

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

**AVALIAÇÃO DA ESPERMATOGÊNESE E DA  
ECOTEXTURA TESTICULAR DO CAVALO PANTANEIRO**

**Marcelo de Souza Varoni**

CAMPO GRANDE, MS  
2014

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

**AVALIAÇÃO DA ESPERMATOGÊNESE E DA  
ECOTEXTURA TESTICULAR DO CAVALO PANTANEIRO**

Evaluation of spermatogenesis and echotexture testicular of the Pantaneirohorse

**Marcelo de Souza Varoni**

**Orientador: Prof. Dr. Deiler Sampaio Costa**

**Co-orientador: Prof. Dr. Fábio José Carvalho Faria**

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

CAMPO GRANDE, MS  
2014

**Marcelo de Souza Varoni**

**Avaliação da Espermatogênese e da Ecotextura Testicular do Cavallo  
Pantaneiro**

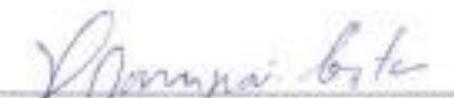
Evaluation spermatogenesis and echotexture testicular of the Pantaneiro horse

Dissertação apresentada à Universidade Federal  
de Mato Grosso do Sul, como requisito à  
obtenção do título de mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Produção Animal

Aprovado (a) em: 06/03/2014

**BANCA EXAMINADORA:**

  
Doutor Deiler Sampaio Costa  
(UFMS/Orientador)

  
Doutor Walvonitis Baes Rodrigues  
(Autônomo)

  
Doutor Paulo Antonio Terrabuio Andreussi  
(UFMS)

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais, Júlio Arantes Varoni e Iara Maria de Souza Varoni,

Ao meu irmão Ricardo de Souza Varoni,

Ao Prof. Dr. Deiler Sampaio Costa,

Ao Prof. Dr. Fábio José Carvalho Faria,

Muito obrigado.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Deiler Sampaio Costa, pela oportunidade concedida de fazer parte do programa de pós-graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

Ao Prof. Dr. Fábio José Carvalho, pela co-orientação e apoio no desenvolvimento dos trabalhos.

A toda equipe do Laboratório de Reprodução Assistida pelo apoio na realização deste trabalho e pelos bons momentos de lazer.

Ao Médico Veterinário Dr. Walvonvitis Baes Rodrigues pelas sugestões e correções atribuídas a este trabalho e, sobretudo pela disponibilidade de participar desta banca.

Ao Prof. Dr. Fernando de Almeida Borges pela disponibilidade em participar desta banca e pelas sugestões e correções.

Ao Zootecnista Msc. Eduardo de Souza Leal pelo apoio incondicional durante o mestrado.

Ao Prof. Dr. Paulo Antonio Terrabuio pelas sugestões e correções deste trabalho.

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO

Tabela 1. Biometria testicular, morfometria das gônadas de 22 garanhões Pantaneiros.....	41
Tabela 2. População celular por secção transversal de túbulo seminífero (Células de Sertoli, espermatogônias A (A), espermatócitos primários em pré-leptoteno/leptóteno (PL/L), espermatócitos primários em paquíteno (PQ) e espermátides arredondadas (Ar)) no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero, devidamente corrigidos.....	42
Tabela 3. Razões entre os números corrigidos da população celular do estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero e percentis de perdas celulares da espermatogênese em garanhões da raça Pantaneira.....	44
Tabela 4. Índices de células de Sertoli (CS), mensurado através das razões entre os cinco tipos celulares do estágio 1 e o número de células de Sertoli, devidamente corrigidos em garanhões da raça Pantaneira.....	44
Tabela 5. Número total de células de Sertoli e por grama de parênquima testicular, produção espermática diária total e por grama de testículo de cavalos da raça Pantaneira.....	45
Tabela 6. Médias de intensidade média de pixels (IP) dos testículos direito (TD) e esquerdo (TE) das 3 regiões pré-determinadas nas respectivas áreas representativas de 22 cavalos da raça Pantaneira.....	46
Tabela 7. Médias e desvios padrões em pixels das imagens ultrassonográficas de 3 amostras das respectivas áreas representativas em pontos diferentes do parênquima testicular de 22 garanhões da raça Pantaneira, analisadas com o software “Image J 1.34” (Rasband, 2005).....	46

## RESUMO

Varoni, M.S. Avaliação da Espermatogênese e da Ecotextura testicular do cavalo Pantaneiro. 2014. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2014.

Objetivou-se com este trabalho desenvolver um método indireto de avaliação da espermatogênese através da ultrassonografia testicular aliada às análises de intensidade pixels das imagens. Para tanto, imagens ultrassonográficas dos testículos direito e esquerdo foram digitalizadas e avaliadas com o auxílio do programa “Image J 1.34” (Rasband, 2005) em intensidade pixels em uma escala de 0 (preto) a 255 (branco). A homogeneidade do parênquima testicular foi avaliada através de quadrados representativos de 400 mm<sup>2</sup>, 1600 mm<sup>2</sup> e 3600 mm<sup>2</sup> nas regiões *captada*, *media* e *caudatado*, parênquima testicular dos testículos esquerdo e direito. A espermatogênese foi avaliada para as correlações com as análises de intensidade pixel, através de técnicas histomorfométricas. O cavalo da raça Pantaneira demonstrou o maior índice de células de Sertoli das raças brasileiras de cavalos. A intensidade de pixels demonstrou correlação apenas ( $r=0,4$ ) com a proporção de lúmen tubular e com a população de espermatogônias do tipo A ( $r=-0,5$ ). Com os outros parâmetros da espermatogênese não houve correlação ( $p>0,05$ ). A espermatogênese não pode ser avaliada através de técnicas indiretas.

Palavras-chave: Células de Sertoli, Intensidade Pixels, Túbulo Seminífero, Ultrassonografia.

## ABSTRACT

Varoni, M.S. Evaluation Spermatogenesis and Echotexture testicular of the Pantaneiro horse. 2014. Dissertação (Mestrado) – Veterinary Medicine and Animal Science College, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2014.

The aim of this study was to develop an indirect method of evaluation of spermatogenesis by testicular ultrasonography combined with the intensity pixels analysis of the images. For both, ultrasound images of the right and left testes were obtained and digitized and analyzed with the support of the "Image J 1.34" program (Rasband, 2005) in pixels intensity on a scale from 0 (black) to 255 (white). The homogeneity of parenchyma testicular was evaluated through representative square 400 mm<sup>2</sup>, 1600 mm<sup>2</sup> and 3600 mm<sup>2</sup> regions *captada*, *media* and *caudate* parenchyma testicular of the left and right testes. The spermatogenesis was only assessed for correlations with the analysis of pixel intensity through histomorphometric techniques. The Pantaneiro breed Horse demonstrated the major Sertoli cell index until then reported to Brazilian horse breeds. The intensity of pixels shown only correlation ( $r=0.4$ ) with the ratio of tubular lumen and a population with type A spermatogonia ( $r=-0.5$ ). The spermatogenesis cannot be assessed by indirect techniques.

Keywords: Sertoli cells, Intensity Pixels, Seminiferous tubule, Ultrasonography.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	11
1. Origem do Cavalo Pantaneiro .....	12
1.1. Espermatogênese.....	16
1.2. Ciclo do epitélio seminífero .....	18
1.3. Testículo e seus componentes celulares.....	20
1.4. Células de Sertoli e a barreira hematotesticular .....	21
1.5. Onda do epitélio seminífero .....	22
1.6. Apoptose .....	22
1.7. Eficiência da espermatogênese .....	22
1.8. Ultrassonografia na medicina veterinária .....	23
1.8.1. Análise de intensidade pixels.....	25
REFERÊNCIAS.....	27
2. ARTIGO: Avaliação da espermatogênese e da ecotextura testicular do cavaloPantaneiro.....	32
2.1. INTRODUÇÃO .....	33
2.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	35
2.2.1. Animais, colheita dos testículos e biometria testicular .....	35
2.2.2. Ultrassonografia testicular .....	35
2.2.3. Processamento histológico.....	36
2.2.4. Proporção volumétrica .....	36
2.2.5. Diâmetro dos túbulos seminíferos, altura do epitélio seminífero e área de secção transversal .....	36
2.2.6. Comprimento tubular total e por grama de parênquima testicular.....	37
2.2.7. Mensuração da população celular .....	37
2.2.8. Rendimento intrínseco da espermatogênese e perdas celulares.....	38
2.2.9. Índice de células de Sertoli, número total de células de Sertoli e por grama de parênquima testicular .....	38
2.2.10. Produção espermática diária total e por grama de parênquima testicular.....	39
2.2.10. Análise estatística.....	39
2.3. RESULTADOS.....	39
2.3.1. Biometria.....	
2.3.3. Diâmetro dos túbulos seminíferos, altura do epitélio seminífero e área da secção transversal .....	40
2.3.4. Comprimento tubular total e por grama de testículo.....	40



2.3.3. População celular .....	41
2.3.4. Rendimento intrínseco da espermatogênese e perdas celulares .....	42
2.3.5. Índice de células de Sertoli .....	43
2.3.6. Número total de células de Sertoli e por grama de parênquima testicular.....	44
2.3.7. Produção espermática diária total e por grama de parênquima testicular.....	44
2.4. DISCUSSÃO .....	46
2.4.1. Espermatogênese.....	46
2.4.2. Intensidade pixels.....	51
2.5. Conclusões .....	53
REFERÊNCIAS.....	54

## INTRODUÇÃO

Atualmente no Brasil, a população de equídeos é estimada em 7.986.023 cabeças, sendo 5.541.702 de equinos, 1.130.795 de asininos e 1.313.526 de muares. A população de equinos é a quarta maior do mundo. Esta população movimenta cerca de R\$ 7,5 milhões e gera em torno de R\$ 3,2 milhões empregos diretos e indiretos (ALMEIDA; SILVA, 2010).

Primeiramente, o cavalo foi utilizado nas funções de sela, carga e tração, a partir do século XX, começou a ser utilizado com mais frequência nas atividades de lazer, equoterapia para o tratamento de portadores de necessidades especiais (ALMEIDA; SILVA, 2010).

O agronegócio equino segmenta-se em diversas áreas, dentre elas o fornecimento de medicamentos, rações, prestação de serviços, selas e outros acessórios utilizados na montaria (ALMEIDA; SILVA, 2010). O Brasil é o terceiro maior mercado de produtos veterinários, ficando apenas atrás de Estado Unidos e Japão (LIMA et al., 2006).

Além destes segmentos há comercialização de animais nos leilões particulares ou de associações de criadores de cavalos. Os leilões de cavalos exigem uma complexa estrutura para a sua realização, sendo um dos principais componentes desta, um local bem localizado para a recepção dos possíveis compradores de cavalos (LIMA et al., 2006).

Além do recinto apropriado para a sua realização, o leilão exige um leiloeiro, uma equipe de pisteiros, um *buffet*, mídia, folhetos para a sua divulgação. Para a realização de um leilão de grande porte é necessário o envolvimento direto de 40 a 50 pessoas. O leilão também exige a preparação física dos animais, é necessário o toalete, a pintura dos cascos e entre outros cuidados (LIMA et al., 2006).

Atualmente, o mercado de leilões rurais de cavalos tem apresentado um crescimento nos últimos anos. Entre os anos de 1995 a 2004, o número de aquisição de animais através de leilões praticamente quadruplicou. O volume financeiro movimentado passou de R\$ 22 milhões, em 1995, para R\$ 111 milhões em 2004, um aumento de 430% (LIMA et al., 2006; ALMEIDA; SILVA, 2010).

Diante deste panorama favorável á criação de cavalos, exposto acima, são necessários mais estudos científicos sobre a reprodução, nutrição e sanidade dos equinos. Um exemplo da necessidade de maiores pesquisas é o limitado número de medicamentos específicos para equinos disponíveis nas lojas agropecuárias (LIMA et al., 2006; ALMEIDA; SILVA, 2010).

Com esta crescente demanda no mercado de cavalos, pesquisas sobre a fisiologia reprodutiva dos garanhões são extremamente importantes, visto que trabalhos científicos deste cunho são escassos. A reprodução nos garanhões começa na espermatogênese, e o seu correto

funcionamento é de assaz importância para a comercialização de garanhões, decorrente da constante demanda de cavalos para serviço, lazer e entre outras utilidades.

## **1. Origem do Cavalo Pantaneiro**

A introdução de cavalos no Brasil ocorreu durante o período de colonização com o intuito de explorar o continente recém-descoberto, pois este era o único meio de transporte. Os primeiros animais foram introduzidos no litoral, e a partir destes territórios os animais foram dispersos para outras regiões do país, tais como o nordeste, norte, centro-oeste e sudeste. Os cavalos do extremo sul e centro oeste originaram-se de animais provenientes da Espanha introduzidos na Argentina e Uruguai (LUCÍDIO; RONDON, 1972; SANTOS et al., 1992).

No ano de 1500, Portugal e Espanha dividiram as terras descobertas através do tratado de Tordesilhas, e conseqüentemente, através das expedições e ocupações do território brasileiro pelos portugueses. Posteriormente, ocupações espanholas no Rio da Prata com o objetivo de colonizar e desbravar a terra nova, introduziram cavalos, que na época eram o meio de transporte dos desbravadores (LUCÍDIO; RONDON, 1972; SANTOS et al., 1992).

As expedições para o descobrimento e povoamento das regiões sul-americanas foram impulsionadas pelas políticas públicas de fixação do homem na terra e contribuíram para inserção de animais domésticos nas regiões povoadas (LUCÍDIO; RONDON, 1972).

Em 1535, Dom Pedro de Mendoza, almirante espanhol, ocupou a região do Rio da Prata com o objetivo de povoar e conquistar as regiões em torno do Rio da Prata, e juntamente com ele, desembarcaram cem cavalos andaluzes. Durante o percurso das viagens adentro do território sul americano, os cavalos eram perdidos, e isto culminou com a formação de um rebanho de cavalos selvagens (AFFONSO; CORREA, 1992).

As colônias não possuíam cercas para delinear o território e eram muito extensas, com isso, muitos cavalos fugiam e pouco a pouco se formaram os plantéis iniciais de cavalos selvagens, que mais tarde se espalharam por todo o continente americano. Contudo, em 1541, Dom Pedro de Mendonza, ao ser atacado por índios, abandonou a região deixando numerosos cavalos durante a fuga. Estes animais encontraram terreno e condições propícias para se desenvolverem e se reproduzirem (AFFONSO; CORREA, 1992).

Após a fuga de Dom Pedro de Mendonza, Alvar Núñez Cabeza de Vaca foi nomeado governador do Rio da Prata, vindo da Espanha para o continente sul americano. Juntamente com o governador vieram soldados, quarenta e seis cavalos e algumas cabeças de vaca. A frota de navios ancorou em Cananea, cidade localizada no litoral paulista a sudeste da capital do Estado, e em

seguida, navegaram em direção ao Estado de Santa Catarina. Durante a viagem, Alvar Núñez Cabeza de Vaca perdeu dois navios e cerca de vinte cavalos, fazendo-o ir por terra para Assunção, e nessa expedição, provavelmente alguns cavalos foram perdidos no sul e centro-oeste do Brasil (SANTOS et al., 1992). Em outra expedição, à procura de uma rota para o Peru, Alvar Núñez Cabeza de Vaca partiu de Assunção em 1542, indo até o rio Paraguai. Outros expedicionários também tentaram descobrir, uma rota para o Peru, e durante estas viagens, cavalos foram perdidos (SANTOS et al., 1992).

Durante as expedições, um dos principais contratemplos eram os ataques indígenas, o que obrigava os governadores, fazendeiros e outras autoridades a aumentarem o número de cavalos, pois os conflitos eram constantes, e manter os soldados bem montados e com cavalos reservas correspondentes aos titulares era de extrema importância para a defesa das terras (AFFONSO; CORREA, 1992).

Os índios guaicurus viviam próximos do rio Paraguai na região entre Miranda e Corumbá e durante os ataques às propriedades e expedições, usavam cavalos descendentes daqueles deixados pelos espanhóis. Os indígenas aprenderam a domar cavalos com os espanhóis, e por anos roubaram cavalos e gado, o que contribuiu para a disseminação de cavalos na região (SANTOS et al., 1992).

Em 1580, já havia cerca de mil cavalos agregados pelo governador do Rio da Prata e um grande rebanho selvagem de cavalos descendentes dos animais trazidos inicialmente por Dom Pedro de Mendonza (AFFONSO; CORREA, 1992; SANTOS et al., 1992).

Posteriormente, no século XVII, ocorreram numerosas expedições em direção ao Peru com o objetivo de capturar nativos para trabalhar na agricultura de São Paulo. Estas expedições iniciaram o processo de expulsão dos jesuítas, que inicialmente ocuparam as margens do rio Aquidauana (AFFONSO; CORREA, 1992; SANTOS et al., 1992). Na metade do século XVII, com as expedições dos Bandeirantes paulistas em direção ao centro-oeste, ocorreram as ocupações do oeste brasileiro e a expulsão dos espanhóis, jesuítas e seus seguidores, formando a região de Vacaria, delimitada pela serra de Maracaju, Rio Paraná e Amambai e a cabeceira do Rio Pardo (SANTOS et al., 1992).

Após a formação da região de Vacaria, ocorreu a sua ocupação por numerosos colonos paulistas, contudo, a descoberta de ouro mudou todo o panorama da região. As vilas que foram decorrentes da ocupação de colonos se transformaram em cidades. Mais tarde, com a decadência do ouro, a atividade econômica de criação de bovinos passou a ser desenvolvida (SANTOS et al., 1992).

As expedições dos bandeirantes para a região central do Brasil, as inserções de animais pelos colonizadores espanhóis e portugueses e as ações dos índios Guaicurús através dos ataques às expedições e fazendas, contribuíram para a inserção de cavalos na região, e subsequentemente, estes

animais sofreram por anos a pressão da seleção natural, já que eram submetidos a longas marchas sem muitos cuidados, e muitos animais foram perdidos durante as viagens formando rebanhos selvagens (SANTOS, 1981; SANTOS et al., 1992).

Além dos índios Guaycurus, os índios Querandis e Paiaguás também contribuíram para a disseminação dos cavalos. Os indígenas avançaram em direção ao norte da região, hoje o Estado de Mato Grosso, à procura de melhores pastagens para seus cavalos, foram povoando as regiões por onde passavam, chegando a ter, segundo as informações dos castelhanos, vítimas dos ataques dos índios, um rebanho aproximado de 20.000 cavalos domesticados (SANTOS, 1981).

Provavelmente o cavalo Pantaneiro é oriundo de animais trazidos, pelos colonizadores, da Península Ibérica, território localizado no sudeste da Europa e corresponde aos países de Portugal, Espanha, Gibraltar e Andorra. As raças de cavalo que provavelmente contribuíram para a formação do cavalo Pantaneiro foram o Andaluz, de origem espanhola, introduzidos no Rio da Prata pelos colonizadores espanhóis; os cavalos da raça Berbere que foram trazidos para a Espanha em 800 D.C. pelos Mouros, que cruzaram estes animais com os animais de raças autóctones e formaram os cavalos da raça Andaluz; dos animais da raça Árabe e dos cavalos da raça Crioulo Argentino. Estes animais por mais de 200 anos passaram por uma pressão de seleção natural o que proporcionou a formação de uma raça local, adaptada ao bioma pantaneiro (SANTOS et al., 1992; SERENO et al., 1996).

As características de adaptabilidade ao bioma Pantaneiro, que foram adquiridas ao longo de anos de seleção natural, tais como a resistência do casco à umidade o que evita enfermidades decorrentes de excesso de umidade, a tolerância ao calor, alta fertilidade independente do manejo adotado, o que indica uma excelente adaptação às condições naturais do ambiente, e a tolerância a doenças infecciosas que acometem os cavalos da região pantaneira, como por exemplo, a Anemia Infecciosa Equina (AIE), Tripanossomose (mal-de-cadeiras), Pitiose Equina (ferida da moda) (SANTOS et al., 2004).

Além disso, o formato fechado do cavalo Pantaneiro possibilita a marcha em terrenos alagados e o hábito alimentar de consumir espécies forrageiras das áreas pantaneiras inundáveis consiste em característica de adaptabilidade, e a utilização do cavalo Pantaneiro no enduro equestre, contudo, o cavalo Pantaneiro também movimentou a economia com leilões e exposições de exemplares da raça (SANTOS et al., 2007).

Os locais da formação da raça, foram em Mato Grosso, nas localidades de Santo Antonio do Leverger, Barão de Melgaço, Nossa Senhora do Livramento, e também em Mato Grosso do Sul, nas localidades de Aquidauana e Corumbá. O Pantanal consiste em um território drenado pelo rio Paraguai e seus afluentes. Abrange os territórios paraguaios, bolivianos e no lado brasileiro, os municípios do Estado de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, sendo nestes a pecuária de corte e o

ecoturismo como umas das principais atividades econômicas (BALIEIRO, 1971; SANTOS et al., 1995). O bioma pantaneiro não é uma área permanentemente inundada, contudo, possui períodos de secas e enchentes. As áreas alagadas restringem-se à quase totalidade do município de Corumbá e parte dos demais municípios alocados na região pantaneira (CARVALHO et al., 1989).

Os primeiros estudos sobre o cavalo Pantaneiro foram realizados por Domingues (1957), e por Corrêa Filho (1973). O primeiro estudo determinou um padrão racial para o cavalo pantaneiro através de análises de animais provenientes de Poconé, Cáceres, Santo Antonio do Leverger e Barão de Melgaço. O segundo estudo, de Santos et al. (1995), identificou os principais fenótipos da raça Pantaneira. A partir do ano de 1900, com cruzamentos indiscriminados com outras raças com o objetivo de elevar o porte da raça Pantaneira, considerado pequeno, aliado a enfermidades como “mal-de-cadeiras” (tripanossomose) e a anemia infecciosa equina (AIE), contribuíram para a diminuição do número de cavalos da raça Pantaneira. Além disso, os melhores animais da raça Pantaneira eram castrados e utilizados nos trabalhos diários das fazendas, com isso, a paternidade ficava com os animais inferiores (SANTOS et al., 1995; SERENO et al., 1996; MISERANI et al., 2002).

Os pecuaristas da região pantaneira já tentaram introduzir outras raças na região, como o Árabe e o Puro Sangue Inglês, entretanto, essas raças não suportaram as cheias, secas e as temperaturas elevadas. O porte menor do cavalo Pantaneiro e a falta de beleza da raça, apontado por alguns produtores como pontos fracos da raça, provavelmente serão melhoradas através da seleção. Contudo, os criadores são unânimes em dizer que o cavalo Pantaneiro é o ideal para a região, pois é o único que suporta as adversidades da região pantaneira e os longos períodos de trabalhos sob temperaturas elevadas sem muitos cuidados (SANTOS et al., 2002).

A pecuária de corte é a base da economia da região pantaneira, sendo explorada no sistema extensivo em decorrência das adversidades das inundações. A partir da década de 40 a indústria de charque, motivada pela necessidade de alimentos da população, impulsionou o comércio de bovinos, com isso, veio a melhoria do rebanho pantaneiro. No entanto, a inexistência de rodovias nas áreas alagadas fazia com que o transporte de bovinos fosse a pé até as rodovias mais próximas (CARVALHO et al., 1989).

O crescimento da pecuária na região pantaneira obrigou os fazendeiros a terem uma tropa numerosa de cavalos adaptados às adversidades de cheias e secas, ao consumo das pastagens nativas da região pantaneira e aos longos períodos de marchas para levar o gado para rodovias mais próximas (CARVALHO et al., 1989).

O cavalo da raça Pantaneira foi ao longo dos anos tornando-se um importante fator socioeconômico por ser essencial na pecuária. Além disso, é importante também para o ecoturismo, uma atividade econômica que vem se consolidando a cada ano como uma atividade sustentável, que

concilia o desenvolvimento econômico com a preservação do meio ambiente. No Pantanal, o sistema de criação de bovinos de corte é de forma extensiva, e o cavalo Pantaneiro exerce papel fundamental no manejo diário desses animais, e no ecoturismo a utilização do cavalo Pantaneiro é no transporte de turistas em cavalgadas (SERENO et al., 1996; SANTOS et al., 1995).

Em 1969, uma comissão de estudos e pesquisas, dentre os integrantes desta comissão, o professor Luiz Rodrigues Fontes, organizou um padrão racial provisório do cavalo Pantaneiro. Com os objetivos de preservação da raça e de um contínuo melhoramento zootécnico foi fundada em 29 de maio de 1972 a Associação Brasileira dos Criadores do Cavalo Pantaneiro (ABCCP) e paralelamente foram criados vários núcleos de criatórios de cavalo Pantaneiro (SANTOS, 1981).

Em 1988, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), criou um núcleo de estudos reprodutivos com o intuito de preservar o material genético do cavalo adaptado ao bioma Pantaneiro (SERENO et al., 1996). Melo et al. (1998) descreveram bem o desenvolvimento sexual e a idade à puberdade de 26 garanhões Pantaneiros, já Ribas (2006), avaliou a influência das estações de cheia e seca nas características reprodutivas do cavalo Pantaneiro, e concluiu que o garanhão Pantaneiro pouco sofre os efeitos do fotoperíodo e depende muito mais de sua condição corporal.

Apesar da importância do cavalo Pantaneiro, alguns fundamentos básicos da fisiologia reprodutiva dos machos desta raça não são esclarecidos, não há trabalhos que avaliem a espermatogênese e a correlacionem com ecotextura testicular com o objetivo de desenvolver um método não invasivo de avaliação da mesma. O desenvolvimento de um método não invasivo de avaliação seria de grande importância para os estudos da espermatogênese, fato este que motivou a realização deste trabalho.

A avaliação da espermatogênese é feita através da castração ou biópsia testicular dos garanhões. Estes métodos são invasivos e não permitem repetição ou alta repetitividade no caso da biópsia testicular e muitos proprietários são resistentes ou não permitem o emprego destes métodos em seus animais. Se a espermatogênese pudesse ser avaliada indiretamente através da ultrassonografia aliada com a análise computacional das imagens ultrassonográficas, um método não invasivo de avaliação da espermatogênese poderia ser utilizado na seleção dos animais pelos criadores.

### **1.1. Espermatogênese**

A espermatogênese é um processo altamente especializado e complexo que tem lugar dentro dos túbulos seminíferos, e para a sua concretização, são necessárias várias divisões celulares para que uma célula diploide se transforme em uma célula altamente especializada, o espermatozoide. O

processo de formação do espermatozoide envolve três classes de células, as espermatogônias, espermatócitos e espermátides (COSTA; PAULA, 2003).

Inicialmente, as espermatogônias surgem a partir dos gonócitos, localizados nos túbulos seminíferos precursores durante o segundo mês de gestação. As espermatogônias são as células tronco do epitélio seminífero e através de divisões mitóticas destas, originam-se o restante das células germinativas. Inicialmente, foram identificados dois tipos de espermatogônias as do tipo A e as do tipo B. Posteriormente, foi demonstrada a presença da espermatogônia intermediária no rato e seguidamente em outras espécies como no touro e no carneiro (CLERMONT, 1960; HOCHEREAU, 1968; AMANN, 1981).

Para a maioria dos mamíferos, exceto para o ganhão, a espermatogênese começa com a conversão dos gonócitos em espermatogônias de forma aleatória em diversos locais do parênquima testicular, isto resulta em uma mudança uniforme da coloração do parênquima testicular. Nos cavalos, o desenvolvimento da espermatogênese começa centralmente no parênquima testicular, e progressivamente se expande para a periferia do parênquima testicular (CLEMMONS et al., 1995; AMANN, 2011).

O cavalo possui cinco subtipos de espermatogônias, as espermatogônias do tipo A<sub>1</sub>, caracterizadas pelo núcleo achatado, as tipo A<sub>2</sub>, caracterizadas por núcleos grandes com o centro composto por eucromatina (cromatina compactada), as espermatogônias do tipo A<sub>3</sub>, caracterizadas pelo maior núcleo e pelo grande nucléolo, as espermatogônias do tipo B<sub>1</sub>, com núcleo grande de formato esférico com traços de cromatina e por fim, as espermatogônias do tipo B<sub>2</sub> que possuem núcleos pequenos e esféricos com pequenos traços de cromatina (AMANN, 2011).

O exato momento em que a espermatogênese começa permanece desconhecido, entretanto este momento pode ser estimado. O fim do processo é determinado no momento em que o espermatozóide é lançado no lúmen tubular (BARTH;OKO,1989).

Contudo, o processo de formação do espermatozoide equino é dividido em três fases, a espermatocitogênese ou fase de proliferação espermatogonial, a fase meiótica e a espermiogênese. A proliferação espermatogonial ou fase de divisões mitóticas possui duração de 19,4 dias e envolve as cinco diferentes gerações de espermatogônias (A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>). Nesta etapa, com a divisão mitótica da espermatogônia B<sub>2</sub> é gerado o espermatócito primário em pré-leptoteno (JOHNSON, 1991; JOHNSON, et al., 1997).

A fase meiótica, com duração de 19,4 dias, é caracterizada por duas divisões meióticas e ao final das divisões celulares formam-se as espermátides, e por fim, a espermiogênese que consiste na diferenciação da espermátide em espermatozóide. Todo o processo espermatogênico do ganhão dura 57 dias (AMANN, 1981).

As células da linhagem espermatogênica que entram em meiose e são provenientes da última divisão espermatogonial são denominadas espermatócitos. A divisão celular compreende duas fases, as células em divisão celular na primeira fase são denominadas espermatócitos primários, e as da segunda fase são denominadas de espermatócitos secundários (COSTA; PAULA, 2003).

Os espermatócitos primários em pré-leptoteno, quando estão perto de se transformarem em leptoteno migram para o compartimento adluminal e iniciam fase de divisão celular meiótica, na qual surgem espermatócitos secundários que completam a meiose com a formação das espermátides (HESS; FRANÇA, 2008).

Ao final do processo de divisão celular, inicia-se o processo de diferenciação celular, em que as espermátides arredondadas passam por diversas mudanças morfológicas e bioquímicas, e que ao final do processo se transformam em uma célula haplóide altamente especializada, denominada espermatozoide (AMANN, 1981).

Após a liberação dos espermatozoides no lúmen tubular, estes vão para o epidídimo, onde adquirem a habilidade inicial de fertilizar os óvulos. As mudanças no trânsito epididimário consistem em aquisição do potencial de sustentar motilidade progressiva e a perda da gota citoplasmática (JOHNSON et al., 1997).

## **1.2. Ciclo do epitélio seminífero**

O ciclo do epitélio é uma sequência de eventos e mudanças que ocorrem em um determinado ponto do epitélio seminífero. A duração do ciclo do epitélio seminífero é específico para a espécie, nos equinos é de 12,2 dias, totalizando 4,5 ciclos. Esta sequência de eventos é denominada estágio do ciclo do epitélio seminífero. As frequências relativas dos estágios do ciclo do epitélio seminífero são constantes para cada espécie (JOHNSON, 1991).

Os estágios do ciclo do epitélio seminífero são classificados de acordo com duas metodologias: o método da morfologia tubular que consiste na classificação das alterações dos núcleos das células espermatogênicas, na ocorrência de divisões meióticas e no arranjo das espermátides, este classifica as mudanças do ciclo do epitélio seminífero em 8 estágios para todas as espécies e foi proposto por Ortavant (1977). Os equinos possuem somente um estágio por secção transversal do túbulo seminífero, devidamente descritos abaixo. Entretanto, os camundongos possuem mais de um estágio por secção transversal (AMANN, 1981).

O estágio um do ciclo do epitélio seminífero dos garanhões tem a duração de 2,1 dias e é caracterizado pelo desaparecimento por completo de espermátides arredondadas maduras ao lúmen e ao início do alongamento dos núcleos das espermátides. Os seguintes tipos celulares estão presentes: espermatogônias do tipo A, espermatócitos primários em pré-leptoteno/leptoteno no

compartimento basal e na porção adluminal são observados espermatócitos primários em paquíteno (SWIERSTRA et al., 1974; FIGUEIRÓ, 2010).

O estágio dois possui duração de 1,8 dias e é caracterizado pelo final do alongamento do núcleo das espermatídes e são evidenciados os seguintes tipos celulares: espermatogônias do tipo A, espermatócitos primários em leptóteno e subsequentemente em paquíteno e espermatídes em fase de alongamento (SWIERSTRA et al., 1974; FIGUEIRÓ, 2010).

O estágio três caracteriza-se pela duração de 0,4 dias e neste, encontram-se os seguintes tipos celulares: espermatogônias do tipo A, espermatócitos primários em zigóteno e paquíteno e espermatídes alongadas (SWIERSTRA et al., 1974; FIGUEIRÓ, 2010).

O estágio quatro, com duração de 1,9 dias, começa na primeira divisão meiótica até o fim da segunda divisão meiótica, e apresenta os seguintes tipos celulares: espermatogônias do tipo A, espermatócitos em transição de zigóteno para paquíteno, diplóteno, espermatócitos secundários, espermatídes arredondadas e espermatídes alongadas (SWIERSTRA et al., 1974; FIGUEIRÓ, 2010).

O estágio cinco, de 0,9 dias de duração, começa ao final da segunda divisão meiótica e apresenta as seguintes células: espermatócitos primários em paquíteno, espermatídes arredondadas e espermatídes alongadas (SWIERSTRA et al., 1974; FIGUEIRÓ, 2010).

O estágio seis, com duração de 1,6 dias caracteriza-se pela presença de espermatogônias B<sub>1</sub>, espermatócitos primários em paquíteno, espermatídes arredondadas e alongadas encaminhando-se para o lúmen (SWIERSTRA et al., 1974; FIGUEIRÓ, 2010).

O estágio sete, com duração de 1,5 dias, demonstra espermatídes B<sub>2</sub> com núcleo menor do que as espermatídes do tipo B<sub>1</sub>, espermatídes arredondadas e alongadas, corpos residuais pequenos e pouco delimitados resultantes do citoplasma das espermatídes alongadas em preparação para a espermição (SWIERSTRA et al., 1974; FIGUEIRÓ, 2010).

Por fim, o estágio oito, com duração de 1,9 dias, caracteriza-se pela presença de espermatogônias do tipo B<sub>2</sub> e do tipo A, espermatídes alongadas que são liberadas para o lúmen tubular (SWIERSTRA et al., 1974; FIGUEIRÓ, 2010).

O segundo método proposto para a classificação denomina-se de sistema acrossomal, que consiste nas observações das alterações do sistema acrossômico e na morfologia das espermatídes, porém, este método propõe números diferentes de estágios para cada espécie. Entretanto, este método não é comumente utilizado (COSTA; PAULA, 2003).

Ao longo dos estágios do ciclo do epitélio seminífero são observadas mudanças nos tipos de espermatogônias. As espermatogônias do tipo A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> e A<sub>3</sub> são encontradas em todos os estágios do epitélio seminífero. Entretanto, espermatogônias do tipo A<sub>3</sub> são predominantes nos estágios um e três. Já as espermatogônias do tipo B são evidenciadas a partir do estágio seis (JOHNSON, 1991).

O tamanho da população de espermatogônias é dependente das células de Sertoli, pela renovação das células tronco pelo número de divisões das células tronco em espermatócitos primários, e pela quantidade de degeneração de subtipos de espermatogônias (BERNDTON, 1977).

As células de Sertoli estão presentes em todos os estádios do ciclo do epitélio seminífero e possuem núcleo com irregularidades e nucléolo evidente (FIGUEIRÓ, 2010).

### **1.3. Testículo e seus componentes celulares**

O testículo é o órgão central do sistema reprodutivo responsável pela produção de andrógenos pelas células de Leydig, assim como a produção de células haplóides através da espermatogênese nos túbulos seminíferos. Os testículos de cavalos medem aproximadamente 80 a 140 mm de comprimento e 50 a 80 mm em largura, e são constituídos pelo parênquima, envolto pela albugínea que é composta por tecido colágeno e músculo liso. A túnica albugínea forma trabéculas que se estendem para o parênquima testicular para fornecer um quadro de apoio estrutural e dividir o testículo em lóbulos (AMANN, 1981).

O túbulo seminífero, estrutura que ocupa maior parte do parênquima testicular, aloca as células espermatogênicas, é funcionalmente dividido em dois compartimentos, o basal e o adluminal. Estes compartimentos são separados por uma complexa junção entre as células de Sertoli, a barreira hematotesticular. As junções de oclusão entre as células de Sertoli estão associadas a complexos hexagonais de filamentos de actina, denominados de especializações ectoplasmáticas (FRANÇA; RUSSELL, 1998).

As células de Sertoli se aderem a lâmina basal do túbulo seminífero através de estruturas semelhantes aos hemidesmossomos, substâncias que ligam a célula com a membrana basal adjacente através de filamentos, que servem para ancorar as células de suporte na membrana basal. Esta aderência na membrana basal ocorre durante o desenvolvimento testicular e permite que as células de Sertoli permaneçam como um andaime para suporte, migração e organização espacial das células germinativas no epitélio seminífero (FRANÇA et al., 2005).

No cavalo, os túbulos seminíferos ocupam cerca de 70% do volume testicular, esta proporção é maior do que em ratos com 60% e humanos com 40% de proporção de tecido tubular. Entretanto, outras espécies possuem maior proporção de túbulos seminíferos, tais como o touro, com 76%, o cão com 84% e o porco com 77% de proporção de tecido tubular no parênquima testicular. Os demais espaços do parênquima testicular são preenchidos, em menor proporção, pelo espaço intertubular e pelo lúmen tubular (FRANÇA; RUSSELL, 1998; AMANN, 2011).

O compartimento basal do túbulo seminífero contém as espermatogônias, as células tronco do epitélio seminífero, os espermatócitos primários e as células de Sertoli, enquanto o compartimento adluminal detém as espermátides e os espermatócitos secundários (FRANÇA; RUSSELL, 1998).

A célula de Sertoli, originária do epitélio celomático, é o elemento-chave da espermatogênese, desempenhando diversas funções no epitélio seminífero, tais como as de sustentação e nutrição das células germinativas, que são provenientes do epiblasto adjacente ao mesoderma embrionário. Além disso, as células de Sertoli proporcionam um ambiente “imuno privilegiado” através de suas junções, evitando que os antígenos produzidos na superfície das células germinativas provoquem resposta auto-imune, caso sejam reconhecidas pelo sistema imunológico (FRANÇA et al., 2005).

O espaço intertubular do parênquima testicular é composto de células de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, e outras populações variáveis de células, como macrófagos e mastócitos, além de tecido conjuntivo. As células de Leydig participam da espermatogênese através da produção da testosterona por meio da metabolização do colesterol em testosterona. Estas células são derivadas do cordão nefrogênico e se desenvolvem a partir das células mesenquimais intersticiais e produzem 95% da testosterona (HESS; FRANÇA, 2008).

#### **1.4. Células de Sertoli e a barreira hematotesticular**

As células de Sertoli ou células de suporte, estão situadas basalmente dentro do túbulo seminífero e desempenham papel importante na regulação da espermatogênese através de suas funções de sustentação do tronco espermatogênico, nutrição das células espermatogênicas, fagocitose de células germinativas em degeneração e de corpos residuais (COSTA; PAULA, 2003).

As células de suporte possuem um extensivo citoplasma que se entende para as células germinativas, constituem 15 a 25% do epitélio germinativo do ganhão. Estão presentes em todos os estádios do ciclo do epitélio seminífero. O número de células germinativas por célula de Sertoli é característico de cada espécie (AMANN, 1981).

Uma das características das células de Sertoli é a formação da barreira hematotesticular, que controla as substâncias que aderem ao túbulo seminífero, através do fluido intersticial. Estruturalmente existem duas barreiras, a de camada de células mióides que circunda o túbulo seminífero e a junção das células de Sertoli que dividem o túbulo seminífero nos compartimentos basal e adluminal (JOHNSON; NEAVES, 1981).

O compartimento basal é composto de espermatogônias e espermatócitos primários, já o compartimento adluminal é composto de espermatócitos secundários e espermátides. O

desenvolvimento testicular é dependente do crescimento das células de Sertoli, e após a puberdade o número de células de Sertoli permanece estável (BRACKETT, 2006).

### **1.5. Onda do epitélio seminífero**

A onda do epitélio seminífero corresponde a uma ordem sequencial de estágios ao longo da extensão dos túbulos seminíferos de um determinado período, e é o resultado de divisões programadas das espermatogônias em segmento tubular (JOHNSON et al., 1991).

A onda possui como funções a constante liberação de espermatozoides, assegurar a redução de competição por hormônios e metabólitos usados nos estágios, reduzir a congestão tubular, assegurar a constante liberação de fluido tubular que serve de veículo para os espermatozoides (AMANN, 2011).

### **1.6. Apoptose**

O rendimento da espermatogênese não é 100%, de modo que há perdas durante as divisões celulares. Estas perdas celulares normalmente acontecem pela apoptose, a morte celular programada. Entretanto, se não ocorressem perdas durante as divisões celulares, as células de Sertoli não conseguiriam suportar as células germinativas, de forma que a apoptose agiria como um fator regulador da população celular de acordo com a capacidade de nutrição e sustentação das células de Sertoli (JOHNSON et al., 1997).

Anteriormente acreditava-se que as células germinativas excedentes da capacidade de suporte das células de Sertoli desencadeavam o processo de degeneração. Posteriormente, evidenciou-se que a perda das células germinativas era decorrente da morte de celular programada, e este processo é regulado pelas células de Sertoli que iniciam a cadeia de eventos que termina com a morte celular programada (NASCIMENTO; SANTOS, 2003).

As perdas celulares nos estágios do ciclo do epitélio seminífero são variáveis entre as espécies, os ganhões, possuem maiores perdas no estágio IV. As maiores perdas celulares são durante a mitose, e em menores proporções durante na meiose, durante a fase de diferenciação não há perdas apreciáveis (HENINGER et al., 2004).

### **1.7. Eficiência da espermatogênese**

A eficiência da espermatogênese é influenciada pela quantidade das células germinativas mensuradas através das razões entre as células germinativas do estágio I do ciclo do epitélio

seminífero. A eficácia da espermatogênese é medida através dos cálculos de seu rendimento e as eventuais perdas celulares (BERNDTSON, 1977; COSTA; PAULA, 2003).

O rendimento intrínseco da espermatogênese é demonstrado através do coeficiente de mitoses espermatogoniais, do número de prováveis perdas durante a prófase meiótica, pelo rendimento meiótico e rendimento geral da espermatogênese (COSTA et al., 2011; ANDREUSSI et al., 2013).

O coeficiente de mitoses espermatogoniais demonstra a eficiência das divisões celulares das mitoses espermatogoniais. Este número demonstra quantos espermatócitos primários em pré-leptoteno (PL/L) surgiram a partir de cada espermatogônia do tipo A (A). O coeficiente é calculado através da divisão entre PL/L:A (COSTA et al., 2011; ANDREUSSI et al., 2013).

A ocorrência de prováveis perdas durante a prófase meiótica indica quantos espermatócitos primários em paquíteno (PQ) surgiram a partir de cada espermatócito primário em pré-leptoteno (PL/L). Normalmente, não há perdas durante a prófase meiótica, e este índice deve ser próximo de um. Este cálculo é realizado entre a razão de PQ:PL/L (COSTA et al., 2011; ANDREUSSI et al., 2013).

O rendimento geral da espermatogênese é calculado através da divisão do número espermatídes arredondadas ( $A_r$ ) e espermatogonias do tipo A (A). Este índice demonstra quantas espermatídes arredondadas surgiram a partir de cada espermatogônia do tipo A. Com os resultados do rendimento intrínseco da espermatogênese, calculam-se as perdas celulares na mitose, meiose e perdas totais da espermatogênese (COSTA et al., 2011; ANDREUSSI et al., 2013).

## **1.8. Ultrassonografia na medicina veterinária**

Os primeiros relatos de aplicações da ultrassonografia em veterinária surgiram em 1966, no diagnóstico de gestação em ovelhas. A partir daí, melhorias na qualidade dos equipamentos, combinadas com crescente aceitação nos benefícios da técnica levaram a uma utilização diversificada do ultrassom dentro da Medicina Veterinária (KING, 2006).

Em meados da década de 80, no século passado, a utilização da técnica de ultrassonografia para avaliação de tecidos moles em diversas espécies animais revolucionou as pesquisas em reprodução animal, aprimorando conhecimentos sobre estrutura e função gonadal (ovários e testículos), patologias dos órgãos genitais, além de ter permitido um melhor entendimento da fisiologia reprodutiva. A ultrassonografia é um método de diagnóstico não invasivo, portanto mais tolerado nos exames em animais sem sedação; seguro para o paciente e o operador; não provoca modificações fisiológicas no paciente e permite a avaliação em tempo real, do órgão em questão, em um animal vivo (EILTS; PECHMAN, 1988; KING, 2006).

O advento da ultrassonografia possibilitou um avanço significativo no estudo da função reprodutiva, particularmente em áreas como dinâmica do crescimento folicular na fase antral (ondas de crescimento), ovulação e função luteal. O diagnóstico ultrassonográfico em escala de cinza constituiu-se no mais profundo avanço tecnológico nas pesquisas com grandes animais e reprodução clínica, desde a introdução da palpação retal e do radioimunoensaio para análise de hormônios circulantes. Pela imagem de ultrassom é possível a avaliação do tamanho, forma, localização e textura do tecido em exame (TOM et al., 1998).

Um dos melhores exemplos do impacto causado por pesquisas com imagens na reprodução animal são os estudos da dinâmica folicular ovariana, divergência e dominância folicular e do momento da ovulação tem sido conduzidos nas diferentes raças e espécies, incluindo zebuínos, possibilitando estabelecer e/ou adequar protocolos de manipulação hormonal da função reprodutiva, como superovulação, sincronização de estro e indução da ovulação (COULTER; BAILEY, 1988).

Tecnologias de imagem de ultrassom também possibilitaram estudos mais profundos sobre o corpo lúteo e função luteal (POWE et al., 1988; SINGH et al., 1997), folículo gênese (SINGH; ADAMS, 2000); produção de progesterona e crescimento/atresia folicular; magnitude da fase luteal (concentração de progesterona e duração) e competência do folículo/oócito. O exame ultrassonográfico tornou possível o monitoramento do desenvolvimento da glândula luteal (CL) sequencialmente permitindo a avaliação do tamanho, forma, localização e consistência do corpo lúteo. A mensuração ultrassonográfica, contudo, não elimina completamente os erros de avaliação do corpo lúteo (PIERSON; ADAMS, 1995).

Também foram melhores caracterizadas patologias ovarianas, como cistos foliculares e luteais (TOM et al., 1998), folículos hemorrágicos anovulatórios em éguas (GINTHER et al., 1989), e síndrome do ovário policístico em mulheres (ATIOMO et al., 2000). Paradoxalmente, grande parte dos estudos com emprego de ultrassonografia limita-se à identificação da presença e mensuração de diâmetro ou área das estruturas, e apenas recentemente começou-se a utilizar diferenças de ecogenicidade como parâmetro de avaliação.

O exame do trato reprodutivo do garanhão foi introduzido há muitos anos e trata-se de uma ferramenta de grande valia para o diagnóstico e a investigação de várias desordens patológicas do escroto e de órgãos genitais internos. Apesar da disponibilidade do aparelho de ultrassonografia, e este ser usado frequentemente em éguas, nos machos o exame de ultrassonografia não é comumente utilizado, apenas quando há um problema que requer diagnóstico fiável (POZOR, 2005).

### 1.8.1. Análise de intensidade pixels

A análise computacional dos atributos de imagens é uma extensão natural dos avanços em diagnóstico ultrassonográfico. A técnica é baseada na identificação, quadro a quadro (pixel), da intensidade do retorno da onda ultrassonora. Cada pixel que compõe a imagem representa um discreto reflexo do tecido e pode assumir um dos 255 valores da escala de cinza, que varia de preto (0) a totalmente branco (255) (SINGH et al., 2000).

A combinação de milhares de pixels forma uma imagem. A densidade e as características do tecido podem ser observadas via ultrassom, mas não quantificadas pelo olho humano. Visualmente, podemos distinguir somente 18 a 20 tons de cinza, o que leva a diferentes percepções individuais e, conseqüentemente, variações na interpretação da imagem (PIERSON; ADAMS, 1995). A análise computacional permite identificar diferenças de ecotextura imperceptíveis ao olho humano, assim como mensurá-las de forma bastante objetiva, pelo estabelecimento de algoritmos computacionais. Os algoritmos computacionais são desenvolvidos especificamente para análises de imagens de ultrassom com o objetivo de reduzir as inconsistências da avaliação visual subjetiva, quantificando os valores de cada pixel da imagem (SINGH et al., 2003).

A ecotextura (i.e. padrão da imagem ultrassonográfica) é determinada pela estrutura histológica do tecido em exame (SINGH et al., 2003). Em várias espécies animais, diferenças no estágio fisiológico estão associadas a variações na impedância acústica do tecido ovariano, relativas a mudanças macromoleculares e estruturais (TOM et al., 1998). Após a digitalização de uma imagem de ultrassom, esta pode ser manipulada como qualquer outro arquivo gráfico. Há diferentes métodos de análise, i.e., podem ser obtidos diferentes resultados, de acordo com a estrutura a ser analisada e o objetivo da análise (GÁBOR et al., 1998).

Na avaliação da ecotextura luteal, algumas áreas de interesse no corpo lúteo podem ser selecionadas e analisadas, gerando valores médios de pixel daquela região específica, o que possibilita a exclusão de áreas onde há artefatos de imagem que não representariam a real estrutura histológica. Os valores obtidos podem ser comparados entre diferentes porções da mesma imagem ou entre imagens de tempos distintos (SIQUEIRA et al., 2006).

No caso de folículos ovarianos, pode ser utilizada a mesma técnica e as comparações podem ser feitas entre regiões do antro ou da parede folicular, a partir de imagens sequenciais, a fim de detectar mudanças na característica do folículo em crescimento, dominância, atresia ou próximo à ovulação (SINGH; ADAMS, 2000).

## **1.9. Objetivos**

Este estudo teve como objetivo testar um método indireto de avaliação da espermatogênese através da ultrassonografia testicular aliadas com as análises em intensidade média de pixels das imagens digitalizadas. Para isso, imagens ultrassonográficas dos testículos foram obtidas e analisadas em intensidade média de pixels. Posteriormente a espermatogênese foi avaliada para as correlações com intensidade média de pixels, através de técnicas histomorfométricas.

Os resultados deste trabalho estão apresentados na forma de um artigo científico, sob as normas do periódico “Animal Reproduction Science”, denominado: Avaliação da Espermatogênese e da ecotextura testicular do cavalo Pantaneiro.

## REFERÊNCIAS

- AFFONSO, A.; CORREA, S. Cavalo Crioulo: Uma História de Raça. 1 ed. Porto Alegre: Sagra, 1992.
- ALMEIDA, F.Q.; SILVA, V.P. Progresso científico em equideocultura na 1ª década do século xx1. Revista Brasileira de Zootecnia, v.39, p.119-129, 2010.
- AMANN, R.P. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. Journal Andrology, v.2, p.37-58, 1981.
- AMANN, R.P. Physiology and endocrinology. In: MCKINNON, A.O., SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E. Equine Reproduction. 2.ed. USA: Blackwell Publishing Ltd, 2011. v.1, p.881-908.
- ANDREUSSI, P.A.T.; COSTA, D.S.; FARIA, F.J.C.; FERNANDES, C.A.C.; GUIMARÃES, J.D. Efficiency of the Spermatogenesis in Bulls *Bos tauros indicus*. Anatomia, Histologia, Embryologia, v. 1, p.1-8, 2013.
- ATIOMO, W.U.; PEARSON, S.; SHAW, S.; PRETICE, A.; DUBBINS, P. Ultrasound Criteria in the Diagnosis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). Ultrasound in Medicine and Biology, v.26, p.977-980, 2000.
- BALIEIRO, E.S. Subsídios ao estudo do cavalo pantaneiro, in: Anuário, Comissão Criadora do Cavalo Nacional, São Paulo, p.59-65, 1971.
- BARTH, A.D.; OKO, R.J. Testis physiology. In: BARTH, A.D.; OKO, R.J. Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa. Ames: Iowa State University Press, 1989, 348p.
- BERNDTSON, W.E. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. Journal Animal Science, v. 44, n. 5, p.818-83, 1977.
- BLANCHARD, T.L.; JOHNSON, L. Increased Germ Cell Degeneration and Reduced Germ Cell:Sertoli cell Ratio in Stallions With Low Sperm Production. Theriogenology, v.47, p.665-677, 1997.
- BRACKETT, B.G. Reprodução em mamíferos do sexo masculino. In: REECE W.O. (Ed.) Fisiologia dos Animais Domésticos. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 2006. p.624-643.

- CARVALHO, A.L.; DUARTE, A.C.; BRASIL, A.E.; AJARA, C.; NIMER, E. Geografia do Brasil. 1 ed. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 1989.
- CLEMMONS, A.J.; THOMPSON-JR, D.L.; JOHNSON, L. Local de initiation of spermatogenesis in the horse. *Biology of Reproduction*, v.52, p.1258-1267, 1995.
- CLERMONT, Y. Cycle of the seminiferous epithelium of the guinéa-pig. *Fertility*, v.11, p. 563-573, 1960.
- CORRÊA FILHO, E.A. O cavalo pantaneiro. *Revista Medicina Veterinária*, v.8, p.395-412, 1973.
- COSTA, D.S.; MACEDO, D.B.; SANTOS, M.D.; PAULA, T.A.R.; FARIA, F.J.C. Intrinsic rate of spermatogenesis in free-ranging feral pigs (*Sus Scrofa sp*). *Animal Reproduction Science*, v. 125, p. 165-169, 2011.
- COSTA, D.S.; PAULA, T.A.R. Espermatogênese em mamíferos. *Scientia*, v.4, p. 53-72, 2003.
- COULTER,G.; BAILEY, D. Effects of ultrasonography on the bovine testis and semen quality. *Theriogenology*, v.30, p.743-749, 1988.
- DOMINGUES, O. Contribuição ao estudo do cavalo pantaneiro. Rio de Janeiro: MNLZ, 1957. 19p.
- EILTS, B.; PECHMAN, R. B-mode ultrasound observations of bull testes during breeding soundness examinations. *Theriogenology*, v.30, p.1169-1176, 1988.
- FIGUEIRÓ, G.M. Análise morfofuncional da espermatogênese do cavalo da raça crioula. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2010. 78p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, 2010.
- FRANÇA, L. R.; RUSSELL, L. D.The testis of domestic animals. In: REGADERA, J. E MARTINEZ-GARCIA, F. (eds.). *Male reproduction. A multidisciplinary overview*. Churchill Livingstone, p.197-219, 1998.
- FRANÇA, L.R.; CHIARINI-GARCIA, H. Células de Sertoli. In: CARVALHO, H.F.; COLLARES-BUZATO, C.B. *Células: Uma abordagem multidisciplinar*. 1.ed. Barueri: Manole, 2005, p.449.
- GÁBOR, G.; SASSER, R.G.; KASTELIC, J.P.; MÉZES, M.; FALKAY, G.; BOZÓ, S.; CSÍK, J.V.; BÁRÁNY, I.; HIDAS, A.; SZÁSZ, F.; BOROS, G. Computer analysis of vídeo and ultrasonographic images for evaluation of bull testes. *Theriogenology*, v.15, p.223-228, 1998.

- GINTER, O.J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J.P. Ovarian follicular dynamics in heifers during early pregnancy. *Biology Reproduction*, v.41, p.247-254, 1989.
- HENINGER, N.L.; STAUB, C.; BLANCHARD, T.L.; JOHNSON, L.; VARNER, D.D.; FORREST, D.W. Germ cell apoptosis in the testes of normal stallions. *Theriogenology*, v.62, p.283-297, 2004.
- HESS, A.H.; FRANÇA, L.R. Molecular Mechanisms in spermatogenesis, in: *Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium*. Landes Bioscience and Springer Science, USA, p.1-15, 2008.
- HOCHEREAU, M.T. Etude des divisions spermatogoniais et du renouvellement de la spermatogonia souche chez le taureau. *Congresso Animal Reproduction*, v.1, 149-152, 1968.
- JOHNSON, L. Seasonal differences in equine spermatocytogenesis. *Biology of Reproduction*, v.44, p.284-291, 1991.
- JOHNSON, L.; BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; SCRUTCHFIELD, W.L. Factors affecting spermatogenesis in the stallion. *Theriogenology*, v.48, p.1199-1216, 1997.
- JOHNSON, L.; NEAVES, W.B. Age-related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules and sperm production in stallions. *Biology of Reproduction*, v.24, p.703-712, 1981.
- KING, A.M. Development, advances and applications of diagnostic ultrasound in animals. *The Veterinary Journal*, v. 171, p.408-420, 2006.
- LIMA, R.A.S.; SHIROTA, R.; BARROS, G.S.C. Estudo do complexo do agronegócio cavalo. Piracicaba: ESALQ/USP, 2006. 250p.
- LUCÍDIO, J.; RONDON, N. Tipos e aspectos do Pantanal: Mato Grosso. São Paulo: Nobel, 1972.
- MELO, M.I.V.; SERENO, J.R.B.; HENRY, M.; CASSALI, G.D. Peripuberal *sexual* development of pantaneiro stallions. *Theriogenology*, v.50, p.727-737, 1998.
- MISERANI, M.G.; MCMANUS, C.; SANTOS, S.A.; SILVA, J.A.; MARIANTE, A.S.; ABREU, U.G.P. Avaliação dos Fatores que Influem nas Medidas Lineares do Cavalo Pantaneiro. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.31, p.335-341, 2002.
- NASCIMENTO, E.F.; SANTOS, R.L. *Patologia da Reprodução dos animais Domésticos*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.93-103, 2003.

ORTAVANT, R.; COUROT, M.; HOCHEREAU-DE-REVIERS, M. T. Spermatogenesis in domestic mammals. In: COLE, H.H., CUPPS, P.T. Reproduction in domestic animals. 3 ed. New York: Academic Press, p.203-227, 1977.

PIERSON, R.A.; ADAMS, G.P. Computer-assisted image analysis, diagnostic ultrasonography and ovulation induction: strange bedfellows. *Theriogenology*, v. 43, p.105-112, 1995.

POWE, T.A.; CARTEE, R.E.; CARSON, R.; WOLFE, D.; HUDSON, R. B-mode ultrasonography of testicular pathology in the bull. *Agriculture Practice*, v.9, p.5-43, 1988.

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

RIBAS, J.A.S.R. Influência das estações cheia e seca nas características reprodutivas e seminais de garanhões da raça Pantaneira no Pantanal de Poconé - MT. Rio de Janeiro: Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2006. 133p. Tese (Doutorado em Produção Animal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2006.

SANTOS, R.F. O Cavalo de Sela Brasileiro e outros Equídeos. Botucatu: Varela, 1981.

SANTOS, S.A.; ABREU, U.G.P.; MASCIOLI, A.S.; MCMANU, C.; MARIANTE, A.S.; SERENO, J.R.B. Fatores Ambientais e Crescimento de Cavalos Pantaneiros Criados em Condições Naturais. *Archivos de Zootecnia*, v.56, p. 929-934, 2007.

SANTOS, S.A.; CRISPIM, S.M.A.; SOARES, A.C.; MAURO, R.A.; PEREIRA, M.; SERENO, J.R.B. Grazing Patterns of Pantaneiro Horses an Element of Adaptability to the Pantanal Region Brazil. *Archivos de Zootecnia*, v.51, p.129-138, 2002.

SANTOS, S.A.; MAZZA, M.C.M.; SERENO, J.R.B.; ABREU, U.G.P.; SILVA, J.A. Avaliação e Conservação do Cavalo Pantaneiro. *Embrapa*, v.21, p.1-33, 1995.

SANTOS, S.A.; MAZZA, M.C.M.; SERENO, J.R.B.; MAZZA, C.A.S.; PEDREIRA, A.A.S.; SILVA, J.A.; MARQUES, M.C.A. Sistema de criação de cavalos Pantaneiros no Pantanal. *Archivos de Zootecnia*, v.53, p.33-336, 2004.

SANTOS, S.A.; SERENO, J.R.B.; MAZZA, M.C.M.; MAZZA, C.A. Origin of the Pantaneiro Horse in Brazil. *Archivos Zootecnia*, v.41, p.371-381, 1992.

SERENO, J.R.B.; SANTOS, S.A.; ZÚCCARI, C.E.S.N. Avaliação do desempenho reprodutivo e estabelecimento da estação de monta de equinos em regime de monta natural a campo no Pantanal. Comunicado Técnico, v.15, p. 1-7, 1996.

SINGH, J., ADAMS, G.P. Histomorphometry of dominant and subordinate bovine ovarian follicles. The Anatomical Record, v. 258, p. 58-70, 2000.

SINGH, J.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A. Promise of new imaging technologies for assessing ovarian function. Animal Reproduction Science, v. 78, p. 371-399, 2003.

SINGH, J.; PIERSON, R. A.; ADAMS, G. P. Ultrasound image attributes of bovine ovarian follicles and endocrine and functional correlates. Journal of Reproduction and Fertility, v.112, p. 19-29, 1997.

SIQUEIRA, L.G.B.; VIANA, J.H.M. Novas tecnologias em diagnóstico por imagem. Jornal O Embrião, Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, v.28, p. 37-38, 2006.

SWIERSTRA, E.E.; GEBAUER, M.R.; PICKETTI, B.W. Reproductive physiology of the stallion. I. spermatogenesis and testis composition. Journal Reproduction Fertility, v.40, p. 113-123, 1974.

TOM, J.W.; PIERSON, R.A.; ADAMS, G.P. Quantitative Echotexture Analysis of Bovine ovarian Follicles. Theriogenology, v.50, p.339-346, 1998.

## 2. ARTIGO: Avaliação da espermatogênese e da ecotextura testicular do cavalo Pantaneiro

Varoni, M.S.<sup>a</sup>; Costa, D.S.<sup>ab</sup>; Faria, F.J.C.<sup>a</sup>.

<sup>a</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Av. Senador Filinto Müller, 2443, Vila Ipiranga, Campo Grande, MS, 79070-900, Brasil.

<sup>b</sup>Autor correspondente. Tel.: +55 67 3345 3632; fax.: 55+ 67 3345 3600. E-mail: deilercosta@yahoo.com.br(D.S. Costa).

**Resumo:** O objetivo deste trabalho foi de avaliar a viabilidade de se estudar o processo espermatogênico indiretamente através da ecotextura no parênquima testicular de garanhões pantaneiros. Foram utilizados 22 animais de 3 a 6 anos de idade. As imagens ultrassonográficas foram salvas, digitalizadas e avaliadas com o auxílio do software “Image J 1.34” (Rasband, 2005). Após a aquisição das imagens ultrassonográficas, os animais foram castrados, e lâminas histológicas foram confeccionadas para a avaliação da espermatogênese através de técnicas histomorfométricas com o auxílio do software “Image J 1.34” (Rasband, 2005). Os cavalos da raça Pantaneira demonstraram um dos maiores rendimentos gerais (16,40) e índice de células de Sertoli, até então relatado para as raças de cavalos brasileiras. A intensidade média de pixels demonstrou correlações ( $r=0,4$ ) com a proporção de lúmen tubular e com a população de espermatogônias do tipo A ( $r=-0,5$ ). Com os demais parâmetros da espermatogênese não ocorreram correlações ( $p>0,05$ ). A ultrassonografia testicular não pode ser usada como um método indireto de avaliação da espermatogênese.

**Palavras-chave:** Células de Sertoli, Intensidade Pixels, Túbulo Seminífero, Ultrassonografia.

**Abstract:** The aim of this study was develop an indirect method for evaluation spermatogenesis through the use of ultrasonography combined analysis of pixel intensity ultrasound images. 22 animals from 3 to 6 years old were used. The ultrasound images were scanned and saved and evaluated with the help of the software "Image J 1.34 " (Rasband, 2005) . After the acquisition of ultrasound images, the animals were castrated, and histological slides were prepared for evaluation of spermatogenesis by histomorphometric techniques with the help of the software " Image J 1.34 " (Rasband, 2005). The horses of the Pantaneira breed demonstrated one of the largest general revenues (16.40) and index of Sertoli cells have by then reported to the Brazilian breeds horses . The average intensity of pixels demonstrated correlations ( $r = 0.4$ ) with the ratio of tubular lumen and the population of type A spermatogonia ( $r=-0.5$ ). With the other parameters of spermatogenesis does not occur correlations ( $p>0.05$ ). Testicular ultrasonography cannot be used as an indirect method of assessment of spermatogenesis.

**Keywords:** Sertoli cells, Intensity Pixels, Seminiferous tubule, Ultrasonography.

## 2.1. INTRODUÇÃO

A reprodução nos machos começa na espermatogênese e o seu correto funcionamento é de extrema importância para a produção de espermatozoides viáveis. Contudo, a compreensão geral da espermatogênese e de certos detalhes deste processo é de extrema importância para utilização eficiente da capacidade reprodutiva do garanhão (Amann, 1981).

A avaliação da espermatogênese é de caráter invasivo sendo realizada através da confecção de lâminas histológicas obtidas dos testículos de animais castrados ou através da biópsia testicular, o que inviabiliza a avaliação da espermatogênese em animais de alto valor zootécnico.

A ultrassonografia é um método seguro e não invasivo para a avaliação de afecções do parênquima testicular e permite a repetição deste exame (Schurich et al., 2009). Estudos recentes

têm demonstrado que as mudanças na ecotextura do parênquima testicular estão intimamente relacionadas com as características histológicas e morfológicas dos túbulos seminíferos (Giffin et al., 2009).

Em touros das raças Angus e Angus x Charolês, as mudanças no tecido testicular durante o desenvolvimento sexual são detectadas pela avaliação ultrassonográfica aliada com a análise de intensidade média de pixels (Brito et al., 2012). Segundo Evans et al. (1996), a ecogenicidade testicular aumenta consideravelmente em touros durante o desenvolvimento testicular.

A imagem ultrassonográfica depende da capacidade do tecido analisado em refletir e transmitir as ondas sonoras. A ecogenicidade é o termo que demonstra o quanto um órgão reflete as ondas sonoras. No entanto, a determinação da ecogenicidade é um processo subjetivo, a menos que a quantificação de pixels em tons de cinza seja realizada, além disso, as análises de intensidade de pixels podem fornecer informações mais detalhadas sobre alterações no testículo (Kauffol et al., 2011).

O presente estudo teve como objetivo testar, como método de avaliação indireto da espermatogênese, a ultrassonografia testicular aliada com as análises computacionais das imagens ultrassonográficas, e secundariamente avaliar o rendimento intrínseco da espermatogênese, os percentis de perdas celulares da espermatogênese, a população celular do epitélio seminífero, a produção espermática diária e por grama de parênquima testicular, o comprimento tubular total e por grama de parênquima testicular e a proporção dos constituintes do parênquima testicular do cavalo Pantaneiro.

## 2.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.2.1. Animais, colheita dos testículos e biometria testicular

Utilizaram-se 22 garanhões pantaneiros com idades entre 3 e 6 anos de idade provenientes da fazenda Rancharia localizada no pantanal sul-mato-grossense no município de Corumbá. Coordenadas 18°34' de latitude sul e 55°48' de latitude oeste com temperatura média anual mínima de 21,0°C e máxima anual de 30,6°C e com precipitação pluviométrica anual de 1070,00 mm<sup>3</sup>. Os cavalos eram criados no sistema de regime extensivo em pastagens nativas da região pantaneira com acesso ao sal mineralizado e água *ad libitum*. Todos os animais foram submetidos inicialmente a um exame clínico a fim de eliminar aqueles reprodutores que possuísssem qualquer alteração dos órgãos genitais. Após a castração, os testículos foram separados dos respectivos epidídimos e pesados em balança de alta precisão. Todos os procedimentos deste experimento foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (protocolo n° 348).

### 2.2.2. Ultrassonografia testicular

A avaliação ultrassonográfica foi realizada antes da orquiectomia dos animais com o auxílio do aparelho de ultrassonografia Mindray<sup>®</sup> (modelo DP 2200, São Paulo, Brasil) acoplado com sonda linear de 7,5 MHz. Após a aplicação do gel acústico, a sonda foi posicionada para obtenção de imagens longitudinais. Posteriormente, as imagens obtidas foram digitalizadas e avaliadas com o auxílio do programa “Image J 1.34” (Rasband, 2005) em intensidade pixels em uma escala de 0 (preto) a 255 (branco). Para a avaliação da homogeneidade do parênquima testicular foram utilizados e comparados os quadrados representativos de 400 mm<sup>2</sup>, 1600 mm<sup>2</sup> e 3600 mm<sup>2</sup> nas regiões *captada*, *media* e *caudatado* parênquima testicular dos testículos esquerdo e direito.

### **2.2.3. Processamento histológico**

Após a orquiectomia bilateral, os testículos foram separados do epidídimo e perfundidos com solução fixativa de Karnovsky (paraformaldeído 4%, glutaraldeído 5% em tampão fosfato a 0,1M e ph 7,4) por 20 minutos em temperatura ambiente, em seguida fragmentos testiculares de 2,0 x 5,0 x 5,0 mm foram coletados e imersos em solução de Karnovsky por 24 horas, quando então foram transferidos para frascos contendo tampão fosfato e armazenados em refrigeração de 8°C até o processamento. Posteriormente, os fragmentos testiculares das regiões *capitata*, *media* e *caudata* foram inclusos em glicol metacrilato conforme descrito por Costa et al. (2004).

Foram realizados cortes histológicos de 4 µm em micrótomo rotativo dotado de navalha de vidro, corados com azul de toluidina – borato de sódio a 1%, e as lâminas foram montadas com Entellan<sup>®</sup>.

### **2.2.4. Proporção volumétrica**

A proporção volumétrica foi aferida através de 30 imagens de cada animal digitalizadas das lâminas histológicas com o auxílio do programa “Image J 1.34” (Rasband, 2005) e expressa em porcentagem. Foram utilizados 204 intersecções, consideradas como pontos, e mensurando-se as proporções do epitélio seminífero, lúmen do epitélio seminífero e tecido intertubular, com aumento de 200 vezes.

### **2.2.5. Diâmetro dos túbulos seminíferos, altura do epitélio seminífero e área de secção transversal**

O diâmetro médio dos túbulos seminíferos foi obtido através da mensuração de 20 secções transversais de forma mais circular possível, e foi expresso em micrometros. Na mesma imagem aferiu-se a altura média do epitélio seminífero, em que se considerou a distância entre a membrana

basal e a borda luminal. A área de secção transversal foi mensurada com o auxílio do software “Image J 1.34” (Rasband, 2005).

Os valores de diâmetro e área foram devidamente corrigidos segundo Amann (1981), considerando uma retração linear de 5% do corte histológico.

#### **2.2.6. Comprimento tubular total e por grama de parênquima testicular**

O comprimento tubular total foi estimado segundo o método de Attal e Courot (1963). Com a aplicação da seguinte fórmula:  $CTT(\text{comprimento tubular total}) = \text{Volume dos túbulos seminíferos} / \text{área de secção transversal}$ . O resultado foi expresso em metros, e para o cálculo do comprimento tubular por grama de parênquima testicular dividiu-se o resultado obtido pelo peso testicular.

#### **2.2.7. Mensuração da população celular**

O número de cada tipo celular foi estimado a partir da contagem, dos núcleos das células espermatogênicas e nucléolos das células de Sertoli em 20 secções transversais do estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero, classificado pelo método de morfologia tubular (Ortavant et al., 1977). As seguintes células foram contadas: espermátides arredondadas (Ar); espermátócitos primários em pré-leptoteno/leptoteno (PL/L); espermátócitos primários em paquíteno (PQ); espermatogônias do tipo A (A) e células de Sertoli (S).

A estimativa de cada tipo celular foi corrigida de acordo com a fórmula de Abercrombie (1946) modificada por Amann (1962). Os diâmetros nucleares das células germinativas e nucleolares para as células de Sertoli foram mensurados em 10 células de cada tipo celular.

### **2.2.8. Rendimento intrínseco da espermatogênese e perdas celulares**

O rendimento intrínseco da espermatogênese foi calculado através das razões entre as células germinativas no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero. Foram estimados o coeficiente de mitoses espermatogoniais (PL/L:A), rendimento meiótico (Ar:PQ), rendimento geral da espermatogênese (Ar:A) e perdas celulares durante a prófase meiótica (PQ:PL/L) (Costa et al., 2011).

Após os cálculos de rendimento da espermatogênese, foram calculadas as perdas celulares durante a proliferação mitótica, divisão meiótica e perdas totais, baseado nos números de células estimados caso o rendimento geral da espermatogênese fosse 100%.

### **2.2.9. Índice de células de Sertoli, número total de células de Sertoli e por grama de parênquima testicular**

O índice de células de Sertoli foi obtido através da divisão entre as células germinativas no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero e as células de Sertoli, através do seguinte procedimento:  $A:S$ ;  $PL/L:S$ ;  $PQ:S$ ;  $Ar:S$  e o número total de células germinativas foi dividido pelo número de células de Sertoli. O número total de células de Sertoli foi calculado através da multiplicação do número de célula de Sertoli por secção transversal pelo comprimento total dos túbulos seminíferos e dividido pela espessura do corte histológico. O cálculo do número total de células de Sertoli por grama de testículo foi realizado através da divisão do número total de células de Sertoli pelo peso testicular e o resultado expresso em gramas (Costa et al., 2011).

### **2.2.10. Produção espermática diária total e por grama de parênquima testicular**

A produção espermática diária total foi aferida utilizando-se o método segundo Costa et al. (2004), no entanto, com uma modificação: a espessura do corte histológico foi multiplicada pela duração do ciclo do epitélio seminífero (12,2 dias) e para o cálculo da produção espermática por grama de parênquima testicular, dividiu-se a produção espermática diária pelo peso testicular em gramas.

### **2.2.10. Análise estatística**

As médias e desvios padrões foram calculados com a ferramenta de estatística do software Microsoft Office Excel. O teste de Tukey foi utilizado para análise dos pesos testiculares e amostras pixels dos testículos em diferentes áreas representativas com o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). A correlação de Pearson, com o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ), foi utilizada entre as médias de intensidade pixels, a biometria, população celular, diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero, comprimento tubular total e por grama de parênquima testicular, número total de célula de Sertoli e por grama de parênquima testicular, produção espermática diária total e por grama de parênquima testicular, rendimento intrínseco e perdas celulares com o auxílio do software BioEstat 3.0 (Ayres et al., 2003).

## **2.3. RESULTADOS**

### **2.3.1. Biometria**

A Tabela 1 demonstra as médias e desvios padrões dos pesos dos testículos direito e esquerdo. Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os pesos dos testículos direito e

esquerdo entre o mesmo animal. Devido ao fato de não observar diferença entre os testículos direito e esquerdo utilizou-se o peso testicular médio para posteriores comparações.

### **2.3.2. Proporção volumétrica**

Os resultados da proporção de túbulos seminíferos, tecido intertubular e lúmen do epitélio seminífero estão descritos em porcentagem na Tabela 1.

### **2.3.3. Diâmetro dos túbulos seminíferos, altura do epitélio seminífero e área da secção transversal**

O diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero e área de secção transversal estão descritos na Tabela 1 com suas respectivas unidade de medidas.

### **2.3.4. Comprimento tubular total e por grama de testículo**

O comprimento tubular total e comprimento tubular por grama de testículo estão descritos na Tabela 1. Estas medidas demonstram o tamanho total da principal unidade funcional do testículo e o tamanho total dos túbulos por grama de parênquima testicular.

Tabela 1. Biometria testicular, morfometria das gônadas de 22 garanhões Pantaneiros.

Variáveis	Média $\pm$ desvio padrão
Peso testicular médio (g)	130,59 $\pm$ 32,06
Tecido intertubular (%)	27,48 $\pm$ 6,55
Parede do epitélio seminífero (%)	69,63 $\pm$ 6,13
Lúmen do epitélio seminífero (%)	2,89 $\pm$ 1,60
Tecido tubular (%)	72,52 $\pm$ 6,55
Diâmetro tubular ( $\mu\text{m}$ )	165,39 $\pm$ 17,53
Altura do epitélio seminífero ( $\mu\text{m}$ )	59,89 $\pm$ 6,24
Área de secção transversal ( $\mu\text{m}^2$ )	19.842,35 $\pm$ 3.738,35
Comprimento tubular total (m)	4.849,67 $\pm$ 1.404,82
Comprimento tubular por grama de testículo (m)	37,70 $\pm$ 7,30

### 2.3.3. População celular

A Tabela 2 demonstra a contagem, por secção transversal de túbulo seminífero, da população celular no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero devidamente corrigidos segundo Amann (1981). A correção da contagem populacional deve ser feita para que não ocorra superestimação da mensuração. Os diâmetros nucleares, utilizados para a correção, foram respectivamente: 7,28 $\mu\text{m}$  para A; 5,44 $\mu\text{m}$  em PL/L; 7,62 $\mu\text{m}$  para PQ; 4,60 $\mu\text{m}$  nas Ar. O diâmetro nucleolar das células de suporte foi de 1,68  $\mu\text{m}$ .

Tabela 2. População celular por secção transversal de túbulo seminífero (Células de Sertoli, espermatogônias A (A), espermatócitos primários em pré-leptoteno/leptoteno (PL/L), espermatócitos primários em paquíteno (PQ) e espermátides arredondadas (Ar)) no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero, devidamente corrigidos.

	Sertoli	A	PL/L	PQ	Ar
<b>Média</b>	6,29	2,79	18,14	18,35	45,48
<b>Desvio padrão</b>	13,52	3,87	4,04	0,44	1,20

Valores corrigidos segundo Amann (1962).

#### 2.3.4. Rendimento intrínseco da espermatogênese e perdas celulares

A Tabela 3 demonstra as razões das células espermatogênicas pelas quais foram mensurados o coeficiente de mitose espermatogonial (PL/L:A), rendimento da meiose (Ar:PQ), rendimento geral (Ar:A) e perdas celulares durante a prófase meiótica (PL/L:PQ).

As estimativas de perdas celulares na mitose, fase meiótica e perdas totais durante o processo estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Razões entre os números corrigidos da população celular do estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero e percentis de perdas celulares da espermatogênese em garanhões da raça Pantaneira.

<b>Tipos Celulares</b>	<b>Razões</b>
Coeficiente de mitoses espermatogoniais	6,54
Ocorrência de perdas na prófase meiótica	1,02
Rendimento meiótico	2,48
Rendimento geral	16,40
Perdas na mitose (%)	89,78
Perdas na meiose (%)	38
Perdas totais (%)	87,18

### 2.3.5. Índice de células de Sertoli

O índice de células de Sertoli está descrito na Tabela 4. Sendo esta relação à proporção das células de Sertoli para os tipos de células germinativas do estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero.

Tabela 4. Índices de células de Sertoli (CS), mensurado através das razões entre os cinco tipos celulares do estágio 1 e o número de células de Sertoli, devidamente corrigidos em garanhões da raça Pantaneira.

<b>Tipos celulares</b>	<b>Razões</b>
Espermatogônia A: CS	9,07
Pré-leptóteno (PL/L): CS	3,04
Paquíteno (PQ): CS	3,06
Espermátides arredondadas (Ar): CS	7,67
Total de células germinativas: CS	14,24

### 2.3.6. Número total de células de Sertoli e por grama de parênquima testicular

O número total de células de Sertoli e por grama de testículo estão descritos na Tabela 5.

### 2.3.7. Produção espermática diária total e por grama de parênquima testicular

A produção espermática diária total e produção espermática por grama de testículo estão apresentadas na Tabela 5. Estes parâmetros demonstram a capacidade produtiva do parênquima testicular total e por unidade de grama do testículo.

Tabela 5. Número total de células de Sertoli e por grama de parênquima testicular, produção espermática diária total e por grama de testículo de cavalos da raça Pantaneira.

Número total de células de Sertoli	$7,71 \times 10^9 \pm 3,24 \times 10^9$
Número de Células de Sertoli por grama (g) de testículo	$6,02 \times 10^7 \pm 2,04 \times 10^9$
Produção espermática diária	$4,47 \times 10^9 \pm 1,57 \times 10^9$
Produção espermática diária por grama (g) de testículo	$3,39 \times 10^7 \pm 7,97 \times 10^7$

### 2.3.9. Intensidade pixels

As médias de intensidade média de pixels dos testículos direito e esquerdo nas regiões pré-determinadas estão descritas na Tabela 6. Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) de intensidade média pixels entre as regiões *captada*, *media* e *caudata* de cada área representativa (400 mm<sup>2</sup>, 1600 mm<sup>2</sup> e 3600 mm<sup>2</sup>) entre os testículos direito e esquerdo. Como não houve diferença significativa, foram utilizadas as médias de intensidade pixels dos testículos direito e esquerdo para as demais análises estatísticas.

A intensidade média de pixels das áreas de 400 mm<sup>2</sup>, 1600 mm<sup>2</sup> e 3600 mm<sup>2</sup> nas regiões pré-determinadas encontram-se apresentadas na Tabela 7.

Não houve diferença significativa ( $p>0,05$ ) de intensidade média de pixel entre as áreas representativas de 400 mm<sup>2</sup> e 1600 mm<sup>2</sup> nas regiões *captada*, *media* e *caudata*.

Somente a área de 3600 mm<sup>2</sup> demonstrou diferença significativa ( $p<0,05$ ) de intensidade média de pixels nas três regiões descritas na Tabela 7.

Como não houve diferença significativa de intensidade média de pixels entre as áreas representativas de 400 mm<sup>2</sup> e 1600 mm<sup>2</sup> nas regiões *captada*, *media* e *caudata*, a área representativa de 400 mm<sup>2</sup>, descrita na Tabela 7, foi escolhida para as correlações com a espermatogênese por ser a menor área representativa.

Houve correlações ( $r=0,4$ ) da intensidade média de pixels da área de 400 mm<sup>2</sup> com a proporção dos túbulos seminíferos e com a população celular de espermatogônias do tipo A ( $r=-0,5$ ).

Não houve correlações ( $p>0,05$ ) da intensidade média de pixels da área de 400 mm<sup>2</sup> com a proporção volumétrica, biometria testicular, diâmetro do túbulo seminífero, altura do epitélio seminífero, comprimento tubular total e por grama de parênquima testicular, produção espermática diária total e por grama de testículo, índice de células de Sertoli, número total de células de Sertoli e por grama de parênquima testicular, população celular, rendimento intrínseco e com os percentis de perdas celulares.

Tabela 6. Médias de intensidade média de pixels (IP) dos testículos direito (TD) e esquerdo (TE) das 3 regiões pré-determinadas nas respectivas áreas representativas de 22 cavalos da raça Pantaneira.

Área	IP TE	IP TD	IP Média
400 mm <sup>2</sup>	139,91	131,25	135,58
1600 mm <sup>2</sup>	136,40	127,54	131,97
3600 mm <sup>2</sup>	136,09	128,94	132,51

As médias de intensidade pixels não diferiram entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Tabela 7. Médias e desvios padrões em pixels das imagens ultrassonográficas de 3 amostras das respectivas áreas representativas em pontos diferentes do parênquima testicular de 22 garanhões da raça Pantaneira, analisadas com o software “Image J 1.34” (Rasband, 2005).

Área	Intensidade Pixels			
	<i>Captada</i> (1)	<i>Media</i> (2)	<i>Caudada</i> (3)	Média +-
400 mm <sup>2</sup>	135,72 ± 18,19 <sup>aA</sup>	133,93 ± 19,47 <sup>aA</sup>	137,07 ± 10,80 <sup>aA</sup>	135,57 ± 11,62
1600 mm <sup>2</sup>	132,56 ± 18,51 <sup>aA</sup>	127,84 ± 18,72 <sup>aA</sup>	135,49 ± 20,16 <sup>aA</sup>	131,96 ± 11,70
3600 mm <sup>2</sup>	130,48 ± 17,69 <sup>aA</sup>	126,53 ± 16,10 <sup>bA</sup>	140,54 ± 19,91 <sup>aA</sup>	132,51 ± 7,22

<sup>a,b</sup> = Valores médios, seguidos por letras minúsculas diferentes na mesma linha, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ); A,B = Valores médios de um mesmo parâmetro, seguidos de letras maiúsculas na mesma coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

## 2.4. DISCUSSÃO

### 2.4.1. Espermatogênese

O peso testicular médio (130,59 g ± 32,06) dos animais deste trabalho foi semelhante ao relatado por Melo et al. (1998), de 131,4g ± 26,1 em cavalos da raça Pantaneira de 3 a 3,3 anos de

idade, e menor do que ganhões sem raça definida (SRD) com faixas etárias de 4 a 5 anos de idade com 161 g de peso testicular médio relatados por Johnson e Neaves (1981). Johnson et al. (1991), relataram o peso testicular médio de  $264 \text{ g} \pm 9$  em ganhões (SRD) de 4 a 5 anos de idade.

Estas diferenças se devem provavelmente ao número total de células de Sertoli do cavalo Pantaneiro de  $7,71 \times 10^9 \pm 3,24 \times 10^9$  ser menor do que os relatos de Johnson et al. (1991), de  $8,9 \times 10^9 \pm 0,41 \times 10^9$ . O número de células de suporte possui alta correlação ( $r=0,8$ ) com peso testicular médio (França e Russell, 1998).

A faixa etária dos animais também poderia explicar a diferença de pesos testiculares. Alguns desses animais estariam na fase pós-púbere e a maturidade sexual do ganhão é alcançada aos 5 anos de idade (Clemmons et al., 1995).

O diâmetro tubular está correlacionado positivamente com a atividade espermatogênica (França e Russell, 1998). O diâmetro médio dos túbulos seminíferos dos cavalos pantaneiros ( $171,73 \text{ } \mu\text{m}$ ) foi menor que os relatados por Johnson e Neaves (1981), de  $230 \text{ } \mu\text{m}$  em cavalos (SRD) de 4 a 5 anos de idade.

Esta diferença poderia ser explicada pela variação de idade dos animais utilizados por Johnson e Neaves (1981), e uma possível diferença por retração linear do corte histológico durante as confecções das lâminas histológicas.

A altura média do epitélio seminífero deste trabalho ( $59,64 \text{ } \mu\text{m} \pm 6,24 \text{ } \mu\text{m}$ ) foi menor do que os relatos de Blanchard e Johnson (1997), em cavalos (SRD) de 3 a 10 anos idade com  $76 \text{ } \mu\text{m} \pm 2 \text{ } \mu\text{m}$ . Provavelmente o que explicaria esta diferença seria de que alguns animais deste experimento estariam na fase pré-púbere não atingindo seu completo desenvolvimento sexual.

A proporção de tecido tubular do cavalo Pantaneiro ( $72,52\% \pm 6,55\%$ ) e de tecido intertubular ( $27,48\% \pm 6,55\%$ ) mostraram-se semelhantes a outras raças em idades análogas, e estão dentro dos padrões para os mamíferos que gira em torno de 70% a 90% para proporção de tecido tubular e de 27% a 38% para o tecido intertubular (França e Russell, 1998).

O comprimento tubular total do cavalo da raça Pantaneira ( $4.849,67 \text{ m} \pm 1.404,82 \text{ m}$ ) e por grama de parênquima testicular ( $30,80 \text{ m} \pm 7,30 \text{ m}$ ) foram maiores do que o relatado por Johnson e Neaves (1981), em cavalos sem raça definida com  $2.390 \text{ m} \pm 190 \text{ m}$  de comprimento tubular total e de  $16,6 \text{ m} \pm 0,5$  por grama de parênquima testicular.

O Comprimento tubular total depende do volume testicular, proporção volumétrica dos constituintes do parênquima testicular e diâmetro tubular. Portanto, é importante considerar o índice de retração linear durante o processamento histológico, evitando que as mensurações sejam superestimadas (Costa et al., 2007).

A população celular do estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero é normalmente estimada para se calcular o rendimento intrínseco da espermatogênese e para calcular o índice de células de Sertoli e o número total destas (Costa et al., 2011).

A partir das divisões mitóticas incompletas das espermatogônias, ocorre a proliferação das células germinativas do epitélio seminífero (Costa e Paula, 2003). O número de espermatogônias A (A) (2,79) do cavalo Pantaneiro foi menor em relação ao de cavalos da raça Crioulo (3,62) (Figueiró, 2010).

A população de espermátócitos primários em pré-leptoteno/leptoteno (PL/L) (18,14) e de espermátócitos primários em paquíteno (PQ) (18,35) dos animais deste estudo foram, respectivamente, 21,38% e 29,91% superiores aos de cavalos da raça Crioula (Figueiró, 2010), e normalmente não há perdas durante a prófase meiótica, um espermátócito primário em PL/L gerará um espermátócito primário em paquíteno.

A quantidade de espermátides arredondadas (Ar) deste estudo (45,48) foi semelhante ao de cavalos da raça Crioula de mesma faixa etária (Figueiró, 2010). O que poderia explicar esta semelhança de Ar seriam as maiores perdas celulares durante a meiose (38%) dos animais deste estudo comparadas aos de cavalos da raça Crioula (2,5%) (Figueiró, 2010).

Segundo Johnson et al. (2008), a relação entre a população de células de Sertoli (CS) com as A, influencia os demais números efetivos da população celular do epitélio seminífero. O número de

CS do garanhão Pantaneiro ( $6,29 \pm 13,52$ ) foi menor do que o de cavalos da raça Crioula ( $8,64 \pm 1,33$ ) (Figueiró, 2010).

O número total de CS deste estudo ( $7,71 \times 10^9 \pm 3,24 \times 10^9$ ) foi menor do que os relatos de Johnson et al. (1991) ( $8,9 \times 10^9 \pm 0,41 \times 10^9$ ) e de Figueiró (2010), ( $8,7 \times 10^9 \pm 2,4 \times 10^9$ ). O número total de CS por grama de testículo dos animais deste trabalho ( $6,02 \times 10^7 \pm 2,04 \times 10^9$ ) foi maior do que o relatado por Figueiró (2010), ( $5,48 \times 10^7 \pm 1,92 \times 10^6$ ). O que poderia explicar isto seria o menor comprimento tubular total ( $4.085,10 \text{ m} \pm 1.170,68\text{m}$ ) dos animais relatados por Figueiró (2010).

A espermatogênese pode ser dividida em três fases distintas: espermatocitogênese, a fase de divisão mitótica; fase de divisões meióticas e por fim a espermiogênese, fase em que ocorre a diferenciação da célula. O rendimento intrínseco da espermatogênese não é 100%. As perdas celulares ocorrem em resposta a diversos fatores, como por exemplo, alta temperatura ou distúrbios hormonais (Rodrigues et al., 2012).

As perdas celulares geralmente ocorrem por apoptose, que segundo Johnson et al. (1997), consiste em um mecanismo de eliminação de células germinativas normais ou defeituosas e uma ferramenta para regular a proporção de células germinativas por célula de Sertoli.

As perdas celulares são mais acentuadas na fase mitótica e em menor proporção na fase meiótica (Hess e França, 2008). A morte das células espermatogênicas evidenciadas na fase mitótica podem ser estimadas através do coeficiente de mitoses espermatogoniais (Costa e Paula, 2003). O coeficiente de mitose espermatogonial (PL/L:A), indica o número de espermatócitos primários formados a partir de cada espermatogônia do tipo A (Rodrigues et al., 2012).

O coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais deste trabalho (6,54) foi maior do que o relatado por Figueiró (2010), (3,9). Para cada espermatogônia do tipo A há 6,54 espermatócitos primários em pré-leptoteno/leptoteno. Isto significa que há somente 10,21% do total esperado de espermatócitos primários em pré-leptoteno/leptoteno.

O cavalo possui cinco gerações de espermatogônias, e cada espermatogônia deveria gerar 64 PL/L, entretanto há perdas celulares nesta fase (Swierstra et al., 1974). Ao todo, as perdas celulares na fase mitótica totalizaram 89,78% e foram semelhantes ao relatado para a maioria dos mamíferos (60% a 90%) (França e Russell, 1998).

A proporção entre PL/Le PQ demonstra as possíveis perdas celulares durante a prófase meiótica, este índice deve ser próximo de 1:1, já que nesta fase não se esperam perdas significativas, o que evidencia que cada espermatócito primário em pré-leptoteno/leptóteno deva gerar um espermatócito primário em paquíteno (Murta et al., 2010).

O rendimento meiótico (Ar:PQ) demonstra quantas Ar foram originadas a partir dos PQ. O coeficiente de rendimento meiótico deste trabalho foi menor (2,48) do que os relatos de Naden et al. (1990), (3,4) e Figueiró (2010), (3,9). Diferença que poderia ser explicada pelas maiores perdas celulares na fase meiótica (38%) em relação aos relatos de Naden et al. (1990), de 15% e de Figueiró (2010), com 2,5%.

O rendimento geral da espermatogênese (Ar:A) indica quantas Ar foram formadas a partir de cada A. Cada espermatogônia do tipo A geraria teoricamente 128 espermátides arredondadas, entretanto, existem perdas durante o processo. O coeficiente de rendimento geral (16,40) foi maior do que o relatado por Figueiró (2010), de 13,9, o que poderia explicar esta diferença seria nas perdas totais de 87,18% menores do que o relatado por Figueiró (2010), de 89%.

A relação entre as CS com os demais tipos celulares do epitélio seminífero é denominada índice de células de Sertoli. Esta relação influencia no tamanho das populações de células germinativas, sendo o indicador de capacidade de suporte e nutrição das células de Sertoli (Johnson et al., 2008). A capacidade de suporte das CS está relacionada com a eficiência da produção espermática diária total (França et al., 2005).

A taxa entre A (9,07) e CS por deste estudo foi superior aos relatos de Figueiró (2010), em cavalos Crioulos (0,4) e de Naden et al. (1990), (0,21) em cavalos da raça Quarto de Milha. Isto demonstra que para cada célula de Sertoli há 9,07 espermatogônias do tipo A.

As taxas entre CS e as demais células germinativas, descritas na Tabela 4, foram maiores do que os relatos de Figueiró (2010), de 1,7 (PL/L:CS), 1,5 (PQ:CS), 5,8 (Ar:CS), e também superiores aos índices relatados de Naden et al. (1990) de 1,47 (PL/L:CS), 1,49 (PQ:CS) e 5,09 (Ar:CS).

A relação entre o número total das células germinativas e as CS deste trabalho foi de 14,24. Este resultado foi maior do que o relatado por Figueiró (2010), de 10,04 e isto poderia explicar as perdas celulares de 38% na fase meiótica, já que a população celular é regulada de acordo com a capacidade de suporte das células de Sertoli. Provavelmente as células germinativas estariam excedendo a capacidade de suporte das células de Sertoli, o que desencadearia com mais intensidade a apoptose das células germinativas (Johnson et al., 2008).

A produção espermática diária de  $4,47 \times 10^9 \pm 1,57 \times 10^9$  do garanhão Pantaneiro foi menor do que os relatos de Gebauer et al. (1974) de  $8,9 \times 10^9$  de produção espermática diária em cavalos de 3 a 14 anos de idade da raça Quarto de Milha. Provavelmente o que poderia explicar esta diferença seria o maior comprimento tubular total dos animais relatados por Gebauer et al. (1974), e pelos animais dele estarem sexualmente maduros.

#### **2.4.2. Intensidade pixels**

Anteriormente, pensava-se que as mudanças na ecogenicidade do parênquima testicular de animais em desenvolvimento sexual seriam devido às diferenciações das células de Sertoli e a formação da barreira hematotesticular (Aponte et al., 2005; Brito et al., 2012).

Entretanto, este estudo não demonstrou correlação ( $p > 0,05$ ) de intensidade média de pixels com as CS. Provavelmente, o que explicaria as mudanças na ecogenicidade do parênquima testicular de animais em desenvolvimento sexual seria a formação do lúmen tubular, evidenciada pela correlação ( $r=0,4$ ) da proporção de lúmen tubular com a intensidade média de pixels neste trabalho.

Brito et al. (2012), relataram correlações da intensidade média de pixels com o diâmetro tubular ( $r=-0,3$ ) e com a área do epitélio seminífero ( $r=-0,2$ ) em bovinos. Em contraste, neste estudo não houve correlações ( $p>0,05$ ) entre diâmetro tubular e área de epitélio seminífero.

Brito et al. (2002), mencionam que o aumento da ecogenicidade é associada com o aumento da produção espermática diária em bovinos. No presente estudo não houve correlação ( $p>0,05$ ) da produção espermática diária com a intensidade média de pixels.

Este é o primeiro estudo que demonstra a correlação ( $r=-0,5$ ) entre espermatogônia do tipo A e intensidade média de pixels.

O rendimento da espermatogênese depende de outros fatores, tais como, percentis de perdas celulares, índice de células Sertoli, proporção volumétrica dos constituintes do parênquima testicular. Como não houve correlação ( $p>0,05$ ) entre estes fatores e a intensidade média de pixels, não há como avaliar a espermatogênese somente com a correlação ( $r=-0,5$ ) de espermatogônias do tipo A com a intensidade média de pixels.

As análises de intensidade média de pixels poderiam ser usadas em estudos da espermatogênese se houvesse uma correlação positiva entre as demais variáveis da espermatogênese.

Durante as avaliações ultrassonográficas não foram encontrados pontos de lesões de fibrose no parênquima testicular de ambos os testículos analisados. Este resultado está de acordo com os relatos de Fukuda et al. (2001), em cavalos (SRD) entre 4 e 24 anos de idade, e Pozor (2005), em 113 cavalos das raças Árabe, Anglo Árabe, Puro Sangue Inglês de 3 a 22 anos de idade.

Talvez a fibrose testicular em equinos não seja frequentemente encontrada como no parênquima testicular de bovinos como observado por Barth et al. (2008), Pinho et al. (2013a) e Pinho et al. (2013b) de etiologia desconhecida. Provavelmente no parênquima testicular de equinos não ocorra intensa proliferação de fibroblastos como no parênquima testicular de bovinos.

## **2.5. Conclusões**

O cavalo da raça Pantaneira demonstrou um dos maiores rendimentos gerais da espermatogênese e índice de células de Sertoli até então relatadas para as raças brasileiras de cavalos. O método de ultrassonografia aliado às análises de intensidade pixels não é recomendado como um método indireto de avaliação da espermatogênese.

## REFERÊNCIAS

- Abercrombie, M., 1946. Estimation of nuclear populations from microtome sections. *Anatomical Record*. 94, 238-248.
- Amann, R.P., 1962. Reproductive capacity of dairy bulls. VI. Spermatogenesis and testicular germ cell degeneration. *Journal of dairy Science*. 110, 69-78.
- Amann, R.P., 1981. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. *Journal of Andrology*. 2, 37-58.
- Aponte, P.M., de Rooij, Dirk, G., Bastidas, P., 2005. Testicular development in Brahman bulls. *Theriogenology*. 64, 1440-1455.
- Attal, J., Courot, M., 1963. Développement Testiculaire et établissment de la spermatogenèse chez le taureau. *Animal Biophy*. 3, 219-241.
- Ayres, M., Ayres Jr. M., Ayres, D.L., Santos, A.S., 2003. *Bio Estat. Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biológicas e Médicas*. Belém, Sociedade Civil Maniraua, Brasilia, CNPq.
- Barth, A.D., Alisio, L., Avilés, M, Artega, A.A., Campbell, J.R., Hendrick, S.H., 2008. Fibrotic lesions in the testis of bulls and relationship to semen quality. *Animal Reproduction Science*. 106, 274-288.
- Blanchard, T.L., Johnson, L, 1997. Increased Germ Cell Degeneration and Reduced Germ Cell: Sertoli cell Ratio in Stallions With Low Sperm Production. *Theriogenology*. 47, 665-677.
- Brito, L.F., Silva, A.E., Rodrigues, L.H., Vieira, F.V., Deragon, L.A.,Kastelic, J.P., 2002. Effect of age and genetic group on characteristics of the scrotum, testes and testicular vascular cones, and on sperm production and semen quality in AI bulls in Brazil. *Theriogenology*. 58, 75-86.
- Brito, L.F.C., Barth, A.D., Wilde, R.E., Kastelic, J.P., 2012. Testicular ultrasonogram pixels intensity during sexual development and its relationship with quality, sperm production, an quantitative testicular histology in beef bulls. *Theriogenology*. 78, 69-76.
- Clemmons, A.J., Thompson-jr, D.L., Johnson, L., 1995. Local de initiation of spermatogenesis in the horse. *Biology of Reproduction*. 52, 1258-1267.

- Costa, D.S., Henry, M., Paula, T.A.R., 2004. Espermatogênese de catetos (*Tayassutajacu*). Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 56, 46-51.
- Costa, D.S., Macedo, D.B., Santos, M.D., Paula, T.A.R., Faria, F.J.C., 2011. Intrinsic rate of spermatogenesis in free-ranging feral pigs (*Susscrofasp*). Animal Reproduction Science. 125, 165-169.
- Costa, D.S., Menezes, C.M.C., Paula, T.A.R., 2007. Spermatogenesis in White-lipped peccaries (*Tayassupeccari*). Animal Reproduction Science. 98, 322-334.
- Costa, D.S., Paula, T.A.R., 2003. Espermatogênese em mamíferos. Scientia. 4, 53-72.
- Evans, A.C.O., Pierson, R.A., Garcia, A., Mcdougall, L.M., Hrudka, F., Rawlings, N.C., 1996. Changes in circulating hormone concentrations, testes histology and testes ultrasonography during sexual maturation in beef bulls. Theriogenology. 46, 345-357.
- Figueiró, G.M., 2010. Análise morfofuncional da espermatogênese do cavalo da raça crioula. Tese. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil. 78p.
- França, L.R., Avelar, G.F., Almeida, F.F.L., 2005. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. Theriogenology. 63, 300-318.
- França, L.R., Russell, L.D., 1998. The testis of domestic animal. In: Regadera, J., Martinez-Garcia, F. (Eds.), Male Reproduction: A Multi-disciplinary Overview. Churchill Livingstone, Madrid, pp. 197-219.
- Fukuda, T., Kikuchi, M., Kurotaki, T., Oyamada, T., Yoshikawa, H., 2001. Age-related changes in the testis of horses. Equine Veterinary Journal. 33, 20-25.
- Gebauer, M.R., Pickett, B.W., Swierstra, E.E., 1974. Reproductive physiology of the stallion II. Daily production and output of sperm. Journal Animal Science. 39, 732-736.
- Giffin, J.L., Franks, S.E., Rodrigues-Sosa, J.R., HaHdnel, A., Bartlewski, P.M., 2009. A Study of a Morphological and Haemodynamic Determinants of Testicular Echotexture Characteristics in the Ram. Experimental Biology and Medicine. 234, 794-801.

- Hess, A.H., França, L.R., 2008. Molecular Mechanisms in spermatogenesis, in: Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. Landes Bioscience and Springer Science, USA, pp. 1-15.
- Johnson, L., Blanchard, T.L., Varner, D.D., Scrutchfield, W.L., 1997 Factors Affecting Spermatogenesis in the Stallion. *Theriogenology*. 48, 119-1216.
- Johnson, L., Neaves, W.B., 1981. Age-related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules and sperm production in stallions. *Biology of Reproduction*. 24, 703-712.
- Johnson, L., Thompson, D.L., Varner, D.D., 2008. Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. *Animal Reproduction Science*. 105, 23-51.
- Johnson, L., Varner, D.D., Tatum, M.E., Scrutchfield, W.L., 1991. Season but not age affects Sertoli cell number in adult stallion. *Biology of Reproduction*. 45, 404-410.
- Kauffol, J., Kessler, M., Richter, A., Beynon, N., Wehrend, 2011. B-mode Ultrasound and Grey-Scale Analysis of the Epididymis in Boars, and the Relationship to Semen Parameters. *Reproduction in Domestic Animal*. 46, 108-113.
- Melo, M.I.V., Sereno, J.R.B., Henry, M., Cassali, G.D., 1998. Peripuberal *sexual* development of pantaneiro stallions. *Theriogenology*. 50, 727-737.
- Murta, D.V.F., Costa, D.S., Santos, M.D., Faria, F.J.C., 2010. Somatic and germ cell proliferation during post-natal development of the testis in the wild boar (*Sus scrofa*). *Animal Reproduction Science*. 119, 154-159.
- Naden, J., Amann, R.P., Squires, E.L., 1990. Testicular growth, hormone concentrations, seminal characteristics and sexual behaviour in stallions. *Journal Reproduction Fertility*. 88, 167-176.
- Ortavant, R., Courot, M., Hochereau-de Reviers, M.T., 1977. Spermatogenesis in domestic mammals. In: Cole, H.H., Cupps, P.T. (Eds.), *Reproduction in Domestic Animals*, third ed. Academic Press, New York, pp. 203-227.
- Pinho, P.O., Costa, D.S., Siqueira, J.B., Martins, L.F, Neto, T.M., Pereira, J.V.T.N., Guimarães, S.E.F.G., Guimarães, J.D., 2013a. Testicular Fibrotic Lesions and semen quality in adult montana tropical compound bulls. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*. 35, 105-110.

- Pinho, P.O., Costa, D.S., Siqueira, J.B., Martins, L.F., Teixeira, L.A., Guimarães, S.E.F.G., Guimarães, J.D., 2013b. Lack of relationship between testicular echotexture and breeding soundness evaluation in adult Nelore bulls. *Livestock Science*. 154, 246-249.
- Pozor, M., 2005. Diagnostic applications of ultrasonography to stallion's reproductive tract. *Theriogenology*. 64, 505-509.
- Rasband, W.S., 2005. Image J. U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, available at: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>(acessadoemOutubro 22, 2012).
- Rodrigues, M.H., Costa, D.S., Fonseca, F.A., 2012. Proliferation of seminiferous epithelium cells during the postnatal development in goats. *Animal Reproduction Science*. 135, 25-30.
- Schurich, M., Aigner, F., Frauscher, F., Pallwein, L., 2009. The role of ultrasound in assessment of fertility. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 144, 192-198.
- Swierstra, E.E., Gebauer, M.R., Pickett, B.W., 1974. Reproductive physiology of the stallion I. Spermatogenesis and testis composition. *Journal Reproduction Fertility*. 40, 113-123.