

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DO ESPERMOGRAMA DE CÃES SUBMETIDOS
À ADMINISTRAÇÃO DE CISPLATINA**

João Humberto T. de Castro
Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL
2007

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DO ESPERMOGRAMA DE CÃES SUBMETIDOS
À ADMINISTRAÇÃO DE CISPLATINA**

**Pós-Graduando: João Humberto Teotônio de Castro
Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Daleck**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do Título de Mestrado em Cirurgia Veterinária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
2007

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JOÃO HUMBERTO TEOTÔNIO DE CASTRO - nasceu em São Paulo, no dia 11 de Novembro de 1979. Filho de Alvírio de Castro Fabretti e Hortência Peres Teotônio de Castro, concluiu os cursos ginásial e colegial no Colégio Anglo Santa Rita, em Novo Horizonte, SP. Tornou-se graduado em Medicina Veterinária no ano de 2004, pela Universidade Federal do Paraná e ingressou no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, curso de mestrado, em 2005.

*“Aquilata-se o grau de desenvolvimento de
um povo pela forma o qual ele trata seus
animais”.*

Alexandre Hundoudet

OFEREÇO E DEDICO

À minha mãe Hortência Peres Teotônio de Castro (força e otimismo) e a meu pai Alvírio de Castro Fabretti (benevolência e humildade), que eu amo tanto e são as pessoas responsáveis por tudo que sou hoje. Esta conquista não é só minha, mas de vocês também.

À minha esposa, Michele Garcia Medeiros Teotônio de Castro pelo amor dedicado, companheirismo e paciência e por ser uma pessoa tão especial e presente na minha vida.

Aos meus irmãos Alvírio César (pelo exemplo e por ter me apresentado o fantástico mundo da Medicina Veterinária) e Marco Antônio por ensinar-me a ser mais humilde e complacente.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela sua divina providência e sua infinita compaixão.

A Nossa Senhora pela sua maternal intercessão junto ao seu filho, nosso Senhor Jesus Cristo.

Aos meus Avós: Vô João Mendes (simplicidade e humildade) e Vó Fermina (única matriarca viva e precursora da valorização do estudo na família, exemplo de Fortaleza), Vô Antônio Messias (bondade e sabedoria) e vó zitta (simplicidade, bondade e religiosidade).

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Roberto Daleck (Pai na carreira acadêmica) pela sabedoria, paciência e por acreditar em mim, possibilitando concluir mais esta etapa da minha vida acadêmica.

A minha eterna orientadora, pessoa a qual me iniciou na vida científica e na vida acadêmica, pessoa que foi a mentora inicial deste projeto e que sempre me incentivou nas horas difíceis, Prof^a Suely Rodaski (Mãe na carreira acadêmica), admiração e gratidão pelo resto da vida.

Ao Prof. Dr. Paulo Henrique Franceschini, mais conhecido como “Cocão”, por sua amizade, orientação na vida pessoal (visão multifocal da vida) e na reprodução animal (essencial neste experimento).

Ao Prof. Dr. Júlio Carlos Canola, por sua amizade e orientações e correções neste experimento.

Ao Prof. Dr. Francisco G. Leite (Peixe), pelas orientações sobre reprodução animal e a vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. Gilson H. Toniollo, por suas correções na qualificação desta dissertação.

A Prof. Dra. Maria Denise Lopes do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da UNESP, Câmpus de Botucatu, pelo apoio a este projeto, em conhecimentos específicos em andrologia canina e participação da banca de defesa desta dissertação.

A Prof. Dra. Fabiana Ferreira de Souza pela sua colaboração em conhecimentos específicos na andrologia canina neste experimento, pessoa boníssima que está sempre disposta a ajudar.

Ao Prof. Dr. Ney Moreira por suas orientações sobre fisiologia reprodutivas e amizade desde a época da graduação na UFPR em Palotina.

Ao meu grande amigo, Andriago Barbosa De Nardi, pela sua amizade, apoio e exemplo, esse é e sempre será meu irmão mais velho na oncologia Veterinária.

As minhas amigas que me ajudaram e me apoiaram sempre, na oncologia veterinária, Sabrina Calazans (sempre me ajudou e me apoiou muito no meu projeto e na vida acadêmica e pessoal, amigona para o resto da vida, eta baixinha arretada!!!), Simone (sempre pronta para ajudar, amigona do peito!!!).

As amigas Sabrina e Jane (amigas, mais recentes da oncologia veterinária) e a Juliana (Jú da Onco)

Aos amigos Marcos Russomano (grande apoio desde da época do estágio no Instituto), Marcio C. V. Silva (pelo apoio) e Alfredo Calpa (irmão da Colômbia que ajudou muito no experimento).

A Juliana (Jú da reprodução) pela sua orientação e ajuda no experimento, valiosa colaboração na andrologia, o sucesso deste experimento deve muito a você, pessoa sempre pronta a ajudar.

A Valeska Rodriguês pela amizade, ajuda na reprodução canina, não vejo esse experimento sem o seu auxílio, pessoa que sempre está pronta para ajudar com seu humor característico.

Ao Danilas pelos conselhos e orientações na andrologia veterinária.

Ao Diogo e Fabiana (obstetrícia veterinária), Fernanda (Radiologia) e Tassila pela ajuda no experimento.

Aos colegas, funcionários e docentes do Departamento de Reprodução Animal da UNESP, Câmpus de Jaboticabal, Roberta, Ivo, Bel, Paulo, Max, Prof. Dr. Joaquim Garcia e Prof. Dra. Vera.

Aos estagiários do Setor de oncologia veterinária e a aluna de graduação Renata Aguiar que de alguma forma ajudaram no experimento.

Aos colegas e funcionários do Laboratório Clínico do Hospital Veterinário Governador Laudo Natel, em especial ao Eugênio.

**Aos amigos Taty (Bituca) e Alexandre (Dedo), Marcy, Gustavo da ortopedia (loiro).
Aos amigos da obstetrícia: Guilherme (Mineirinho), Maricy, Araceli, Danilo-Puff (pelos recursos gráficos) e Gil.**

Aos amigos Cleber e Priscila, Luís Guilherme de Oliveira, Bruno (Moc), Fabio (Ganso), Everton Regonato (Tripa), Fábio Brito, Fabiano (Bi), Renato (Salsa), Guilherme Hungria (Fogo).

Aos tios que amo muito e aprendo muito: Tio Ginês e tia Nega (padrinhos e exemplos de vida pessoal e espiritual), Tia Plácida (madrinha com grande sabedoria e conhecimento multifocal) e Tio Sardela (alegria e hilaridade), tio Beito (desprendimento e bondade), Tia Celina (alegria e entusiasmo) e tio Miguel (grande conhecimento e ímpeto filosófico), Tio Alvimar e Tia Odete (bondade e exemplo de vida), Tio Irandy (bondade e temperança), Tia Maria de Lurdes (alegria e entusiasmo) e Tio Adair (hilaridade e força), Tia Leninha (bondade e complacência) e Tio João (hilaridade), Tio Chico e Tia Eva (força, conhecimento e visão de vida), Tio Disney e Tia Maria Helena (exemplo de vida, praticidade e alegria), Tio Binho e Tia Salete (hilaridade e exemplo), Tia Regina (espiritualidade e força), Tio Tono e Tia Iracy (simplicidade e alegria).

As minhas cunhadas Leila e Lucimara e aos meus queridos sobrinhos e todos os meus primos, em especial (Miguelito, Lúcio, Aquenaton, Paulinho, Jô, padrinho Émerson) e outros tantos, pela força e incentivo.

Ao programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária da FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, por ter me concedido a chance de realizar este mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida.

Ao Hospital Veterinário Governador Laudo Natel por me acolher e possibilitar a realização do presente trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE APÊNDICES.....	xx
RESUMO.....	xxi
SUMMARY.....	xxii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
3. MATERIAL E MÉTODOS	7
3.1 ANIMAIS.....	7
3.2 GRUPO EXPERIMENTAL.....	8
3.3 COLHEITA DE SÊMEN.....	10
3.4 ANÁLISE DO EJACULADO	11
3.4.1 Análise Macroscópica.....	11
3.4.2 Análise Microscópica.....	11
3.4.2.1 Motilidade espermática.....	11
3.4.2.2 Vigor.....	11
3.4.2.3 Concentração espermática	12
3.4.2.4 Morfologia espermática.....	12
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	13
4. RESULTADOS.....	14
4.1- LÂMINA CORADA.....	14
4.1.1 Defeito Maior	14
4.1.1.1 Acrossomo com Defeito.....	15
4.1.1.2 Cabeça Piriforme.....	16

4.1.1.3 Cabeça Subdesenvolvida.....	18
4.1.1.4 Cabeça Estreita na Base.....	19
4.1.1.5 Cabeça de Contorno Anormal (CCA).....	20
4.1.1.6 "Pouch Formation.....	21
4.1.1.7 Gota Citoplasmática Proximal (GCP).....	22
4.1.1.8 Formas Teratológicas.....	23
4.1.1.9 Peça Intermediária (PI).....	24
4.1.1.10 Cauda Fortemente Dobrada (CFD).....	26
4.1.1.11 Cauda Dobrada com Gota (CDG).....	27
4.1.1.12 Cauda Enrolada na Cabeça.....	28
4.2- CÂMARA ÚMIDA	29
4.2.1 Defeito Maior	29
4.2.1.1 Acrossomo com Defeito.....	30
4.2.1.2 Cabeça Piriforme.....	30
4.2.1.3 Cabeça Subdesenvolvida.....	31
4.2.1.4 Cabeça Estreita na Base.....	32
4.2.1.5 Cabeça de Contorno Anormal (CCA).....	33
4.2.1.6 "Knobbed"	34
4.2.1.7 Gota Citoplasmática Proximal (GCP).....	36
4.2.1.8 Formas Teratológicas.....	36
4.2.1.9 Peça Intermediária (PI).....	37
4.2.1.10 Cauda Fortemente Dobrada (CFD).....	38
4.2.1.11 Cauda Dobrada com Gota (CDG).....	39
4.2.1.12 Cauda Enrolada na Cabeça.....	40
4.2.1.13 Formas Duplas.....	41
4.3- DEFEITO MAIOR, MENOR E TOTAL.....	42
4.3.1 Lâmina Corada	43
4.3.1.1 Defeito Maior.....	43
4.3.1.2 Defeito Menor.....	44
4.3.1.3 Defeito Total.....	44

4.3.2 Câmara úmida.....	45
4.3.2.1 Defeito Maior.....	45
4.3.2.2 Defeito Menor.....	46
4.3.2.3 Defeito Total.....	47
5. DISCUSSÃO.....	49
6. CONCLUSÕES.....	57
7. REFERÊNCIAS.....	58
APÊNDICES.....	64
Tabela 1A. Valores do hemograma, urinálise, bioquímico e eletrólitos dos cães do grupo G1 e G2 em diferentes momentos.....	65
Tabela 2A. Valores médios das patologias espermáticas do método de lâmina corada.....	67
Tabela 3A. Valores médios das patologias espermáticas do método de câmara úmida.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

G1 = GRUPO DE 4 CÃES QUE RECEBEU CISPLATINA
G2 = GRUPO DE 4 CÃES QUE NÃO RECEBEU CISPLATINA
CCA = CABEÇA COM CONTORNO ANORMAL
GCP = GOTA CITOPLASMÁTICA PROXIMAL
PI = PEÇA INTERMEDIÁRIA
CFD = CAUDA FORTEMENTE DOBRADA
CDG = CAUDA DOBRADA COM GOTA
CEC = CAUDA ENROLADA NA CABEÇA
SPTZ = ESPERMATOZÓIDE

LISTA DE FIGURAS

1. Ilustração fotográfica de cão contido na mesa recebendo a quimioterapia e protocolo de diurese: Observar a sondagem uretral.....9
2. Ilustração fotográfica da colheita de sêmen de cão: Observar cão estimulado pronto para ejaculação em coletor de plástico.....10
3. Ilustração fotográfica do funil coletor acoplado em tubo de ensaio de plástico: observar ejaculado no interior do tubo.....10
4. Evolução dos valores médios percentuais da patologia de acrossomo com defeito nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen. Observar o aumento desta patologia no grupo G1 a partir do momento 5.....15
5. Ilustração fotográfica de lâmina corada: observar (A) sptz com cabeça piriforme e (B), sptz com acrossomo com defeito (destacamento).....16
6. Ilustração fotográfica de lâmina corada: observar (A) sptz com cabeça de contorno anormal e (B) o mesmo sptz com inserção de cauda abaxial.....16
7. Evolução dos valores médios percentuais da patologia de cabeça piriforme nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen. Observar o aumento desta patologia no grupo G1 a partir do momento 4.....17
8. Ilustração fotográfica de lâmina corada: observar (A), sptz com cabeça subdesenvolvida e (B) o mesmo sptz com GCP.....18

9. Ilustração fotográfica de lâmina corada: observar (B) sptz, cabeça estreita na base.....18
10. Evolução dos valores médios percentuais da patologia de cabeça subdesenvolvida nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen. Observar o aumento desta patologia no grupo G1 a partir do momento 5 e decréscimo no momento 7.....19
11. Evolução dos valores médios percentuais da patologia de cabeça estreita na base nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen. Observar o aumento desta patologia no grupo G1 a partir do momento 6.....20
12. Evolução dos valores médios percentuais da patologia de CCA nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen. Observar o aumento desta patologia no grupo G1 a partir do momento 5.....21
13. Evolução dos valores médios percentuais da patologia de “pouch formation” nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen. Observar o aumento desta patologia no grupo G1 no momento 5, apenas.....22
14. Evolução dos valores médios percentuais da patologia de CCA nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen. Observar o aumento desta patologia no grupo G1 a partir do momento 5 e decrescendo no momento 7.....23
15. Evolução dos valores médios percentuais da patologia de formas teratológicas nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen. Observar o aumento desta patologia no grupo G1 a partir do momento 6.....24

16. Evolução dos valores médios percentuais da patologia de PI nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen. Observar o aumento desta patologia no grupo G1 a partir do momento 5 e decréscimo no momento 7.....25
17. Ilustração fotográfica de lâmina corada: observar (A), sptz com PI alterada e (B), sptz CFD.....26
18. Ilustração fotográfica de lâmina corada: observar (A), sptz com CEC e (B), sptz com CDG.....26
19. Evolução dos valores médios percentuais da patologia de CFD nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. Observar o aumento desta patologia no grupo G1 a partir do momento 5.....27
20. Evolução dos valores médios percentuais da patologia de CDG nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. Observar o aumento desta patologia no grupo G1 a partir do momento 5 e decréscimo no momento 7.....28
21. Evolução dos valores médios percentuais da patologia de CEC nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. Observar o aumento desta patologia no grupo G1 a partir do momento 5.....29
22. Evolução dos valores médios percentuais da patologia de acrossomo com defeito nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. Observar o aumento desta patologia no grupo G1 a partir do momento 4 e decréscimo no momento 7.....30

23. Evolução dos valores médios percentuais da patologia de cabeça piriforme nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. Observar o aumento da patologia no grupo G2 somente no momento 5 e um aumento da mesma no grupo G1 a partir do momento 5.....31
24. Evolução dos valores médios percentuais da patologia cabeça subdesenvolvida nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. Observar o aumento desta patologia no grupo G1 a partir do momento 5 e decrescendo a partir do momento 6.....32
25. Evolução dos valores médios percentuais da patologia cabeça estreito na base nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. Observar o aumento desta patologia no grupo G1 no momento 3 e subsequente decréscimo no momento 4 e novamente, aumento no momento 5 e decréscimo no momento 6.....33
26. Evolução dos valores médios percentuais da patologia CCA nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. Observar o aumento desta patologia no grupo G2 no momento 4 e subsequente decréscimo no momento 5 e aumento da mesma no grupo G1 no momento 6 e decréscimo no momento 7.....34
27. Evolução dos valores médios percentuais da patologia de “knobbed” nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. Observar o aumento desta patologia no grupo G1 a partir do momento 5.....35
28. Ilustração fotográfica de câmara úmida: observar no mesmo sptz, (A), com “knobbed” e (B), formas duplas (cauda dupla).....35

29. Ilustração fotográfica de câmara úmida: observar no spz, (A), CFD.....35
30. Evolução dos valores médios percentuais da patologia de GCP nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. Observar o aumento desta patologia no grupo G1 a partir do momento 5.....36
31. Evolução dos valores médios percentuais da patologia de formas teratológicas nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. Observar o aumento desta patologia no grupo G1 a partir do momento 5 e decréscimo a partir do momento 7.....37
32. Evolução dos valores médios percentuais de PI alterado nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. Observar o aumento desta patologia no grupo G1 a partir do momento 5 e subsequente decréscimo a partir do momento 6.....38
33. Evolução dos valores médios percentuais de CFD nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. Observar o aumento desta patologia no grupo G1 a partir do momento 5.....39
34. Evolução dos valores médios percentuais de CDG nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. Observar o aumento desta patologia no grupo G1 a partir do momento 5 e leve decréscimo no momento 7.....40
35. Evolução dos valores médios percentuais de CEC nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. Observar o aumento desta patologia no grupo G1 a partir do momento 5.....41

36. Evolução dos valores médios percentuais de espermatozóide com formas duplas nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. Observar o aumento desta patologia no grupo G1 a partir do momento 4 e leve decréscimo no momento 7.....42
37. Evolução dos valores médios percentuais de espermatozóide com defeito maior nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. Observar o aumento desta patologia no grupo G1 a partir do momento 5.....43
38. Evolução dos valores médios percentuais de espermatozóide com defeito maior nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. Observar o aumento desta patologia no grupo G2 a partir do momento 3 e subsequente decréscimo no momento 5.....44
39. Evolução dos valores médios percentuais de espermatozóide com defeito total nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. Observar o aumento desta patologia no grupo G1 a partir do momento 5.....45
40. Evolução dos valores médios percentuais de espermatozóide com defeito maior nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. Observar o aumento desta patologia no grupo G1 a partir do momento.....46
41. Evolução dos valores médios percentuais de espermatozóide com defeito maior nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. Observar o aumento desta patologia no grupo G2 no momento 4 e subsequente decréscimo no momento 5.....47
42. Evolução dos valores médios percentuais de espermatozóide com defeito total nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. Observar o aumento

das patologias no grupo G2 no momento 4 e subsequente decréscimo no momento 5 e também, aumento das patologias no grupo G1 no momento 6 e discreto decréscimo no momento 7.....48

LISTA DE APÊNDICES

1. Valores do hemograma, urinálise, bioquímico e eletrólitos dos cães do grupo G1 e G2 em diferentes momentos.....65
2. Valores médios das patologias espermáticas do método de lâmina corada...67
3. Valores médios das patologias espermáticas do método de câmara úmida....69

AVALIAÇÃO DO ESPERMOGRAMA DE CÃES SUBMETIDOS À ADMINISTRAÇÃO DE CISPLATINA.

RESUMO - A correta orientação do Médico Veterinário, aos proprietários de cães, usados com finalidades reprodutivas, submetidas à quimioterapia com cisplatina, é importante na medida que este agente citostático age nas células em constante divisão, podendo ser citotóxicos para as células germinativas testiculares. O objetivo desse trabalho foi avaliar a qualidade espermática através do espermograma de cães que receberam cisplatina em diferentes momentos de análise espermática. A dose utilizada foi de 70 mg/m², em intervalos de 21 dias, totalizando 4 infusões. Os cães foram divididos em dois grupos de 4 animais cada, sendo que um dos grupos recebeu a quimioterapia e o protocolo de diurese para proteção renal, já o grupo controle não recebeu a cisplatina, estando sujeito apenas aos fatores ambientais. Os resultados obtidos demonstraram que a cisplatina influenciou na qualidade espermática de cães, pois elevou as patologias maiores e totais acima do aceitável para cães aptos a reprodução. Portanto, infere-se que este citostático possa acarretar alterações morfofuncionais nos túbulos seminíferos e conduto epididimário.

Palavras-Chave: Sêmen, espermograma, cisplatina, cão

SPERM ANALISYS IN DOGS UNDERGONE CISPLATIN ADMINISTRATION.

SUMMARY - The correct veterinary's orientation for male dogs' owners used for reproduction goals, undergone cisplatin administration, is important because of this cistostatic act in cell with frequently proliferation, and could to cause germ cell injury. The objections of this experiment was to analysis the sperm quality through dogs' spermogram that received cisplatin's infusions. The dose used was 70 mg/m² in 21 days periods, with 4 infusion in total. The dogs were divided in 2 groups with 4 animal each one. One of the groups received all the diuresys protocol (to protect the kidney) and the citostatic. And the other control group just didn't receive the cisplatin infusion to know the real action of cisplatin effects without environmental stresses. The results show that cisplatin influence at the sperm quality in the dogs, because it elevated the major and total defects above that would be acceptable for competent dog to reproduct. It could deduct that cisplatin cause phisiologic alteration in the testis and epididymis.

Key-words: Semen, sperm analysis, cisplatin, dog

1. INTRODUÇÃO

Na Medicina Veterinária até a alguns anos atrás o tratamento do câncer restringia-se basicamente na utilização da cirurgia. Com a evolução da oncologia clínica, o tratamento cirúrgico deixou de ser a única opção para os pacientes portadores de neoplasias. A cisplatina, quimioterápico selecionado para o estudo em questão, é um fármaco utilizado na Medicina Veterinária como adjuvante ao tratamento de osteossarcomas, linfomas e alguns carcinomas. Em seres humanos, a utilização deste fármaco provoca diminuição da espermatogênese, azoospermia e muitas vezes infertilidade permanente. Além de comprometer a função gonadal e a fertilidade, a cisplatina é fetotóxica e teratogênica. No entanto, as alterações reprodutivas provocadas por este quimioterápico não são bem esclarecidas. Já na Medicina Veterinária são escassos os estudos sobre a atuação dos fármacos antineoplásicos no sistema reprodutivo, mais raro ainda são as pesquisas específicas com a cisplatina.

Em seres humanos não são somente as alterações orgânicas como oligo e azoospermia que influenciam na fertilidade, mas também a diminuição da libido ocasionada por múltiplos fatores; como a fadiga, ansiedade relacionada com a doença e o tratamento, além das alterações da auto-imagem.

O presente trabalho objetivou avaliar a morfologia espermática de cães e confrontar dois métodos de avaliação (métodos de lâmina corada e câmara úmida), submetidos à quimioterapia antitumoral com o uso de cisplatina e realizando análise seqüencial dos ejaculados. Com isso, mensurando a possível elevação das porcentagens patológicas seminais (defeito maior, menor e total), discriminando qualitativamente e quantitativamente cada patologia aumentada.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A cisplatina é um sal metálico que possui uma molécula de platina, e apesar de não ser um agente alquilante verdadeiro, o seu mecanismo de ação é similar a outros fármacos deste grupo, ou seja, provoca inibição competitiva da síntese de DNA (ANDRADE, 2002). Tem a capacidade de se intercalar no interior e entre as fitas do DNA causando a ionização de átomos de cloro, inibindo a replicação, transcrição, tradução e reparação do DNA, conseqüentemente inativando-o. O mecanismo de ação deste quimioterápico nas células somáticas do testículo (Leydig e Sertoli) tem sido estudado, porém ainda permanece sem explicação. A destruição da barreira hemato-testicular e o decréscimo da secreção de inibina-B e transferrina pelas células de Sertoli após os efeitos citotóxicos da cisplatina, tem sido relatada. Porém, estes estudos, têm sido realizados após recente exposição à cisplatina e não evidenciam uma insuficiência funcional a longo prazo (DAGLI et al., 2002; SAWHNEY et al., 2005).

Os efeitos colaterais associados à administração de cisplatina são representados principalmente pela nefrotoxicidade (GORMAN, 1995; MORRISON, 1998), possuindo também citotoxicidade hematológica, gastrintestinal, pulmonar (nos felídeos) e além destas, são relatadas outras alterações como anafilaxia, neuropatia periférica, ototoxicidade, neurite ótica e diminuição de magnésio, sódio, fósforo e cálcio (RODASKI & DE NARDI, 2004; MOORE, A. S. & OGILVIE G. K, 2001).

Este fármaco pode ser usado com grande aplicabilidade na terapia antitumoral, comumente utilizado no tratamento de osteossarcomas, mostrando também atividade contra linfomas caninos e alguns carcinomas. E ainda, pode ser empregado mais especificamente em carcinomas de células escamosas da cavidade oral e da derme, carcinomas de células de transição da bexiga urinária e próstata, adenocarcinoma nasal, carcinoma pulmonar e nos mesoteliomas (DAGLI et al., 2002; RODASKI & DE NARDI, 2004).

A quimioterapia antitumoral adjuvante, com a cisplatina, é utilizada para combater as micrometástases em potencial associadas aos osteossarcomas de cães

proporcionando aumento da sobrevivência, segundo MCGLENNON (1995), STRAW (1996) e WATERS E COOLEY (1998).

Na medicina, a cisplatina é usada largamente com extraordinária eficácia na terapêutica do câncer testicular, mesmo sendo constatado seus efeitos colaterais como azoospermia (COLPI, G.M. et al. 2003; HOWELL & SHALET, 2005), além de ser fetotóxico, teratogênico e gonadotóxico (CASTANHO et al., 2000; DAVID FILHO & EYL, 2000).

Em homens, a quimioterapia com cisplatina, em altas doses (400-500 mg/m²) induziu azoospermia com danos permanentes no epitélio seminífero. Para a oncologia humana é muito importante que os pacientes submetidos a altas doses com este quimioterápico sejam informados que poderão ficar inférteis permanentemente (COLPI et al., 2004; ISHIKAWA et al., 2004; TAKSEY et al., 2003).

Anormalidades testiculares, ocasionadas pela quimioterapia com cisplatina e carboplatina, sendo este um composto derivado da platina com efeitos citotóxicos mais brandos, foi delineado em 170 homens com câncer testicular. Foi observado que apenas 64% dos pacientes que eram normospermicos antes do tratamento retornaram a esta condição 30 meses após o término das quimioterapias, e que os pacientes tratados com carboplatina retornaram mais rapidamente a normospermia (HOWELL & SHALET, 2005).

Estudos em ratos (C57/Bl/6J) realizados por SEAMAN (2003), SAWHNEY (2005) e ZHAN (2001) indicaram que a cisplatina induziu elevadas taxas de apoptose nas células germinativas, causando degeneração do epitélio seminífero. Pode-se observar que a dose de 1 mg/kg causou apenas depleção temporária das células germinativas. Com aumento de cinco vezes à dose inicial, observou-se atrofia generalizada do epitélio, bem como vacuolização citoplasmática e perda da diferenciação das células germinativas, ocasionando uma diminuição da espermatogênese. ADLER & TARRAS (1990) relataram que a cisplatina ocasionou efeitos clastogênicos na meiose das células espermáticas de ratos F1 (101/E1 x C3H/E1). Segundo CHERRY et al. (2004) o tratamento com o mesmo fármaco nesta espécie, ocasionou diminuição no tamanho e parênquima dos testículos.

Na Medicina Veterinária, ROSENTHAL (1981) descreveu que a administração de sulfato de vincristina, em cães com tumor venéreo transmissível, suprimiu temporariamente a espermatogênese. Já nos experimentos realizados por DALECK et al. (1995), foi observado que a aplicação do mesmo fármaco determinou degeneração testicular de grau leve a moderado.

A mensuração da qualidade do sêmen compreende as características macroscópicas e microscópicas. Para colheita do ejaculado canino podem ser usados dois métodos. O primeiro, consiste na massagem do pênis (masturbação), foi o empregado por Spallanzani em suas experiências e continua sendo preferido por alguns autores que afirmam obter sêmen de melhor qualidade. O segundo método é o que utiliza a vagina artificial. Para um bom desempenho no trabalho, é indispensável um período de adaptação do animal, condicionando-o. Algumas vezes, faz-se necessária à presença de uma fêmea em estro ou um “swab” vaginal, para que o macho possa cheirá-lo (BOUCHER et al. 1958).

O ejaculado canino é dividido em três frações diferenciadas. A primeira é a fração pré-espermática, de origem prostática, possui aspecto aquoso e transparente, com volume variando de 0,5 a 5 mL. A segunda fração é rica em espermatozóides, com coloração variando de branco leitoso a translúcido, dependendo da concentração, e o volume varia entre 1 a 4 mL (JOHNSTON et al., 2001). A terceira fração é também de origem prostática, com aspecto aquoso e transparente e volume entre 2,5 a 80 mL, e tem função de facilitar o transporte espermático pela cérvix e aumentar o volume do ejaculado (ENGLAND & ALEN, 1992).

O ciclo espermático de cães tem duração aproximada de 62 dias e o número total de espermatozóides do ejaculado canino varia de 300 milhões a 2 bilhões, dependendo da raça, idade e frequência de colheita (JOHNSTON et al., 2001).

A avaliação da motilidade espermática deve ser realizada imediatamente após a colheita ou descongelação do sêmen, com auxílio de microscopia óptica (SEAGER & FLETCHER, 1972), em microscópio de contraste de fase ou em analisador computadorizado (HTR-IVOS ANALYSER, Hamilton Thorn Research). A vantagem do analisador está na avaliação da característica do movimento espermático, se

progressivo, retrógrado, velocidade espermática, velocidade em linha reta, curvilínea e linearidade dos espermatozóides (IGUER-OUADA & VERSTEGEN, 2001).

Em seguida, deve-se avaliar o vigor espermático que é a qualidade da motilidade, exibida pelos espermatozóides móveis. Para isso, utilizam-se classificações que variam conforme o autor, com escalas que vão de 0 a 5 (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

Apesar da grande utilização, a motilidade não é um parâmetro totalmente confiável para predizer a capacidade fecundante de uma amostra de sêmen. A presença de espermatozóides imóveis na amostra não implica que os mesmos estejam mortos. Além disso, a motilidade, por ser um parâmetro subjetivo, sofre influências como, por exemplo, da temperatura do local onde está sendo realizada e habilidade do avaliador, levando a uma alta variabilidade entre os laboratórios (IGUER-OUADA & VERSTEGEN, 2001).

A avaliação da morfologia espermática é um outro parâmetro importante. Até o momento, não foi descrita evidência de uma relação entre morfologia espermática e fertilidade no cão. Há poucos trabalhos que descrevem uma possível relação, porém com resultados conflitantes (OETTLÉ & SOLEY, 1985; PLUMMER et al., 1987). Oetlé (1993) relatou que, à medida que o percentual de espermatozóides anormais aumenta, a fertilidade é reduzida, sendo observado que quando a proporção de espermatozóides morfológicamente normais está abaixo de 60%, a fertilidade é adversamente afetada.

Diversas classificações foram propostas para a morfologia espermática. Seager (1986) sugere a classificação das alterações morfológicas espermáticas como: primárias, quando relacionadas a problemas oriundos da produção espermática no testículo; secundárias, quando relacionados aos problemas causados durante a maturação espermática no epidídimo, ou oriundas dos processos de manipulação do sêmen, como diluição, resfriamento, congelamento ou descongelamento. Oetlé (1993) sugere a classificação de acordo com os danos que as alterações causam à função espermática, nomeando tais alterações como defeitos maiores ou menores. Já outros autores preferem classificar as alterações de acordo com a região espermática afetada, sendo eles defeitos de cabeça, peça intermediária ou cauda (SILVA et al., 2003).

Segundo o Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal, do CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998), a proporção de defeitos maiores e menores no sêmen de cão deve ser no máximo de 20%, sendo que o total de defeitos maiores não deve ser superior a 10%.

Para possibilitar a avaliação da morfologia espermática, pode-se fazer uso de diversos corantes, tais como Eosina-Nigrosina (DOTT & FOSTER, 1972), Spermac® (OETTLÉ, 1993), Rosa Bengala (RODRIGUES, 1997), Giemsa (CARDOSO et al., 2003), Hematoxilina-Eosina (SILVA et al., 2003) Karras modificado por Papa et al. em 1988 (MARTINS, 2005). Entretanto, é necessário enfatizar que nem todos os estágios do dano acrossomal podem ser identificados através da microscopia de contraste de fase (RODRIGUES, 1997), sendo sugerido o emprego de outras técnicas mais eficientes, como a epifluorescência e a microscopia eletrônica (SILVA, 2005).

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados oito cães machos, considerados inicialmente hígdos, com idade variando entre um e três anos, peso médio de 15 kg, sem raça definida, fornecidos pelo Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal – Unesp.

Uma vez selecionados, os animais foram vacinados¹, vermifugados², banhados e alojados em canis individuais sob condições adequadas de higiene, junto ao supra-referido Hospital Veterinário. Receberam um único tipo de ração industrializada e água *ad libitum*. Foram familiarizados ao local de estadia e experimento por um período de dois meses antes do início do mesmo, a fim de se adaptarem ao ambiente e manejo. Os animais foram submetidos a exame físico, hemograma, provas bioquímicas (alanino-aspartatotranferase, creatinina e proteína total) e urinálise. Após a realização de análise criteriosa de todos os resultados obtidos nas avaliações citadas anteriormente, os animais hígdos foram submetidos à avaliação seminal antes de iniciar o experimento, através de análises macroscópicas (volume, aspecto, odor) e microscópicas (motilidade espermática, vigor, concentração e morfologia espermática).

Os animais eram submetidos a pesagens da massa corpórea, sempre antes das quimioterapias, sendo que houve uma discreta diminuição deste valor no grupo tratado com cisplatina G1 (media de 1,1 Kg) ao longo de todo o experimento. Os dados da biometria dos testículos serão analisados e publicados posteriormente.

¹RAI-VAC I e DURAMUNE V10 – Fort Dodge Saúde Animal Ltda; Campinas-SP

²Bay-o-Pet Drontal® Plus – Bayer S.A. – Saúde Animal – São Paulo-SP

3.2 Grupo Experimental

Os cães foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais de quatro animais cada. O primeiro grupo denominado de G1 recebeu o protocolo de diurese salina e a infusão de cisplatina³ na dose de 70 mg/m², metoclopramida⁴ (2 mg/Kg pela via intravenosa, 20 minutos antes da quimioterapia) e furosemida⁵ (2 mg/Kg, pela via intravenosa, 5 minutos após a administração de metoclopramida); o segundo grupo denominado de G2 (grupo controle), recebeu o mesmo tratamento que o grupo G1, porém sem a cisplatina³.

Foram avaliados sete momentos (1 a 7), referentes ao momento de colheita e análise do ejaculado, sendo que cada grupo foi avaliado dentro dos momentos. Do momento 1 ao momento 3 as análises de sêmen foram realizadas sem dar início à quimioterapia, visando estabelecer um padrão dos ejaculados dos animais. Somente após o terceiro momento, deu-se início a quimioterapia antitumoral.

Em ambos os grupos, os animais foram contidos em mesas de atendimento para a realização de fluidoterapia e quimioterapia (Figura 1).



Figura 1. Ilustração fotográfica de cão contido na mesa recebendo a quimioterapia e o protocolo de diurese: Observar a sondagem uretral (A).

Após anti-sepsia local, a veia cefálica foi canulada com cateter nº. 20, para realização de fluidoterapia prévia (2 horas antes da administração da cisplatina³), com solução fisiológica a 0,9% na dose de 25mL/kg/h.

A cisplatina³, na dose de 70mg/m², foi diluída em solução fisiológica a 0,9%, e administrada durante 20 minutos, seguido de mais uma hora de fluidoterapia. As infusões da cisplatina foram efetuadas a cada 21 dias perfazendo um total de quatro aplicações, sendo que um dia antes da administração do quimioterápico eram realizados exames laboratoriais (hemograma, provas bioquímicas e eletrolíticas) (Apêndice 1). As colheitas de sêmen e análises dos ejaculados foram realizadas três dias antes de cada quimioterapia, perfazendo, sempre, um intervalo de 21 dias entre as análises.

³Cisplatex- Eurofarma Laboratório Ltda-Campo Belo-SP

3.3 Colheita de Sêmen

Os animais foram treinados para colheita de sêmen em ambiente tranqüilo, seguindo a técnica preconizada por MACPHERSON & PENNER (1967), ou seja, pelo método da estimulação digital (mão enluvada), frente a uma fêmea em estro. O pênis foi limpo com gaze ou compressa seca, para evitar contaminação.

A seguir, o bulbo peniano foi fixado manipulando-o através de contrações rítmicas manuais para que ocorresse a ejaculação (Figura 2). Para a colheita utilizou-se um funil devidamente limpo, adaptado a tubo Falcon graduado em 15 mL previamente aquecido em banho Maria a 37 °C (Figura 3). A primeira fração foi descartada, sendo que a segunda e terceira frações espermáticas foram colhidas juntas. As colheitas foram realizadas a cada 21 dias, em 7 momentos diferentes (onde cada momento representa um dia inteiro de colheita de sêmen de todos animais), perfazendo um total de 56 colheitas de sêmen durante todo o experimento.



Figura 2. Ilustração fotográfica da colheita de sêmen de cão: método da estimulação digital.



Figura 3. Ilustração fotográfica do funil coletor acoplado em tubo de ensaio de plástico calibrado: observar ejaculado no interior do tubo.

3.4 Análise do Ejaculado

Imediatamente após a colheita, o ejaculado foi mantido a 37°C em banho-maria, analisado macroscopicamente e microscopicamente.

3.4.1 Análise macroscópica

O volume foi avaliado pela leitura direta da graduação do tubo coletor. A coloração (aspecto) foi avaliada visualmente e odor subjetivamente.

3.4.2 Análise microscópica

3.4.2.1. Motilidade espermática

Uma gota de sêmen fresco foi colocada entre lâmina e lamínula, pré-aquecidas a 37°C, e observada em microscópio de contraste de fase (Zeiss, Alemanha) com aumento de 10X. A porcentagem de células com movimentos progressivos, variou de 0 (todas as células imóveis) a 100 (todas as células em movimento).

3.4.2.2. Vigor

O mesmo procedimento de análise da motilidade foi utilizado, sendo avaliada a qualidade de movimento progressivo dos espermatozóides, pelo escore de 0 (nenhum movimento) a 5 (movimento retilíneo).

3.4.2.3. Concentração espermática

Para a determinação da concentração (número de spz/mL) foi utilizada uma diluição de 1:20, sendo 50 μ L do ejaculado, em 950 μ L de solução de água destilada e formol salina tamponado. A solução foi utilizada para preencher a câmara hematocimétrica de "Neubauer". Após a sedimentação das células espermáticas, a leitura foi realizada em microscópio de contraste de fase, com aumento de 40X, e o número de células contadas foi expresso em espermatozoides por mL.

3.4.2.4. Morfologia espermática

Depois de confeccionados os esfregaços de sêmen em lâmina de vidro, foram fixados em formol salina durante 10 minutos em banho-Maria, a 37°C, secos em temperatura ambiente, e armazenados. Posteriormente, as lâminas foram coradas pelo método de KARRAS modificado por PAPA et al. (1988) (MARTINS, 2005). Realizou-se a contagem diferencial de 200 células em microscópio de contraste de fase (Zeiss, Alemanha), com objetiva de imersão (100X). As alterações morfológicas foram classificadas em defeitos maiores e menores, segundo o Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998). No Método de câmara úmida, o sêmen foi colocado "a fresco" em tubo eppendorf contendo formol salina tamponado até turvar a solução, ficando assim conservados os espermatozoides para posterior avaliação. Realizou-se a contagem diferencial de 200 células em microscópio de contraste de fase, com objetiva de imersão (100X), com o prévio instilar de uma gota da solução fixada entre a lâmina e a lamínula. Os defeitos analisados no método de lâmina corada foram os mesmos analisados no método da câmara úmida; e foram divididos em:

- **Defeitos maiores:** Acrossomo; Patologia de cabeça (subdesenvolvida, isolada patológica, estreita na base, piriforme, pequena anormal, contorno anormal,

“Pouch formation” e “knobbed”); Gota citoplasmática proximal; Formas teratológicas; Defeitos de peça intermediária; Patologia de cauda (fortemente dobrada, dobrada com gota e enrolada na cabeça) e Formas duplas.

- **Defeitos menores:** Patologia da cabeça (delgada, gigante, curta, larga, pequena normal e isolada normal); Patologia da cauda e implantação (retro e abaxial, oblíquo, dobrada ou enrolada) e Gota citoplasmática distal.

3.5 Análise Estatística

Os resultados obtidos para as diferentes características foram analisados segundo o esquema de análise de variância com medidas repetidas no tempo. A comparação entre as médias foram realizada pelo Teste Scott-Knott (1974), ao nível de 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas, utilizando-se o programa computacional GENES (CRUZ, 2001). Os dados foram transformados em

$$\sqrt{y + 0,5}$$

4. RESULTADOS

As colheitas de sêmen ao longo do experimento foram realizadas sem dificuldade, pois os animais já se apresentavam condicionados e adaptados aos locais de colheita, sendo realizadas sempre em ambientes tranquilos.

No decorrer do experimento alguns fatores intercorrentes foram importantes, como o estresse notadamente marcado durante a diurese salina. Os animais eram contidos fisicamente em uma mesa durante horas, era necessário à sondagem uretral para melhorar a perfusão renal, em decorrência do potencial nefrotóxico da cisplatina. A cateterização uretral, além de ser um fator de estresse, contribuía para um quadro de discreta cistite crônica. Notadamente após o término da diurese salina os animais apresentavam-se prostrados. O grupo que recebeu a quimioterapia manifestava episódios esporádicos de emese, diarréia e inapetência por um período máximo de até 48 horas. No entanto, ao longo das quimioterapias, o grupo tratado (G1) foi apresentando diminuição da manifestação dos efeitos colaterais.

Os resultados da patologia espermática, do referido experimento, apresentados a seguir serão apenas das análises que diferiram estatisticamente. Diferentemente das patologias espermáticas as avaliações de motilidade, vigor, volume e concentração serão comentados, embora não apresentaram diferenças significativas entre os grupos nos sete momentos de análise.

4.1 Método da Lâmina Corada

4.1.1 Defeito Maior

Os resultados da morfologia espermática, método da lâmina corada, coloração de KARRAS modificado por PAPA et al. (1988), apresentaram como defeito maior, as seguintes alterações:

4.1.1.1 Acrossomo com Defeito: Os valores médios percentuais obtidos para acrossomo com defeito (Figura 5) entre os dois grupos (G1 e G2) nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen, realizadas antes, durante e após o tratamento com cisplatina no grupo G1, estão expressos na Figura 4.

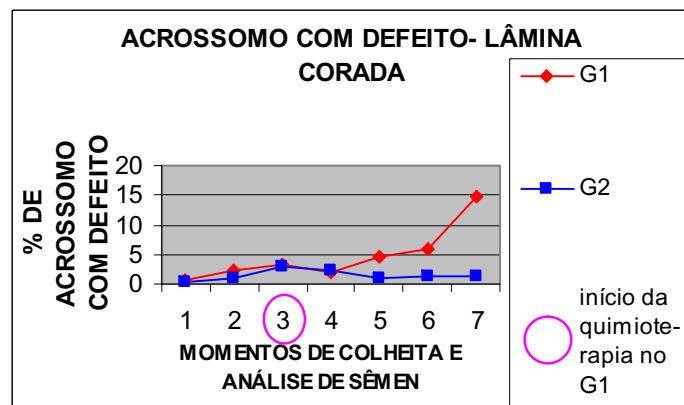


Figura 4. Evolução dos valores médios percentuais de acrossomo com defeito nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen. Observar o aumento desta patologia no grupo G1 a partir do quinto momento, através do método de lâmina corada.

A avaliação dos dados indica que houve diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos a partir do momento 5 e principalmente no momento 7.

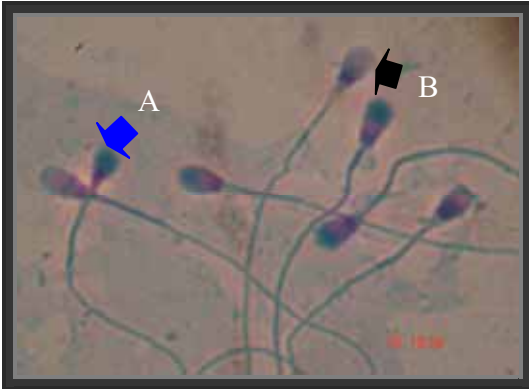


Figura 5. Ilustração fotográfica de lâmina corada: observar espermatozóide com cabeça piriforme (A) e espermatozóide sem acrossomo- destacado (B). Aumento: 100 vezes. Coloração: KARRAS modificado por PAPA et al. (1988).

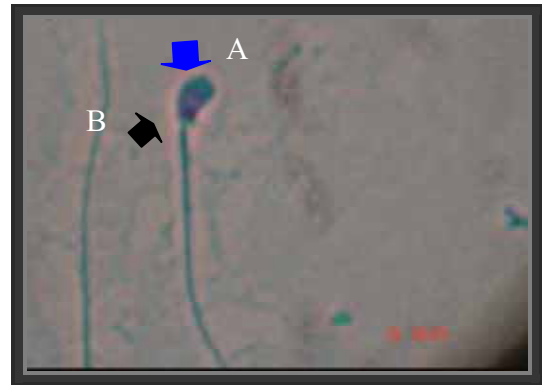


Figura 6. Ilustração fotográfica de lâmina corada: observar espermatozóide com cabeça de contorno anormal (A) e o mesmo espermatozóide com inserção de cauda abaxial (B). Aumento: 100 vezes. Coloração: KARRAS modificado por PAPA et al. (1988).

4.1.1.2 Cabeça Piriforme: Os valores médios percentuais obtidos para cabeça piriforme (Figura 5) avaliados entre os dois grupos (G1 e G2) nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen, realizadas antes, durante e após o tratamento com cisplatina no grupo G1, estão expressos na Figura 7.

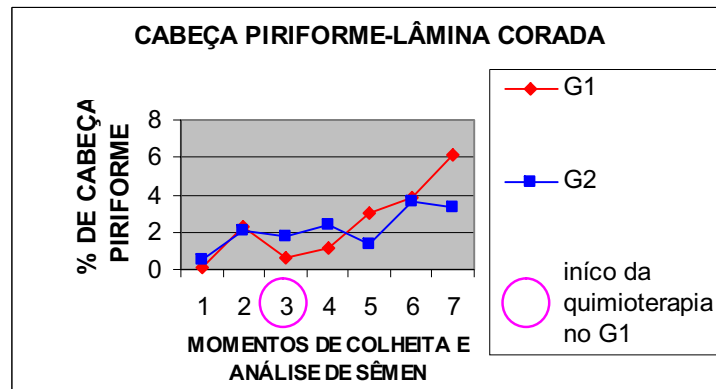


Figura 7. Evolução dos valores médios percentuais da patologia de cabeça piriforme nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen. Observar o aumento desta patologia através do método de lâmina corada no grupo G1 a partir do momento 4.

Na observação dos dados verifica-se diferença significativa ($P \leq 0,05$) no grupo G1 nos momentos 5, 6 e 7.

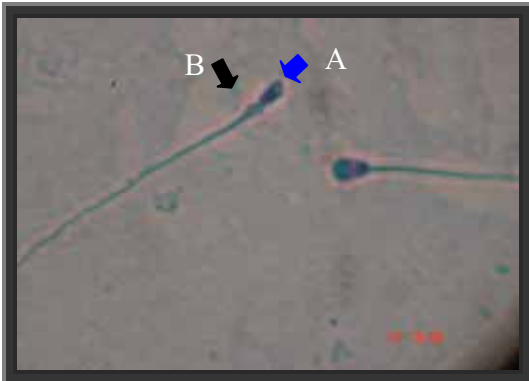


Figura 8. Ilustração fotográfica de lâmina corada: observar espermatozóide com cabeça subdesenvolvida (A) e o mesmo espermatozóide com GCP(B). Aumento: 100 vezes. Coloração: KARRAS modificado por PAPA et al. (1988).

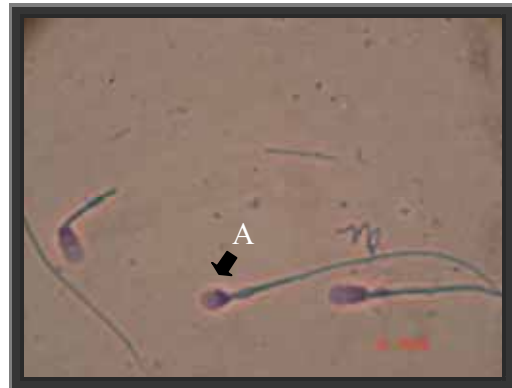


Figura 9. Ilustração fotográfica de lâmina corada: observar espermatozóide com cabeça estreita na base (A). Aumento: 100 vezes. Coloração: KARRAS modificado por PAPA et al. (1988).

4.1.1.3 Cabeça Subdesenvolvida: Os valores médios percentuais obtidos para cabeça subdesenvolvida (Figura 8) avaliados entre os dois grupos (G1 e G2) nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen, realizadas antes, durante e após o tratamento com cisplatina no grupo G1, estão expressos na Figura 10.

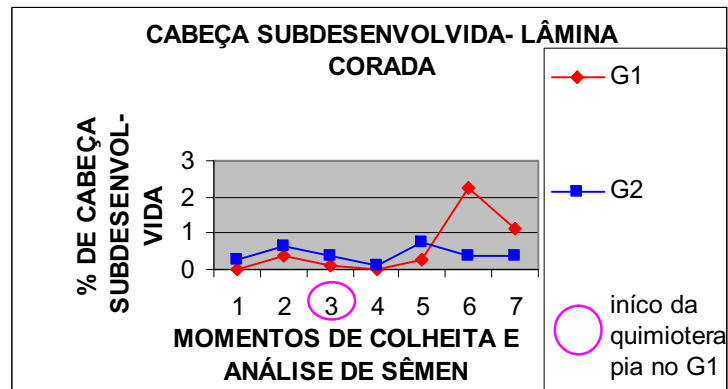


Figura 10. Evolução dos valores médios percentuais da patologia de cabeça subdesenvolvida nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen. Observar o aumento desta patologia através do método de lâmina corada no grupo G1 a partir do momento 5 e decréscimo a partir do momento 6.

A avaliação dos dados indica que houve diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos no momento 6 .

4.1.1.4 Cabeça Estreita na Base: Os valores médios percentuais obtidos para cabeça estreita na base (Figura 9) avaliados entre os dois grupos (G1 e G2) nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen, realizadas antes, durante e após o tratamento com cisplatina no grupo G1, estão expressos na Figura 11.

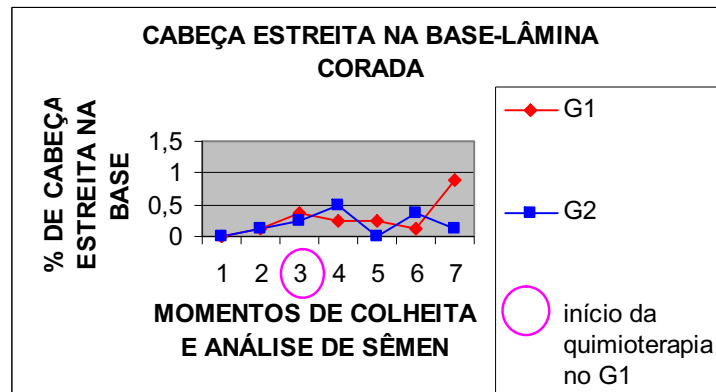


Figura 11. Evolução dos valores médios percentuais da patologia de cabeça estreita na base nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen. Observar o aumento desta patologia através do método de lâmina corada no grupo G1 a partir do momento 6.

Foi observado diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos dentro do momento 7 .

4.1.1.5 Cabeça com Contorno Anormal (CCA): Os valores médios percentuais obtidos para CCA (Figura 6) avaliados entre os dois grupos (G1 e G2) nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen, realizadas antes, durante e após o tratamento com cisplatina no grupo G1, estão expressos na figura 12.

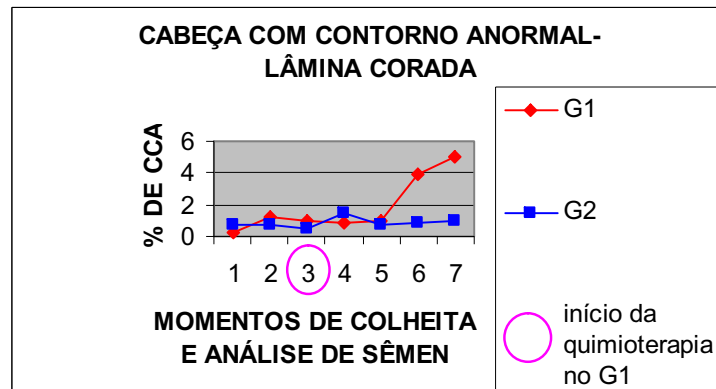


Figura 12. Evolução dos valores médios percentuais da patologia de CCA nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen. Observar o aumento desta patologia através do método de lâmina corada no grupo G1 a partir do momento 5.

Foi verificada diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos no momento 6 e 7 .

4.1.1.6 “Pouch Formation”: Os valores médios percentuais obtidos para “pouch formation” avaliados entre os dois grupos (G1 e G2) nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen, realizadas antes, durante e após o tratamento com cisplatina no grupo G1, estão expressos na figura 13.

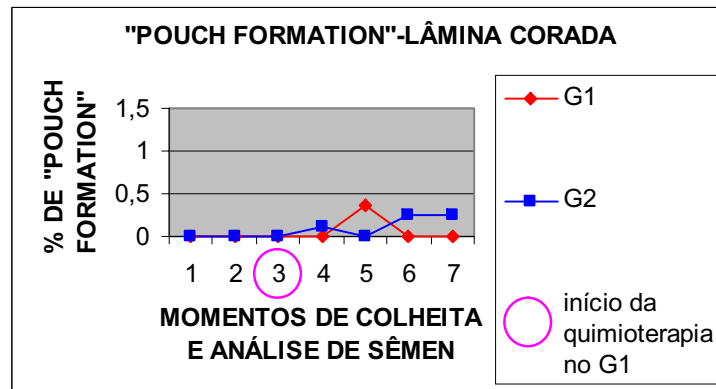


Figura 13. Evolução dos valores médios percentuais da patologia de “pouch formation” nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen. Observar o aumento desta patologia através do método de lâmina corada no grupo G1 no momento 5.

Notou-se diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos no momento 5.

4.1.1.7 Gota Citoplasmática Proximal (GCP): Os valores médios percentuais obtidos para GCP (Figura 8) avaliados entre os dois grupos (G1 e G2) nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen, realizadas antes, durante e após o tratamento com cisplatina no grupo G1, estão expressos na figura 14.

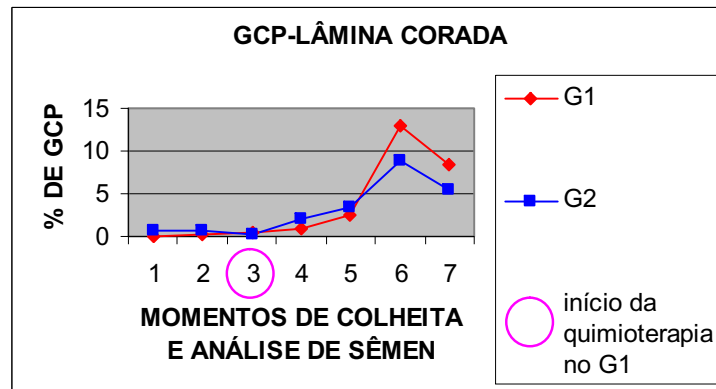


Figura 14. Evolução dos valores médios percentuais da patologia de GCP nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen. Observar o aumento desta patologia através do método de lâmina corada no grupo G1 e G2 a partir do momento 5 e decrescendo a partir do momento 6.

Os dados demonstraram diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos no momento 6 e 7.

4.1.1.8 Formas Teratológicas: Os valores médios percentuais obtidos para os espermatozoides com formas teratológicas avaliados entre os dois grupos (G1 e G2) nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen, realizadas antes, durante e após o tratamento com cisplatina no grupo G1, estão expressos na figura 15.

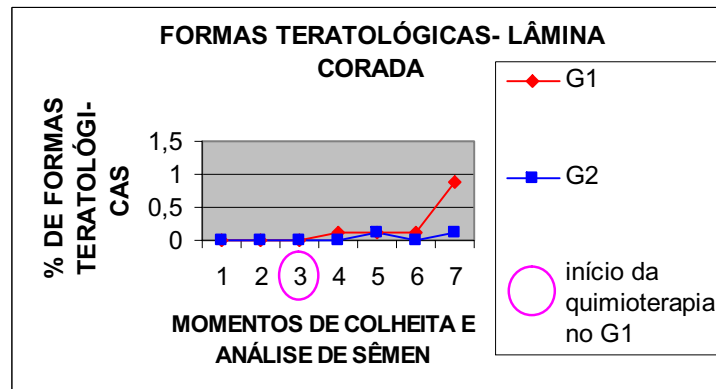


Figura 15. Evolução dos valores médios percentuais da patologia de formas teratológicas nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen. Observar o aumento desta patologia através do método de lâmina corada no grupo G1 a partir do momento 6.

O estudo dos dados indica que houve diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos no momento 7.

4.1.1.9 Peça Intermediária (PI) Alterada: Os valores médios percentuais obtidos para PI (Figura 17) avaliados entre os dois grupos (G1 e G2) nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen, realizadas antes, durante e após o tratamento com cisplatina no grupo G1, estão expressos na figura 16.

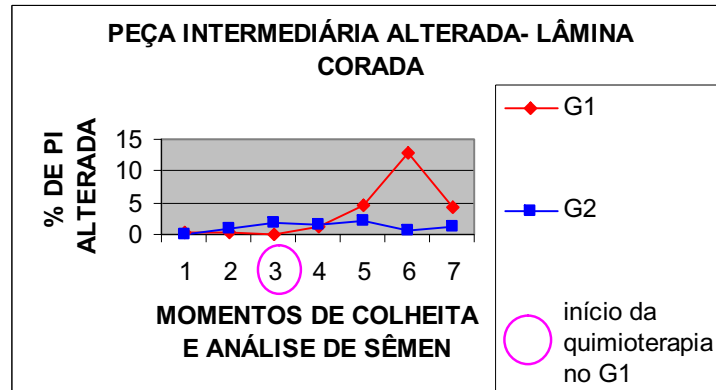


Figura 16. Evolução dos valores médios percentuais da patologia de PI nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen. Observar o aumento desta patologia através do método de lâmina corada no grupo G1 a partir do momento 5 e decréscimo a partir do momento 6.

Notou-se diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos no momento 6 .

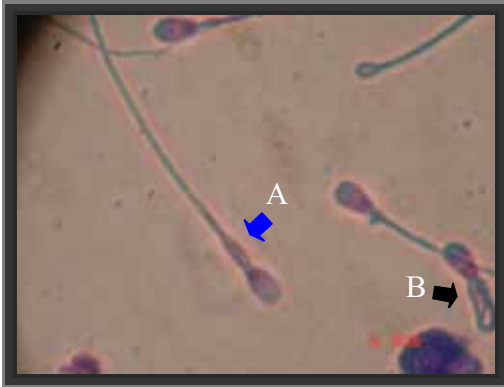


Figura 17. Ilustração fotográfica de lâmina corada: observar espermatozóide com PI alterada (A) e espermatozóide com cauda fortemente dobrada (B). Aumento: 100 vezes. Coloração: KARRAS modificado por PAPA et al. (1988).

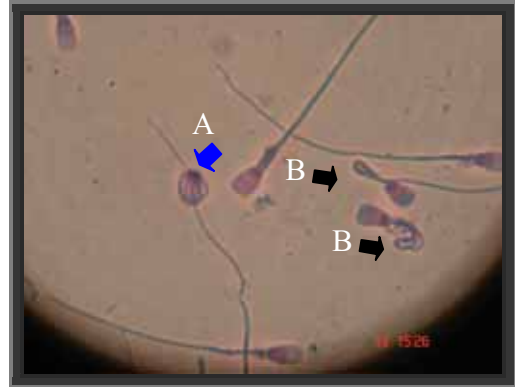


Figura 18. Ilustração fotográfica de lâmina corada: observar espermatozóide com cauda enrolada na cabeça (A) e espermatozóide com cauda dobrada em gota (B). Aumento: 100 vezes. Coloração: KARRAS modificado por PAPA et al. (1988).

4.1.1.10 Cauda Fortemente Dobrada (CFD): Os valores médios percentuais obtidos para CFD (Figura 17) avaliados entre os dois grupos (G1 e G2) nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen, realizadas antes, durante e após o tratamento com cisplatina no grupo G1, estão expressos na figura 19.

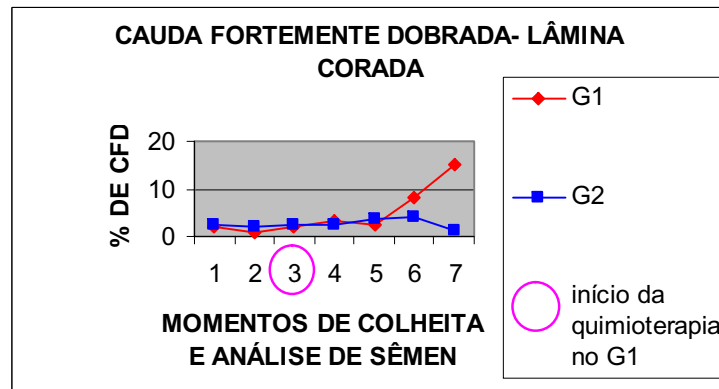


Figura 19. Evolução dos valores médios percentuais da patologia de CFD nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. Observar o aumento desta patologia através do método de lâmina corada no grupo G1 a partir do momento 5.

A avaliação dos dados indica que houve diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos no momento 7.

4.1.1.11 Cauda Dobrada com Gota (CDG): Os valores médios percentuais obtidos para CDG (Figura 18) avaliados entre os dois grupos (G1 e G2) nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen, realizadas antes, durante e após o tratamento com cisplatina no grupo G1, estão expressos na figura 20.

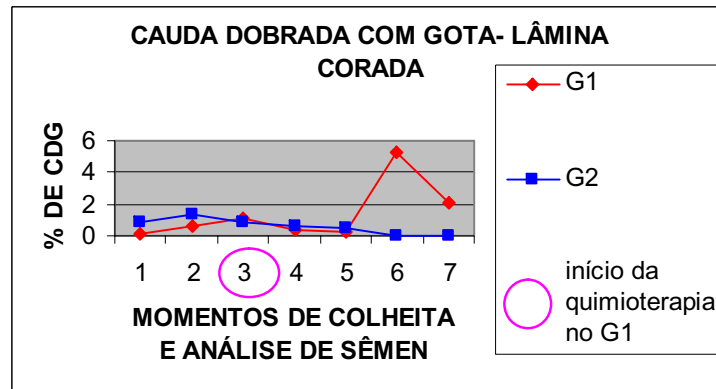


Figura 20. Evolução dos valores médios percentuais da patologia de CDG nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. Observar o aumento desta patologia através do método de lâmina corada no grupo G1 a partir do momento 5 e decréscimo a partir do momento 6.

O estudo dos dados indica que houve diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos no momento 6.

4.1.1.12 Cauda Enrolada na Cabeça: Os valores médios percentuais obtidos para CEC (Figura 18) avaliados entre os dois grupos (G1 e G2) nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen, realizadas antes, durante e após o tratamento com cisplatina no grupo G1, estão expressos na figura 21.

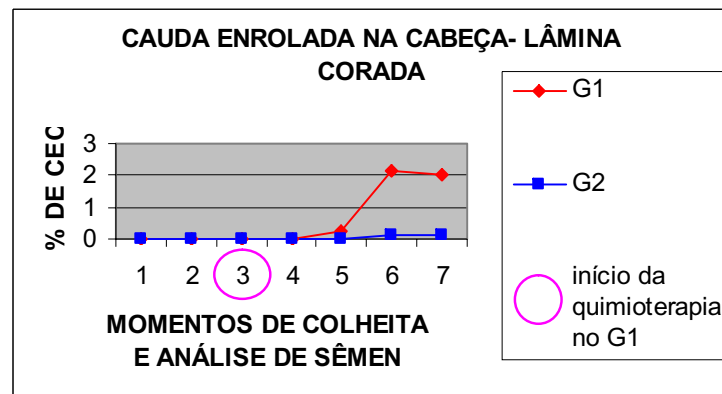


Figura 21. Evolução dos valores médios percentuais da patologia de CEC nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. Observar o aumento desta patologia através do método de lâmina corada no grupo G1 a partir do momento 5.

A observação dos dados demonstra diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos no momento 6 e 7.

4.2 Método da Câmara Úmida

Para as análises morfológicas do sêmen, as patologias foram divididas em defeito maior e menor.

4.2.1 Defeito Maior

Os resultados da morfologia espermática, método da câmara úmida, apresentaram como defeito maior, as seguintes alterações:

4.2.1.1 Acrossomo com Defeito: Os valores médios percentuais obtidos para acrossomo com defeito entre os dois grupos (G1 e G2) nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen, realizadas antes, durante e após o tratamento com cisplatina no grupo G1, estão expressos na Figura 22.

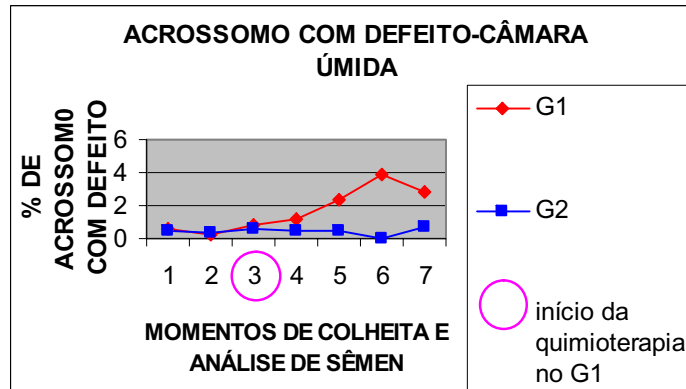


Figura 22. Evolução dos valores médios percentuais da patologia de acrossomo com defeito nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. Observar o aumento desta patologia no método da câmara úmida no grupo G1 a partir do momento 4 e decréscimo a partir do momento 6.

Foi verificada diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos no momento 5, 6 e 7.

4.2.1.2 Cabeça Piriforme: Os valores médios percentuais obtidos para cabeça piriforme entre os dois grupos (G1 e G2) nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen, realizadas antes, durante e após o tratamento com cisplatina no grupo G1, estão expressos na Figura 23.

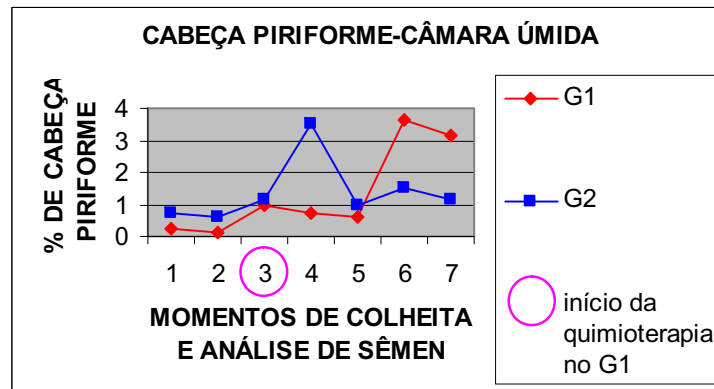


Figura 23. Evolução dos valores médios percentuais da patologia de cabeça piriforme nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. Observar o aumento da patologia no método da câmara úmida no grupo G2 a partir do momento 3 e um aumento do grupo G1 a partir do momento 5 e posterior decréscimo após o momento 6.

A avaliação dos dados indica que houve diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos no momento 4, 6 e 7.

4.2.1.3 Cabeça Subdesenvolvida: Os valores médios percentuais obtidos para cabeça subdesenvolvida entre os dois grupos (G1 e G2) nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen, realizadas antes, durante e após o tratamento com cisplatina no grupo G1, estão expressos na Figura 24.

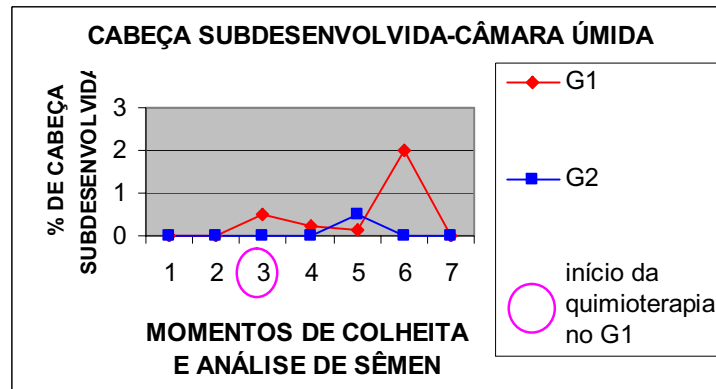


Figura 24. Evolução dos valores médios percentuais da patologia de cabeça subdesenvolvida nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. Observar o aumento desta patologia no método da câmara úmida no método da câmara úmida no grupo G1 a partir do momento 5 e decréscimo a partir do momento 6.

Foi observado diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos no momento 6.

4.2.1.4 Cabeça Estreita na Base: Os valores médios percentuais obtidos para CEB entre os dois grupos (G1 e G2) nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen, realizadas antes, durante e após o tratamento com cisplatina no grupo G1, estão expressos na Figura 25.

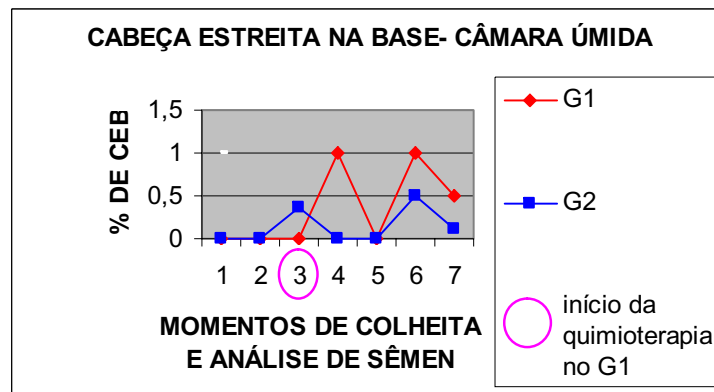


Figura 25. Evolução dos valores médios percentuais da patologia cabeça estreito na base nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. Observar o aumento desta patologia no método da câmara úmida no grupo G1 a partir do momento 3 e subsequente decréscimo a partir do momento 4 e novamente, aumento a partir do momento 5 e decréscimo a partir do momento 6.

Foi verificada diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos no momento 4, 6 e 7.

4.2.1.5 Cabeça com Contorno Anormal: Os valores médios percentuais obtidos para CCA entre os dois grupos (G1 e G2) nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen, realizadas antes, durante e após o tratamento com cisplatina no grupo G1, estão expressos na Figura 26.

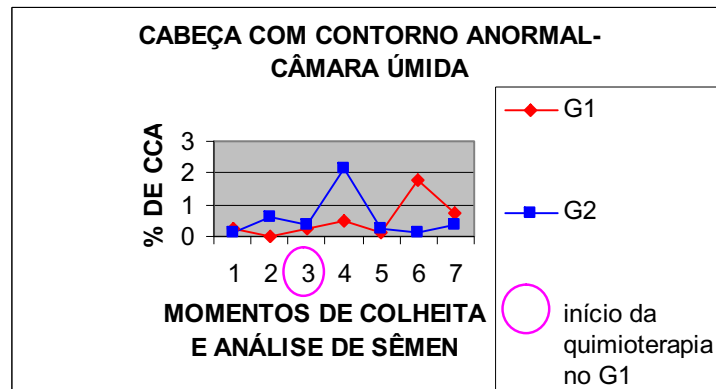


Figura 26. Evolução dos valores médios percentuais da patologia CCA nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. Observar o aumento desta patologia no método da câmara úmida no grupo G1 a partir do momento 5 e decréscimo a partir do momento 6.

Na observação dos dados verifica-se diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos nos momentos 4 e 6 .

4.2.1.6 “Knobbed”: Os valores médios percentuais obtidos para a patologia de “knobbed” (Figura 29) entre os dois grupos (G1 e G2) nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen, realizadas antes, durante e após o tratamento com cisplatina no grupo G1, estão expressos na Figura 27.

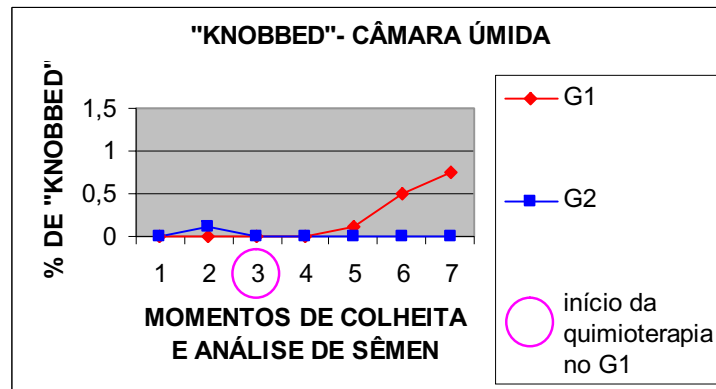


Figura 27. Evolução dos valores médios de “knobbed” nos diferentes momentos de análise de sêmen. Observar o aumento desta, no método da câmara úmida no grupo G1 a partir do momento 5.

Foi notado diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos no momento 7.

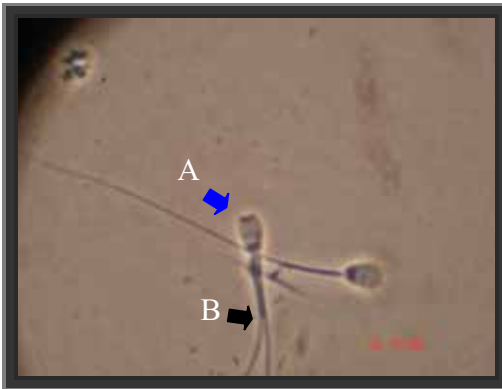


Figura 28. Ilustração fotográfica de câmara úmida: observar no mesmo espermatozóide com “knobbed” (A) e formas duplas (cauda dupla) (B). Aumento: 100 vezes.

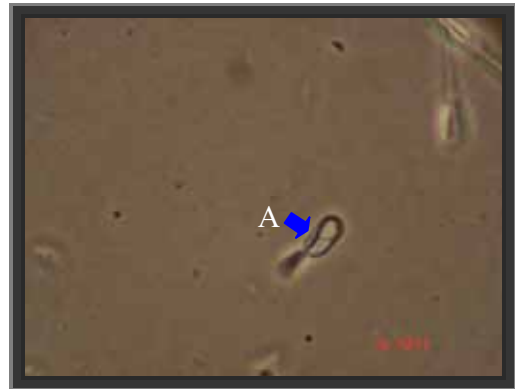


Figura 29. Ilustração fotográfica de câmara úmida: observar CFD (A). Aumento: 100 vezes.

4.2.1.7 Gota Citoplasmática Proximal (GCP): Os valores médios percentuais obtidos para a patologia de GCP (Figura 30) entre os dois grupos (G1 e G2) nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen, realizadas antes, durante e após o tratamento com cisplatina no grupo G1, estão expressos na figura 30.

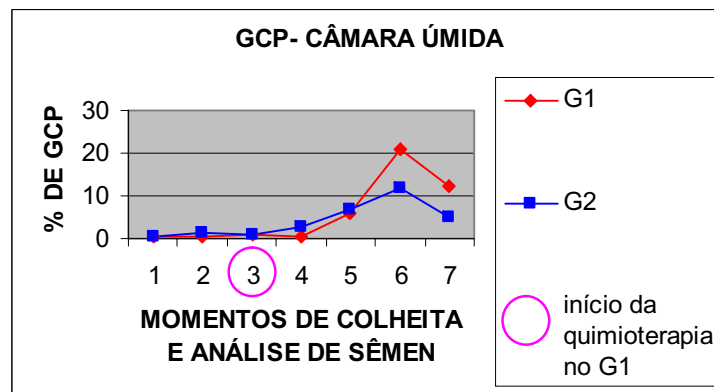


Figura 30. Evolução dos valores médios percentuais da patologia de GCP nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. Observar o aumento desta patologia no método da câmara úmida no grupo G1 a partir do momento 5.

Foi observada diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos no momento 6 e 7.

4.2.1.8 Formas Teratológicas: Os valores médios percentuais obtidos para a patologia de formas teratológicas entre os dois grupos (G1 e G2) nos diferentes

momentos de colheita e análise do sêmen, realizadas antes, durante e após o tratamento com cisplatina no grupo G1, estão expressos na Figura 31.

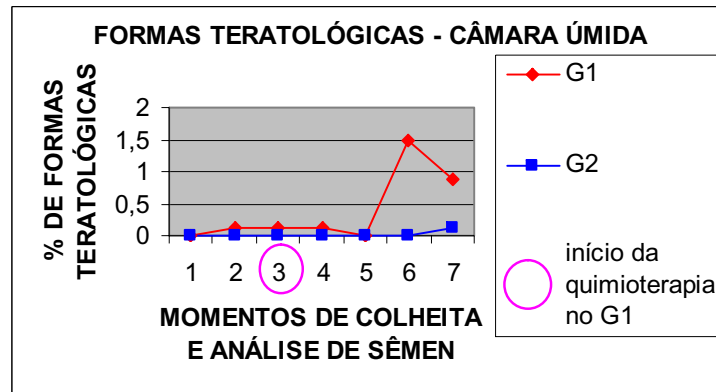


Figura 31. Evolução dos valores médios percentuais da patologia de formas teratológicas nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. Observar o aumento desta patologia no método da câmara úmida no grupo G1 a partir do momento 5 e decréscimo a partir do momento 6.

Observou-se que houve diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos no momento 6 e 7.

4.2.1.9 Peça Intermediária Alterada (PI): Os valores médios percentuais obtidos para a patologia de PI entre os dois grupos (G1 e G2) nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen, realizadas antes, durante e após o tratamento com cisplatina no grupo G1, estão expressos na figura 32.

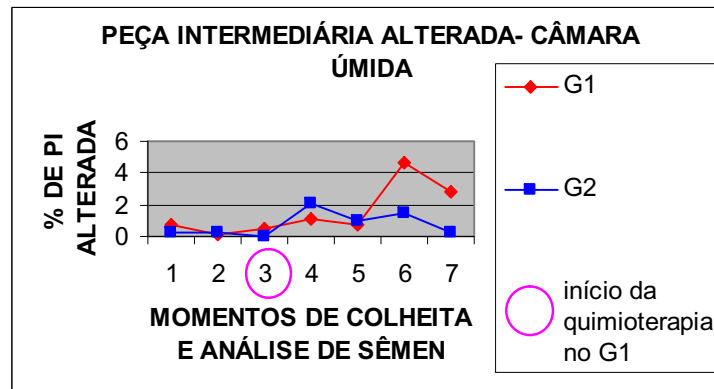


Figura 32. Evolução dos valores médios percentuais de PI alterado nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. Observar o aumento desta patologia no método da câmara úmida no grupo G1 a partir do momento 5 e subsequente decréscimo a partir do momento 6.

Foi constatado que houve diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos nos momentos 4, 6 e 7.

4.2.1.10 Cauda Fortemente Dobrada (CFD): Os valores médios percentuais obtidos para a patologia de CFD (Figura 30) entre os dois grupos (G1 e G2) nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen, realizadas antes, durante e após o tratamento com cisplatina no grupo G1, estão expressos na figura 33.

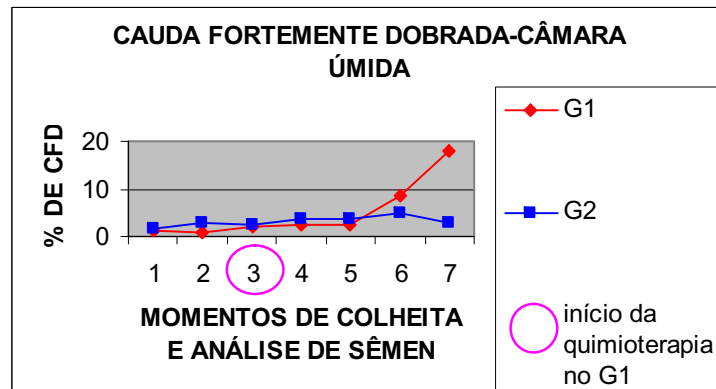


Figura 33. Evolução dos valores médios percentuais de CFD nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. Observar o aumento desta patologia no método da câmara úmida no grupo G1 a partir do momento 5.

Foi observada diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos no momento 7 .

4.2.1.11 Cauda Dobrada com Gota (CDG): Os valores médios percentuais obtidos para a patologia de CFD entre os dois grupos (G1 e G2) nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen, realizadas antes, durante e após o tratamento com cisplatina no grupo G1, estão expressos na figura 34.

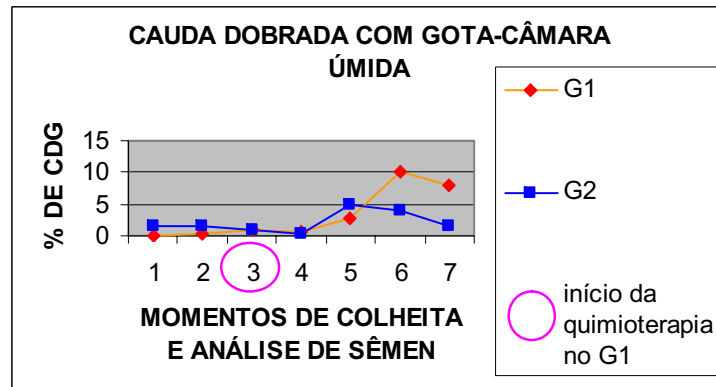


Figura 34. Evolução dos valores médios percentuais de CDG nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. Observar o aumento desta patologia no método da câmara úmida no grupo G1 a partir do momento 5 e leve decréscimo a partir do momento 6.

Foi verificada diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos nos momentos 6 e 7.

4.2.1.12 Cauda Enrolada na Cabeça: Os valores médios percentuais obtidos para a patologia de CEC entre os dois grupos (G1 e G2) nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen, realizadas antes, durante e após o tratamento com cisplatina no grupo G1, estão expressos na figura 35.

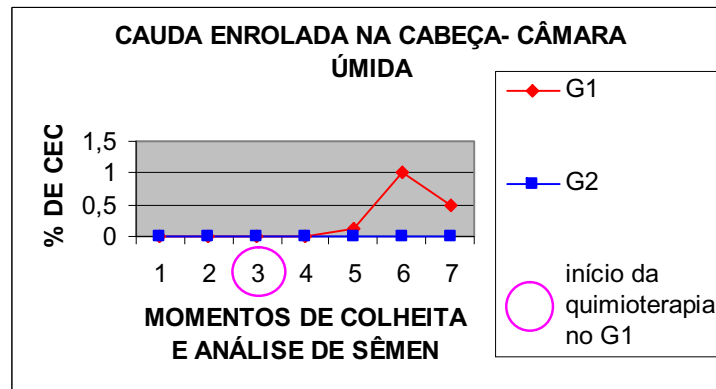


Figura 35. Evolução dos valores médios percentuais de CEC nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. Observar o aumento desta patologia no método da câmara úmida no grupo G1 a partir do momento 5 e decréscimo a partir do momento 6.

Verificou-se diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos no momento 6 e 7.

4.2.1.13 Formas Duplas: Os valores médios percentuais obtidos para a patologia de formas duplas (Figura 27) entre os dois grupos (G1 e G2) nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen, realizadas antes, durante e após o tratamento com cisplatina no grupo G1, estão expressos na figura 36.

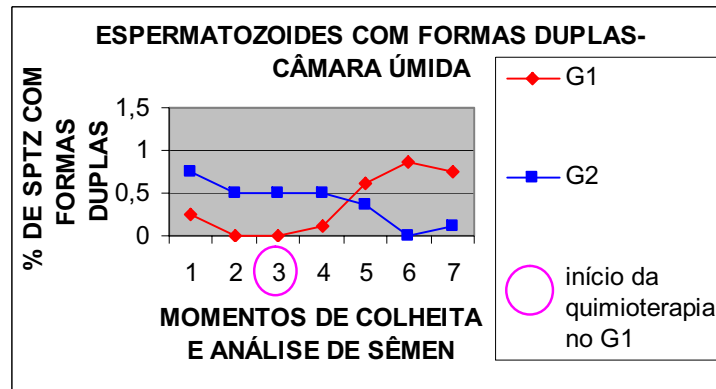


Figura 36. Evolução dos valores médios percentuais de espermatozói­de com formas duplas nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. Observar o aumento desta patologia no método da câmara úmida no grupo G1 a partir do momento 4 e leve decréscimo a partir do momento 6.

Foi observado diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos em todos os momentos.

4.3 Defeito Maior, Menor e Total

O defeito total é a soma dos defeitos maiores e defeitos menores em porcentagem nos dois tipos de avaliação morfológica espermática.

4.3.1 Lamina Corada

4.3.1.1 Defeito Maior: Os valores médios percentuais obtidos para patologia de defeito maior entre os dois grupos (G1 e G2) nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen, realizadas antes, durante e após o tratamento com cisplatina no grupo G1, estão expressos na figura 37.

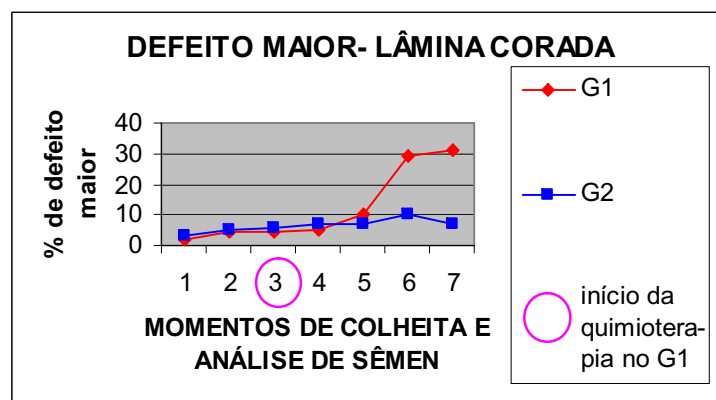


Figura 37. Evolução dos valores médios percentuais de espermatozóide com defeito maior nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. Observar o aumento desta patologia no método de lâmina corada no grupo G1 a partir do momento 5.

Foi observado diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos nos momentos 6 e 7.

4.3.1.2 Defeito Menor: Os valores médios percentuais obtidos para patologia de defeito menor entre os dois grupos (G1 e G2) nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen, realizadas antes, durante e após o tratamento com cisplatina no grupo G1, estão expressos na figura 38.

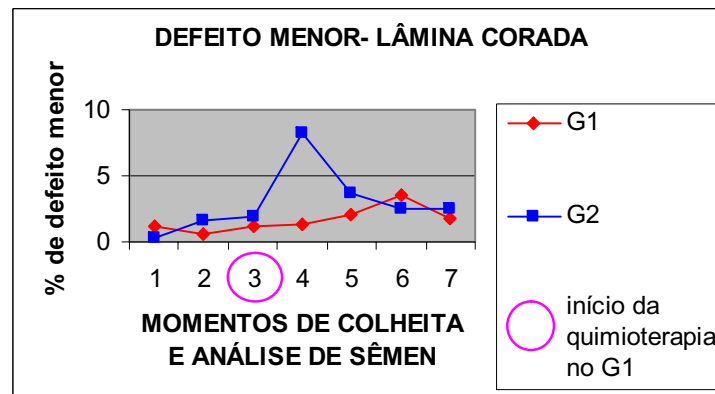


Figura 38. Evolução dos valores médios percentuais de espermatozóide com defeito maior nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. Observar o aumento desta patologia no método de lâmina corada no grupo G2 a partir do momento 3 e subsequente decréscimo a partir do momento 4.

Foi verificada diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos no momento 4.

4.3.1.3 Defeito Total: Os valores médios percentuais obtidos para patologia de defeito total entre os dois grupos (G1 e G2) nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen, realizadas antes, durante e após o tratamento com cisplatina no grupo G1, estão expressos na figura 39.

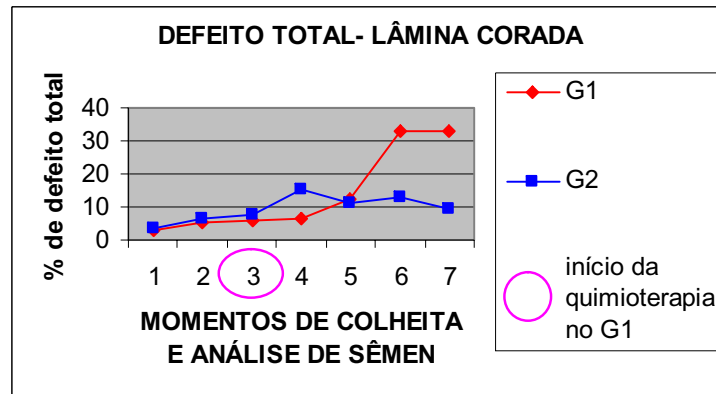


Figura 39. Evolução dos valores médios percentuais de espermatozóide com defeito total nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. Observar o aumento desta patologia no método de lâmina corada no grupo G1 a partir do momento 4.

Foi notado diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos nos momentos 6 e 7.

4.3.2 Câmara Úmida

4.3.2.1 Defeito Maior: Os valores médios percentuais obtidos para patologia de defeito maior entre os dois grupos (G1 e G2) nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen, realizadas antes, durante e após o tratamento com cisplatina no grupo G1, estão expressos na figura 40.

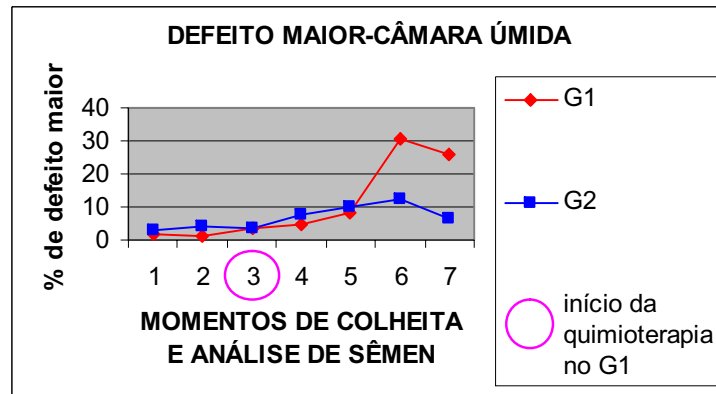


Figura 40. Evolução dos valores médios percentuais de espermatozóide com defeito maior nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. Observar o aumento desta patologia no método de câmara úmida no grupo G1 a partir do momento 4.

Foi observado diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos nos momentos 6 e 7.

4.3.2.2 Defeito Menor: Os valores médios percentuais obtidos para patologia de defeito menor entre os dois grupos (G1 e G2) nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen, realizadas antes, durante e após o tratamento com cisplatina no grupo G1, estão expressos na figura 41.

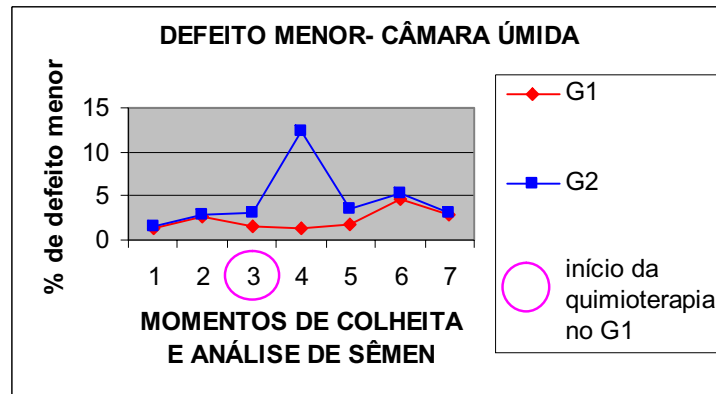


Figura 41. Evolução dos valores médios percentuais de espermatozóide com defeito maior nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. Observar o aumento desta patologia no método de câmara úmida no grupo G2 a partir do momento 3 e subsequente decréscimo a partir do momento 4.

Foi observado diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos no momento 4 .

4.3.2.3 Defeito Total: Os valores médios percentuais obtidos para patologia de defeito total entre os dois grupos (G1 e G2) nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen, realizadas antes, durante e após o tratamento com cisplatina no grupo G1, estão expressos na figura 42.

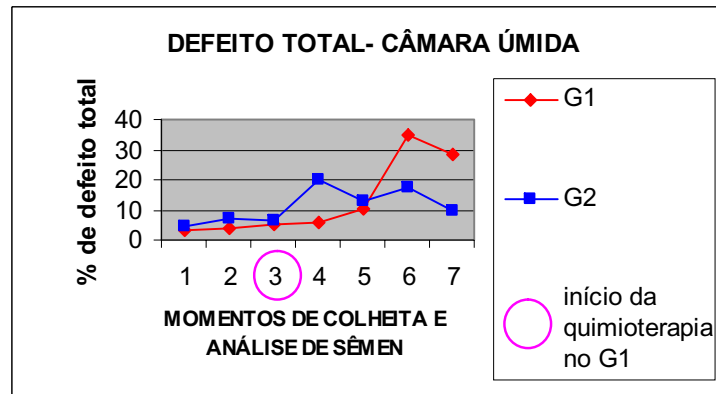


Figura 42. Evolução dos valores médios percentuais de espermatozóide com defeito total nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. Observar o aumento das patologias no método de câmara úmida no grupo G2 a partir do momento 3 e subsequente decréscimo a partir do momento 4 e também, aumento das patologias no grupo G1 a partir do momento 5 e discreto decréscimo a partir do momento 6.

Foi verificada diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos nos momentos 4, 6 e 7.

Quando se confrontou as médias percentuais das patologias maior, menor e total, dos métodos de lâmina corada e câmara úmida, observou-se que não houve diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre elas.

5. DISCUSSÃO

A incidência da patologia de acrossomo é comum, mesmo em animais que apresentam boa fertilidade. O desenvolvimento de acrossomo com defeito parece estar relacionado com problemas genéticos, exatamente durante o processo de diferenciação espermática e também por influências ambientais como o estresse (BARTH & OKO 1989). Portanto, ao observarmos no método de lâmina corada (Figura 4), podemos inferir que a partir do momento 6, que corresponde a um ciclo espermático completo, o número desta patologia no grupo tratado com cisplatina (G1) aumentou. E que pelo método de câmara úmida (Figura 22) houve um aumento desta patologia no grupo G1, a partir do momento 4, chegando na sua porcentagem máxima no momento 6 e com discreto decréscimo no momento 7, podemos inferir, que a cisplatina atua no epitélio germinativo, no processo de formação espermática.

A cabeça piriforme é uma das patologias de cabeça mais comuns. Uma das causas para este tipo de defeito parece estar relacionada a fatores de predisposição hereditária exacerbadas por condições ambientais como o estresse, obesidade, afecções que alteram a funcionalidade do trato reprodutor e sazonalidade, descrito por BARTH e OKO (1989), HAFEZ, (2004).

Conforme relatado por SEAGER (1986) e BARTH e OKO (1989), na maioria dos casos de defeitos de cabeça piriforme, há uma forte correlação na mudança da função testicular em decorrência de distúrbios de termorregulação dos testículos ou através de disfunção endócrina testicular, que pode ser causada por fatores intrínsecos ou extrínsecos, afetando diretamente a espermatogênese. Observou-se, no método de lâmina corada (Figura 7), um aumento ascendente desta patologia no grupo G1 nos momentos pós-quimioterapia, em especial no momento 7. Um discreto aumento desta patologia no grupo G2, nos momentos 6 e 7. Já pelo método de câmara úmida, houve um aumento ascendente desta patologia, no grupo G1, a partir do momento 5, chegando na sua porcentagem máxima no momento 6 e com discreto decréscimo no momento 7, sugerindo, nos dois métodos, que a cisplatina pode influenciar a

espermatogênese no cão. Um aumento desta patologia no grupo G2, no momento 4 pode ser em virtude que esse grupo, assim como no método de lâmina corada, também sofreu estresse ambiental, principalmente pelo protocolo de diurese salina, embora não recebendo a cisplatina.

A patologia de cabeça subdesenvolvida tem baixa frequência de ocorrência, e não há relatos específicos indicando que este defeito seja causa de infertilidade. Sua etiologia ainda não é bem determinada, no entanto supõe-se que o problema ocorra durante a espermiogênese. Observa-se que quando há distúrbios na espermatogênese por determinados fatores, há um aumento no número desta patologia associado as demais patologias espermáticas (BARTH & OKO, 1989). Segundo KNUDSEN (1954) várias mudanças ambientais e orgânicas dos animais podem levar a uma divisão desigual dos cromossomos no momento da diferenciação espermática, com perda do material nuclear. Portanto, esta divisão acidental dos cromossomos pode ocorrer frequentemente, sendo que apenas algumas células sobrevivem a todo o processo de espermatogênese e espermiogênese permanecendo intactas no ejaculado. Pelo método de lâmina corada (Figura 10) observamos que houve um aumento deste defeito, no grupo G1, a partir do momento 5 e chegando no seu valor máximo no momento 6 (63 dias após início da quimioterapia) quando se completa um ciclo celular. Inferindo distúrbios na espermatogênese ocasionados pela cisplatina, porém não se pode determinar o motivo da diminuição no grupo G1 no momento 7.

O desenvolvimento da cabeça estreita na base pode ser de origem genética ou ambiental. Algumas influências adversas podem acarretar anormalidades hormonais ou eventos metabólicos extrínsecos ou intrínsecos das células de sertoli, afetando diretamente o desenvolvimento da espermatíde. O dano também pode ocorrer no espermatócito primário, predispondo o desenvolvimento de distúrbios na espermatíde (BARTH & OKO, 1989). Com isso, é importante observarmos no método de lâmina corada (Figura 11), que houve um aumento desta patologia no grupo G1, a partir do momento 6 e ainda, no método de câmara úmida (Figura 25) que houve um aumento desta patologia no grupo G1, a partir do momento 3 e subsequente decréscimo a partir do momento 4 e novamente, aumento a partir do momento 5 e decréscimo a partir do

momento 6, sugerindo que a cisplatina pode ter induzido distúrbios nas espermatídes primárias.

Segundo BARTH e OKO, (1989), os fatores que controlam a formação da cabeça podem ser de origem genética (erros durante a espermatogênese) ou sofrer influências externas. Os primeiros sinais histológicos observados durante falhas na espermatogênese (vacuolização citoplasmática e danos no fuso mitótico na metáfase da espermatíde primária), foram ocasionadas por estresse ambiental, lesões locais ou outras afecções. Portanto, observa-se, no gráfico, que há um aumento ascendente de cabeça com contorno anormal no método de lâmina corada, no grupo G1, a partir do momento 5 atingindo o seu ápice no momento 7. E já, no método de câmara úmida houve um aumento desta patologia no grupo G1 a partir do momento 5 e decréscimo a partir do momento 6, deduzindo que a cisplatina pode acarretar danos na espermatogênese. E ainda, observa-se aumento da mesma no grupo G2, a partir do momento 3 e subsequente decréscimo a partir do momento 4 o que pode ser explicado pelo estresse ambiental da diurese salina.

BANE e NICANDER (1965) relataram um único caso onde a patologia de “pouch formation” ocorreu simultaneamente a distúrbios da espermatogênese, o que inclui um decréscimo na concentração espermática, decréscimo de motilidade e um elevado índice de outras patologias espermáticas. De acordo com BARTH e OKO (1989), a incidência desta patologia também está relacionada ao estresse, doenças, falta de alimento e condições climáticas. OKO (1977), sugeriu que a condição de estresse poderia levar a um desequilíbrio hormonal, o que resultaria na formação desta patologia.

HEATH e OTT (1982) reportaram um caso onde uma afecção do trato reprodutor levou ao aparecimento de 79% de patologia “pouch formation”, entretanto seis semanas depois, as células espermáticas estavam livres da presença de crateras, que caracteriza esta patologia. O aumento discreto desta patologia detectado somente no método de lâmina corada (Figura 13), no grupo G1, no momento 5, infere que esse aumento possa ser devido à quimioterapia e um aumento transitório devido ao aumento das outras patologias.

Quando o “Knobbed” é encontrado com uma variedade de outros defeitos como vacuolização nuclear ou núcleos disformes, pode ser devido a adversidades ambientais, termorregulação, doenças sistêmicas, toxicidade ou deficiência nutricional levando a degeneração testicular (BARTH & OKO, 1989). O aumento ascendente desta patologia, somente no método de câmara úmida (Figura 27), no grupo G1 a partir do momento 4, chegando ao seu valor máximo no momento 7, propõe que a cisplatina pode provocar degeneração do epitélio germinativo.

A gota citoplasmática proximal (CGP) é considerada um sinal de uma espermiogênese anormal, e comumente está associada a uma variedade de outros defeitos espermáticos. Sabe-se que durante a espermiogênese, a espermátide muda de uma forma redonda para uma célula alongada, o citoplasma é puxado para trás, progressivamente, da cabeça para a região da cauda do espermatozóide. Sugere-se, portanto, ser um problema secundário, ou seja, está relacionado a problemas durante a maturação espermática no epidídimo (SEAGER, 1986; BARTH & OKO, 1989). O presente estudo, demonstra, no método de lâmina corada (Figura 14), um aumento significativo no grupo G1 a partir do momento 5 e decréscimo a partir do momento 6, mas ainda permanecendo alta quando comparado com a porcentagem desta patologia antes do início da quimioterapia e que assume o mesmo comportamento no método de câmara úmida (Figura 30), também. Isto propõe que a cisplatina pode ter alterado a espermiogênese durante a maturação no epidídimo. O aumento de GCP, nos dois métodos de avaliação, no grupo G2 pode ser explicado, pelo estresse da diurese salina.

As formas teratológicas são caracterizadas por uma aberração severa nas estruturas celulares do espermatozóide, não permitindo seu reconhecimento como célula espermática. Acredita-se que as formas teratológicas estão sempre associadas a distúrbios da espermatogênese, através de processos inflamatório locais ou degeneração do epitélio germinativo das células primordiais (BARTH & OKO, 1989). As porcentagens de teratologia espermáticas obtidas no método de lâmina corada (Figura 15) demonstram um aumento a partir do momento 6 no grupo G1, e já no método de câmara úmida (Figura 31) constatamos um aumento a partir do momento 5 no grupo G1

e decréscimo a partir do momento 6, mas ainda permanecendo alta quando comparado com a porcentagem desta patologia antes do início da quimioterapia, evidenciando uma possível influência do quimioterápico na espermatogênese.

A peça intermediária alterada (PI) é comumente observada nas preparações seminais rotineiras, são induzidas por preparações laboratoriais. A continuada exposição do sêmen a substâncias hipotônicas resulta num alto índice de patologias de peças intermediárias. No entanto, em algumas experimentações sugeriram que o aparecimento desta patologia poderia estar relacionado a um distúrbio da formação da cauda, durante a espermiogênese (BARTH & OKO, 1989). Observa-se no método de lâmina corada (Figura 16), o maior aumento destes defeitos no grupo G1, no momento 6 (63 dias após o início da quimioterapia) quando se completa um ciclo espermático e um subseqüente declínio, inexplicável, da patologia no grupo G1, no momento 7 e assumindo estes mesmos comportamentos no método de Câmara úmida (Figura 32), sugerindo uma ação da cisplatina sobre o epitélio epididimário.

As patologias de cauda podem apresentar-se de diversas formas, como a cauda fortemente enrolada sobre o próprio eixo da peça intermediária (CFD) (Figura 17-B) ou apenas com uma dobra assumindo variadas formas (CFD e quando apresenta gota citoplasmática é CDG) (Figura 18-B) ou uma ou várias vezes enrolada na cabeça (CEC) (Figura 18-A). As ocorrências destas patologias espermáticas podem estar relacionadas à exposição do sêmen a soluções hipotônicas e as técnicas de congelamento, como também o aparecimento deste defeito durante a passagem do ejaculado pelo epidídimo (BARTH & OKO, 1989). SWANSON e BOYD (1961) mostraram que o sêmen começava a adquirir esta patologia quando migrava através do epidídimo. Este achado sugere que este defeito pode estar associado a uma sensibilidade seminal aos íons adquiridos na cauda do epidídimo. E ainda, acredita-se que esta patologia esteja associada a continua exposição a secreções epididimais anormais.

O epitélio epididimário e sua função são extremamente sensíveis aos níveis de testosterona, por isso supõe-se que o funcionamento inadequado do epidídimo esteja relacionado com algum mecanismo de baixa produção de testosterona, entre eles

podemos citar o estresse, baixa atividade tiroidiana, febre, uso de estradiol. No entanto, em alguns casos, esta patologia se origina de uma fragilidade na PI distal ocorrida durante a espermiogênese, conforme relatado por BARTH e OKO (1989). Quando observamos o aumento ascendente da CFD, no método de lâmina corada (Figura 19), no grupo G1, a partir do momento 5 e no método de câmara úmida (Figura 33) assume o mesmo comportamento, supõe-se que a cisplatina tenha alterado o epitélio epididimário ou ainda a dinâmica iônica. A baixa produção de testosterona é uma inferência com menor relevância, à medida que esta diminuiria a libido, que parece não ter ocorrido nos grupos G1 e G2, embora esta atividade não tenha sido objeto de estudo no presente experimento.

O aumento de CDG no método de lâmina corada (Figura 20), no grupo G1, a partir do momento 5 atingindo o valor máximo no momento 6 e subsequente decréscimo no momento 7 e no método de câmara úmida (Figura 34) ocorre um aumento deste defeito no grupo G1, a partir do momento 5 atingindo o valor máximo no momento 6 e discreto decréscimo no momento 7, pode demonstrar que a cisplatina influencie a maturação espermática no epidídimo. E o aumento de CEC no método de lâmina corada (Figura 21), no grupo G1, a partir do momento 5, chegando na sua porcentagem máxima no momento 6 e se mantendo, também, no momento 7 e no método de câmara úmida (Figura 35) assumindo o mesmo comportamento, infere que a cisplatina tenha alterado a função epididimária.

As patologias de formas duplas incluem espermatozoides com cabeça ou cauda dupla. Não foram encontradas referências sobre espermatozoides com cabeça dupla. Segundo BARTH e OKO (1989), espermatozoides de cauda dupla podem ocorrer com a presença de cauda abaxial, e ainda, espermatozoides com implantação com cauda tripla pode ser encontrada, porém é raro. Estudos, demonstraram que cauda dupla poderia estar envolvida com baixa concentração e motilidade (WENKOFF, 1978). Porém, esta condição não foi observada. Em outro estudo, concluiu-se que esta condição é incompatível com a fertilização do oócito e desenvolvimento embriológico (BARTH & OKO, 1989).

Segundo o Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal, do CBRA- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998), a proporção de defeitos maiores não deve ser superior a 10%. O aumento das porcentagens no método de lâmina corada (Figura 37) e de câmara úmida (Figura 40), no grupo G1 a partir do momento 4, onde se observa, ainda, as médias das patologias dos dois grupos sempre dentro de um padrão aceitável para a fertilidade (menor que 10 %), começa a elevar-se no grupo tratado com quimioterapia, até chegar a um valor três vezes superior ao permitido, para um cão apto à reprodução. Com isso, sugere que a cisplatina interfere de forma significativa na performance reprodutiva de cães.

Os defeitos menores são aqueles defeitos morfológicos que possuem baixos efeitos sobre a fertilidade (BARTH & OKO, 1989). O aumento de defeito menor no método de lâmina corada (Figura 38) e no método de câmara úmida (Figura 41), no grupo G2 (grupo que não recebeu a quimioterapia) no momento 4 foi devido a um dos cães deste grupo que apresentou 35% e 75 % de gota citoplasmática distal, respectivamente nos métodos de avaliações espermáticas supracitados, sendo que após o momento 2, este cão sempre apresentou uma porcentagem maior deste defeito quando comparado aos demais, evidenciando uma variabilidade individual.

Segundo o Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal, do CBRA- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998), a proporção de defeitos maiores e menores no sêmen de cão deve ser no máximo de 20%. O aumento de defeitos totais no método de lâmina corada (Figura 39) e câmara úmida (Figura 42), no grupo G1, a partir do momento 5 chegando na sua porcentagem máxima no momento 6 e mantendo-se no momento 7 no método de lâmina corada e assumindo um leve decréscimo no método de câmara úmida, demonstra que a porcentagem de defeitos totais, que antes do início da quimioterapia era por volta de 5 % nos dois grupos, elevou-se em mais de 30%, no grupo G1, quando é completado um ciclo espermático no momento 6 (63 dias após o início da quimioterapia). É importante ressaltar que o máximo aceitável é de 20% para aptidão reprodutiva. Isto pode supor que a cisplatina influencia de forma significativa na qualidade espermática, podendo apresentar efeitos citotóxicos, tanto em epitélio germinativo (espermatogênese) como no epitélio

epididimário do cão (espermiogênese). A discreta elevação dos referidos defeitos no grupo G2, a partir do momento 3, sugere que seja em virtude do estresse ambiental, em especial da diurese salina, que os animais foram submetidos. No momento 4, em virtude da variabilidade individual para defeito menor (gota citoplasmática distal), observou-se um discreto aumento no grupo G2 (grupo não tratado com quimioterapia).

A motilidade, vigor, volume e o aspecto do sêmen dos cães dos grupos G1 e G2 avaliados não apresentaram nenhuma diferença significativa entre as suas médias, podendo inferir que a cisplatina não exerceu uma influência considerável sobre tais parâmetros.

Em virtude, do presente experimento, ter utilizado dois métodos (lâmina corada e câmara úmida) de avaliação da patologia espermática, tornou-se imperativo a comparação entre os métodos para predizer a eficácia e a semelhança de ambos, já que tais métodos avaliaram os mesmos parâmetros morfológicos do sêmen estudado. Diante disso, observamos que não houve diferença significativa entre os métodos, quando se confrontaram as médias dos defeitos maior, menor e total. Isto demonstra que tais métodos neste experimento foram igualmente eficientes na detecção das patologias maior e menor do sêmen estudado.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitem as seguintes conclusões:

1. Os parâmetros de contagem das alterações morfológicas dos espermatozoides de cães híidos submetidos à administração de cisplatina, em sete diferentes tempos demonstraram que o fármaco aumentou o número de patologias no grupo tratado (G1).
2. As patologias espermáticas detectadas no presente experimento sugerem a ocorrência de alterações morfofuncionais nos túbulos seminíferos e no conduto epididimário de cães tratados com cisplatina.
3. Os dois métodos de avaliação espermática (método da lâmina corada e câmara úmida), quando comparados entre si, mostraram-se efetivos, no estudo do espermograma de cães tratados com cisplatina.

7. REFERÊNCIAS

ADLER, I. D.; TARRAS, A. Clastogenic effects of cis-diamminedichloroplatinum. II. Induction of chemosomal aberrations in primary spermatocytes and spermatogonial stem cell of mice. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 243, n. 3, p. 173-178, 1990.

ANDRADE, F. A. Terapêutica antineoplásica. In: ANDRADE, F. A. **Manual de terapêutica veterinária**. São Paulo: Roca, p.192, 2002.

BANE, A.; NICANDER, L. Electron and light microscopical studies on espermateliosis in a boar with acrosome abnormalities. **Journal of Reproductive fertility**. Iowa, p. 133-138, 1965.

BARACAT, F. F.; BARACAT, F. Câncer e gravidez. In: BARACAT, F. F. I.; FERNANDES JR, H. J.; SILVA, M. J. **Cancerologia atual: um enfoque multidisciplinar**. São Paulo: Roca, p.461-477, 2000.

BOUCHER, J., FOOTE, R.H., KIRK, R.W. The evaluation of semen quality in the dog and the effects of frequency of ejaculation upon semen quality, libido and depletion of sperm reserves. **The Cornell Veterinarian**, v.48, p.67-86, 1958.

CASTANHO, P. R. O. L.; GRANDE, M.; KUE, C. M.; FRISTACHI, C. E.; OLIVEIRA, A. B.; BERNARDI, M. A.; BARACAT, F.; PASCALICCHIO, J. C.; BARACAT, F. F.; Câncer ginecológico sexualidade. In: BARACAT, F. F.; FERNANDES JR, H. J.; SILVA, M. J. **Cancerologia atual: um enfoque multidisciplinar**, São Paulo: Roca, p.478-497, 2000.

CARDOSO, R.C.S.; SILVA, A.R; UCHOA, D.C. *et al.* Cryopreservation of canine semen using a coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. **Theriogenology**, v.59, p.743-751, 2003.

CHERRY, S. M.; HUNT, P. A.; HASSOLD, T. J. Cisplatin disrupts mammalian spermatogenesis, but does not affect recombination or chromosome segregation. **Mutation Research**, Amsterdam, v.564, n.2, p.115-128, 2004.

COELHO, L. A. **Avaliação da motilidade progressiva e da integridade da membrana plasmática de espermatozoides de bovinos para fecundação in vitro**. 1993. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1993.

COLPI, G. M.; CONTALBI, F. N.; SAGONE P.; PIEDIFERRO, G. Testicular function following chemo-radiotherapy. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, Shannon, Supplement 1, v.113, p.52-56, 2004.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed., Belo Horizonte-MG, p.52, 1998.

CRUZ, C. D. **Programa Genes**: versão Windows: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, p.648, 2001.

DALECK, C. R.; FRANCESCHINI, P. H.; PADILHA FILHO, J. G.; ALESSI, A. C.; GARCIA, J. M.; MARTINS, M. I. M.; COSTA NETO, J. M. Alterações produzidas em nível de testículo e sêmen de cães submetidos à administração de sulfato de vincristina. **Brasilian Journal Review Science**, v.32, n.1, p.51-56, 1995.

DAVID FILHO, W. J.; ADAM VAN EYLL, B. M. H. R. Complicações do tratamento clínico de câncer. In: BARACAT, F. F.; FERNANDES JR, H. J.; SILVA, M. J. **Cancerologia atual**: um enfoque multidisciplinar. São Paulo: Roca, p.271-276, 2000.

DOTT, H.M., FOSTER, G.C. A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a different "live/dead" stain. **Journal of Reproductive Fertility**, v.29, p.443-445.

ENGLAND, G.C.W., ALLEN, W.E. Factors affecting the viability of canine spermatozoa. II Effects of seminal plasma and blood. **Theriogenology**, v.37, p.373-81, 1992.

GAFFAN J, HOLDEN L, NEWLANDS ES, SHORT D, FULLER S, BEGENT RH, RUSTIN GJ, SECKL MJ. Infertility rates following POMB/ACE chemotherapy for male and female germ cell tumours – a retrospective long-term follow-up study. **British Journal of Cancer**, Hants, v.89, n.10, p.1849-1854, 2003.

GORMAN, N. T. Chemotherapy. In: WHITE, R. A. S. **Manual of small animal oncology**. Cheltenham: p.127-160, 1991.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Avaliação do sêmen In: AX, R. L., DALLY, M., DIDION, A. B., LENZ, R. W., LOVE, C. C., VARNER, D. D., HAFEZ, B., ELLIN, M. E. **Reprodução Animal**. 7ª ed. São Paulo: Manole, p. 372-373, 2004.

HEATH, E.; OTT, R. S. Diadem crater defect in spermatozoa of a bull. **Veterinary Research** v. 110, p. 5-6, 1982.

HOWELL, S. J. E.; SHALET, S. M. Spermatogenesis after cancer treatment: damage and recovery. **Journal of the National Cancer Institute Monographs**, Bethesda, n.34, p.12-17, 2005.

IGUER-OUADA, M., VERSTEGEN, J. Validation of sperm quality analyser (SQA) for dog semen analysis. **Theriogenology**, v.55, p.1143-58, 2001.

ISHIKAWA T.; KAMIDONO, S.; FUJISAWA, M. Fertility after high-dose chemotherapy for testicular cancer. **Urology**, Belle Mead, v.63, n.1, p.137-140, 2004.

KNUDSEN, O. Cytomorphological investigations into the spermiocytogenesis of bulls with normal fertility and bulls with acquired disturbances in spermiogenesis. **Pathology Microbiology Scandinavian**. Cap. 101 e 102, p. 12-79, 1954.

MARTINS, M. I, M. **Efeito da sazonalidade sobre a função testicular de cães**. Botucatu, 123p, 2005. Tese de Doutorado- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

McGLENNON, N. J. The Musculoskeletal system. In: WHITE, R. A. S. **Manual of small animal oncology**. Cheltenham: p.265-280, 1991.

OGILVIE, G. K.; MOORE, A. S. Chemotherapy: properties, uses, and patient management. In: OGILVIE, G. K.; MOORE, A. S. **Feline oncology: a comprehensive guide to compassionate care**. New Jersey: Veterinary Learning Systems. Cap. 11, p.63. 2001.

OETTLÉ, E. E.; SOLEY, J.T. Infertility in a maltese poodle as a result of a sperm midpiece defect. **Journal South Africa Veterinary Association** v.56, p.103-106, 1985.

OETTLÉ, E. E. Sperm morphology and fertility in the dog. **Journal of Reproduction and Fertility**, Supplement 47, p.257-60, 1993.

MORRISON, W. B. Chemotherapy. In: MORRISON, W. B. **Cancer in dogs and cats: medical and surgical management.**, ed. Teton Newmedia, Jackson, p.351-358, 1998.

PLUMMER, J. M.; WATSON, P. F.; ALLEN, W. E. A spermatozoal midpiece abnormality associated with infertility in a Lhasa Apso dog. **Journal Small Animal Practies** v.28, p.743-751, 1987.

PIMENTEL GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 12. ed. São Paulo: Nobel, p. 67, 1987.

RODASKI, S.; DE NARDI, A. B. Classificação dos quimioterápicos. In: RODASKI S.; DE NARDI, A. B. **Quimioterapia antineoplásica em cães e gatos**. Curitiba: Editora Maio, p. 69-72, 2004

RODRIGUES, B.A. **Efeito do diluidor à base de albumina sérica bovina (BSA) sobre a viabilidade in vitro do sêmen canino criopreservado**. Porto Alegre, 1997. 176p. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SAWHNEY, P. GIAMMONA, J.; MEISTRICH, M.; RICHBURG, J. H. Cisplatin-induced long-term failure of spermatogenesis in adult C57/Bl⁶ mice. **Journal of Andrology**, Texas, v.26, n.1, p.136-145, 2005.

SEAGER, S.W.J. Artificial insemination in dogs. In: BURKE, T.J. **Small Animal Reproduction and Infertility: A Clinical Approach to Diagnosis and Treatment**. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 207-217, 1986.

SEAGER, S.W.J., FLETCHER, W.S. Collection, storage and insemination of canine semen. **Laboratory Animal Science**. v.22, p.177-182, 1972.

SEAMAN F, SAWHNEY P, GIAMMONA CJ, RICHBURG JH. Cisplatin-induced pulse of germ cell apoptosis precedes long-term elevated apoptotic rates in C57/BL/6 mouse testis. **Apoptosis**, Austin, v.8, n.1, p.101-108, 2003.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; UCHOA, D.C., SILVA, L.D.M. Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. **Theriogenology**, v.59, p.821-829, 2003.

SPINOSA, H. S. GÓRNIAC, S. L.; BERNARDI, M. M. Agentes antineoplásicos In: DAGLI, M. L. Z. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**, 3. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, p. 504, 2003.

SWANSON, E. W.; BOYD, L. J. Factors affecting coiled-tail spermatozoa in the bull. **American Journal Veterinary Research**,

STRAW, R. C. Tumors of the skeletal system. In: WITHROW, S. J.; MACEWEN, E. G. **Small animal clinical oncology**. 2. ed. Philadelphia:W.B. Saunders, p.287-315, 1996.

TAKSEY J.; BISSADA N. K.; CHAUDHARY U. B. Fertility after chemotherapy for testicular cancer. **Archives of Andrology**, London, v.49, n.5, p.189-95, 2003.

WATERS, D. J.; COOLEY, P. M. Skeletal Neoplasms. In: MORRISON,W.B. **Cancer in dogs and cats: medical and surgical management**. Baltimore: Sans Tache, p.639-654, 1998.

ZHANG X.; YAMAMOTO N.; SORAMOTO S.; TAKENAKA I. Cisplatin-induced germ cell apoptosis in mouse testes. **Archives of Andrology**, London, v. 46, n.1, p.43-49, 2001.

APÊNDICES

Tabela 1A. Valores do hemograma, urinálise, bioquímico e eletrólitos dos cães do grupo G1 e G2 em diferentes momentos.

Cães	HEMOGRAMA				URINÁLISE				BIOQUÍMICA				ELETRÓLITOS			
	He	Le	Hb	Ht	Dens	pH	TGP	Crea.	Prot.	Ca	P	Mg	Na	K		
G1	Jacky	6870	14600	14,9	44,6	1040	8	15,71	1,36	7,56	11,64	5,3	1,79	145	3,6	
	Amarelo	7010	11400	15,8	46,9	1035	8	33,71	1,13	7,95	12,4	3,48	1,75	142	4,6	
	Benji	7480	9600	18,8	54,3	1041	8	97,8	0,91	7,89	9,93	4,47	1,8	145	3,9	
	Magrelo	6730	15300	15,5	45,7	1025	8	29,55	0,91	7,78	10,3	4,78	1,91	144	3,5	
	Fofão	7060	11700	17	47,9	1025	9	26,19	1,41	7,09	10,37	5,71	1,68	146	3,8	
G2	Billy	4180	10300	12	35,2	1050	7	21,11	1,18	9,86	12	4,14	1,5	146	3,9	
	Coçoira	4990	3400	11,5	33,1	1032	6,5	21,11	0,81	13,6	10,19	4,43	1,62	144	4	
	Piloto	7920	8400	19	54,2	1044	8	46,43	1,13	7,42	12,4	4,47	1,79	141	3,5	
Cães	Hemograma				Urinálise				Bioquímica				Eletrólitos			
	He	Le	Hb	Ht	Dens	pH	TGP	Crea.	Prot.	Ca	P	Mg	Na	K		
G1	Jacky	6260	12700	14,2	42	1029	8,5	26,19	1,31	7,33	15,99	5,94	2,4	147	3,7	
	Amarelo	6620	4500	15,1	44,6	1015	7	41,9	1,58	6,19	14,13	2,25	2,1	142	4,5	
	Benji	7700	4200	18,1	52,3	1013	8	151,9	1,31	8,39	13,59	5,21	2	143	4,2	
	Magrelo	6490	6200	14,8	44,2	1027	7,5	36,67	1,2	7,83	16,42	5,78	2,3	146	3,6	
	Fofão	6930	11200	16,2	47,7			20,95	1,26	7,5	13,92	4,52	2	147	3,7	
G2	Billy	4410	7300	13	38,4	1039	6	15,71	1,47	9,41	20,87	5,14	1,6	145	3,7	
	Coçoira	6360	6000	14,9	43,7	1041	8	20,95	0,93	12,1	13,91	5,99	2,2	146	3,8	
	Piloto	7620	12200	18,3	53,5	1041	8	31,43	0,87	7,77	12,54	5,23	2	144	3,7	

Momento
4

	Cães	Hemograma				Uirálise				Bioquímica			Eletrólitos					
		Hc	Le	Hb	Ht	Dens	pH	TGP	Gca	Pct.	Ca	P	Mg	Na	K			
Mnento 5	G1	Jacky	5780	11800	131	38,9	1018	6,5	41,9	1,44	7,34	122	6,18	2	135	48		
		Anarelo	6590	8800	152	44,2	1009	8	47,4	1,54	9,29	146	4,38	1,8	136	37		
		Barji	7170	7300	169	48,4	1018	7,5	68,09	0,96	8,42	11,58	4,23	1,8	140	49		
		Magele	6230	8800	14,5	43,4	1019	7	36,67	1,49	8,34	9,69	5,04	2,1	142	51		
		Fdão	6520	9800	15,5	45,2	1031	8,5	47,14	1,22	7,5	9,9	4,21	1,7	176	4		
	G2	Billy	4440	13100	13,2	39,4	1042	8	40,95	1,38	9,76	10,7	5,4	1,8	155	41		
		Coçeira	6590	5700	15,8	46	1059	8	52,38	1,17	11,4	13,23	5,71	1,9	137	39		
		Fildo	7530	12100	18,2	52,6	1043	8	41,9	1,17	7,42	15,22	5,41	1,8	132	4		
		Mnento 6	G1	Jacky	5460	11300	12,4	36,7	1017	8	36,7	1,85	7,57	10,41	6,18	2,1	135	39
				Anarelo	6050	10900	13,9	40,8	1020	7,5	36,6	1,97	8,55	10,14	6,19	2,1	136	38
Barji	6710			5500	16,4	44,9	1020	7,5	78,57	1,85	8,81	10,46	5,64	2	133	4,3		
Magele	5560			9900	13,5	37	1007	7,5	41,9	1,69	8,25	9,69	5,33	2,4	140	37		
Fdão	6430			10700	15,6	44,6			36,65	1,52	7,87	9,34	7,63	2,5	142	4,2		
G2	Billy		3770	12500	11,9	23,4	1048	6	31,43	1,18	9,1	17,4	6,11	1,9	134	4,4		
	Coçeira		5840	6700	14,7	40,8	1036	6	36,67	1,46	10,4	9,79	4,83	1,9	134	4,3		
	Fildo		6710	3800	16,8	46,5	1045	6	20,95	1,4	7,4	9,6	6,54	1,8	131	4,3		
	Mnento 7		G1	Jacky	5470	10500	12,2	35,5	1016	8	36,68	2,17	7,54	11,51	4,98	2	139	37
				Anarelo	6320	7500	13,7	41,1	1025	8,5	47,1	1,65	7,46	12,4	3,35	2,1	137	37
Barji		6690		6700	15,3	44,2	1024	9	52,38	1,65	5,26	10,76	4,24	1,7	138	4		
Magele		6090		9000	14,3	41,4	1022	9	36,67	1,71	8,4	11,38	3,24	1,9	137	35		
Fdão		6110		10700	14,8	41,8	1035	7	31,43	1,31	5,95	8,42	3,88	1,8	138	3,9		
G2		Billy	3950	17800	11,9	34,6	1016	7	41,9	1,08	7,22	11,74	3,5	2,2	136	3,8		
		Coçeira	6840	8700	16,3	46,6	1040	8	57,62	1,37	9,84	9,77	5,03	2,3	140	4,2		
		Fildo	7130	11000	17	48,4	1045	7	22,5	1,14	8,32	10,07	4,66	1,9	139	4		

Tabela 2A. Valores médios das patologias espermáticas do método de lâmina corada.

		Momentos						
Grupos	1	2	3	4	5	6	7	
Defeito de acrossomo								
G1	0,5	2,25	3,25	2	4,75	5,75	14,875	
G2	0,375	1	3,062	2,375	1	1,375	1,375	
Cabeça piriforme								
G1	0,125	2,25	0,625	1,125	3	3,875	6,125	
G2	0,5	2,125	1,8125	2,375	1,375	3,625	3,375	
Cabeça subdesenvolvida								
G1	0	0,375	0,125	0	0,25	2,25	1,125	
G2	0,25	0,625	0,375	0,125	0,75	0,375	0,375	
Cabeça estreita na base								
G1	0	0,125	0,375	0,25	0,25	0,125	0,875	
G2	0	0,125	0,25	0,5	0	0,375	0,125	
Cabeça com contorno anormal								
G1	0,25	1,25	1	0,875	1	3,875	5	
G2	0,75	0,75	0,5	1,5	0,75	0,875	1	
"Pouch formation"								
G1	0	0	0	0	0,375	0	0	
G2	0	0	0	0,125	0	0,25	0,25	
"Knobbed"								
G1	0,00	1,25	0,25	0,00	0,25	1,50	1,50	
G2	0,00	0,25	0,00	0,25	0,00	0,00	0,25	
GCP								
G1	0	0,125	0,375	1	2,5	13	8,375	
G2	0,625	0,75	0,3125	2,125	3,5	8,875	5,375	
Formas teratológicas								
G1	0	0	0	0,125	0,125	0,125	0,875	
G2	0	0	0	0	0,125	0	0,125	
PI alterada								
G1	0,375	0,375	0	1,125	4,625	12,75	4,375	
G2	0,125	0,875	1,875	1,5	2	0,75	1,125	
CFD								
G1	1,875	1	2,125	3,125	2,5	8,125	15,125	
G2	2,625	1,875	2,3125	2,5	3,875	4	1,125	
CDG								
G1	0,125	0,625	1,125	0,375	0,25	5,25	2,125	
G2	0,875	1,375	0,825	0,625	0,5	0	0	
CEC								
G1	0	0	0	0	0,25	2,125	2	
G2	0	0	0	0	0	0,125	0,125	

Formas duplas							
G1	0,5	0,25	0	0,25	0,25	1	1
G2	0	0,5	0,25	0	1,25	0,25	0
Cauda abaxial							
G1	0	0	0,625	0,125	1,25	0,375	1
G2	0	0,5	0,375	0,125	0,25	0,125	1,125

Tabela 3A. Valores médios das patologias espermáticas do método de câmara úmida.

Grupos	Momentos						
	1	2	3	4	5	6	7
	Defeito de acrossomo						
G1	0,625	0,25	0,875	1,125	2,375	3,875	2,875
G2	0,5	0,375	0,5625	0,5	0,5	0	0,75
	Cabeça piriforme						
G1	0,25	0,125	1	0,75	0,625	3,625	3,125
G2	0,75	0,625	1,125	3,5	1	1,5	1,125
	Cabeça subdesenvolvida						
G1	0	0	0,5	0,25	0,125	2	0
G2	0	0	0	0	0,5	0	0
	Cabeça estreita na base						
G1	0	0	0	1	0	1	0,5
G2	0	0	0,375	0	0	0,5	0,125
	Cabeça com contorno anormal						
G1	0,25	0	0,25	0,5	0,125	1,75	0,75
G2	0,125	0,625	0,39	2,125	0,25	0,125	0,375
	"Pouch formation"						
G1	0	0	0	0	0	0,5	0
G2	0	0	0	0	0	0	0,5
	"Knobbed"						
G1	0	0	0	0	0,125	0,5	0,75
G2	0	0,125	0	0	0	0	0
	GCP						
G1	0,25	0,5	1,125	0,625	5,875	21,125	12,375
G2	0,5	1,25	0,6875	2,75	7	11,75	5
	Formas teratológicas						
G1	0	0,125	0,125	0,125	0	1,5	0,875
G2	0	0	0	0	0	0	0,125
	PI alterada						
G1	0,75	0,125	0,5	1,125	0,75	4,625	2,875
G2	0,25	0,25	0	2,125	1	1,5	0,25
	CFD						
G1	1,375	0,75	2,125	2,625	2,5	8,625	18,125
G2	1,625	2,75	2,3125	3,5	3,75	5	2,75
	CDG						
G1	0	0,375	0,875	0,75	2,62	10,125	8
G2	1,625	1,5	0,9375	0,25	5	4,125	1,625
	CEC						
G1	0	0	0	0	0,125	1	0,5
G2	0	0	0	0	0	0	0
	Formas duplas						
G1	0,25	0	0	0,125	0,625	0,875	0,75
G2	0,75	0,5	0,5	0,5	0,375	0	0,125