamente).

O diagnóstico definitivo de vesiculite seminal foi estabelecido quando o animal apresentou hemácias e/ou leucócitos no sêmen, presença de conteúdo sanguinolento ou purulento no interior de uma ou ambas as vesículas seminais e resultado positivo na cultura bacteriana do lavado vesicular.

4.1.2. Exame microbiológico

4.1.2.1. Coleta do conteúdo vesicular

As coletas do conteúdo vesicular foram realizadas mediante endoscopia, sempre em duplicata, com intervalo de uma semana entre elas. Antes do procedimento os animais foram colocados em tronco de contenção e sedados com Cloridrato de Xilazina¹ a 10 % na dose 1 mg/Kg por via intravenosa e Maleato de Acepromazina² a 1% na dose de 0,1 mg/Kg, visando a contenção química e exposição do pênis por um período de 30 minutos. Após exposição do pênis foi realizada a limpeza da glândula, fossa e processo uretral com água corrente.

1. Vagina Artificial: Botupharma Ltda., Botucatu/SP, Brasil.

2. Xilazina (Sedomin): König S.A, Avellaneda/Buenos Aires, Argentina.

3. Acepromazina (Aprumazin): Syntec do Brasil Ltda., São Paulo/SP, Brasil.

No mínimo três pessoas foram necessárias para a realização do procedimento, sendo a primeira encarregada de operar o aparelho, a segunda encarregada de introduzir a sonda na uretra peniana e a terceira encarregada de auxiliar na instilação de solução e nas demais necessidades do procedimento.

Foi utilizado um vídeoendoscópio flexível¹ com comprimento de 300 cm e diâmetro de 9,8 mm. Um catéter de polipropileno estéril foi utilizado para guiar a entrada do endoscópio nas aberturas dos ductos ejaculatórios na região do colículo seminal.

Após acessar o lúmen glandular, um volume de 60 a 100 mL de solução de Ringer Lactato² era instilado de forma a preencher todo o interior da vesícula, e através de uma bomba de sucção a vácuo³, era realizada a aspiração do conteúdo.

As amostras eram acondicionadas em tubo falcon estéril e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia da FMVZ – UNESP – Botucatu – SP para realização de cultura bacteriana, seguida de antibiograma. Quando o exame era realizado na propriedade, as amostras eram refrigeradas à 5°C em caixa isotérmica Botuflex⁴, por um período máximo de 3 horas.

4.1.2.2. Cultura bacteriana e antibiograma

No Laboratório de Microbiologia da FMVZ – UNESP – Botucatu as amostras de sêmen e do lavado vesicular foram semeadas em placas de Petri contendo Ágar acrescido de sangue ovino desfibrinado a 5% (Ágar-sangue) e em placas de Petri contendo Ágar MacConkey. Após semeadura, as placas foram mantidas em estufa a 37°C em condições de aerobiose por um período de 72 horas. As leituras do crescimento microbiano foram realizadas com 24, 48 e 72 horas após incubação, sendo as colônias isoladas examinadas fenotipicamente mediante características macroscópicas das colônias (forma, tamanho, elevação, bordos, característica da superfície – lisa ou rugosa, estrutura, coloração e aspecto), microscópicas mediante características morfotintoriais (coloração de Gram) e testes bioquímicos.

1. PortoScope (PVS93M System): PortoScopeTM, Orlando/FL, Estados Unidos.

2. Solução de Ringer com Lactato: HalexIstar Indústria Farmacêutica, Goiânia/GO, Brasil.

3. AspiraMax: NS Indústria de Aparelhos Médicos Ltda., São Paulo/SP, Brasil.

4. Caixa Isotérmica Botuflex: Botupharma Ltda, Botucatu/SP, Brasil

Para identificação bioquímica de enterobactérias foi utilizado a prova de Citrato EPM e Mili conforme descrição de Krieg & Holt, (1994) e Trabulsi, (2005). Para identificação de *Staphylococcus spp.* e *Streptococcus spp.* foi utilizado a prova da Catalase e para identificação de *Pseudomonas spp.* utilizou-se a prova da Oxalase.

Após isolamento e identificação das colônias, procedeu-se o teste de sensibilidade bacteriana aos antibacterianos (antibiograma) pelo método semi-quantitativo de Kirby-Bauer. Para isso, a cultura pura foi diluída em solução salina estéril e 100 µL da suspensão foi plaqueada em Ágar Mueller-Hinton, por meio de uma alça de Drigalski. Os discos¹ impregnados com as drogas foram colocados em pontos equidistantes e a placa de Petri foi incubada a 37°C por 24 horas.

As drogas avaliadas foram: Amicacina, Amoxicilina associada ao Ácido Clavulânico, Carbenicilina, Ciprofloxacina, Enrofloxacina, Gentamicina, Levofloxacina, Norfloxacina, Imipenem, Ampicilina, Ceftiofur, Ceftriaxona e Ticarcilina associada ao Ácido Clavulânico.

A partir da avaliação do halo inibitório ao redor do disco a bactéria foi classificada em sensível, parcialmente sensível e resistente à droga em questão. Essa avaliação se baseou na Concentração Inibitória Mínima. A conversão do diâmetro em milímetros para a concentração inibitória mínima em µg/mL foi baseada em curvas lineares de regressão estabelecidas de acordo com normas da CLSI (CLSI - Manual Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013).

A escolha do antibiótico a ser utilizado no tratamento local foi realizada baseada no resultado da cultura bacteriana e antibiograma. A escolha seguiu o critério do tipo de bactéria isolada e sua sensibilidade ao fármaco. Quando mais de uma bactéria foi isolada, todas deveriam apresentar sensibilidade ao fármaco em avaliação. Além disso, levou-se em consideração a possibilidade de utilização da droga de forma local. Na ausência de um fármaco em comum entre as bactérias isoladas, associaram-se duas drogas sinérgicas para o tratamento local.

Devido ao fato de não haver na literatura a especificação da dose para a infusão intra-vesicular de antibióticos, foram utilizadas as doses indicadas para infusão intra-uterina, de acordo com Leblanc (2008).

4. Discos de antibióticos: Oxoid Limited, Basingstoke/Hampshire, Inglaterra.

4.2. Experimento II

4.2.1. Animais e local da pesquisa

Foram utilizados 5 garanhões com idades entre 7 e 19 anos (média de $12,4 \pm 2,13$), sendo dois da raça Quarto de Milha, um da raça Apaloosa, um da raça Crioula e um da raça Mangalarga Paulista. Dois animais foram atendidos no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da FMVZ – UNESP – Botucatu, os demais foram avaliados na propriedade de origem.

4.2.2. Coletas e processamento do sêmen antes do tratamento local

Uma vez estabelecido o diagnóstico de vesiculite seminal (conforme descrito no experimento I), procedeu-se o início das coletas de sêmen. Foram coletados dois ejaculados antes de iniciar o tratamento local para vesiculite seminal (Momento 0, M0) com intervalo de 48 horas entre elas, utilizando vagina artificial modelo Botucatu¹.

Uma parte do sêmen fresco foi mantido *in natura* (sem adição de diluentes). Essa amostra foi utilizada para mensuração do pH, osmolaridade, concentração espermática, reservada para contagem de Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL) e preparada para separação do plasma seminal com a finalidade de posterior dosagem de Óxido Nítrico.

Ainda com o sêmen *in natura* foram realizados esfregaços em lâminas de vidro para microscopia, que posteriormente foram coradas com o kit de corantes rápidos Panótico², para avaliação da porcentagem de leucócitos na amostra.

Em um eppendorf um volume de 500 µL do sêmen *in natura* foi diluído em 500 µL de Formol Salina a 10%, e esse material foi armazenado em geladeira a 5°C para posterior realização da análise de morfologia espermática em microscópio de contraste de interferência diferencial de fase (DIC)³.

1. Vagina Artificial: Botupharma Ltda., Botucatu/SP, Brasil

2. Panótico Rápido LB: Laborclin produtos para laboratório Ltda, Pinhais/PR, Brasil

3. Microscópio DIC – Leica DM 2500: Leica Microsystems, São Paulo/SP, Brasil

Um volume de 1 mL da amostra *in natura* de sêmen foi colocado em eppendorf estéril, que foi posteriormente armazenado em freezer a -18°C para futura realização da contagem de Unidade Formadora de Colônias (UFC/mL).

O sêmen *in natura* foi submetido à centrifugação a $600 \times g$ por 10 minutos para obtenção do plasma seminal. Esse plasma foi acondicionado em eppendorfs estéreis e mantido em freezer -18°C , para futura mensuração do teor de Óxido Nítrico.

A outra parte do sêmen fresco foi diluída a uma concentração de 50×10^6 espermatozoides/mL com o diluente Botusêmen¹ e a partir dessa amostra foram realizados as avaliações de cinética espermática e avaliação da integridade de membrana plasmática.

4.2.3. Tratamento local de vesiculite seminal

Após a última coleta de sêmen pré-tratamento, iniciou-se o tratamento local do garanhão com antimicrobiano de eleição.

Para o procedimento foi utilizado o mesmo equipamento endoscópico descrito no experimento I. Após acessar o lúmen da vesícula seminal, com auxílio do cateter de polipropileno, procedeu-se lavagens sucessivas (infusão seguida de aspiração) com um volume aproximado de 100 mL de solução de Ringer Lactato², até o líquido recuperado apresentar-se translúcido.

Após o término das lavagens, foi aspirado todo o conteúdo presente no lúmen glandular, seguido de infusão do antibiótico de eleição em um volume variando de 30 a 60 mL, na dependência da droga utilizada e sua concentração.

Esse tratamento foi realizado em ambas as vesículas seminais diariamente, por dez dias consecutivos.

1. Diluente Botusêmen: Botupharma Ltda, Botucatu/SP, Brasil

2. Solução de Ringer com Lactato: HalexIstar Indústria Farmacêutica, Goiânia/GO, Brasil.

4.2.4. Coletas e processamento do sêmen após o tratamento local

Uma semana após o término do tratamento foram iniciadas duas coletas de sêmen, com intervalo de 48 horas entre elas (Momento 1, M1) e um mês após o término do tratamento foram realizadas duas novas coletas, com intervalo de 48 horas entre elas (Momento 2, M2).

Essas amostras foram coletadas e processadas da mesma maneira do Momento 0 (coletas pré-tratamento), conforme descrito anteriormente no tópico 4.2.2.

4.2.5. Análise do sêmen fresco

As análises laboratoriais das amostras seminais foram conduzidas no Centro de Biotecnologia e Diagnóstico em Reprodução Animal (CERAN), pertencente ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Campus de Botucatu/SP. As análises nos momentos pré-tratamento (M0), uma semana pós-tratamento (M1) e um mês pós-tratamento (M2) foram realizadas da mesma forma.

4.2.5.1. Características físico-químicas

Após a obtenção do sêmen as características físico-químicas foram avaliadas quanto ao volume, coloração, pH, osmolaridade e concentração espermática.

O volume seminal foi estabelecido com o auxílio de uma proveta de 100 mL; a coloração foi determinada visualmente, sendo o sêmen classificado em normal quando apresentava-se branco ou branco-acizentado e alterado quando apresentava-se avermelhado ou amarelado; o pH foi mensurado em pHmetro (Analion PM 608, Analion[®], Ribeirão Preto/SP, Brasil); a osmolaridade foi determinada em osmômetro (PZL1000, PZL tecnologia em equipamentos, Londrina/PR, Brasil); a concentração espermática (mm³) foi determinada por meio de câmara hematocitométrica de Neubauer (Optik Labor[®], Lancing, Inglaterra), sob microscopia de contraste de fase¹, em aumento de 200 vezes.

1. Microscópio de contraste de fase – Jenamed 2 Zeiss: Carls Zeiss, Munique, Alemanha

4.2.5.2. Cinética espermática

O sêmen fresco diluído a uma concentração de 50×10^6 espermatozoides/mL foi avaliado quanto a cinética espermática pelo método computadorizado – CASA em relação aos seguintes parâmetros: porcentagens de espermatozoides com motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e de espermatozoides rápidos (RAP), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$) e velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$). A descrição do ajuste utilizado na análise está disposto em anexo na página 123.

4.2.5.3. Integridade de membrana plasmática

A análise da integridade de membrana plasmática foi realizada pela técnica de microscopia de epi-fluorescência¹, utilizando-se a associação das sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio (IP) segundo metodologia de Harrison e Vickers (1990). Nessa análise 100 células foram contadas, sendo os espermatozoides corados integralmente em verdes considerados íntegros e os espermatozoides corados em vermelho ou em verde e vermelho, considerados lesados. A descrição da preparação das soluções bases está disposta em anexo na página 124.

4.2.5.4. Morfologia espermática

A análise de morfologia espermática foi realizada em microscópio de interferência de contraste diferencial de fase (DIC)². Para isso uma preparação úmida mediante diluição de 500 μL do sêmen em 500 μL de formol salina a 10% (1:1) foi realizada e cem células foram avaliadas quanto à morfologia de cabeça e cauda, resultando em uma porcentagem dos defeitos encontrados.

1. Microscópio de epifluorescência- Leica DM LB: Leica Microsystems, São Paulo/SP, Brasil

2. Microscópio DIC – Leica DM 2500: Leica Microsystems, São Paulo/SP, Brasil

4.2.5.5. Porcentagem de leucócitos

A porcentagem de leucócitos foi acessada mediante avaliação em microscopia óptica de luz¹ de esfregaços de sêmen corados com kit de corantes hematológicos (Panótico Rápido²). Com células foram avaliadas entre leucócitos e espermatozoides, gerando uma porcentagem.

4.2.5.6. Dosagem de óxido nítrico (NO)

As amostras de plasma seminal foram descongeladas em temperatura ambiente para realização das dosagens de Óxido Nítrico (NO) segundo metodologia descrita por Bortoluzo (2004).

As concentrações de nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-) foram determinadas pelo método de reação colorimétrica de Griess em um espectrofotômetro (Multiskan EX Primary EIA V 2.1-0) com absorvância de cor em 540 nm, para estimar a concentração de NO total, no Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense.

As reações calorimétricas permitiram estimar o total de metabólitos (NO_2^- e NO_3^-) na amostra. Dessa forma, com a soma do total de nitrito e nitrato na amostra determinou-se o valor de óxido nítrico total (NO).

4.2.5.7. Contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL)

Para realizar a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) das amostras do sêmen *in natura*, uma alíquota de 0,1 mL da amostra seminal foi diluída em 9,9 ml de solução salina. Uma alíquota de 0,1 ml desta amostra foi plaqueada em meio Ágar Muller-Hinton. As placas semeadas foram incubadas e as colônias bacterianas contadas após um período de 24 horas. De acordo com a diluição realizada, o total de colônias identificadas representa 10^3 UFC/mL.

1. Microscópio de luz – Jenamed 2 Zeiss: Carls Zeiss, Munique, Alemanha

2. Panótico Rápido LB: Laborclin produtos para laboratório Ltda, Pinhais/PR, Brasil

4.3. Experimento III

4.3.1. Animais e local da pesquisa

Foram utilizados os mesmos gananhões descritos no experimento II.

4.3.2. Coletas e processamento do sêmen antes do tratamento local

Uma vez estabelecido o diagnóstico de vesiculite seminal (conforme descrito no experimento I), procedeu-se o início das coletas de sêmen. Foram coletados dois ejaculados antes de iniciar o tratamento local para vesiculite seminal (Momento 0, M0) com intervalo de 48 horas entre elas, utilizando vagina artificial modelo Botucatu¹.

O sêmen foi diluído com o diluente Botusêmen² até a concentração de 50×10^6 espermatozoides/mL. Metade da amostra foi acondicionada a 5° C e a outra metade a 15° C, em caixas isotérmicas de refrigeração Botuflex³ por 24 horas.

4.3.3. Tratamento local de vesiculite seminal

O tratamento local de vesiculite seminal foi realizado conforme descrito no experimento II.

4.3.4. Coletas e processamento do sêmen após o tratamento local

Uma semana após o término do tratamento foram iniciadas duas coletas de sêmen, com intervalo de 48 horas entre elas (Momento 1, M1) e um mês após o término do tratamento foram realizadas duas novas coletas, com intervalo de 48 horas entre elas (Momento 2, M2).

Essas amostras foram coletadas e processadas da mesma maneira do Momento 0 (coletas pré-tratamento) conforme descrição no item 4.3.2.

1. Vagina Artificial: Botupharma Ltda., Botucatu/SP, Brasil.

2. Diluente Botusêmen: Botupharma Ltda, Botucatu/SP, Brasil

3. Caixa isotérmica Botuflex: Botupharma Ltda, Botucatu/SP, Brasil

4.3.5. Análise do sêmen refrigerado

As amostras de sêmen refrigeradas a 5°C e a 15°C foram avaliadas após 24 horas de armazenamento. Estas foram homogeneizadas e aquecidas a 37°C em banho-maria seco¹ durante cinco minutos, previamente à análise de cinética espermática.

4.3.5.1. Cinética espermática

Após aquecido a 37° C, o sêmen refrigerado foi avaliado em relação à cinética espermática seguindo mesma metodologia descrita no tópico 4.2.5.2.

4.3.5.2. Integridade de membrana plasmática

O sêmen refrigerado foi avaliado em relação à integridade de membrana plasmática seguindo mesma metodologia descrita no tópico 4.2.5.3.

4.4. Experimento IV

4.4.1. Animais e local da pesquisa

Foram utilizados os mesmos garanhões descritos no experimento II.

4.4.2. Coletas e processamento do sêmen antes do tratamento local

Uma vez estabelecido o diagnóstico de vesiculite seminal (conforme descrito no experimento I), procedeu-se o início das coletas de sêmen. Foram coletados dois ejaculados antes de iniciar o tratamento local para vesiculite seminal (Momento 0, M0) com intervalo de 48 horas entre elas, utilizando vagina artificial modelo Botucatu².

1. Banho-maria seco – Kacil BT 02: Kacil Indústria e Comércio Ltda., Recife/PE, Brasil

2. Vagina Artificial: Botupharma Ltda., Botucatu/SP, Brasil.

O sêmen obtido foi diluído na proporção de 1:1 (v/v) com o diluente Botusêmen¹ e posteriormente centrifugada a 600 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” ressuspendido com o diluente Botucrio² na concentração de 200×10^6 espermatozóides/mL.

Após o envase em palhetas de 0,5 mL, as mesmas foram levadas à geladeira de temperatura controlada (Minitub³) e permaneceram à 5°C por 20 minutos.

Posteriormente, foram acondicionadas em caixa isotérmica com capacidade de 45 litros, preenchida com nitrogênio líquido (N₂) até a marca de 3,5 cm de altura. As palhetas ficaram dispostas horizontalmente a 6,0 cm do nível do nitrogênio líquido por 20 minutos e após este período foram imersas (PAPA *et al.*, 2008).

4.4.3. Tratamento local de vesiculite seminal

O tratamento local de vesiculite seminal foi realizado conforme descrito no experimento II.

4.4.4. Coletas e processamento do sêmen após o tratamento local

Uma semana após o término do tratamento foram iniciadas duas coletas de sêmen, com intervalo de 48 horas entre elas (Momento 1, M1) e um mês após o término do tratamento foram realizadas duas novas coletas, com intervalo de 48 horas entre elas (Momento 2, M2).

Essas amostras foram coletadas e processadas da mesma maneira do Momento 0 (coletas pré-tratamento) conforme descrição no item 4.4.2.

4.4.5. Análise do sêmen congelado

Para a análise do sêmen congelado as amostras foram descongeladas em banho-maria⁴ a 46°C durante 20 segundos.

1. Diluente Botusêmen: Botupharma Ltda, Botucatu/SP, Brasil

2. Diluente Botucrio: Botupharma Ltda, Botucatu/SP, Brasil

3. Geladeira Minitub: Minitube do Brasil, Porto Alegre/RS, Brasil

4. Banho-maria – Tecnal TE 0501: Tecnal equipamentos para laboratório, Piracicaba/SP, Brasil

4.4.5.1. Cinética espermática

Uma vez descongelado o sêmen foi avaliado em relação à cinética espermática seguindo mesma metodologia descrita no tópico 4.2.5.2.

4.4.5.2. Integridade de membrana plasmática

O sêmen foi avaliado em relação integridade de membrana plasmática seguindo mesma metodologia descrita no tópico 4.2.5.3.

4.4.5.3. Avaliação morfofuncional por citometria de fluxo

O sêmen congelado foi submetido às análises de citometria de fluxo. Utilizou-se o equipamento BD LSR II (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) equipado com lasers: azul 488-nm, 100 mW e vermelho 640-nm, 40 mW. Os dados foram armazenados e avaliados por programa do mesmo fabricante BD FACSDiva™ software v6.1.

As análises realizadas foram: índice de peroxidação lipídica das membranas e teor de espécies reativas de oxigênio (ROS).

Foram identificadas 2 populações celulares de acordo com o gráfico FSC x SSC, sendo uma população formada por espermatozoides e leucócitos (população identificada como TOTAL) e outra contendo espermatozoides e raros leucócitos (população identificada como SPTZ). Não foi possível separar totalmente os leucócitos dos espermatozoides devido à falta de um marcador específico para leucócitos de equinos.

Índice de peroxidação lipídica

Este ensaio foi realizado seguindo metodologia de Guasti *et al.*, 2012, utilizando a probe C11-BODYPY (D-3861; Molecular Probes). Assim, uma amostra do sêmen foi diluída em TALP-PVA a uma concentração de 5×10^6 espermatozoides/mL com um volume final de 500 μ L. Estas amostras foram coradas com 0,5 μ L de C11BODIPY581/591 (1mg/mL), 5 μ L de IP (50 μ g/mL), 5 μ L de H342 (100 μ g/mL) e incubadas por 30 minutos à 37° C. Após a incubação, foram realizadas 2 lavagens consecutivas por centrifugação a 300 x g por 5 minutos com TALP-PVA e o pellet ressuspendido em 300 μ L de TALP-PVA. O tempo de avaliação das amostras no

citômetro de fluxo foi de cinco minutos e os dados gerados foram arquivados para posterior análise.

Teor de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Para esta análise foi utilizada a sonda 5-(-6)-carboxi-2,7-diclorodihidrofluoresceindiacetato (carboxi-H₂DCFDA; Molecular Probes) de acordo com Guthrie e Welch (2007). Uma alíquota de 500 µL de sêmen foi diluída em TALP na concentração de 5×10^6 espermatozoides/mL e em seguida adicionados 0,5µL da sonda DCFDA (concentração final de 20 µM), 5µL de IP (50µg/mL) e 5µL de H342 (100µg/mL). A solução foi incubada por 60 minutos em temperatura ambiente ao abrigo de luz. O tempo de avaliação das amostras no citômetro de fluxo foi de cinco minutos e os dados gerados foram arquivados para posterior análise.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana.”

Carl Gustav Jung

Análise Estatística

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos experimentos II, III e IV foram avaliados através do software GraphPadInStat 5.0 (San Diego, CA, USA) e expressos na forma de média e erro padrão. Os dados laboratoriais foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov para verificação de normalidade ou homocedasticidade. Para as médias obtidas que apresentaram distribuição normal foi utilizado a análise de medidas repetidas (Two-Way ANOVA) e teste “T” de Student, considerando-se os diferentes grupos como tratamento e o efeito de ganhão/ejaculado como blocos. Para os resultados laboratoriais que não apresentaram distribuição normal e/ou variâncias iguais (amostras independentes) foi aplicado o teste não paramétrico de Dunn. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ e tendências quando $0,05 < p \leq 0,1$.

Para avaliação da associação entre as variáveis laboratoriais do experimento II foi utilizado o teste de correlação Pearson (Proc Corr®version 9.1.3, SASInstitute Inc., Cary, NC, USA). Os resultados gerados foram apresentados na forma de coeficiente de correlação e diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

“Só uma vontade séria, um esforço persistente podem conduzir-te à meta. Pois a sorte, essa jamais constitui um mero acaso; e a vida, à tua frente, só desenvolve o que lhe deste - além disso, nada mais.”

Goethe

Resultados

6. RESULTADOS

6.1. Experimento I – Avaliação de fatores predisponentes e principais bactérias envolvidas na etiopatogenia de vesiculite seminal em garanhões

Animais

Durante o processo de triagem, nove garanhões foram localizados com histórico compatível com vesiculite seminal, por apresentarem sangue ou pus no ejaculado. Os dados apresentados na Tabela 1 demonstram o número de animais avaliados, os diagnósticos definitivos (estabelecidos por exame reprodutivo e endoscopia) e a coloração do sêmen no momento da primeira avaliação.

TABELA 1 - Número de animais triados, diagnóstico definitivo da enfermidade e a coloração do sêmen no momento do exame reprodutivo.

Nº ANIMAIS TRIADOS	DIAGNÓSTICO	COLORAÇÃO DO SÊMEN
6	Vesiculite Seminal	Amarelada
2	Fístula Uretral	Avermelhada
1	Lesão no Processo Uretral	Avermelhada

As informações contidas na Tabela 2 dizem respeito às idades (em anos), raças, o tempo de evolução da doença até o momento do exame reprodutivo de triagem (em meses) e o manejo reprodutivo dos garanhões selecionados para o estudo. A idade variou de sete a dezenove anos, sendo a idade média e erro-padrão ($X \pm EP$) de $11,8 \pm 1,83$ anos. O tempo de evolução variou de um mês e meio a trinta e seis meses, sendo o tempo de evolução médio e erro-padrão ($X \pm EP$) de $19,4 \pm 9,90$ meses. Em relação ao manejo reprodutivo, dos seis animais, quatro (66,7%) eram utilizados em montas naturais, além da coleta de sêmen com vagina artificial para programas de inseminação artificial.

TABELA 2 - Idade (em anos), raça, tempo de evolução da enfermidade (em meses) e o manejo reprodutivo dos animais com vesiculite seminal.

GARANHÃO	IDADE (anos)	RAÇA	EVOLUÇÃO (meses)	MANEJO REPRODUTIVO
1	7	Quarto de Milha	4	Coleta de sêmen / Monta Natural
2	9	Apaloosa	1,5	Coleta de sêmen
3	12	Crioulo	6	Coleta de sêmen / Monta Natural
4	15	Quarto de Milha	24	Coleta de sêmen / Monta Natural
5	19	Mangalarga Paulista	3	Coleta de sêmen / Monta Natural
6	9	Quarto de Milha	60	Coleta de sêmen

Os dados da Tabela 3 demonstram as características seminais de coloração e porcentagem de leucócitos, detectados durante o exame reprodutivo de triagem dos seis animais portadores de vesiculite seminal, cuja média e erro-padrão ($X \pm EP$) foram de $36,8 \pm 2,36$, a ocorrência de distúrbio ejaculatório e histórico de orquite, periorquite e/ou epididimite durante o tempo de evolução da doença. A média e erro-padrão ($X \pm EP$) da porcentagem de leucócitos dos cinco animais utilizados no presente estudo foram de $35,2 \pm 2,67$. O distúrbio ejaculatório observado em quatro dos seis animais (66,7%) foi a falha da ejaculação. Em relação ao histórico de orquite, periorquite e/ou epididimite, três dos seis animais (50%) apresentaram algum grau de aumento de volume e temperatura da região escrotal e/ou epidídimo durante a evolução da doença.

TABELA 3 - Médias e erros-padrão ($X \pm EP$) da porcentagem de leucócitos, ocorrência de distúrbio ejaculatório e histórico de orquite, periorquite e/ou epididimite.

GARANHÃO	COLORAÇÃO SÊMEN	LEUCO (%)	DISTÚRPIO EJACULATÓRIO	HISTÓRICO (orquite/periorquite/epididimite)
1	Amarelada	$32,5 \pm 2,5$	Presente	Ausente
2	Amarelada	$33 \pm 1,0$	Ausente	Ausente Presente
3	Amarelada	$39,5 \pm 4,5$	Presente	(orquite e periorquite) Presente
4	Amarelada	$43 \pm 8,0$	Presente	(epididimite)
5	Amarelada	$28 \pm 4,0$	Presente	Ausente Presente
6	Amarelada	$45 \pm 6,0$	Ausente	(orquite e epididimite)

Na Tabela 4 estão contidas as informações sobre a ocorrência de tratamento com antibiótico de forma sistêmica e/ou local, anteriormente ao presente estudo. Dos seis

animais, cinco (83,3%) foram submetidos a tratamento prévio com antibióticos, sendo três animais (50%) submetidos a tratamento sistêmico e local e dois animais (23,3%) submetidos apenas ao tratamento de forma sistêmica.

TABELA 4 - Histórico de tratamento com antibiótico antes do presente estudo e a forma de tratamento (sistêmico e/ou local).

GARANHÃO	TRATAMENTO PRÉVIO	FORMA DE TRATAMENTO
1	Sim	Sistêmico / Local
2	Não	-
3	Sim	Sistêmico
4	Sim	Sistêmico / Local
5	Sim	Sistêmico
6	Sim	Sistêmico / Local

Exame microbiológico

Os resultados das culturas bacterianas dos lavados das vesículas seminais e do sêmen, coletados em duplicata, estão descritos na Tabela 5 e Figura 5A.

O microorganismo mais prevalente nos lavados das vesículas seminais foi a *Pseudomonas aeruginosa*, sendo isolada em oito de doze lavados (8/12, 66,7%), seguido pela *Klebsiella pneumoniae* (4/10, 33,3%), *Streptococcus β-hemolítico* (3/12, 25%), *Escherichia coli* (2/12, 16,7%), *Pseudomonas fluorescens* (1/12, 8,3%) e *Klebsiella oxytoca* (1/12, 8,3%). No sêmen o microorganismo mais prevalente foi também a *Pseudomonas aeruginosa* (5/12, 41,7%) e *Streptococcus β-hemolítico* (5/12, 41,7%), seguidos da *Escherichia coli* (4/12, 33,3%), *Streptococcus α-hemolítico* (3/12, 25%), *Klebsiella pneumoniae* (3/12, 25%), *Enterobacter aerogenes* (2/12, 16,7%), *Pseudomonas fluorescens* (1/12, 8,3%), *Klebsiella oxytoca* (1/12, 8,3%), *Alcaligenes faecalis* (1/12, 8,3%) e *Citrobacter diversus* (1/12, 8,3%).

Em 66,7% dos casos, o microorganismo identificado no lavado da vesícula seminal também foi identificado no sêmen.

Uma média de 2,25 tipos diferentes de microorganismos foi encontrada para cada amostra seminal quando comparada a uma média de 1,58 microorganismos isolados em cada lavado da vesícula seminal ($p < 0,05$).

TABELA 5 - Microorganismos isolados da vesícula seminal e do sêmen de garanhões com vesiculite seminal.

GARANHÃO	VESÍCULA SEMINAL	SÊMEN
1	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. b-hemolítico</i>	<i>E. aerogenes</i> , <i>S. b-hemolítico</i> , <i>S. a-hemolítico</i> , <i>P. aeruginosa</i>
1	<i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i> , <i>S. a-hemolítico</i>
2	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E.coli</i> , <i>S. b-hemolítico</i>
2	<i>K. oxytoca</i> , <i>P. aeruginosa</i> <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. b-hemolítico</i> , <i>E.</i> <i>coli</i>	<i>S. b-hemolítico</i>
3		<i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>P.fluorescens</i>
3	<i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i>	<i>E. aerogenes</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i>
4	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i>
4	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. b-hemolítico</i> <i>S. b-hemolítico</i> , <i>S. a-hemolítico</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i>
5	<i>S. b-hemolítico</i> , <i>P. fluorensens</i>	
5	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. faecalis</i>
6	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i> , <i>C. diversus</i>
6	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. aerogenes</i>

A Tabela 6 descreve as drogas de eleição para o tratamento local de vesiculite seminal dos animais estudados, bem como as doses utilizadas. As drogas utilizadas foram Amicacina, Ticarcilina associada ao Ácido Clavulânico, Ceftriaxona, Ceftiofur, Ciprofloxacina e Ceftriaxona (Figura 5B).

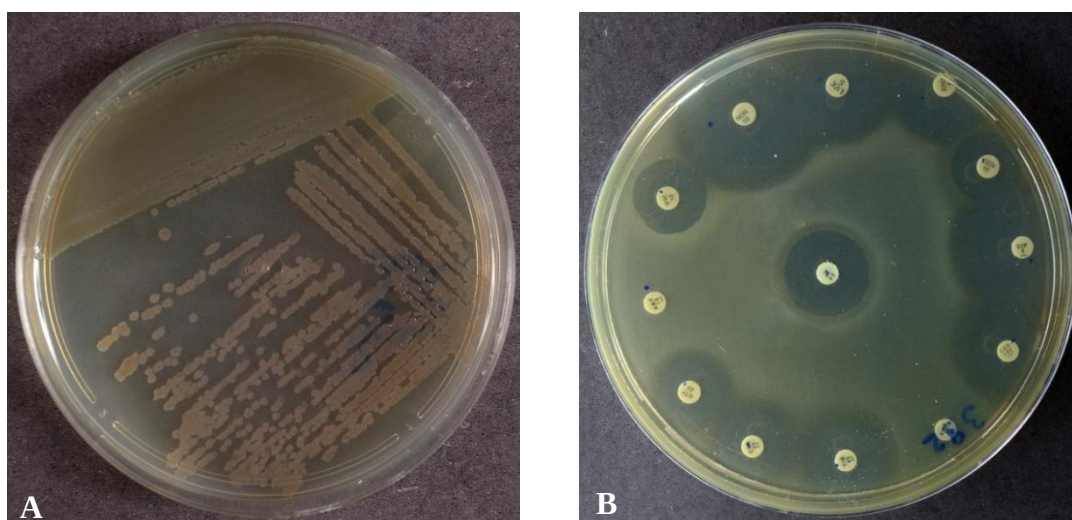


FIGURA 5. A) Cultura bacteriana de *Pseudomonas aeruginosa*. B) Antibiograma caracterizado pelos halos de inibição ao redor dos discos impregnados com os antibióticos avaliados.

TABELA 6 - Drogas de eleição para o tratamento local de vesiculite seminal e a dose por infusão, para cada caso avaliado.

GARANHÃO	DROGAS UTILIZADAS
1	Amicacina (1g) + Ticarcilina & Ác.Clavulânico (3g)
2	Ceftriaxona (1g)
3	Ceftiofur (1g)
4	Ciprofloxacina (200mg)
5	Amicacina (1g) + Ceftriaxona (1g)

Observações pós-tratamento

Após uma semana do término do tratamento as amostras seminais de quatro dos cinco garanhões avaliados apresentaram coloração branco-acizentada, o valor médio e erro-padrão ($X \pm EP$) da porcentagem de leucócitos no sêmen foram de $15,1 \pm 2,54$ e o sinal clínico de dificuldade na ejaculação se manteve nos quatro dos cinco animais avaliados.

Após um mês do término do tratamento as amostras seminais de quatro dos cinco animais voltaram a apresentar-se amareladas, valor médio e erro-padrão ($X \pm EP$) da porcentagem de leucócitos no sêmen foram de $36,1 \pm 4,04$ e o sinal clínico de dificuldade na ejaculação se manteve nos quatro dos cinco animais avaliados.

Após uma semana do término do tratamento local o garanhão 3 apresentou aumento do tamanho e temperatura do testículo esquerdo, diagnosticado como orquite, que foi controlada com uso de antiinflamatório não esteroideal, antibiótico de forma sistêmica por um período de 10 dias (o mesmo utilizado previamente de forma local) e duchas frias três vezes ao dia. O garanhão 4 apresentou aumento do tamanho e temperatura do epidídimo esquerdo após 15 dias do término do tratamento, diagnosticado como epididimite, que foi controlada com uso de antiinflamatório não esteroideal, antibiótico de forma sistêmica por um período de 10 dias (o mesmo utilizado previamente de forma local) e duchas frias três vezes ao dia.

Ambos os garanhões já haviam manifestado essas alterações, durante o período de evolução da enfermidade. O garanhão 2, que nunca havia apresentado alteração em bolsa escrotal, testículo ou epidídimo, apresentou após 40 dias do término do tratamento, aumento do tamanho e temperatura do testículo direito, diagnosticado como orquite, que foi controlada com uso de antiinflamatório não esteroideal, antibiótico de

forma sistêmica por um período de 10 dias (o mesmo utilizado previamente de forma local) e duchas frias três vezes ao dia.

6.2. Experimento II - Efeito do tratamento local de vesiculite seminal sobre a qualidade do sêmen equino a fresco

A partir dos resultados obtidos no experimento II, foram calculadas as médias e erros-padrão das características seminais e parâmetros dos espermatozoides (Tabelas 7, 8, 9 e 10) do sêmen a fresco. Os momentos de avaliação foram: antes do tratamento local para vesiculite seminal (Momento 0 – M0), após uma semana do término do tratamento (Momento 1 – M1) e após um mês do término do tratamento (Momento 2 – M2). As amostras seminais dos cinco animais foram sempre coletadas em duplicata (n=10).

A Tabela 7 descreve as características seminais de concentração espermática, volume, número de espermatozoides totais, pH e osmolaridade. O valor médio do volume do ejaculado no M1 foi menor do que no M0 e M2, enquanto que o valor médio da concentração espermática no M1 foi maior em comparação ao M0 e M2 ($p < 0,05$). Não houve diferença entre M0 e M2 quanto aos volumes dos ejaculados e concentrações espermáticas.

TABELA 7 - Médias e erros-padrão ($X \pm EP$) da concentração espermática (mm^3), volume (mL), pH e osmolaridade (mOsm) do sêmen fresco de garanhões pré-tratamento (M0), uma semana pós-tratamento (M1) e um mês pós-tratamento (M2).

MOMENTOS (n=10)	VOL (mL)	CONCENT ($10^3/\text{mm}^3$)	SPTZs TOTAIS (10^6)	pH	OSMOL (mOsm)
M0	72,5 $\pm$ 13,02 ^a	78,9 $\pm$ 15,28 ^a	5556 $\pm$ 1510,48	7,5 $\pm$ 0,06	296,5 $\pm$ 4,27
M1	42,5 $\pm$ 10,88 ^b	186 $\pm$ 28,58 ^b	6865 $\pm$ 1717,93	7,4 $\pm$ 0,06	299,3 $\pm$ 7,55
M2	63,4 $\pm$ 6,40 ^a	98 $\pm$ 18,78 ^a	6410 $\pm$ 1628,15	7,4 $\pm$ 0,05	295,9 $\pm$ 3,51

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0,05$).

A Tabela 8 descreve os parâmetros de cinética espermática e integridade de membrana avaliados a cada momento M0, M1 e M2. Os valores médios de MT, MP, RAP e IM foram superiores no M1 em comparação aos demais momentos ($p < 0,05$). Entretanto, não houve diferença significativa entre os parâmetros de cinética espermática entre M0 e M2.

TABELA 8 - Médias e erros-padrão ($X \pm EP$) da MT (%), MP (%), VAP ($\mu\text{m/s}$), VSL ($\mu\text{m/s}$), VCL ($\mu\text{m/s}$), RAP (%) e IM (%) de espermatozoides do sêmen fresco de garanhões em três momentos de avaliação (M0, M1 e M2).

MOMENTOS (n=10)	MT (%)	MP (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	RAP (%)	IM (%)
M0	46,5 $\pm$ 5,13 ^a	19,3 $\pm$ 3,86 ^a	118,6 $\pm$ 6,40	86,7 $\pm$ 4,13	220,4 $\pm$ 15,72	22,2 $\pm$ 1,82 ^a	47,5 $\pm$ 4,65 ^a
M1	75,1 $\pm$ 3,42 ^b	33,4 $\pm$ 2,39 ^b	119,6 $\pm$ 4,72	91,3 $\pm$ 1,61	218,3 $\pm$ 5,38	52,2 $\pm$ 5,65 ^b	62,9 $\pm$ 5,41 ^b
M2	42,8 $\pm$ 5,28 ^a	16,5 $\pm$ 2,40 ^a	110,3 $\pm$ 10,74	82,1 $\pm$ 4,17	183,0 $\pm$ 16,17	22,1 $\pm$ 2,62 ^a	39,1 $\pm$ 4,32 ^a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0,05$).

Na Tabela 9 estão demonstrados os valores dos defeitos morfológicos de cabeça e cauda dos espermatozoides em cada um dos momentos avaliados: M0, M1 e M2. O M1 apresentou menor porcentagem de defeitos morfológicos de cauda em comparação ao M0 e M2 ($p < 0,05$). A porcentagem dos defeitos morfológicos de cauda não diferiu entre M0 e M2.

TABELA 9 - Médias e erros-padrão ($X \pm EP$) dos defeitos morfológicos de cabeça (%) e defeitos morfológicos de cauda (%) de espermatozoides do sêmen fresco de garanhões em três momentos de avaliação (M0, M1 e M2).

MOMENTOS (n=10)	*DEFEITOS DE CABEÇA (%)	**DEFEITOS DE CAUDA (%)
M0	2,3 $\pm$ 0,37	32,1 $\pm$ 1,97 ^a
M1	2,1 $\pm$ 10,46	21,1 $\pm$ 1,22 ^b
M2	2,8 $\pm$ 0,33	28,5 $\pm$ 2,69 ^a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0,05$).

*Isolada normal, isolada anormal, contorno anormal, subdesenvolvida, piriforme e estreita na base. **Gota citoplasmática distal, gota citoplasmática proximal, cauda dobrada, cauda enrolada e cauda fortemente dobrada/enrolada.

Na Tabela 10 estão descritos a porcentagem de leucócitos e a contagem de UFC por mililitro das amostras seminais, bem como o teor de óxido nítrico no plasma seminal, nos M0, M1 e M2. O M1 apresentou menor porcentagem de leucócitos no sêmen em relação ao M0 e M2 ($p < 0,05$), entretanto, esses últimos momentos não variaram entre si.

A contagem de UFC no sêmen foi menor em M1 em comparação ao M0 ($p < 0,05$), porém esse parâmetro não diferiu entre M0 e M2 e entre M1 e M2. O teor de

óxido nítrico no plasma seminal foi inferior no M1 em comparação ao M0 ($p < 0,05$), porém não variou em relação ao M2 e entre M0 e M2.

TABELA 10 - Médias e erros-padrão ($\bar{X} \pm EP$) da porcentagem de leucócitos, número de UFC/mL e teor de NO no sêmen fresco e plasma seminal de garanhões em três momentos de avaliação (M0, M1 e M2).

MOMENTOS (n=10)	LEUCÓCITOS (%)	UFC (10³/mL)	ÓXIDO NÍTRICO (nMol)
M0	35,2±2,36 ^a	119980±19528,0 ^a	0,645±0,172 ^a
M1	15,1±2,55 ^b	5375±2453,7 ^b	0,117±0,023 ^b
M2	36,1±4,04 ^a	65850±19701,0 ^{ab}	0,364±0,110 ^{ab}

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0,05$).

Na Tabela 11 estão descritos os coeficientes de correlação e o valor de p , entre as variáveis analisadas. A MT obteve correlação negativa com a porcentagem de leucócitos, a contagem de UFC, teor de óxido nítrico e porcentagem de defeitos morfológicos de cauda. A MP obteve correlação negativa com a porcentagem de leucócitos e a contagem de UFC. A IM obteve correlação negativa com a porcentagem de leucócitos. A RAP obteve correlação negativa com a porcentagem de leucócitos. A contagem de UFC obteve correlação positiva com porcentagem de leucócitos e porcentagem de defeitos de cauda.

TABELA 11 – Análises de correlação e valor de p das variáveis MT (%), MP (%), IM (%), RAP (%) e contagem de UFC (10³/mL) em relação a porcentagem de leucócitos (%), contagem de UFC (10³/mL), teor de NO (nMol) e defeitos de cauda (%).

VARIÁVEIS	LEUCO	UFC	NO	DEF CAUDA
MT	-0,73 $p < 0,0001$	-0,65 $p < 0,0001$	-0,49 $p < 0,005$	-0,62 $p < 0,0002$
MP	-0,66 $p < 0,0001$	-0,60 $p < 0,0004$	-	-
IM	-0,61 $p < 0,0003$	-	-	-
RAP	-0,8 $p < 0,0001$	-	-	-
UFC	0,61 $p < 0,0003$	-	-	0,63 $p < 0,0001$

6.3. Experimento III - Impacto da vesiculite seminal e efeito do tratamento local sobre a qualidade do sêmen equino refrigerado

Na Tabela 12 estão contidos os resultados de cinética espermática e integridade de membrana plasmática do sêmen a fresco e refrigerado a 5°C e a 15°C por 24 horas, no momento pré-tratamento (M0), no intuito de estabelecer qual a melhor temperatura de armazenagem para o sêmen de animais com vesiculite seminal.

Os resultados demonstraram que os parâmetros MT, MP, VSL, RAP e IM foram superiores no sêmen a fresco em comparação ao sêmen refrigerado, tanto a 5°C quanto a 15°C ($p < 0,05$). Entretanto, esses parâmetros não diferiram entre 5°C e 15°C após 24 horas de refrigeração. O VAP foi superior no sêmen a fresco em comparação a temperatura de 5°C após 24 horas de refrigeração ($p < 0,05$), porém não diferiu em relação à temperatura de 15°C após 24 horas de refrigeração, do mesmo modo que não houve diferença significativa desse parâmetro entre ambas as temperaturas de refrigeração. Em relação ao VCL, o sêmen a fresco apresentou superioridade em relação ao sêmen refrigerado por 24 horas a 15°C ($p < 0,05$), mas não foi diferente em relação ao sêmen refrigerado por 24 horas a 5°C e entre as duas temperaturas de refrigeração.

TABELA 12 - Médias e erros-padrão ($X \pm EP$) da MT (%), MP (%), VAP ($\mu\text{m/s}$), VSL ($\mu\text{m/s}$), VCL ($\mu\text{m/s}$), RAP (%) e IM (%) de espermatozoides do sêmen equino fresco, refrigerado a 5°C e a 15°C por 24 horas no momento pré-tratamento (M0).

MOMENTOS SÊMEN (n=10)		MT (%)	MP (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	RAP (%)	IM (%)
M0	Fresco	46,5 $\pm$ 5,13 ^a	19,3 $\pm$ 3,86 ^a	118,6 $\pm$ 6,40 ^a	86,70 $\pm$ 4,13 ^a	220,4 $\pm$ 15,72 ^a	22,2 $\pm$ 1,82 ^a	47,5 $\pm$ 4,65 ^a
	5°C							
M0	(24h)	25,5 $\pm$ 3,74 ^b	9,0 $\pm$ 2,12 ^b	93,3 $\pm$ 8,57 ^b	65,0 $\pm$ 3,43 ^b	179,9 $\pm$ 14,52 ^{ab}	13,4 $\pm$ 2,03 ^b	31,7 $\pm$ 3,56 ^b
	15°C							
M0	(24h)	25,3 $\pm$ 3,99 ^b	6,9 $\pm$ 1,70 ^b	97,3 $\pm$ 8,65 ^{ab}	67,7 $\pm$ 4,36 ^b	173,9 $\pm$ 17,37 ^b	12,4 $\pm$ 2,27 ^b	32,8 $\pm$ 3,97 ^b

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0,05$).

A Tabela 13 apresenta os dados de cinética espermática e integridade de membrana plasmática do sêmen equino refrigerado a 5°C por 24 horas nos momentos pré-tratamento (M0), uma semana após o término do tratamento (M1) e um mês após o término do tratamento (M2).

O resultado obtido demonstra que os parâmetros de MT, MP, RAP e IM foram superiores no sêmen equino refrigerado a 5°C por 24 horas no M1 em comparação ao M0 e M2 ($p<0,05$). Entretanto, esses parâmetros não diferiram entre M0 e M2 após 24 horas de refrigeração a 5°C. O VSL foi superior em M1 e M2 em comparação ao M0 ($p<0,05$), porém não diferiu entre M1 e M2.

TABELA 13 - Médias e erros-padrão ($X \pm EP$) da MT (%), MP (%), VAP ($\mu\text{m/s}$), VSL ($\mu\text{m/s}$), VCL ($\mu\text{m/s}$), RAP (%) e IM (%) de espermatozoides do sêmen refrigerado a 5°C por 24 horas de ganhões em três momentos de avaliação (M0, M1 e M2).

MOMENTOS (n=10)	MT (%)	MP (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	RAP (%)	IM (%)
M0	25,5 $\pm$ 3,74 ^a	9,0 $\pm$ 2,12 ^a	93,3 $\pm$ 8,57	65,0 $\pm$ 3,43 ^a	179,9 $\pm$ 14,52	13,4 $\pm$ 2,03 ^a	31,7 $\pm$ 3,56 ^a
M1	38,2 $\pm$ 6,59 ^b	15,2 $\pm$ 2,95 ^b	105,8 $\pm$ 5,11	76,5 $\pm$ 3,67 ^b	194,2 $\pm$ 11,02	20,5 $\pm$ 3,71 ^b	41,1 $\pm$ 4,47 ^b
M2	23,4 $\pm$ 4,01 ^a	9,5 $\pm$ 2,06 ^a	101,7 $\pm$ 4,90	78,6 $\pm$ 3,98 ^b	174,1 $\pm$ 10,56	11,9 $\pm$ 2,83 ^a	31,7 $\pm$ 2,90 ^a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0,05$).

A Tabela 14 compara os dados de cinética espermática e integridade de membrana plasmática do sêmen equino refrigerado a 5°C e a 15°C por 24 horas, nos momentos pré-tratamento (M0), uma semana após o término do tratamento (M1) e um mês após o término do tratamento (M2).

Os resultados demonstram que a MT, MP, VAP, VCL, VSL, RAP e IM não diferiram entre 5°C e 15°C após 24 horas de refrigeração em nenhum dos momentos avaliados (M0, M1 e M2). Entretanto em ambas as temperaturas os valores de MT e RAP foram superiores no M1 em relação ao M0 ($p<0,05$). A IM do sêmen refrigerado a 15°C por 24 horas foi superior em M1 em relação ao M0 ($p<0,05$), mas não diferiu entre M1 e M2 e entre M0 e M2.

TABELA 14 - Médias e erros-padrão ($\bar{X} \pm EP$) da MT (%), MP (%), VAP ($\mu\text{m/s}$), VSL ($\mu\text{m/s}$), VCL ($\mu\text{m/s}$), RAP (%) e IM (%) de espermatozoides do sêmen equino refrigerado a 5°C e a 15°C por 24 horas em três momentos de avaliação (M0, M1 e M2).

T ^a C (24hs)	MOMENTOS (n=10)	MT (%)	MP (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	RAP (%)	IM (%)
5	M0	25,5 $\pm$	9,0 $\pm$	93,3 $\pm$	65,0 $\pm$	179,9 $\pm$	13,4 $\pm$	31,7 $\pm$
		3,74 ^a	2,12 ^{ad}	8,57	3,43	14,52	2,03 ^{ac}	3,56 ^a
15	M0	25,3 $\pm$	6,9 $\pm$	97,3 $\pm$	67,7 $\pm$	173,9 $\pm$	12,4 $\pm$	32,8 $\pm$
		3,99 ^a	1,70 ^{ad}	8,65	4,36	17,37	2,27 ^{ac}	3,97 ^a
5	M1	38,2 $\pm$	15,2 $\pm$	105,8 $\pm$	76,5 $\pm$	194,2 $\pm$	20,5 $\pm$	41,1 $\pm$
		6,59 ^b	2,95 ^{ac}	5,11	3,67	11,02	3,71 ^{bd}	4,47 ^{ac}
15	M1	33,0 $\pm$	15,5 $\pm$	105,0 $\pm$	82,0 $\pm$	207,5 $\pm$	19,5 $\pm$	42 $\pm$
		6,79 ^b	3,84 ^{bc}	3,73	4,22	9,75	3,29 ^b	5,69 ^{bc}
5	M2	23,4 $\pm$	9,5 $\pm$	101,7 $\pm$	78,6 $\pm$	174,1 $\pm$	11,9 $\pm$	31,7 $\pm$
		4,01 ^a	2,06 ^d	4,90	3,98	10,56	2,83 ^{ac}	2,90 ^a
15	M2	22,8 $\pm$	8,7 $\pm$	94,7 $\pm$	77,6 $\pm$	164,5 $\pm$	14,6 $\pm$	34,8 $\pm$
		3,56 ^a	1,67 ^{ad}	6,76	4,83	15,85	2,53 ^{cd}	6,51 ^{ac}

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0,05$).

6.4. Experimento IV - Efeito do tratamento local sobre a qualidade do sêmen equino congelado

A partir dos resultados obtidos no experimento IV, foram calculadas as médias e erros-padrão dos parâmetros seminais e dos espermatozoides (Tabelas 15, 16 e 17) do sêmen congelado. Os momentos considerados na avaliação foram: antes do tratamento local para vesiculite seminal (M0), após uma semana do término do tratamento (M1) e após um mês do término do tratamento (M2).

Na Tabela 15 encontram-se os dados de MT, MP, VAP, VSL, VCL, RAP e IM dos espermatozoides do sêmen congelado no M0, M1 e M2. As variáveis MT, MP, RAP e IM foram superiores no M1, quando comparadas ao M0 e M2 ($p < 0,05$), porém esses parâmetros não variaram entre M0 e M2. Em relação as velocidades (VAP, VSL e VCL), houve superioridade do M1 em relação ao M0 ($p < 0,05$), porém não foram observadas diferenças entre M0 e M2 e entre M1 e M2.

TABELA 15 - Médias e erros-padrão ($X \pm EP$) da MT (%), MP (%), VAP ($\mu\text{m/s}$), VSL ($\mu\text{m/s}$), VCL ($\mu\text{m/s}$), RAP (%) e IM (%) de espermatozoides do sêmen congelado de garanhões em três momentos de avaliação (M0, M1 e M2).

MOMENTOS (n=10)	MT (%)	MP (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	RAP (%)	IM (%)
M0	20,8 $\pm$ 2,12 ^a	7,5 $\pm$ 1,05 ^a	76,5 $\pm$ 3,05 ^a	61,3 $\pm$ 1,98 ^a	139,6 $\pm$ 5,08 ^a	10,7 $\pm$ 1,51 ^a	26,6 $\pm$ 2,42 ^a
M1	44,8 $\pm$ 2,97 ^b	19,6 $\pm$ 2,55 ^b	83,9 $\pm$ 1,88 ^b	66,4 $\pm$ 1,67 ^b	150,8 $\pm$ 3,35 ^b	27,0 $\pm$ 1,80 ^b	42,2 $\pm$ 2,09 ^b
M2	24,3 $\pm$ 3,02 ^a	9,9 $\pm$ 1,73 ^a	81,0 $\pm$ 2,69 ^{ab}	63,7 $\pm$ 2,13 ^{ab}	147,1 $\pm$ 3,70 ^{ab}	14,3 $\pm$ 3,01 ^a	28,3 $\pm$ 2,36 ^a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0,05$).

A Tabela 16 demonstra os índices de peroxidação lipídica e o teor de ROS da população total contida no sêmen (espermatozoides e leucócitos), das amostras seminais congeladas. Os momentos de avaliação foram: antes do tratamento local para vesiculite seminal (M0), após uma semana do término do tratamento (M1) e após um mês do término do tratamento (M2). Os resultados demonstraram que houve um menor índice de peroxidação lipídica da população total de células no M1 em relação ao M0 e M2 ($p < 0,05$), entretanto não diferiu entre M0 e M2. O teor de ROS foi inferior na população total no M1 em relação ao M0 ($p < 0,5$), porém não diferiu entre M0 e M2 e entre M1 e M2.

TABELA 16 - Médias e erros-padrão ($X \pm EP$) do índice de peroxidação lipídica da população total (células espermáticas e leucócitos) avaliado em unidade arbitrária (PERO TOTAL, UA) e teor de ROS da população total (células espermáticas e leucócitos) avaliado em unidade arbitrária (ROS TOTAL, UA) do sêmen congelado de garanhões em três momentos de avaliação (M0, M1 e M2).

MOMENTOS (n=10)	PERO TOTAL (UA)	ROS TOTAL (UA)
M0	1,2 $\pm$ 0,12 ^a	5,83 $\pm$ 2,06 ^a
M1	0,75 $\pm$ 0,09 ^b	1,72 $\pm$ 0,57 ^b
M2	0,98 $\pm$ 0,11 ^a	1,87 $\pm$ 0,81 ^{ab}

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0,05$).

A Tabela 17 demonstra os índices de peroxidação lipídica e o teor de ROS da população de espermatozoides das amostras seminais congeladas. Os momentos de avaliação foram: antes do tratamento local para vesiculite seminal (M0), após uma semana do término do tratamento (M1) e após um mês do término do tratamento (M2).

TABELA 17 - Médias e erros-padrão ($X \pm EP$) do índice de peroxidação lipídica da população de espermatozoides, avaliado em unidade arbitrária (PERO SPTZ, UA), teor de ROS da população de espermatozoides, avaliado unidade arbitrária (ROS SPTZ, UA) do sêmen congelado de garanhões em três momentos de avaliação (M0, M1 e M2).

MOMENTOS (n=10)	PERO SPTZ (UA)	ROS SPTZ (UA)
M0	0,54±0,04	1,52±0,37
M1	0,55±0,05	0,78±0,24
M2	0,56±0,05	0,93±0,37

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0,05$).

*“Há aqueles que crêem que o destino
descansa nos joelhos dos deuses, mas
a verdade é que trabalha, como um
desafio candente, sobre as
consciências dos homens.”*

Eduardo Galeano

7. DISCUSSÃO

Apesar de o tratamento local ser descrito na literatura por diversos autores como a melhor alternativa terapêutica em casos de vesiculite seminal (BLANCHARD *et al.* 1987; BLANCHARD *et al.*, 1988; BLANCHARD & VARNER, 1992; MALMGREN & SUSSEMILCH 1992; BLANCHARD *et al.*, 2002; VARNER *et al.* 2000; LIU & MORRESEY, 2006; CHENIR, 2009; MIRAGAYA, 2011; VARNER & SCHUMACHER, 2011, PINTO *et al.*, 2014), nenhuma pesquisa antes desta avaliou a eficácia do tratamento local e seus efeitos na qualidade e longevidade do sêmen. Dessa forma, o presente estudo auxilia no esclarecimento sobre a eficiência do tratamento local de vesiculite seminal e seus efeitos sobre a qualidade e longevidade do sêmen equino.

7.1. Experimento I

No experimento I foram avaliados animais com histórico de hemospermia e piospermia. A partir dessa informação, o histórico clínico e reprodutivo foi investigado e os animais submetidos a exames reprodutivos, no intuito de diagnosticar casos de vesiculite seminal. Uma vez diagnosticados, foram investigados alguns fatores predisponentes ao surgimento de vesiculite seminal como idade, tempo de evolução da enfermidade e manejo reprodutivo do garanhão. Além disso, foram estudadas as principais bactérias envolvidas na etiopatogenia da doença.

Na espécie equina os reprodutores obtêm maior valor econômico quando sua progênie se destaca e isto geralmente acontece quando o animal atinge idades mais avançadas. Dessa forma, o alto valor da prole estimula o uso dos animais em programas de reprodução assistida, fazendo com que eles sejam mantidos em atividade reprodutiva mesmo com idade avançada. Entretanto, com o avançar da idade ocorre um declínio natural e gradativo na capacidade reprodutiva, além de um maior índice de alterações reprodutivas nessa fase (CARNEVALLE *et al.*, 1993).

A idade dos animais selecionados com vesiculite seminal variou de sete a dezenove anos (média de 11,8 anos). Segundo classificação realizada por Ramires-Neto *et al.*, (2013a) garanhões com idade entre cinco e quinze anos são considerados animais adultos, e acima disto são considerados idosos. Dessa forma, no presente estudo a vesiculite seminal foi mais prevalente em animais adultos e idosos. Esse achado corrobora com outros relatos de vesiculite seminal presentes na literatura, como nos

seguintes casos: garanhão de seis anos (FENNELL *et al.*, 2010), sete anos (PINTO *et al.*, 2014) onze anos (BLANCHARD *et al.*, 1987) e quatorze anos de idade (MALMGREN & SUSSEMILCH, 1992). Essa característica difere da espécie bovina, onde touros jovens são mais afetados pela vesiculite seminal, apesar de uma forma mais crônica da doença ter sido relatada em touros mais velhos (BRUCE *et al.*, 2008). A maior frequência em touros jovens se deve principalmente à prática de sodomia, especialmente quando há alta concentração de machos no mesmo local (LADDS, 1974).

O tempo de evolução da enfermidade nos animais selecionados variou de um mês e meio a trinta e seis meses (média de 19 meses), portanto, as infecções das glândulas vesiculares no presente estudo apresentaram caráter crônico. Esse dado se assemelha a característica das doenças infecciosas das glândulas sexuais acessórias em humanos, incluindo a vesiculite seminal, uma vez que a maioria dos casos possui curso crônico (VIGNERA *et al.*, 2011). Além disso, cinco dos seis animais selecionados foram submetidos a tratamentos prévios com antibióticos de forma sistêmica ou de forma local associada à sistêmica, porém em todos esses casos houve recidiva da doença. O tratamento de vesiculite seminal constitui um grande desafio, devido à elevada frequência de persistência da infecção (VARNER *et al.*, 2000).

De maneira geral, os garanhões afetados pela vesiculite seminal não exibem sinais sistêmicos como febre, apatia, anorexia e dor durante micção, defecação ou cópula (FREESTONE *et al.*, 1993; TIBARY & RODRIGUEZ, 2011; VARNER & SCHUMACHER, 2011). Apesar de nenhum dos cinco garanhões terem apresentado sinais sistêmicos, quatro dos cinco animais manifestaram dificuldade em ejacular, que pode ser atribuído à dor ou inflamação da região do colículo seminal, causando um impedimento mecânico (TURNER *et al.*, 2011). Mesmo após o tratamento local de vesiculite seminal (M1 e M2) os quatro garanhões continuaram a apresentar falhas durante a ejaculação. Alguns autores citam que a vesiculite seminal aguda pode levar a casos de distúrbios ejaculatórios (TIBARY & RODRIGUEZ, 2011; TURNER, 2011). Entretanto, 66,7% dos animais do estudo apresentaram alterações na ejaculação e neles a enfermidade se apresentou de forma crônica.

A amostra seminal tingida de vermelho ou ainda amarelada, pode indicar o processo infeccioso das glândulas vesiculares. Essas alterações na cor são decorrentes da presença de hemácias ou polimorfonucleares no ejaculado (VARNER *et al.*, 2000; MANCILL, 2010; MIRAGAYA *et al.*, 2011; VARNER *et al.*, 2011). Apesar de a hemospermia ser uma possível consequência de infecção das vesículas seminais, os seis

animais diagnosticados com vesiculite seminal durante a triagem, apresentaram coloração amarelada do sêmen, decorrente de contaminação com leucócitos. Os três animais que apresentaram coloração avermelhada do ejaculado, decorrente de hemospermia, apresentaram lesões em diferentes locais da uretra. O exame endoscópico foi essencial para o diagnóstico diferencial de vesiculite seminal, uma vez que lesões na uretra foram identificadas, justificando a presença de sangue no ejaculado. Além disso, a endoscopia permitiu identificar a causa da piospermia, mediante identificação de conteúdo purulento no interior das vesículas seminais, auxiliando no estabelecimento do diagnóstico definitivo da enfermidade, uma vez que o foco infeccioso pode estar localizado em todos os níveis do trato genital (VOSS & McKINNON &, 1993; TURNER, 2011).

Apesar da fisiopatogenia da vesiculite seminal em garanhões não ser completamente elucidada, uma das hipóteses mais aceitas é a de infecção ascendente (VARNER *et al.*, 2011). Uma característica em comum entre 50% dos animais selecionados com infecção das glândulas vesiculares foi o histórico de realização de montas naturais. Estudos em humanos correlacionaram vesiculite seminal e prostatite a doenças sexualmente transmissíveis, como a gonorréia (IRWIN, 1936; VIGNERA *et al.*, 2011). Os fatores contribuintes para a alteração da flora bacteriana normal e seleção de bactérias patogênicas no aparelho reprodutor de garanhões incluem a limpeza excessiva do pênis e prepúcio e a cobertura natural de éguas infectadas (TIBARY & RODRIGUEZ, 2011).

Durante a monta natural há uma transferência de microorganismos presentes no trato genital da égua para o trato genital do garanhão e também o contrário (SAMPER & TIBARY, 2006). Garanhões em atividade reprodutiva devem ser rotineiramente examinados quanto à composição da flora bacteriana presente no aparelho genital, como parte do exame reprodutivo, antes e após cada estação de monta. Bactérias comensais contaminantes da superfície do pênis ou uretra incluem *Escherichia coli*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus spp.*, *Klebsiella spp.* e *Pseudomonas spp.* Esses microorganismos não são considerados patogênicos e podem ser isolados do ejaculado, swab do pênis, prepúcio e uretra, bem como do útero de éguas (TIBARY & RODRIGUEZ, 2011). Entretanto, alterações da flora bacteriana normal da genitália externa podem causar o crescimento de bactérias oportunistas no trato reprodutor, tais como *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus spp.* (SAMPER & TIBARY, 2006). No presente estudo as bactérias mais prevalentes

encontradas nas amostras seminais foram *Pseudomonas aeruginosa* (41,7%) e *Streptococcus β -hemolítico* (41,7%), corroborando com as descrições na literatura. Foi reportado por Tibary & Rodriguez (2011) que a *P. aeruginosa* tem sido frequentemente isolada de swabs penianos de animais em atividade reprodutiva nos Estados Unidos com uma frequência variando entre 20% a 40%, porcentagem semelhante à encontrada nas amostras seminais do presente estudo.

Em relação as bactérias encontradas nos lavados vesiculares, as mais prevalentes foram *Pseudomonas aeruginosa* (66,7%), *Klebsiella pneumoniae* (33,3%) e *Streptococcus β -hemolítico* (25%). A *Pseudomonas aeruginosa* é o patógeno mais comumente isolado em casos de infecções do trato genital interno de garanhões (COMERFORD *et al.*, 2011). Os microrganismos identificados a partir dos lavados vesiculares realizados neste estudo foram também descritos na literatura por diversos autores como agentes etiológicos de vesiculite seminal em garanhões (TURNER, 2011; TIBARY & RODRIGUEZ, 2011; VARNER *et al.*, 2011; PINTO *et al.* 2014). Além dos microrganismos citados anteriormente foram também isolados de lavados vesiculares *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* e *Klebsiella oxytoca*. Estas bactérias não foram descritas ainda na literatura como possíveis patógenos envolvidos em infecções de glândulas anexas no garanhão.

O isolamento e correta identificação do agente etiológico de vesiculite seminal é essencial para a realização de antibiograma, a fim de determinar o tratamento apropriado. O diagnóstico definitivo é geralmente estabelecido com a inspeção e o cultivo do conteúdo vesicular, obtido por endoscopia (TIBARY, 2007; CHENIER, 2009; BRINSKO *et al.*, 2011). No entanto, devido ao fato de que este exame não é rotineiramente usado a campo, pela necessidade de aparelho específico e um operador experiente, a comparação do perfil microbiológico do sêmen e lavado vesicular assume importância. Em 66,7% dos casos, o microrganismo identificado no lavado da vesícula seminal também foi identificado no sêmen. Uma média de 2,25 tipos diferentes de microrganismos foi encontrada para cada amostra seminal quando comparada a uma média de 1,58 microrganismos isolados em cada lavado da vesícula seminal, demonstrando que a cultura bacteriana do lavado vesicular permite a obtenção de uma amostra mais pura, uma vez que evita a contaminação com a microflora do pênis.

Durante a avaliação reprodutiva dos animais, um total de 50% dos casos selecionados com vesiculite seminal, em algum momento da evolução da doença, apresentou aumento de temperatura e de volume do testículo, bolsa escrotal e/ou

epidídimo, quadros clínicos caracterizados por orquite, periorquite e/ou epididimite, respectivamente. Em humanos a vesiculite seminal quase sempre está associada à infecções em outros locais do trato genital masculino, como a próstata, sendo a enfermidade denominada próstato-vesiculite ou associada a próstata e epidídimo, sendo denominada de próstato-vesículo-epididimite. Essas patologias são agrupadas em um conjunto denominado de Infecções das Glândulas Acessórias Masculinas (MAGI), cuja propagação é imprevisível em uma ou mais glândulas do trato reprodutivo, bem como a um ou ambos os lados (VIGNERA *et al.*, 2011). Na espécie bovina a vesiculite seminal pode ser frequentemente acompanhada por infecção de outros tecidos urogenitais, como ampolas, epidídimos, testículos, próstata, glândulas bulbouretrais e a uretra. A inflamação dos tecidos associados pode muitas vezes explicar as falhas do tratamento (BRUCE *et al.*, 2008).

Blanchard *et al.* (1988) descreveram um caso de vesiculite seminal causada por *Pseudomonas aeruginosa* concomitante à infecção das ampolas. Comerford *et al.* (2011) relataram um caso de um garanhão com epididimite e periorquite unilaterais do lado esquerdo, decorrentes de infecção ascendente a partir da vesícula seminal ipsilateral, cujo agente patológico isolado do lavado vesicular foi a *Pseudomonas aeruginosa*. A orquiectomia do testículo esquerdo foi realizada, na tentativa de preservar o testículo e epidídimo direitos. Porém, dois dias após o procedimento cirúrgico o testículo e epidídimo remanescentes apresentaram inflamação aguda, sendo posteriormente removidos.

Caso semelhante foi descrito por Pinto *et al.* (2014) de um garanhão com orquite e epididimite do lado esquerdo causados por *Klebsiella pneumoniae*, no qual após tentativa de tratamento parenteral com enrofloxacina e fenilbutazona, o animal não apresentou melhora clínica e foi submetido a orquiectomia unilateral. Após o procedimento foi iniciado tratamento local com Imipenem-Cilastatina, única droga cuja bactéria apresentou sensibilidade no antibiograma. O tratamento foi realizado por dez dias consecutivos, seguindo mesmo protocolo do presente estudo. Dez dias após o término do tratamento nova cultura foi realizada e não foi isolada *K. pneumoniae*, entretanto o animal permaneceu apresentando piospermia. Em nosso estudo três animais apresentaram sinais de orquite, periorquite e/ou epididimite após o tratamento local, sendo dois deles, casos de recidiva. A *Pseudomonas aeruginosa* foi identificada nos lavados vesiculares desses três animais e a *Klebsiella pneumoniae* em um dos casos. A *P. aeruginosa* e a *K. pneumoniae* possuem alto grau de persistência tecidual, por

apresentarem a capacidade de formação de biofilmes, aumentando a resistência aos fármacos antimicrobianos (MAH & O'TOOLE, 2001). A infecção ascendente a partir da vesícula seminal contaminada é uma importante ameaça à saúde testicular e epididimária e deve ser considerada em casos de orquite e epididimite (COMERFORD *et al.*, 2011).

Os fármacos amicacina e ticarcilina associada ao ácido clavulânico foram anteriormente utilizados no tratamento local em casos de vesiculite seminal descritos na literatura (VARNER *et al.*, 1993; GAY & PERRIN, 1999; COMERFORD *et al.*, 2011), porém as drogas ceftiofur, ceftriaxona e ciprofloxacina não foram reportadas em infusões vesiculares em equinos. Algumas dessas drogas têm seu uso descrito em tratamento intrauterino de endometrite crônica em éguas (LEBLANC, 2008) e intra-vesicular em touros (ROVARY, 2008). Nenhum dos antibióticos utilizados promoveu reação inflamatória local, aderências ou qualquer outro efeito indesejável.

O protocolo local de lavagens uterinas associadas à infusão com o antibiótico de eleição por dez dias consecutivos foi igualmente utilizado por Comerford *et al.* (2011). Na literatura é mencionado que o tratamento local para vesiculite seminal deve ser realizado por um período mínimo de cinco dias (TIBARY, 2007). Estudo realizado por Rovary *et al.* (2008), demonstrou que a administração intra-glandular de ceftiofur ou penicilina em touros com vesiculite seminal através da fossa ísquio-retal foi seguro e eficaz. Este estudo também demonstrou que um único tratamento com o antibacteriano tulatromicina apresentou maior taxa de recuperação dos animais (88%) quando comparado a duas infusões com intervalo de 72 horas (48%), demonstrando que o sucesso terapêutico de infusões intravesiculares pode variar com o protocolo utilizado.

Em nosso estudo o sêmen de quatro dos cinco animais avaliados apresentou coloração normal (branco-acizentado) após uma semana do término do tratamento local, que foi acompanhado de redução na porcentagem de leucócitos ($X=15,1\%$) em comparação ao momento de triagem, no qual todos os animais selecionados apresentaram o ejaculado com coloração amarelada e maior porcentagem de leucócitos ($X=35,2\%$). Um mês após o término do tratamento local apenas um animal manteve a coloração branco-acizentada do sêmen, os demais voltaram a apresentar coloração amarelada e elevação da porcentagem de leucócitos nas amostras ($X=36,1\%$). A presença de leucócitos no sêmen de garanhões é considerada uma condição incomum e indica um processo infeccioso no trato genital (VOSS & MCKINNON, 1993).

A contaminação de neutrófilos no sêmen pode ser utilizada para prever fertilidade (GUNN *et al.*, 2011), já que até mesmo em baixas quantidades os leucócitos podem interferir na função espermática (BAUMBER *et al.*, 2002). Estudo realizado por Gunn *et al.* (2011) avaliou a presença de neutrófilos no sêmen de garanhões da raça Puro Sangue Inglês (PSI) que possuíam fertilidade normal e não apresentavam alterações no trato reprodutivo. Esses animais estavam em atividade reprodutiva sob o regime de monta natural. Nesse estudo, os autores concluíram que 20% das amostras seminais desses animais contêm neutrófilos e que a presença de neutrófilos no sêmen de garanhões PSI não deve ser utilizada como um indicador de fertilidade. A normalização da coloração do sêmen associada à redução da porcentagem de leucócitos demonstra uma resposta positiva dos animais após uma semana do tratamento local, porém após um mês os parâmetros seminais voltaram a apresentar coloração alterada e incremento da porcentagem de leucócitos, sugerindo que o tratamento local não foi eficiente em manter a normalização dos parâmetros seminais após 30 dias.

7.2. Experimento II

No experimento II foi avaliado o efeito do tratamento local de vesiculite seminal sobre a qualidade do sêmen equino a fresco em relação aos parâmetros de volume, concentração espermática, pH, osmolaridade, cinética espermática, integridade de membrana plasmática, porcentagem de leucócitos e número de Unidades Formadoras de Colônias por mililitro no sêmen e teor de Óxido Nítrico no plasma seminal.

O volume do ejaculado reduziu significativamente entre o momento pré tratamento (M0) e após uma semana do término do tratamento local (M1) ($p < 0,05$), demonstrando que a vesiculite seminal leva a um aumento desse parâmetro e que o tratamento interferiu no volume de plasma seminal produzido pela vesícula seminal, uma vez que na espécie equina as glândulas sexuais acessórias são responsáveis por 95% do volume do ejaculado (BLANCHARD & VARNER, 1992). O aumento do volume seminal pode estar relacionado ao conteúdo inflamatório produzido pela glândula acometida, uma vez que a infecção da vesícula seminal resulta em acúmulo de material purulento e/ou sanguinolento em seu interior, que é lançado no sêmen no momento da ejaculação (MIRAGAYA *et al.*, 2011). Após um mês do término do tratamento (M2) ($p < 0,05$), o volume do ejaculado voltou a aumentar em relação ao M1 ($p < 0,05$) e se tornou igual ao momento pré-tratamento (M0), indicando um retorno do

processo infeccioso após um mês da terapia. A glândula vesicular tem uma influência significativa no volume de sêmen produzido pelo garanhão. Estudando os efeitos da vesiculectomia em garanhões Webb *et al.* (1990) perceberam que dentre os principais resultados obtidos do procedimento cirúrgico, estava a redução do volume total ejaculado e do gel.

A concentração espermática apresentou aumento após uma semana do término do tratamento (M1) em relação ao momento pré-tratamento (M0). Entretanto, após um mês da terapia (M2) a concentração espermática voltou a reduzir, sendo diferente de M1 ($p < 0,05$), mas não de M0. Em humanos, Vicari (1999) estabeleceu uma classificação para caracterizar homens com próstato-vesículo-epididimite crônica e dentre os critérios utilizados estava a redução da concentração espermática. Embora a concentração espermática tenha variado ao longo da avaliação, ela se manteve dentro dos parâmetros de normalidade para a espécie equina, não sendo caracterizado quadro de oligospermia em nenhum dos momentos. Apesar da concentração espermática e o volume terem apresentado diferenças entre os momentos de avaliação o número total de espermatozoides se manteve semelhante ao longo do período estudado.

O pH e a osmolaridade do sêmen não variaram entre os momentos avaliados, sendo esta uma característica que não se altera antes e após o tratamento local de vesiculite seminal. Em touros (GROTELUESCHEN *et al.*, 1994) e em homens (VIGNERA *et al.*, 2008) afetados com vesiculite seminal é relatado a ocorrência de elevação do pH seminal. Entretanto, em nosso estudo os valores de pH (variação de 7,4 a 7,5) e a osmolaridade (variação de 295,9 a 299,3) não obtiveram grande discrepância em relação ao pH e osmolaridade do sêmen de garanhões saudáveis, que são de 7,47 e 302 mOsm, respectivamente (PICKETT & VOSS, 1972; PICKETT, 1970).

Os parâmetros de cinética espermática, como motilidade total, motilidade progressiva e porcentagem de espermatozoides rápidos, bem como a integridade de membrana plasmática, apresentaram um aumento significativo após uma semana do tratamento local (M1) em relação ao momento pré-tratamento (M0). Entretanto, todos esses parâmetros voltaram a exibir redução após um mês do tratamento (M2), de forma a não apresentarem diferenças estatísticas em relação ao M0 e uma redução significativa em relação ao M1 ($p < 0,05$). A qualidade dos espermatozoides, quanto à cinética e integridade de membrana plasmática, pode parecer inalterada no sêmen de garanhões com vesiculite seminal, analisado imediatamente após a ejaculação, mas a longevidade desses espermatozoides é geralmente reduzida (VARNER *et al.*, 2000). Os dados do

presente trabalho demonstram que a cinética espermática e integridade de membrana plasmática do sêmen de garanhões acometidos com vesiculite seminal sofreram uma redução da qualidade desde o momento a fresco, imediatamente após a ejaculação, contrariando o que é relatado na literatura. A semelhança dos parâmetros de cinética espermática entre o M0 e M2, e o aumento dos parâmetros no M1, em relação aos demais momentos, sugere que o tratamento local para vesiculite seminal melhorou a qualidade do sêmen após uma semana da terapia, mas esta não se manteve após um mês (M2). A vesiculite seminal em touros também é caracterizada por uma redução significativa da motilidade espermática, associada a concentrações anormais de células polimorfonucleares no sêmen (GROTELUESCHEN, 1994).

Uma semana após o tratamento (M1) houve uma redução significativa na porcentagem de defeitos morfológicos de cauda em relação ao momento pré-tratamento ($p < 0,05$). Porém, após um mês do tratamento (M2), houve incremento desse parâmetro em relação ao M1 ($p < 0,05$), apresentando porcentagem semelhante ao M0, sendo este mais um indício de que o tratamento local foi eficiente em melhorar a qualidade seminal após uma semana, mas não foi eficiente em manter essa qualidade após um mês. O aparecimento de anormalidades de cauda de espermatozoides no sêmen pode indicar que essas células sofreram efeitos de estresse térmico, disfunção epididimária ou choque osmótico (BARTH & BOWMAN, 1994). A osmolaridade no presente estudo não foi um fator contribuinte para o aparecimento de alterações morfológicas de cauda, uma vez que ela se manteve entre os valores normais para espécie em todos os momentos avaliados. Entretanto, o aumento da temperatura causado pela inflamação da glândula vesicular e consequentemente de seu conteúdo, associada ao processo inflamatório do epidídimo observado em alguns animais durante a evolução da doença (antes do processo de triagem) e após o tratamento local, podem explicar a elevada porcentagem de defeitos morfológicos de cauda nos momentos M0 e M2.

O tratamento local levou à redução significativa da porcentagem de leucócitos na amostra após uma semana do tratamento (M1) em relação ao momento pré-tratamento (M0), porém essa redução não se manteve após um mês do tratamento (M2), uma vez que a porcentagem voltou a apresentar valor semelhante ao M0. Apesar de haver uma redução na porcentagem de leucócitos no M1, esta permaneceu em uma média de 15,1% nas amostras, enquanto que no M0 e M2 apresentou médias de 35,2% e 36,1%, respectivamente. Em humanos a piospermia é uma condição relativamente comum e não é considerada um bom marcador para infecções do trato genital ou para a

qualidade seminal (TURNER, 2011). Gunn *et al.* (2011) consideraram que 20% das amostras seminais de garanhões PSI sadios apresentam algum grau de contaminação por leucócitos sem prejuízos à qualidade seminal. Entretanto, para Baumber *et al.* (2002) até mesmo discreta presença de leucócitos no sêmen pode causar redução da qualidade seminal, uma vez que os leucócitos produzem cem vezes mais espécies reativas de oxigênio (ROS), do que o espermatozoide, aumentando o estresse oxidativo do meio. Pinto *et al.* (2014) consideraram efetivo o tratamento local de vesiculite seminal em um garanhão que apresentou cultura bacteriana negativa após 10 dias da terapia, apesar de o garanhão continuar apresentando neutrófilos nos ejaculados. No presente experimento, a porcentagem de leucócitos apresentou correlação positiva com o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Esse resultado pode ser explicado pela quimiotaxia induzida pelas bactérias envolvidas no processo infeccioso da vesícula seminal.

A presença de leucócitos e bactérias no sêmen leva a um incremento significativo de ROS e citocinas pró-inflamatórias, afetando, com isso, a integridade de membranas, função mitocondrial e integridade de DNA, acarretando em aumento da expressão de marcadores de apoptose na célula espermática. Como resultado desse efeito deletério no sêmen é observado redução na motilidade espermática e na longevidade e fertilidade do sêmen (VIGNERA *et al.*, 2011). Esses efeitos podem explicar as correlações negativas encontradas para a porcentagem de leucócitos e do número de UFC por mililitro em relação à motilidade total, motilidade progressiva, espermatozoides rápidos e integridade de membrana plasmática dos espermatozoides das amostras seminais.

O tratamento local levou a uma redução acentuada ($p < 0,05$) de UFC por mililitro após uma semana do tratamento (M1) em relação ao momento pré-tratamento (M0), demonstrando que o tratamento local foi efetivo em reduzir a carga bacteriana do sêmen. Todavia, após um mês do tratamento o número de UFC por mililitro voltou a aumentar, porém esse aumento não representou diferença em relação ao M1 e também não apresentou diferença estatística em relação ao M0, apesar da grande diferença numérica. Esse resultado demonstra que embora o tratamento não tenha sido efetivo em melhorar a qualidade seminal após um mês do tratamento em relação aos diversos parâmetros anteriormente expostos, como volume seminal, concentração, cinética espermática, integridade de membrana plasmática, bem como porcentagem de leucócitos, o crescimento bacteriano parece estar ainda em desenvolvimento,

caracterizando o processo de recidiva da doença, sem que o processo infeccioso nesse momento (M2) seja da mesma dimensão do momento pré-tratamento (M0).

O óxido nítrico (NO) corresponde a um mensageiro molecular com múltiplas funções biológicas, produzido por inúmeros tipos celulares. Desempenha função em diversos processos biológicos, dentre eles na modulação de respostas inflamatórias. Em um processo inflamatório, o maior sítio de produção de NO encontra-se nos macrófagos e a regulação transcricional ocorre em função de estímulos inflamatórios, tais como por citocinas pró-inflamatórias, endotoxinas, hipóxia e estresse oxidativo (MONCADA *et al.*, 1991). O NO produzido em altas concentrações atua como molécula citotóxica contra microorganismos, porém produz danos teciduais e vasodilatação, resultando em apoptose, danos mitocondriais, desnaturação de proteínas e danos ao DNA celular (WONG & BILLIAR, 1995). Esse efeito pode explicar a correlação negativa entre NO e a motilidade total espermática.

Após uma semana (M1) do tratamento local de vesiculite seminal ocorreu redução ($p<0,05$) dos níveis de NO no plasma seminal em relação ao momento pré-tratamento (M0), indicando redução do processo inflamatório na vesícula seminal. Após um mês do término do tratamento (M2) houve um aumento dos níveis de NO, mas não foi significativamente diferente do M1 e foi semelhante ao M2. Esse resultado indica que o processo inflamatório aumentou em M2, sugerindo recidiva da doença, mas ainda não na mesma dimensão do momento pré-tratamento.

7.3. Experimento III

No experimento III foi avaliado o impacto da vesiculite seminal sobre a qualidade do sêmen equino refrigerado a 5°C e 15°C durante um período de 24 horas. Além disso, avaliou-se o sêmen equino refrigerado a 5°C e 15°C por 24 horas no momento pré-tratamento (M0), após uma semana do término do tratamento (M1) e após um mês do término do tratamento (M2), no intuito de avaliar o efeito do tratamento local sobre a longevidade do sêmen e determinar qual a melhor temperatura de armazenamento pós-tratamento.

Na avaliação do sêmen no momento pré-tratamento (M0) o resultado obtido demonstra superioridade do sêmen a fresco para os parâmetros de MT, MP, VSL, RAP e IM em comparação ao sêmen refrigerado, tanto a 5°C quanto a 15°C ($p<0,05$). Entretanto, esses parâmetros não diferiram entre 5°C e 15°C após 24 horas de

refrigeração. Esse resultado demonstra que as temperaturas de refrigeração a 5°C e a 15°C possuem a mesma eficiência no processo de armazenamento do sêmen de garanhões com vesiculite seminal por um período de 24 horas.

O VAP foi superior no sêmen a fresco em comparação a temperatura de 5°C após 24 horas de refrigeração ($p < 0,05$), porém não diferiu em relação à temperatura de 15°C após 24 horas de armazenamento, do mesmo modo que não houve diferença significativa desse parâmetro entre ambas as temperaturas. Em relação ao VCL, o sêmen a fresco apresentou superioridade em relação ao sêmen refrigerado por 24 horas a 15°C ($p < 0,05$), mas não foi diferente em relação ao sêmen refrigerado por 24 horas a 5°C e entre as duas temperaturas de refrigeração. O processo de refrigeração de sêmen tem como objetivo reduzir a atividade metabólica do espermatozoide e consequentemente aumentar o tempo de viabilidade do gameta. Entretanto, existe uma grande variação individual na manutenção da motilidade espermática após a refrigeração, de forma que nem todos os garanhões produzem sêmen com capacidade de suportar os rigores de refrigeração e armazenagem (BRINSKO *et al.*, 2000). Para alguns animais, mesmo quando são empregadas as melhores técnicas de processamento de sêmen, número insuficiente de espermatozoides sobrevive ao processo de resfriamento com motilidade adequada à inseminação artificial.

As principais injúrias celulares relacionadas ao choque frio ocorrem entre 15°C a 5°C (STORNELLI *et al.*, 2005; WATSON, 2000), levando a queda significativa na motilidade espermática e atividade metabólica em relação ao sêmen a fresco. No entanto Jasko *et al.* (1992) reportaram que o sêmen refrigerado pode ser utilizado com taxas de concepção semelhantes aos obtidos com o sêmen fresco. No presente trabalho os resultados de VAP e VCL foram inferiores nos grupos de amostras refrigeradas em relação à amostra fresca, para Verstegen *et al.*, (2002) isto está ligado às injúrias ocasionados pelo processo de refrigeração, levando à uma baixa qualidade seminal e menores índices de fertilidade.

Estudo realizado por Aurich & Spengler (2007) avaliou a adição de *Pseudomonas aeruginosa* ao sêmen equino com o objetivo de estudar os efeitos dessa contaminação após a refrigeração a 5°C por 24, 48 e 72 horas. Os principais resultados observados foram a redução gradativa da motilidade total e das velocidades em comparação ao grupo controle, resultados semelhantes aos obtidos no presente estudo.

Na avaliação do sêmen a 5°C após 24 horas de refrigeração nos momentos pré-tratamento (M0), após uma semana do término do tratamento (M1) e após um mês do

tratamento (M2), os parâmetros de MT, MP, RAP e IM foram superiores no M1 em comparação ao M0 e M2 ($p < 0,05$), entretanto, esses parâmetros não diferiram entre M0 e M2. Esse resultado sugere um efeito positivo do tratamento local na cinética espermática e integridade de membrana plasmática do sêmen refrigerado a 5°C por 24 horas após uma semana, mas esse efeito não foi mantido após um mês da terapia.

Quando as temperaturas de 5°C e 15°C foram comparadas após 24 horas de refrigeração nos momentos pré-tratamento (M0) e após uma semana (M1) e um mês (M2) do término do tratamento, não foram notadas diferenças estatísticas entre ambas as temperaturas quanto aos parâmetros de cinética espermática e integridade de membrana plasmática em cada momento avaliado. Esse resultado significa que as temperaturas de 5°C e 15°C possuem eficiência similar no armazenamento do sêmen por 24 horas antes após o tratamento local de vesiculite seminal. Entretanto, em ambas as temperaturas a maioria dos resultados de cinética espermática e integridade de membrana plasmática foram superiores no M1 em comparação ao M0 e M2 ($p < 0,05$), demonstrando uma melhora da qualidade seminal do sêmen refrigerado após uma semana de tratamento, que não foi mantida após um mês.

Varner *et al.* (1989) demonstraram que o armazenamento de espermatozoides a 5°C foi superior à armazenagem a 20°C em preservar a motilidade dos espermatozoides utilizando diluentes à base de leite. Diversos estudos compararam temperaturas de armazenamento no intuito de determinar o intervalo de temperatura ideal para a manutenção da motilidade e fertilidade, e concluíram que esse intervalo varia de 4°C a 6°C (Palmer, 1984; Squires *et al.*, 1988; Varner *et al.*, 1988; Varner *et al.*, 1989; Moran *et al.*, 1992). No entanto, um estudo realizado por Province *et al.* (1985) demonstrou que as temperaturas de armazenagem de 15°C e 20°C foram superiores a de 5°C para manter a motilidade e fertilidade durante o armazenamento entre 4 e 12 horas. Pesquisa realizada por Pickett (1995) reportou que à medida que o tempo de armazenamento aumenta a fertilidade diminui gradativamente, particularmente quando o sêmen for armazenado por mais de 12 h a 20°C e por mais de 48 horas a 5°C. No presente estudo não houve diferença estatística dos parâmetros de cinética espermática e integridade de membrana plasmática do sêmen equino na refrigeração a 5°C ou 15°C, antes e após o tratamento local da glândula vesicular, contrariando a maioria dos autores.

Segundo Ramires-Neto *et al.* (2013b), os espermatozoides de garanhões podem ser classificados como de alta ou baixa sensibilidade ao processo de refrigeração, sendo classificados em sensíveis quando o sêmen apresenta motilidade total inferior a 30% e

em não sensíveis quando a motilidade total for superior a esse valor. No presente experimento o sêmen no M0 e M2 apresentou valores médios inferiores a 30% de motilidade total, enquanto que no M1 a motilidade total foi superior a esse valor. Dessa forma, esse resultado permite inferir que a vesiculite seminal promove redução da resistência espermática ao processo de refrigeração e que o tratamento local após uma semana foi eficiente em aumentar a capacidade dos espermatozoides ao armazenamento.

7.4. Experimento IV

No experimento IV avaliou-se o efeito do tratamento local sobre a qualidade do sêmen equino congelado antes do tratamento local para vesiculite seminal (M0), após uma semana do término do tratamento (M1) e após um mês do término do tratamento (M2).

As variáveis MT, MP, RAP e IM foram superiores no M1, quando comparadas ao M0 e M2 ($p < 0,05$), porém esses parâmetros não variaram entre M0 e M2. Em relação as velocidades (VAP, VSL e VCL), houve superioridade do M1 em relação ao M0 ($p < 0,05$), porém não foram observadas diferenças entre M0 e M2 e entre M1 e M2. Esses resultados demonstram que o tratamento local foi efetivo em melhorar a qualidade do sêmen criopreservado após uma semana do término do tratamento, mas esse incremento da qualidade não foi mantido após um mês da terapia. Além disso, a vesiculite seminal reduz a qualidade dos espermatozoides quanto à cinética espermática e integridade de membrana plasmática dos espermatozoides após o processo de congelamento. Esse resultado corrobora com os obtidos por Grotelueschen *et al.* (1994) de que o sêmen de touros com vesiculite seminal séptica apresentaram baixa congelabilidade quando comparado ao sêmen de touros normais.

O processo de congelamento inclui fatores que são extremamente prejudiciais para os espermatozoides, tais como, alterações de temperatura, stress osmótico e tóxico causado pela exposição ao agente crioprotetor e a formação e dissolução de cristais de gelo (WATSON, 2000). Além disso, na aplicação dessa técnica ocorre a remoção do plasma seminal e com ele há a eliminação de inúmeras substâncias antioxidantes, permitindo que as células espermáticas estejam mais susceptíveis aos traumas causados pela ação das espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ROS).

A avaliação do índice de peroxidação lipídica e teor de ROS das amostras seminais descongeladas demonstram que houve um menor índice de peroxidação lipídica da população total de células (espermatozoides e leucócitos) no M1 em relação ao M0 e M2 ($p < 0,05$), entretanto este parâmetro não diferiu entre M0 e M2. O teor de ROS foi inferior na população total (espermatozoides e leucócitos) no M1 em relação ao M0 ($p < 0,5$), porém não diferiu entre M0 e M2 e entre M1 e M2. Esses resultados permitem inferir que o tratamento local foi eficiente em reduzir a peroxidação lipídica e a produção de ROS após uma semana. Entretanto, a peroxidação lipídica voltou a se elevar após um mês do tratamento.

Quando essas mesmas análises foram realizadas em relação à população composta basicamente por espermatozoides, não houve diferença estatística entre os momentos de avaliação. Esse resultado sugere que a presença dos leucócitos é um fator determinante para o incremento de peroxidação lipídica e ROS nas amostras seminais descongeladas de animais com vesiculite seminal.

As ROS são geradas naturalmente durante a criopreservação do sêmen, entretanto quando presentes em quantidades elevadas promovem danos mais acentuados aos espermatozoides, por reagirem com os fosfolipídios da membrana espermática promovendo a peroxidação lipídica, alterando a fluidez e a integridade da membrana, o que prejudica a capacidade fecundante e a motilidade espermática (AITKEN, 1995). A presença de leucócitos e bactérias no sêmen leva a uma elevação de espécies reativas de oxigênio (ROS) além dos níveis considerados aceitáveis. Esta contaminação afeta integridade de membranas, função mitocondrial e integridade de DNA e aumenta a expressão de marcadores de apoptose na célula espermática, acarretando em redução da motilidade, longevidade e fertilidade do sêmen (VIGNERA *et al.*, 2011). Estudo realizado por Ortega-Ferrusola *et al.* (2009) avaliou a congelabilidade do sêmen equino em função da flora bacteriana naturalmente presente no ejaculado e os autores concluíram que bactérias como a *Klebsiella spp.* e *Streptococcus spp.* são responsáveis por danos subletais aos espermatozoides durante a criopresevação, por apresentarem correlação positiva com espermatozoides mortos e atividade de caspases.

*"(...) Ir à luta com determinação,
abraçar a vida com paixão, perder
com classe e vencer com ousadia, pois
o triunfo pertence a quem se atreve
(...)"*

Charles Chaplin

8. CONCLUSÕES

✓ A vesiculite seminal é mais prevalente em animais adultos e idosos, a monta natural constitui um fator predisponente para o surgimento da doença, a coloração amarelada do sêmen e dificuldade de ejaculação são sinais que sugerem a alteração da glândula e a bactéria mais prevalente envolvida na etiopatogenia da infecção é a *Pseudomonas aeruginosa*;

✓ A vesiculite seminal leva a um aumento do volume do ejaculado, redução da concentração espermática, redução dos parâmetros de cinética espermática e da porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra, aumento da porcentagem de espermatozoides com defeito de cauda, incremento da porcentagem de leucócitos e do número de UFC por mililitro no sêmen a fresco e elevação do teor de NO no plasma seminal;

✓ O tratamento local constitui uma alternativa paliativa trazendo melhora transitória da qualidade seminal por um período de uma semana, mas não após um mês de tratamento, no entanto essa melhora da qualidade seminal permite resultados superiores de aproveitamento biotecnológico do sêmen (congelamento e refrigeração).

✓ O tratamento local melhorou os parâmetros seminais de cinética e integridade de membrana plasmática no sêmen fresco, refrigerado e congelado. No sêmen fresco promoveu ainda redução do volume, aumento da concentração espermática, redução da contaminação leucocitária e de UFC por mililitro. No sêmen congelado promoveu redução da peroxidação lipídica e do teor de ROS. Essas modificações dos parâmetros seminais ocorreram após uma semana de tratamento, mas não após um mês, o que pode ser justificado pela recidiva da enfermidade.

“A luta pela vida nem sempre é vantajosa aos fortes nem aos espertos. Mais cedo ou mais tarde, quem cativa a vitória é aquele que crê plenamente.”

Napoleon Hill

REFERENCIAS

AITKEN, R. J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction Fertility and Development**, v.7, p.659-668, 1995.

AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine reproduction**. Philadelphia: Saunders, 1993, p.715-745.

AURICH, C.; SPERGSE, J. Influence of bacteria and gentamicin on cooled-stored stallion Spermatozoa. **Theriogenology**, v.67, p.912–918, 2007.

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.

BALL, B.A. Oxidative stress in sperm. In: MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, E.W.; VARNER, D.D. 2 ed: **Equine Reproduction**. Wiley-Blackwell, v.2, p. 991-995, 2011.

BARRIER-BATTUT, I.; DELAJARRAUD, H.; LEGRAND, E.; BRUYAS, J.F.; TAINURIER, D.; THORIN, C.; POULIQUEN, H. Calcium, magnesium, copper and zinc in seminal plasma of fertile stallions, and their relationship with semen freezability. **Theriogenology**, v.58, p.229-232, 2002.

BARTH, A.D.; BOWMAN, A.P. The sequential appearance of sperm abnormalities after scrotal, insulation or dexamethasone treatment in bulls. **Canadian Veterinary Journal**, v.35, p.93-102, 1994.

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.; LOVE, C.C.; HURTGEN, J.P.; CUMMINGS M.R.; KENNEY, R.M. Use of a semen extender containing antibiotic to improve the

fertility of a stallion with seminal vesiculitis due to *Pseudomonas aeruginosa*. **Theriogenology**, v.28, p.541–546, 1987.

BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D; HURTGEN, J.P; LOVE, C.C.; CUMMINGS, M.R.; STREZMIENSKI, P.J.; BENSON, C; KENNEY, R.M. Bilateral seminal vesiculitis and ampullitis in a stallion. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.15, n.192, p.525-526, 1988.

BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D. Stallion Management. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.8, p.205-218, 1992.

BLANCHARD TL, WOODS JA, BRINSKO SP, VARNER DD, BOOTHE DM. 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.

BERTONE, J.J. Urinary Tract Endoscopy of Horse. In: **Proceedings of the Annual Convention of the AAEP**, v. 44, p. 298-299, 1998.

BORTOLUZO, E.C.M.T. Avaliação dos níveis de óxido nítrico (NO) no plasma seminal humano e da interferência com os parâmetros seminais relacionados à fertilidade. 2004. p.142. Tese de Doutorado – Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara.

BOUÉ, F.; BLAIS, J.; SULLIVAN, R. Surface localization of P34H, an epididymal protein, during maturation, capacitation, and acrosome reaction of human spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.54, p.1009-1017, 1996.

BRINSKO, S.P., CROCKETT, E.C., SQUIRES, E.L. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. **Theriogenology**, v.54, p.129-136, 2000.

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.

BRUCE, L.; HULL, D.V.M.; M.S.; SUSAN, R.; VOGEL, D.V.M. Seminal Vesiculitis. **Veterinary Clinical Food Animal**, v. 24, p. 267–272, 2008.

CARNEVALE, E.M.; GRIFFIN, O.J.; GUINTER, O.J. Age-associated subfertility before entry of embryo into the uterus in mares. **Equine Veterinary Journal**, v.15, p.31-35, 1993.

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.

CLSI publication M100-S23 Suggested Grouping of US-FDA Approved Antimicrobial Agents That Should Be Considered for Routine Testing and Reporting on Nonfastidious Organisms by Clinical Laboratories, 2013.

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 a stallion. **Clinical Theriogenology**, v.3, n.3, p.366, 2011.

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

DELL'AQUA JR., J.A.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A.; ZAHN, F.S. Effect of packing systems and thawing temperature on spermatic parameters and fertility rate of frozen equine semen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, n.1, p.458-460, 2001.

ELEY, A.; HOSSEINZADEH, S.; HAKIMI, H.; GEARY, I.; PACEY, A.A. Apoptosis of ejaculated human sperm is induced by co-incubation with *Chlamydia trachomatis* lipopolysaccharide. **Human Reproduction**, v.20, p.2601–2607, 2005.

EVENSON, D.P.; JOST, L.K. Sperm chromatin structure assay: DNA denaturability. In: **Methods in Cell Biology. Flow Cytometry** DARZYNKIEWICZ, Z.; ROBINSON, J.P.; CRISSMAN, H.A. 2nd Ed. Academic Press, Inc., Orlando, v.42, p.159–176, 1994.

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.

GROTELUESCHEN, D.M.; MORTIMER, R.G.; ELLIS, R.P. Vesicular adenitis syndrome in beef bulls. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.205, n.6, p. 874-877, 1994.

GUASTI, P.N.; FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; MAZIERO, R.R.D.; HARTWIG, F.P.; MONTEIRO, G.A.; LISBOA, F.P.; PAPA, F.O. Validation of flow cytometry for assessment of membrane lipid peroxidation of equine spermatozoa. **IV International Symposium on Animal Biology of Reproduction**, p.17-20, 2012.

GUNN, A.J.; BROOKES, V.J. Neutrophil prevalence in dismount semen samples of Thoroughbred stallions. **Clinical Theriogenology**. v.3, n.4, p.487-481, 2011.

GUTHRIE, H.D.; WELCH, G.R. Use of fluorescence-activated flow cytometry to determine membrane lipid peroxidation during hypothermic liquid storage and freeze-thawing of viable boar sperm loaded with 4, 4-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-undecanoic acid. **Journal of Animal Science**. v.85, p.1402-1411, 2007.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 7ed. Barueri: Editora Manole Ltda, 2004.

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, n.1, p.343-352, 1990.

HOLST, W.V.D. Seminal vesiculitis in two stallions. **Tijdschr Diergeneeskd**, v.101, p.375-377, 1976.

IRWIN, W.K. The etiology and Treatment of Prostatitis and Vesiculitis. **British Journal of Venereal Diseases**, v.12, n.1, p.29, 1936.

JASKO, D.J; HATHAWAY, J.A; SCHALTENBRAND, V.L; SIMPER, W.D; SQUIRES, E.L. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.37, p.1241-1252, 1992.

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.

KENDALL, N.R.; McMULLEN, S.; GREEN, A.; RODWAY, R.G. The effect of a zinc, cobalt and selenium soluble glass bolus on trace element status and semen quality of ram lambs. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.277-283, 2008.

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

KRIEG, N.R.; HOLT, J.C. **Bergey's manual of systematic bacteriology**, 9.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, p.984, 1994.

LADDS, P.W. Pathological conditions of the reproductive tract of the bull. In: **Bulls course held at the university of queensland veterinary school**, Austrália. *Proccedings*. Brisbane. p.13, 1974.

LEBLANC, M.M. The chronically infertile mare. **Proceedings AEEP**, v.54, p.391-407, 2008.

LITTLE, T.V; HOLYOAK, G.R. Reproductive anatomy and physiology of the stallion. **Veterinary Clinics of North America Equine Practice**. v.8, n.1, p.1-29. 1992.

LOVE, C.C.; BRINSKO, S.P.; RIGBY, S.L.; THOMPSON, J.A.; BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D. Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. **Theriogenology**, v. 63, p. 1584-1591, 2005.

LU, K.G.; MORRESEY, P.R. Reproductive Tract Infections in Horses. **Veterinary Clinics Equine**, v.22, p.519–552, 2006.

MAH, T.F.; O'TOOLE, G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **TRENDS in Microbiology**. v.9, n.1, p.34-39, 2001.

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.

MARTINS, C.F.; DRIESSEN, K.; MELO COSTA, P.; CARVALHO-NETO, J.O.; DE SOUSA, R.V.; RUMPF, R.; DODE, M.N. Recovery, cryopreservation and fertilization potential of bovine spermatozoa obtained from epididymides stored at 5 °C by different periods of time. **Animal Reproduction Science**, v.116, n.1, p.50-57, 2009.

McDONNELL, S.M. Ejaculation: physiology and dysfunction. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.8, n.1, p.57-70, 1992.

McDONNELL, S.M. Practical review of self-mutilation in horses. **Animal Reproduction Science**, v.107, p.219–228, 2008.

MENZIES-GOW, N. Diagnostic endoscopy of the urinary tract of the horse. **Equine Practice**, v.29, p.208-213, 2011.

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.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Review**, v.43, n.2, p.109-134, 1991.

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 – 297, 2009.

MONTEIRO, G.A.; GUASTI, P.N.; ROCHA, A.S.; MARTIN, I; SANCLER-SILVA, Y.F.R.; FREITAS DELL'AQUA, C.P.; DELL'AQUA, J.R; PAPA, F.O. Effect of Storage Time and Temperature of Equine Epididymis on the Viability, Motion Parameters, and Freezability of Epididymal Sperm. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.33, p.169-173, 2013.

MORAN, D.M.; JASKO, D.J.; SQUIRES, E.L.; AMANN, R.P. Determination of temperature and cooling rate induced cold shock in stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.38, p.999–1012, 1992.

MOORE, H.D.M.; HIBBIT, K.C.S. The binding of labeled basic proteins by boar spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.46, p.71, 1976.

MOUSTAFA, A.R.; MEZAROS, I. Interrelationship between the total protein content of bovine seminal plasma and behavior of spermatozoa after freezing-and-thawing, **Acta Veterinary. Academic Scientific Hungary**, v.28, n.4, p.403-408, 1981.

ORTEGA-FERRUSOLA, C.; GONZALEZ-FERNANDEZ, L.; MURIEL, A.; MACIAS-GARCIA¹, B.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; TAPIA, J.A.; ALONSO, J.M.; PENA¹, F.J. Does the Microbial Flora in the Ejaculate Affect the Freezeability of Stallion Sperm? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 518–522, 2009.

PALMER, E. Factors affecting stallion semen survival and fertility. In: Proceedings of the 10th International. **Congress on Animal Reproduction**, Urbana – Champaign II, v.3, p.377, 1984.

PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A.; CARVALHO, I.M.; BICUDO, S.D.; RAMIRES, P.R.N.; LOPES, M.D. Coloração espermática segundo karras modificado pelo emprego do barbatimão (*Stryphnodendrum barbatiman*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.40, p.115-23, 1988.

PAPA, F.O.; ZAHN, F.S.; DELL'AQUA JR, J.A.; ALVARENGA, M.A. Utilização do diluente MP50 para a criopreservação do sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, n.3, p.184-187, 2002.

PAPA, F.O., MELO, C.M.; FIORATTI E.G.; DELLA'QUA, J.A.; ZAHN, F.S.; ALVARENGA, M.A. Freezing of stallion epididymal sperm. **Animal Reproduction Science**, v.107, p.293-301, 2008.

PICKETT, B.W.; FAULKNER, L.C.; SUTHERLAND, T.M. Effect of month and stallion on seminal characteristics and sexual behavior. **Journal of Animal Science**. v.31, p.713, 1970.

PICKETT, B.W.; VOSS, J.L. Reproductive management of the stallion. **Proceedings of. 18th Annual A.A.E.P.**, p.501, 1972.

PICKETT, B.W. Retrospective and review. **Biology of Reproduction Monographs**, v.1, p.547–564, 1995.

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**. Article in Press, 2014.

POLAKOSKI, K.L.; KOPTA, M. Seminal plasma. In: **Biochemistry of mammalian reproduction**. Ed. Zaneveld LJD, Chatterton RT. John Wiley & Sons. New York, USA, p.89-117, 1982.

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.

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

PROVINCE, C.A.; SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; AMANN, R.P. Cooling rate, storage temperature and fertility of extended equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.23, p.925-934, 1985.

QUINN, P.J.; CARTER, M.E.; MARKEY, B.K.; CARTER, G.R. 1st Ed: **Clinical Veterinary Microbiology**. Mosby Ed., London, England, p.648. 1994.

RAMIRES-NETO, C. ; MONTEIRO, G.A. ; DELFIOL, D.J.Z.; FARRAS, M.C.; DELL'AQUA, J.A. ; PAPA, F.O. ; ALVARENGA, M.A. The relationships between scrotal surface temperature, age and sperm quality in stallions. **Livestock Science**, v.157, p.358–363, 2013a.

RAMIRES-NETO, C.R.; MONTEIRO, G.A.; SOARES, R.F.; PEDRAZZI, C.; DELL'AQUA, J.A; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Effect of Removing Seminal Plasma Using a Sperm Filter on the Viability of Refrigerated Stallion Semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.33, p.40-43, 2013b.

RIJSSELAERE, T.; VAN SOOM, A.; MAES, D.; DE KRUIF, A. Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted canine spermatozoa. **Theriogenology**, v.57, p.1669–1681, 2004.

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

SACK, W.O; HACKETT, M.S. **Rooney's Guide to the Dissection of the Horse**, Veterinary Textbooks, New York, 2001.

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

SANCLER-SILVA, Y.F.R.; MONTEIRO, G.A.; IGNACIO, F.S.; HARTWIG, F.P.; PAPA, F.O. Processing of semen with pyospermia allows its use in equine embryo transfer programs. **Reproduction, Fertility and Development**, v.25, n. 1, p.229, 2012.

SANCLER-SILVA, Y.F.R.; RAMIRES-NETO, C. ; MONTEIRO, G. A. ; RESENDE, H. L. ; ALVARENGA, M.A. ; PAPA, F.O. Consequences of hemospermia and urospermia for quality of stallion semen. In: ESDAR, 2013, Bolonha. **Reproduction Domestic Animals**, v.48, 2013.

SATTA, A.; STIVALA, A.; GAROZZO, A.; MORELLO, A.; PERDICHIZZI, A.; VICARI, E.; SALMERI, M.; CALOGERO, A.E. Experimental Chlamydia trachomatis infection causes apoptosis in human sperm. **Human Reproduction**, v.21, p.134–137, 2006.

SCHUMACHER J.J; VARNER, D.D. Surgery of the penis and prepuce. In: **Equine Reproduction**, MCKINNON, A.O; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. 2nd Ed. Lea & Febiger, Philadelphia, PA. 2008.

SIEME H, KATILA T, KLUG E, Effect of semen collection practices on sperm characteristics before and after storage and on fertility of stallions. **Theriogenology**, v.61, p.769- 784, 2004.

STEINER, J. Stallion reproductive tract. In: **Atlas of Equine Endoscopy**, SLOVIS, N.M., 1st Ed. St Louis, Mosby. 2004.

STORNELLI, M.C.; TITTARELLI, C.M.; SAVIGNONE, C.A.; STORNELLI, M.A. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. **Analecta Veterinária**, v.25, n.2, p.28-35, 2005.

SOJKA, J.E.; CARTER, G.K. Hemospermia and seminal vesicle enlargement in a stallion. **Compendium Continue Education Practice Veterinary**, v.7, p.587-588, 1985.

SQUIRES, E.; AMANN, R.P.; MCKINNON, A.O.; PICKETT, B.W. Fertility of equine spermatozoa cooled to 5 or 20 C. In: **Proceedings of the 11th International Congress on Animal Reproduction**, v. 3, p.297–299, 1988.

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

TIBARY, A.; RODRIGUEZ, 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.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.M. **Microbiologia**. 4 ed. São Paulo: Atheneu, p. 718, 2005.

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. Problems of the accessory sex glands. **Clinical Theriogenology**, v.3, n.3, p.279-283, 2011.

VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; MEYERS, P.J.; MAYERS, S.A. Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 hrs at 5 or 20 C. **Theriogenology**, v.32, p.515-525, 1989.

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.; TAYLOR, T.S.; BLANCHARD, T.L. Seminal Vesiculitis. In: **Equine Reproduction**. McKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. 2nd Ed. Willey-Blackwell, 2011.

VARNER, D.D.; SCHUMACHER, J. Abnormalities of the Accessory Sex Glands. In: **Equine Reproduction**. McKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. 2nd Ed. Willey-Blackwell, v.1, p.1113-1118, 2011.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.I.; OCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, p.149-179, 2002.

VICARI, E.; Seminal leukocyte concentration and related specific radical oxygen species production in different categories of patients with male accessory gland infection. **Human Reproduction**, v.14, p.2025-2030, 1999.

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.

VOSS, J.L.; WOTOWEY, J.L. Hemospermia. *Proceedings of AAEP*, p.103-112, 1972.

VOSS, J.L.; PICKETT, B.W.; SCHIDELER, R.K. The effect of hemospermia on fertility in horses. **Proceedings of 8th ICAR**, v.1, p.271, 1976.

VOSS, J.L.; McKINNON, A.O. Hemospermia and Urospermia. In: McKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine reproduction**. Philadelphia: Saunders, p.864-870, 1993.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim. Reprod.Sci.**, v.60, p.481-492, 2000.

WEBB, R.L.; EVANS, J.W.; ARNS, M.J.; WEBB, G.W.; TAYLOR, T.S.; POTTER, G.D. Effects of vesicectomy on stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.10, n.3, p.218-223, 1990.

WONG, J.M; BILLIAR, T.R. Regulation and function of inducible nitric oxide synthase during sepsis and acute inflammation. **Advances in Pharmacology**, v.34, p.155-170, 1995.

ZAHN, F.S.; PAPA, F.O.; MELO, C.M. Blood serum, seminal plasma and sperm membrane protein profiles in stallions: Are they correlated to semen freezability? **Animal Reproduction Science**, v.64, p.64-66, 2006.

“O degrau de uma escada não serve simplesmente para que alguém permaneça em cima dele, destina-se a sustentar o pé de um homem pelo tempo suficiente para que ele coloque o outro um pouco mais alto.”

Thomas Huxley

ARTIGO CIENTÍFICO

O trabalho será enviado para o periódico Veterinária e Zootecnia.

EFEITO DO TRATAMENTO LOCAL DE VESICULITE SEMINAL SOBRE A QUALIDADE DO SÊMEN EQUINO A FRESCO

Yamê Fabres Robaina Sancler da Silva¹

Gabriel Augusto Monteiro¹

Carlos Ramires Neto¹

Camila de Paula Freitas Dell'aqua¹

André Maciel Crespilho²

Frederico Ozanam Papa¹

RESUMO

Os objetivos do presente estudo incluíram: avaliar e comparar o efeito do tratamento local de vesiculite seminal em garanhões quanto aos índices de cinética e morfologia espermática, integridade de membrana plasmática, porcentagem de leucócitos e contagem de unidades formadoras de colônias de amostras seminais frescas e o teor de óxido nítrico no plasma seminal, antes (M0), após uma semana (M1) e um mês (M2) da terapia. Os resultados obtidos demonstram que o tratamento local após uma semana leva a uma melhora da qualidade seminal, mediante redução do volume do ejaculado, aumento da concentração espermática, incremento da cinética espermática e da porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra, redução da porcentagem espermatozoides com defeitos de cauda, redução da porcentagem de leucócitos e do número de UFC por mililitro no sêmen a fresco e redução do teor de NO no plasma seminal ($p < 0,05$). Entretanto, essa melhora da qualidade seminal não se mantém após um mês da terapia, uma vez que os parâmetros seminais nesse momento se assemelham ao momento pré-tratamento, o que pode ser explicado pela recidiva da doença. **Palavras-chave:** vesiculite seminal, piospermia, sêmen equino.

¹Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP- Campus de Botucatu/SP.

²Departamento de Reprodução Animal – Faculdade de Medicina Veterinária – UNISA- Santo Amaro/SP.

EFFECT OF LOCAL TREATMENT OF SEMINAL VESICULITIS ON THE QUALITY OF EQUINE FRESH SEMEN

ABSTRACT

The aims of this study included: to evaluate the effect of local treatment of seminal vesiculitis in stallions as the sperm kinetic parameters, morphology, plasma membrane integrity, percentage of leukocytes and counting colony forming units of fresh semen samples and content of nitric oxide in seminal plasma, before (M0) after one week (M1) and after one month (M2) therapy. The results demonstrate that local treatment after a week leads to an improvement of sperm quality by reducing the volume of ejaculate, increased sperm concentration, increased sperm kinetics and percentage of sperm with intact plasma membrane, reducing the percentage spermatozoa with tail defects, decrease of leukocytes and the percentage of CFU per ml in fresh semen and reduction of the NO content in seminal plasma ($p < 0.05$). However, this improvement in semen quality is not maintained after one month of therapy, since the seminal parameters at this time are similar to the pre-treatment, which can be explained by recurrent disease. **Keywords:** seminal vesiculitis, piospermia, equine semen.

EFECTO DEL TRATAMIENTO LOCAL DE VESICULITE SEMINAL SOBRE LA CALIDAD DEL SEMEN EQUINO FRESCO

RESUMEN

Los objetivos del estudio fueron: evaluar el efecto del tratamiento local de vesiculite seminal en los sementales como los parámetros cinéticos de espermatozoides, la morfología, la integridad de la membrana plasmática, el porcentaje de leucocitos y recuento de unidades formadoras de colonia de muestras de semen fresco y el contenido de óxido nítrico en lo plasma seminal, antes (M0), después de una semana (M1) y después de uno mes de terapia (M2). Los resultados demuestran que el tratamiento local después de una semana conduce a una mejora de la calidad del esperma mediante la reducción del volumen de eyaculación, aumento de la concentración de esperma, el aumento de la cinética de esperma y el porcentaje de espermatozoides con la membrana plasmática intacta, reduciendo el porcentaje de espermatozoides con defectos de la cola, disminución de leucocitos y la porcentaje de UFC por ml en semen fresco y la reducción del contenido de NO en el plasma seminal ($p < 0,05$). Sin embargo, esta mejora en la calidad del semen no se mantiene después de uno mes de la terapia, ya que los parámetros seminales en este momento son similares a la de pre-tratamiento, que puede ser explicado por la enfermedad recurrente. **Palabras clave:** vesiculitis seminal, piospermia, semen equino.

INTRODUÇÃO

O animal acometido pela infecção da glândula vesicular, denominada vesiculite seminal, apresenta frequentemente o histórico de infertilidade ou subfertilidade, distúrbio ejaculatório, disseminação de patógenos sexualmente transmissíveis e alterações físico-químicas do sêmen, que levam à redução na qualidade e longevidade seminal (1,2,3,4,5). Essas alterações são causadas pela presença de polimorfonucleares, hemácias e bactérias no ejaculado que promovem aglutinação, precipitação, redução da motilidade espermática, incremento da produção de espécies reativas de oxigênio e citocinas pró-inflamatórias, culminando em apoptose da célula espermática e consequente perda de sua função (6,7,8). A vesiculite seminal possui grande relevância na clínica reprodutiva devido à dificuldade de tratamento, elevados índices de recidiva, risco de contaminação de fêmeas com agentes patogênicos sexualmente transmissíveis e inutilização de animais, gerando considerável prejuízo econômico ao criador e frustração ao médico veterinário (4,5,8).

O tratamento convencional utiliza antibióticos por via sistêmica e é quase sempre ineficaz, devido à farmacodinâmica e farmacocinética da maioria dos medicamentos disponíveis, uma vez que eles não atingem as glândulas sexuais acessórias em concentrações adequadas (9,10,11). Dessa forma, o tratamento local tem sido apontado por diversos autores como a melhor alternativa terapêutica (5,8,10,11). Apesar disso, nenhum estudo foi realizado no intuito de avaliar a eficácia do tratamento local em garanhões com vesiculite seminal e seu impacto na qualidade do sêmen.

Nesse sentido, os objetivos do presente estudo incluíram: avaliar o efeito do tratamento local de vesiculite seminal em garanhões quanto aos índices de cinética e morfologia espermática, integridade de membrana plasmática, porcentagem de leucócitos e contagem de unidades formadoras de colônias de amostras seminais frescas e o teor de óxido nítrico no plasma seminal, antes e após a terapia.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e local da pesquisa

Foram utilizados 5 garanhões entre 7 e 19 anos de idade (média de 12,5 anos), sendo dois da raça Quarto de Milha, um da raça Apaloosa, um da raça Crioula e um da raça Mangalarga Paulista. Os animais possuíam histórico de piospermia e foram

diagnosticados com vesiculite seminal, mediante exame reprodutivo, endoscopia da vesícula seminal e cultura bacteriana do lavado vesicular. A partir dos lavados vesiculares foram realizados cultura bacteriana e antibiograma seguindo as normas da CLSI (CLSI - Manual Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013), no intuito de selecionar o melhor antibiótico a ser utilizado no tratamento local para cada caso.

As análises das amostras foram realizadas no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária e no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) – UNESP – Botucatu/SP, Brasil.

Coletas e processamento do sêmen pré-tratamento

Uma vez estabelecido o diagnóstico de vesiculite seminal procedeu-se o início das coletas de sêmen. Foram coletados dois ejaculados antes de iniciar o tratamento local para vesiculite seminal (Momento 0, M0) com intervalo de 48 horas entre elas, utilizando vagina artificial modelo Botucatu (Botupharma[®], Botucatu/SP, Brasil).

Uma parte do sêmen fresco foi mantida *in natura* (sem adição de diluentes), para avaliação do pH, osmolaridade, concentração e morfologia espermática, contagem de Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL) e porcentagem de leucócitos. A partir do plasma seminal foi ainda avaliado o teor de Óxido Nítrico (NO).

A outra parte do sêmen fresco foi diluída a uma concentração de 50×10^6 espermatozoides/mL com o diluente Botusêmen (Botupharma[®], Botucatu/SP, Brasil) e com essa amostra foram realizadas as avaliações de cinética espermática e integridade de membrana plasmática.

Tratamento local

Após a última coleta de sêmen pré-tratamento, iniciou-se o tratamento local do garanhão com antibiótico de eleição.

Para o procedimento foi utilizado um equipamento videoendoscópico flexível (3,0 m de comprimento e 9.8 mm de diâmetro). Após acessar o lúmen da vesícula seminal, com auxílio do cateter de polipropileno, procedeu-se lavagens sucessivas (infusão seguida de aspiração) com um volume aproximado de 100 mL de solução de Ringer Lactato, até o líquido recuperado apresentar-se translúcido.

Uma vez terminada as lavagens, foi aspirado todo o conteúdo presente no lúmen glandular, seguido de infusão do antibiótico de eleição em um volume variando de 30 a 60 mL, na dependência da droga utilizada e sua concentração.

Esse tratamento foi realizado em ambas as vesículas seminais diariamente, por dez dias consecutivos.

Coletas e processamento do sêmen pós-tratamento

Uma semana após o término do tratamento foram iniciadas duas coletas de sêmen, com intervalo de 48 horas entre elas (Momento 1, M1) e um mês após o término do tratamento foram realizadas duas novas coletas, com intervalo de 48 horas entre elas (Momento 2, M2).

Essas amostras foram coletadas e processadas da mesma maneira do Momento 0 (coletas pré-tratamento), conforme descrito anteriormente.

Análise das amostras

As análises das amostras seminais nos momentos pré-tratamento (M0), uma semana pós-tratamento (M1) e um mês pós-tratamento (M2) se procederam da mesma maneira.

Características físico-químicas

Após a obtenção do sêmen as características físico-químicas foram avaliadas quanto ao volume, coloração, pH, osmolaridade e concentração espermática.

O volume seminal foi estabelecido com o auxílio de uma proveta de 100 mL; a coloração foi determinada visualmente, sendo o sêmen classificado em normal quando apresentava-se branco ou branco-acizentado e alterado quando apresentava-se avermelhado ou amarelado; o pH foi mensurado em pHmetro (Analion PM 608, Analion[®], Ribeirão Preto/SP, Brasil); a osmolaridade foi determinada em osmômetro (PZL1000, PZL tecnologia em equipamentos, Londrina/PR, Brasil); a concentração espermática (mm³) foi determinada por meio de câmara hematocitométrica de Neubauer (Optik Labor[®], Lancing, Inglaterra), sob microscopia de contraste de fase, em aumento de 200 vezes.

Cinética espermática do sêmen fresco

O sêmen fresco diluído a uma concentração de 50×10^6 espermatozoides/mL foi avaliado quanto à cinética espermática pelo método computadorizado – CASA em relação aos seguintes parâmetros: porcentagens de espermatozoides com motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e de espermatozoides rápidos (RAP), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$) e velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$).

Integridade de membrana plasmática

A análise da integridade de membrana plasmática foi realizada pela técnica de microscopia de epi-fluorescência, utilizando-se a associação das sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio (IP) segundo descrição de Harrison e Vickers (1990). Nessa análise 100 células foram contadas, sendo os espermatozoides corados integralmente em verdes considerados íntegros e os espermatozoides corados em vermelho ou em verde e vermelho, considerados lesados.

Morfologia espermática

A análise de morfologia espermática foi realizada em microscópio de interferência de contraste diferencial de fase (DIC). Para isso uma preparação úmida de 500 μL de sêmen em 500 μL de formol salina a 10% (1:1) foi realizada e cem células foram avaliadas quanto à morfologia de cabeça e cauda, resultando em uma porcentagem dos defeitos encontrados.

Porcentagem de leucócitos

A porcentagem de leucócitos foi acessada mediante avaliação em microscopia óptica de luz de esfregaços de sêmen corados com kit de corantes hematológicos (Panótico Rápido). Cem células foram avaliadas entre leucócitos e espermatozoides, gerando uma porcentagem.

Dosagem de Óxido Nítrico (NO)

As amostras de plasma seminal foram descongeladas em temperatura ambiente para realização das dosagens de Óxido Nítrico (NO) segundo metodologia descrita por (12).

As concentrações de nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-) foram determinadas pelo método de reação colorimétrica de Griess em um espectrofotômetro (Multiskan EX Primary EIA V 2.1-0) com absorvância de cor em 540 nm, para estimar a concentração de NO total, no Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal da Universidade Estadual do Norte Fluminense.

As reações calorimétricas permitiram estimar o total de metabólitos (NO_2^- e NO_3^-) na amostra. Dessa forma, com a soma do total de nitrito e nitrato na amostra determinou-se o valor de óxido nítrico total (NO).

Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL)

Para realizar a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) das amostras de sêmen puro, uma alíquota de 0,1 mL da amostra seminal foi diluída em 9,9 ml de solução salina. Uma alíquota de 0,1 ml desta amostra foi plaqueada em meio Ágar Muller-Hinton. As placas semeadas foram incubadas e as colônias bacterianas contadas após um período de 24 horas. De acordo com a diluição realizada, o total de colônias identificadas representa 10^3 UFC/mL.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram avaliados através do software GraphPadInstat 5.0 (San Diego, CA, USA) e expressos na forma de média e erro padrão. Os dados laboratoriais foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov para verificação de normalidade ou homocedasticidade. Para as médias obtidas que apresentaram distribuição normal foi utilizado a análise de medidas repetidas (Two-Way ANOVA) e teste “T” de Student, considerando-se os diferentes grupos como tratamento e o efeito de garanhão/ejaculado como blocos. Para os resultados laboratoriais que não apresentaram distribuição normal e/ou variâncias iguais (amostras independentes) foi aplicado o teste não paramétrico de Dunn. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ e tendências quando $0,05 < p \leq 0,1$.

Para avaliação da associação entre as variáveis laboratoriais foi utilizado o teste de correlação Pearson (Proc Corr®version 9.1.3, SASInstitute Inc., Cary, NC, USA). Os resultados gerados foram apresentados na forma de coeficiente de correlação e diferenças significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

A Tabela 1 descreve as características seminais de concentração espermática, volume, número de espermatozoides totais, pH e osmolaridade. O valor médio do volume do ejaculado no M1 foi menor do que no M0 e M2, enquanto que o valor médio da concentração espermática no M1 foi maior em comparação ao M0 e M2 ($p < 0,05$). Não houve diferença entre M0 e M2 quanto aos volumes dos ejaculados e concentrações espermáticas.

TABELA 1 - Médias e erros-padrão ($X \pm EP$) da concentração espermática (mm^3), volume (mL), pH e osmolaridade (mOsm) do sêmen fresco de garanhões pré-tratamento (M0), uma semana pós-tratamento (M1) e um mês pós-tratamento (M2).

MOMENTOS (n=10)	VOL (mL)	CONCENT ($10^3/\text{mm}^3$)	SPTZs TOTAIS (10^6)	pH	OSMOL (mOsm)
M0	72,5 $\pm$ 13,02 ^a	78,9 $\pm$ 15,28 ^a	5556 $\pm$ 1510,48	7,5 $\pm$ 0,06	296,5 $\pm$ 4,27
M1	42,5 $\pm$ 10,88 ^b	186 $\pm$ 28,58 ^b	6865 $\pm$ 1717,93	7,4 $\pm$ 0,06	299,3 $\pm$ 7,55
M2	63,4 $\pm$ 6,40 ^a	98 $\pm$ 18,78 ^a	6410 $\pm$ 1628,15	7,4 $\pm$ 0,05	295,9 $\pm$ 3,51

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0,05$).

A Tabela 2 descreve os parâmetros de cinética espermática e integridade de membrana avaliados a cada momento M0, M1 e M2. Os valores médios de MT, MP, RAP e IM foram superiores no M1 em comparação aos demais momentos ($p < 0,05$). Entretanto, não houve diferença significativa entre os parâmetros de cinética espermática entre M0 e M2.

TABELA 2 - Médias e erros-padrão ($X \pm EP$) da MT (%), MP (%), VAP ($\mu\text{m/s}$), VSL ($\mu\text{m/s}$), VCL ($\mu\text{m/s}$), RAP (%) e IM (%) de espermatozoides do sêmen fresco de garanhões em três momentos de avaliação (M0, M1 e M2).

MOMENTOS (n=10)	MT (%)	MP (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	RAP (%)	IM (%)
M0	46,5 $\pm$ 5,13 ^a	19,3 $\pm$ 3,86 ^a	118,6 $\pm$ 6,40	86,7 $\pm$ 4,13	220,4 $\pm$ 15,72	22,2 $\pm$ 1,82 ^a	47,5 $\pm$ 4,65 ^a
M1	75,1 $\pm$ 3,42 ^b	33,4 $\pm$ 2,39 ^b	119,6 $\pm$ 4,72	91,3 $\pm$ 1,61	218,3 $\pm$ 5,38	52,2 $\pm$ 5,65 ^b	62,9 $\pm$ 5,41 ^b
M2	42,8 $\pm$ 5,28 ^a	16,5 $\pm$ 2,40 ^a	110,3 $\pm$ 10,74	82,1 $\pm$ 4,17	183,0 $\pm$ 16,17	22,1 $\pm$ 2,62 ^a	39,1 $\pm$ 4,32 ^a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0,05$).

Na Tabela 3 estão demonstrados os valores dos defeitos morfológicos de cabeça e cauda dos espermatozoides em cada um dos momentos avaliados: M0, M1 e M2. O M1 apresentou menor porcentagem de defeitos morfológicos de cauda em comparação ao M0 e M2 ($p < 0,05$). A porcentagem dos defeitos morfológicos de cauda não diferiu entre M0 e M2.

TABELA 3 - Médias e erros-padrão ($X \pm EP$) dos defeitos morfológicos de cabeça (%) e defeitos morfológicos de cauda (%) de espermatozoides do sêmen fresco de garanhões em três momentos de avaliação (M0, M1 e M2).

MOMENTOS (n=10)	*DEFEITOS DE CABEÇA (%)	**DEFEITOS DE CAUDA (%)
M0	2,3 $\pm$ 0,37	32,1 $\pm$ 1,97 ^a
M1	2,1 $\pm$ 10,46	21,1 $\pm$ 1,22 ^b
M2	2,8 $\pm$ 0,33	28,5 $\pm$ 2,69 ^a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0,05$).

*Isolada normal, isolada anormal, contorno anormal, subdesenvolvida, piriforme e estreita na base. **Gota citoplasmática distal, gota citoplasmática proximal, cauda dobrada, cauda enrolada e cauda fortemente dobrada/enrolada.

Na Tabela 4 estão descritos a porcentagem de leucócitos e a contagem de UFC por mililitro das amostras seminais, bem como o teor de óxido nítrico no plasma seminal, nos M0, M1 e M2. O M1 apresentou menor porcentagem de leucócitos no sêmen em relação ao M0 e M2 ($p < 0,05$), entretanto, esses últimos momentos não variaram entre si.

A contagem de UFC no sêmen foi menor em M1 em comparação ao M0 ($p < 0,05$), porém esse parâmetro não diferiu entre M0 e M2 e entre M1 e M2. O teor de

óxido nítrico no plasma seminal foi inferior no M1 em comparação ao M0 ($p < 0,05$), porém não variou em relação ao M2 e entre M0 e M2.

TABELA 4 - Médias e erros-padrão ($X \pm EP$) da porcentagem de leucócitos, número de UFC/mL e teor de NO no sêmen fresco e plasma seminal de garanhões em três momentos de avaliação (M0, M1 e M2).

MOMENTOS (n=10)	LEUCÓCITOS (%)	UFC (10³/mL)	ÓXIDO NÍTRICO (nMol)
M0	35,2±2,36 ^a	119980±19528,0 ^a	0,645±0,172 ^a
M1	15,1±2,55 ^b	5375±2453,7 ^b	0,117±0,023 ^b
M2	36,1±4,04 ^a	65850±19701,0 ^{ab}	0,364±0,110 ^{ab}

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças estatísticas entre os grupos ($p < 0,05$).

Na Tabela 5 estão descritos os coeficientes de correlação e o valor de p, entre as variáveis analisadas. A MT obteve correlação negativa com a porcentagem de leucócitos, a contagem de UFC, teor de óxido nítrico e porcentagem de defeitos morfológicos de cauda. A MP obteve correlação negativa com a porcentagem de leucócitos e a contagem de UFC. A IM obteve correlação negativa com a porcentagem de leucócitos. A RAP obteve correlação negativa com a porcentagem de leucócitos. A contagem de UFC obteve correlação positiva com porcentagem de leucócitos e porcentagem de defeitos de cauda.

TABELA 5 – Análises de correlação e valor de p das variáveis MT (%), MP (%), IM (%), RAP (%) e contagem de UFC (10³/mL) em relação a porcentagem de leucócitos (%), contagem de UFC (10³/mL), teor de NO (nMol) e defeitos de cauda (%).

VARIÁVEIS	LEUCO	UFC	NO	DEF CAUDA
MT	-0,73 p<0,0001	-0,65 p<0,0001	-0,49 p<0,005	-0,62 p<0,0002
MP	-0,66 p<0,0001	-0,60 p<0,0004	-	-
IM	-0,61 p<0,0003	-	-	-
RAP	-0,8 p<0,0001	-	-	-
UFC	0,61 p<0,0003	-	-	0,63 p<0,0001

DISCUSSÃO

O volume do ejaculado reduziu significativamente entre o momento pré-tratamento (M0) e após uma semana do término do tratamento local (M1) ($p < 0,05$), demonstrando que a vesiculite seminal leva a um aumento desse parâmetro e que o tratamento interferiu no volume de plasma seminal produzido pela vesícula seminal, uma vez que na espécie equina as glândulas sexuais acessórias são responsáveis por 95% do volume do ejaculado (3). O aumento do volume seminal pode estar relacionado ao conteúdo inflamatório produzido pela glândula acometida, uma vez que a infecção da vesícula seminal resulta em acúmulo de material purulento e/ou sanguinolento em seu interior, que é lançado no sêmen no momento da ejaculação (5).

Após um mês do término do tratamento (M2), o volume do ejaculado voltou a aumentar ($p < 0,05$) em relação ao M1 e se tornou igual ao momento pré-tratamento (M0), indicando um retorno do processo infeccioso após um mês da terapia. A glândula vesicular tem uma influência significativa no volume de sêmen produzido pelo garanhão. Estudando os efeitos da vesiculectomia em garanhões (12) perceberam que dentre os principais resultados obtidos do procedimento cirúrgico, estava a redução do volume total ejaculado e do gel.

A concentração espermática apresentou aumento significativo após uma semana do término do tratamento (M1) em relação ao momento pré-tratamento (M0). Entretanto, após um mês da terapia (M2) a concentração espermática voltou a reduzir, sendo significativamente diferente de M1 ($p < 0,05$), mas não de M0. Em humanos, (13) estabeleceu uma classificação para caracterizar homens com próstato-vesículo-epididimite crônica e dentre os critérios utilizados estava a redução da concentração espermática. Embora a concentração espermática tenha variado ao longo da avaliação, ela se manteve dentro dos parâmetros de normalidade para a espécie equina, não sendo caracterizado quadro de oligospermia em nenhum dos momentos.

O pH e a osmolaridade do sêmen não variaram entre os momentos avaliados, sendo esta uma característica que não se altera antes e após o tratamento local de vesiculite seminal. Em touros (14) e em homens (7) afetados com vesiculitis seminal é relatado a ocorrência de elevação do pH seminal. Entretanto, em nosso estudo o pH e a osmolaridade não tiveram grande discrepância em relação ao pH e osmolaridade do sêmen de garanhões saudáveis, que são de 7,47 e 302 mOsm, respectivamente (15,16).

Os parâmetros de cinética espermática, como motilidade total, motilidade progressiva e porcentagem de espermatoídes rápidos, bem como a integridade de membrana plasmática, obtiveram um aumento significativo após uma semana do tratamento local (M1) em relação ao momento pré-tratamento (M0) ($p < 0,05$). Entretanto, esses parâmetros voltaram a piorar após um mês do tratamento (M2), de forma a não apresentarem diferença estatística com o M0 e uma redução significativa em relação ao M1 ($p < 0,05$). A qualidade dos espermatozoides, quanto à cinética espermática e integridade de membrana plasmática, pode parecer inalterada no sêmen de garanhões com vesiculite seminal, analisado imediatamente após a ejaculação, mas a longevidade desses espermatozoides é geralmente reduzida (17). Os dados do presente trabalho demonstram que a cinética espermática e integridade de membrana plasmática do sêmen de garanhões acometidos com vesiculite seminal sofreram uma redução da qualidade desde o momento a fresco, imediatamente após a ejaculação, contrariando o que é relatado na literatura.

A semelhança dos parâmetros de cinética espermática entre o M0 e M2, e o aumento dos parâmetros no M1, em relação aos demais momentos, sugere que o tratamento local para vesiculite seminal melhorou a qualidade do sêmen após uma semana do tratamento, mas esta não se manteve após um mês (M2). A vesiculite seminal em touros também é caracterizada por uma redução significativa da motilidade espermática, associada a concentrações anormais de polimorfonucleares no sêmen (14).

Uma semana após o tratamento (M1) houve uma redução significativa na porcentagem de defeitos morfológicos de cauda em relação ao momento pré-tratamento ($p < 0,05$). Porém, após um mês do tratamento (M2), houve incremento desse parâmetro em relação ao M1 ($p < 0,05$), apresentando porcentagem semelhante ao M0, sendo este mais um indício de que o tratamento local foi eficiente em melhorar a qualidade seminal após uma semana, mas não foi eficiente em manter essa qualidade após um mês. O aparecimento de anormalidades de cauda de espermatozoides no sêmen pode indicar que essas células sofreram efeitos de estresse térmico, disfunção epididimária ou choque osmótico (18). A osmolaridade no presente estudo não foi um fator contribuinte para o aparecimento de alterações morfológicas de cauda, uma vez que ela se manteve entre os valores normais para espécie em todos os momentos avaliados, entretanto o aumento da temperatura causado pela inflamação da glândula vesicular e consequentemente de seu conteúdo, associada ao processo inflamatório do epidídimo observado em alguns animais durante a evolução da doença (antes do processo de

triagem) e após o tratamento local, podem explicar a elevada porcentagem de defeitos morfológicos de cauda nos momentos M0 e M2.

O tratamento local levou à redução significativa da porcentagem de leucócitos na amostra após uma semana do tratamento (M1) em relação ao momento pré-tratamento (M0) ($p < 0,05$), porém essa redução não se manteve após um mês do tratamento (M2), uma vez que a porcentagem voltou a apresentar valor semelhante ao M0. Apesar de haver uma redução na porcentagem de leucócitos no M1, esta permaneceu em uma média de 15,1% nas amostras, enquanto que no M0 e M2 apresentou médias de 35,2% e 36,1%, respectivamente. Em humanos a piospermia é uma condição relativamente comum e não é considerada um bom marcador para infecções do trato genital ou para a qualidade seminal (10).

Um estudo realizado por (19) considerou que 20% das amostras seminais de garanhões PSI sadios apresentam algum grau de leucócitos sem prejuízos à qualidade seminal. Entretanto, para (6) até mesmo discreta presença de leucócitos no sêmen podem causar redução da qualidade seminal, uma vez que os leucócitos produzem cem vezes mais espécies reativas de oxigênio (ROS), do que o espermatozoide, aumentando o estresse oxidativo do meio. O tratamento local realizado por [20] por um período de 10 dias em um garanhão com de vesiculite seminal foi considerado efetivo após avaliação com 10 dias do término do tratamento, apesar de o garanhão continuar apresentando neutrófilos nos ejaculados.

No presente experimento, a porcentagem de leucócitos obteve uma correlação positiva ($p < 0,05$) em relação ao número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Esse resultado pode ser explicado pela quimiotaxia induzida pelas bactérias envolvidas no processo infeccioso da vesícula seminal. A presença de leucócitos e bactérias no sêmen leva a um incremento significativo de ROS e citocinas pró-inflamatórias, afetando, com isso, integridade de membranas, função mitocondrial e integridade de DNA, acarretando em aumento da expressão de marcadores de apoptose na célula espermática. Como resultado desse efeito deletério no sêmen é observado redução na motilidade espermática e na longevidade e fertilidade do sêmen (7). Esses efeitos podem explicar a correlação negativa da porcentagem de leucócitos e do número de UFC por mililitro em relação à motilidade total, motilidade progressiva, espermatozoides rápidos e integridade de membrana plasmática dos espermatozoides das amostras seminais ($p < 0,05$).

O tratamento local levou a uma redução acentuada de UFC por mililitro após uma semana do tratamento (M1) em relação ao momento pré-tratamento (M0) ($p<0,05$), demonstrando que o tratamento local foi efetivo em reduzir a carga bacteriana do sêmen. Todavia, após um mês do tratamento o número de UFC por mililitro voltou a aumentar, porém esse aumento não representou diferença em relação ao M1 e também não apresentou diferença estatística em relação ao M0, apesar de grande diferença numérica. Esse resultado demonstra que embora o tratamento não tenha sido efetivo em melhorar a qualidade seminal após um mês do tratamento em relação aos diversos parâmetros anteriormente expostos, como volume seminal, concentração, cinética espermática, integridade de membrana plasmática, bem como porcentagem de leucócitos, o crescimento bacteriano parece estar ainda em desenvolvimento, caracterizando o processo de recidiva da doença, sem que o processo infeccioso nesse momento (M2) seja da mesma dimensão do momento pré-tratamento (M0).

O óxido nítrico (NO) é um mensageiro molecular com múltiplas funções biológicas, produzido por inúmeros tipos celulares. Desempenha função em diversos processos biológicos, dentre eles na modulação de respostas inflamatórias. Em um processo inflamatório, o maior sítio de produção de NO encontra-se nos macrófagos e a regulação transcricional ocorre em função de estímulos inflamatórios, tais como por citocinas pró-inflamatórias, endotoxinas, hipóxia e estresse oxidativo (21). O NO produzido em altas concentrações atua como molécula citotóxica contra microorganismos, porém produz danos teciduais e vasodilatação, resultando em apoptose, danos mitocondriais, danos a proteínas e danos ao DNA celular (22). Esse efeito pode explicar a correlação negativa entre NO e motilidade total espermática ($p<0,05$). Após uma semana (M1) do tratamento local de vesiculite seminal ocorreu redução dos níveis de NO no plasma seminal em relação ao momento pré-tratamento (M0) ($p<0,05$), indicando redução do processo inflamatório na vesícula seminal. Após um mês do término do tratamento (M2) houve um aumento dos níveis de NO, mas não foi significativamente diferente do M1 e foi semelhante ao M2. Esse resultado indica que o processo inflamatório está aumentando em M2, sugerindo recidiva da doença, mas ainda não na mesma proporção do momento pré-tratamento.

CONCLUSÕES

A vesiculite seminal leva a um aumento do volume do ejaculado, redução da concentração espermática, dos parâmetros de cinética espermática e da porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra, aumento da porcentagem de espermatozoides com defeito de cauda, da porcentagem de leucócitos e do número de UFC por mililitro no sêmen a fresco e aumento do teor de NO no plasma seminal.

O tratamento local após uma semana levou a uma melhora da qualidade seminal, mediante redução do volume do ejaculado, aumento da concentração espermática, incremento da cinética espermática e da porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra, redução da porcentagem espermatozoides com defeitos de cauda, redução da porcentagem de leucócitos e do número de UFC por mililitro no sêmen a fresco e redução do teor de NO no plasma seminal. Entretanto, essa melhora da qualidade seminal não se mantém após um mês da terapia, uma vez que os parâmetros seminais nesse momento se assemelham ao momento pré-tratamento, o que pode ser justificado pela recidiva da doença.

Agradecimentos

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo auxílio financeiro e bolsa de mestrado.

REFERÊNCIAS

1. BLANCHARD, T.L; VARNER, D.D; HURTGEN, J.P; LOVE, C.C.; CUMMINGS, M.R.; STREZMIENSKI, P.J.; BENSON, C; KENNEY, R.M. Bilateral seminal vesiculitis and ampullitis in a stallion. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.15, n.192(4), p.525-526, 1988.
2. 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.

3. BLANCHARD TL, WOODS JA, BRINSKO SP, VARNER DD, BOOTHE DM. 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.

4. TIBARY, A.; RODRIGUEZ, 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.

5. 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.

6. 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.

7. 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.

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

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

10. TURNER, R.M. Problems of the accessory sex glands. **Clinical Theriogenology**, v.3, n.3, p.279-283, 2011.

11. VARNER, D.D.; TAYLOR, T.S.; BLANCHARD. T.L. Seminal Vesiculitis. In: **Equine Reproduction**. McKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. 2nd Ed. Willey-Blackwell, 2011.

12. WEBB, R.L.; EVANS, J.W.; ARNS, M.J.; WEBB, G.W.; TAYLOR, T.S.; POTTER, G.D. Effects of vesicectomy on stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.10, n.3, p.218-223, 1990.
13. VICARI, E.; Seminal leukocyte concentration and related specific radical oxygen species production in different categories of patients with male accessory gland infection . **Human Reproduction**, v.14, p.2025-2030, 1999.
14. GROTELUESCHEN, D.M.; MORTIMER, R.G.; ELLIS, R.P. Vesicular adenitis syndrome in beef bulls. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.205, n.6, p.874-877, 1994.
15. PICKETT, B.W.; VOSS, J.L. Reproductive management of the stallion. **Proceedings of. 18th Annual A.A.E.P.**, p.501, 1972.
16. PICKETT, B.W.; FAULKNER, L.C.; SUTHERLAND, T.M. Effect of month and stallion on seminal characteristics and sexual behavior. **Journal of Animal Science**, v.31, p.713, 1970.
17. 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.
18. BARTH, A.D.; BOWMAN, A.P. The sequential appearance of sperm abnormalities after scrotal, insulation or dexamethasone treatment in bulls. **Canadian Veterinary Journal**, v.35, p.93-102, 1994.
19. GUNN, A.J.; BROOKES, V.J. Neutrophil prevalence in dismount semen samples of Thoroughbred stallions. **Clinical Theriogenology**, v.3, n.4, p.487-481, 2011.
20. 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**, p.1–5, 2014.

21. MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Review**, v.43, n.2, p.109-134, 1991.
22. WONG, J.M; BILLIAR, T.R. Regulation and function of inducible nitric oxide synthase during sepsis and acute inflammation. **Advances in Pharmacology**, v.34, p.155-170, 1995.

ANEXOS

ANEXO I

Ajuste do HTMA-IVOS-10 para análise espermática em equinos

CARACTERÍSTICAS	AJUSTE
Número de pontos examinados	30
Contraste das células em relação ao campo	60 pixels
Tamanho mínimo da célula	3 pixels
Contraste para células imóveis	30 pixels
Limite inferior para índice retilíneo	80 %
Referência para velocidade média (VAP)	<70 $\mu\text{m/s}$
Referência para velocidade lenta (VAP)	<30 $\mu\text{m/s}$
Referência para velocidade lenta (VSL)	<20 $\mu\text{m/s}$
Limite inferior de tamanho	0,62 pixels
Limite superior de tamanho	2,98 pixels
Limite inferior de intensidade	0,24
Limite superior de intensidade	1,19
Limite inferior de alongamento	0%
Limite superior de alongamento	100%
Lentos contados como móveis	Não
Magnificação	1,95

ANEXO II

Preparo das sondas fluorescentes

<i>Soluções</i>	<i>Constituintes</i>	<i>Quantidade</i>
Estoque IP	Iodeto de Propídeo ¹	10 mg
	Solução Fisiológica	20 mg
Estoque CFDA	Diacetato de carboxifluoresceína ²	9.2 mg
	DMSO	20 mL
Estoque de Formaldeído	Formalina a 40%	1 mL
	Solução fisiológica	79 mL
Estoque de Citrato de Sódio	Citrato de sódio	3g
	Solução fisiológica	100 mL

¹ P4170 – Sigma

² C541 – Sigma

Solução de trabalho

<i>Soluções</i>	<i>Quantidade</i>
Solução de citrato de sódio	96 mL
Solução de formaldeído	10 µL
Solução de iodeto de propídio	10 µL
Solução de carboxifluoresceína	20 µL