

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

**AVALIAÇÃO SEMINAL E TESTICULAR DE CÃES
SUBMETIDOS À ADMINISTRAÇÃO DE CISPLATINA.**

Michele Garcia Medeiros T. de Castro
Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

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

**AVALIAÇÃO SEMINAL E TESTICULAR DE CÃES
SUBMETIDOS À ADMINISTRAÇÃO DE CISPLATINA.**

**Pós-Graduanda: Michele Garcia Medeiros Teotônio de Castro
Orientador: Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente**

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
2010

M488
a Medeiros, Michele Garcia
Avaliação seminal e testicular de cães submetidos à
administração de cisplatina /Michele Garcia Medeiros. -- Jaboticabal,
2010
xxii, 122 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2010
Orientador: Wilter Ricardo Russiano Vicente
Banca examinadora: Márcia Rita Fernandes machado, Andriago
Barboza De Nardi
Bibliografia

1. Sêmen. 2. Espermograma. 3. Ultra-som. 4. Análise
Ultraestrutural I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias
e Veterinárias.

CDU 619:615.28:636.7

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

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MICHELE GARCIA MEDEIROS T. DE CASTRO - nasceu no Paraná, na cidade de Uraí, no dia 17 de Janeiro de 1979. Filha de Ipojucan Cabral de Medeiros e Lucinéia Garcia de Medeiros, concluiu os cursos ginasial e colegial no Colégio Positivo, em Curitiba, PR. Graduou-se em Medicina Veterinária no ano de 2006, pela Universidade Federal do Paraná , ingressou em 2006 no Programa de Aprimoramento Profissional em Medicina Veterinária, na área de Obstetrícia e Reprodução Animal junto ao Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Universidade Estadual Paulista – UNESP – Câmpus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente. Em 2008 entrou no programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária, curso de Mestrado, junto a FCAV, UNESP, campus de Jaboticabal, sob a orientação do Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente.

“Procure ser uma pessoa de valor, em vez de procurar ser uma pessoa de sucesso. O sucesso é consequência.”

Albert Einstein

Dedico

À minha mãe Lucinéia Garcia de Medeiros (força e otimismo) e o meu pai Ipojucan Cabral de Medeiros (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.

Ao meu filho lindo, Gabriel Medeiros de Castro, meu anjo amado, que me inspira em todos os momentos da minha vida e me faz uma pessoa muito melhor.

Ao meu esposo, João Humberto Teotônio de Castro pelo amor dedicado, companheirismo e paciência e por ser uma pessoa tão especial e presente na minha vida.

À minha vó Maria Lúcia Garcia Ponce Alves por toda a ajuda e suporte durante os momentos mais difíceis que me sobrevieram no decorrer do mestrado, pelo carinho comigo e com meu filho amado Gabriel.

Ao meu irmão Potiguar Medeiros Neto, a minha cunhada Heloize Tolchak e ao meu amado sobrinho e afilhado Davi Ubiratan, pelos momentos agradáveis, de felicidade, de amor e união familiar.

Ofereço

Ao meu amado pai...

Amigo é coisa para se guardar

Debaixo de sete chaves

Dentro do coração

Assim falava a canção...

Mas quem cantava chorou

Ao ver seu amigo partir

Amigo é coisa para se guardar

No lado esquerdo do peito

Mesmo que o tempo e a distância digam “não”

Mesmo esquecendo a canção

O que importa é ouvir

A voz que vem do coração

Pois seja o que vier, venha o que vier

Qualquer dia, amigo, eu volto

A te encontrar

Qualquer dia, amigo, a gente vai se encontrar...

Ipojucan Cabral de Medeiros (...in memoriam)

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 e por me amparar todas as vezes que da Senhora precisei mãe amada.

Aos meus avós Potiguar Medeiros e Maria Célia Pereira (simplicidade, humildade e exemplo de fé), e minha vó Maria Lúcia G. Ponce Alves por toda a sua ajuda durante o meu mestrado e aos momentos difíceis que enfrentamos juntas.

Aos meus sogros Hortência e Alvírio que eu considero como meus segundos pais, obrigada pelo amor a mim dedicado, por todao auxílio e por fazerem parte da minha vida, amo vocês muito.

Ao prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente por todo o apoio e sinceridade durante a minha residência e o meu mestrado.

Ao Professor Dr. Andriago Barboza De Nardi por ter aceito a participar deste momento tão importante da minha vida acadêmica, por suas valiosas considerações, e por ser um exemplo de conhecimento, caráter e simplicidade.

Ao Prof. Dr. Paulo Henrique Franceschini, mais conhecido como “Cocão”, por suas correções, idéias , elogios e orientação na reprodução animal (essencial neste experimento).

Ao Professor Dr. César Roberto Éesper. por sua motivação em ensinar, pelas correções feitas a este relatório e orientação na reprodução animal (essencial neste experimento).

À Professora Dra. Márcia Rita por suas valiosas considerações neste trabalho e por ser um exemplo de mulher competente, de caráter e muito querida neste meio onde as relações humanas muitas vezes se perdem.

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

Ao Professor Dr. Olícies da Cunha por todo o ensinamento, e que me apresentou de maneira excelente o mundo da clínica e cirurgia veterinária e

principalmente pela excelência dos seus conhecimentos que me inspiram a querer ser uma excelente profissional.

A minha grande amiga e companheira de residência Fabiana Azevedo Voorwald, pela sua amizade, exemplo e ensinamentos.

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 Danilo (Puff), amigo muito querido, que me ajudou muito principalmente durante a minha residência, pessoa que está também sempre disposto a ajudar.

Aos meus amigos que me ajudaram durante toda a minha residência e mestrado , Diogo e Carol, André (clínica), Carol do Juan, Eliandra, Karen, Guilherme(mineirinho), Simone (onco), Sabrinhas (onco), Jú (reprodução), Marcy, Dona Izilda (por seu carisma), Dona Sílvia, Ana, Arnildo, Luis Guilherme e Maria Emília

A todos os estagiários do Setor de obstetrícia veterinária que me proporcionaram momentos alegres, compartilhando conhecimentos..

As funcionárias do laboratórios de Microscopia eletrônica, Cláudia e Cláudia também, por toda a ajuda e disposição em me ajudar nos momentos mais difíceis do meu mestrado, jamais esquecerei da boa vontade e paciência de vocês.

Aos colegas, funcionários e docentes do Departamento de Reprodução Animal da UNESP, Câmpus de Jaboticabal, Roberta, Ivo, Bel, Paulo, Max

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

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 Fundação de Amparo á Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de estudos concedida.

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

AVALIAÇÃO SEMINAL E TESTICULAR 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 citotóxico para as células germinativas testiculares. O objetivo desse trabalho foi avaliar a qualidade espermática através do espermograma, ultra-som e avaliação de ultraestruturas do testículo de cães que receberam cisplatina em diferentes momentos de análise espermática. A dose utilizada foi de 70 mg/m², dose terapêutica, 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 e ao tratamento suporte. 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, além de alterações de volume testicular observados pelo exame ultra-sonográfico ao longo dos tratamentos e constatação da degeneração testicular em variados graus observados pela análise ultraestrutural. Portanto, infere-se que este citostático possa acarretar alterações morfofuncionais nos túbulos seminíferos.

Palavras-Chave: Sêmen, espermograma, ultra-som, análise ultraestrutural, cisplatina, cão

SEMINAL AND TESTICULAR EVALUATION OF DOGS SUBMITTED TO THE ADMINISTRATION OF CISPLATIN.

SUMMARY - The Veterinary Doctor's correct orientation, to the proprietors of dogs, used with reproductive purposes, submitted to the chemotherapy with cisplatin, it is important in the measure that this citostatic agent acts in the cells in constant division, could be toxicity for the testicle germ cells . The objective of that work was to evaluate the spermatic quality through the spermogram, ultra-sound and evaluation of ultrastructures of the testicle of dogs that received cisplatin in different moments of spermatic analysis. The used dose was of 70 mg/m², therapeutic dose, in intervals of 21 days, totaling 4 infusions. The dogs were divided in two groups of 4 animals each, and one of the groups received the chemotherapy and the diuresis protocol for renal protection, the group control didn't already receive the cisplatin, being just subject to the environmental factors and the treatment supports. The obtained results demonstrated that the cisplatin influenced in the spermatic quality of dogs, because it elevated the larger and total pathologies above the acceptable for capable dogs the reproduction, besides alterations of volume testicular observed by the ultra-sound exam along the treatments and verification of the degeneration testicular in varied degrees observed by the analysis ultrastructural. Therefore, it is inferred that this citostatic agent can cart alterations morphofunctional in the seminiferous tubules.

Key-words: Semen, sperm analysis, ultrasound, ultrastructural analysis, cisplatin, dog.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxvii
LISTA DE FIGURAS.....	xxix
LISTA DE APÊNDICES.....	xxxvi
RESUMO.....	xxii
SUMMARY.....	xxiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 DESCRIÇÃO ANATÔMICA E FISIOLÓGICA DOS TESTÍCULOS DE CÃES.....	4
2.2 TERAPIA ANTIBLÁSTICA COM CISPLATINA.....	12
2.3 ULTRA-SONOGRAFIA TESTICULAR EM CÃES.....	18
2.4 AVALIAÇÃO SEMINAL (ESPERMOGRAMA).....	23
2.5 CARACTERÍSTICAS ULTRAESTRUTURAIS DAS CÉLULAS GERMINATIVAS (MET).....	33
3. OBJETIVO.....	38
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1 ANIMAIS.....	39
4.2 LOCAL DO EXPERIMENTO.....	40
4.3 GRUPO EXPERIMENTAL E QUIMIOTERAPIA CITOTÓXICA.....	40
4.4 COLHEITA DE SÊMEN.....	42

4.5 ANÁLISE DO EJACULADO.....	42
4. 5.1 Análise Macroscópica.....	42
4.5.1.1 Volume.....	42
4.5.1.2 Cor e Aspecto.....	42
4. 5. 2 Análise Microscópica.....	43
4.5.2.1 Motilidade espermática.....	43
4.5.2.2 Vigor.....	43
4.5.2.3 Concentração espermática.....	43
4.5.2.4 Turbilhonamento.....	43
4.5.2.5 Morfologia espermática.....	43
4.6. AVALIAÇÃO ULTRA-SONOGRÁFICA TESTICULAR.....	45
4.6.1 Mensuração e Avaliação em Escala de Cinzas.....	45
4.7. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DA ESPERMATOGÊNESE.....	49
4.7.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	49
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
5. RESULTADOS.....	51
5.1. ESPERMOGRAMA.....	51
5.1.1 Motilidade Espermática.....	52
5.1.2 Vigor.....	53
5.1.3 Concentração Espermática.....	54
5.1.4 Turbilhonamento.....	55
5.1.5 Morfologia espermática.....	56
5.1.5.1 Método da Lâmina Corada.....	56
5.1.5.1.1 Defeito Maior.....	56

5.1.5.1.2 Defeito Menor.....	60
5.1.5.1.3 Defeito Total.....	61
5.2 AVALIAÇÃO ULTRA-SONOGRÁFICA TESTICULAR.....	63
5.2.1 Mensuração Testicular.....	63
5.2.2 Avaliação em escala de cinzas.....	65
5.3 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DAS CÉLULAS GERMINATIVAS.....	68
6. DISCUSSÃO.....	77
7. CONCLUSÃO.....	97
8. REFERÊNCIAS.....	98
APÊNDICES.....	116
Tabela 1A. Valores do hemograma, urinálise, bioquímico e eletrólitos dos cães do grupo T e C em diferentes momentos.....	117
Tabela 2A. Valores médios das patologias espermáticas do método de lâmina corada.....	118
Tabela 3A . Valores médios da análise espermática dos cães dos grupos T e C durante os sete momentos avaliados.....	119
Tabela 4A – Motilidade espermática (média ± desvio padrão) dos animais dos grupos tratado e controle nos 5 momentos de colheita e análise do sêmen.....	52
Tabela 5A – Vigor espermático (média ± desvio padrão) dos animais dos grupos tratado e controle nos 5 momentos de colheita e análise do sêmen.....	53

Tabela 6A – Concentração espermática ($\times 10^6$) (média \pm desvio padrão) dos animais dos grupos tratado e controle nos 5 momentos de colheita e análise do sêmen.....54

Tabela 7A – Turbilhonamento (média \pm desvio padrão) dos animais dos grupos tratado e controle nos 5 momentos de colheita e análise do sêmen.....55

Tabela 8A – Morfologia Espermática – Defeito maior (média \pm desvio padrão) dos animais dos grupos tratado e controle nos 5 momentos de colheita e análise do sêmen.....57

Tabela 9A – Morfologia Espermática – Defeito menor (média \pm desvio padrão) dos animais dos grupos tratado e controle nos 5 momentos de colheita e análise do sêmen.....60

Tabela 10A – Morfologia Espermática – Defeito total (média \pm desvio padrão) dos animais dos grupos tratado e controle nos 5 momentos de colheita e análise do sêmen.....62

LISTA DE ABREVIATURAS

AC= ACROSSOMO
BH = BARREIRA - HEMATOTESTICULAR
C= GRUPO CONTROLE
CA= COMPARTIMENTO ADLUMINAL
CDG= CAUDA DOBRADA COM GOTA
CEC= CAUDA ENROLADA NA CABEÇA
CFD= CAUDA FORTEMENTE DOBRADA
CG= COMPLEXO DE GOLGI
CGM= CÉLULAS GIGANTES MULTINUCLEADAS
CM= CENTÍMETRO
DNA = ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLÉICO
EC= ESCALA DE CINZAS
EIV= ECHO IMAGE VIEWER
ESP=ESPERMÁTIDE
ESPA= ESPERMÁTIDE ALONGADA
I=INTERSTÍCIO
LB=LÂMINA BASAL
LE=LEPTÓTENO
L= CÉLULA DE LEYDIG
M= MITOCÔNDRIA
MM= MOMENTO
MAE= MEMBRANA ACROSSOMAL EXTERNA
MAI= MEMBRANA ACROSSOMAL INTERNA
MET= MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO
N= NÚCLEO DA CÉLULA DE SERTOLI
PA= REGIÃO PÓS-ACROSSOMAL
P= PAQUÍTENO
PI= PEÇA INTERMEDIÁRIA

RE = RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO

RI= REGIÃO DE INTERESSE DO PARÊNQUIMA TESTICULAR

RIFD= REGIÃO DE INTERESSE FRONTAL DIREITA

RIFE= REGIÃO DE INTERESSE FRONTAL ESQUERDA

SC= CITOPLASMA DA CÉLULA DE SERTOLI

SPTZ= ESPERMATOZÓIDE

SPT^{1a}=ESPERMATOGÔNIA PRIMÁRIA

SPC=ESPERMATÓCITO

SPT – B=ESPERMATOGÔNIA TIPO B

SPT – A= ESPERMATOGÔNIA TIPO A

SPT^{2a}= ESPERMATOGÔNIA SECUNDÁRIA

SPT= ESPERMATOGÔNIA

SPC¹= ESPERMATÓCITO PRIMÁRIO

T= GRUPO TRATADO

TS= TÚBULO SEMINÍFERO

US= ULTRA-SOM

VT= VOLUME TESTICULAR

LISTA DE FIGURAS

Página

1. Ilustração esquemática do epitélio seminífero demonstrando a disposição das várias gerações celulares em diferentes estágios de desenvolvimento. (fonte: <http://faculty.washington.edu/Kepeter/118/photos/testesce11s.jpg>)09
2. Ilustração do processo de espermiogênese. Notar transformação da espermatíde arredondada na complexa estrutura do espermatozóide. (fonte: <http://faculty.washington.edu/Kepeter/118/photos/sperm-development.jpg>)11
3. Estrutura química da cisplatina13
4. Esquema do método de colheita de sêmen pelo procedimento de estimulação digital. (Fonte: Christiansen, I. J., 1988)25
5. Ilustração fotográfica de cão sob contenção física recebendo a quimioterapia e o protocolo de diurese:41
6. Esquema didático demonstrando o exame ultra-sonográfico em plano transversal (A), plano frontal (B) e plano sagital(C) no testículo dos cães dos dois grupos45
7. Imagem ultra-sonográfica dos testículos direito e esquerdo de um cão de 2 anos pertencente ao grupo tratado, no plano de varredura frontal, demonstrando as regiões de interesse selecionadas. Note que as regiões de interesse englobam apenas a região do parênquima testicular46

8. Imagem dos testículos direito e esquerdo de um cão de 2 anos, pertencente ao grupo tratado, no plano de varredura sagital, onde E representa a espessura e C o comprimento testicular47
9. Imagem ultra-sonográfica dos testículos direito e esquerdo de um cão de 2 anos, pertencente ao grupo tratado, no plano de varredura frontal, onde L representa a largura do parênquima testicular ao ultra-som48
10. Evolução dos valores médios percentuais de motilidade espermática nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen. (M0 – momento do início da quimioterapia)52
11. Representação dos valores médios percentuais de vigor espermático nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen. (M0- momento antes do início da quimioterapia)53
12. Evolução dos valores médios percentuais de concentração espermática nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen. (M0 – momento antes do início da quimioterapia)54
13. Evolução dos valores médios percentuais de turbilhonamento nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen. (M0 – momento antes do início da quimioterapia)55
14. Evolução dos valores médios percentuais de espermatozóide com defeito maior nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. (M0 – momento antes do início da quimioterapia)57
15. Evolução dos valores médios percentuais de patologias espermáticas avaliadas pelo método de lâmina corada observadas entre o grupo tratado e controle58
16. Ilustração fotográfica de lâmina corada: observar seta azul sptz com cabeça piriforme (A) e seta preta, sptz com acrossomo defeituoso (B) (destacamento),

seta azul sptz com cabeça de contorno anormal (A) e seta preta o mesmo sptz com inserção de cauda abaxial (B), seta azul sptz, cabeça estreita na base (A), seta azul, sptz com PI alterada (A) e seta preta, sptz CFD (B), seta azul, sptz com CEC (A) e seta preta, sptz CDG (B). Aumento: 100 vezes. Coloração: KARRAS modificado por PAPA et al. (1988).....59

17. Evolução dos valores médios percentuais de espermatozóide com defeito menor nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. (M0 – momento antes do início da quimioterapia)60
18. Evolução dos valores médios percentuais de patologias espermáticas avaliadas pelo método de lâmina corada, defeito menor, observadas entre o grupo tratado e controle61
19. Evolução dos valores médios percentuais de espermatozóide com defeito total nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen. (M0 – momento antes do início da quimioterapia)62
20. Evolução dos valores médios percentuais do volume dos testículos esquerdo e direito dos animais do grupo tratado ao longo das quimioterapias64
21. Imagem ultra-sonográfica de testículo esquerdo e direito de cão pertencente ao grupo tratado no plano de varredura sagital, demonstrando a nítida redução do comprimento e largura testiculares64
22. Valores médios percentuais obtidos para a variável escala de cinzas (EC) nos diferentes momentos da análise ultra-sonográfica66
23. Imagem ultra-sonográfica de testículos esquerdo e direito de cão pertencente ao grupo tratado, no plano de varredura sagital, demonstrando uma diminuição da ecogenicidade do parênquima testicular67

24. Imagem ultra-sonográfica de testículos esquerdo e direito de cão pertencente ao grupo tratado, no plano de varredura frontal, demonstrando uma diminuição da ecogenicidade do parênquima testicular67
25. Eletronmicrografia do parênquima testicular de cão pertencente ao grupo controle. **A** - Característica ultraestrutural do túbulo seminífero e interstício (600 x). **B** - Eletronmicrografia demonstrando intensa divisão celular (600x). **C** - espermatogônias primárias e espermatócitos na prófase I da meiose (1500x). **D** - espermatogônias primárias e epsermatócitos em fase de leptóteno (2000x). **E** - espermatogônias tipo A e tipo B (3000x). **F** - espermátides alongadas e espermatócitos em paquíteno (1500x)72
26. Eletronmicrografia do epitélio testicular seminífero de cão do grupo controle. **G** – espermatogônias secundárias , espermatócitos em paquíteno e presença de lisossomos (1200x). **H** – espermatócitos na prófase I da meiose - paquíteno (2000x). **I** – espermatogônias primárias com nucléolo excêntrico bem evidente (1500x). **J** – compartimento adluminal comportando as células espermatogênicas em diferentes estágios de divisão meiótica e mitótica (1200x)73
27. Eletronmicrografia do epitélio germinativo testicular de cão do grupo controle. **L** – espermátides alongadas no citoplasma da célula de Sertoli (4000x). **M** – espermátides arredondadas (2500x). **N** – núcleo da célula de Sertoli (6000x). **O** – mitocôndria e complexo de golgi74
28. Característica ultraestrutural do epitélio germinativo testicular de cão submetido à quimioterapia. **A** – degeneração do epitélio testicular (1200x). **B** - retração do espaço intertubular com oclusão parcial da luz tubular (1500x). **C** – presença de células da linhagem espermatogênica (1500x). **D** – célula tronco (3000x). **E** – ausência de sptz no lume (3000x). **F** – células de Leydig (1200x)75

29. Eletronmicrografia do epitélio seminífero de cão do grupo tratado. **G e H** – células degeneradas (2500x, 3000x). **I** – cabeça do espermatozóide de cão do grupo controle (15000x). **J** – cabeça com aspecto de forquilha (5000x). **L** – variação no tamanho nuclear (6000x). **M** – vacuolização em região acrossomal (6000x)

.....76

1. INTRODUÇÃO

O câncer apesar de já ter sido relatado por Hipócrates há séculos, constitui-se até os dias de hoje um desafio à comunidade científica, pois representa a segunda causa de morte na espécie humana (FERNANDES JUNIOR, 2000). Conforme Daleck et al. (1995) o aumento contínuo das enfermidades neoplásicas constatado nos vários animais domésticos, tem alta prevalência, principalmente na espécie canina.

Os fármacos antineoplásicos em geral atuam inibindo as proliferações celulares, agindo sem distinção nas células normais e nos oncócitos. Em decorrência desse fato, as células que se multiplicam mais rapidamente, como por exemplo, as germinativas e epiteliais são as mais comprometidas pela quimiotoxicidade dos agentes citostáticos (OGILVIE, 1996; WATERS; COOLEY, 1998). 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). Este quimioterápico tem a capacidade de se intercalar no interior e entre as fitas do DNA causando a ionização de átomos de cloro, conseqüentemente inativando o DNA. É uma substância com grande aplicabilidade na terapia antitumoral, comumente utilizada no tratamento de neoplasias do aparelho reprodutor (DAGLI, et al, 2002).

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 renal, além desta são relatadas outras alterações como anafilaxia, neuropatia periférica, ototoxicidade, neurite ótica e diminuição de magnésio, sódio, fósforo e cálcio (RODASKI; DE NARDI, 2004). Na literatura médica veterinária são escassos os dados sobre os efeitos desse agente citostático na reprodução de cães. Estudos em ratos (C57/BI/6J) realizados por Seaman (2003), Sawhney (2005),

Zhang (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 um 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 e 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 massa dos testículos.

Na medicina, a cisplatina é usada largamente na terapêutica do câncer testicular, mesmo sendo constatado seus efeitos colaterais como azoospermia (HOWELL; SHALET 2005). Além disto, este quimioterápico pode 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).

Em experimento realizado por Castro (2007), onde se avaliou a morfologia espermática, confrontando dois métodos (lâmina corada e câmara úmida) de cães submetidos à administração de cisplatina, constatou-se que o fármaco elevou o número de patologias espermáticas, demonstrando a ocorrência de alterações morfofuncionais nos túbulos seminíferos de cães tratados com cisplatina, ainda evidenciou que os dois métodos de avaliação espermática, quando comparados entre si, mostraram-se efetivos no estudo da morfologia, não apresentando diferença significativa entre os dois métodos.

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 da mesma substância determina degeneração testicular de grau leve a moderado.

Ao longo dos anos, muitos pesquisadores têm buscado desenvolver ensaios laboratoriais capazes de prever com exatidão a capacidade fertilizante de amostras seminais (GRAHAM, 2001), permitindo dessa forma um manejo efetivo de reprodutores (KIRK et al., 2005). Nesse sentido, os espermatozoides são avaliados rotineiramente por meio de microscopia ótica, observando-se as características físicas relacionadas à morfologia e a qualidade do movimento desenvolvido pelas células espermáticas (JOSHI et al., 2001). No entanto, isoladamente, a morfologia e a motilidade espermática representam apenas indicações grosseiras da real capacidade fertilizante de um ejaculado (BLOTTNER et al., 2001), que depende, sobretudo, da integridade dos diferentes compartimentos celulares dos espermatozoides e de suas funções características (MAGISTRINI et al., 2001).

Embora os ensaios laboratoriais, como a determinação da motilidade espermática, possam ser utilizados para uma rápida avaliação de uma amostra seminal, esses testes não permitem o acesso às alterações que ocorrem em proporções celulares (KIRK, et al., 2005). Quando os defeitos morfológicos se expressam por alterações em escala nanométrica (nm), ocorrem falhas nos métodos tradicionais de avaliação, havendo a necessidade do emprego da microscopia eletrônica (MET) (JOSHI et al., 2001).

As técnicas radiológicas, laboratoriais e microscópicas na avaliação da infertilidade masculina humana e animal proporcionam a formação de uma base sólida para o melhor entendimento dos processos patofisiológicos envolvidos e para uma melhor adequação das condutas terapêuticas a serem seguidas. Portanto, torna-se necessário a realização de maiores pesquisas sobre o exato efeito da cisplatina na fertilidade da espécie canídea, tomando por base estudos em seres humanos e roedores

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. DESCRIÇÃO ANATÔMICA E FISIOLÓGICA DOS TESTÍCULOS DE CÃES

As gônadas masculinas situam-se fora do abdome, no escroto, sendo uma estrutura semelhante a uma bolsa, derivada da pele e da fáscia da parede abdominal (HAFEZ, 2004). A consistência normal é elástica e firme, variando de muito firme em animais jovens sexualmente maduros, até a consistência elástica macia em animais idosos (SILVA & DODE, 1993).

Sua posição é oblíqua, apresenta forma ovóide sendo achatado transversalmente. O bordo anterior é apenas recoberto superiormente por uma parte da cabeça do epidídimo e o posterior dá inserção ao corpo do epidídimo. As extremidades, arredondadas, superior e inferior estão recobertas pela cabeça e cauda do epidídimo, respectivamente. O pólo superior é o de inserção do cordão espermático (MIES FILHO, 1977). O parênquima testicular consiste de túbulos seminíferos (que são os maiores componentes dos testículos) (JOHNSON, 1991) e tecido intersticial. Ele é cercado por um denso tecido conjuntivo capsular, denominado túnica albugínea.

Os espermatozoides são produzidos através da espermatogênese dentro dos túbulos seminíferos (STANBENFELD & EDQUIVIST, 1996). Estes são compostos por células espermatogênicas (espermatogônias, espermatócitos e espermátides) entremeados por células de suporte, as células de Sertoli (DADOUNE & DEMOULIN, 1993). O testículo é constituído por dois compartimentos: o tubular e o intertubular. O espaço entre os túbulos seminíferos contém tecido conectivo frouxo onde se encontram numerosos vasos sanguíneos e linfáticos, (DADOUNE & DEMOULIN, 1993) (que são essenciais para o movimento dos hormônios e nutrientes para dentro

e fora do testículo) (O`DONNEL et al., 1991), nervos , células de Leydig e células livres (fibroblastos, macrófagos, linfócitos e mastócitos) (DADOUNE & DEMOULIN, 1993). O tipo celular mais comumente encontrado no interstício é a célula de Leydig, a qual é primariamente envolvida na secreção de andrógenos assim como outros esteróides (O`DONNEL et al., 2001).

Segundo MIES FILHO (1977), do testículo depende as duas funções essenciais do macho: a espermatogênese com produção de espermatozóides imaturos do processo de espermatogênese e a androgênica através da produção do hormônio sexual masculino testosterona e outros hormônios como progesterona e estrógeno, por meio do processo de esteroidogênese. As células direta ou indiretamente envolvidas na produção dos gametas masculinos: (células de Sertoli, células germinativas, células de Leydig, células mióides peritubulares, leucócitos) mantêm um sistema parácrino/autócrino, que modula uma intrincada rede de interação celular, fundamental para o perfeito funcionamento do testículo (SCHLATT *et al*, 1997).

A unidade histológica dos testículos são os túbulos seminíferos e sede da função espermatogênica (MIES FILHO, 1977). Os túbulos aparecem como grandes estruturas isoladas, perfis arredondados ou oblíquos, aparência variável devido ao seu complexo espiralado em muitos diferentes ângulos e níveis. Entre os túbulos situam-se os vasos sanguíneos de diâmetro variável agrupados com eritrócitos e embutidos em pequenas massas de células intersticiais (Leydig), que produzem os hormônios sexuais masculinos para o interior das veias testiculares e vasos linfáticos, sendo dependentes dos hormônios gonadotrópicos, LH (hormônio luteizante) e FSH (hormônio folículo estimulante), liberados pela adenohipófise. O eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal é quem regula a secreção destes hormônios, sendo este eixo auto regulável.

O componente não germinativo dos túbulos seminíferos, são as células de Sertoli, descritas originalmente por Enrico Sertoli (1865) na Itália (GONZÁLEZ, 2002). São células grandes com nucléolos evidentes e seu citoesqueleto é responsável por manter a forma celular e os movimentos ativos do citoplasma, essencial ao acomodamento das constantes mobilidades das células germinativas

(STANBENFELD & EDQUIVIST, 1996; DADOUNE & DEMOULIN, 1993). Estas células de sustentação repousam sobre a membrana basal e exercem funções nutritivas, protetoras e de sustentação para as células espermatogênicas. As células de Sertoli desempenham papel fundamental na regulação do processo espermatogênico (RUSSELL & GRISWOLD, 1993).

Dentre as muitas funções desempenhadas por esta célula, incluem-se o suporte e a nutrição das células germinativas em desenvolvimento, a compartimentalização do epitélio seminífero, a liberação de espermatozoides no lume tubular, a secreção de fluidos e proteínas, a produção de citocinas, fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), lactato e transferrina, a fagocitose de células germinativas em degeneração e do excesso de citoplasma das espermátides em espermição (GONZÁLEZ, 2002, FRANÇA & RUSSELL, 1998).

Entre as células de Sertoli, há junções altamente especializadas, conhecidas como zônulas de oclusão ou “tight junctions”. Estas junções formam a barreira de células de Sertoli (também conhecida como barreira hemato-testicular), a qual, além de controlar o fluxo de substâncias no epitélio seminífero, delimita dois compartimentos, o basal e o adluminal (RUSSELL *et al*, 1990).

O compartimento basal contém espermatogônias e espermatócitos no estágio de preleptoteno e o compartimento adluminal é preenchido por espermatócitos primários em estágios posteriores e secundários e espermátides arredondadas (DADOUNE & DEMOULIN, 1993; AMANN, 1993). A população de células de Sertoli no epitélio seminífero é constante ao longo de toda a vida do animal (FRANÇA & RUSSELL, 1998; SHARPE, 1994; FRANÇA, 1991; PATIL & SAIDAPUR, 1991; WING & CHRISTENSEN, 1982).

Em cães adultos, a população deste tipo celular permaneceu constante em animais de 1 a mais de 10 anos de idade (PAULA, 1992). Em cada espécie, a célula de Sertoli suporta um número limitado de células germinativas (FRANÇA *et al*, 1999; FRANÇA & RUSSELL, 1998; ORTH *et al*, 1988), conhecido como índice de célula de Sertoli. Devido a esta característica, esta célula é utilizada como uma referência para analisar e quantificar a espermatogênese (PAULA, 1999).

As células intersticiais localizadas entre os túbulos seminíferos são denominadas células de Leydig. Estas células se encontram em contato íntimo com o sistema de capilares (DADOUNE & DEMOULIN, 1993) e sua principal função é a produção de testosterona, que é importante para o desenvolvimento e manutenção da espermatogênese e das características masculinas (O'DONNELL et al., 2001). O FSH e os andrógenos mantêm a função gametogênica, enquanto o LH controla a secreção de testosterona pelas células de Leydig.

O LH também tem efeito tóxico sobre as células de Leydig, estimulando-as a se hipertrofiar. A remoção do LH cessa a produção de testosterona e leva a uma grande redução no tamanho das células de Leydig (STANBENFELD & EDQUIVIST, 1996).

A testosterona produzida pelas células de Leydig desloca-se para dentro do túbulo seminífero por difusão simples ou facilitada. Altas concentrações são necessárias para a espermatogênese e especialmente para o processo de meiose (STANBENFELD & EDQUIVIST, 1996). Cerca de 95 % da testosterona circulante no sangue é de origem testicular, o resto é liberado pela produção da adrenal com a conversão periférica de androstenediona. Outros andrógenos detectados no sangue vem do testículo, como a dihidrotestosterona (20% origem testicular), dehidroepiandrosterona (30%) e androstenediona (50%) (DADOUNE & DEMOULIN, 1993).

As funções periféricas da testosterona são desenvolvimento e manutenção da libido, atividade secretora dos órgãos acessórios e características corporais que em geral são associados ao macho (KALTENBACH & DUNN, 1982; AMANN, 1993; STANBENFELD & EDQUIVIST, 1996).

As mudanças comportamentais incluem padrão urinário dos cães, que envolve o levantamento de um membro posterior como prelúdio da micção, a agressividade (STANBENFELD & EDQUIVIST, 1996), a posição na ordem social para a apreensão do alimento (KALTENBACH & DUNN, 1982) e a marcação de território por substâncias conhecidas como ferormônios, que podem ser produzidas pelo rim sob influência da testosterona (STANBENFELD & EDQUIVIST, 1996).

Os túbulos seminíferos influenciam o desenvolvimento e a função das células de Leydig adjacentes através de vários fatores de crescimento. Quando as células

germinativas estão danificadas, as células de Leydig próximas proliferam-se rapidamente (HUHTANIEMI & TOPPARI, 1995).

As células de Leydig ainda sintetizam outras substâncias como IGF-1 e proteínas ligantes, ainda, ocitocina que parece ser transportada pelas células de Sertoli para o fluido luminal ou secretado na *rete testis* (AMANN,1993), facilitando a contração rítmica dos túbulos seminíferos para facilitar na evacuação do sêmen, produzem ainda vasopressina e peptídeos opióides (DADOUNE & DEMOULIN, 1993).

Transversalmente ao epitélio do túbulo seminífero, são arranjadas cerca de quatro gerações de células da linhagem espermatogênica em diferentes fases de desenvolvimento. As várias gerações de espermatogônias, não são aleatoriamente dispostas dentro dos túbulos seminíferos, mas são organizadas em associações celulares estritamente definidas (O'DONNELL et al., 2001) e seu desenvolvimento conta com uma íntima associação com as células de Sertoli, com múltiplos tipos de espermatogônias em contato com uma única célula de Sertoli (O'DONNELL et al., 2001).

As gerações mais imaturas estão dispostas junto à base e as gerações mais avançadas, próximo à luz do túbulo. Quando o desenvolvimento das células germinativas se completa, as espermátides maduras são liberadas pelas células de Sertoli dentro do lume, e passam por um sistema de duto coletor, conhecido como *rete testes*, antes de entrarem no epidídimo via dutos eferentes. Durante a passagem através do epidídimo, as espermátides sofrem uma série de alterações bioquímicas para se tornarem espermatozóides capazes de fertilizar (O'DONNELL et al., 2001).

Cada geração apresenta um desenvolvimento progressivo e rigorosamente sincronizado com as demais, formando um fluxo em direção à luz do túbulo, onde serão liberadas como espermatozóides. Pode-se observar uma cíclica sucessão de arranjos distintos entre as diferentes gerações, denotando os estádios do ciclo do epitélio seminífero, segundo o método da morfologia tubular (BERNDTSON, 1977) (Figura 1).

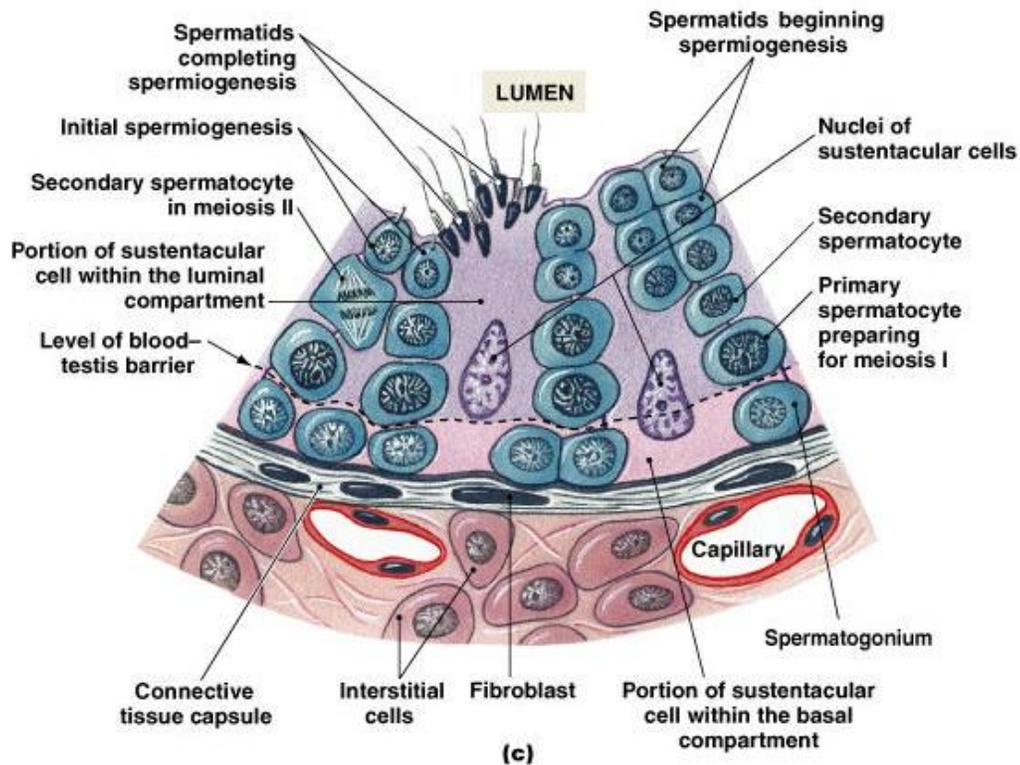


Figura. 1. Esquema de um corte ansversal do epitélio seminífero demonstrando a disposição das várias gerações celulares em diferentes estágios dedesenvolvimento. (fonte: <http://faculty.washington.edu/Kepeter/118/photos/testes-cells.jpg>).

A espermatogênese é um processo no qual as célula germinativas entram em divisão, diferenciação, e meiose para dar origem a espermátides haplóides (O'DONNEL et al., 2001). A mitose, cuja função básica é assegurar a produção de grande número de células germinativas, é a primeira fase mais importante da espermatogênese (STANBENFELD & EDQUIVIST, 1996). As espermatogônias indiferenciadas presentes na membrana basal dos túbulos seminíferos são denominadas células germinativas (O'DONNEL et al., 2001).

O desenvolvimento da célula germinativa envolve uma série de complicados eventos, (O'DONNEL et al., 2001) e é classificada em subtipos de acordo com o

estágio de diferenciação (HULEIHEL & LUNENFELD, 2004), incluindo a espermatogônia tipo A, intermediária (presente apenas em roedores) e tipo B (O'DONNELL et al., 2001, HULEIHEL & LUNENFELD, 2004). Uma das espermatogônias formadas pela divisão mitótica inicial não se divide nem se diferencia mais e permanece em estado basal de diferenciação; em essência ela substitui a célula parental, enquanto a outra processa a mitose (STANBENFELD & EDQUIVIST, 1996).

A meiose é a segunda etapa da espermatogênese e tem como função a redução no número de cromossomos da célula germinal para o estado haplóide (STANBENFELD & ADQUIVIST, 1996). Depois da última mitose que forma a espermatogônia do tipo B, espermatócitos no estágio preleptóteno primário são formados. Essas células replicam o DNA e então iniciam a meiose (O'DONNELL et al., 2001).

Durante a prófase da primeira divisão meiótica, as células germinativas entram em transição morfológica que podem ser classificadas com base no tamanho nuclear e morfologia. Na fase de zigóteno, os cromossomos homólogos pareados ocorrem, e essas células com cromossomos pareados são denominadas espermatócitos no paquíteno. Depois da fase de paquíteno, uma breve fase de diplóteno se segue, na qual os cromossomos pareados parcialmente se separam, e as células então entram na primeira divisão meiótica para produzir as espermatídes secundárias. Essas células entram rapidamente na segunda divisão meiótica para gerar a espermatíde haplóide arredondada (O'DONNELL et al., 2001).

A espermiogênese é a transformação das espermatídes arredondadas na complexa estrutura do espermatozóide (HULEIHEL & LUNENFELD, 2004), conforme mostra a figura 2. Ela inicia-se nos túbulos seminíferos e termina no epidídimo (STANBENFELD & EDQUIVIST, 1996).

As espermatídes produzidas pela segunda divisão meiótica, se diferenciam de forma celular esférica com núcleo esférico para células que tem uma cabeça aerodinâmica contendo enzimas que possibilitam a penetração do oócito, núcleo condensado que carrega o genoma masculino, desenvolvimento da mitocôndria para

fornecer energia e uma cauda necessária para a motilidade celular (JOHNSON, 1991, O'DONNELL et al., 1991)

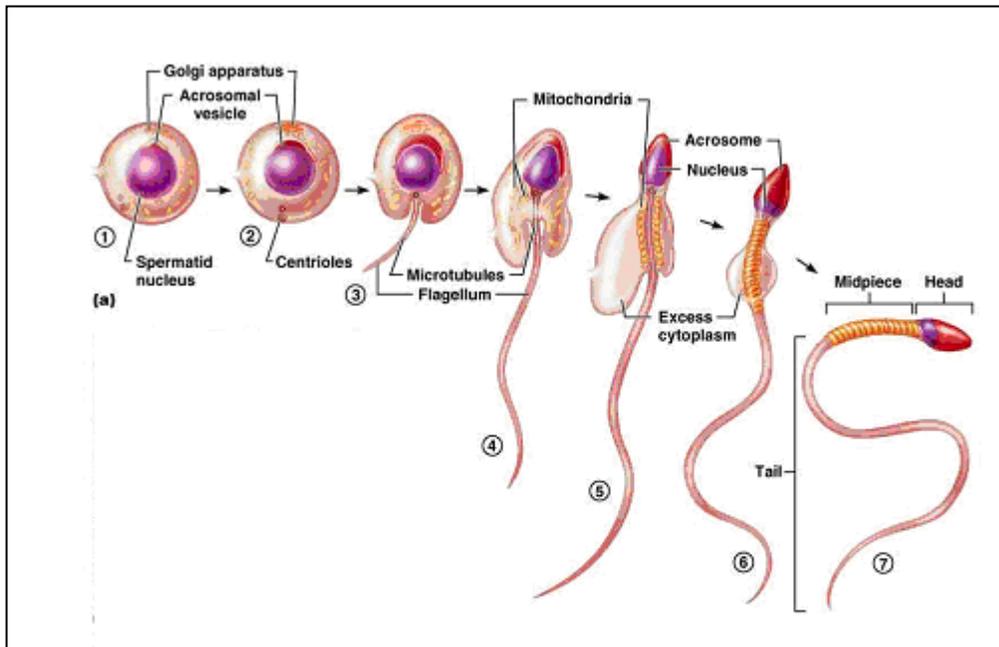


Figura. 2. Ilustração do processo de espermiogênese. Notar transformação da espermatíde arredondada na complexa estrutura do espermatozóiado. (fonte: <http://faculty.washington.edu/Kepeter/118/photos/spermdevelopment.jpg>).

Cada espermatogônia que substitui a célula-mãe começa a se dividir a intervalos de tempo que são característicos de cada espécie, sendo o intervalo denominado ciclo espermatogênico. O ciclo espermatogênico para as várias espécies são o seguinte: suínos 8 dias (STANBENFELD & EDIQUIVIST, 1996); ovinos 10 dias (STANBENFELD & EDIQUIVIST, 1996; GARNER, 1982); bovinos 14 dias (STANBENFELD & EDIQUIVIST, 1996); ratos 12 dias, humanos 16 dias (STANBENFELD & EDIQUIVIST, 1996; JOHNSON, 1991); eqüinos 12 dias (JOHNSON, 1991; GARNER, 1982) e cão 14 dias (JOHNSON, 1991).

Há uma relação bastante precisa entre a duração do ciclo espermatogênico e a espermatogênese isto é, a espermatogênese é quatro a cinco vezes a duração do ciclo espermatogênico (STANBENFELD & EDQUIVIST, 1996; JOHNSON, 1991).

A duração do processo espermatogênico no cão é de aproximadamente 62 dias, ou seja, é o tempo necessário para uma espermatogônia ser liberada na luz do túbulo seminífero sob a forma de espermatozóide. Assim, findo este prazo, nenhuma geração destas células estaria sob efeito direto de determinada alteração testicular, por exemplo, uma quimioterapia.

No epitélio seminífero, a apoptose de células germinativas ocorrem normalmente de forma espontânea ou em resposta a vários fatores, como uma quimioterapia por exemplo, temperatura elevada, distúrbios hormonais e diminuição de fatores de crescimento (BLANCO-RODRIGUEZ & MARTINEZ-GARCIA, 1998; HENRIKSEN & PARVINEN, 1998; SINHA-HIKIM & SWERDLOFF, 1999). O modo de degeneração das células germinativas é espécie-específico, mas, em geral, ocorre durante as divisões mitóticas e meióticas (ROOSEN-RUNGE, 1973), refletindo-se nos rendimentos intrínsecos da espermatogênese.

2.2. TERAPIA ANTIBLÁSTICA COM CISPLATINA

O câncer apesar de já ter sido relatado por Hipócrates há séculos, constitui-se até os dias atuais um desafio à comunidade científica, pois representa a segunda causa de morte na espécie humana (FERNANDES JUNIOR, 2000). Conforme Daleck et al. (1995) o aumento contínuo das enfermidades neoplásicas constatado nos vários animais domésticos, tem alta prevalência, principalmente na espécie canina. Os testículos são altamente susceptíveis aos efeitos tóxicos das terapias antitumorais, embora o exato mecanismo seja incerto, aparentemente envolve a combinação de destruição da proliferação de células germinativas com a inibição de futuras diferenciações das células sobreviventes (KANGASNIEMI et al., 1996). A

quimioterapia citotóxica e radioterapia podem destruir o tecido gonadal e resultar em esterilidade parcial ou permanente (THOMSON et al., 2002).

Os fármacos antineoplásicos em geral atuam inibindo as proliferações celulares, agindo sem distinção nas células normais e nos oncócitos. Em decorrência desse fato, as células que se multiplicam mais rapidamente, como por exemplo, as germinativas, mielógenas e epiteliais são as mais comprometidas pela quimiotoxicidade dos agentes citostáticos (OGILVIE, 1996; WATERS; COOLEY, 1998).

A utilização de quimioterapia no tratamento do câncer tem sido objeto de estudo nas últimas três ou quatro décadas. Apesar disto, o envolvimento de compostos inorgânicos, principalmente contendo metais, foi muito limitado até a demonstração da atividade anticancerígena de complexos contendo platina por Rosenberg e colaboradores no final dos anos (ROSENBERG, 1969; ROSENBERG, 1970).

O sucesso na clínica do cis-[diamindicloroplatina(II)], cis-[PtCl₂(NH₃)₂] platina complexa cercada por dois átomos de cloro com dois grupos de amônia na posição cis, figura 3, denominado Cisplatina, inicialmente utilizada em pacientes terminais (HIGBY, et al., 1973) e, posteriormente, em tumores localizados, como nos casos de câncer testicular (WALLACE & HIGBY, 1974) ovariano (WILTSHAW & CARR, 1974), bem como o desenvolvimento de procedimentos clínicos que diminuem a toxicidade renal (CIVTKOVIC et al., 1977; DE LENA et al., 1987), têm revertido a resistência inicial e renovado o interesse na química deste composto e outros estreitamente relacionados.

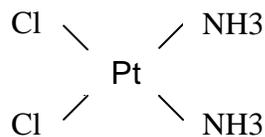


Fig. 3. Estrutura química da Cisplatina

A cisplatina é um sal metálico de baixa polaridade (SPINOSA, et al., 2003) em cujo núcleo existe a platina metálica, pertencente ao grupo dos alquilantes bifuncionais 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 ou mesmo prejudicando a molécula do DNA já formado. (ANDRADE, 2002).

Este quimioterápico tem a capacidade de se intercalar no interior e entre as fitas do DNA configurando uma lesão molecular, ocorrendo à ionização de átomos de cloro, inibindo a replicação, transcrição, tradução e reparação do DNA, conseqüentemente inativando-o. A cisplatina exerce seu efeito antineoplásico por meio de uma reação intracelular, na qual as moléculas de cloro na posição *cis* são substituídas por água ou grupos hidroxil, transformando-a num composto altamente reativo, que pode alquilar as bases púricas e pirimídicas do DNA (HALABE et al., 1991). A propriedade citotóxica deste fármaco, assim como de numerosos análogos, tem sido atribuída a sua habilidade de formar ligações cruzadas (“Cross-Link”) do tipo interfilamentar e também intrafilamentar.

As ligações cruzadas interfilamentares são mais citotóxicas, pois a alquilação de um único filamento de DNA pode até ser reparado facilmente, mas as ligações cruzadas interfilamentares, como as produzidas por agentes alquilantes bifuncionais, exigem mecanismos mais complexos de reparação, sendo que esta droga muda a conformação do DNA inibindo sua síntese e causando a apoptose celular. Como efeito secundário, a Cisplatina interfere na síntese do RNA e de proteínas essenciais ao organismo, demonstrando especial preferência para os tecidos cujas células apresentam alta velocidade de reprodução mitótica (OGILVIE, 1996; WATERS; COOLEY, 1998).

Os estudos farmacocinéticos, efetuados em seres humanos e em animais de experimentação, demonstraram uma distribuição tissular rápida, sendo que as maiores concentrações foram encontradas nos rins, fígado, intestinos delgado e grosso. A difusão no sistema nervoso central é extremamente fraca.

O desaparecimento da radioatividade após injeção da Cisplatina marcada é bifásica, com uma meia-vida plasmática de distribuição de 25 a 49 minutos e uma

meia vida de eliminação de 58 a 73 horas. Durante a fase de excreção, a sua ligação às proteínas plasmáticas é superior a 90%, ou seja, apresenta baixa eliminação e maior duração do efeito, sendo sua eliminação essencialmente urinária. Contudo a excreção urinária é incompleta, sendo somente 27% a 43% da radioatividade excretada nos 5 dias posteriores à administração em humanos (OGILVIE, 1996; WATERS; COOLEY, 1998). De acordo com Rodaski & De Nardi, 2004, cinquenta e oito por cento da dose administrada são excretadas pela urina em 24 a 48 horas.

No entanto, o modo como a cisplatina entra na célula, ainda não é elucidado, mas estudos evidenciam que o principal mecanismo seja a difusão passiva, assim como o fluoracil que é outro quimioterápico, e esta difusão ocorre principalmente em barreira hemato-encefálica, túbulos renais e sistema gastrintestinal. Diante do exposto, podemos imaginar que a polaridade da molécula ou sua lipossolubidade está mais correlacionada com a sua capacidade de atravessar as barreiras do que simplesmente o tamanho ou a massa molecular; sendo que na barreira hematotesticular só passam substâncias pouco polares (SPINOSA, et al., 2003).

A Cisplatina foi introduzida em testes clínicos no início da década de 70 (HIGBY, et al., 1973) e os resultados demonstraram que essa droga era um dos mais eficazes agentes quimioterápicos disponíveis para o tratamento do câncer, principalmente os de testículo e ovário.

Nestas neoplasias o tratamento com a Cisplatina obteve boas respostas como agente terapêutico único ou como droga básica em vários regimes de poliquimioterapia, uma vez que possui efeito sinérgico com numerosos agentes como alquilantes, antibióticos e antimetabólitos (LOEHRER, 1984; FIORENTINO & GHIOTO, 1987). É uma substância com grande aplicabilidade na terapia antitumoral, comumente utilizada no tratamento de osteossarcomas, mostrando também atividade contra linfomas caninos e alguns carcinomas (DAGLI et al., 2002).

O entusiasmo inicial causado pela descoberta de um novo agente quimioterápico foi, no entanto, arrefecido com a observação de que a Cisplatina, como a maioria dos quimioterápicos, possui vários efeitos tóxicos importantes, destacando-se principalmente a toxicidade renal (GORMAN, 1995; MORRISON, 1998), a toxicidade gastrointestinal e a neurotoxicidade (STRUM et al., 1985;

OZOLS, 1989). Possuindo, também citotoxicidade hematológica, , pulmonar (nos felídeos), além desta são relatadas outras alterações como anafilaxia, neuropatia periférica, ototoxicidade, neurite ótica e diminuição de magnésio, sódio, fósforo e cálcio (RODASKI & DE NARDI, 2004)

Na literatura médica veterinária são escassos os dados sobre os efeitos desse agente citostático na reprodução de cães. Sabe-se que a quimioterapia afeta o testículo tanto em sua função endócrina quanto na exócrina. O impacto e a duração da disfunção gonadal nestes pacientes depende da qualidade prévia do sêmen ao tratamento, idade, tipo de agente quimioterápico utilizado, dose e número de ciclos realizados (Presti et al., 1993). Estudos em ratos realizados por Seaman (2003), Sawhney (2005), Zhang (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 um 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 e 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 massa dos testículos.

Na medicina, a cisplatina é usada largamente na terapêutica do câncer testicular, mesmo sendo constatados seus efeitos colaterais como azoospermia (HOWELL; SHALET 2005). Além disto, este quimioterápico pode 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). De modo geral, utilizando-se quimioterapia, a maior parte dos pacientes se torna azoospérmicos, por lesão das espermatogônias do tipo B, após sete a oito semanas

do início do tratamento. Destes, 56% apresentam recuperação da concentração, com níveis acima de 20 milhões ,após 24-36 meses pós-quimioterapia. Contudo, a melhora do espermograma já pode ser alcançada após 12 semanas, se não ocorrer lesão de toda a população de espermatogônias do tipo A. A elevação de FSH, indicativa de lesão das células de Sertoli, atinge um pico com 14 meses e se normaliza, em metade dos pacientes após dois anos (PRESTI et al., 1993).

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 da mesma substância determina degeneração testicular de grau leve a moderado. Mais recentemente em um estudo com a cisplatina, foi observado que os resultados obtidos demonstraram que o fármaco influenciou na qualidade espermática de cães, pois elevou as patologias maiores e totais acima do aceitável para cães aptos a reprodução (CASTRO, 2007).

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).

A lesão gonadal pode ser explicada por alterações morfológicas das células germinativas em suas diversas fases de espermatogênese e por alterações genéticas subletais que podem acarretar defeitos congênitos futuros. Tem sido aceito que a quimioterapia também afeta as células de Sertoli em maior proporção que as de Leydig (PRESTI et al., 1993). Doses acumulativas maiores que 400 mg/m² causam lesão gonadal irreversível (WALLACH, 1997).

Foi observado que pacientes com baixas concentrações de espermatozóides anteriores à realização da quimioterapia apresentam uma melhora mais acentuada quando comparadas com aquelas que apresentam redução apenas moderada da concentração. Isto serviu como um modelo experimental de proteção da

espermatogênese, utilizando-se análogos de GnRH. Todavia, o seu uso na prática clínica ainda é questionável (YORK & BADALAMENT, 1993).

2.3. AVALIAÇÃO ULTRA-SONOGRÁFICA TESTICULAR DE CÃES

Na Medicina Veterinária, o uso freqüente da ultra-sonografia (US) foi mais tardio quando comparado à Medicina. Apesar dos primeiros relatos do uso do ultra-som em Medicina Veterinária terem sido feitos há quase 30 anos, a sua maior difusão e popularização foi na década de 80 (VIANA, 2004).

Com a popularização da técnica e o maior conhecimento fisiológico do trato reprodutivo, em machos e fêmeas, aliados a aparelhos sofisticados que geram imagens de alta qualidade, o uso da ultra-sonografia agregado ao exame clínico (andrológico ou ginecológico) é um exame complementar de grande importância, especialmente em desordens subclínicas. O diagnóstico preciso e correto é o conjunto de informações de todas as análises feitas no animal (JEDRASZCZYK, 2004).

A ultra-sonografia é um método de diagnóstico muito útil na rotina clínica de pequenos animais e especialmente no exame do trato reprodutivo, tanto do macho como da fêmea (GONZÁLEZ, 2004). O ultra-som é a modalidade de escolha por ser um exame não invasivo, prático e por não possuir radiação ionizante (ROOT & SPAULDING, 1994). É uma técnica que não traz conseqüências nocivas ao paciente e permite obter de forma rápida uma informação dinâmica da arquitetura dos órgãos explorados, além de informar a amplitude e extensão de lesões. Sua interpretação é baseada na visualização de imagens em distintas projeções e cortes.

A ultra-sonografia do aparelho genital masculino proporciona muita informação em casos de afecções testiculares e prostáticas (GONZÁLEZ, 2004). Em relação aos testículos, cerca de 80% da produção diária de espermatozóides é atribuída ao peso ou tamanho testicular, pois 80% do volume dos testículos estão ocupados pelos túbulos seminíferos, os quais são responsáveis pela produção das células

espermáticas (KRIESE et al., 19991; BO e TRIBULO, 2001). Em média, as dimensões testiculares de cães são de 3cm x 2cm x 1,5cm (comprimento x largura x altura) (OLAR et al., 1983; AMANN, 1986; HEWITT, 1998).

A determinação do volume testicular é de extrema importância na avaliação do processo de maturação sexual e ainda na avaliação do efeito de determinada doença ou tratamento que altere a função reprodutiva.

Embora fosse adequado em algumas condições clínicas classificar os testículos em pequenos, médios ou grandes, uma grande precisão é requerida quando se trata de mudança na maturação sexual, no monitoramento de afecções testiculares e na avaliação do efeito de uma quimioterapia nos testículos.

Os resultados de estudos em homens inférteis mostraram que o volume testicular está diretamente correlacionado com a qualidade seminal. Num estudo de 486 homens, Arai et al. (1998) documentaram que a concentração espermática se mostrou abaixo dos limites normais naqueles pacientes com um volume testicular total abaixo de 30ml.

Pacientes com um volume testicular total abaixo de 10 ml foram considerados azoospermicos, enquanto que o volume total abaixo de 20 ml foi associado a uma severa oligozoospermia. Em um estudo com cães domésticos, a variação do tamanho testicular não foi correlacionada às mudanças da proporção de nenhum componente tecidual e a proporção de túbulos seminíferos (epitélio germinal+lume) permaneceu constante mesmo na grande variação de tamanho testicular (WOODAL & JOHNSTONE, 1988).

Os testículos podem ser mensurados pelo ultra-som ou com o auxílio do paquímetro (EILTS et al., 1993). A vantagem do US sobre os métodos manuais de aferição de volume testicular está na habilidade de permitir ao examinador distinguir os testículos dos tecidos adjacentes. Segundo EILTS et al. (1993) a mensuração testicular pela ultra-sonografia é mais acurada, porém não existe diferença entre os dois métodos.

Várias fórmulas para o cálculo de volume testicular têm sido utilizadas, no entanto estudos recentes elaborado por Paltiel e colaboradores (2002), através de um estudo que objetivou analisar a comparação da precisão do paquímetro e do

ultra-som na mensuração do volume testicular de cães da raça Beagle, demonstraram que o método do ultra-som para avaliação do volume testicular é mais preciso e a fórmula $L \times H \times W \times 0,71$ (L= comprimento, H = espessura e W = largura) provou ser uma fórmula cujo resultado foi superior na estimativa do volume testicular, evidenciando sua utilidade na prática clínica.

Para exames de testículo, epidídimo e escroto é mais conveniente utilizar transdutores de 6,5 a 8,0 Mhz. O animal pode ser colocado em decúbito dorsal e o transdutor colocado diretamente sobre a pele do escroto. Os testículos normais apresentam a forma oval, a superfície lisa e estão em íntimo contato com o escroto. Devido à grande mobilidade dos testículos eles podem ser observados em vários planos de corte, como transversal, longitudinal e múltiplos cortes oblíquos (GONZÁLEZ, 2004).

A ultra-sonografia modo-B em tempo real tem por função a avaliação da estrutura anatômica e a determinação da ecogenicidade do estroma e do mediastino testicular (PECHMAN & EILTS, 1987; CARTER et al., 1989; CHANDOLIA et al., 1997; KASTELIC, 1997), apresentando elevada importância no diagnóstico complementar de afecções, a exemplo das calcificações intratesticulares e neoplasias (AHMAD & NOKAES, 1995; GERAGHTY et al., 1998; GANEM et al., 1999; HOWLETT, MARCKBANK & SALLOMI, 2000; DEROGEE et al., 2001; MILLER & SIDHU, 2002; SARTORI et al., 2002).

Segundo Carvalho (2004) a ultra-sonografia em modo B é conhecido como “modo de brilho” ou “modo bidimensional”. Neste tipo de representação, a intensidade do eco é visibilizada como um ponto luminoso em um monitor. Quanto maior a reflexão da onda sonora, mais intenso é o brilho do ponto luminoso. As diferentes intensidades de brilho determinam à escala de cinzas.

Estruturas anecóicas são aquelas que não refletem a onda sonora, portanto, não produzem ecos e aparecem pretas em um monitor. Quando a escala de cinzas de duas estruturas é comparada, a estrutura mais escura é hipoecóica enquanto a mais brilhante é hiperecóica. Se as estruturas têm o mesmo grau de brilho, elas são isoecóicas entre si (DROST, 2002). No entanto, a análise da imagem é subjetiva e pode variar em função da interpretação de cada examinador; sendo necessário

instituir valores quantitativos aos diferentes tons da escala de cinzas para possibilitar a determinação do padrão de normalidade para os órgãos reprodutivos.

Estudos de diferentes ecogenicidades testiculares facilitam o diagnóstico definitivo. Por exemplo, os processos inflamatórios, são representados por imagens ultra-sonográficas hipoecóicas (ARCHBAL et al., 1997; SIMON et al., 2001), que são visíveis em contraste com a ecogenicidade moderada dos testículos “maduros”. Hamm e Fobbe (1994) e Chandolia et al. (1997), observaram aumento na escala de cinzas nos testículos em diferentes fases de maturação sexual. Em testículos de animais pré-púberes a baixa ecogenicidade pode reduzir a identificação das lesões hipoecóicas, especialmente se o testículo afetado não estiver aumentado (HAMM & FOUBE, 1994).

Vários autores, em diferentes espécies e em várias raças, vêm estudando a imageologia e os fenômenos envolvidos à reprodução. Brito (2004), utilizando touros Canchim, com idade variável, concluiu que há aumento da ecogenicidade do parênquima testicular à medida que os animais envelhecem. Em outro estudo, Brito et al. (2003), promoveram estresse térmico em animais *Bos taurus x Bos indicus*, e observaram que a ecogenicidade do parênquima testicular ficou inalterada, porém, ao espermograma relataram que houve queda na qualidade e produção de sêmen.

Em outro estudo, utilizando a raça Angus, Kastelic et al. (2000), relataram correlações negativas entre temperatura escrotal subcutânea, intra-testicular e intra-epididimal com a ecotextura testicular, produção diária de sêmen e morfologia espermática. A ecotextura testicular apresentou regressão linear positiva quando comparada com a produção diária de espermatozóides, ou seja, em uma escala de valores em pixels que variou de 0 (anecóico) a 255 (hiperecóico), a imagem tornou-se mais ecogênica com o aumento da produção de espermatozóides.

Num estudo com touros mestiços (Hereford x Charolês), os examinados desde as duas semanas de idade até 45 semanas, Aravindakshan et al. (1999), concluíram que houve aumento da ecogenicidade do parênquima testicular do nascimento até 16 semanas, sendo este aumento atribuído à proliferação celular. De 16 a 24 semanas foi observado diminuição da ecogenicidade do parênquima, o qual foi

explicado pela diminuição de volume dos túbulos seminíferos e também da porção fluido/tecido no parênquima testicular.

Após 24 semanas houve aumento das ecogenicidades, atribuído ao início da divisão das espermatogônias e a formação de uma maior quantidade de células maduras na espermatogênese. O início desta fase coincide com o final do primeiro na secreção de LH e início da espermatogênese.

A composição da imagem é feita por um arranjo de “pixel”, e a imagem formada fornece informações úteis sobre a função dos testículos (CHANDOLIA et al., 1997). O histograma da imagem descreve a distribuição estatística dos níveis de cinza em termos numéricos de amostras (pixels) em cada segmento de imagem (BUSSAB et al., 1997).

Ao examinador é de grande importância conhecimento da anatomia do órgão a ser examinado e como se comportam ao exame ultra-sonográfico. O par de testículos está contido no escroto, esses são separados um do outro pelo septo mediano. Os testículos são cobertos por tecido conjuntivo, a túnica albugínea, a qual emite septos que radiam centralmente para unirem-se ao mediastino testicular, o qual é orientado em plano sagital. Os septos dividem o parênquima testicular em lóbulos, compostos pelos túbulos seminíferos.

Estes são compostos de células espermatogênicas e células de Sertoli. Os túbulos seminíferos formam um sistema coletor, diretamente pelos túbulos, que, por sua vez formam a rede testicular, localizada no mediastino testicular.

O testículo canino é ecogênico, com ecotextura média e homogênea. As túnicas parietal e visceral formam um eco periférico fino e hiperecótico. O mediastino testicular é visibilizado como uma estrutura ecogênica linear central, no plano sagital médio, e como um eco central focal, no plano médio transversal. Com frequência, ambos os testículos podem ser visibilizados em um único plano de varredura. Visibilizar cada testículo em plano transversal ou dorsal é útil para a comparação direta, ou seja, como método diagnóstico em pequenos animais.

2.4. ESPERMOGRAMA

Ao longo dos anos, muitos pesquisadores têm buscado desenvolver ensaios laboratoriais capazes de prever com exatidão a capacidade fertilizante de amostras seminais (GRAHAM, 2001), permitindo dessa forma um manejo efetivo de reprodutores (KIRK et al., 2005). A determinação das características seminais é um recurso importante e deve ser comumente posta em prática para avaliação da capacidade reprodutiva dos animais domésticos (FOOTE, R. H., 1978). Nesse sentido, os espermatozóides são avaliados rotineiramente por meio de microscopia ótica, observando-se as características físicas relacionadas à morfologia e a qualidade do movimento desenvolvido pelas células espermáticas (JOSHI et al., 2001).

A fertilidade do macho está intrinsecamente ligada à qualidade do sêmen. A composição do sêmen é extremamente variável, mesmo em indivíduos da mesma espécie, já que a atividade espermatogênica e a função secretora das glândulas estão sob a influência de numerosos fatores externos e hormonais (DERIVAUX, 1980). Segundo o mesmo autor a avaliação exata da qualidade do sêmen de qualquer indivíduo deve ser realizada por meio de diferentes exames. A provável avaliação do poder fecundante comporta várias provas, todas de grande valor, embora somente a concordância de todas elas permita conclusões válidas.

O ejaculado canino apresenta três frações distintas e, segundo Heidrich (1977), foi Freiberg, em 1935, o primeiro a identificar o fracionamento no ejaculado do cão, chamando a primeira fração de uretral ou pré-espermática, a segunda, de fração rica em espermatozóides, e a terceira, de fração prostática ou pós-espermática. A primeira fração, pré-espermática, de origem prostática, possui um aspecto aquoso e transparente, um volume que varia de 0,5 a 5,0 mL. A segunda fração é rica em espermatozóides, a coloração varia de branco leitoso a translúcido, dependendo da concentração; e o volume varia de 1,0 a 4,0 mL (JOHNSTON et al., 2001). A terceira fração é também de origem prostática, de aspecto aquoso,

transparente, volume variando de 2,5 a 80,0 mL e possui a função de facilitar o transporte espermático pela cérvix e aumentar o volume do ejaculado (ENGLAND & ALLEN, 1992).

De acordo com Feldman e Nelson (1996), as freqüências de coletas de sêmen para o cão podem ser uma coleta a cada 48 horas; uma coleta ao dia durante 3 dias consecutivos e um repouso de 2 dias ou 3; duas coletas ao dia e repouso de 2 dias, podendo ocorrer um aumento na concentração total de espermatozoides após alguns dias de repouso sexual.

Para colheita do ejaculado canino podem ser usados dois métodos. O primeiro consiste na massagem do pênis (manipulação digital) (figura 4), foi o empregado por Spallanzani em suas experiências e continua sendo preferido por alguns autores que afirmam obter sêmen de melhor qualidade.

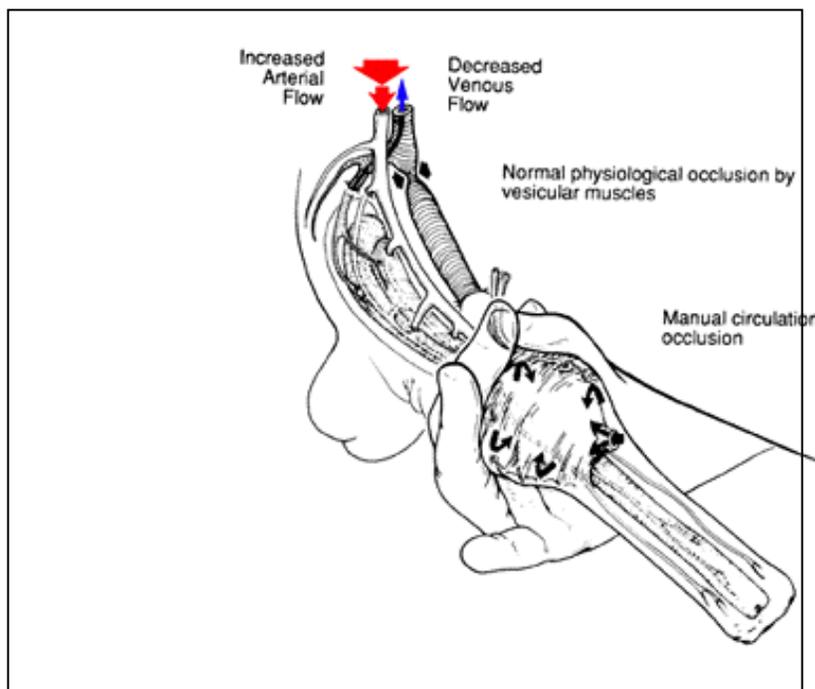


Fig. 4. Esquema do método de colheita de sêmen pelo procedimento de estimulação digital. (Fonte: Christiansen, I. J., 1988)

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 a presença de uma fêmea em estro ou um suabe vaginal, para que o macho possa cheirá-lo (BOUCHER et al. 1958). O volume total do ejaculado varia de 1,0 a 80,0 mL, tem a osmolaridade ao redor de 320 mOsm e pH de 6,4 a 6,6. O pH normal varia entre 6,3 a 7,0 e depende da quantidade de líquido prostático colhido (AMANN, 1986, JOHNSTON et al., 2001).

Como já dito anteriormente o ciclo espermático de cães tem duração aproximada de 62 dias e o número total de espermatozoides do ejaculado canino varia de 300 milhões a dois bilhões, dependendo da raça, idade e frequência de colheita (JOHNSTON et al., 2001).

Uma das maneiras mais utilizadas para a verificação da fertilidade do sêmen de cães é a avaliação *in vitro*, pois estes ensaios permitem demonstrar quais os aspectos da função espermática podem estar alterados. Várias técnicas têm sido descritas para avaliar o sêmen, porém a combinação de diferentes ensaios mostrou resultados mais reais quando comparados a um único teste, na tentativa de prever a fertilidade *in vivo* (AMANN, 1989, ZHANG et al., 1999).

A principal forma de se avaliar a célula espermática *in vitro* é determinando suas características morfofuncionais (VERSTEGEN et al., 2002).

A avaliação da qualidade do sêmen compreende as características físico-químicas, macroscópicas e microscópicas. No cão, a motilidade e o vigor espermáticos, concentração de espermatozoide e alterações morfológicas são as principais características seminais avaliadas.

2.4.1. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS DO SÊMEN

2.4.1.1. Volume

A análise do volume é realizada através da mensuração em um tubo coletor graduado e a quantidade de ejaculado é muito variável entre as diversas espécies ou

dentro de uma mesma espécie devido à estação do ano, clima, hora, período de repouso sexual e também em relação à idade, tamanho, frequência de coletas, método e duração das coletas. O volume não tem valor biológico intrínseco e sim pela quantidade de células fecundantes que possa conter.

O volume é representado em mililitros (mL) e lido na graduação do copo coletor ou constatado com uma pipeta graduada (ROSENBERGER, 1990).. O volume total do ejaculado varia de 1,0 a 80,0 mL, (AMANN, 1986, JOHNSTON et al., 2001).O parâmetro mínimo para cães vai de 1 a 40 ml por ejaculado^{2,3,5}. Aguiar *et al.*(1994)⁴, citaram valor de $5,98 \pm 2,3$ ml para ejaculado total de cães de até 20 kg

2.4.1.2. Cor e Aspecto

A cor e o aspecto devem ser mensurados por meio de análise subjetiva. A cor do ejaculado canino pode variar de branco opalescente ao turvo. Esta variação é decorrente de alterações na concentração espermática e o aspecto vai do leitoso ao aquoso, dependendo da quantidade de fração prostática coletada. A cor amarelada de um ejaculado canino sugere a presença de urina; a cor verde com ou sem grumos, é sugestiva de pus e de infecção do trato reprodutivo; a cor vermelha sugere hemorragia, que geralmente é originária de ferimentos ocorridos no pênis ereto ou de afecções da glândula prostática (FILHO, 1987; CHRISTIANSEN, 1988; FELDMAN & NELSON, 1996)

2.4.2. CARACTERÍSTICA MICROSCÓPICA DO SÊMEN

2.4.2.1. Motilidade e Vigor

A motilidade e o vigor são avaliados subjetivamente e constitui-se num dos mais importantes aspectos físicos do sêmen em todas as espécies domésticas. O exame é realizado colocando-se uma gota de sêmen sobre lâmina aquecida (35-37 °C), sendo esta recoberta por lamínula. O exame é realizado sob microscopia de contraste de fase. O resultado obtido deve ser expresso em porcentagem (0-100) para a motilidade e um escore de zero a cinco (0-5) para o vigor⁶. A avaliação da

motilidade espermática é definida como o percentual de espermatozóides móveis de um ejaculado e o vigor representa a intensidade com a qual as células espermáticas se locomovem. O conjunto destas duas avaliações é um importante parâmetro da qualidade e viabilidade do sêmen⁶.

A motilidade espermática de uma amostra de sêmen fresco de cão deve ser no mínimo de 70% (ROTA et al., 1997). A avaliação da motilidade espermática deve ser realizada imediatamente após a colheita ou descongelação do sêmen, com auxílio de microscopia óptica (SEAGER & PLATZ, 1977), 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). A motilidade progressiva informa sobre uma das características necessárias ao espermatozóide para a fertilização. Apesar disto, a correlação entre a motilidade e a capacidade da célula espermática para fertilizar o oócito ainda não é totalmente esclarecida e os achados são conflitantes entre os pesquisadores (ENGLAND & ALLEN, 1989; SODERQUIST et al., 1991; KJAESTAD et al., 1993; IVANOVA-KICHEVA et al., 1997; SANCHEZ-PARTIDA et al., 1999, TARDIF et al., 1999). A motilidade tem sido correlacionada positivamente à fertilidade in vitro, testada pela penetração em zona pelúcida de espermatozóides humanos (HOLT et al., 1985, FETTEROLF & ROGERS, 1990).

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).

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).

2.4.2.2. Concentração Espermática

A concentração é um dos aspectos físicos do sêmen de maior importância, pois, quando a colheita for corretamente realizada, revela a eficiência dos túbulos seminíferos para produzir espermatozóides. A concentração espermática foi associada à fertilidade por OEHNINGER et al. (1988) que encontrou um aumento significativo na taxa de fertilização in vitro, quando usou espermatozóides de homens teratozoospermicos em uma concentração mais elevada.

Para sua determinação, recomenda-se a contagem das células espermáticas em uma câmara hematimétrica (câmara de Neubauer). Para a realização do exame utiliza-se uma diluição de 1:20, sendo 50µL do ejaculado, em 950µL de água destilada. Posteriormente, as duas metades de uma câmara de contagem de Neubauer, preparada da forma rotineira, são preenchidas, usando-se uma pipeta capilar, com o sêmen já previamente diluído contido no tubo de ensaio.

A câmara deve permanecer em repouso horizontal, no mínimo por cinco minutos, para que os espermatozóides se depositem no fundo. Finalmente, é realizada a contagem dos espermatozóides encontrados em cinco quadrados grandes (compostos de 16 quadrados pequenos cada), ou seja, sobre o total de 10/25 mm de área em cada metade da câmara no microscópio com contraste de fase (aumento de 320 vezes). Na contagem, consideram-se apenas as cabeças dos espermatozóides, incluindo aquelas que se encontram sobre a linha esquerda inferior, e também as cabeças destacadas. Após a contagem de um quadrado, deve-se focalizar o lado inferior da lamínula, para contar também os espermatozóides possivelmente aderidos a ela.

A concentração (C) é calculada a partir da fórmula abaixo. Aguiar *et al.* (1994) confirmaram ser normal para cães de até 20 kg de peso corpóreo, a concentração espermática de $47,73 \pm 12,20 \times 10^6$ / ml de ejaculado.

$$C \text{ sptz} / \text{mm}^3 = \frac{\text{Média sptz contados}}{1/D \times 1/A \times \text{contados/total}}$$

onde,

C = concentração

D = diluição ()

A = altura da câmara (10 mm³)

2.4.2.3. Turbilhonamento

É o movimento em forma de ondas observado em uma gota de sêmen. A intensidade do movimento é resultante da motilidade, vigor e concentração espermática (HAFEZ, 1995). Para se proceder a avaliação do turbilhonamento, coloca-se uma gota de sêmen, recém-colhido, sobre uma lâmina previamente aquecida a 37°C e leva-se ao microscópio convencional, com aumento de 100 vezes.

A interpretação é subjetiva e exige treinamento para que esta característica seja corretamente avaliada (FONSECA et al., 1991). A expressão movimento de massa significa o acentuado movimento semelhante a um turbilhão, ondas ou cardumes de espermatozóides em ejaculados de grande concentração com células muito ativas (ROSENBERGER, 1990).

2.4.2.4. Morfologia Espermática

A avaliação da morfologia espermática é outro parâmetro importante, e no cão tem sido correlacionada à fertilidade (OETTLÉ, 1993). OETTLÉ (1993) relatou uma fertilidade, após inseminação artificial com sêmen fresco, de 61% para cães com mais de 60% de células espermáticas normais e uma fertilidade de 13% para

aqueles com menos de 60% de espermatozóides morfológicamente normais. Porém, ENGLAND & ALLEN (1989), mostraram que cães com uma baixa qualidade seminal poderiam ser férteis usando o acasalamento natural. De acordo com VALE FILHO et al. (1980), o índice de patologias do sêmen é fundamental para o controle da fertilidade do macho. Embora o exame de gota do ejaculado em microscópio comum com aumento de 100 - 400 vezes permita idéia preliminar sobre a qualidade de um sêmen, somente pelo estudo morfológico dos espermatozóides, podem-se detectar anormalidades na espermatogênese, maturação, estocagem de gametas ou funcionamento das glândulas anexas do sistema genital.

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.

Castro (2007), estudando a morfologia espermática de cães, constatou que animais submetidos à quimioterapia com cisplatina apresentaram as patologias maiores e totais acima do aceitável para cães aptos à reprodução corroborando o citado pelo Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal, do CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998).

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, congelação ou descongelação.

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%. Os defeitos maiores ocorrem durante o processo da espermiogênese, portanto dentro dos testículos, atribuindo a estes defeitos os de cabeça, peça intermediária e cauda (FONSECA et al., 1991).

Os defeitos classificados em maiores são: subdesenvolvido, formas duplas, "knobbed sperm", destacamento de acrossoma, decapitados, "diadema" ("pouch formation"), piriforme, estreito na base, contorno anormal, cabeça pequena anormal, cabeça isolada anormal, "corkscrew", defeitos da peça intermediária, gotas proximais, pseudo gotas, cauda fortemente dobrada e enrolada, "dag defect" (SILVA & DODE, 1993). Estes defeitos não podem ultrapassar 20% e, cada forma individual 5%, em caso contrário, a eficiência reprodutiva na monta natural estará comprometida (FONSECA et al., 1992).

Os defeitos de cabeça "pouch formation", "diadema", knobbed sperm", de peça intermediária e caudas fortemente enroladas, tem origem no epitélio seminífero (degeneração) e indicam uma espermatogênese imperfeita. No entanto, os defeitos de cabeça diminuem a medida em que passam do ducto deferente ao ejaculado, porque alguns são fagocitados ao longo da via excretora. Dependendo da duração do efeito no testículo, 6 a 14 horas, após 3 a 56 semanas inicia-se o aparecimento de anomalias de cabeça, peça intermediária, cauda e gotas proximais (SILVA et al., 1993).

Os defeitos menores surgem após os espermatozóides terem deixado os testículos, conseqüentemente, durante sua passagem através do epidídimo e ou durante a ejaculação ou manipulação do sêmen (FONSECA et al., 1991). Segundo FONSECA (1992) e SILVA & DODE (1993), os defeitos menores são: acrossoma desprendido, gota citoplasmática distal, cauda dobrada (com gota anexa), cauda enrolada e cabeça isolada normal. Além de: cabeça delgada, pequeno normal, gigantes, curtos, largos, abaxial, retroaxial e oblíquo. Ainda são incluídas a presença

de medusas, células epiteliais, leucócitos, eritrócitos, neutrófilos e bactérias (SILVA & DODE, 1993).

Muitas vezes, os choques térmicos, além da manipulação no ato da coleta, podem dar origem a caudas dobradas e enroladas (SILVA & DODE, 1993). Os defeitos menores não devem ultrapassar um total de 25% e 10% de anormalidades individuais, pois reduzem a fertilidade, porém devem-se levar em conta as condições da realização do exame (SILVA & DODE, 1993).

O total de defeitos das células espermáticas defeituosas num ejaculado é formado pelos resultados de defeitos maiores e menores contados separadamente (SILVA & DODE, 1993). O total de anormalidades, não deve ultrapassar 30% numa contagem de no mínimo 200 células espermáticas (SILVA & DODE, 1993). O animal que apresenta formas anormais de células além do estabelecido, não deve ser condenado para reprodução, isto pode significar apenas imaturidade passageira (SILVA & DODE, 1993).

O estudo morfológico dos elementos figurados do sêmen necessita de recursos de preparações coradas. Diversos meios de coloração têm sido utilizados, alguns são empregados simplesmente com a finalidade de melhor destacar a morfologia geral dos espermatozóides, enquanto que outros, denominados colorações vitais, permitem diferenciar os espermatozóides vivos dos mortos, determinando-se a porcentagem de cada ocorrência. Para tanto, 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, apesar de todas as técnicas de coloração utilizadas na avaliação morfológica dos espermatozóides, 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).

2.5. CARACTERÍSTICAS ULTRAESTRUTURAIS DAS CÉLULAS GERMINATIVAS (MET)

A avaliação das características seminais são analisadas rotineiramente por meio da microscopia ótica, observando-se as características físicas relacionadas à morfologia e a qualidade do movimento desenvolvido pelas células espermáticas (JOSHI et al., 2001). No entanto, isoladamente, a análise espermática representa apenas uma indicação grosseira da real capacidade fertilizante de um ejaculado (BLOTTNER et al., 2001), que depende, sobretudo, da integridade dos diferentes compartimentos celulares dos espermatozóides e de suas funções características (MAGISTRINI et al., 2001).

Embora os ensaios laboratoriais, como a determinação da motilidade espermática, possam ser utilizados para uma rápida avaliação de uma amostra seminal, esses testes não permitem o acesso às alterações que ocorrem em proporções sub-celulares (KIRK, et al., 2005). Quando os defeitos morfológicos se expressam por alterações em escala nanométrica (nm), ocorrem falhas nos métodos tradicionais de avaliação, havendo a necessidade do emprego da microscopia eletrônica de transmissão (MET) (JOSHI et al., 2001).

Ultraestruturalmente as espermatogônias primárias são as maiores células do testículo, seu núcleo é esférico, apresentando cromatina granular e uniformemente distribuída; nucléolo proeminente, esférico e elétron-denso. O citoplasma contém mitocôndrias esféricas com poucas cristas, ribossomos livres, retículo endoplasmático liso e granular (ROMAGOSA et al., 1999; QUAGIO-GRASSIOTTO & CARVALHO, 1999). As espermatogônias apresentam também uma estrutura elétron-densa no citoplasma denominada cimento intermitocondrial, o qual geralmente esta associado a grupos de mitocôndrias (TOURY et al., 1977; ROMAGOSA et al., 1999; QUAGIO-GRASSIOTTO & CARVALHO, 1999; ZAIDEN, 2000).

As espermatogônias primárias se dividem por mitose e dão origem as espermatogônias secundárias, que inicialmente se apresentam muito similares às células mães, com exceção do núcleo que se apresenta ligeiramente menor. Em seqüência , as espermatogônias secundárias sofrem mitose e originam os

espermatócitos primários, que são visualizados nas diversas fases da prófase meiótica.

Estas células apresentam núcleo central com forma regular ocupando grande parte da célula. O nucléolo não é visível e frequentemente se observam massas cromossômicas denominadas de complexos sinaptonêmicos (ROMAGOSA, 1991; ROMAGOSA et al., 1999; QUAGIO-GRASSIOTTO & CARVALHO, 1999).

Os espermatócitos secundários, que se originam a partir da primeira divisão meiótica dos espermatócitos primários, apresentam nucléolos evidentes, excêntricos e com cromatina distribuída irregularmente, o citoplasma apresenta numerosas nuages e mitocôndrias concentradas no pólo oposto ao núcleo (ROMAGOSA et al., 1999; SHAHIN, 2006).

A seguir, tem início o processo de espermiogênese, que representa a parte pós-meiótica da espermatogênese, e envolve um processo complexo de diferenciação celular das espermatídes em espermatozóides (PLOEN & COURTENS, 1986). Durante a diferenciação das espermatídes ou espermiogênese, ocorre à compactação do conteúdo nuclear e formação da peça intermediária e o desenvolvimento do flagelo. Ao final da espermiogênese, as pontes citoplasmáticas e o citoplasma residual são fagocitados pelas células de Sertoli, e os processos citoplasmáticos das células de Sertoli se afastam (GRIER, 1992; SELMAN & WALLACE, 1986; SCHULZ & MIURA, 2002).

As células de Sertoli se caracterizam por possuir núcleo grande, nucléolo proeminente e citoplasma com retículo endoplasmático não-granuloso, complexo de Golgi bem desenvolvido, além da presença de mitocôndrias, ribossomas livres, polisomas e vesículas de lipídeo. Elas são encontradas no interior dos túbulos seminíferos, sempre associadas às células da linhagem germinativa.

No decorrer do ciclo reprodutivo, variam em número, forma e tamanho, elas possuem uma função importante no desenvolvimento das células germinativas, conseqüentemente, estas fornecem fatores necessários para a sobrevivência, proliferação e diferenciação, além de participarem do processo de fagocitose de células germinativas em decomposição (WELTZIEN et al., 2004), bem como, de

corpos citoplasmáticos residuais deixados por espermatídes adultas no final da espermatogênese (AMANN,1993).

A espermatogênese é um processo complexo, coordenado por sinais parácrinos e endócrinos. Estes sinais são necessários para ajudar no desenvolvimento das camadas de células germinativas em diferentes estágios de mitose, meiose e espermiogênese dentro de cada região do túbulo seminífero. Em mamíferos, a espermatogênese, além de ser coordenada por sinais parácrinos e endócrinos, também é condicionada por junções do tipo “gap” (ROSCOE et al., 2001). As junções do tipo “gap” são constituídas de agregações de canais de membrana, chamadas “connexons”, quando juntadas com outras “connexons” de células adjacentes, formam pontes intercelulares para a difusão de íons e moléculas pequenas (BEYER et al., 1990). As células de Sertoli também podem estar interconectadas por “tight junctions” localizadas em regiões basais dos túbulos seminíferos, formando uma barreira hemato-testicular funcional, em mamíferos, durante o processo de maturação, os espermatócitos que se originam das espermatogônias no compartimento basal do túbulo, deslocam-se através de “tight junctions” e terminam seu desenvolvimento no compartimento central do túbulo (AMANN, 1993). Gilio et al. (2007) em recentes estudos relataram que o controle dos níveis de óxido nítrico produzido pelas células de Sertoli está diretamente envolvido na dinâmica das junções celulares da barreira hematotesticular. Varios estudos tem demonstrado que as alterações na dinamica das junções celulares presentes na barreira hematotesticular de mamíferos podem alterar todo o processo espermatogênico, levando até a degeneração das células germinativas (LEE, 2005). Em estudo realizado por Gilio et al. (2007) observaram que os níveis de óxido nítrico produzido no epitélio seminífero estão diretamente relacionados com a dinâmica (abertura e o fechamento) dos complexos juncionais que permitem a migração das células germinativas do compartimento basal para o adluminal durante o processo espermatogênico.

Os túbulos seminíferos se apresentam separados por tecido conjuntivo contendo fibroblastos, vasos sanguíneos e células de Leydig. As quais são importantes na produção de esteróides, para a regulação da espermatogênese,

assim como para o desenvolvimento de caracteres sexuais secundários e comportamento sexual (WELTZIEN et al., 2004).

Segundo ALBERTS *et al.* (2002), o espermatozóide, gameta masculino, é considerado uma das menores células do organismo e possui características próprias, como capacidade de movimentação e formato ideal para otimizar seu potencial de fertilização, que o torna ideal para propagar os genes paternos.

Constitui-se de duas regiões morfológica e funcionalmente distintas envolvidas por uma única membrana plasmática: a cabeça, que possui um núcleo haplóide altamente condensado, e a cauda, que o propulsiona até o oócito e ajuda a penetrá-lo. Na cabeça espermática, o DNA nuclear encontra-se inativo e extremamente condensado, o que torna seu volume pequeno e facilita o transporte. Ainda nesta região, próximo à extremidade anterior do envelope nuclear, existe uma vesícula secretória especializada denominada vesícula acrossomal; esta contém enzimas hidrolíticas que auxiliam a penetração da camada externa do oócito pelo espermatozóide.

A liberação destas enzimas ocorre por exocitose, e a este evento denomina-se, reação acrossomal. O espermatozóide possui ainda uma cauda forte que o propulsiona através do meio aquoso. Esta é, na realidade, um longo flagelo cujo axonema central se origina de um corpo basal situado imediatamente posterior ao núcleo. O movimento flagelar ocorre pela hidrólise de ATP gerado por mitocôndrias altamente especializadas, situadas na parte anterior da cauda, denominada peça intermediária. Este posicionamento das mitocôndrias é estratégico e propicia maior força aos batimentos do flagelo, imprimindo maior velocidade à célula.

Segundo EDDY e O'BRIEN (1994), apesar de todos os espermatozóides de mamíferos apresentarem estas características gerais, existem diferenças espécie - específicas no tamanho e formato de cabeça, e comprimento e tamanho relativo dos componentes do flagelo.

A ultra-estrutura dos espermatozóides de vertebrados e invertebrados tem sido intensamente estudada ao longo de muitos anos, especialmente por microscopia eletrônica de transmissão (ELLIS et al., 2002; JOSHI et al., 2001) A avaliação seminal por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET) é

caracterizada pela observação de grande heterogeneidade morfológica e também pela presença de anomalias que não podem ser evidenciadas pela microscopia ótica convencional (LANDIM-ALVARENGA & ALVARENGA, 1997)

As técnicas de MET na avaliação da infertilidade masculina humana e animal proporcionam a formação de uma base sólida para o melhor entendimento dos processos patofisiológicos envolvidos e para uma melhor adequação das condutas terapêuticas a serem seguidas. Até o presente, muitos aspectos relacionados à infertilidade do macho continuam obscuros.

3. OBJETIVO

OBJETIVO PRINCIPAL:

- ❖ Tendo em vista a influência das neoplasias na função reprodutiva das diferentes espécies e suas implicações, o objetivo principal deste estudo é a avaliação dos efeitos do agente citostático cisplatina sobre as células gonadais em cães machos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ❖ Definir alterações no comportamento sexual e características do sêmen de cães após tratamento com cisplatina;
- ❖ Verificar se há alterações no parênquima testicular ,através da análise ultra-sonográfica, de cães que foram submetidos à ação de quimioterapia;
- ❖ Análise descritiva de ultras-estruturas do epitélio germinativo testicular de cães tratados com cisplatina;
- ❖ Colaborar na obtenção dos dados para servir de subsídio para a oncologia humana;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Utilizou-se 8 cães, machos, com idades variando entre 1 e 3 anos, peso médio de 15 Kg, sem raça definida pois a padronização das raças foi inviável neste experimento. Os animais foram fornecidos pelo Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, câmpus de Jaboticabal – Unesp. Após a seleção dos animais, estes foram vacinados¹, desverminados², higienizados e alojados em canis individuais sob condições sanitárias adequadas, junto ao suprareferido Hospital Veterinário. Estes animais receberam ração comercial duas vezes ao dia e água *ad libitum*. Antes do início do experimento, os animais passaram por um período de adaptação de aproximadamente dois meses, a fim de se amoldar ao ambiente, manejo e principalmente treinados para a colheita e análise de sêmen, permitindo assim que os parâmetros fisiológicos seminais destes animais fossem analisados cuidadosamente antes do início da etapa experimental (Apêndice I). Os animais foram submetidos a exame clínico e exames laboratoriais (hemograma, provas bioquímicas [alanino-aspartatotransferase e creatinina] e urinálise) antes do início do experimento. Após a realização de análise criteriosa de todos os resultados obtidos nas avaliações citadas anteriormente, os animais hígidos foram submetidos à avaliação seminal, através de análises macroscópicas (volume, aspecto, odor) e microscópicas (motilidade espermática, vigor, concentração, turbilhonamento, e morfologia espermática), análise ultra-sonográfica com avaliação da escala de cinzas e do tamanho do volume testicular antes de iniciar o experimento.

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.

4.2. Local do Experimento

As colheitas de sangue, dos ejaculados, análises seminais e ultrasonográficas foram executadas na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, câmpus de Jaboticabal – Unesp, no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” nos departamentos de Cirurgia, Reprodução Animal e Radiologia, já as análises ultraestruturais foram realizadas no laboratório de Microscopia Eletrônica da mesma Instituição de Ensino Superior no período de 2008 a 2009.

4.3. Grupo Experimental e Quimioterapia Citotóxica

Os cães foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais de quatro animais. O primeiro grupo denominado de T (grupo tratado) , recebeu o protocolo de diurese salina e a infusão de cisplatina³ na dose de 70 mg/m² (dose terapêutica), 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 C (grupo controle), recebeu o mesmo tratamento que o grupo T, porém sem a cisplatina³. Em ambos os grupos, os animais foram contidos em mesas de atendimento para a realização de fluidoterapia com monitoramento do débito urinário e quimioterapia intravenosa (Figura 5).

³Cisplatex- Eurofarma Laboratório Ltda-São Paulo-SP.

⁴ PLasil – Aventis Pharma – São Paulo -SP.

⁵Lasix – Aventis Pharma – São Paulo-SP.



Figura.5. Ilustração fotográfica de cão sob contenção física recebendo a quimioterapia e o protocolo de diurese.

Após anti-sepsia local canulou-se a veia cefálica com cateter nº. 20, para a realização de fluidoterapia com solução fisiológica a 0,9% na dose de 25 mL/kg/h por 2 horas antes da administração da cisplatina. Lembrando que não houve a utilização de nenhum perfusor com peça de alumínio introduzido ao cateter, uma vez que o contato do alumínio com o fármaco provoca formação de precipitado e perda de potência. A cisplatina, na dose de 70mg/m^2 , foi diluída em solução fisiológica a 0,9%, e administrada durante 20 minutos, seguido de mais uma hora de fluidoterapia. A administração da cisplatina foi efetuada a cada 21 dias, ciclo este utilizado na terapêutica clínica de diversas neoplasias, perfazendo um total de quatro infusões (protocolo usual utiliza-se de duas a seis infusões), sendo que um dia antes da administração do quimioterápico eram realizados exames laboratoriais (Apêndice 1). Em todos os animais, foi administrado metoclopramida (2 mg/kg, intravenosa 20 minutos antes da quimioterapia) e furosemida (2 mg/kg, intravenosa, 5 minutos após a administração da metoclopramida).

4.4. Colheita de Sêmen

Os animais foram treinados para colheita de sêmen em ambiente tranqüilo, seguindo a técnica preconizada por MACPHERSON & PENNER (1967). Para a colheita utilizou-se um funil estéril, adaptado a tubo Falcon graduado em 15 mL previamente aquecido em banho Maria a 37 °C.

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 5 momentos diferentes (onde cada momento representa um dia inteiro de colheita de sêmen de todos os animais), perfazendo um total de 56 colheitas de sêmen durante todo o experimento.

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. As colheitas foram realizadas três dias antes de cada quimioterapia para se ter tempo hábil em realizá-las, não permitindo atrasos na administração do fármaco. As análises não foram realizadas após a quimioterapia uma vez que o objetivo foi coletar dados das alterações de cada terapia individual.

4.5. Análise do Ejaculado

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

4.5.1 Análise Macroscópica

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

4.5.2 Análise Microscópica

4.5.2.1. Motilidade Espermática

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

4.5.2.2. 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).

4.5.2.3. Concentração Espermática

Para a determinação da concentração (número de spz/mL) foi utilizada uma diluição de 1:20, sendo 50µL do ejaculado, em 950µL 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 óptico, com aumento de 40X, e o número de células contadas foi expresso em espermatozóides por mL.

4.5.2.4. 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 óptico, 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). Os defeitos analisados 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.

4.6. Avaliação Ultra-sonográfica Testicular

Os cães foram submetidos às avaliações ultra-sonográficas testiculares que foram realizadas em quatro momentos, onde o momento 0 (M0) correspondeu à análise antes do início da quimioterapia, o momento 1 (M1) representou a análise após a primeira quimioterapia, já o momento 2 (M2) representou o exame entre a 2ª e 3ª colheitas e o momento 3 (M3) foi após a última sessão da terapia antitumoral.

4.6.1. Mensuração e Avaliação em Escala de Cinzas

Os exames ultra-sonográficos foram realizados com aparelho Pie Medical Scanner 200C, ligado a um transdutor linear de 8 MHz. Para a realização do exame de ultra-sonografia os cães foram mantidos em decúbito dorsal e a análise foi realizada por via trans-abdominal. Após a aplicação de gel acústico diretamente sobre o escroto, foram realizadas varreduras em planos transversais, frontais e sagitais nos testículos direito e esquerdo (Figura 6). No entanto para as análises realizadas foram utilizados somente os planos frontais e sagitais. O aparelho de ultra-sonografia foi calibrado sempre de uma mesma maneira quanto à intensidade de brilho e também quanto à posição do foco principal.

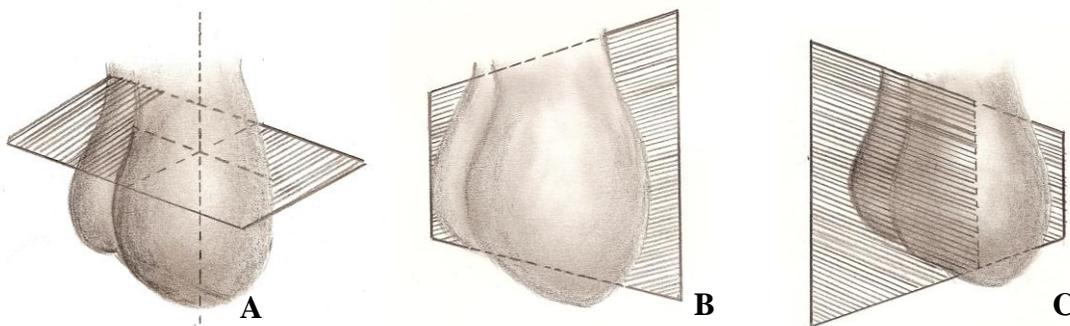


Figura 6- Esquema didático demonstrando o exame ultra-sonográfico em três planos: plano transversal (A), plano frontal (B) e plano sagital (C) no testículo dos cães dos dois grupos.

As imagens selecionadas foram transferidas diretamente ao computador por meio do software “Echo Image Viewer” (EIV) da PIE MEDICAL. Com o auxílio do software EIV, objetivou-se avaliar a ecotextura do parênquima testicular (avaliação em escala de cinzas), para tanto foram selecionadas duas regiões de interesse (RI) no plano de varredura frontal dos testículos esquerdo e direito, assim denominado: frontal direita (RI_{fd}); frontal esquerda (RI_{fe}). Cada região de interesse foi delimitada por um quadrado de 4,2 mm de lados (Figura 7). As RI contiveram o parênquima testicular, sem englobar pele, túnicas, epidídimo e o mediastino testicular. Automaticamente o software EIV calculou a média (m) da escala de cinza (intensidade de pixels da imagem) das RI, em uma escala que variou de zero a 100%, sendo 0% para uma imagem totalmente preta ao monitor (parênquima testicular menos ecogênico) e 100% para uma imagem totalmente branca (parênquima testicular mais ecogênico).

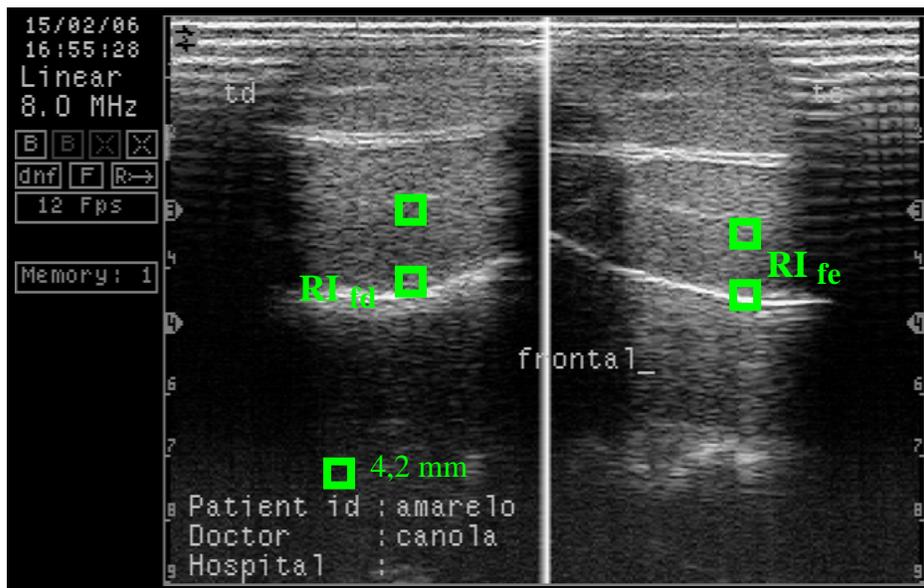


Figura 7 – Imagem ultra-sonográfica dos testículos direito e esquerdo de um cão de 2 anos pertencente ao grupo tratado, no plano de varredura frontal, demonstrando as regiões de interesse selecionadas (RI_{fd} direita e RI_{fe} esquerda). Note que as regiões de interesse englobam apenas a região do parênquima testicular.

Para a mensuração do volume testicular foi usada a fórmula empírica idealizada por Lambert (1951) , $v = L \times H \times W \times 0,71$, onde L = comprimento; H= espessura e W = largura (considerando os testículos e excluindo-se a cauda do epidídimo), sendo o valor obtido expresso em centímetros cúbicos (cm³). O ultra-som foi utilizado para fornecer o comprimento, largura e espessura (Figura 8) de cada testículo, no plano de varredura sagital e frontal.

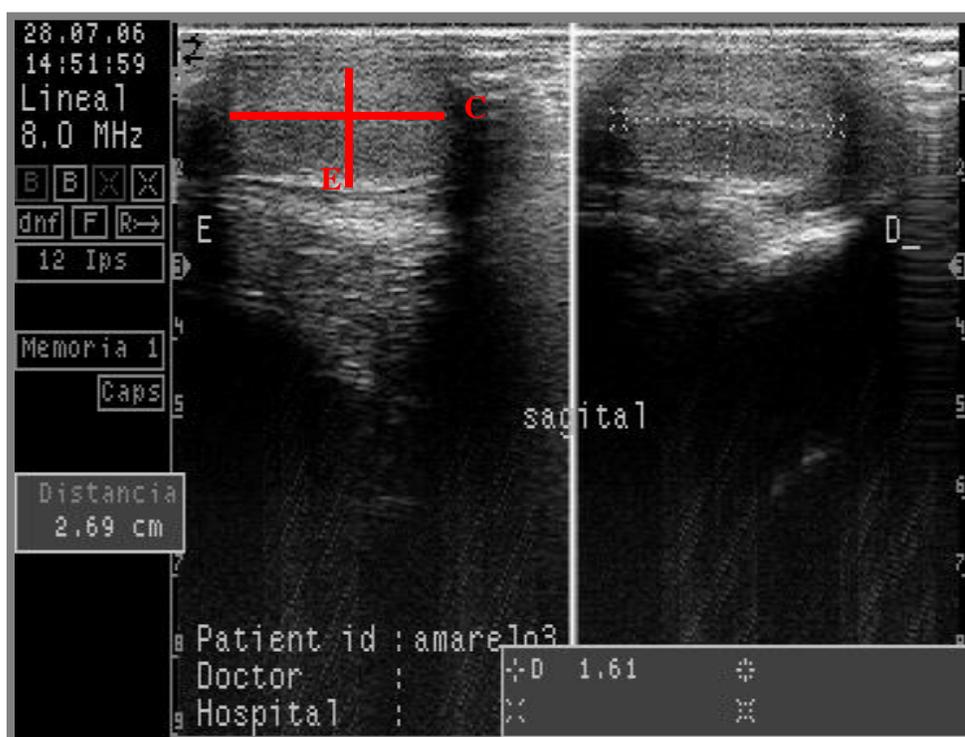


Figura 8 - Imagem ultra-sonográfica dos testículos direito e esquerdo de um cão de 2 anos, pertencente ao grupo tratado, no plano de varredura sagital, onde E representa a espessura e C o comprimento testicular.

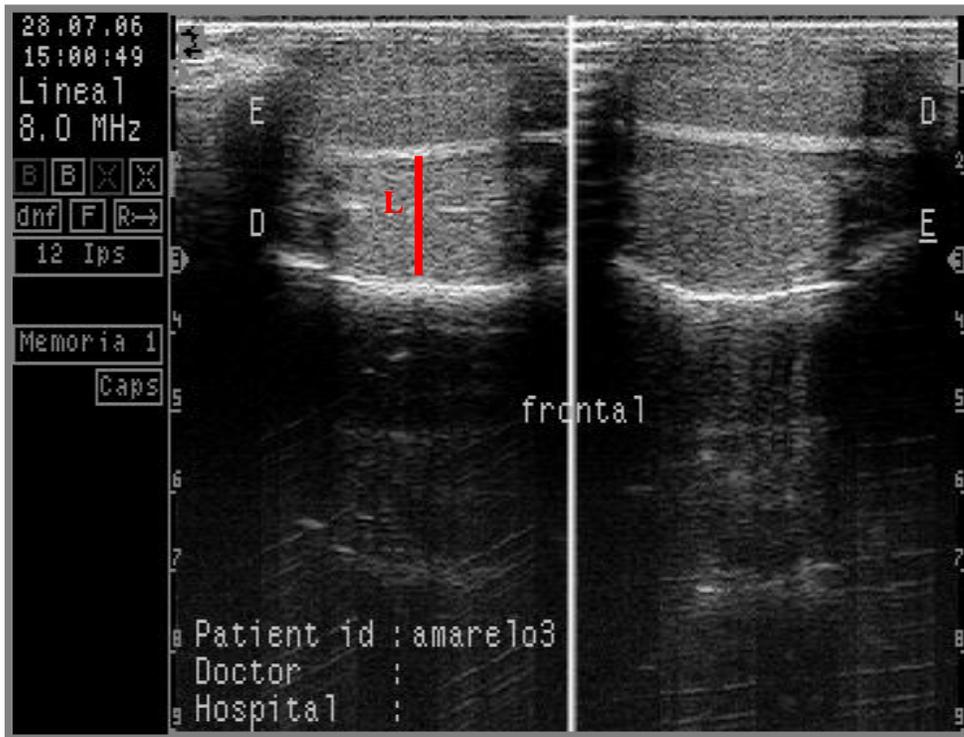


Figura 9 - Imagem ultra-sonográfica dos testículos direito e esquerdo de um cão de 2 anos, pertencente ao grupo tratado, no plano de varredura frontal, onde L representa a largura do parênquima testicular ao ultra-som.

4.7. Análise Ultraestrutural da Espermatogênese

4.7.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para a avaliação ultraestrutural do epitélio testicular, foram coletados os testículos dos cães do experimento no décimo primeiro dia após a última quimioterapia (tempo médio de possível maior toxicidade no epitélio testicular, fazendo comparação com a toxicidade da medula óssea), através de orquiectomia bilateral. Os testículos foram então seccionados e fixados em solução de glutaraldeído 2,5%, tamponado em PBS 0,1 mol L⁻¹, em pH de 7,3. Após 24 horas de fixação, as amostras foram lavadas em solução tampão fosfato e pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio a 1%, tamponado em PBS, “overnight” à temperatura de 4°C. Subsequentemente, os testículos foram desidratados em gradiente crescente de acetona (30, 50, 70%) por 20 minutos em cada escala, mantidos a temperatura ambiente. Posteriormente as amostras foram refrigeradas por um período de 24 horas. Deu-se então a continuidade da desidratação em escalas de (80, 90 e 100%), 20 minutos em cada escala, mantido em temperatura ambiente, sendo que quando chegou a 100% este processo foi realizado três vezes.

Na etapa de infiltração (pré-inclusão) foi utilizada resina Araldite 502 (Embed/812) mais acetona na proporção 1:1. Após, foi utilizada para a etapa de inclusão a resina EPON juntamente com araldite pura, sendo posteriormente incubada em estufa a 60 °C por um período de 72 horas. O material foi cortado em secções de 0,8 µm, que foram corados com Azul de Toluidina 1% para escolha dos campos. Secções de 80-100 nm foram coletados em telas de cobre sem filme suporte e posteriormente contrastados em acetato de uranila por um tempo de 40 minutos. Após a lavagem em água destilada este material sofre uma nova contrastação em citrato de chumbo por três minutos. A análise e a fotodocumentação foram feitas em microscópio eletrônico de transmissão Modelo JEOL – JEM 1010, junto ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – campus de Jaboticabal.

4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos para as diferentes características seminais 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 $\sqrt{y + 0,5}$.

Os dados da evolução da variável escala de cinzas (EC) e volume testicular (VT) dos animais ao longo do tratamento foram submetidos a uma análise de variância com medidas repetidas no tempo. As variáveis, foram analisadas pelo programa computacional MIXED do SAS (2002), utilizando um modelo que incluiu os efeitos de animal, testículos (direito e esquerdo), momentos e interações entre esses efeitos. Quando o efeito ou a interação foi significativa pelo teste F, às médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

5. 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 (T) foi apresentando diminuição da manifestação dos efeitos colaterais.

5.1. Espermograma

5.1.1. Motilidade Espermática

Os valores médios percentuais obtidos para motilidade espermática entre os dois grupos (Tratado e Controle) nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen, realizadas antes, durante e após o tratamento com cisplatina no grupo T, estão expressos na Figura 10. A avaliação dos dados demonstrou que estatisticamente não houve diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos nos diversos momentos. Observou-se uma discreta diminuição da motilidade do grupo tratado a partir do momento 1 .

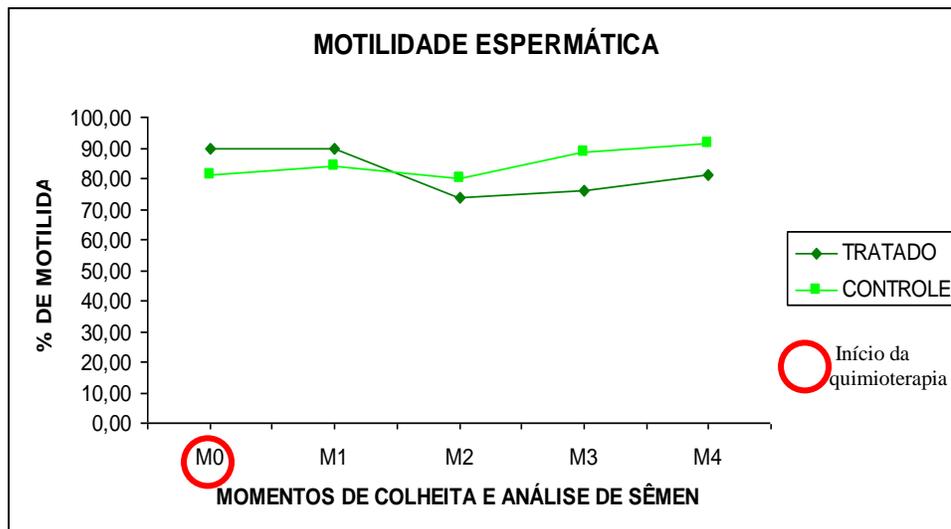


Figura 10 – Evolução dos valores médios percentuais de motilidade espermática nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen, onde o M0 (momento 0) representa o início da quimioterapia.

5.1.2. Vigor

Os valores médios percentuais obtidos para vigor espermático entre os dois grupos (Tratado e Controle) nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen, realizadas antes, durante e após o tratamento com cisplatina no grupo T, estão expressos na Figura 11. A avaliação dos dados indica que estatisticamente não houve diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos nos diversos momentos. Observou-se uma discreta diminuição do vigor para o grupo tratado a partir do momento 1.

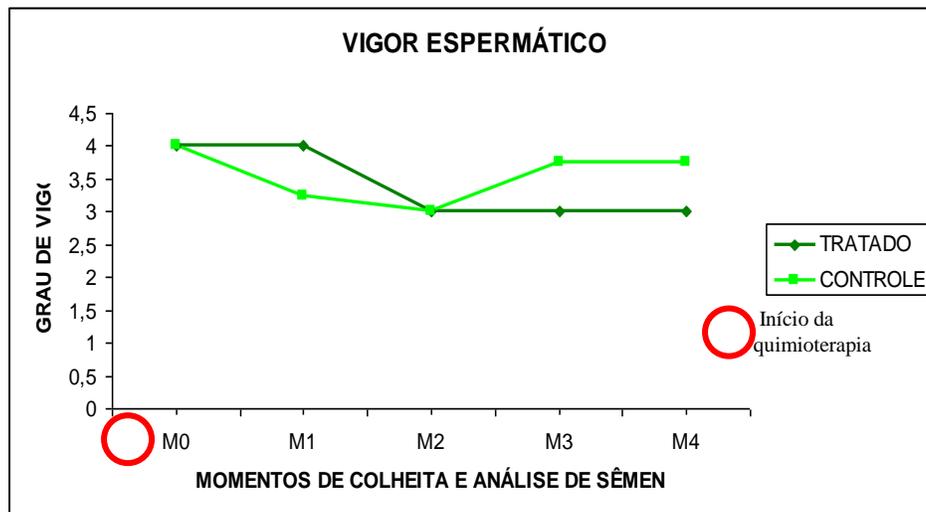


Figura 11 - Evolução dos valores médios percentuais de vigor espermático nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen, onde o M0 (momento 0) representa o início da quimioterapia.

5.1.3. Concentração Espermática

Os valores médios percentuais obtidos para concentração espermática entre os dois grupos (Tratado e Controle) nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen, realizadas antes, durante e após o tratamento com cisplatina no grupo T, estão expressos na Figura 12. A avaliação dos dados indica que estatisticamente não houve diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos nos diversos momentos. Observou-se uma diminuição importante da concentração espermática a partir do momento 0 (M0).

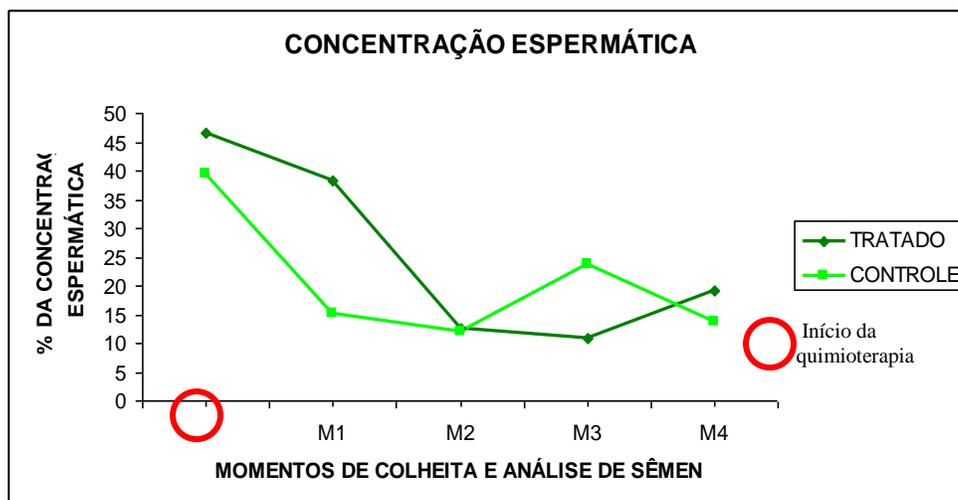


Figura 12 - Evolução dos valores médios percentuais de concentração espermática nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen, onde o M0 (momento 0) representa o início da quimioterapia.

5.1.4. Turbilhonamento

Os valores médios percentuais obtidos para turbilhonamento espermático entre os dois grupos (Tratado e Controle) nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen, realizadas antes, durante e após o tratamento com cisplatina no grupo T, estão expressos na Figura 13. A avaliação dos dados indica que houve diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos nos momentos 3 e 4. Observou-se a diminuição do turbilhonamento do grupo tratado nos momentos 1 e 2.

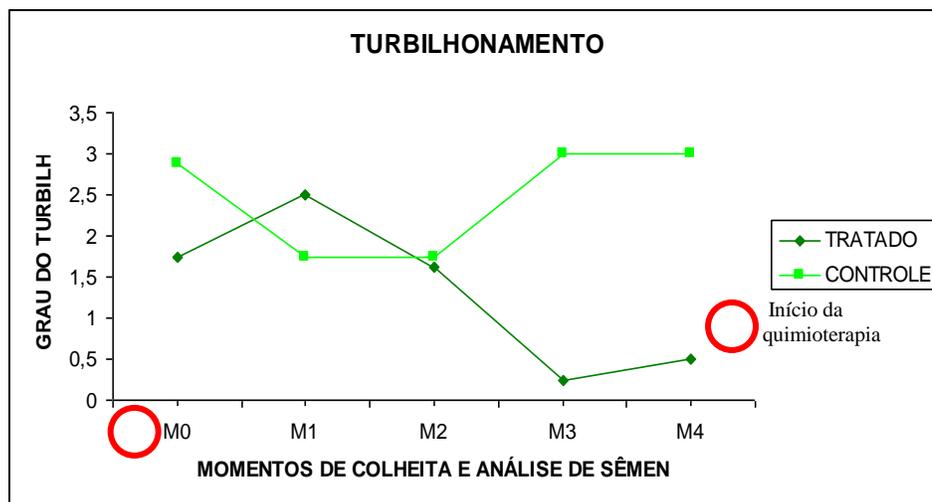


Figura 13 - Evolução dos valores médios percentuais de turbilhonamento nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen, onde o M0 (momento 0) representa o início da quimioterapia.

5.1.5. Morfologia Espermática

5.1.5.1. Método da Lâmina Corada

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

5.1.5.1.2. Defeito Maior

Os valores médios percentuais obtidos para patologia de defeito maior entre os dois grupos (T e C) nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen, realizadas antes, durante e após o tratamento com cisplatina no grupo T, estão expressos na figura 14. Foi observada diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os momentos 2 e 3; entre os grupos nos momentos 3 e 4 e entre os momentos 2 e 3 no grupo T. Observar o aumento desta patologia no método de lâmina corada no grupo tratado a partir do momento 2 (M2).

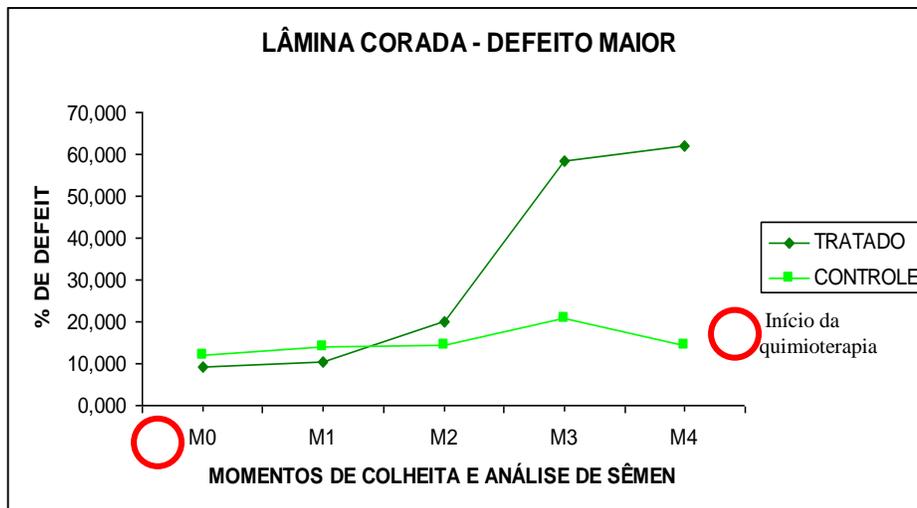


Figura 14 – Representação gráfica dos valores médios percentuais de espermatozóide com defeito maior nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen, onde o M0 (momento 0) representa o início da quimioterapia.

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:

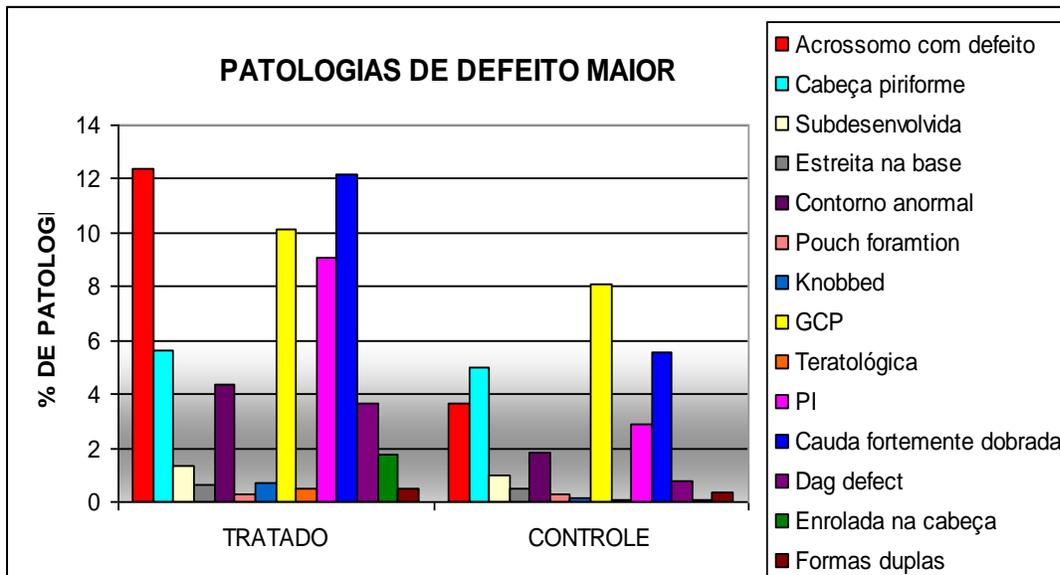


Figura 15 – Evolução dos valores médios percentuais de patologias espermáticas avaliadas pelo método de lâmina corada observadas entre o grupo tratado e controle.

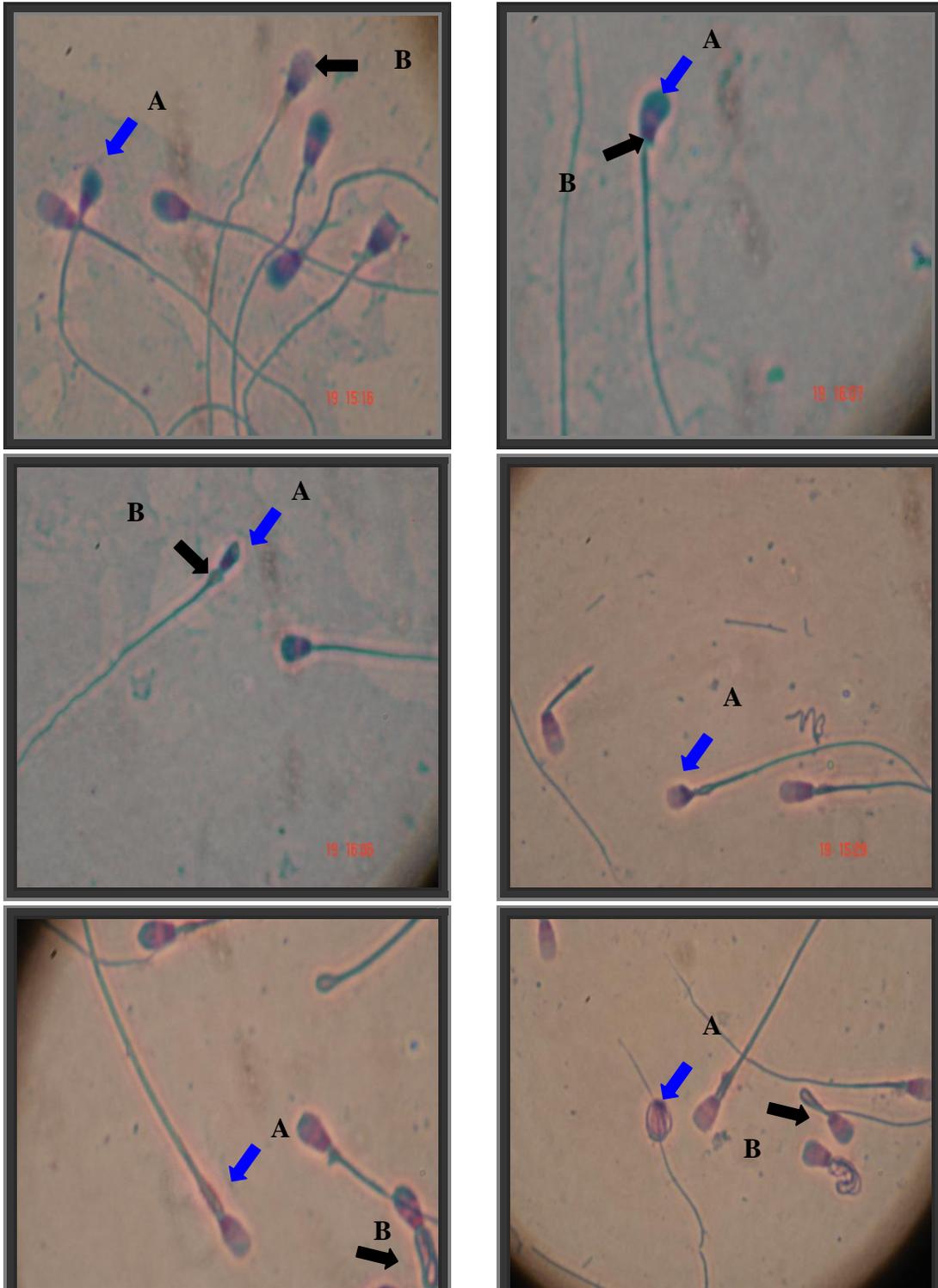


Figura 16 - Ilustração fotográfica de lâmina corada: observar seta azul sptz com cabeça piriforme (A) e seta preta, sptz com acrossomo defeituoso (B) (destacamento), seta azul sptz com cabeça de contorno anormal (A) e seta preta o mesmo sptz com inserção de cauda abaxial (B), seta azul sptz, cabeça estreita na base (A), seta azul, sptz com PI alterada (A) e seta preta, sptz CFD (B), seta azul, sptz com CEC (A) e seta preta, sptz CDG (B). Aumento: 100 vezes. Coloração: KARRAS modificado por PAPA et al. (1988).

5.1.5.1.3. Defeito Menor

Os valores médios percentuais obtidos para patologia de defeito menor entre os dois grupos (T e C) nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen, realizadas antes, durante e após o tratamento com cisplatina no grupo T, estão expressos na figura 17. Foi verificada diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos no momento 1. Observar o aumento desta patologia no método de lâmina corada no grupo controle a partir do momento 0 e subsequente decréscimo a partir do momento 1.

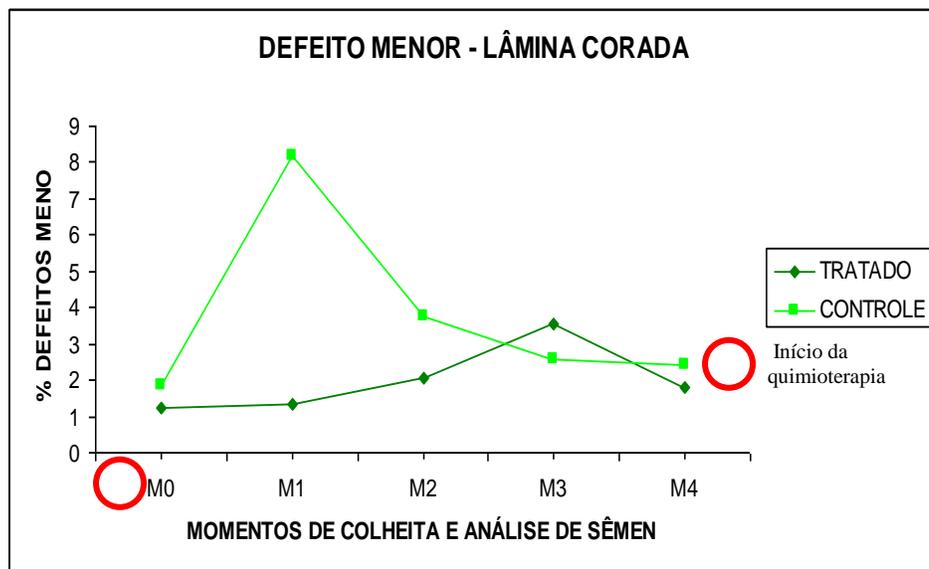


Figura 17 – Evolução dos valores médios percentuais de espermatozói-de com defeito menor nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen, onde o M0 (momento 0) representa o início da quimioterapia.

Os resultados da morfologia espermática, método da lâmina corada, apresentaram como defeito menor, as seguintes alterações (Figura 23):

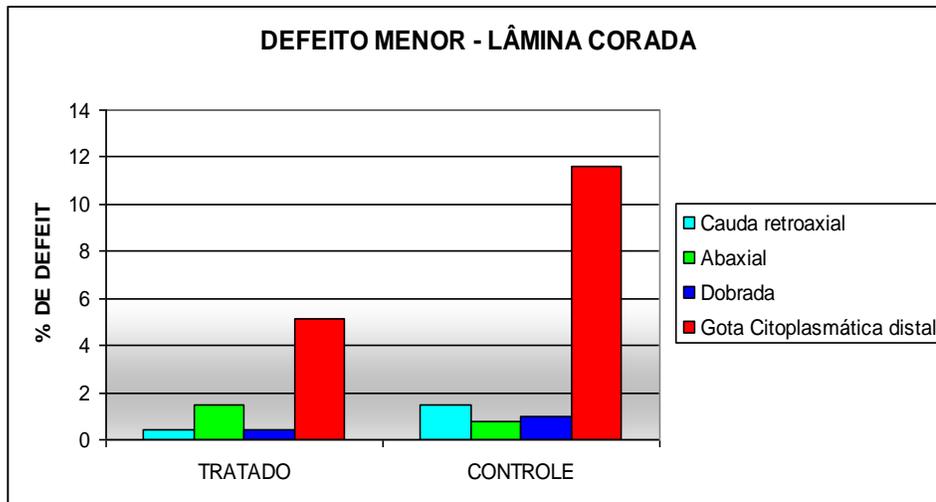


Figura 18 - Evolução dos valores médios percentuais de patologias espermáticas avaliadas pelo método de lâmina corada, defeito menor, observadas entre o grupo tratado e controle.

5.1.5.3. Defeito Total

O defeito total é a soma dos defeitos maiores e defeitos menores em porcentagem na avaliação morfológica espermática.

5.1.5.4. Defeito Total

Os valores médios percentuais obtidos para patologia de defeito total entre os dois grupos (T e C) nos diferentes momentos de colheita e análise do sêmen, realizadas antes, durante e após o tratamento com cisplatina no grupo T, estão expressos na figura 19. Foi notada diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os momentos 1,2 e 3, entre os grupos nos momentos 3 e 4 e entre os momentos 2 e 3

no grupo T. Observar o aumento de defeitos totais no método de lâmina corada no grupo tratado a partir do momento 2.

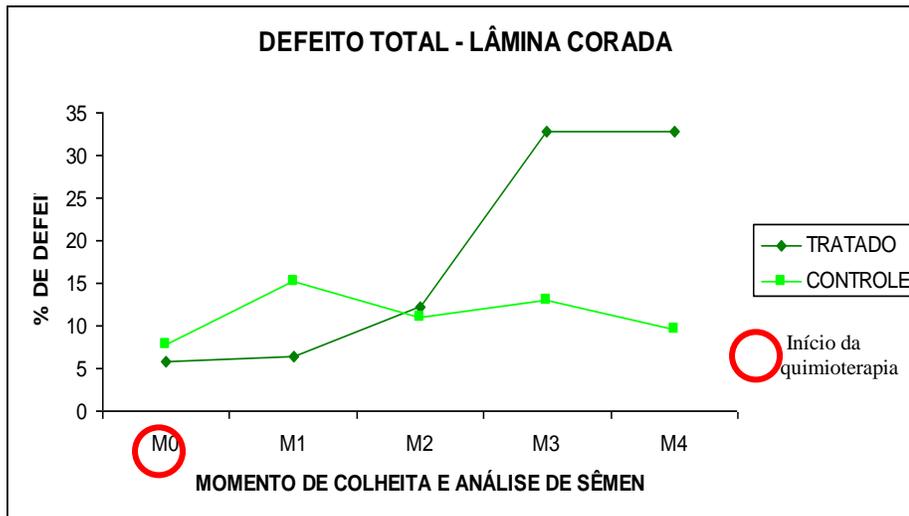


Figura 19 - Evolução dos valores médios percentuais de espermatozói-de com defeito total nos diferentes momentos de colheita e análise de sêmen, onde o M0 (momento 0) representa o início da quimioterapia.

6.1. AVALIAÇÃO ULTRA-SONOGRÁFICA TESTICULAR

6.1.1. Mensuração Testicular

Na avaliação ultra-sonográfica dos oito animais, foram analisados em quatro momentos, onde o M0 representou a ultra-sonografia antes do início da quimioterapia, o M1 o ultra-som logo após a primeira quimioterapia, o M2 representou o exame entre a 2ª e 3ª sessões de quimioterapia e finalmente o M3 a ultra-sonografia após a última aplicação do fármaco antineoplásico. Foram obtidas e analisadas 32 imagens escaneadas no plano de varredura sagital e frontal.

Foram observadas alterações importantes em relação ao volume testicular ao longo do tratamento nos cães que receberam cisplatina, enquanto que os cães do

grupo controle mantiveram um valor volumétrico do testículo quase constante no decorrer do experimento (Figuras 20 e 21).

Os valores médios percentuais obtidos para volume testicular entre os dois grupos (T e C) nos diferentes momentos de análise ultra-sonográfica, estão expressos na figura 20. Foi notada diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos nos momentos 2 e 3.

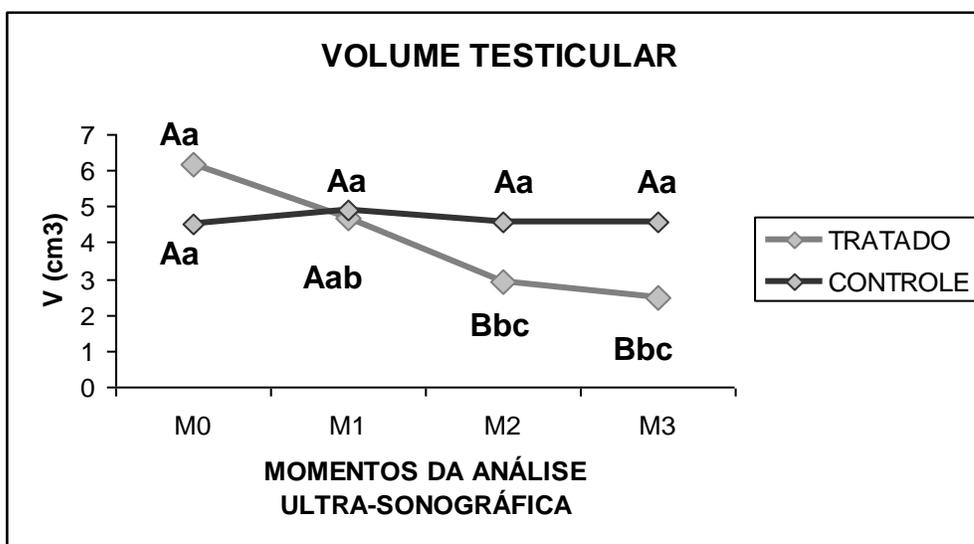


Figura 20 - Evolução dos valores médios percentuais do volume dos testículos esquerdo e direito dos animais do grupo tratado ao longo das quimioterapias. As letras maiúsculas indicam as diferenças significativas entre os grupos no mesmo momento ($P \leq 0,05$), enquanto que as letras minúsculas representam a diferença significativa do mesmo grupo entre os momentos.

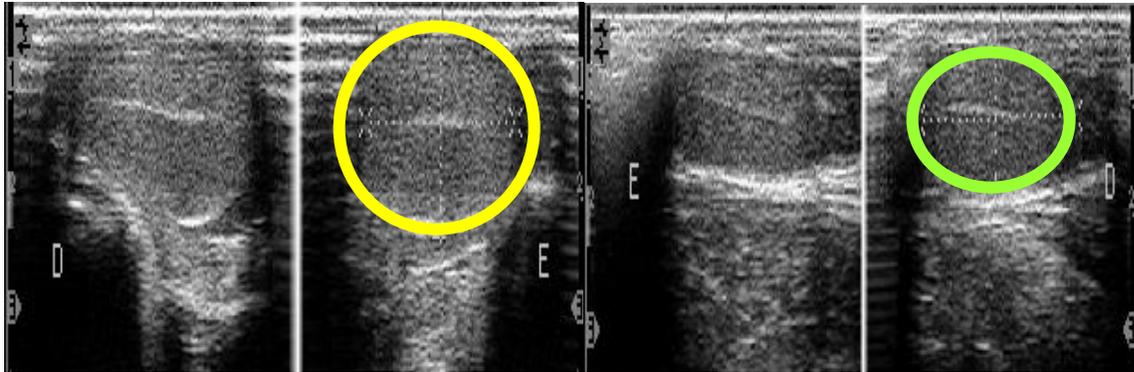


Figura 21– Imagem ultra-sonográfica de testículo esquerdo e direito de cão pertencente ao grupo tratado no plano de varredura sagital, demonstrando a nítida redução do comprimento e largura testiculares.

6.1.2. Avaliação em Escala de Cinzas

Na avaliação ultra-sonográfica dos 8 animais, foram obtidas e analisadas 16 imagens escaneadas no plano de varredura frontal. A média da variável, escala de cinzas (EC) para os animais tratados e controle em todos os momentos da análise ultra-sonográfica estão expressos na Tabela 1, onde: M0 (momento antes da quimioterapia), M1 (momento após a 1^o quimioterapia), M2 (momento entre a 2^a e 3^a quimioterapia) e M3 (momento após a última sessão de quimioterapia).

Tabela 9 – Escala de Cinzas (média ± desvio padrão) dos animais dos grupos tratado e controle nos quatro momentos de análise ultrasonográfica (TD = testículo direito; TE= testículo esquerdo).

TRATADO	M0	M1	M2	M3
TD	37 ± 9,8	36 ±7,35	33,8±9,47	33,6 ± 5,93
TE	37 ± 9,8	36,25± 17,5	32,87±14, 8	29,7 ± 13,6
CONTROLE				
TD	38,2 ± 5,9	41 ± 11,26	38 ± 5,93	40±6,54
TE	41 ± 8,08	39,5 ± 5,89	38,9 ± 2,98	40±6,15

Tabela 10 – Média dos valores da escala de cinza obtidos dos testículos em cada momento para os animais do grupo controle e tratado.

GRUPOS	M0	M1	M2	M3
TRATADO	37,56% ^a	36,38% ^a	34,96% ^a	33,81 ^a
CONTROLE	40,37% ^a	40,62% ^a	37,78% ^a	40,68 ^a

Médias seguidas de letras diferentes na coluna diferem estatisticamente pelo teste Tukey (p<0,05).

A média da variável EC obtida para todos os momentos do grupo tratado foi de 35,37% e para o grupo controle foi de 39,86%. Estes dados mostram que em uma escala de 0% a 100% (quanto mais próxima do zero, a imagem é mais negra, ou seja, menos ecogênica, e mais próximo de 100%, a imagem é mais branca, ou seja, mais ecogênica) os testículos dos animais do grupo tratado embora significativamente não difiram do grupo controle demonstraram uma baixa na ecogenicidade ao longo dos tratamentos (Figuras 22 e 23).

Os valores médios percentuais obtidos dos testículos esquerdo e direito para a avaliação da escala de cinzas (EC), que foi analisada pelo programa computacional E-view, estão expressos na figura 25.

Os dados indicam que não houve diferença significativa ($P \leq 0,05$) entre os grupos nos diferentes momentos analisados. No entanto observar discreta diminuição da ecogenicidade no grupo tratado ao longo do tratamento.

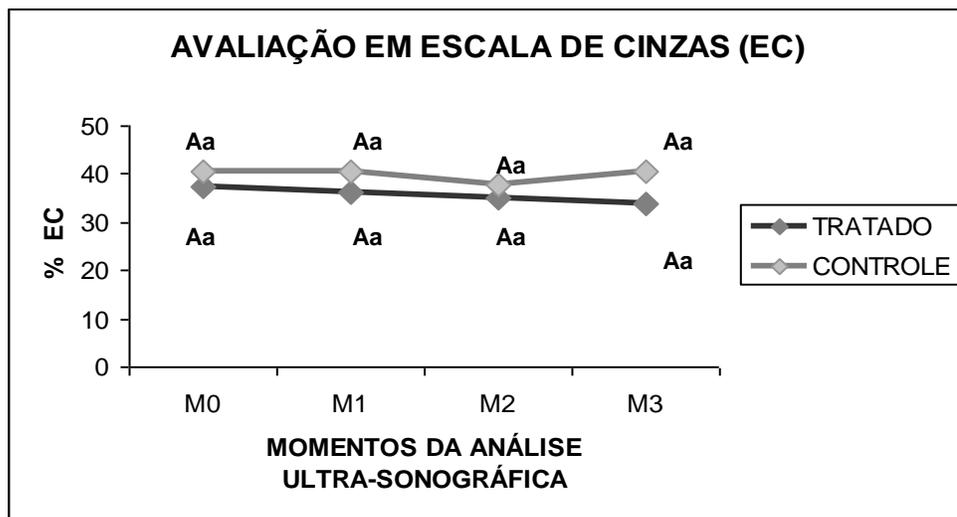


Figura 22- Valores médios percentuais obtidos para a variável escala de cinzas (EC) nos diferentes momentos da análise ultra-sonográfica. As letras maiúsculas indicam as diferenças significativas entre os grupos no mesmo momento ($P \leq 0,05$), enquanto que as letras minúsculas representam as diferenças significativas do mesmo grupo entre os momentos.

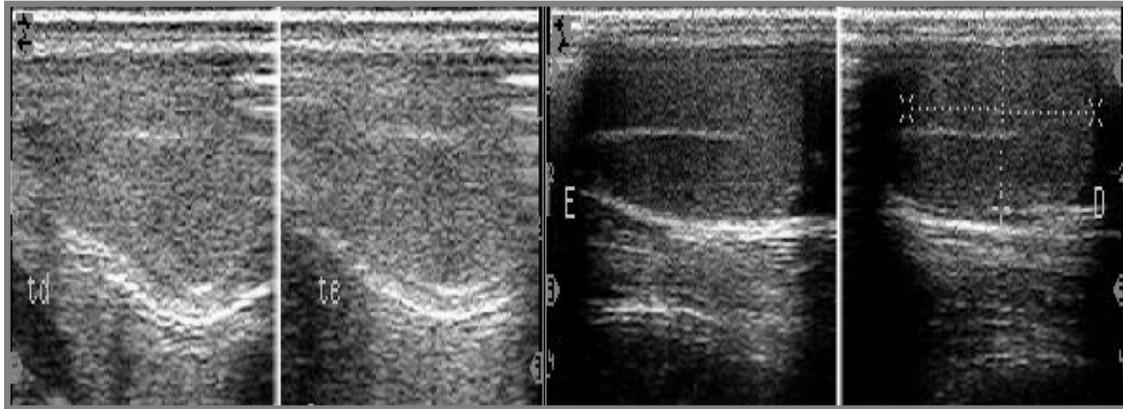


Figura 23– Imagem ultra-sonográfica de testículos esquerdo e direito de cão pertencente ao grupo tratado, no plano de varredura sagital, demonstrando uma diminuição da ecogenicidade do parênquima testicular.

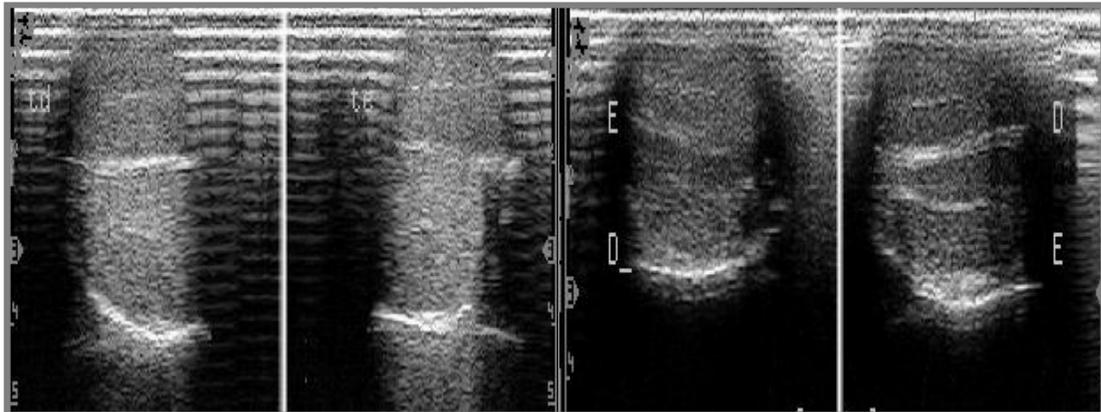


Figura 24 - Imagem ultra-sonográfica de testículos esquerdo e direito de cão pertencente ao grupo tratado, no plano de varredura frontal, demonstrando diminuição da ecogenicidade do parênquima testicular.

6.2 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL QUALITATIVA DAS CÉLULAS GERMINATIVAS

A degeneração testicular varia de discreta a severa e quando determinada por causa sistêmica, no caso uma quimioterapia, o acometimento é bilateral. Neste estudo observou-se que os resultados obtidos na análise ultraestrutural do epitélio germinativo testicular dos dois grupos revelaram que a unidade histológica dos testículos, os túbulos seminíferos (sede da função espermatogênica), nos animais do grupo controle aparecem como grandes estruturas isoladas com grande diferenciação celular, perfis arredondados ou oblíquos, aparência variável devido ao seu complexo espiralado em muitos diferentes ângulos e níveis (Figura 25 – A e B).

Já os animais do grupo tratado observaram-se um grau de degeneração de moderado a severa do parênquima testicular e irregularidades na conformação dos túbulos seminíferos (figuras 27 – A e B). Em alguns túbulos observaram-se um padrão de atrofia caracterizado por aumento do espaço intertubular e conseqüente diminuição da luz tubular (figura 27 - B). Em outros túbulos observou-se grau de degeneração com intensa vacuolização do epitélio seminífero e ausência de atividade espermatogênica, presença de células do epitélio germinativo, assim como de células gigantes multinucleadas no lúmen tubular (figura 27 – E).

A degeneração moderada caracterizou-se pela presença de túbulos seminíferos com atividade espermatogênica reduzida em maior intensidade e presença de células do epitélio germinativo em lume tubular (figura 27 – C e E).

Internamente os testículos encontram-se divididos em dois compartimentos distintos, o seminífero e o intersticial, o padrão normal desta compartimentalização pode ser observado na Figura 25 – A e B, onde se observam no espaço intersticial grande quantidade de células. Nos cães que receberam a quimioterapia apesar do aumento do espaço intertubular em relação aos túbulos seminíferos, pode-se observar a proliferação de células de Leydig no interstício (Figura 27 – F).

O compartimento seminífero normal é composto por células espermatogênicas (espermatogônias, espermatócitos e espermátides) (Figura 25- A e B) em diferentes estágios de divisão mitótica e meiótica (figuras 25 e 26 – C,D,E,F,G,H,I,J)

,entremeados por células de suporte, as células de Sertoli (Figura 27 – N e O). No grupo controle verificou-se grande heterogeneidade celular e um contínuo processo de diferenciação celular (Figura 26 - J).

As Espermatogônias primárias são encontradas ao longo da parede dos túbulos seminíferos, são as maiores células germinativas, apresentam citoplasma eosinófilo, claro e abundante, cujo limite pode ser observado com dificuldade.

Dentro do citoplasma existem grânulos muito finos e muito pouco corados difícil de visualizar. O núcleo, grande e esférico, localiza-se na região central do citoplasma. Dentro do núcleo há um só nucléolo, bastante evidente, localizado em posição excêntrica. A cromatina forma grumos junto à membrana nuclear, de onde emite filamentos radiais em direção ao nucléolo (Figuras 25 e 26 – C, D, E, G, I). Entre os filamentos de cromatina existem grandes espaços vazios, conferindo ao núcleo um aspecto hialino.

As espermatogônias secundárias são semelhantes às anteriores, porém menores e com núcleo basófilo um pouco mais corado, ocupando quase todo o volume da célula, e vários nucléolos excêntricos (Figura 26 - G). A cromatina apresenta-se em grânulos distribuídos de maneira uniforme pelo nucleoplasma.

Os espermatócitos primários são menores que as espermatogônias secundárias. Apresentam-se aglomerados, citoplasma hialino e escasso, quase totalmente ocupado pelo núcleo, que apresenta cromatina condensada caracterizando a prófase I da meiose (Figuras 25 e 26 – C, D, G, H, I, J).

Encontram-se espermatócitos primários em diferentes fases de divisão celular, dependendo do estágio da prófase I, o núcleo destas células é identificado em leptóteno ou paquíteno. Quando em leptóteno, a cromatina está associada ao envoltório nuclear assumindo um aspecto de bouquet; já em paquíteno, os cromossomos estão mais evidenciados e de aspecto filamentosos, devido ao processo de condensação e espiralização mais adiantada da cromatina (Figuras 25 e 26 – C, D, G, H, I, J).

Os espermatócitos secundários são resultantes da divisão meiótica dos espermatócitos primários, apresentando tamanho menor que os mesmos. Como este período se processa muito rapidamente estas células são de difícil visualização. As

espermátides apresentam tamanho menor que os espermatócitos secundários (Figuras 25 e 27 – F, L, M). Apresentam núcleo esférico e cromatina com diferentes graus de condensação, muitas vezes aparecem englobadas pelas projeções das células de Sertoli, que futuramente vão se diferenciar em espermatozóides durante o processo de espermiogênese.

No compartimento seminífero dos cães do grupo controle as células germinativas apresentam-se em variados estágios sucessivos de um processo contínuo de diferenciação. Observou-se que para os animais tratados há presença de algumas células tanto da linhagem espermatogênica como células somáticas, no entanto não há a presença de um processo contínuo de diferenciação, e as células presentes nos diferentes estágios muitas vezes apresentam-se isoladas, em processo de degeneração num montante de células degeneradas (figura 28 –, G, H), e ainda apresentam aparente mudança de conformação citoplasmática e nuclear (figura 28 - C). Nos animais controle ficou evidente a intensidade do processo de espermiogênese, enquanto que no grupo dos animais tratados constatou-se uma baixa espermiogênese, uma vez que há ausência de espermatozóides na luz tubular. (Figura 28 – A, B, E).

Importante ressaltar, que mesmo na intensa degeneração das várias camadas do epitélio seminífero a camada basal de alguns túbulos seminíferos do grupo de animais tratados contou com a presença de espermatogônias primárias (figura 28 – A, B, C, D).

Conforme observado no espermograma dos animais tratados há uma queda da concentração de espermatozóides no decorrer do tratamento e alta porcentagem de espermatozóides com defeitos morfológicos.

Ainda, os resultados da morfologia espermática mostraram que para os animais tratados houve a presença de uma série de espermatozóides apresentando defeitos maiores e menores.

De maneira geral os espermatozóides normais apresentam três regiões fundamentais: a cabeça, peça intermediária e a cauda. Estas duas últimas constituem o flagelo e estão unidas à cabeça ao nível do colo que é a parte mais estreita e une a cabeça à peça intermediária do flagelo, já a cabeça é

essencialmente constituída pelo núcleo e recoberto em sua posição anterior pelo acrossoma constituído por material homogêneo ou levemente granular e de densidade moderada (figura 29 - I).

Na avaliação das patologias morfológicas em microscopia eletrônica de transmissão observaram-se principalmente a presença de defeitos em região de cabeça, com a presença de vacúolos nucleares localizados ao longo de toda a cabeça do espermatozóide (figura 29 - M). Observou-se ainda alguns espermatozoides apresentando uma condensação anormal do DNA, com uma visível perda da compactação cromatínica (figura 29 - M), e o grau de condensação cromatínica variaram consideravelmente entre as células, fato este não observado nos animais do grupo controle, que apresentaram um padrão constante na densidade nuclear. Observou-se ainda em algumas fotomicrografias dos animais do grupo tratado a grande variação de tamanho nuclear nas diferentes secções de espermatozoides (figura 29 - L). Relata-se também que em cortes longitudinais foi observada na região da cabeça uma conformação com aspecto de forquilha (BARTH & OKO, 1989), onde se notou a presença de uma vesícula contendo material granular em quase toda a curvatura da cabeça (figura 29 – J).

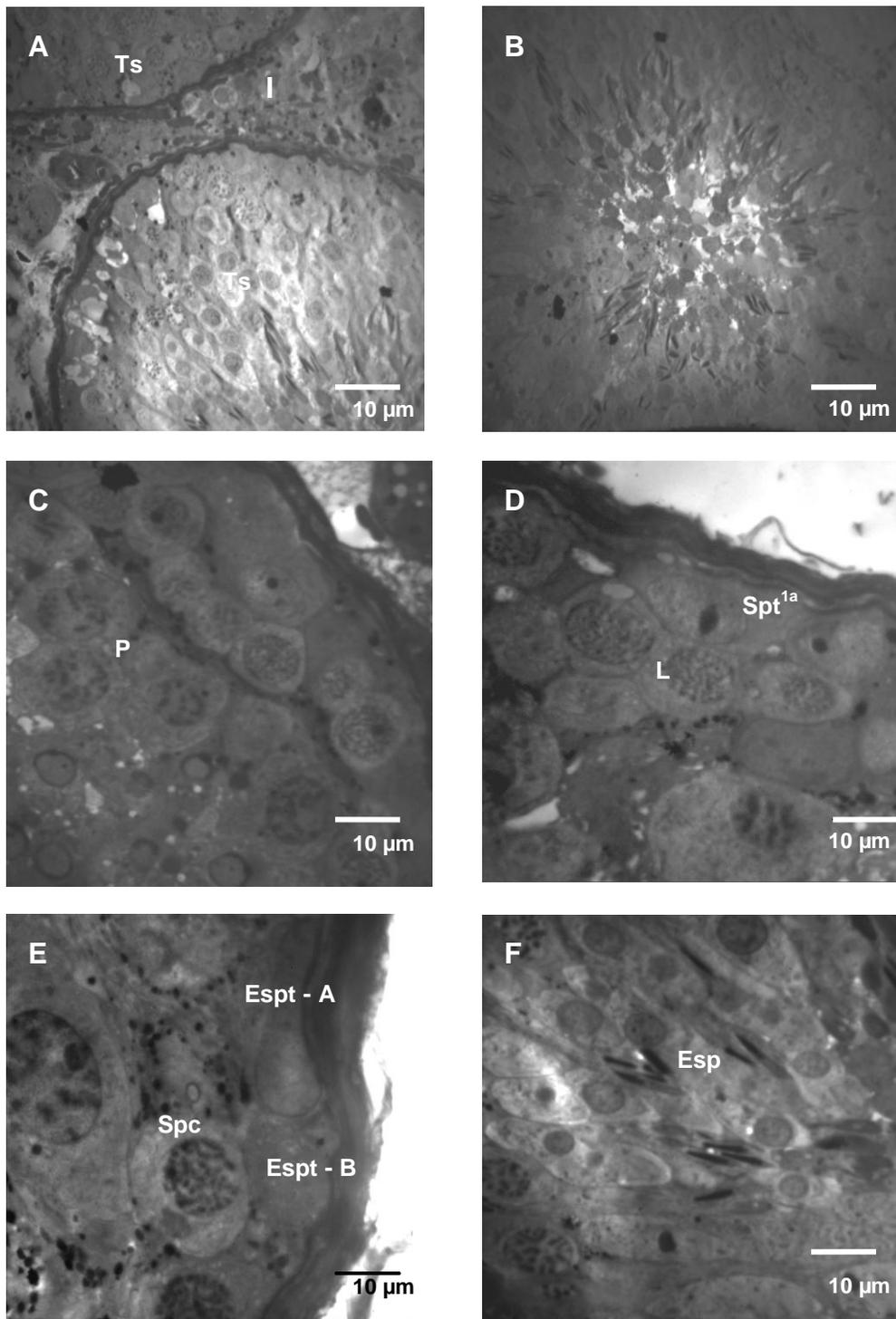


Figura 25 – Eletronmicrografia do parênquima testicular de cão pertencente ao grupo controle. **A** - Característica ultraestrutural do túbulo seminífero e interstício (600 x). **B** - Eletronmicrografia demonstrando intensa divisão celular (600x). **C** - espermatogônias primárias e espermatócitos na prófase I da meiose (1500x). **D** - espermatogônias primárias e espermatócitos em fase de leptóteno (2000x). **E** - espermatogônias tipo A e tipo B (3000x). **F** - espermátides alongadas e espermatócitos em paquíteno (1500x).

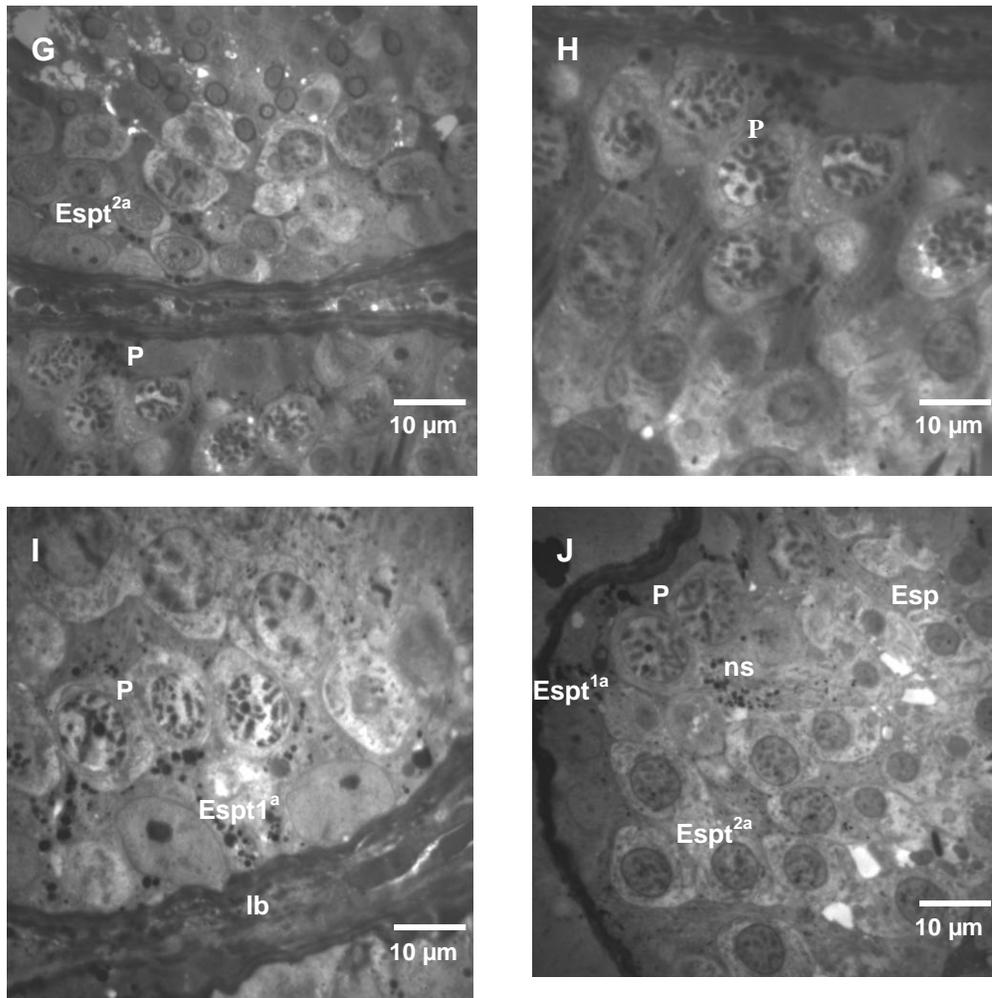


Figura 26 – Eletronmicrografia do epitélio testicular de cão do grupo controle. **G** – espermatogônias secundárias , espermatócitos em paquíteno (1200x). **H** – espermatócitos na prófase I da meiose - paquíteno (2000x). **I** – espermatogônias primárias com nucléolo excêntrico bem evidente (1500x). **J** – compartimento adluminal comportando as células espermatogênicas em diferentes estágios de divisão meiótica e mitótica (1200x).

Legendas:

Spc- espermatócito;Lb-lâmina basal; P-espermatócito em paquíteno;Spt1a-espermatogônia primária; L-espermatócito em leptóteno;Espt2a-espermatogônia secundária , ,Esp-espermátide arredondada; Ns- núcleo da célula de Sertoli.

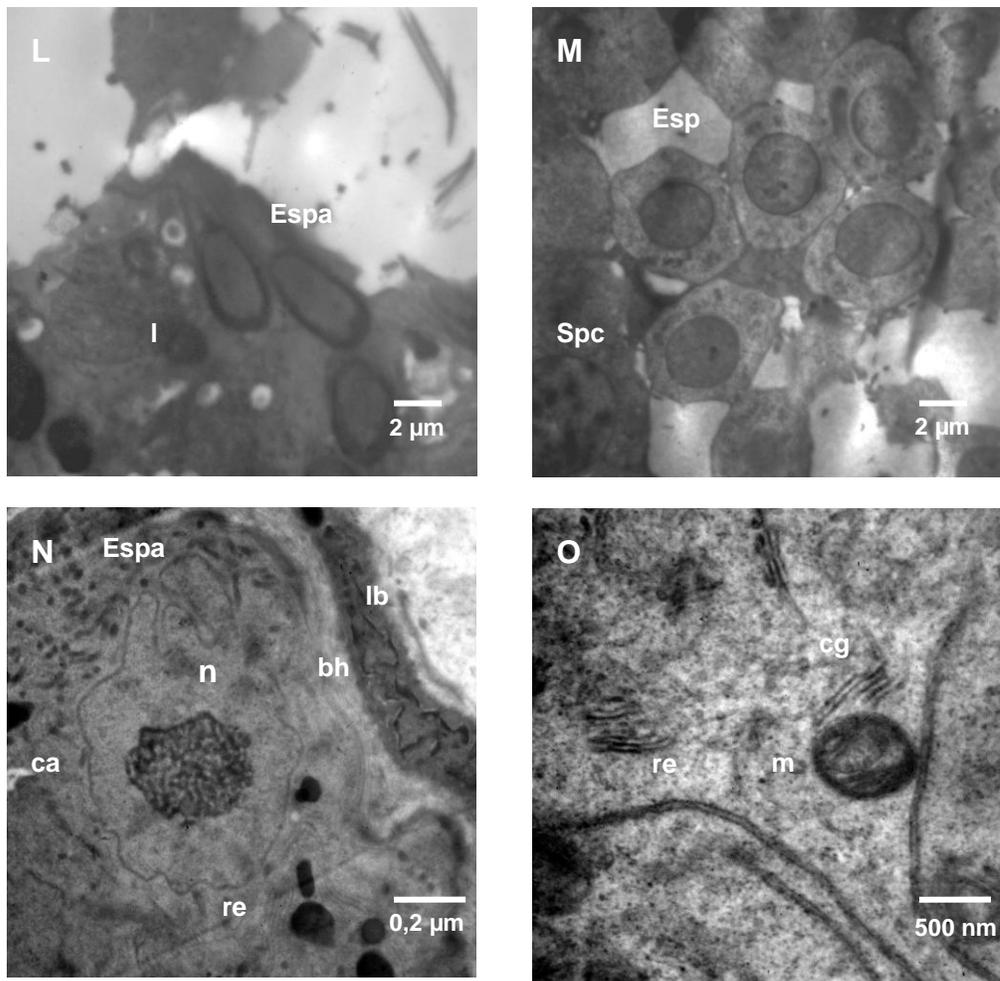


Figura 27 – Eletronmicrografia do epitélio germinativo testicular de cão do grupo controle. **L** – espermátides alongadas no citoplasma da célula de Sertoli (4000x). **M** – espermátides arredondadas (2500x). **N** – núcleo da célula de Sertoli (6000x). **O** – mitocôndria e complexo de golgi da célula de Sertoli (40.000x).

Legendas:

Spc- espermátocito; ,EspB, Espa- espermátide alongada; Esp-espermátide arredondada, N- núcleo da célula de sertoli; BH-barreira hematotesticular; lb-lâmina basal; Ca-compartimento adluminal; re- retículo endoplasmático; cg-complexo de golgi; m-mitocôndria.

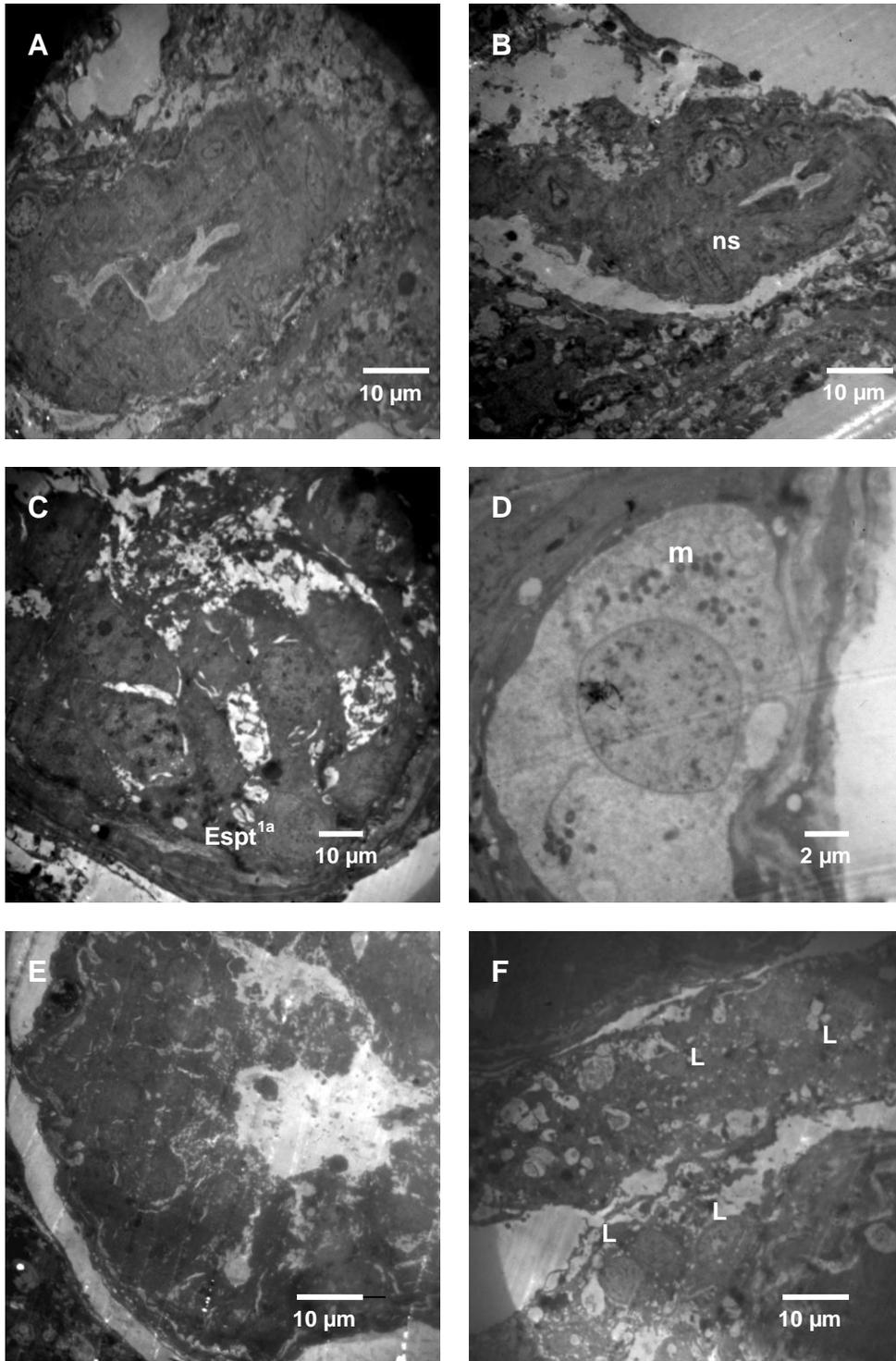


Figura 28 – Característica ultraestrutural do epitélio germinativo testicular de cão submetido à quimioterapia. **A** – degeneração do epitélio testicular (1200x). **B** - retração do espaço intertubular com oclusão parcial da luz tubular (1500x). **C** – presença de células da linhagem espermatogênica (1500x). **D** – célula tronco (3000x). **E** – ausência de sptz no lume (3000x). **F** – células de Leydig (1200x).

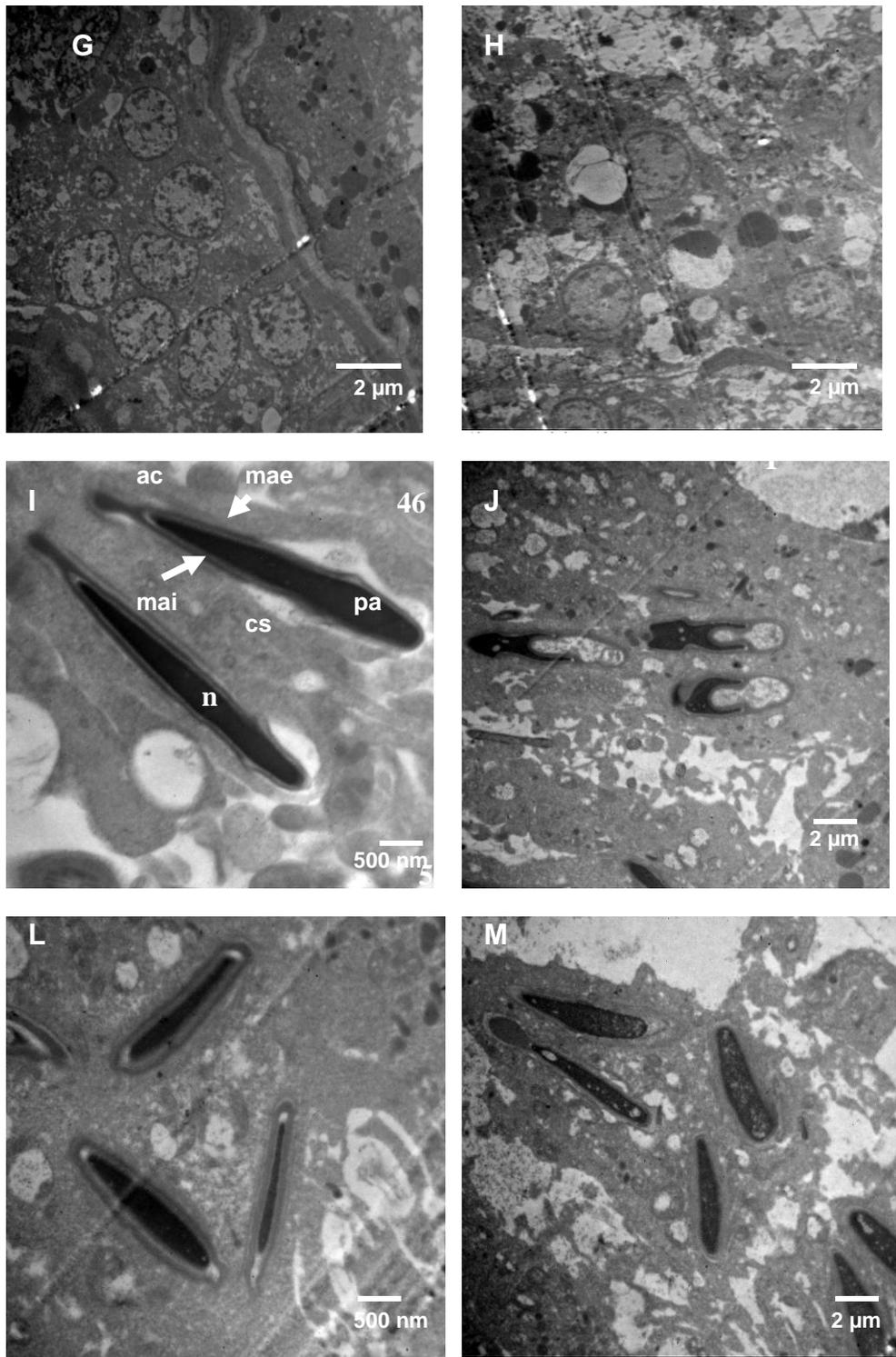


Figura 29 – Eletronmicrografia do epitélio seminífero de cão do grupo tratado. **G e H** – células degeneradas (2500x, 3000x). **I** – cabeça de espermatozói de cão do grupo controle (15000x). **J** – cabeça com aspecto de forquilha (5000x). **L** – variação no tamanho nuclear (6000x). **M** – vacuolização nuclear variação na condensação cromatínica (6000x).

7. DISCUSSÃO

Durante o processo normal de diferenciação, ocorrem perdas de células da linhagem germinativa, e a taxa de perda é determinante do rendimento da espermatogênese. Em outras palavras, quanto maior a perda das células da linhagem germinativa em diferenciação que ocorre normalmente durante a espermatogênese menor será o rendimento. O rendimento da espermatogênese é variável entre as espécies.

Inicialmente acreditava-se que o “excesso” de células germinativas ou as células que excediam a capacidade de suporte das células de Sertoli eram eliminadas por um processo de natureza degenerativa. Mais tarde ficou claro que a perda destas células ocorre através da morte celular programada, ou apoptose. Esse processo é regulado pelas células de Sertoli, que tem a capacidade de iniciar a cadeia de eventos que culmina com apoptose das células germinativas.

Sob o ponto de vista patológico, vários fatores predisponentes ou causadores de alterações testiculares, particularmente de degeneração testicular, por exemplo, quimioterapia, exerce seus efeitos deletérios sobre o testículo e sobre a espermatogênese, induzindo aumento da taxa de apoptose das células germinativas.

Nas análises microscópicas do espermograma realizado neste experimento observou-se que os valores médios percentuais obtidos para a motilidade espermática e vigor espermático não apresentaram diferença significativa entre o grupo tratado e controle. Observou-se que após a primeira aplicação do fármaco, na análise do sêmen realizada três dias antes de se efetuar a segunda aplicação da cisplatina, não houve alteração da motilidade e vigor para os animais do grupo tratado, no entanto do momento 1 (M1) para o momento 2 (M2) houve uma ligeira queda de motilidade e vigor para os animais do grupo tratado, acredita-se que esta diminuição pode ter ocorrido em virtude de alguns fatores .

Supõe-se que o primeiro fator possa estar relacionado a recente exposição do epitélio testicular a uma substância potencialmente citotóxica, entretanto observou-se

que a queda tanto da motilidade como do vigor não ocorreu após a primeira aplicação do fármaco, o que se esperaria nesta situação, lembrando que a análise do sêmen não é feita imediatamente e sim somente após um período de 18 dias, permitindo assim que o fármaco atingisse a concentração terapêutica e conseqüentemente seus efeitos deletérios no epitélio, lembrando que segundo OGILVIE (1996), WATERS & COOLEY (1998) os estudos farmacocinéticos, efetuados em seres humanos e em animais de experimentação, demonstraram uma distribuição tissular rápida, com uma meia-vida plasmática de distribuição de 25 a 49 minutos e uma meia vida de eliminação de 58 a 73 horas, ainda a sua ligação às proteínas plasmáticas é superior a 90%, sendo sua eliminação incompleta corroborando o citado por Rodaski & De Nardi, 2004, que apenas cinqüenta e oito por cento da dose administrada são excretadas pela urina.

Ainda, pode-se sugerir que o efeito no decréscimo da motilidade e vigor espermático poderia ter acontecido somente depois do momento 1 (M1) em virtude do tratamento feito com a cisplatina residir no fato que a toxicidade do fármaco está principalmente relacionada com a dose que é acumulativa.

Infere-se que a outra possibilidade seja que quase no final do ciclo da segunda aplicação, que daria por volta de 40 dias do tratamento, houve queda da motilidade e vigor espermático em virtude de alguma alteração no processo de diferenciação e maturação da espermátide, sugerindo uma possível interferência na função normal dos microtúbulos que são responsáveis pela composição do flagelo do espermatozóide responsável pela movimentação do mesmo, lembrando que estes são compostos basicamente por proteína (tubulina), e segundo OGILVIE (1996), WATERS & COOLEY (1998) como efeito secundário, a Cisplatina interfere na síntese do RNA e de proteínas essenciais ao organismo, demonstrando especial preferência para os tecidos cujas células apresentam alta velocidade de reprodução mitótica (OGILVIE, 1996; WATERS; COOLEY, 1998). Também pela própria afinidade da cisplatina em se ligar às proteínas plasmáticas.

Sabe-se ainda, que algumas moléculas interferem na função dos microtúbulos, alterando a função dos mesmos nos processos celulares dos quais participam. Na década de 30, observou-se que o alcalóide colchicina paralisava a

mitose na metáfase, e, desde então, a colchicina tem sido usada nos estudos sobre os cromossomos e a divisão celular. Estudos posteriores mostraram que a colchicina se combina especificamente com os dímeros de tubulina e causa o desaparecimento dos microtúbulos menos estáveis, como o do fuso mitótico.

Os microtúbulos dos cílios e flagelos são resistentes à colchicina, talvez devido às proteínas (MAPS) a eles associadas. Já o Taxol é um alcalóide utilizado no tratamento de tumores, pois também impede a mitose. Ele acelera a polimerização e estabiliza os microtúbulos, impedindo a despolimerização.

Outras drogas utilizadas no tratamento de tumores, que também interferem com a dinâmica de microtúbulos, são a Vincristina e a vimblastina. Ainda, é importante ressaltar que a cisplatina, assim como outros quimioterápicos produz uma grande quantidade de radicais livres, que são oriundo principalmente por modificações químicas de proteínas, lipídeos, carboidratos e nucleotídeos, resultando em uma variedade de conseqüências biológicas, incluindo lesão tecidual, mutação, carcinogênese, comprometimento do sistema imunológico e morte celular. E também pelo fato da cisplatina interferir na síntese de ácido desoxiribonucléico (DNA) e também de proteínas, conseqüentemente ocasiona uma maior liberação de várias substâncias tóxicas ao organismo, que afetam células sadias de tecidos de rápida proliferação celular (SANTOS & CRUZ, 2001), como é o caso do epitélio testicular.

No entanto, apesar das observações e suposições supracitadas, a motilidade não se apresentou inferior a 70%, lembrando que segundo ROTA et al. (1997) a motilidade espermática de uma amostra de sêmen fresco de cão deve ser de no mínimo 70%. No decorrer do experimento houve apenas esta ligeira queda do valor da motilidade e vigor com subsequente tendência a estabilização, correlaciona-se este fato ao citado por IGUER-QUADA & VERSTEGEN (2001) de que apesar da grande utilização, a motilidade não é um parâmetro totalmente confiável para predizer a capacidade fecundante de uma amostra de sêmen, pois pode-se ter espermatozóides com grande quantidade de patologias ou ainda a presença de espermatozóides imóveis na amostra não implica que os mesmos estejam mortos, além disso, a motilidade por ser um parâmetro subjetivo, sofre diversas influências.

A concentração espermática, apesar de não ter havido diferença significativa entre os grupos, demonstrou uma grande queda nos dois grupos após o momento um (M1), com subsquentes oscilações no decorrer do experimento, sendo que a partir do momento três (M3) houve um ligeiro aumento com possível tendência adaptativa do organismo a uma possível estabilização da concentração espermática.

A queda nos dois grupos provavelmente está relacionada com o estresse ambiental que estes animais passaram, pois se fosse somente pela ineficiência funcional dos túbulos seminíferos devido a grande redução do volume testicular que houve ao longo dos tratamentos, apenas os animais do grupo tratado apresentariam uma queda da concentração e os animais do grupo controle até poderiam apresentar uma queda motivada pelo estresse ambiental também sofrido, no entanto menos evidente.

De acordo com Almeida et al. (1998) e Goss et al. (2002) o estresse reduz a produção de espermátides e também a qualidade e quantidade de espermatozóides, ainda, o estresse aumenta os níveis de prolactina que no macho atua diminuindo a espermatogênese. Sugere-se portanto, que o estresse observado, por provocar alterações hormonais, provavelmente altera uma intrincada rede de interação entre os hormônios da reprodução, refletindo diretamente nos rendimentos intrínsecos da espermatogênese.

Se somente a concentração fosse utilizada como parâmetro de avaliação poderia-se supor também que se após a última quimioterapia houver uma tendência a estagnação dos valores da concentração espermática, pode-se sugerir que a taxa de fertilização ficaria comprometida de acordo com o exposto por OEHNINGER et al. (1988).

Em relação ao turbilhonamento foi observado que a partir do M1 houve uma queda acentuada do movimento de massa. Esta avaliação é resultante principalmente da soma dos valores do vigor juntamente com a concentração (HAFEZ, 1995), supõe-se portanto que a queda acentuada do turbilhonamento durante o tratamento correlaciona-se com a brusca diminuição da concentração espermática.

Ao observarmos os defeitos classificados em maiores no método de lâmina corada, (Figura 14), podemos inferir que o número desta patologia no grupo tratado com cisplatina (T) aumentou a partir do início da quimioterapia atingindo altos picos no M4. que corresponde a um ciclo espermatogênico completo, ou seja aproximadamente 62 dias.

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, 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.

A patologia de cabeça subdesenvolvida tem baixa freqüência 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, inclusive a quimioterapia

com o uso da cisplatina. Portanto, esta divisão acidental dos cromossomos pode ocorrer freqüentemente, sendo que apenas algumas células sobrevivem a todo o processo de espermatogênese e espermiogênese permanecendo intactas no ejaculado, supõe-se portanto que houve distúrbios na espermatogênese ocasionados pela cisplatina, uma vez que esta apresenta efeitos clastogênicos de acordo com Adler e Tarras (1990).

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 espermátide. O dano também pode ocorrer no espermatócito primário, predispondo o desenvolvimento de distúrbios na espermátide (BARTH & OKO, 1989), sugerindo que a cisplatina pode ter induzido distúrbios nas espermátides primárias durante o processo de maturação celular.

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 espermátide primária), foram ocasionadas por estresse ambiental, lesões locais ou outras afecções., deduz-se portanto que a cisplatina pode acarretar danos na espermatogênese. em decorrência de diversos fatores somados, como a produção de radicais livres, alteração de estruturas protéicas da célula, ação mutagênica, desarranjo hormonal, enfim uma cadeia de eventos que podem ocorrer de forma isolada ou simultaneamente.

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 esta 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, corroborando

os achados de DAGLI et al. (2002); SAWHNEY et al. (2005), aonde um desequilíbrio do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, com diminuição de transferrina disponível pelas células de Sertoli, inibina-B diminuindo a produção de FSH e ainda a hiperprolactinemia, que apesar de não se ter mensurado, endocrinologicamente é sabido que o estresse com aumento dos níveis de cortisol leva a um aumento na secreção de prolactina pela hipófise, só não se sabe se o estresse sofrido pelos animais dos grupos tratado e controle aumentaria a prolactina a ponto de causar efeitos danosos na espermatogênese.

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. Sugere-se portanto 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)., infere-se portanto que devido ao seu potencial citotóxico e alquilante o fármaco cisplatina tenha tendência em produzir este tipo de alteração celular.

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, que pode ser um problema com danos as células de Sertoli, que dentre muitas funções, apresentam a propriedade de retirar o excesso de citoplasma das espermátides em espermição (GONZÁLEZ, 2002., FRANÇA & RUSSEL, 1998), ou ainda, pode ser secundário, relacionado a problemas durante a maturação espermática (espermiogênese) no epidídimo (SEAGER, 1986; BARTH & OKO, 1989). O aumento de GCP, no grupo controle pode ser explicado pelo estresse da

diurese salina, que novamente modula uma intrincada rede de interação hormonal. Observou-se na microscopia eletrônica de transmissão para os animais do grupo tratado inúmeras espermátides vacuolizadas sugerindo um alto grau de degeneração do epitélio (figura 29 - H).

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). Ao observamos a microscopia eletrônica de transmissão dos animais submetidos à quimioterapia constata-se graus de degeneração testicular variados, com a presença de vacuolização, retração do espaço intersticial, aberrações celulares, propondo novamente que os efeitos deletérios da cisplatina em atuar diretamente na função meiótica e mitótica levaram erros de divisão celular, ou ainda por inativação de processos fisiológicos importantes, como a síntese protéica e também pela possível produção de metabólitos celulares tóxicos, tenha levado ao aparecimento deste tipo de patologia espermática.

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). Se a cisplatina tem atuação negativa na síntese de proteínas, e o flagelo do espermatozóide é constituído basicamente por microtúbulos que são essencialmente proteínas, infere-se portanto que este quimioterápico tenha efeitos negativos durante a formação da cauda do gameta masculino, produzindo uma porcentagem elevada de patologias de peça intermediária.

As patologias de cauda podem apresentar-se de diversas formas, como a cauda fortemente enrolada sobre o próprio eixo da peça intermediária (CFD) (Figura 16) ou apenas com uma dobra assumindo variadas formas (CFD e quando

apresenta gota citoplasmática é CDG) (Figura 16) ou uma ou várias vezes enrolada na cabeça (CEC) (Figura 16). 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 contínua 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 tireoidiana, 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)., supõe-se portanto que a cisplatina possa ter alterado o epitélio epididimário ou ainda a dinâmica iônica uma vez que ela tem a tendência de reduzir uma série de eletrólitos conforme descrito por Rodaski & De nardi (2002), ou novamente a organização estrutural dos microtúbulos devido aos efeitos na síntese protéica pelo RNA.

Uma das características importantes no desempenho reprodutivo de machos é a libido. A libido é considerada uma das funções periféricas da testosterona, pois o impulso sexual é totalmente dependente de andrógenos. A testosterona e seus derivados são transportados para a saliva, são liberados pela glândula submandibular e atuam como feromônios, através destes é mediada uma comunicação química entre os cães que caracteriza o comportamento sexual desses animais. A ausência ou quantidade reduzida destes ferômonios pode causar uma redução da libido do macho e, conseqüentemente uma redução da fertilidade da matilha (KALTENBACH & DUNN, 1982; MARCHESE et al., (1998)

. No entanto, 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 tratado e controle, embora esta atividade não tenha sido objeto de estudo no presente experimento uma vez que a mensuração sérica de testosterona não foi realizada. Porém no presente experimento foi digno de nota o comportamento dos animais frente à fêmea em estro, pois mantiveram a atitude normal de um cão macho hígido (interesse marcante para desempenhar cópula).

Outro fato, os animais ,entre eles, no momento em que estes eram levados à passeio e ficavam soltos juntos (duas vezes ao dia) eles apresentavam comportamento de cópula. Ainda, de acordo com Bordallo et al. (2001) mesmo os animais tratados com quimioterapia que apresentaram importante dano no epitélio germinativo, podem ter mantido os níveis de testosterona normais às custas do aumento da secreção de hormônio luteinizante (LH).

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 14), no grupo tratado a partir do momento 2, 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 17), no grupo controle (grupo que não recebeu a quimioterapia) 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 19) no grupo T, a partir do momento 1 chegando na sua porcentagem máxima no momento 3 e mantendo-se no momento 4 no método de lâmina corada, 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 T, 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 influência de forma significativa na qualidade espermática, podendo apresentar efeitos citotóxicos, tanto em epitélio germinativo (espermatogênese) como no epitélio epididimário do cão (espermio gênese).

A discreta elevação dos referidos defeitos no grupo C, a partir do momento 0, sugere que seja em virtude do estresse ambiental, em especial da diurese salina, que os animais foram submetidos. No momento 1, em virtude da variabilidade individual para defeito menor (gota citoplasmática distal), observou-se um discreto aumento no grupo C (grupo não tratado com quimioterapia).

Em relação à ultra-sonografia testicular, na avaliação do volume, foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos nos diferentes momentos, e entre o grupo tratado nos diferentes momentos da aplicação do fármaco. Constatou-se para o grupo dos animais tratados com o quimioterápico que houve uma redução evidente do parênquima testicular ao longo do tratamento, e se for feita uma comparação com os achados de KRIESE et al. (1991) BO e TRIBULO (2001), de que cerca de 80% da produção diária de espermatozoides é atribuída ao peso ou tamanho testicular, pois 80% do volume dos testículos estão ocupados pelos túbulos seminíferos, infere-se que a cisplatina compromete a função gametogênica, refletindo na quantidade e qualidade do sêmen produzido.

Isto se pode confirmar com os achados dos animais do grupo controle que apesar de terem sofrido um estresse ambiental bastante evidente durante o

experimento, no quesito volume testicular, não tiveram alteração do tamanho do órgão, que se manteve em valores volumétricos constantes, ressaltando novamente que a cisplatina nos animais tratados compromete a proporção do componente tecidual do epitélio germinativo, o que será confirmado posteriormente com a análise ultraestrutural do testículo.

De acordo com Arai et al. (1998), num estudo com 486 homens, observaram que a concentração espermática se mostrou abaixo dos limites normais naqueles pacientes com um volume testicular bastante reduzido, conseqüentemente pode-se supor que o volume testicular está diretamente correlacionado com a qualidade seminal. No entanto, fica um questionamento, pois a concentração espermática se encontrou reduzida, mas não somente no grupo tratado, o que sugeriria este fato devido à redução do volume testicular, mais os animais do grupo controle que não apresentaram alteração do volume do parênquima também apresentaram uma queda considerável na concentração espermática.

Este fato implica na suposição de que o estresse, com elevação de níveis de cortisol e conseqüentemente aumento na produção de prolactina que atua negativamente na espermatogênese estariam atuando de maneira mais deletéria em comparação à perda tecidual provocada pelo fármaco.

Neste estudo juntamente com a avaliação do volume testicular, realizou-se a determinação da escala de cinzas da imagem, estudo este muito importante na detecção de afecções testiculares, assim como na avaliação de estruturas anatômicas com a determinação da ecogenicidade do estroma testicular. Apesar de não ter havido diferença significativa entre os grupos no grau de ecogenicidade ao longo dos tratamentos, visualmente observou-se que houve uma nítida redução da ecogenicidade do estroma ao longo dos tratamentos dos animais tratados, tornando o testículo mais hipoecogênico em relação a densidade dos testículos do início do experimento.

Hamm e Fobbe (1994) e Chandolia et al. (1997), observaram aumento da ecogenicidade nos testículos em diferentes fases de maturação sexual, portanto supõe-se que a cisplatina ao longo do tempo provoca alterações tanto na espermatogênese como espermiogênese, alterando os processos de divisões

celulares, o que resultaria numa mudança da densidade do parênquima testicular ao longo das quimioterapias, em virtude da perda de massa tecidual, que será observado na análise ultraestrutural.

Em contrapartida, os animais do grupo controle embora tenham sofrido o mesmo grau de estresse, principalmente durante a diurese salina, mantiveram a escala de cinzas do estroma testicular quase que constante ao longo do experimento, sugerindo que mesmo o estresse tendo fortes indícios de provocar alterações na espermatogênese devido às alterações hormonais provocadas, ele não foi um fator suficiente neste experimento para induzir grandes alterações do epitélio germinativo.

Correlaciona-se este fato ao estudo realizado por Brito et al. (2003), onde se promoveu estresse térmico em testículo de bovinos e foi observado que a ecogenicidade do parênquima testicular ficou inalterada, porém ao espermograma houve queda na qualidade e quantidade de sêmen, assim como neste experimento.

Num outro experimento com touros mestiços aravindakshan et al. (1999), examinado-os desde as duas semanas de idade até 45 semanas, concluíram que houve aumento da ecogenicidade do parênquima testicular dos animais até 16 semanas de idade, sendo este aumento atribuído a proliferação celular, após 24 semanas também houve aumento da ecogenicidade do parênquima, o qual foi atribuído ao início da divisão das espermatogônias e a formação de uma maior quantidade de células maduras na espermatogênese.

Portanto, os resultados obtidos dos animais tratados com cisplatina, reforçam estes estudos, uma vez que o fármaco sendo citotóxico acarretaria um comprometimento da função mitótica e meiótica do testículo, diminuído a produção e qualidade de gametas, conseqüentemente levando a uma redução da ecogenicidade do parênquima testicular, pois há perda tecidual.

Observou-se na microscopia eletrônica de transmissão que os animais do grupo controle apresentam as células espermatogênicas organizadas numa série bem definida de associações celulares ou estádios. O epitélio seminífero compõe-se de várias camadas de gerações distintas de células germinativas, que se apresentam em arranjos distintos conforme a figura 31^a.

No estágio I do ciclo do epitélio seminífero, observam-se camadas basais de espermatogônias e espermatócitos primários em estágio de pré-leptóteno (figura 25 – E), camadas intermediárias de espermatócitos primários em paquíteno (figura 26- I), e uma camada adluminal de espermátides arredondadas (figura 27 - M.)

No grupo dos animais controle ficou evidente que ao longo do experimento, embora houvesse algumas mudanças físicas da qualidade seminal, o epitélio germinativo se apresentou íntegro, com nítida divisão celular e grande quantidade de células em diferentes estágios de divisão. Observou-se que ultraestruturalmente as espermatogônias primárias de acordo com Romagosa et al. (1999) e Quagio-grassiotto & Carvalho (1999), são as maiores células do testículo, apresentando núcleo esférico central e ficando bem próximas a lâmina basal.

Já as espermatogônias secundárias, que são oriundas da mitose das primárias, se apresentam de forma muito semelhante, difícil de distinguir, a única diferença é seu núcleo, que é um pouco menor. De acordo com Romagosa (1991), Romagosa et al.(1999) e Quagio-grassiotto & Carvalho (1999), em sequência temos os espermatócitos, que neste experimento para os animais do grupo controle foi observado nitidamente. Os espermatócitos primários para os animais do grupo controle apresentaram-se nas diversas fases da prófase meiótica (leptóteno e paquíteno), de acordo com o relato por Romagosa et al. (1999) e Quagio-grassiotto & Carvalho (1999) e ainda apresentando núcleo central ocupando quase toda a célula, sem nucléolo visível e observando massas cromossômicas denominadas complexos sinaptonêmicos (figura 26 – H e I).

No processo da espermiogênese, que representa a etapa pós-meiótica da espermatogênese, observou-se diferenciação celular das espermátides em espermatozóides nos animais do grupo controle de acordo com o descrito por Ploen & Courtens (1986). Visualizou-se ainda, as células de Sertoli que se caracterizam por possuir núcleo grande, fusiforme e sempre associadas às células germinativas, de acordo com o relatado por Weltzien et al. (2004).

No tecido intersticial, observou-se que os animais do grupo controle apresentaram grande quantidade de vasos sanguíneos, fibroblastos e células de

Leydig, importantes na produção de esteróides, para a regulação da espermatogênese conforme citado por WELTZIEN et al. 2004 .

Segundo ALBERTS *et al.* (2002), o espermatozóide, gameta masculino, é considerado uma das menores células do organismo e possui características próprias, como capacidade de movimentação e formato ideal para otimizar seu potencial de fertilização, que o torna ideal para propagar os genes paternos.

Constitui-se de duas regiões morfológica e funcionalmente distintas envolvidas por uma única membrana plasmática: a cabeça, que possui um núcleo haplóide altamente condensado, e a cauda, que o propuliona até o oócito e ajuda a penetrá-lo. Na cabeça espermática, o DNA nuclear encontra-se inativo e extremamente condensado, o que torna seu volume pequeno e facilita o transporte. Ainda nesta região, próximo à extremidade anterior do envelope nuclear, existe uma vesícula secretória especializada denominada vesícula acrossomal; esta contém enzimas hidrolíticas que auxiliam a penetração da camada externa do oócito pelo espermatozóide.

Neste experimento, como não foi o objetivo utilizar o sêmen, e sim o epitélio testicular, os espermatozoides encontrados para os animais do grupo controle não puderam ser identificados por inteiro, mas somente a região da cabeça. Observou-se no grupo controle, que os espermatozoides em sua grande maioria apresentam a cabeça essencialmente constituída pelo núcleo e recoberta em sua porção anterior pelo acrosssoma constituído por material homogêneo e de densidade moderada, de acordo com o relatado por BARTH & OKO, 1989 (figura 29 – I)).

Em contrapartida, os animais do grupo tratado apresentaram tamanhos nucleares diferenciados, sugerindo cabeças macro e microcefálicas (figuras 29 – L)), algumas aberrações (figura 29 – J) e variados graus de compactação cromatínica (figura 29 – M), com a presença de alguns vacúolos, se fizermos analogia com os estudos de HALABE et al. (1991), suporíamos que a cisplatina exerce seu efeito antineoplásico por meio de uma reação intracelular, que pode alquilar as bases púricas e pirimídicas do DNA, lembrando da sua grande capacidade de formar ligações cruzadas “cross-links” do tipo interfilamentar e também intrafilamentar,

sendo que esta droga muda a conformação do DNA inibindo sua síntese e causando a apoptose celular. (OGILVIE, 1996; WATERS; COOLEY, 1998).

Em contrapartida aos achados dos animais do grupo controle, os animais que receberam a quimioterapia apresentaram variados graus de degeneração, de moderado a severo, com pouca presença de celularidade (figuras 28 – A, B e E).

Neste estudo, observamos que o tratamento com cisplatina desorganizou o epitélio seminífero, promovendo o deslocamento de agregados celulares (figuras 28 – C)), em comparação aos aspectos morfológicos observados nos animais do grupo controle (figura 25 – A e B). Além disso, foi observado degeneração do epitélio seminífero, túbulos seminíferos atrofiados e hipoespermatogênicos.

O tratamento com a cisplatina promoveu a redução do lúmen dos túbulos seminíferos, ruptura parcial do epitélio seminífero e desorganização das células germinativas (figura 28 – A, B, C e E), em comparação ao controle (figuras 25 – A, B, F, 26-G, H, I e J). Ainda, há uma nítida redução do número de células germinativas que residem no compartimento adluminal como os espermatócitos paquitênicos e espermatídes circulares vacuolizadas após a citólise, e os que se fazem presente apresentam sua morfologia celular alterada, num processo evidente de degeneração (figura 29 – G e H).

A presença de espermatócitos nos animais do grupo tratado se comparado aos animais do grupo controle, apresentam alteração morfofuncional da célula, visualmente observa-se que há um comprometimento da conformação nuclear e do padrão cromatínico da célula (figura 29 - G). No entanto, uma constatação importante deste trabalho, é que mesmo os animais submetidos à quimioterapia com a cisplatina apresentando variados graus de degeneração do epitélio, apresentaram algumas células do compartimento basal (espermatogônias) intactas (figura 28 - D), e estas segundo. Presti et al. (1993), são células tronco essencialmente importantes em processos de regeneração tecidual quando se existe alguma injúria provocada no epitélio seminífero.

Portanto, infere-se que a cisplatina na dose que foi utilizada, lembrando que 70mg/m² é a dose máxima terapêutica utilizada na medicina veterinária, possa não acarretar alterações permanentes e irreversíveis no epitélio seminífero, em

contrapartida a alguns estudos realizados em seres humanos, onde já se tornou evidente que dependendo da dose de cisplatina utilizada os homens se tornam estéreis, Lembrando que de acordo com COLPI et al. (2004); ISHIKAWA et al. (2004) e TAKSEY et al. (2003)., 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).

De modo geral, utilizando-se quimioterapia, a maior parte dos pacientes se torna azoospermicos, por lesão das espermatogônias do tipo B, após sete a oito semanas do início do tratamento. Destes, 56% apresentam recuperação da concentração, com níveis acima de 20 milhões, após 24-36 meses pós-quimioterapia. Contudo, a melhora do espermograma já pode ser alcançada após 12 semanas, se não ocorrer lesão de toda a população de espermatogônias do tipo A. A elevação de FSH, indicativa de lesão das células de Sertoli, atinge um pico com 14 meses e se normaliza, em metade dos pacientes após dois anos (Presti et al., 1993).

Através deste achado podemos inferir que pelos valores obtidos do espermograma ao final do ciclo quimioterápico, os animais do grupo tratado possivelmente teriam a sua função reprodutiva restabelecida, em virtude da observação pelos gráficos, onde ao final do ciclo, ou seja, após aproximadamente 63 dias, a tendência do gráfico é se estabilizar, sugerindo que o organismo do animal se adaptou ou ainda se recuperará. Com a microscopia eletrônica temos evidências ainda mais fortes de que os animais do grupo tratado submetidos à dose de 70 mg/m² retornariam à reprodução, uma vez que foi encontrada a presença de espermatogônias e células de Sertoli no epitélio danificado, sugerindo portanto que nesta dose o fármaco cisplatina na função gonadal apresenta efeitos reversíveis.

Os animais do grupo tratado ainda apresentaram um aumento do espaço intertubular, caracterizando um processo de atrofia do túbulo seminífero com conseqüente diminuição da luz tubular (figura 28 – A e B). observa-se que na figura 28 – B há a presença evidente do núcleo da célula de Sertoli, no entanto dentro do

compartimento adluminal se esperaria uma certa quantidade de células espermatogênicas em mitose e meiose, no entanto não é o que se encontra nos animais do grupo tratado.

Porém, de acordo com Russel & Griswold (1993), González (2002) e França & Russel (1998), a presença destas células após à agressão ao epitélio, devido as características citotóxicas do fármaco, vão desempenhar um papel fundamental no processo de reparação do epitélio, pois elas regulam o processo espermatogênico. Lembrando que dentre as muitas funções desempenhadas por esta célula estão, o suporte e a nutrição das células germinativas que vão se desenvolver, a secreção de fluido e proteínas, a produção de citocinas, IGF-1, lactato e transferrina, a fagocitose das células germinativas em degeneração e do excesso das espermatídes em espermiacção, supondo novamente que os efeitos deléterios da cisplatina na dose usada são reversíveis no epitélio seminífero.

Ainda, entre as células de Sertoli existem junções altamente especializadas conhecidas como zônulas de oclusão, formando a barreira de células de Sertoli, também conhecida como barreira hemato-testicular, a qual, além de controlar o fluxo de substâncias no epitélio seminífero, delimita dois compartimentos, o basal o adluminal (RUSSEL, et al., 1990).

Como já dito a barreira hematotesticular é constituída por um complexo juncional protéico que mantém a oclusão entre os prolongamentos citoplasmáticos das células de Sertoli e permite assim que as células germinativas permaneçam em um ambiente imunoprivilegiado. A dinâmica dos complexos juncionais (abertura e fechamento) possibilita a migração das células primordiais (espermatócitos) do complexo basal para o adluminal, por meio da barreira hematotesticular conforme descrito por Dadoune & Demoulin (1993) e Amann (1993), assim como o impedimento da passagem de macromoléculas nocivas ao processo espermatogênico.

Conforme relatado por Gilio et al. (2007) recentes estudos relataram que o controle dos níveis de óxido nítrico produzido pelas células de Sertoli está diretamente envolvido na dinâmica das junções celulares da barreira hematotesticular. Vários estudos tem demonstrado que as alterações na dinamica

das junções celulares presentes na barreira hematotesticular de mamíferos podem alterar todo o processo espermatogênico, levando até a degeneração das células germinativas (LEE, 2005), supõe-se portanto que de acordo com o citado por Andrade (2002) a cisplatina atravessa a barreira hematotesticular, uma vez que nesta junção só passam substâncias pouco polares, conforme relatado por (SPINOSA et al., 2002).

Ainda, ao observarmos os túbulos seminíferos dos animais do grupo tratado podemos verificar a presença da célula de Sertoli, no entanto o arranjo das células espermatogênicas que teriam que se distribuir ao longo de todo o parênquima praticamente não existe (figura 28 - B), se compararmos aos túbulos dos animais do grupo controle (figura 26 - J).

Outro fator importante de se encontrar células de Sertoli no parênquima dos animais do grupo tratado, é que elas apresentam receptores para o FSH, que sob sua influência produzem uma proteína ligadora de andrógenos, o ABP, que retêm a testosterona nos túbulos seminíferos.

A platina da cisplatina, e não a própria cisplatina permanece ligada à várias proteínas plasmáticas de acordo com Ogilvie (1996) e Waters & Cooley (1998), portanto afirma-se que ela use a transferrina como proteína carreadora, afirmando o que foi constatado por Dagli et al. (2002) & Sawhney et al. (2005).

Por outro lado, sabemos que a inibina do tipo B atua inibindo o FSH, lembrando que o hormônio folículo estimulante atua nas células dos túbulos seminíferos do testículo sendo responsável pela espermatogênese até o estágio de espermátócito secundário, e regulando assim a produção de espermatozóides, portanto de acordo com Dagli et al. (2002) & Sawhney et al. (2005), os quimioterápicos também poderiam estar atuando de maneira significativa nesta proteína de fundamental importância na endocrinologia reprodutiva.

8. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitem as seguintes conclusões:

1. As análises microscópicas seminais de motilidade e vigor, não contribuíram de forma significativa para predizer se o fármaco cisplatina causa efeitos deletérios no epitélio germinativo testicular, sendo apenas avaliações subjetivas. Já a concentração e o turbilhonamento são parâmetros importantes na detecção de anormalidades na espermatogênese.
2. Os parâmetros de contagem das alterações morfológicas dos espermatozóides de cães hígdos submetidos à administração de cisplatina, em cinco momentos diferentes de tempos demonstraram que o fármaco aumentou o número de patologias no grupo tratado (T).
3. As patologias espermáticas detectadas no presente experimento mostraram a ocorrência de alterações morfofuncionais nos túbulos seminíferos e no conduto epididimário de cães tratados com cisplatina.
4. A ultrasonografia provou ser uma ferramenta diagnóstica bastante precisa em se tratando de quimioterapia com efeito na função gonadal, uma vez que houve nítida redução do estroma testicular dos animais do grupo tratado ao longo do ciclo quimioterápico.
5. A análise ultraestrutural, embora qualitativa, provou os efeitos deletérios no epitélio seminífero de cães do grupo tratado, uma vez que foi constatada pelas eletromicrografias a perda celular e tecidual, ainda provocou alterações morfofuncionais.

6. Foi constatada pela microscopia eletrônica de transmissão, é que na dose em que a cisplatina foi utilizada (70 mg/m²), os efeitos do fármaco sobre o epitélio seminífero são reversíveis, não tornando estes animais estéreis, uma vez que se comprovou a presença de espermatogônias primárias e células de Sertoli.

9. REFERÊNCIAS

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

AGUIAR, P.H.P.; COSTA, M.E.L.T.; ABREU, J.J.; ABREU, C.P. Coleta e avaliação de sêmen canino. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 46, n. 5, p.537-544, 1994.

AMMAN, R.P. Physiology and endocrinology. In: McKINNON, A.O., VOSS, J.L. **Equine reproduction**. Pennsylvania: Lea & Febiger, 1993. Cap. 77, p.658 – 688.

AMANN, R.P. Reproductive physiology and endocrinology of the dog. In: MORROW, D.A. **Current therapy in theriogenology**. 2ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986, p.532-38.

AMANN, R.P. Physiology and endocrinology. In : McKINNON; VOSS, J.L. **Equine reproduction**. Pennsylvania: Lea & Febiger. Cap.77.p.658 – 688, 1993.

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

ARAI T, KITAHARA S, HORIUCHI S, SUMI S, YOSHIDA, Relationship of testicular volume to semen profiles and serum hormone concentrations in infertile Japanese males. **Int J Fertil**1998; 43:40–47.

ARCHBALD, L.F.; WALDON. D.; GELLAT, K. Theriogenology question of the month. **J. Amer. Vet. Med. Assoc.**, v. 210, n.10, p. 1423-1424, 1997.

ARAVINDAKSHAN, J.P. et.al. Pattern of gonadotropin secretion and ultrasonographic evaluation of developmental changes in the testis of early and late maturing bull calves. **Theriogenology**, Stoneham, v.54, p.339-354, 2000.

ATALA, A. **Index terms:** Animals Experimental study Testis, Ultrasound (US), experimental studies8/radiol.2221001385 **Radiology 2002**; 222:114–119.

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.; 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.

BEYER, E.C.; PAUL, D.L. GOODENOUGH, A. Connexin family of gap junction proteins. **J. Membrane Biol.** V.116, p.187 – 194, 1990.

BERNDTSON, W.E. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review.**Journal of Animal Science** 44, (5): 818-83, 1977.

BLANCO-RODRIGUEZ, J., MARTÍNEZ-GARCIA, C. Apoptosis pattern elicited by several apoptogenic agents on the seminiferous epithelium of the adult rat testis. **Journal of Andrology** 19 (4): 487-497, 1998.

BLOTTNER, S. et al. Morphological and functional changes os stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. **Animal reproduction science**, v.65, p. 75 – 87, 2001.

BO, G.; TRÍBULO, R. **Curso de evaluación de toros y control de la calidad seminal**. Cordoba: IRAC, 2001. p. 27-48.

BRITO, L.F.C. et.al. Effects of scrotal insulation on sperm production, semen quality and testicular echotexture in Bos indicus and Bos indicus x Bos Taurus bulls. **Animal Reproduction Science**, v.79, p.1-15, 2003.

BRITO, L.F.C. et.al. Sexual development in early and late maturing Bos indicus and Bos indicus x Bos Taurus crossbred bulls in Brazil. **Theriogenology**, Stoneham, v.62, p.1198-1217, 2004.

BUSSAB, W.O.; MORETTIN, P.A. Estatística básica. 4. ed. São Paulo: Atual,1987.

CARVALHO, C.F. Bases físicas da formação da imagem ultra-sonográfica. In: **Ultrasonografia em pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2004 p. 1-8.

CARTER, A.P.; WOOD, P.D.P.; WRIGHT, P.A.. Association between scrotal circumference, live weight and sperm output in cattle. **Journal Reproduction Fertility**, v.59, p.447-451, 1989.

CASTANHO, P. R. O. L.; GRANDE, M.; KUE, C. M.; FRISTACHI, C. E.; OLIVEIRA, A. B.; BERNARDI, M. A.; BARACAT, F.; PASCALICCHIO, J. C.; 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.

CASTRO, J.H.T. **Avaliação do espermaograma de cães machos hípidos submetidos à administração de cisplatina**. 2007. Dissertação de Mestrado em Cirurgia Veterinária. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal.

CHANDOLIA, R.K. et.al. Assessment of development of the testes and accessory glands by ultrasonography in bull calves and associated endocrine changes. **Theriogenology**, v. 48, p. 119-132, 1997.

CHERRY, S.M. Cisplatin disrupts mammalian spermatogenesis, but does not affect recombination or chromosome segregation. **Mutation Research**. Amsterdam, v.564, n.2, p.115-28, 2004.

CHRISTIANSEN, J. **Reprodução no cão e no gato**. São Paulo: Manole, 1988. 361p.

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.

CVITKOVIC, E.; SPAULDING, J.; BETHUNE, V.; MARTIN, J.; WHITMORE, W. F.; *Cancer* **1977**, 39, 1357.

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.

DADOUNE, J., DEMOULIN, A. Structure and functions of testis. In: THIBAUT, C., LEVASSEUR, M. C., HUNTER, R.H.F. **Reproduction in mammals and man**. Paris: Ellipses, 1993. Cap. 13, p.227 – 255.

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.

DE LENA, M.; LORUSSO, V.; PARADISO, A.; TOMMASI, S.; **Inorg. Chim. Acta** **1987**, 137, 91.

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.

DROST, W.T. Basic ultrasound physics. In: THRALL, D.E. **Textbook of veterinary diagnostic radiology**. 4. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2002, p. 20-27.

EILTS, B.E., WILLIAMS, D.B., MOSER, E.B. Ultrasonic measurement of canine testis. **Theriogenology**, v.40, p.819-28, 1993.

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.

FELDMAN, E.C., NELSON, R.W. Clinical and diagnostic evaluation of the male reproductive tract. In: **Canine and Feline Endocrinology and Reproduction**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996. p.673-90.

FELDMAN, E.C., NELSON, R.W. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. Philadelphia: WB Saunders, 1996. 487p.

FIORENTINO, M. V.; GHIOTTO, C.; **Inorg. Chim. Acta** **1987**, 137, 59.

FOOTE, R. H. Factors influencing the quantity and quality of semen harvested from bulls, rams, boars and stallion. **Journal of Animal Science**, n. 2, 1978.

FONSECA, O.F.; VALE FILHO, V.R.; MIES FILHO, A.; ABREU, J.J. Procedimentos para Exame Andrológico e Avaliação do Sêmen. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 1991. 79p.

FRANÇA, L.R. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. 1991. 185p. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais. (Tese de doutorado).

FRANÇA, L.R. & RUSSELL, L.D. The testis of domestic animals. In: Regadera, J. & Martinez-Garcia (eds.). **Male reproduction**. A multidisciplinary overview. Churchill Livingstone, Madrid, 1998. p.197-219.

GARNER, D.L., HAFEZ, E.S.E. Espermatozóides. In: HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. São Paulo: editora Manole, 1982. Cap.9, p. 187 – 211.

GILIO, J.M.; BORELLA, M.I.; CAMARGO, A.C.M.; SILVA, C.A. A variação dos níveis de óxido nítrico relacionada ao controle da dinâmica dos complexos juncionais no epitélio seminífero de camundongos. **ConScientia Saúde**, 2008;7(1):69-76.

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

GONZALEZ, G. Ecografía del aparato reproductor. In: GOBELLO, C. **Temas de reproducción de caninos y felinos por autores latinoamericanos**. Auspicio Intervet Argentina S.A. , 2004, p. 27 – 42.

GRAHAM, J.K. Assessment of sperm quality. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON STALLION REPRODUCTION, 3., 2001, Fort Collins, Colorado. **Anais...**Fort Collins: Colorado State University, 2001. 88p. p.23.

GRIER, H.J. Chordate testis: The extracellular matrix hypothesis. **J. Exper. Zool.**, v.261, p.151 – 160, 1992.

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.

HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. São Paulo: Manole Ltda. p.3-20, 1995.

HALABE, A.; WONG, N.L.M.; STONN, R.A.L.; Effect of chronic cisplatin administration on phosphate and glucose transport by the renal brush border membrane. **Nephron**, v.57, p.197 – 200, 1991.

HAMM, B.; FOBBE, F. Maturation of the Testis: ultrasound evaluation. **Ultrasound in Medicine and Biology**, Elmsford, v. 21, n. 2, p. 143-147, 1994.

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

HEWITT, D. Fisiology and endocrinology of the male. In: ENGLAND, G.C.W., HARVEY, M. **Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology**. Cheltenham, BSAVA, 1998. p.61.

HENRIKSEN, K. & PARVINEN, M. Stage-specific apoptosis of male germ cells in the rat: mechanisms of cell death studied by supravital squash preparations. **Tissue & Cell** 30 (6): 692-701, 1998.

HIGBY, D. J.; WALLACE, H. G.; HOLLAND, J. F.; **Cancer Chemother. Rep.** 1973, 57, 459.

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.

HUHTANIEMI, I., TOPPARI, J. Endocrine, paracrine and autocrine regulation of testicular steroidogenesis. **Adv Exp Med Biol**, v. 377, p.33 – 54, 1995.

HULEIHEL, M., LUNENFELD, E. Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors. **Asian Journal of Andrology**, v.6, n.3, p. 259 – 268, 2004.

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.

JEDRASZCZYK, J. Ultrasonography technique in bull reproductive organ examination. **Med. Weter.**, Warsaw, v. 59, n. 4, p. 311-314, 2004.

JOHNSTON, S.D., KUSTRITZ, M.V.R., OSLON, P.N.S. Semen collection, evaluation and preservation. In:**Canine and feline theriogenology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001. cap.16, p.287-306.

JOHNSON, L. Spermatogenesis. In: CUPPS, P.T. **Reproduction in domestic animals**. San Diego: Academic Press, Inc., 1991. Cap.5, p. 174 – 220.

JOSHI, N. et al. Deteermination of the ultraestructural pathology of human sperm by atomic force microscopy. **Fertility and Sterelity**, , v. 75, n.5, p.961 – 66, 2001.

KALTENBACH, C.C., DUNN, T.G. Endocrinologia da reprodução. In : HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. São Paulo: editora Manole, 1982. Cap.5, p. 95 – 127.

KASTELIC, J.P. et al. Relationships among scrotal and testicular characteristics, sperm production, and seminal quality in 129 beef bulls. **The Canadian Journal of Veterinary Research**. v.65, p.111-115, 2001.

KIRK, E.S. et al. Comparison of *in vitro* laboratory analyses with the fertility of cryopreserved stallion spermatozoa. **Theriogenology** , v.64, p. 1422 – 1439, 2005.

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.

KRIESE, L.A; BERTRAND, J.K.; BENISHEK L.L. Age adjustment factors, heritabilities and genetic correlations for scrotal circumference and related growth traits in Hereford and Brangus Bulls. **J. Anim. Sci.**, Champaign, v. 69, p. 478-489, 1991.

LANDIM –LVARENGA, F. C.; ALVARENGA, M.A. Microtubular defect in equine spermatozoa associated with infertility. **Equine Veterinary Journal**, v.29, n.6, p. 487 – 489, 1997.

LEE, N.P., MRUK, D.D; WONG, C.H.; CHENG, C.Y. Regulation of Sertoli-germ cell adherens junction dynamics in the testis via the nitric oxide synthase/cyclic guanosine 5´- monophosphate/protein kinase G/(beta)-catenin signaling pathway: an in vivo and in vitro study. **Biol. Reprod.**2005; 73(3):458-71.

LOEHRER, P. J.; EINHOR, L. H.; **Ann. Intern. Med.** 1984, 100, 704.

MAGISTRINI, M. et al. Assessment of sperm quality. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON STALLION REPRODUCTION, 3.,2001, Fort Collins, Colorado. **Anais...**Fort Collins: Colorado State University, 2001. 88p. p.24 - 25.

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.

MARCHESE, S.; PES, D.; SCALONI, A.; CARBONE, V.; PELOSI, P. Lipocalins of boar salivary glands binding odors and pheromones. **European Journal Of Biochemistry**, 1998. V. 252. P.563-568.

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

MIES FILHO, A. Reprodução dos animais e inseminação artificial. 4.ed. Sulina, v. 1, 1977, 359p.

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.

O'DONNELL, L., ROBERTSON, K.M., JONES, M.E., SIMPSON, E.R. Estrogen and spermatogenesis. **Endocr Rev**, v. 22, n.3, p.289 – 318, 2001.

OETTLÉ, E. E.; SOLEY, J.T. Infertility in a malttese 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.

OEHNINGER, S.; ACOSTA, A.A., MORSHEDI, M., VEECK, L., SWANSON, R.J., SIMMONS, K., ROSENWALKS, Z. Corrective measures and pregnancy outcome in in

vitro fertilization in patients with severe sperm morphology abnormalities. **Fertil. Steril.**, v.50, n.2, p. 283 – 7, 1988.

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.

OLAR, T.T., BOWEN, R.A., PICKETT, B.W. Influence of extender, cryopreservative and seminal processing procedures on post-thaw motility of canine spermatozoa. **Theriogenology**, v.31, p.451-61, 1989.

ORTH, J.M., GUNSALUS, G.L., LAMPERTI, A.A. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. **Endocrinology** 122:787-794, 1988.

OZOLS, R. F.; **Seminars in Oncology** 1989, 16, 22.

PALTIEL, H.J.; DIAMOND, D.A.; DI CANZIO, J.; ZURAKOWISK, D.; BORER, J.G.; PAULA, T.A.R. Estudo histológico quantitativo da atividade espermatogênica de cães s.r.d. em diferentes faixas etárias após a puberdade. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. UFMG,1992. 62p. (Dissertação de mestrado).

PATIL, S.B. & SAIDAPUR, S.K. Kinetics of spermatogenesis in the wild squirrel *Funambulus palmarum* (Linnaeus). **Acta Anatomica (Basel)** 141(4):352-363, 1991.

PECHMAN, R.D.; EILTS, B.E. B-mode ultrasonography of the bull testicle. **Theriogenology**, v. 27, n. 2, p. 431-441, 1987.

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

PLOEN, L., COURTNENS, J.L. Comparative aspects of mammalian spermiogenesis. **Scan. Elect. Microsc.**, v.2, p.107 – 120, 1986.

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.

PRESTI J.C., HERR H.W., CARROL, P.R.: Fertility and Testis Câncer. **Urol Clin North Am** 20:1, 1993.

QUAGIO-GRASSIOTO, I., CARVALHO, E.D. The ultrastructure of *Sorubim lima* (Teleostei, Siluriformes, Pimelodidae) spermiogenesis: premeiotic and meiotic periods. **Tiss. Cell.**, v.31, n.6, p.561 – 567, 1999.

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.

ROMAGOSA, E. Mudanças morfológicas (microscopia de luz e eletrônica) das gônadas de pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) durante o ciclo reprodutivo, em condições de confinamento. 177f. Tese – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Rio Claro, 1991.

ROMAGOSA, E.; NARAHARA, M.Y.; BORELLA, M.I.; PARREIRA, S.F.; FENERICH-VERANI, N. Ultrastructure of the germ cells in the testis of matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei, Characidae). **Tiss. Cell.** V.31, n.6, p.540 – 544, 1999.

ROOSEN-RUNGE, E.C. Germinal-cell loss in normal metazoan spermatogenesis. **Journal of Reproduction and Fertility** 35:339-348, 1973.

ROOT, C.R., SPAULDING, K.A. (1994). Diagnostic Imaging in companion animal theriogenology. **Seminars in Veterinary medicine and Surgery: Small Animal**, 9, 7-27.

ROSCOE, W.A.; BARR, K.J.; MHAWI, A.A.; POMERANTZ, D.K.; KIDDER, G.M. Failure of spermatogenesis in mice lacking connexin 43. **Biol. Reprod.** v.5, n.3, p. 829 – 838, 2001.

ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L.; TROSKO, J. E.; MANSOUR, H.V.; **Nature** 1969, 222, 385.

ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L.; **Cancer Res.** 1970, 30, 1799.

ROTA, A.; STRÖM, B.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effects of equex paste on viability of frozen - thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. **Theriogenology**, v.47, p.1093-1101, 1997.

ROSENBERGER, G. Exame Clínico dos Bovinos. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1990. 420p.

RUSSELL, L. D. & GRISWOLD, M. D. The Sertoli cell. (ed.) Cache River Press, Clearwater, Florida. 1993. 801p.

RUSSELL, L.D., REN, H.P., SINHA-HIKIN, I., SCHULZE, W., SINHA-HIKIN, A.P. A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell. **American Journal of Anatomy** 188 (1): 21-30, 1990.

SANTOS, H.S.; CRUZ, W.M.S. A terapia nutricional com vitaminas antioxidantes e o tratamento quimioterápico oncológico. **Revista Brasileira de Cancerologia**. 2001;47(3):303-08.

SCHLATT, S., MEINHARDT, A. AND NIESCHLAG, E., Paracrine regulation of cellular interactions in the testis: factors in search of a function. **European Journal of Endocrinology** 137:107-117, 1997.

SAWHNEY, P. GIAMMONA, J.; MEISTRICH, M.; RICHBURG, J. H. Cisplatin-induced long-term failure of spermatogenesis in adult C57/Bl/6 mice. **Journal of Andrology**, Texas, v.26, n.1, p.136-145, 2005.

SCHULZ, R.W.; MIURA, T. Spermatogenesis and its endocrine regulation. **Fish. Phys. Bioch.** V.26, p.43 – 56, 2002.

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.

SEAGER, S.W.J., PLATZ, C.C. Artificial insemination and frozen semen in the dog. **Vet. Clin. North Amer.**, v. 7, p.757 – 64, 1977.

SELMAN, K.; WALLACE, R.A. Gametogenesis in *Fundulus heteroclitus*. **Am. Zool.**, v.26, p.173 – 192, 1986.

SILVA, A.E.D.F.; DODE, M.A.N. Capacidade reprodutiva do touro de corte: funções, anormalidade e fatores que a influenciam. Campo Grande: Embrapa - CNPGC, 1993. 128p. (EMBRAPA-CNPGC. Documentos, 51).

SHARPE, R.M.. Regulation of spermatogenesis. In. Knobil, E. & Neil, J. D. (eds.) **The physiology of reproduction**, 2ed. Raven Press, New York 1994, p.1363-1434.

SHAHIN, A.A.B. Semicystic spermatogenesis and biflagellate spermatozoon ultrastructure in the Nile electric catfish *Malapterurus electricus* (Teleostei: Siluriformes: Malapteruridae). **Act. Zool. (Stockholm)**. V. 87, p. 215 – 227, 2006.

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

SIMON, S.D.; LEE, R.D.; MULHALL, J.P. Should all infertile males undergo urologic evaluation before assisted reproductive technologies? Two cases of testicular cancer presenting with infertility. **Fertil. Steril.**, Birmingham, v.75, p.1226, 2001.

SINHA-HIKIM, A.P. & SWERDLOFF, R. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. **Reviews of Reproduction** 4:38-47, 1999.

SPINOSA, H. S. GÓRNIAK, 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.

STANBENFELDT, G.H.; EDQUIVIST, L. Processos reprodutivos do macho. In: SWENSON, M.J.; REECE, W.O. **Dukes – fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 1996. Cap.35, p. 603 – 614.

STRUM, S. D.; McDERMED, J. E.; LIPONI, D. F.; **J. Clin. Oncol.** 1985, 3, 245.

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.

TOURY, R.; CLÉROT, J.C.; ANDRÉ, J. Les groupements mitochondriaux des cellules germinales des poissons teleostéens cyprinids. IV Analyses biomique des constituents du "ciment" intermitochondrial isolé. **Biol. Cell.**, v.30, p.225 – 232, 1977.

WALLACE, H. J.; HIGBY, D. J.; Recent Results in Cancer Research:Platinum Coordination Complexes in Cancer Chemotherapy; CONNORS, T. A.; ROBERTS, J. J., Eds.;Springer-Verlag, New York, 1974, p. 167.

WALLACH, E.E.: Fertility and chemotherapy for testicular germ cell cancer. **Fertil Steril** 68:1, 1-5 1997.

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.

WELTZIEN, F.A.; ANDERSSON, E.; ANDERSEN, O.; SHALCHIAN – TABRIZI, K.; NORBERG, B. The brain-pituitary-gonad axis in male teleosts with special emphasis on flatfish (Pleuronectiformes), **Comp. Bioch. And Physiol.** Part A, v.137, p. 447 – 47, 2004.

WILTSHAW, E.; CARR, B.; *Recent Results in Cancer Research Platinum Coordination Complexes in Cancer Chemotherapy*; T. A.; Roberts, J. J., Eds.; Springer-Verlag, New York, 1974, p. 178.

WING, T.Y. & CHRISTENSEN, A.K. Morphometric studies on rat seminiferous tubule. **American Journal of Anatomy** 165:13-25, 1982.

WOODAL, P.F., JOHNSTONE, I.P. Dimensions and allometry of testes, epididymides and spermatozoa in the domestic dog (*Canis familiaris*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v.82, p.603-9, 1988.

YORK, J.P., BADALAMENT R.A.: Fertility issues associated with testicular cancer. **Compr Ther** 19(1): 17-20, 1993.

VALE FILHO, V. R. do. Subfertilidade em touros: Parâmetros para avaliação andrológica e conceituação geral. **Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte: F.E.P.M.V.Z. n.35, p.81-87, ago. 2001a.

VERSTEGEN, J., IGUER-OUAFI, M., ONCLIN, K. Computer assisted sêmen analyzers in **andrology research and veterinary practice**. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY, 2002, Foz do Iguaçu. ,Paraná: Brasil, 2002. p. 149-79.

VIANA, J.H.M., BARRETO FILHO, J.B., ALBUQUERQUER, F.T. Ultra-som: ferramenta para melhorar a eficiência reprodutiva. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

ZAIDEN, S.F. Morfologia gonadal e metabolismo energético da Piraputanga Brycon hilarii (Cuvier e Valenciennes, 1849) (Pisces, Characidae) em cativeiro, durante o ciclo reprodutivo anual. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura – Jaboticabal - SP. 152p., 2000.

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	
Pré quimioterapia	G1	1	6870	14600	14,9	44,6	1040	8	15,71	1,36	7,56	11,64	5,3	1,79	145	3,6
		2	7010	11400	15,8	46,9	1035	8	33,71	1,13	7,95	12,4	3,48	1,75	142	4,6
		3	7480	9600	18,8	54,3	1041	8	97,8	0,91	7,89	9,93	4,47	1,8	145	3,9
		4	6730	15300	15,5	45,7	1025	8	29,55	0,91	7,78	10,3	4,78	1,91	144	3,5
	G2	5	7060	11700	17	47,9	1025	9	26,19	1,41	7,09	10,37	5,71	1,68	146	3,8
		6	4180	10300	12	35,2	1050	7	21,11	1,18	9,86	12	4,14	1,5	146	3,9
		7	4990	3400	11,5	33,1	1032	6,5	21,11	0,81	13,6	10,19	4,43	1,62	144	4
		8	7920	8400	19	54,2	1044	8	46,43	1,13	7,42	12,4	4,47	1,79	141	3,5
M0	T	1	6260	12700	14,2	42	1029	8,5	26,19	1,31	7,33	15,99	5,94	2,4	147	3,7
		2	6620	4500	15,1	44,6	1015	7	41,9	1,58	6,19	14,13	2,25	2,1	142	4,5
		3	7700	4200	18,1	52,3	1013	8	151,9	1,31	8,39	13,59	5,21	2,2	143	4,2
		4	6469	6200	14,8	44,2	1027	7,5	36,67	1,2	7,83	16,42	5,78	2,3	146	3,6
	C	5	6930	11200	16,2	47,7	1039	6	20,95	1,26	7,5	13,92	4,52	2	147	3,7
		6	4410	7300	13	38,4	1041	8	15,71	1,47	9,41	20,87	5,14	1,6	145	3,7
		7	6360	6000	14,9	43,7	1041	8	20,95	0,93	12,1	13,91	5,99	2,2	146	3,8
		8	7620	12200	18,3	53,5	1041	7	31,43	0,87	7,77	12,51	5,23	2	144	3,7
M1	T	1	5780	11800	13,1	38,9	1018	6,5	41,9	1,44	7,34	12,2	6,18	2	135	4,8
		2	6590	8900	15,2	44,2	1009	8	47,4	1,54	9,29	14,65	4,38	18	136	3,7
		3	7170	7300	16,9	48,4	1018	7,5	68,09	0,96	8,42	11,58	4,23	18	140	4,9
		4	6230	8900	14,5	43,4	1019	7	36,67	1,49	8,34	9,69	5,04	2,1	142	5,1
	C	5	6520	9800	15,5	45,4	1031	8,5	47,14	1,22	7,5	9,9	4,21	1,7	176	4
		6	4440	13100	13,2	39,4	1042	8	40,95	1,38	9,76	10,7	5,4	1,8	155	4,1
		7	6590	5700	15,8	46	1030	8	52,33	1,17	11,4	13,23	5,71	1,9	137	3,9
		8	7530	12100	18,2	52,6	1043	8	41,9	1,17	7,42	15,22	5,41	1,8	132	4
M2	T	1	5460	11300	12,4	36,7	1017	8	36,7	1,85	7,57	10,41	6,18	2,1	135	3,9
		2	6050	10900	13,9	40,8	1020	7,5	36,6	1,97	8,55	10,14	6,19	2	136	3,8
		3	6710	5500	16,4	49,9	1020	7,5	78,57	1,85	8,81	10,46	5,64	2	133	4,3
		4	5560	9900	13,5	37	1007	7,5	41,9	1,69	8,25	9,69	5,33	2,4	140	3,7
	C	5	6430	10700	15,6	44,6	1048	6	36,65	1,52	7,87	9,34	7,33	2,5	142	4,2
		6	3770	12500	11,9	23,4	1036	6	31,43	1,18	9,1	17,4	6,11	1,9	134	4,4
		7	5840	6700	14,7	40,8	1045	6	36,77	1,46	10,4	9,79	4,83	1,9	134	4,3
		8	6710	3800	16,8	46,5	1043	6	20,95	1,4	7,4	9,6	6,54	1,8	131	4,3
M3	T	1	5470	1500	12,2	35,5	1016	8	36,68	2,17	7,54	11,51	4,98	2	139	3,7
		2	6320	7500	13,7	41,1	1025	8,5	47,1	1,65	7,46	12,4	3,35	2,1	137	3,7

	3
	4
	5
C	6
	7
	8

Tabela 2A. Valores médios das patologias espermáticas do método de lâmina corada (método de Karras modificado por Papa et al. (1988).

Grupos	Momentos						
	1	2	3	4	5	6	7
Defeito de acrossomo							
T	0,5	2,25	3,25	2	4,71	5,75	14,875
C	0,375	1	3,062	2,375	1	1,375	1,375
Cabeça piriforme							
T	0,125	2,25	0,625	1,125	3	3,875	6,125
C	0,5	1,25	1,8125	2,375	1,375	3,625	3,375
Cabeça subdesenvolvida							
T	0	0,375	0,125	0	0,25	2,25	1,125
C	0,25	0,625	0,375	0,125	0,75	0,375	0,375
Cabeça estreita na base							
T	0	0,125	0,375	0,25	0,25	0,125	0,875
C	0	0,125	0,25	0,5	0	0,375	0,125
Cabeça com contorno anormal							
T	0,25	0,25	1,25	1	0,875	1	5
C	0,75	0,75	0,75	0,5	1,5	0,75	1
"Pouch formation"							
T	0	0	0	0	0,375	0	0
C	0	0	0	0,125	0	0,25	0,25
"Knobbed"							
T	0,00	1,25	0,25	0	0	1,50	1,50
C	0,00	0,25	0	0,25	0,25	0	0,25
GCP							
T	0	0,125	0,375	1	2,5	13	8,375
C	0,625	0,75	0,3125	2,125	3,5	8,875	5,375
Formas teratológicas							
T	0	0	0	0,125	0,125	0,125	0,875
C	0	0	0	0	0,125	0	0,125
PI alterada							
T	0,375	0,375	0	1,25	4,625	12,75	4,375
C	0,125	0,875	1,875	1,5	2	0,75	1,125

CFD

T	1,875	1	2,125	3,125	2,5	8,125	15,25
C	2,625	1,875	2,3125	2,5	3,875	4	1,125
CDG							
T	0,125	0,625	1,125	0,375	0,25	5,25	2,125
C	0,875	1,375	0,825	0,625	0,5	0	0
CEC							
T	0	0	0	0	0,25	2,125	2
C	0	0	0	0	0	0,125	0,125
Formas duplas							
T	0,5	0,25	0	0,25	0,25	1	1
C	0	0,5	0,25	0	1,25	0,25	0
Cauda abaxial							
T	0	0	0,625	0,125	1,25	0,375	1
C	0	0,5	0,375	0,125	0,25	0,125	1,125

Tabela 3A . Valores médios da análise espermática dos cães dos grupos T e C durante os sete momentos avaliados.

Grupos	Momentos						
	1	2	3	4	5	6	7
Motilidade espermática							
T	86,25	88,75	90	90	73,75	76,25	81,25
C	68,75	87,50	81,25	83,75	80	88,75	91,25
Vigor							
T	3,25	4	4	4	3	3	3
C	3,5	4,25	4	3,25	3	3,75	3,75
Concentração espermática							
T	42,80	34,52	46,65	38,17	12,45	10,79	19,10
C	32,17	29,74	39,32	15,23	11,97	23,72	13,71
Turbilhonamento							
T	1,5	1,3	1,75	2,5	1,63	0,25	0,5
C	1,75	2,75	2,88	1,75	1,75	3	3

Tabela 1 – Motilidade espermática (média \pm desvio padrão) dos animais dos grupos tratado e controle nos 5 momentos de colheita e análise do sêmen.

GRUPOS	M0	M1	M2	M3	M4
TRATADO	90,00 ± 4,08	90,00 ± 4,08	73,75 ± 12,5	76,25 ± 7,50	81,25 ± 8,54
CONTROLE	81,25 ± 24,2	83,75 ± 11,0	80,00 ± 8,16	88,75 ± 6,29	91,25 ± 2,50

Tabela 2 – Vigor espermático (média ± desvio padrão) dos animais dos grupos tratado e controle nos 5 momentos de colheita e análise do sêmen.

GRUPOS	M0	M1	M2	M3	M4
TRATADO	4,00 ± 0,82	4,00 ± 0,82	3,00 ± 0,00	3,00 ± 0,82	3,00 ± 0,00
CONTROLE	4,00 ± 1,41	3,25 ± 1,26	3,00 ± 0,82	3,75 ± 0,50	3,75 ± 0,50

Tabela 3 – Concentração espermática ($\times 10^6$) (média ± desvio padrão) dos animais dos grupos tratado e controle nos 5 momentos de colheita e análise do sêmen.

GRUPOS	M0	M1	M2	M3	M4
TRATADO	46,65 ± 25,31	38,17 ± 21,46	12,45 ± 8,57	10,79 ± 5,40	19,10 ± 5,07
CONTROLE	39,30 ± 31,64	15,23 ± 12,58	12,97 ± 13,74	23,72 ± 15,60	13,71 ± 9,56

Tabela 4 – Turbilhonamento (média ± desvio padrão) dos animais dos grupos tratado e controle nos 5 momentos de colheita e análise do sêmen.

GRUPOS	M0	M1	M2	M3	M4
TRATADO	1,75 ± 1,50	2,5 ± 1,00	1,63 ± 1,70	0,25 ± 0,50	0,50 ± 0,58
CONTROLE	2,88 ± 1,31	1,75 ± 0,96	1,75 ± 1,50	3,00 ± 0,82	3,00 ± 0,82

Tabela 5 – Morfologia Espermática – Defeito maior (média ± desvio padrão) dos animais dos grupos tratado e controle nos 5 momentos de colheita e análise do sêmen.

GRUPOS	M0	M1	M2	M3	M4
TRATADO	4,56 ± 2,39	5,12 ± 4,73	10,06 ± 3,19	29,25 ± 34,76	31,06 ± 13,99
CONTROLE	5,90 ± 10,57	6,93 ± 6,60	7,25 ± 8,26	10,37 ± 17,41	7,25 ± 9,59

Tabela 6 – Morfologia Espermática – Defeito menor (média ± desvio padrão) dos animais dos grupos tratado e controle nos 5 momentos de colheita e análise do sêmen.

GRUPOS	M0	M1	M2	M3	M4
TRATADO	2,50 ±0,91	2,62 ± 1,88	4,12 ±3,17	7,12±5,82	3,62±1,65
CONTROLE	3,68 ±5,89	16,37±16,27	7, 5 ± 5,70	5,12±4,04	4,87±3,83

Tabela 7 – Morfologia Espermática – Defeito total (média ± desvio padrão) dos animais dos grupos tratado e controle nos 5 momentos de colheita e análise do sêmen

GRUPOS	M0	M1	M2	M3	M4
TRATADO	11,62 ±3,27	12,87 ± 5,58	24,25 ±3,20	65,6±31,07	65,7±14,42
CONTROLE	15,5 ±10,35	30,25±17,16	22 ± 12,89	25,8±21,32	19,3±13,35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média \pm desvio padrão dos valores de volume testicular direito e esquerdo obtidos em cada momento para os animais do grupo controle e tratado. (TD = testículo direito; TE= testículo esquerdo)76

Tabela 2 – Volume Testicular (média \pm desvio padrão) dos animais dos grupos tratado e controle nos quatro momentos de análise ultrasonográfica (TD = testículo direito; TE= testículo esquerdo)76

Tabela 3 – Média dos valores da escala de cinza obtidos dos testículos em cada momento para os animais do grupo controle e tratado76

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)