

VIABILIDADE DA PUNÇÃO BIÓPSIAASPIRATIVA POR AGULHA FINA, EM TESTÍCULOS DE CÃES (*Canis familiaris*- LINNAEUS, 1758) COMO MÉTODO AUXILIAR DE DIAGNÓSTICO

Guilherme Nascimento Cunha¹, Marcelo Emilio Beletti², Karine Pena Fayad³, Wilter Ricardo Russiano Vicente⁴

RESUMO

Objetivou-se avaliar a viabilidade do uso de biópsia por punção aspirativa por agulha fina (PAAF) em testículos de cães, como técnica auxiliar na realização de diagnóstico. Foram utilizados 20 cães machos, adultos, hípidos, distribuídos em 4 grupos com 5 animais cada: Ga, Gb, Gc e Gd sendo orquiequitosmizados respectivamente 3, 7, 14 e 62 dias após a biópsia. Submeteu-se o material colhido pela PAAF à avaliação citológica, e o parênquima testicular proveniente da orquiectomia submetido à histopatologia. Foi identificado os seguintes tipos celulares: espermatogônias (4,74%), espermatócitos (5,57%), espermátides (42,10%), espermatozoides (7,00%), células de Sertoli (11,23%) e células não identificadas (5,73%). Na histopatologia a PAAF revelou pequena área de lesão hemorrágica e reação inflamatória com degeneração testicular nos primeiros dias, seguido de cicatrização tecidual aos 62 dias. A amostra direcionada para citologia e histologia, demonstrou ser quantitativa e qualitativa suficiente para o diagnóstico. As alterações histopatológicas encontradas nos diferentes momentos mostraram uma evolução transitória, finalizando com cicatrização e recuperação do parênquima testicular. O uso da biópsia por agulha fina demonstrou ser pouco traumática, sendo pois recomendada em procedimentos de rotina na clínica médica veterinária.

Palavras-chave: punção, biópsia por agulha fina, testículo, cão.

INTRODUÇÃO

A infertilidade no cão pode ser devida a etiologias testiculares ou não. As que não tem origem gonadal podem decorrer de alterações nas

glândulas hipófise e adrenais, obstruções dos ductos deferentes, podendo esta ser congênita, pós-cirúrgica ou inflamatória (JOHNSTON et al., 2001).

A avaliação da fertilidade no homem e nos animais domésticos pode ser realizada por exame clínico, características sexuais secundárias, avaliação seminal, determinação de anticorpos, dosagens hormonais, ultra-sonografia e biópsia testicular (AL-JITAWI et al., 1997; CRAFT et al., 1997; MANSOUR et al., 1999).

Segundo Pianton et al. (1985) uma alternativa a biópsia testicular na investigação das afecções reprodutivas é a biópsia por punção aspirativa com agulha fina (PAAF), porém tem sido pouco utilizada desde sua publicação original por Huhner (1928).

A biópsia aspirativa, considerada como excelente procedimento para diagnóstico de infertilidade no homem, é pouco difundida na prática veterinária (MANSOUR et al.,

1999; ZAHN et al., 1999). Nota-se que as investigações clínicas na infertilidade de machos caninos são limitadas, não sendo possível ao clínico realizar diagnóstico preciso (DAHLBOM et al., 1997).

Mais recentemente a citologia testicular obtida por aspiração tem sido utilizada como método auxiliar no diagnóstico clínico em casos de azoospermia e afecções testiculares em cães (DAHLBOM et al., 1997; LEME; PAPA, 1997), equinos (MANSOUR et al., 1999), lhamas (HEATH et al., 2000) e em onça pintada (PAZ et al., 2003).

O presente estudo visa avaliar como método auxiliar de diagnóstico, em testículos de cães, a biópsia por punção aspirativa com agulha fina (PAAF).

¹ Médico Veterinário. Doutorando. Professor. Centro Universitário de Patos de Minas - UNIPAM, Rua Diógenes de Moraes, 190, Bairro Cazeca, Uberlândia- MG. gncunha@yahoo.com.br.

² Médico Veterinário. Doutor. Professor Associado. Instituto de Ciências Biomédicas(ICB). Universidade Federal de Uberlândia(UFU).

³ Acadêmica. Faculdade de Medicina Veterinária(FAMEV) Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

⁴ Médico Veterinário. Doutor. Professor Titular. UNESP-Campus de Jaboticabal.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 20 cães machos, adultos, da espécie canina, sem predileção por raça, provenientes da Associação de Proteção aos Animais de Uberlândia (APA), sendo considerados hígidos após exames clínico e laboratorial (hemograma, bioquímica e urinálise). Realizaram-se todos os procedimentos (biópsia e orquiectomia) nas dependências do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Distribuíram-se os cães em quatro grupos experimentais, com cinco animais em cada: Ga, Gb, Gc e Gd sendo orquiectomizados respectivamente 3, 7, 14 e 62 dias após a biópsia.

Utilizou-se como medicação pré-anestésica a acepromazina e buprenorfina, por via intramuscular, nas doses de 0,025/Kg e 0,01mg/Kg, respectivamente. Todos os animais foram submetidos à anestesia dissociativa, pela aplicação de 5mg/Kg de tiletamina associado a 5 mg/Kg de zolazepam (Zoletil®50), por via intramuscular.

Manteve-se o testículo entre os dedos indicador e polegar. Foi utilizada agulha (BD, Curitiba-PR) de 22G (0,70X25mm) adaptada a uma seringa (Indústrias Cirúrgicas Ltda, Ourinhos-SP) de 20mL, perfurando a cutis do escroto e demais lâminas até atingir o parênquima testicular. Fez-se a punção no terço médio da borda livre do testículo. A agulha acoplada a seringa foi movimentada cranialmente e caudalmente, com o êmbolo tracionado, promovendo a formação de vácuo, perfazendo cinco punções. Ao final do procedimento fez-se uma pressão digital suave no local da aspiração (ROSENLUND et al., 1998; LEME; PAPA, 1999).

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

Dividiu-se o material aspirado em três lâminas, para microscópio 26x76mm, devidamente

identificadas, e secas à temperatura ambiente. Sendo fixadas e coradas pela técnica de May-Grunwald-Giensa.

As três lâminas foram avaliadas contando-se randomicamente um total de 100 células em cada, utilizando-se para leitura a mesma microscopia de luz na objetiva de 100x. Avaliou-se a presença de hemácias e leucócitos utilizando-se um escore de zero a três cruces, conforme a quantidade presente nas mesmas.

Depois de fixado seguiu-se os processos de desidratação em álcool, diafanização por xilol e inclusão em parafina. Posteriormente, fez-se cortes de 5µm e coloração com HE para avaliação do processo inflamatório.

As lâminas foram submetidas a avaliação descritiva observando-se os seguintes parâmetros: área de lesão, hemorragia, células mononucleares, células polimorfonucleares, destruição mecânica de túbulos seminíferos, presença de fibras colágenas (fibrose) e degeneração testicular. Para tal, utilizou-se microscopia de luz na objetiva de 10x e 40x.

Para a análise estatística aplicou-se o teste paramétrico T de Student e não paramétrico de Kruskal-Wallis para encontrar possíveis diferenças significativas ($p < 0,05$) (FLEMING; HARRINGTON, 1991).

RESULTADOS

A média percentual da contagem de células obtidas na PAAF foi: espermatogônias (4,74%), espermatócitos (5,57%), espermátides (42,10%), espermatozoides (7,00%), Sertolis (11,23%) e células não identificadas (5,73%) (Figura 1). Das 120 lâminas obtidas 51 (42,5%) observou-se a cor vermelho intenso, devido à presença de eritrócitos (contaminação), o que dificultou a avaliação. Não foi possível realizar a leitura em 24 (20%) destas por terem poucas células; 18 (15%) por contaminação e 5 (4,1%) por não estarem coradas.

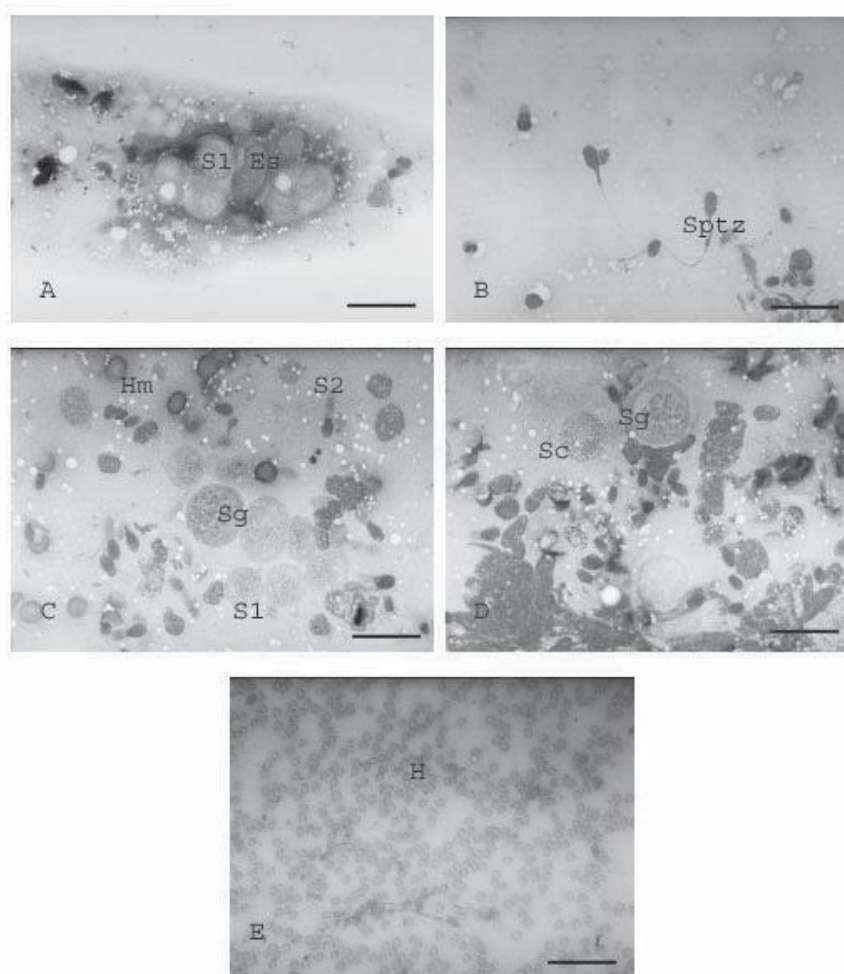


Figura 1. Fotomicrografia de células obtidas por biópsia, com agulha fina (PAAF) em testículos de cães. A- nota-se: espermatócito (Es); espermatíde primária (S1) B- espermatozóide (Sptz) C- espermatogônia (Sg); espermatíde primária (S1); espermatíde secundária (S2); hemácia (Hm) D- espermatogônia (Sg); células de Sertoli (Sc) E- campo repleto de hemácias (A a D - barra corresponde a 30 μ m; E - barra corresponde a 75 μ m).

Após a punção, o material coletado foi dividido em três lâminas. Quando se comparou a quantidade de células encontradas para verificar a homogeneidade da amostra, não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) para os tipos celulares espermatogônias, espermatídes, espermatozóides,

Sertolis e células não identificadas. Já referente aos espermatócitos foi observado diferença ($p < 0,05$) na distribuição do material celular colhido apenas entre a primeira e última lâmina (Tabela 1) e em relação às hemácias e leucócitos não houve diferenças estatísticas ($p > 0,05$).

Tabela 1. Médias e desvios padrão do número de células da linhagem germinativa e de Sertoli obtidas por punção biópsia com agulha fina em testículos de cães, Jaboticabal-SP, 2008.

Células	Lâmina 1	Lâmina 2	Lâmina 3
Espermatogônia	6,14 ± 7,08 ^a	8,15 ± 17,30 ^a	8,99 ± 18,57 ^a
Espermatócito	6,74 ± 1 0,42 ^a	13,45 ± 9,29 ^{a,b}	4,91 ± 9,29 ^b
Espermátide	54,39 ± 14,97 ^a	53,73 ± 19,75 ^a	54,72 ± 17,89 ^a
Espermatozóide	9,08 ± 9,50 ^a	7,64 ± 7,94 ^a	9,98 ± 11,15 ^a
Sertoli	14,43 ± 9,20 ^a	15,93 ± 11,99 ^a	14,34 ± 8,63 ^a
Células não identificadas	8,21 ± 4,84 ^a	7,05 ± 5,34 ^a	7,03 ± 5,94 ^a

Valores seguidos de letras minúsculas diferentes na mesma linha são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Nos achados histológicos do grupo 1, grupo Ga (3 dias pós biópsia) observou-se lesões mecânicas não bem delimitadas provocadas pela introdução da agulha, onde as áreas destruídas e adjacentes mostraram-se hemorrágicas (Figura 2B), com destruição de túbulos seminíferos e li-

beração de células germinativas para o interstício testicular em 70% dos testículos avaliados (Figura 2B). Observou-se infiltrado de células inflamatórias mono e polimorfo nucleares, no local da lesão e adjacente a esta.

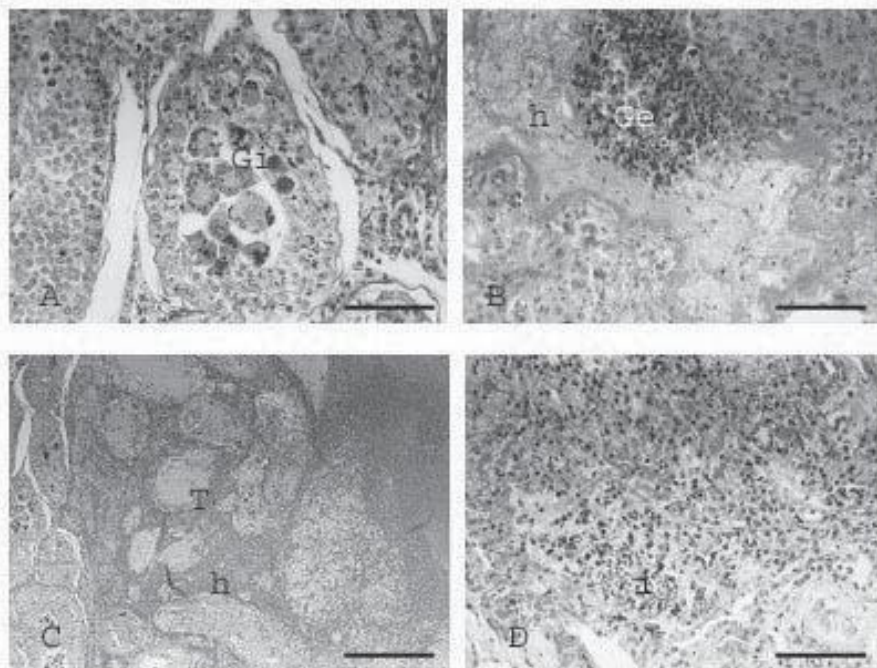


Figura 2. Corte histológico transversal (HE) de testículo de cão coletado no sétimo dias após a biópsia com agulha fina. A - nota-se processo degenerativo testicular por presença de células gigantes multinucleadas no interior dos túbulos seminíferos (Gi), B - presença de células germinativas no interstício (Ge), devido destruição dos túbulos seminíferos com hemorragia (h). C - área hemorrágica (h) com destruição e degeneração dos túbulos seminíferos (T). D - área de infiltrado de células mono e polimorfonucleares (A e B - barra corresponde a 75 μ m). C e D - barra corresponde a 300 μ m).

Já referentes ao grupo Gb (7 dias pós biópsia) notou-se que 30% dos testículos revelaram a presença de fibroblastos na área de lesão, com início de formação de tecido conjuntivo e processo de cicatrização. Observaram-se neste local túbulos seminíferos destruídos (Figura 2C), sendo que 10% dos casos com degeneração testicular (Figura 2A). Já as células germinativas no interstício mostraram-se reduzidas, cerca de 10%, decorrentes do processo de cicatrização e reorganização tecidual. Hemorragia facilmente observada, devido a sua extensão, presente em 50% dos casos; e o infiltrado de células inflamatórias (Figura 2D) manteve-se constante.

No grupo Gc (14 dias pós biópsia) não verificou-se áreas hemorrágicas, e processo de cicatrização, com aumento na quantidade de fibroblastos levando a formação de fibras colágenas (cicatriz), estando este em processo de reorganização. Evidenciou-se ainda, presença de túbulos seminíferos lesionados mecanicamente, mostrando em apenas um caso alterações características de processo degenerativo. Na região da lesão e adjacente a esta registrou-se discreta presença de células germinativas no interstício, bem como de células inflamatórias, ambas em 30% dos casos.

Já o grupo Gd (62 dias pós biópsia) os locais biopsados encontraram-se já cicatrizados com fibras colágenas organizadas, e poucos fibroblastos. Os túbulos seminíferos destruídos remanescentes revelaram alterações de degeneração testicular, em 10% dos testículos avaliados, estando os túbulos envolvidos por fibras colágenas. Notou-se em um caso, área de reabsorção do coágulo com formação de fibrina e fibras colágenas (fibrose), com grande infiltrado de células inflamatórias.

DISCUSSÃO

Referente às células encontradas no aspirado observaram-se espermatogônias, espermátocitos, espermátides, espermatozóides, Sertolis e células não identificadas. Estes resultados mostram similares aos de Gottschalk-Sabag et al. (1993) em humanos, Leme; Papa (1997) em cães e Leme; Papa (1999) em equinos, no entanto estes autores subdividiram os espermátocitos e espermátides em primários e secundários, o que não foi por nós adotado. Conforme Leme; Papa (1997) os espermátocitos secundários são muito difíceis de serem identificados devido à curta duração desta fase celular.

Quanto a morfologia celular as espermatogônias mostraram-se com citoplasmas basófilos e

núcleos acidófilos arredondados. Nos espermátocitos primários observaram-se cordões de cromatina fazendo o contorno do núcleo de forma irregular, porém fortemente corado e acidófilo. Quanto às espermátides observou-se que as iniciais mostraram núcleos e citoplasmas pouco densos sendo estes levemente acidófilos e basófilos respectivamente. Já as espermátides finais apresentaram núcleos fortemente corados e alongados. Os espermatozóides presentes coraram-se em fraco tom roxo, sendo que suas caudas em muitos casos não se apresentaram-se coradas. As células de Sertolis caracterizaram-se com núcleos isolados arredondados com cromatina granular e nucléolo bastante visível. Achados estes similares aos de Gottschalk-Sabag et al. (1993) em humanos, Dahlbom et al. (1997) e Leme; Papa (1999) em cães, Leme; Papa (1999) e Mansour et al. (1999) em garanhões. As células não identificadas no presente estudo referem-se àquelas rompidas durante a produção dos esfregaços, ou devido a aglomerado celular intenso, não sendo possível a diferenciação celular.

Referente à análise quantitativa do esfregaço citológico, este mostrou-se viável por ser possível identificar as linhagens celulares da espermatogênese. Quanto à distribuição celular nas três laminais, os espermátocitos foram o único tipo celular diferente, provavelmente decorrente de uma possível distribuição desigual destas células, bem como de sua identificação, sendo esta dificuldade um dos fatores limitantes ao uso da citologia. De acordo com Foresta et al. (1992), Mansour et al. (1999) e Batra et al. (1999) o aumento do número de células de Sertoli acima de um terço da linhagem espermatogênica está relacionado a síndrome de Sertoli, onde observa-se diminuição das células espermatogênicas. Fato este não constatado na presente investigação, o que se traduz na condição normal de espermiogênese dos animais estudados.

Achados histopatológicos tais como hemorragia local, ruptura de túbulos seminíferos com liberação de células germinativas para o interstício foram observados também por Craft et al. (1997) em humanos imediatamente após a biópsia. Leme; Papa (1999) avaliando garanhões observaram que em 35 dias pós biópsia apenas uma pequena região de lesão com túbulos seminíferos irregulares e desorganizados compatíveis com degeneração, bem como infiltrado de células inflamatórias mononucleares. Já Mansour et al. (1999) encontraram uma semana após o procedimento as mesmas alterações em garanhões, acrescido de fibrose tecidual; também nós encontramos. Uma importante alteração verificada no presente estudo foi que no período de 14 a 62 dias

após a biópsia, observou-se a presença de tecido conjuntivo, que inicialmente estava desorganizado, finalizando em um tecido organizado (cicatriz). Todas essas modificações histopatológicas notadas nos diferentes grupos em momentos diferentes, mostraram uma evolução transitória finalizando em cicatrização e recuperação do parênquima testicular.

CONCLUSÕES

Conclui-se que a biópsia PAAF é uma técnica viável, pouco invasiva, de fácil execução, que fornece material suficiente para análise e diagnóstico de doenças testiculares em cães.

Study of the viability of puncture biopsy by fine needle aspiration in testicles of dogs (*Canis familiaris*- LINNAEUS, 1758) as an auxiliary diagnostic method

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the viability of the use of the biopsies by fine needle aspiration (PAAF) in testicles of dogs as an auxiliary diagnostic method. Twenty healthy adult male dogs were used in this study. They were distributed in 4 groups with 5 animals each (Ga, Gb, Gc e Gd) and orchidectomized at 3, 7, 14 and 62 days after biopsy, respectively. The sample collected by PAAF was submitted to cytological evaluation, and the testicular parenchyma samples from the orchectomy subjected to histopathology. The following cell types were identified: spermatogonia (4.74%), spermatocytes (5.57%), spermatids (42.10%), sperm (7.00%), Sertoli cells (11.23%) and unidentified cells (5.73%). Histopathology PAAF showed small area of hemorrhagic lesion and inflammatory reaction with testicular degeneration in the first days followed by tissue healing at 62 days. The samples obtained by the studied technique for cytology and histology showed to be quantitatively and qualitatively sufficient to diagnostic. The histopathological changes found throughout the case study showed a transient evolution ending with healing and recovery of testicular parenchyma. The use of fine needle biopsy has shown to be less traumatic and is therefore recommended for routine procedures in veterinary medicine.

Keywords: puncture, biopsy by fine needle, testicle, dog.

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

FORESTA, C.; VAROTTO, A.; SCANDELLARI, C. Assessment of testicular cytology by fine aspiration as a diagnostic parameter in the evaluation of the azoospermic subject. *Fertility and Sterility*, Birmingham, v. 57, n. 4, p. 858-865, 1992.

GOTTSCHALK-SABAG, S.; GLICK, T.; BARON, E.; WEISS, D.B. Testicular fine needle aspiration as a diagnostic method. *Fertility and Sterility*, Birmingham, v. 59, p. 1129-1131, 1993.

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

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

JOHNSTON, S.D.; ROOT KUSTRITZ, M.V.; OLSON, P.N.S. Clinical approach to infertility in the

male dog. In: _____. **Canine e feline Theriogenology**. Philadelphia: W.B.Sauders, 2001. p.374-378.

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

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

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

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

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

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

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