UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO

ANÁLISE HISTOLÓGICA TESTICULAR EM TOUROS SUBMETIDOS À BIOPSIA COM AGULHA SEMI-AUTOMÁTICA TRU-CUT

Eudiley Proença

CAMPO GRANDE, MS
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO

Análise histológica testicular em touros submetidos à biopsia com agulha semi-automática Tru-cut

Testicular histological analysis in bulls underwent biopsy with semi-automatic Tru-cut needle

Eudiley Proença

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eurico dos Santos Fernandes

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.
Área de concentração: Saúde Animal.

CAMPO GRANDE, MS
2014

Certificado de aprovação (fornecido pela secretaria)

Dedicatória

Aos integrantes do Laboratório de Patologia Geral do CCBS-UFMS

Ao meu filho Arthur de Albuquerque Proença

Aos meus Pais, Sr. Abel Evaristo Franco Proença e D. Marlene do Espírito SantoProença.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela concessão de sua Divina Luz e em mostrar os melhores os caminhos a serem trilhados;

Ao Professor Dr. Carlos Eurico dos Santos Fernandes, pela paciência na dedicação de ensinar. Muito obrigado!

À Médica Veterinária Adriane L. Zart pela ajuda a campo e confecção das lâminas para avaliação da morfologia espermática;

À Técnica do Laboratório Ketleen Mesquita da Silva pela preciosa colaboração e orientação em todo processo histotécnico.

Ao Médico Veterinário Heliton Franco pelo companheirismo e ajuda nos trabalhos de coleta de dados a campo;

Ao Técnico de Laboratório de Histologia Cláudio Gonçalves Oliveira pelo conhecimento transferido no refinamento dos processos histotécnicos;

À mãe do Arthur, Lenir Cleide de Albuquerque, pelo total apoio e colaboração nos momentos que me fiz ausente como pai.

À Hábil Brangus, em especial ao proprietário Luciano Zamboni, pelo apoio e por ceder os touros do seu plantel, material indispensável para realização desta pesquisa;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Mestrado.

Epígrafe (opcional)

Resumo

PROENÇA, E. Análise histológica testicular em touros submetidos à biopsia com agulha semi-automática Tru-cut. Ano 2014.34f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2014.

A redução da fertilidade em touros ocorre de forma temporária ou definitiva, resultante de diversas alterações clínico-patológicas no aparelho reprodutivo destes animais, principalmente nos testículos. Novas técnicas de diagnóstico necessitam ser estudadas e incorporadas ao exame andrológico para que se identifique e dê um prognóstico para vida reprodutiva desses animais subférteis. Esta subfertilidade, quando inerente aos testículos, está associada na maioria dos casos à degeneração e hipoplasia gonadal e, a diferenciação destas se faz em lâminas histológicas confeccionadas de fragmentos do tecido em questão, obtidos necessariamente por biopsia, quando se quer preservar o órgão no animal. Objetivou-se neste trabalho validar a técnica de biopsia testicular para bovinos de corte, por meio de uma agulha semi-automática do tipo tru-cut, como um diagnóstico complementar, avaliando a capacidade de reparo tecidual do parênquima do testículo em até 60 dias pós-biopsia. Foram utilizados 20 touros Brangus que passaram por um exame andrológico no dia biopsia (dia zero) e outro no dia da orquiectomia: três, sete, 14, 30 e 60 dias pós-biopsia, para coleta de amostra do parênquima junto ao ponto de corte da agulha, para avaliação histopatológica. Na histopatologia foram avaliadas a ausência e/ou a intensidade da presença de hemorragia, edema, infiltrado leucocitário e fibrose, tanto do trajeto quanto do ponto de corte da agulha. O perímetro escrotal (PE) e motilidade espermática não se alteraram durante todo o período experimental. Em torno do 30º dia, vigor e porcentagem de células espermáticas normais retornaram-se ao estado inicial. A alteração macroscópica no final deste estudo se resumiu a uma discreta alteração de coloração no ponto da biopsia e, histologicamente, pela prevalência de tecido de reparação por cicatrização (fibrose) restrita ao ponto da lesão. Este estudo mostrou que a biopsia é um método seguro em bovinos e pode ser útil para avaliação da função testicular, validado aqui pela capacidade de recuperação do tecido após lesão deixada pela técnica.

Palavras-chave: biopsia, testículo, bovino, histopatologia.

Abstract

PROENÇA, E. Testicular histological analysis in bulls underwent biopsy with semi-automatic Tru-cut needle.2014. 10 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2014.

The reduced fertility in bulls takes place on a temporary or permanent way, resulting in several clinical and pathological changes in the reproductive tract of these animals, mainly in the testicles. New diagnostic techniques need to be studied and incorporated into the andrological examination to identify and a prognosis for reproductive life of these subfertile animals. This subfertility, when inherent to the testicles, is associated in most cases gonadal degeneration and hypoplasia, and the differentiation between them is made on histological slides prepared with fragments of tissue in question, necessarily obtained by biopsy. The objective of this study validate the technique of testicular biopsy for beef cattle, by means of a semi-automatic post needle type tru-cut as an additional diagnosis, assessing the ability of tissue repair testicular parenchyma within 60 days biopsy. The 20 Brangus bulls that have passed a breeding soundness examination on biopsy (day zero) and another on the day of orchiectomy were used, three, seven, 14, 30 and 60 days post-biopsy, to collect samples of parenchyma near the cutoff of needle for histopathological evaluation. Histopathology in the absence and / or the intensity of the presence of hemorrhage, edema, leukocyte infiltration and fibrosis, both path as the cutoff point of the needle were evaluated. The scrotal perimetre (SP) and sperm motility did not change throughout the experimental period. Around the 30th day, vigor and percentage of normal sperm cells is returned to its initial state. The macroscopic changes at the end of this study are summarized to a discrete color change point of biopsy and histologically by the prevalence of repair tissue by scarring (fibrosis) restricted to the point of injury. This study showed that the biopsy is a safe method in cattle and can be useful for evaluation of testicular function valid here for the resilience of tissue injury left the technique.

Keywords: biopsy, testicle, bovine, histopathology.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 1
2 REVISÃO DE LITERATURA..... 2
2.1Estrutura testicular..... 2
2.2Espermatogênese..... 3
2.3 Biopsia testicular..... 3
2.4. Reparação Tecidual..... 4
2.4.1Reparo por Cicatrização (fibrose)..... 5
2.4.1.1 Hemostasia..... 5
2.4.1.2 Fase Inflamatória..... 6
2.4.1.3 Formação de Tecido de Granulação com deposição de MEC..... 7
2.4.1.4 Remodelação..... 8
2.5 Reparação de Ferimentos externos..... 9
3 OBJETIVOS 10
3.1. Objetivos Gerais..... 10
3.2. Objetivo Específico..... 10
REFERÊNCIAS..... 11
Análise histológica testicular em touros submetidos à biopsia com agulha semi-automática Tru-cut..... 1
Resumo..... 1
Introdução..... 1
Material e Métodos..... 2
Resultados..... 3
Discussão..... 4
Conclusão..... 5
Referências..... 5

1. INTRODUÇÃO

O Brasil, segundo pesquisa do IBGE divulgada em setembro de 2013, com um rebanho de mais de 212 milhões de bovino, tem o segundo maior rebanho bovino do mundo, ficando atrás somente da Índia (IBGE, 2011). A monta natural é a base do manejo reprodutivo brasileiro, sendo assim, a seleção zootécnica e a avaliação para aptidão reprodutiva de touros jovens ou daqueles mais velhos, que serão mantidos em atividade, tornam-se fundamentais para a obtenção de índices competitivos.

Embora tenha havido avanços nos modelos propostos para melhorar a eficiência dos sistemas produtivos, as taxas de descarte de reprodutores por problemas reprodutivos e baixa qualidade seminal ainda são preocupantes. No Mato Grosso do Sul, esses índices variam entre 15 a 20% em touros Nelore; porém, podem ser superiores a 30% em animais de genótipo cruzado *Bos indicus* x *Bos taurus* (Fernandes et al., 2003; Nogueira et al., 2006; Moraes et al., 1998).

Considerando a fertilidade como uma variável multifatorial, é possível inferir que em muitas situações, o exame andrológico convencional não seja suficiente para diagnosticar e prognosticar alterações na função reprodutiva. Portanto, novas técnicas semiológicas, especialmente de baixo custo, devem ser estudadas e/ou incorporadas à rotina de seleção e avaliação andrológica, buscando identificar mais acuradamente subpopulações de indivíduos potencialmente subférteis, e definir um prognóstico mais verdadeiro. Uma delas é a biopsia testicular, que pode ser feita por diferentes técnicas. Dentre os métodos mais utilizados são a biopsia aberta ou incisional, biopsia por punção com agulhas "Punch", "Split" ou "Tru-Cut" e punção aspirativa com agulha fina, sendo a primeira muito invasiva e a última pouco invasiva, mas com poder de diagnóstico limitado (Sartori, 2002).

Biopsia testicular é uma técnica complementar de exame andrológico útil no diagnóstico de casos de infertilidade ou subfertilidade, além de possibilitar estudos da fisiologia reprodutiva em machos. Mas quando realizada de maneira inadequada, podem ocorrer complicações como hemorragia, hematoma, calcificação, fibrose, inflamação, infecções, reações auto-imunes e degeneração do epitélio germinativo e dos túbulos seminíferos (Sartori, 2002a).

Objetivou-se neste estudo avaliar pela histopatologia a capacidade de recuperação do estroma testicular de bovino de corte após a biopsia por meio de uma agulha semi-automática do tipo Tru-cut 14G, pareada com comportamento clínico reprodutivo durante o período experimental, avaliado por exames andrológicos antes e pós-biopsia.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Estrutura testicular

Os testículos dos bovinos são externos à cavidade abdominal, pendulares (posição vertical), de formato ovalado e, nos adultos, variam entre 250 e 350g cada, dependendo da raça (Constantinescu, 2007).

Ambos os testículos são circundados pela pele (epiderme e derme), túnica muscular dardos, fáscia laminar, túnica vaginal parietal, visceral, túnica albugínea e túnica vascular. A túnica vascular recebe ramos da artéria testicular que se distribuem por todo o tecido e fazem anastomoses com as veias, formando o complexo vascular da túnica albugínea. Veias do tipo I drenam o fluxo sanguíneo parenquimatoso, enquanto as do tipo II drenam o fluxo da própria túnica. Possivelmente, as trocas entre sangue arterial e venoso nessa túnica participem do mecanismo de controle do suprimento sanguíneo e termorregulação testicular (Polguj et al. 2010).

Os túbulos seminíferos são estruturas cilíndricas, compactas, não irrigadas, compostas por diferentes camadas de células germinativas (epitélio germinativo). Nos bovinos e ovinos, os túbulos seminíferos não estão organizados na forma de lóbulos circundados por tecido conjuntivo como característico no cão e no homem. Porém, os capilares sanguíneos e linfáticos juntamente com a matrix extracelular circundam os túbulos seminíferos de forma difusa em todo o órgão. Nestes espaços, localizam-se as células de Leydig, responsáveis pela síntese de esteróides, os fibroblastos, os macrófagos e os mastócitos. Essas estruturas formam o interstício testicular (estroma), subdividido em região intertubular e peritubular (Wrobel et al., 1979; Ahamed, 2005).

Circundando os túbulos seminíferos encontra-se a lâmina ou túnica própria, a qual consiste de uma lâmina basal, circundada por um feixe multilaminar fusiforme interligado às fibras de colágeno e elásticas. As lâminas internas (3 a 5 células) coram-se positivamente para desmina, actina e vimentina, característico dos miofibroblastos. As fibras elásticas aparecem durante a puberdade e favorecem a expansão do volume tubular durante o crescimento gonadal. Sua ausência ou diminuição leva à esclerose tubular, um achado comum nos processos degenerativos ou hipogonadais. Tanto nos ovinos quanto nos bovinos, o estroma testicular compreende aproximadamente 15% do volume testicular total, sendo que deste, os capilares, linfáticos e matriz extracelular compreendem ao redor de 37%. As células de Leydig representam em torno de 7,5% do tecido intersticial e 1% de todo o volume testicular. Morfologicamente, as células de Leydig apresentam-se em grupos, frequentemente associadas

aos capilares sanguíneos, são relativamente grandes, poliédricas, de característica epitelióide, com núcleo esférico, ovóide, centralizado, com um a três nucléolos bem definidos. Grânulos de cromatina podem ser observados distribuidamente na periferia da membrana nuclear (Setchel, 1991; Trainer, 2007).

2.2 Espermatogênese

Espermatogênese é o processo que envolve a transformação das espermatogônias em espermatozóides. Três fases caracterizam esta transformação, a espermatocitogênese, onde ocorre a multiplicação mitótica das espermatogônias $A_{1,}$ resultando em células mais diferenciadas, denominadas A_2, A_3, In, B_1 e B_2. Posteriormente, as espermatogônias do tipo B_2transformam-se em espermatócitos primários e secundários, sofrendo duas divisões meióticas consecutivas. Destas divisões, resulta a formação de células haplóides, chamadas de espermátides. A terceira fase, conhecida por espermiogênese, caracteriza-se pela transformação das espermátides em espermatozóides, e compreende aproximadamente 14 etapas distintas. No touro, as fases de espermatocitogênese, meiose e espermiogênese, duram em média 21, 23 e 17 dias, respectivamente, totalizando 61 dias ((Berndston & Desjardins, 1974; Clermont, 1972; Amann, 1970).

Após essa importante etapa, a cromatina nuclear começa a condensar e torna-se mais cromofílica. Na primeira divisão meiótica (espermatócitos primários) há em torno de 6% de perda celular por degeneração e, na segunda divisão (espermatócitos secundários) a degeneração aumenta para 20%. Essa característica, embora seja fisiológica, está ligada à reorganização da cromatina nuclear e possíveis mecanismos de reparação no DNA (Fawcet, 1970; Russel et al., 1990; Berndston & Desjardins, 1974; Baarends et al., 2001).

2.3. Biopsia testicular

Entende-se por biopsia, a retirada de um fragmento tecidual em um indivíduo vivo. É uma técnica invasiva e de relevância para complementar o diagnóstico em diversas alterações clínicas. No homem, animais domésticos e laboratoriais, a biopsia testicular é conhecida desde a década de 1940, e seu impacto no campo da infertilidade foi imediatamente reconhecido (Cerilli, et al., 2010; Hotchkiss, 1942).

Embora seja considerada de rotina para o estudo da infertilidade no homem, nos bovinos essa técnica tem sido rejeitada dos meios semiológicos devido a possíveis lesões testiculares como hemorragia, inflamação, necrose e reação autoimune. No entanto, o método aberto foi o mais preconizado, onde uma pequena incisão é feita na túnica albugínea com

exposição e retirada de parte da massa parenquimatosa testicular. Por ser grossa, fibrosa e altamente vascularizada, há maior probabilidade de lesões e sequelas, resultando em fibrose e degeneração testicular permanente (Galina, 1971; Roberts, 1986; McEntee, 1990).

Na década de 1950, alguns pesquisadores passaram a usar o método com agulha aspirativa por punção. Nos bovinos, ambos os métodos foram discutidos, embora alguns autores descrevessem pequenas alterações em períodos subsequentes após o seu emprego (Hill & Gassner, 1955). Mais tarde, McDonald & Hudson (1960), verificaram apenas 2% de orquite em touros submetidos à biopsia com agulha aspirativa de 12 G, sendo que a amostra foi considerada suficiente para exame histológico. Heath et al. (2001), usaram agulha de 14 G para obtenção da biopsia testicular e avaliaram os animais até 90 dias após. Houve aumento discreto da temperatura testicular até o 14º dia, e o surgimento de pequenas áreas hiperecóicas à ultrassonografia, porém sem que houvesse lesões importantes com prejuízos significativos na qualidade seminal. Da mesma forma, em ovinos, Sartori et al. (2002a; 2002b) demonstraram que o a biopsia com agulha do tipo tru-cut não induz alterações seminais significativas e nem lesivas no testículo, embora pequenos focos de calcificação podem ocorrer na maioria dos animais.

Portanto, os estudos sugerem que essa técnica embora não seja difundida na andrologia bovina, é promissora no estudo da subfertilidade, podendo ser uma ferramenta importante não apenas para o diagnóstico, mas também para outros tipos de estudos associados à função testicular. Esse método tem sido usado com sucesso para complementar o diagnóstico em situações críticas em outras espécies, tais como equinos (Del Vinto et al., 1992; Leme & Papa, 2010), ovinos para avaliação da puberdade (Lunstra & Eckternkam, 1988), nos cães (Lopate et al, 1989; Cunha, 2009) , em lhamas (Heath et al., 2002), e em felinos (Gouletsou et al, 2012).

2.4. Reparação Tecidual

A habilidade do organismo em substituir células lesionadas ou mortas e reparar tecidos após determinado processo inflamatório é crítica para a sobrevivência. O reparo do tecido danificado por ressecção cirúrgica, ferimentos e diversos tipos de lesão crônica pode ser dividido em dois processos: regeneração e cicatrização. A *regeneração* resulta na restituição dos tecidos perdidos; a *cicatrização* pode restaurar as estruturas originais, porém envolve a deposição de colágeno e a formação de cicatriz (Robbins & Cotran, 2005).

2.4.1. Reparo por Cicatrização (fibrose)

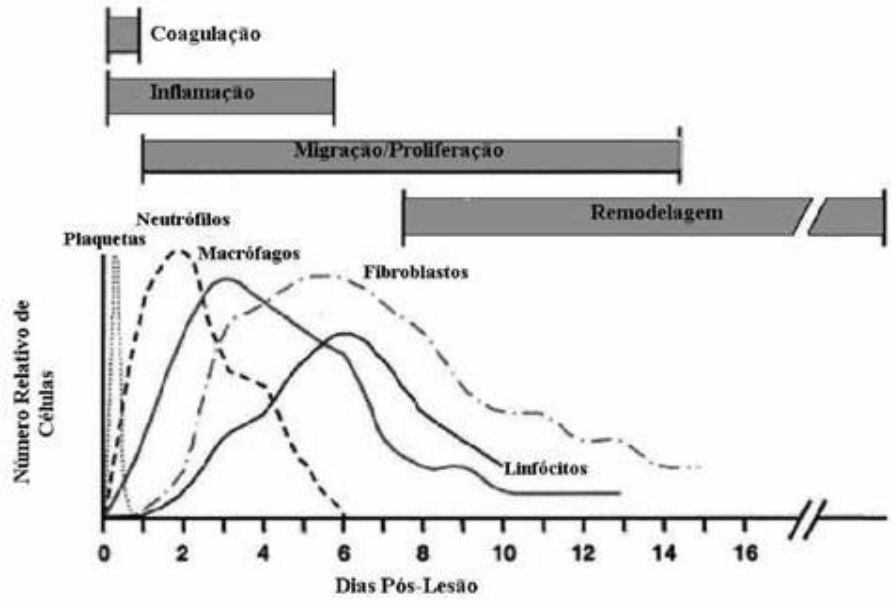
O processo de reparo por cicatrização se inicia quase que imediatamente após o surgimento de uma ferida ou trauma. O tecido passa por quatro fases temporais antes que a cicatrização se complete: hemostasia, inflamação aguda, proliferação (granulação) e remodelação (maturação e contração) (Ackermann, 2009).

2.4.1.1 Hemostasia

Essa fase depende da atividade plaquetária e da cascata de coagulação, tendo início após o surgimento da ferida. Após um dano tecidual, as alterações nas células endoteliais, a ruptura de vasos sanguíneos e o extravasamento de seus constituintes incitam compostos vasoativos a promoverem uma vasoconstrição imediata, visando diminuir a perda sanguínea para o espaço extravascular (Robbins & Coltran, 2005).

Uma cobertura primária composta por fibrina (coágulo) restabelece a hemostase e fornece um ambiente para que as plaquetas secretem fatores de crescimento (FCs), citocinas e elementos da matriz extracelular (MEC). O coágulo formado atua na coaptação das bordas da ferida, minimizando a perda de sangue e fluidos, protegendo o organismo contra penetração de agentes exógenos e disponibilizando uma matriz provisória para o início da organização da

FIGURA 1: Representação esquemática da especificidade celular imunológica correlacionada temporalmente com as fases da cicatrização



Fonte: Mendonça & Coutinho (2009)

ferida. Os mediadores do processo inflamatório recrutam macrófagos e neutrófilos, que secretam diversos fatores específicos, que regem as fases seguintes do processo de reparação tecidual (Oliveira & Dias, 2012).

Após a hemostasia o processo de cicatrização tem sido convenientemente dividido em três fases que se sobrepõem de forma continua e temporal (Figura 1): fase inflamatória, fase proliferativa e fase de remodelagem (Mendonça & Coutinho, 2009).

2.4.1.2 Fase Inflamatória

A fase inflamatória da cicatrização é caracterizada basicamente pela presença de células inflamatórias no tecido cicatricial. Intimamente ligada à fase anterior, a inflamação depende, além de inúmeros mediadores químicos, das células inflamatórias, como leucócitos polimorfonucleares (PMN), macrófagos e linfócitos. O processo inflamatório caracteriza-se por migração celular intensificada através das vênulas e extravasamento de moléculas séricas, anticorpos, complemento e proteínas pelos capilares. Estes eventos são controlados pelo aumento do suprimento sanguíneo e da permeabilidade capilar, além de vasodilatação (Oliveira & Dias, 2012).

Os principais componentes celulares de uma ferida são os leucócitos polimorfonucleares (PMN) e os macrófagos derivados de monócitos, os quais aparecem proporcionalmente à sua quantidade presente na circulação. Inicialmente, o tipo de célula predominante, o PMN, tem vida breve e atua principalmente com função fagocítica, surge durante a injúria tissular e permanece por período que varia de três a cinco dias, sendo responsável pela fagocitose de bactérias. Os macrófagos apresentam capacidade fagocítica, além de atuarem como células apresentadoras de antígenos e fonte de fatores de crescimento e mediadores bioquímicos que ditam e sustentam o processo de cicatrização (Mandelbaum et al., 2003)

O macrófago predomina do terceiro ao quinto dia após a lesão, fagocita bactérias, debrida corpos estranhos e ativa o desenvolvimento de tecido de granulação. Também atua como removedor fagocítico, que sintetiza e libera proteases, fazendo a remoção de colágeno desvitalizado e coágulos de fibrina da ferida, expressando vários fatores mitogênicos e citocinas (Neto, 2003).

O papel dos linfócitos na cicatrização não está bem definido e permanece controverso. Porém, sabe-se que, com suas linfocinas, tem importante influência sobre os macrófagos. Aproximadamente, entre seis a sete dias após a injúria, a quantidade de linfócitos que aparece

na ferida é menor que na circulação. Eles secretam linfocinas importantes, como o fator de inibição da migração (MIF), interleucina-2, fator de ativação de macrófago (MAF) e fatores quimiotáticos, além de aumentar o estágio inicial da cicatrização através da estimulação de macrófagos, células endoteliais e fibroblastos (Oliveira & Dias, 2012).

2.4.1.3 Formação de tecido de granulação com deposição de matriz extracelular

Nesta fase ocorre a reparação do tecido conjuntivo e do epitélio. O tecido conjuntivo torna-se tecido de granulação, com proliferação endotelial e de fibroblastos. Os fibroblastos, células mesenquimais diferenciadas, proliferam na região mais superficial da ferida (fibroplasia). A proliferação de fibroblastos é modulada pelos macrófagos, num complexo modelo contrarregulatório, com uma fase de retardamento, que precede a estimulação direta pelo fator de crescimento derivado do macrófago e interleucina-1 (Oliveira & Dias, 2012).

O fibrinogênio do exsudato inflamatório transforma-se em fibrina, formando uma rede, onde os fibroblastos depositam-se e passam a multiplicar-se e a secretar os componentes protéicos do tecido cicatricial. Os fibroblastos iniciam a síntese e secreção de componentes da matriz extracelular, como glicosaminoglicanos e fibras colágenas tipo I e III, associadas à proliferação e ao crescimento interno dos capilares (angiogênese). Como consequência da angiogênese, o tecido conjuntivo é formado, recebendo a denominação de tecido de granulação, devido a sua aparência granular, pela presença de inúmeros capilares (Robbins e Coltran, 2013).

O tecido de granulação é formado de três a quatro dias após a lesão. Consiste primariamente em vasos sanguíneos neoformados, fibroblastos e seus produtos, como colágeno fibrilar, elastina, fibronectina, glicosaminoglicanas sulfatadas e não sulfatadas e proteases e células inflamatórias. Uma vez restabelecidos o fluxo sanguíneo e a oxigenação, o principal fator desencadeador da angiogênese é reduzido e os vasos neoformados começam a diminuir (Werner, 2011)

A partir deste evento, inicia-se a fase de contração das margens da lesão. Esta ação é realizada pelos fibroblastos ativados, os quais se diferenciam em miofibroblastos. O miofibroblasto é uma célula que está presente no tecido de granulação e confere capacidade contrátil, reduzindo a área de sangramento e facilitando a epitelização. Os miofibroblastos aproximam as margens da ferida, forçando as fibras de colágeno a se sobreporem e se entrelaçarem, fornecendo o fechamento das feridas após as lesões (Paganela, et al., 2009).

Ao final dessa fase ocorre a epitelização, etapa que levará ao fechamento das superfícies da lesão e que é iniciada pela migração de células epiteliais (queratinócitos) desde as margens da ferida. Esta epitelização faz-se pelo aumento de tamanho, divisão e migração das células da camada basal da epiderme sobre a área de reparação do tecido conjuntivo subjacente. Diferentes fatores de crescimento são responsáveis pelo aumento de mitoses e consequente hiperplasia do epitélio (Mandelbaum et al., 2003).

Concomitantemente à migração, as células sofrem alterações fenotípicas específicas, retração dos tonofilamentos intracelulares, dissolução dos desmossomos intercelulares e formação de actina citoplasmática na periferia. Tais alterações liberam as células da membrana basal subjacente e das células epiteliais adjacentes, dando-lhes a capacidade de movimentar-se lateralmente. Tão logo a reepitelização tenha completado toda a superfície da ferida, as células epiteliais revertem-se ao seu fenótipo normal, a membrana basal é reconstituída pelo novo epitélio e hemidesmossomos e desmossomos são rearranjados (Oliveira & Dias, 2012).

2.4.1.4 Remodelação

Nessa fase do processo de cicatrização ocorre uma tentativa de recuperação da estrutura tecidual normal. Configura-se por maturação dos elementos e alterações na matriz extracelular, ocorrendo o depósito de proteoglicanas e colágeno. Em fase mais tardia, os fibroblastos do tecido de granulação transformam-se em miofibroblastos comportando-se como um tecido contrátil responsivo aos agonistas que também estimulam o músculo liso (Mendonça & Coutinho, 2009).

Durante a remodelagem ocorre diminuição da atividade celular e do número de vasos sanguíneos, além de perda do núcleo dos fibroblastos, levando à maturação da cicatriz. O número de células diminui, mas aumenta a síntese e a produção de colágeno do tipo I. As fibras de colágeno, dispostas paralelamente às linhas de tensão, formam feixes de várias unidades, preferencialmente intercruzadas, enquanto as fibras orientadas aleatoriamente são degradadas pela colagenase. O conteúdo aquoso da matriz diminui, aumentando a agregação das fibras de colágeno. Gradativamente os feixes de fibras colágenas tornam-se mais espessos, resultando em uma configuração mais regular, que está diretamente relacionada às forças mecânicas as quais o tecido está sujeito durante a atividade normal. Assim, a lesão torna-se mais resistente após o colágeno ter sofrido maturação. Com a evolução do processo, acentua-se a deposição de colágeno e a maioria das células desaparece, observando-se a

apoptose de fibroblastos e células endoteliais, formando finalmente o tecido cicatricial. (Mendonça & Coutinho, 2009; Oliveira & Dias, 2012).

2.5 Reparação de ferimentos externos

As feridas cutâneas são classicamente descritas para cicatrizar por intenção primária ou secundária. Esta classificação tem como base a natureza da ferida em vez do próprio processo de cicatrização (Robbins & Cotran, 2013).

Define-se como um tecido cicatrizado aquele que tem as estruturas, inicialmente danificadas, completamente reepitelizadas e reparadas com o retorno da homeostase do tecido onde ocorre, sem que haja necessidade de drenagens contínuas ou curativos. De acordo com a extensão de tecido perdido com a injúria, pode-se classificar a cicatrização em dois tipos: por primeira e por segunda intenção (Enoch, 2005).

A *cicatrização por segunda intenção* ocorre quando há uma perda excessiva de células e tecidos, fazendo com que as margens do corte na pele não sejam justapostas em posição apropriada para a cicatrização (Ackermann, 2009).

O exemplo menos complicado de reparação de ferida é a cicatrização de uma incisão cirúrgica limpa e não-infectada, e aproximada, por sutura cirúrgicas. Tal cicatrização é referida como união primária ou *cicatrização por primeira intenção*. A incisão causa morte de um número limitado de células do tecido epitelial e conjuntivo, bem como o rompimento da continuidade da membrana basal epitelial. O espaço incisional estreito se preenche imediatamente com sangue coagulado contendo fibrina e células sanguíneas (Robbins & Cotran, 200; Gantwerker, 2012).

A cicatrização por segunda intenção é a natureza de resolução da ferida resultante da biopsia e, em 24 horas, espera-se que neutrófilos sejam encontrados às margens da ferida ou incisão. De 24 a 48 horas ocorre migração de neutrófilos para o coágulo e iniciam-se as mitoses e migrações de células basais da epiderme. Próximo ao terceiro dia os neutrófilos são amplamente substituídos por macrófagos. O tecido de granulação invade progressivamente o espaço incisional. As fibras colágenas agora estão presentes no bordo da lesão, primeiro elas são orientadas verticalmente e não unem a incisão. Em torno do quinto dia, o tecido de granulação preenche o espaço incisional e a neovascularização está no seu máximo. As fibrilas colágenas tornam-se abundantes e começam unir a incisão. Durante a segunda semana, continua o depósito de colágeno, proliferação de fibroblastos e vasos neoformados desaparecem progressivamente por obstrução e/ou eliminados, iniciando o empalidecimento.

O infiltrado leucocítico, edema e vascularidade aumentados desaparecem por completo. Ao final da quarta semana a cicatriz é feita de um tecido conjuntivo fibroso desprovido de infiltrado inflamatório, e no caso da pele, a epiderme está intacta. A resistência tênsil aumenta desde então e se prolonga por vários meses (Werner, 2011).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos Gerais

- Avaliar o emprego da biopsia testicular com agulha do tipo Tru-Cut em touros de corte;
- Estabelecer o potencial lesivo e a capacidade reparadora testicular pós-biopsia;
- Descrever as variações seminais e histológicas em diferentes períodos pós biopsia;

3.2. Objetivo Específico

- Quantificar as variações histológicas testiculares após a biopsia com agulha semi-automática do tipo Tru-Cut;

REFERÊNCIAS

ACKERMANN, M, R. (2009) Inflamação crônica e cicatrização de feridas. In: McGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. **Bases da Patologia em Veterinária**, 4ª ed, p. 153-174.

AHAMEDE, A.E.(2005) Morphological, glycohistochemical, and immunohistochemical studies on the embryonic and adult bovine testis. **PhD Thesis, Faculty of Veterinary Medicine,** Ludwig-Maximilians-Universität, München, Germany. 229 p.

AMANN R.P. Reproductive capacity of dairly bulls. III. (1962) The effect of ejaculation frequency, unilateral vasectomy and age on spermatogenesis. **The American Journal of Anatomy** 110, 49-78.

BAARENDES, W.M.; VAN DER LAAN, R.; GROOTEGOED, J.A. (2001) DNA repair mechanisms and gametogenesis. **Reproduction**, v. 121, p. 31-39.

BERNDSTON, W.E.; DESJARDINS, C**.**(1974) The cycle of the seminiferous epithelium and spermatogenesis in the bovine testis. **American Journal of Anatomy**, v. 140, p. 167-179.

CERILLI, L.A.; KUANG, W.; ROGERS, D.(2010) A practical approach to testicular biopsy interpretation for male infertility. **Arch. Pathol.** Lab. Med., v. 134, p. 1197-1204.

CLERMONT Y.(1972)Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. **Physiological Review**, v. 52, p.198-236.

COSNTANTINESCO, G.M.(2007) Anatomy of reproductive organs. In.: SCHATTEM, H; CONSTANTINESCO, G.M. **Comparative Reproductive Biology**. BlackwellPublishing, IO, USA. p.33-48.

CUNHA, G.N. **Estudo da viabilidade do uso da punção biopsia aspirativa por agulhas fina comparada ao da tru-cut, em testículos de cães**. 2009. 61f. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal: 607 UNESP, 2009.

DEL VINTO, V.R.; AMANN, R.P.; TROTTER, G.W.; VEERAMACHANENI, D.N.R.; SQUIRE, E.L. (1992). Ultrasonographic and quantitative histologic assessment of sequelae to testicular biopsy in stallion. **Americam Journal of Veterinary Research**, v. 53, p.2094-2101.

ENOCH, S.; LEAPER, D. J.(2005) Basic science of wound healing. **Surgery.** v.23, n.2.

FAWCETT, D.W.(1970) A comparative view of sperm ultrastructure. **Biology of Reproduction**, v. 2, p. 2:90-127.

FERNANDES, C.E.; POMPEO, M.; LEAL, C.(2003). Caracterização do espermograma e aspectos da biometria testicular em touros Brangus (3/8 Zebu). In: **V Congresso Brasileiro de Buiatria**, Salvador, BA. *Anais...* p.78.

GALINA, C.(1971). An evaluation of testicular biopsy in farm animals. **Veterinary Record**, v. 88, p. 628-631.

GANTWERKER, E. A.; HOM, D. B(2012) . Skin: Histology and Physiology of Wound Healing. **Clin Plastic Surg.** v.39, p.85–97.

GOULETSOU, P.G.; GALATOS, A.D.; SIDERI, A.I.; KOSTOULAS, P.(2012) Impact of fine needle aspiration (FNA) and of the number of punctures on the feline testis: clinical, gross anatomy and histological assessment. **Theriogenology** v. 58, p. 1125-1130.

HEATH, A.M.; CARSON,R.L. PUROHIT, R.C.; SARTIN, E.M.; WENZEL, J.G.W.; WOLFE, D.F. (2001) Effects of testicular biopsy in clinically normal bulls. **Journal American Veterinary Medical Association**, v. 220, n. 4, p.507-512.

HEATH, A.M.; PUGH, D.G.; SARTIN, E.A.; NAVARRE, B.; PUROHIT, R.C.(2002) Evaluation of the safety and efficacy of testicular biopsies in IIamas. **Theriogenology**, v. 58, p. 1125-1130

HILL, H.J.; GASSNER, F.X.(1955) Testicular biopsy in the bull. **Fertility and Sterility**, v. 6, p.215-227.

HOTCHKISS R.S.(1942) Testicular biopsy in the treatment of sterility in the male. **BulletinNew York Academy Medical**, v. 18, p.600-605

IBGE (2011) - http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2/bn_2013_v21.pdf Acessoem 30 jan. 2014

LEME, D.P.; PAPA, F.O.(2010) How to perform and interpret testicular fine needle aspiration in stallions. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 30, p. 590-596.

LOPATE, C.; THRELFALL, W.; RUSOL, T.(1989) Histopathology and gross effects of testicular biopsy in the dog. **Theriogenology**, v. 32, p. 585-602.

LUNSTRA, D.D.; ECHTERNKAMP, S.E.(1988) Repetitive testicular biopsy in the ram during pubertal development. **Theriogenology**, v. 29, p.803-810.

MANDELBAUM, S.H., DI SANTIS E.P.; MANDELBAUM M.H.S. (2003). Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte 1. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 78(4), p.393-410.

McDONALD, L.E; HUDSON, R.E.(1960) The 12 gauge Vin-Silverman needle for testicular biopsy in the bull. **American Journal of Veterinay Research**, v. 21, p. 772-774.

McENTEE, K.(1990) **Reproductive pathology of domestic animals**. Academic Press, San Diego, CA. 401 p.

MENDONÇA R.J.; COUTINHO-NETTO, J. 2009. Aspectos celulares da cicatrização. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 84(3), p. 257-262.

MORAES, J.C.F.; HORN, M.M.; ROSADO JR., A.G.(1998) Exame andrológico em touros: qualidade dos indicadores da aptidão reprodutiva em distintos grupos raciais. **Ciência Rural**, v. 28, n. 4, p. 647-652.

NETO J.C.L. Considerações sobre a cicatrização e o tratamento de feridas cutâneas em equinos em 2003. *On line*: **Disponível na internet http://br.merial.com/pdf/arquivo8.pdf**

NOGUEIRA, E.; FERNANDES, C.E.; COSTA E SILVA, E.; SILVA, A.S. Comparação do perfil andrológico de 4443 touros Nelore criados extensivamente no planalto e pantanal sul-matogrossense. In.: **43ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**. João Pessoa, PB. **Anais**...p. 1-4. 1 CD Room. 2006.

OLIVEIRA, I.V.P.M.; DIAS, R.V.C. (2012). Cicatrização de feridas: fases e fatores de influência. **Acta VeterinariaBrasilica**, v.6, n.4, p.267-271

PAGANELA J.C.; RIBAS L.M.; SANTOS C.A.; FEIJÓ L.S.; NOGUEIRA C.E.W.; FERNANDES C.G. (2009). Abordagem clínica de feridas cutâneas em equinos. **RPC**., v. 104(569-572), p.13-18.

POLGUJ, M.; SOPIN, M.; JEDRZEJEWSKI, K.; BOLANOWSKI, W.; TOPOL, M. (2010) Angioarchitecture of the bovinetunicaalbuginea vascular complex – A

corrosiveandhistologicalstudy. **Research in Veterinary Science**. doi:10.1016/j.rvsc.2010.12.002. Article in press: www.elsevier.com/locate/rvsc.

ROBERTS, S.J.(1986) Infertility in male animals. In.: Roberts, S.J. **Veterinary Obstetrics and Genital Disease**. Woodstock, Vt. USA, p. 826-838.

ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S.(2013) Tecido de Renovação e Reparações: Regeneração, Cicatrização e Fibrose. **Patologia - Bases Patógicas das Doenças**, 7ª ed, p. 91-124.

SAMUELSON, D.A. (2007) Sistema Reprodutor Masculino. **Tratado de Histologia Veterinária**,p. 405-420.

SARTORI, R. PRESTES, N.C. CANAVESSI, A.M.O. KEMPINAS, W.G. ROSA, G.J.M. (2002a) Avaliações ultra-sonográficas, macroscópicas e histológica da biopsia testicular em ovinos. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 3, p.233-241.

SARTORI, R.; PRESTES, N.C.; CANAVESSI, A.M.O.; CURI, P.R.; BERGFELT, D.R. (2002b) Testicular biopsy with Tru-Cut needle in conjunction with fibrin adhesive or nylon suture: assessment of post-biopsy testicular function in rams. **Small Ruminant Research**, v.45, p. 25-31.

SETCHEL, B.P.(1991) Male reproductive organs and semen. In.: CUPPS, P.T. **Reproduction in Domestic Animals.**Academic Press Inc., 4 ed. San Diego, CA, USA., p. 221-249.

THOMSON, R.G. , D.A. (1983) Inflamação e Reparação. **PatologiaGeral**, p. 144-250.

TRAINER, T.D.(2007) Testis and Excretory Duct System. In.: MILLS, S.E. **Histology for Pathologists**. Lippincott Williams & Wilkins, 3 ed., PA, USA. p. 943-980.

WERNER, P.R.(2011) Renovação por tecido conjuntivo fibroso. **Patologia Geral Veterinária Aplicada**, 4ª ed, p. 271-292.

WROBEL, K.H.; MADEMANN, R.; SINOWATS, F.(1979) The lamina propria of the bovine seminiferous tubule. **Celland Tissue Research,** v. 202, p. 357-377.

Análise histológica testicular em touros submetidos à biopsia com agulha semi-automática Tru-cut

Eudiley Proença[1*], Carlos E.S. Fernandes[2]

ABSTRACT.- ProençaE. & Fernandes C.E.S. 2014. [**Testicular histological analysis in Bull sunderwent biopsy with semi-automatic Tru-cut needle**] Análise histológica testicular em touros submetidos à biopsia com agulha semi-automática Tru-cut. *Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00.* Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Av. Felinto Muller, 2443, Campo Grande, MS 79070-900, Brazil. E-mail: eudiley@yahoo.com.br

Because testicular biopsy can cause hemorrhage, inflammation, degeneration, fibrosis and adhesion, especially with the open or incisional techniques, this study evaluated the feasibility of a less invasive (needle biopsy Tru-Cut) in cattle in obtaining material for histology and followed the subsequent testicular lesions, as well as semen quality before and after biopsy. Twenty bulls were randomly divided into five groups: Group A, 3 days, group B, 7 days, group C, 14 days, Group D, 30 days, Group E, 60 days post-biopsy. The testes were evaluated macroscopically and microscopically after orchiectomy. The sperm quality, sperm morphology and reproductive clinical examination showed no significant differences ($p < 0.05$) at the time before and after biopsy. Macroscopically, small areas of healing were observed in groups D and E. Histopathology has shown that the bovine testicle was recovered from the 30th day. This study demonstrated the recovery capability of the bovine testicle after biopsy, validating this technique using semi automatic needle Tru-cut, justified by the animal performance during the andrological examination and testicular histopathological evaluation up to 60 days after the biopsy, one safe procedure did not significantly compromise the structural and functional characteristics of the testicles and consequently sperm quality.

INDEX TERMS: Biopsy, testis, bovine, histopathology.

RESUMO.- Devido ao fato da biopsia testicular causar hemorragia, inflamação, degeneração, aderência e fibrose, especialmente com as técnicas incisionais ou abertas, este trabalho avaliou a aplicabilidade de uma técnica menos invasiva (biopsia com agulha Tru-Cut) em bovinos na obtenção de material para histologia e acompanhou as lesões testiculares posteriores, assim como a qualidade seminal antes e pós-biopsia. Vinte touros foram aleatoriamente divididos em cinco grupos conforme o período pós-biopsia: Grupo A, 3 dias; Grupo B, 7 dias; Grupo C, 14 dias; Grupo D, 30 dias; Grupo E, 60 dias pós-biopsia. Os testículos foram avaliados macro e microscopicamente após orquiectomia. A qualidade seminal, morfologia espermática e exame clínico reprodutivo não apresentaram alterações significativas ($p<0,05$) nos momentos antes e pós-biopsia. Ao exame macroscópico, pequenas áreas de cicatrização foram observadas nos grupos D e E, 30 e 60 dias pós biopsia respectivamente. Na histopatologia ficou demonstrado que o testículo se recuperou a partir do 30º dia pós-biopsia, não apresentando processo inflamatório algum e apenas tecido de cicatrização restrito ao ponto da biopsia. O presente trabalho demonstrou a capacidade de recuperação do testículo bovino pós biopsia, validando esta técnica utilizando-se de agulha semi automática do tipo Tru-cut, justificado pelo desempenho animal no exame andrológico e avaliação histopatológica testicular até 60 dias após a biopsia, sendo um procedimento seguro por não ter comprometido significativamente as características estruturais e funcionais dos testículos e, por consequência, a qualidade seminal.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Biopsia, testículo, bovino, histopatologia.

Recebido em .....
Aceito para publicação em .....
[1]Pós-Graduação em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Av. Felinto Muller, 2443, Campo Grande, MS 79070-900, Brasil. *Autor para correspondência: eudiley@yahoo.com.br
[2]Departamento de Patologia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, MS 79070-900, Brasil. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Av. Costa e Silva, s/n, Campo Grande.

INTRODUÇÃO

Considerando a fertilidade como uma variável multifatorial, é possível inferir que em muitas situações, o exame andrológico convencional não seja suficiente para diagnosticar e prognosticar alterações na função reprodutiva. Portanto, técnicas semiológicas adicionais, especialmente de baixo custo, devem ser estudadas e/ou incorporadas à rotina de seleção e avaliação andrológica, buscando identificar mais acuradamente subpopulações de indivíduos potencialmente subférteis, e definir um prognóstico mais conciso. Uma delas é a biopsia testicular.

Nos bovinos, a biopsia testicular é uma técnica de diagnóstico andrológico que ainda tem causado controvérsia. Apesar disto, ela tem sido de grande auxilio na quantificação e diagnóstico de várias afeções testiculares, hipogonadismo, o hipogonadotrofismo, processos inflamatórios e degenerativos e neoplasias (Threlfall & Lopate, 1987). A biopsia testicular tem sido mais investigada em trabalhos experimentais sobre acompanhamento do desenvolvimento testicular e análises histológicas quantitativas (Freneau, 1991). A biopsia testicular em animais domésticos e no homem tem sido utilizada usando de métodos abertos, por punção com aspiração e, agulhas de corte semi-automático.

No método aberto é retirado fragmento do parênquima testicular através de pequena incisão na túnica albugínea. Por ser grossa, fibrosa e altamente vascularizada, há maior probabilidade de lesões e sequelas, resultando em fibrose e degeneração testicular permanente (McEntee, 1990).

Por meio de punção aspirativa em bovinos, Hill & Gassner (1955) descreveram pequenas alterações em períodos subsequentes ao seu emprego. Foi observado também 2% de orquite em touros submetidos à biopsia com agulha aspirativa de 12 G (McDonald & Hudson, 1960). Usando agulha de 14 G e acompanhando por 90 dias pós-biopsia, Heath et al. (2001) verificaram aumento discreto da temperatura testicular até o 14º dia e surgimento de pequenas áreas hiperecóicas à ultrassonografia, mas sem prejuízos significativos na qualidade seminal.

Leme e Papa (2010) fizeram estudos histológicos de testículos de equinos submetidos à punção e aspiração com agulha de 22-23G. Houve recuperação do tecido sem alterações clínicas significativas sobre os mesmos. Mas este método possibilita apenas a mensuração das populações, pois com a perda da arquitetura do parênquima testicular, fica impossibilitada a avaliação da integridade do estroma testicular.

A biopsia com agulha semi-automática do tipo tru-cut não induziu alterações seminais significativas e nem lesivas no testículo de ovinos, apenas pequenos focos de calcificação podem ocorrer na maioria dos animais (Sartori et al. 2002a; 2002b). Em bovinos, esta técnica de biopsia ainda é pouco testada. O objetivo deste trabalho é avaliar a capacidade de recuperação do parênquima testicular pós-biopsia e se a técnica interfere na qualidade seminal de bovinos.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e grupos experimentais

Neste estudo foram utilizados tanto touros aptos quanto inaptos à reprodução, determinado por exame andrológico prévio, sete dias antes do início do período experimental. Para o experimento foram escolhidos aleatoriamente 20 touros da Raça Sintética Brangus (3/8 Nelore, 5/8 Aberdeen Angus), de 24 a 36 meses de idade, localizados em fazenda de criação extensiva de gado de corte no município de Campo Grande MS e mantidos em um único lote. No dia zero (D-0) todos os animais passaram por exame andrológico e logo em seguida foi feita a biopsia no testículo direito. Para avaliação da recuperação do tecido testicular e características seminais, os animais (n=20) foram distribuídos, aleatoriamente, em 5 grupos experimentais conforme o período pós biopsia: Grupo A, 3 dias; Grupo B, 7 dias; Grupo C, 14 dias; Grupo D, 30 dias; Grupo E, 60 dias. Na sequencia do experimento, foram orquiectomizados bilateralmente dentro das datas do seu grupo experimental. Ao término do experimento os animais foram devidamente medicados e retornaram ao seu grupo de manejo da propriedade, sendo os mesmos destinados à engorda.

Exame andrológico, biopsia e histopatologia testicular

Os animais foram submetidos a colheitas de sêmen por eletrojaculação e avaliados os aspectos físicos e morfológicos segundo Blom (1973). Imediatamente após a colheita avaliou-se turbilhonamento (0 a 5), motilidade (0 a 100%) e vigor (1 a 5) em microscopia de campo claro (100x). Foram feitos esfregaços de sêmen a fresco em duplicata de cada touro. Estes foram corados pela reação de Feulgen para avaliação da morfologia espermática, considerando-se o percentual de espermatozóides normais e com defeitos de cabeça, vesículas nucleares, peça intermediária, acrossomo, gota citoplasmática proximal, cauda e cabeça isolada normal, em microscopia de contraste de fase (Olympus BX 45, 1000x).

Para realização da biopsia testicular, após antissepsia do escroto, foi injetada no subcutâneo do testículo direito, porção centro-lateral, 2 a 3ml de Cloridrato de Licocaína 1%. Decorridos cinco minutos para analgesia local, foi feita uma incisão de 2cm longitudinalmente incluindo a pele, túnica dartos e túnica vaginal parietal. A agulha Tru-Cut (BiopsyHandy, BMR Medical, Curitiba, PR) de 14G foi introduzida no parênquima testicular em posição oblíqua, no sentido caudo-cranial e o gatilho acionado a 3cm de profundidade. Após a remoção da agulha, foi feita uma breve compressão digital e coaptação dos bordos com auxílio de cola cirúrgica hemostática a base de N-butil-2-cianoacrilato e metacrilosisolfolano. O fragmento obtido foi fixado em solução de Bouin por 12horas e, em seguida, lavado três vezes com intervalos de 24 horas e mantido em solução de álcool 70ºGL.

Conforme o seu grupo experimental, os touros passaram por um novo exame andrológico e foram orquiectomizados bilateralmente conforme preconizado por Wolf (1986). O testículo contralateral esquerdo foi avaliado apenas macroscopicamente para comparação clínica, e depois desprezado. Do testículo direito foram retirados dois fragmentos de 2cm² acompanhando o trajeto do corte da agulha e fixados em solução de Bouin por 12horas e, em seguida, lavados três vezes com intervalos de 24h e mantidos em solução de álcool 70 0Gl até processamento histotécnico.

Quanto à histologia, os fragmentos de tecidos colhidos da orquiectomia, após os processos de desidratação em álcool, passaram por diafanização por xilol e inclusão em parafina. Em seguida, realizou-se a microtomia, obtendo-se dois cortes de 5µm e corados com HE(hematolixa-eosina). Foram confeccionadas duas lâminas cada uma com dois cortes: um no sentido longitudinal e outro no sentido transversal da lesão deixada pela agulha. A primeira lâmina foi fixada e corada pela hematoxilina-eosina (HE). A segunda por uma coloração tricrômica que cora as fibras colágenas pela cor verde, Tricromo de Gomori (TG). A preparação e leitura do material histológico foram realizadas no Laboratório de Patologia Geral da UFMS.

Os fragmentos obtidos por ambas às colorações foram submetidos à avaliação descritiva observando-se os seguintes parâmetros na área de lesão: hemorragia, edema, infiltrado leucocitário, presença de fibras colágenas (fibrose), mediante microscopia de luz com objetiva de 10x e 40x. Estas alterações foram pontuadas dentro de uma escala de 0 a 3, onde: 0 (zero) caracterizou-se ausência e 1, ligeira presença; 2, presença moderada; 3, severa; adaptado de Sartori (2002), em estudo que mensurou a intensidade de calcificação em testículos ovinos biopsiados.

Análise estatística

Cada grupo (3, 7, 14, 30 e 60 dias pós-biopsia) foi comparado ao seu momento zero (dia da biopsia). As características seminais foram submetidas à análise de variância para medidas repetidas (teste de Friedman) ao nível de significância de $P<0,05$. O teste de Mann-Whitney U foi usado para comparar a intensidade das alterações histológicas (hemorragia, edema, infiltrado e fibrose) entre os períodos (3, 7, 14, 30 e 60 dias pós-biopsia), com nível de significância de $p<0,05$, segundo descrito por Sampaio (2007). Os programas estatísticos SPSS 17.0 e Bioestat 5.0 foram utilizados para as análises.

Todo trabalho desenvolveu-se conforme parecer favorável da CEUA/UFMS, protocolo nº 489/2013.

RESULTADOS

As características seminais avaliadas e o perímetro escrotal dos touros de cada grupo estão apresentados no Quadro 1. O perímetro escrotal e a motilidade espermática não sofreram alterações significativas ($P<0,05$) em todos os grupos estudados. No Grupo A (3 dias) não houve alterações em todos os parâmetros avaliados. Houve diferença significativa ($P<0,05$) no Grupo B (7 dias) para a porcentagem de defeitos maiores e células normais, no Grupo C (14 dias) para os defeitos menores e no Grupo E (60 dias) apenas o vigor. As alterações macroscópicas pós-biopsia nos vários grupos estão ilustradas na Figura 1.

No Grupo A (3 dias pós-biopsia – Figura 1B) luz incisional evidente com coágulo e hemorragia na periferia do bordo da lesão.

Quanto ao Grupo B (7 dias pós-biopsia – Figura 1C) verificou-se coágulo mais enegrecido e ferida incisional com bordos ondulantes consequência de contração, processo esperado na cicatrização.

No Grupo C (14 dias pós-biopsia – Figura 1D) notou-se a oclusão do espaço incisional e leve hemorragia invadindo o parênquima testicular adjacente, sugerida pela cor avermelhada do mesmo.

O Grupo D (30 dias pós-biopsia – Figura 1E) apresentou áreas descoradas no local da lesão, mas com cicatriz evidente.

Finalizando-se no Grupo E (60 dias pós-biopsia – Figura 1F), notou-se uma cicatriz de difícil evidenciação devida sua cor branco-amarelada, muito semelhante ao estroma testicular normal.

As avaliações microscópicas dos esfregaços estão ilustradas na Figura 2, e as diferenças estatísticas entre as variáveis estão representadas na Figura 3. Os parâmetros avaliados: hemorragia, edema, infiltrado leucocitário (macrófagos e neutrófilos, principalmente) e fibrose se fizeram evidentes nos grupos da seguinte forma:

No Grupo A (3 dias pós-biopsia – Figura 1B), espaço incisional bem definido com deposição de fibrina sobre hemorragia, edema, infiltrado predominantemente de macrófagos seguido por neutrófilos e deposição de fibrina sobre o coágulo;

Grupo B (7 dias pós-biopsia – Figura 1C), lesão aberta com presença de resto de coágulo e infiltrado leucocitário, edema diminuído, fibras colágenas nas bordoas em início de contração, definido pelos bordos irregulares da lesão;

Grupo C (14 dias pós-biopsia – Figura 1D), retração total do coágulo e espaço incisional ocluído e preenchido por tecido conjuntivo fibroso;

Grupo D (30 dias pós-biopsia – Figura 1E), ausência total de coágulo e substituição do tecido de granulação por tecido conjuntivo fibroso;

Grupo E (60 dias pós-biopsia – Figura 1F), cicatriz avascular com restos de túbulos degenerados e preenchidos por tecido conjuntivo fibroso.

Houve diferenças estatísticas ($p<0,5$) na avaliação dos escores definidos para a histopatologia entre as variáveis avaliadas (0-3). Hemorragia, entre o sétimo e o 14°dia e entre 30°e 60° dia, tornado-se nula neste último período. Edema permaneceu constante até 14° diminuindo-se significativamente do 30° dia pós-biopsia em diante. Infiltrado leucocitário manteve-se semelhante até o sétimo dia pós-biopsia, havendo diferença estatística entre 14° e o terceiro dia e entre 30° e 60° dia, constituído principalmente de macrófagos ativados. A deposição de fibras colágenas (reparação por fibrose) foi significativamente maior após o sétimo dia pós-biopsia e se manteve constante até o final do experimento.

DISCUSSÃO

A capacidade de recuperação do testículo bovino pós-biopsia foi demonstrada, validando esta técnica pela agulha semi automática do tipo Tru-cut, justificado pelo desempenho animal no exame andrológico e avaliação histopatológica testicular até 60 dias após a biopsia. Foram utilizados tanto touros aptos como inaptos à reprodução, e cada condição de fertilidade não se alterou durante o período experimental, confirmados por exame andrológicos pré e pós-biopsia.

Após uma semana houve acentuado aumento de volume e temperatura do testículo biopsiado em dois touros, um do grupo C (14 dias) e outro do E (60 dias), elevando a circunferência escrotal em até 5cm. Contudo não houve comprometimento da função testicular conforme também observado por Heath et. al. (2012), trabalhando com biopsia testicular em lhamas, verificaram por termógrafo, um aumento significativo da temperatura da parte dorsal do escroto em relação a sua parte ventral, em três dos 16 testículos biopsiados. Na orquiectomia observou-se aderências e hemorragias no sentido intra para extra testicular que se dispersou sobre a túnica albugínea. A elevação do volume escrotal deveu-se principalmente ao edema, que se estendeu entre a túnica vaginal parietal e escrotal, até o plexo, devido lesão de grandes vasos sanguíneos presentes na região vascular da túnica albugínea. Estes animais avaliados isoladamente, não apresentaram nenhuma alteração significativa no espermiograma, exceto a motilidade espermática de um animal do Grupo C (14 dias), que passou de 70% para 10%. Apenas uma área maior de tecido de cicatrização foi observada macroscopicamente, no animal do Grupo E (60 dias).

O perímetro escrotal e motilidade espermática não sofreram alterações significativas em todos os grupos estudados, conforme também encontrado em ovinos biopsiados pela agulha semi-automática do tipo Tru-cut (Sartori 2002) e bovinos pelo método aberto (Freneau, Vale Filho & Cardoso1997).

As alterações significativas na morfologia espermática ocorridas nos grupos de até 14 dias pós-biopsia ficaram dentro dos padrões aceitáveis para que um touro seja considerado apto à reprodução, segundo as os padrões definidos pelo manual Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013). A partir do 14º dia não se verificou alterações significativas na morfologia espermática e demais parâmetros, fato que se correlaciona com o final da fase de granulação passando para a fase de substituição de tecido parenquimal lesado por tecido conjuntivo fibroso (Werner, 2011), evento este que parece ser menos agressivo as áreas vizinhas adjacentes, mantendo a espermatogênese em níveis semelhantes ao encontrado antes da biopsia.

Nas avaliações histológicas verificaram-se todas as fases do processo de reparação tecidual pela deposição de tecido fibroso (fibrose) e os resultados conferiram com as fases de resolução de feridas por primeira intenção (Robbins & Cotran, 2005; Werner, 2011). Nos grupos A, B e C (três, sete e 14 dias pós-biopsia, respectivamente), as respostas individuais dentro dos grupos foram semelhantes, gerando médias com menor desvio padrão.

Na colheita de material para histopatologia dos Grupos D e E (30 e 60 dias pós-biopsia respectivamente), houve dificuldade para se localizar visualmente o ponto exato de lesão para confecção de lâmina histológica e acredita-se ser por dois motivos: variação individual quanto à capacidade de regeneração do parênquima testicular e similaridade de coloração entre o tecido de reposição na sua fase intermediária e o parênquima íntegro.

Os resultados sugerem que um touro submetido à biopsia testicular estará recuperado para a sua atividade reprodutiva a partir de 30 dias pós-exame, pois ficou definido neste prazo que a cicatrização por deposição de tecido conjuntivo fibroso(fibrose) está consolidada, aliada a função testicular que não se alterou durante todo período experimental, definidos pela histopatologia e exames andrológicos pré e pós-biopsia, respectivamente.

A biopsia testicular bovina por meio de agulha semi-automática do tipo Tru-cut, ao nível de campo, é uma técnica rápida e de fácil execução. A incisão da pele é necessária para que possibilite a visualização dos vasos sanguíneos. A coaptação das bordas da pele por cola cirúrgica foi eficiente e acelerou a execução da

técnica e corrobora com os resultados encontrados em ovinos por Sartori (2002), que não encontrou diferença significativa entre animais que tiverem a pele da bolsa escrotal suturada ou coladas.

CONCLUSÃO

Ficou demonstrado que a biopsia testicular com agulha semi-automática do tipo Tru-Cut em bovinos de corte é um procedimento que não compromete as características estruturais e funcionais dos testículos, validados pela histopatologia e exame andrológico, respectivamente.

A recuperação tecidual, do ponto de corte da agulha e do seu trajeto, ocorre por uma cicatrização do tipo primeira intenção, sendo assim, de forma localizada e não se estendendo as áreas adjacentes do estroma testicular.

A chance de danos iatrogênicos ao testículo e possibilidade da introdução de um agente infeccioso merece devida ponderação em função do potencial ganho da informação gerada pela biopsia, assim como o custo financeiro necessário.

Agradecimentos: Os autores agradecem a FUNDECT-MS pelo apoio e suporte financeiro. Processo n° 23/200.725/2012.

REFERÊNCIAS

Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013) Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal, 3º ed. *On line:* http://www.cbra.org.br/portal/index.htm

Freneau, G. E. (2011). Aspectos da morfologia espermática em touros. *Rev. Bras. Reprod. Anim*, *35*(2), 160-170.

Freneau, G. E., Vale Filho, V. R., & Cardoso, F. M. (1997). Biometria testicular pós-castração em touros Nelore submetidos a biopsia testicular aberta. *Rev. Bras. Reprod. Anim. No prelo*.

Heath, A.M.; Carson,R.L. Purohit, R.C.; Sartin, E.M.; Wenzel, J.G.W.; Wolfe, D.F. (2001) Effects of testicular biopsy in clinically normal bulls. *Journal American Veterinary Medical Association*, v. 220, n. 4, p.507-512.

Heath, A.M.; Pugh, D.G.; Sartin, E.A.; Navarre, B.; Purohit, R.C.(2002) Evaluation of the safety and efficacy of testicular biopsies in IIamas. *Theriogenology*, v. 58, p. 1125-1130

Hill, H.J.; Gassner, F.X.(1955) Testicular biopsy in the bull. *Fertility and Sterility*, v. 6,p.215-227.

Leme, D.P.; Papa, F.O.(2010) How to perform ande interpret testicular fine needle aspiration in stallions. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 30, p. 590-596.

Lopate, C., Threlfall, W., &Rusol, T.(1989) Histopathology and gross effects of testicular biopsy in the dog. *Theriogenology*, v. 32, p. 585-602.

McDonald, L.E; Hudson, R.E.(1960) The 12 gauge Vin-Silverman needle for testicular biopsy in the bull. American Journal of Veterinay Research, v. 21, p. 772-774.

McEntee, K.(1990) *Reproductive pathology of domestic animals*. Academic Press, San Diego, CA. 401 p.

Robbins, s.l.; Cotran, R.S.(2005) Tecido de Renovação e Reparações: Regeneração, Cicatrização e Fibrose. Patologia - Bases Patógicas das Doenças*,* 7ª ed, p. 91-124.

Sampaio, I.B.M. (2007). Testes estatísticos não paramétricos. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia - UFMG, 3ª ed, p. 207-221.

Sartori, R., Prestes, N. C., Canavessi, A. M., Kempinas, W. G., & Rosa, G. J. (2002). Avaliaçöesultra-sonográfica, macroscópica e histológica da biopsia testicular em ovinos; Assessment of ultrasonographicimagesandgrossandmicroscopiclesions of the testicular biopsy in sheep. *Arq. bras. med. vet. zootec*, *54*(3), 233-241.

Legenda da Figura 1

Figura 1. Biopsia testicular com agulha semi-automática do tipo Tru-Cut, 14G, em bovinos. A, fragmento retirado pós-biopsia. Aspecto macroscópico testicular pós-biopsia: B, 3 dias = luz incisional com coágulo e hemorraga periférica; C, 7 dias = coágulo e feridas incisional em regressão; D, 14 dias = oclusão de insição e hemorragia de parênquima evidente; E, 30 dias = regressão vascular e cicatrização; F, 60 dias = fibrose de parênquima. Barra=1cm.

Legenda da Figura 2

Figura 2. Fotomicrografia testicular de touros submetidos à biopsia com agulha semi automática do tipo Tru-Cut, 14G. A, aspecto testicular normal (antes da biopsia); B, 3 dias pós-biopsia = espaço incisional com deposição de fibrina e restos de coágulo; C, 7 dias pós-biopsia = início de contração da lesão com presença de resto de coágulo e infiltrado leucocitário evidente; D, 14 dias pós-biopsia = espaço incisionalocluido e sendo preenchido por tecido conjuntivo fibroso; E, 30 dias pós biopsia = finalização da substituição do tecido de granulação por tecido conjuntivo fibroso e F, 60 dias pós biopsia = Cicatriz avascular e empaledecida. Coloração Tricrômica de Gomori.

Legenda da Figura 3

Figura 3. Média e intervalo de confiança (95%) para as diferentes variáveis histopatológicas (edema, hemorragia, infiltrado neutrofílico e fibrose) em touros de corte submetidos à biopsia testicular com agulha semi-automática do tipo Tru-Cut de acordo com os períodos pós-biopsia. Letras distintas entre períodos representam diferenças significativas ($p<0,05$).

Quadro 1. Valores médios (±epm) do perímetro escrotal e características seminais em tourossubmetidos à biopsia testicular por agulha semi-automática do tipo Tru-cut de acordo com o período pós-biopsia

	Período pós-biopsia (dias)				
	3 (n=4)	7 (n=4)	14 (n=4)	30 (n=4)	60 (n=4)
PE(cm)	*34,5 ± 1,18[a] 35,2 ± 1,16[a]	*34,6 ± 1,33[a] 35,5 ± 1,34[a]	*34,2 ± 1,79[a] 35,7 ± 2,46[a]	34,6 ± 1,33[a] 34,8 ± 1,34[a]	*34,7 ± 2,49[a] 35,0 ± 2,71[a]
Motilidade(%)	*70,0 ± 3,16[a] 62,0 ± 6,63[a]	*47,5 ± 14,93[a] 37,5 ± 8,54[a]	*50,0 ± 12,25[a] 45,0 ± 17,56[a]	*67,5 ± 2,50[a] 70,0 ± 4,08[a]	*55,0 ± 11,91[a] 50,0 ± 15,81[a]
Vigor(1-5)	*3,2 ± 0,20[a] 3,0 ± 0,31[a]	*2,7 ± 0,25[a] 2,5 ± 0,64[a]	*3,0 ± 0,57[a] 2,7 ± 0,48[a]	*3,7 ± 0,25[a] 3,2 ± 0,25[a]	*3,2 ± 0,48[a] 2,2 ± 0,48[b]
Def. maiores (%)	*4,4 ± 1,94[a] 1,8 ± 0,72[a]	*15,0 ± 9,17[a] 4,75 ± 1,89[b]	*29,2 ± 10,11[a] 15,0 ± 5,49[a]	*4,5 ± 1,89[a] 1,5 ± 0,29[a]	*3,0 ± 1,35[a] 3,0 ± 2,12[a]
Def. menores (%)	*10,0 ± 0,89[a] 14,0 ± 2,34[a]	*14,4 ± 3,87[a] 10,5 ± 5,04[a]	*20,0 ± 5,49[a] 25,0 ± 5,96[b]	*17,9 ± 4,23[a] 23,7 ± 3,96[a]	*20,0 ± 7,15[a] 23,5 ± 9,18[a]
Normais(%)	*85,80 ± 2,59[a] 83,10 ± 3,10[a]	*71,0 ± 12,19[a] 83,3 ± 6,68[b]	*50,2 ± 13,55[a] 59,5 ± 10,12[a]	*74,0 ± 4,73[a] 76,6 ± 3,46[a]	*75,1 ± 10,05[a] 73,3 ± 11,40[a]

±, erro padrão da média
n, número de animais por período
PE, perímetro escrotal
*, apresenta valores relativos ao momento pré-biopsia (dia zero) em todos os períodos estudados
ab, representa diferença (P<0,05) entre valores obtidos para o mesmo período

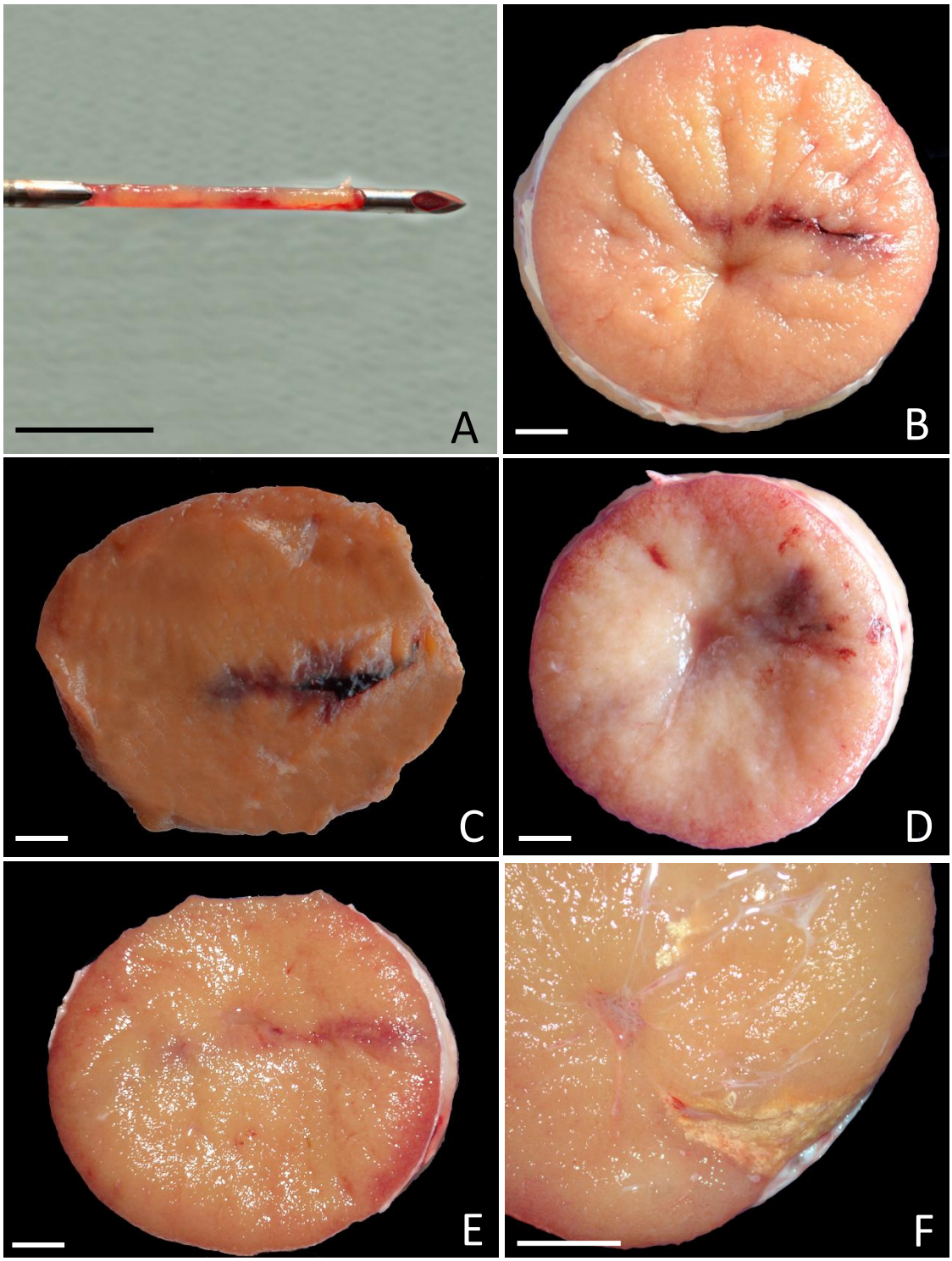


Figura 1.

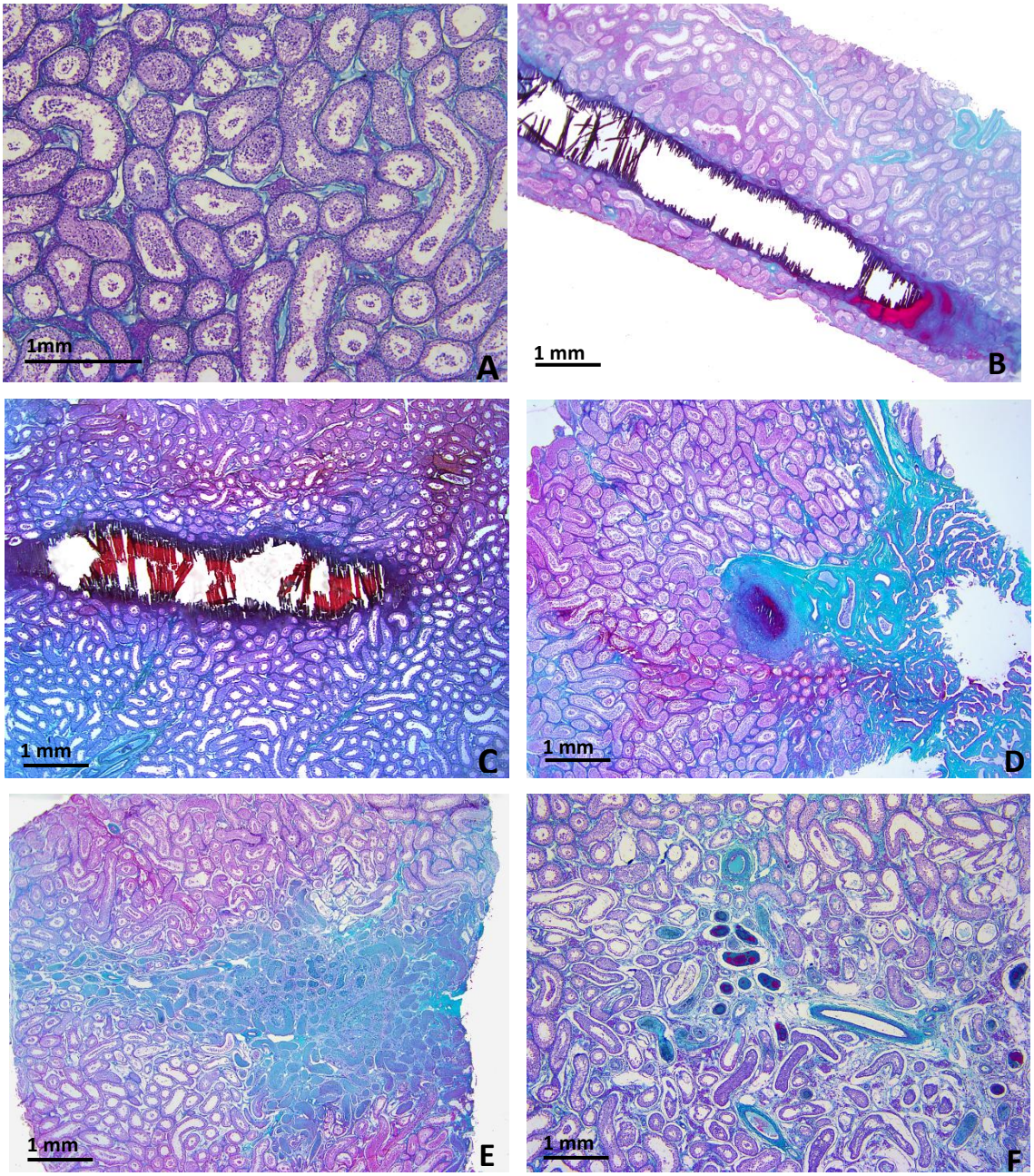


Figura 2.

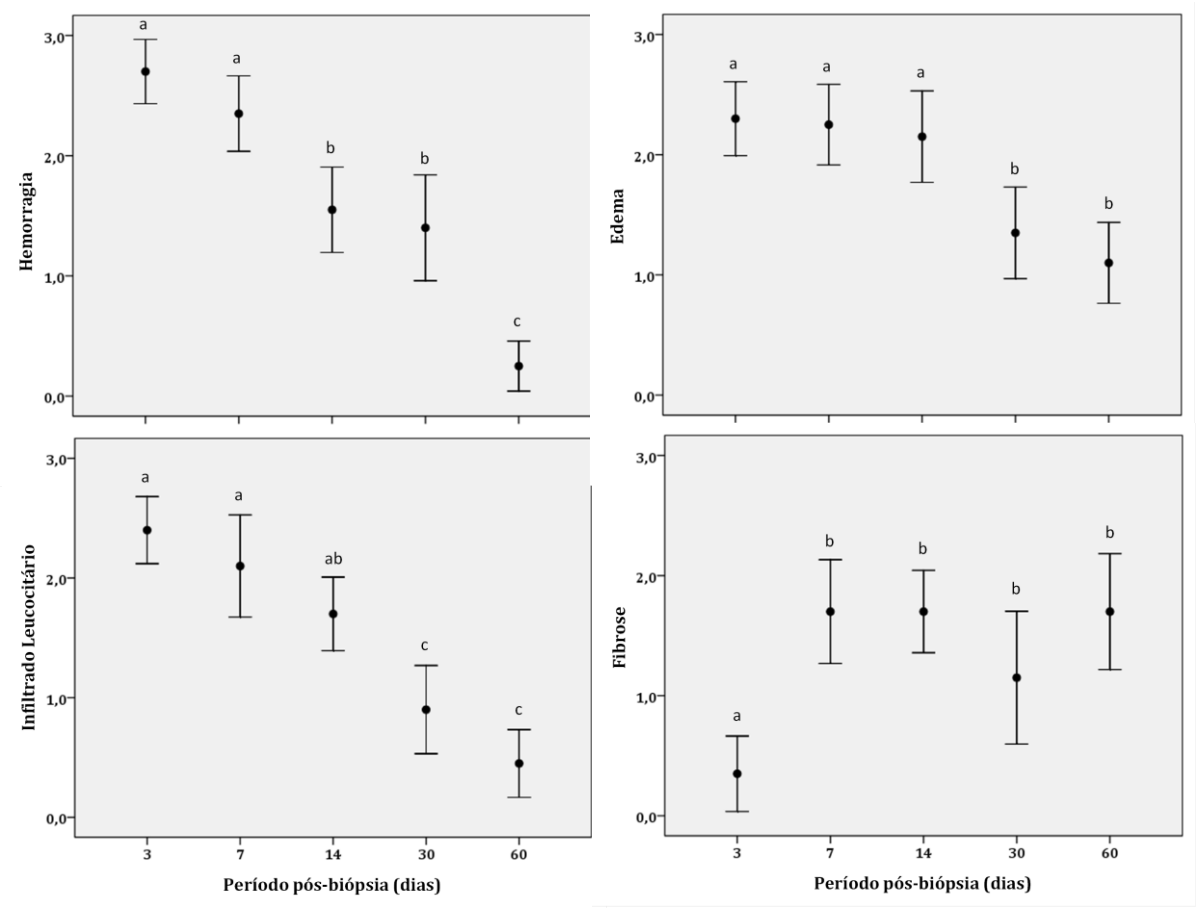

Hemorragia
3,0
2,0
1,0
0,0
a
a
b
b
c
Edema
a
a
a
b
b
Infiltrado Leucocitário
a
a
ab
c
c
Fibrose
a
b
b
b
b
3
7
14
30
60
Período pós-biópsia (dias)
Período pós-biópsia (dias)

Figura 3.

Considerações finais

Em bovinos, as avaliações que se fazem nos laboratórios de patologia, de material de biopsia ou microdissecação, têm-se resumido a descrição de lesões já estabelecidas em animais já descartados da reprodução, em processos litigiosos de compra e venda de touros e em acompanhamento de recuperação de animais em tratamento clínico reprodutivo.

Assim, identificar alterações específicas encontradas em pequeno grupo de touros aparentemente sadios se torna fontes importantes para identificar uma possível subfertilidade. O avanço no conhecimento dos processos patológicos são fundamentais para estabelecer novos parâmetros histopatológicos que possam diagnosticar *in situ* precocemente e com maior precisão de indivíduos subférteis.

A aplicabilidade da técnica de biopsia testicular em bovinos poderá ser uma importante ferramenta a outras áreas do conhecimento, como os grupos de melhoramento genético ou aqueles voltados a estudos específicos sobre a fisiopatologia e endocrinologia da reprodução bovina, desde que observados os custos de realização da mesma.

APÊNDICES (*opcional***)**

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- Objetivo e política editorial
- Apresentação de manuscritos

ISSN 0100-736X ***versión impresa***
ISSN 1678-5150 ***versión online***

Objetivo e política editorial

O objetivo da revista **Pesquisa Veterinária Brasileira** é contribuir, através da publicação dos resultados de pesquisa e sua disseminação, para a manutenção da saúde animal que depende, em grande parte, de conhecimentos sobre as medidas de profilaxia e controle veterinários.

Com periodicidade mensal, a revista publica trabalhos originais e artigos de revisão de pesquisa no campo da patologia veterinária no seu sentido amplo, principalmente sobre doenças de importância econômica e de interesse para a saúde pública.

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através do e-mail <jurgen.dobereiner@terra.com.br>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word. Havendo necessidade (por causa de figuras "pesadas"), podem ser enviados em CD pelo correio, com uma via impressa, ao Dr. Jürgen Döbereiner, Revista PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA, Caixa Postal 74.591, Seropédica, RJ 23890-000. Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista (www.pvb.com.br) e o modelo em Word (PDF no site). Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.

Apesar de não serem aceitas comunicações (*Short communications*) sob forma de "Notas Científicas", não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Trabalhos sobre Anestesiologia e Cirurgia serão recebidos para submissão somente os da área de Animais Selvagens.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (*peer review*).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista (impressa e online) e distribuição via correio é cobrada taxa de publicação (*page charge*) no valor de R$ 120,00 por página editorada e impressa, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

Apresentação de manuscritos

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos**), Agradecimentos e REFERÊNCIAS:**

a) o **Título** do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) **Autor**(**es**) deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo

de 8 autores;

c) o **ABSTRACT** deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de "INDEX TERMS" ou "TERMOS DE INDEXAÇÃO", respectivamente;

d) o **RESUMO** deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a **INTRODUÇÃO** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em **MATERIAL E MÉTODOS** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em **RESULTADOS** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na **DISCUSSÃO** devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as **CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) **Agradecimentos** devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de **REFER◆NCIAS***,* que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do "Style Manual for Biological Journals" (American Institute for Biological Sciences), o "Bibliographic Guide for Editors and Authors" (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

a) os trabalhos devem ser submetidos **seguindo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob "Instruções aos Autores" (www.pvb.com.br).** A digitalização deve ser na fonte **Helvética, corpo 11, entrelinha simples**; a **página** deve ser **no formato A4, com 2cm de margens** (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta "Inserir" do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) **no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails de outros autores;**

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez

no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema "autor e ano"; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de "et al.", mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. **Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, "(Resumo)" ou "(Apud Fulano e o ano.)"; a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez**. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, **não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nemponto-e-vírgula após cada ano**; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exememplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das **REFERÊNCIAS** deverá ser apresentada **isenta do uso de caixa alta**, com os nomes científicos em itálico (grifo), **e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista**, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) **originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica.** Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão "jpg"), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nes**se caso,** cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra "pé". Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos ("slides"). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As **legendas explicativas das Figuras** conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicatívas , com independência do texto) e **serão apresentadas no final do trabalho.**

5. Os **Quadros deverão ser** explicativos por si mesmos e **colocados no final do texto**. Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas**. Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, se possível, com "a" em cada Quadro;** as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.

(cc) BY-NC Todo o conteúdo do periódico, exceto onde está identificado, está licenciado sob uma Licença Creative Commons

Revista Pesquisa Veterinária Brasileira
Caixa Postal 74.591
23890-000, Seropédica
Rio de Janeiro, RJ, Brasil
Tel./fax: +55 (21) 2682-1081

e-Mail
pvb@pvb.com.br