DANIEL DE SOUZA RAMOS ANGRIMANI

**Caracterização seminal e das alterações hemodinâmicas da
próstata e testículos de cães com hiperplasia prostática benigna**

São Paulo
2017

DANIEL DE SOUZA RAMOS ANGRIMANI

Caracterização seminal e das alterações hemodinâmicas da próstata e testículos de cães com hiperplasia prostática benigna

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Profa. Dra. Camila Infantsi Vannucchi

São Paulo
2017

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3586
FMVZ

Angrimani, Daniel de Souza Ramos
Caracterização seminal e das alterações hemodinâmicas da próstata e testículos de
cães com hiperplasia prostática benigna / Daniel de Souza Ramos Angrimani. – 2017.
137 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2018.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Profa. Dra. Camila Infantsi Vannucchi.

1. Finasterida. 2. 5a-redutase. 3. VEGF. 4. Doppler. 5. Caninos. I. Título.

ERRATA

ANGRIMANI, D. S. R. **Caracterização seminal e das alterações hemodinâmicas da próstata e testículos de cães com hiperplasia prostática benigna**. 2017. 137 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Página

Onde se lê

Leia-se

8

Finalmente, agradeço a **Universidade de São Paulo** e a **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia** que possibilitou este doutorado e a **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo auxílio financeiro, bolsa no país e bolsa estágio de pesquisa no exterior concedidas.

Finalmente, agradeço à **Universidade de São Paulo** e à **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia** que possibilitaram este doutorado; à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo auxílio financeiro com concessão de bolsa no país (Proc. FAPESP n. 2013/25966-5) e bolsa estágio de pesquisa no exterior (Proc. FAPESP n.2017/04102-3), e à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Fundação CAPES)**, que me concedeu bolsa que utilizei apenas um mês, mas que foi o auxílio com que iniciei esta jornada.

São Paulo, 23 de fevereiro de 2015

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Caracterização seminal e das alterações hemodinâmicas da próstata e testículos de cães com hiperplasia prostática benigna.", protocolado sob o CEUA nº 7122171213, utilizando 30 Cães (30 machos), sob a responsabilidade de Camila Infantsi Vannucchi, foi aprovado na reunião de 15/10/2014, e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "título em inglês", protocol number CEUA 7122171213, utilizing 30 Dogs (30 males), under the responsibility Camila Infantsi Vannucchi, was approved in the meeting of day 10/15/2014, and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: ANGRIMANI, Daniel de Souza Ramos

Título: Caracterização seminal e das alterações hemodinâmicas da próstata e testículos de cães com hiperplasia prostática benigna

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

“Às vezes não há nenhum aviso.

As coisas acontecem em segundos.

Tudo muda.

Você está vivo. Você está morto.

E as coisas continuam.

Afinal, somos finos como papel”

(Charles Bukowski)

Estes quatro anos, são dedicados para

Minha Luana,

Meus Pais,

Meus Mestres,

“My sign is vital

My hands are cold

And I’m on my knees

Looking for the answer

Are we human?

Or are we dancer?”

(The Killers - Human)

AGRADECIMENTOS

Para escrever bem, um escritor deve realizar sua obra na solidão. Infelizmente, estimado Ernest Hemingway, ou Ernie (para os mais íntimos), eu devo discordar de você. **Sim!** Eu discordo desta frase escrita na parede do meu quarto há mais de quatro anos. Para aprender a escrever bem, você deve ser afortunado em ser rodeado de **Amor**. Exatamente isso! Essa palavra de quadro letras muda, ilumina e enobrece a vida de qualquer um. Por quatro anos eu fui rodeado de Amor! E foi graças a este sentimento que eu mudei, me transformei e fui capaz de desenvolver este doutorado.

Portanto, primeiramente eu agradeço ao Amor incondicional da minha **Família**. Deve ser complicado ter eu como filho/irmão/tio. Sei que muitas vezes substitui meu tempo com vocês para alcançar meus objetivos, mas isso só acontece porque vocês me ensinaram a ser assim! **Pai**, muito obrigado por ter contado todas aquelas histórias antes de eu dormir! E por te me apresentado o Faulkner, o Bukowski, o Miller e tantos outros. Hoje eu sei que toda essa educação me faz questionar, pensar e ser criativo nas horas mais escuras. **Mãe**, obrigado por você ter me ensinado a respeitar e cuidar dos animais e por todos aqueles bichinhos que nós criamos! Você moldou meu Amor a Medicina Veterinária! Tudo isso, é claro, sob uma trilha sonora bem 70s ou 80s. **Irmã**, você com certeza será sempre minha primeira professora, de *Passa ou Repassa* a *Friends*, mas definitivamente, sua maior lição foi me dar a oportunidade de amar incondicionalmente a nossa **Manu!**

Durante os quatro anos de Doutorado muitas conquistas e surpresas aconteceram. Mas nenhuma delas jamais vai chegar perto de ter conhecido você, **Luana**. Começou em Pira, foi pra São Paulo, se esticou pra Bélgica e depois de Viena, nós viramos noivos! Você mudou o jeito de eu encarar o cotidiano e me preparar para o futuro. Agora tudo é intenso, verdadeiro e com muito Amor. Absolutamente, sem você, nada disso teria acontecido. Muito obrigado por você ser a vela e o vento do meu barquinho! Eu espero sempre navegar para o outro lado do mundo com você! (Com ou sem a FlixBus e Ryanair!). Te amo Bibizita!

Entre os *papers* e as aulas, vocês sempre estavam lá! Sem vocês, meus amigos, eu não teria sido capaz de desenvolver esse trabalho! **Brunão, Diego, Marcel, Givago,**

Renato, Cicinho, Tis e Mide MUITO obrigado pela irrestrita ajuda, conselhos e amizade.

Destarte todo o meu esforço e estudo, este trabalho nunca teria sido realizado se não fosse pela minha orientadora, a **Professora Camila**. Prô, muito obrigado por esta oportunidade de aprender! De fato, a educação muda as pessoas, e eu mudei MUITO nestes sete anos de USP. Olhando para trás, eu vejo como amadureci e aprendi. Tudo isso graças a você! Sou muito grato a todos os seus ensinamentos, conversas e conselhos. Não obstante, muito obrigado por você ter me preparado e me transformado em um professor. Isso é uma coisa que eu nunca esquecerei e serei eternamente agradecido a você!

Professor Marcilio! Meu amigo, parceiro de pôquer, conselheiro e claro, co-orientador! Marcilião, é impossível pontuar tudo o que eu aprendi com você! Mas dentre tudo, te agradeço pelo mais impossível: Por você me ensinar a rodar estatística. Você foi a única pessoa no mundo capaz de me ensinar matemática! Você é a pessoa mais genial que já conheci, mas ao mesmo tempo mais generosa e humilde! Eu espero, um dia, ser 1% do que você é! O mundo mudaria se todas as pessoas fossem como você! Obrigado por ter me confiado e me ajudado a ir para a Bélgica! Você foi responsável por realizar um dos sonhos mais incríveis da minha vida! *Alstublieft!*

Ainda, agradeço a todos os membros da velha guarda (Gi, Cris, Li e Fer) e da new generation (Re, Má, Le, Thay, Renatao e Beto) do **Laboratório de Inseminação Artificial, Patologia e Perinatologia**, obrigado pela ajuda diária, eu aprendi muito com todos vocês! Também agradeço a equipe do **Laboratório de Andrologia** (onde também me sinto em casa), em especial a Dredz, Giulia, Barbara e Bob.

Agradeço a estrutura que possibilitou tudo isso: o VRA e todos os seus funcionários. Em especial, a **Claudia Pereda**. Clau, muito obrigado pela ajuda nesse projeto, pelas risadas e conselhos! Você é mais do que fundamental no VRA! Ademais, agradeço a **Priscila** (LDH) pelo o suporte nas dosagens hormonais, **Camilla** (BioSptz) pelo auxílio no PCR e também a **Harumi, Miguel, Thais, Roberta, Loide, Luiz, Ira, Belau, Dona Sandra, Dona Teresa e Joci**.

Em especial, eu agradeço ao Departamento de Patologia da FMVZ-USP. A **Prof. Cristina Massoco**, a **Nicole** e o **Daniel**, pelo auxílio na citometria de fluxo. Ao **Prof. Bruno Cogliati** pelo suporte na imunohistoquímica. E ao **Danilo** por me ajudar a interpretar as lâminas histológicas.

Ainda, obrigado a toda a equipe **Cutucando a Próstata!** Gus, Ingrid, Gi, Bibiz e as ICs (Gi e Carol), muito obrigado! As orquiectomias e as biópsias não teriam sido tão especiais se não fosse a ajuda de cada um de vocês. Valeu!

Aproveito para agradecer a todos os **Professores do VRA** que me ajudaram nesta trajetória, em especial: Prof. Mayra, Prof. Ricardo, Profa. Claudia e Profa. Eneiva. Obrigado por compartilhar o conhecimento de vocês!

Também, agradeço de coração a Família Bicudo. **Prof. Sony** e **Sara**, muito obrigado pelos conselhos, conversas, pizzas fritas e por me receberem sempre como um filho!

Agradeço a todos os proprietários que gentilmente me auxiliaram nesse experimento, e também a todos os 25 cães participantes!

Furthermore, I would like to thanks my supervisor in Gent University, **Prof. Ann Van Soom**. Professor, thanks for the hospitality and the guidance during my stay in Gent. Also, **Nuria, Andres, Bart, Krishna, Tess, Eline, XaoLin, Kassia, Gretania, Myke** and **Petra** thanks to make my stay in Gent amazing and unforgettable.

Finalmente, agradeço a **Universidade de São Paulo** e a **Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia** que possibilitou este doutorado e a **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo auxílio financeiro, bolsa no país e bolsa estagio de pesquisa no exterior concedidas.

E por fim, almejo que o Ernie Hemingway não esteja totalmente errado, e espero que este trabalho, construído com Amor esteja *suficientemente bom, para a cada dia enfrentar a eternidade ou a ausência da eternidade.*

EPÍGRAFE

*When there's nowhere else to run
Is there room for one more son?
One more son
If you can hold on, If you can hold on, hold on*

*I wanna stand up, I wanna let go
You know, you know, no you don't, you don't
I wanna shine on, in the hearts of men
I want a meaning from the back of my broken hand*

*Another head aches, another heart breaks
I'm so much older than I can take
And my affection, well it comes and goes
I need direction to perfection, no no no no*

*Help me out, yeah
You know you gotta help me out, yeah
Oh, don't you put me on the back burner
You know you gotta help me out, yeah*

*And when there's nowhere else to run
Is there room for one more son?
These changes ain't changing me
The cold-hearted boy I used to be*

*Yeah, you know you gotta help me out, yeah
Oh don't you put me on the back burner
You know you gotta help me out, yeah
You're gonna bring yourself down, yeah
You're gonna bring yourself down*

*I got soul, but I'm not a soldier
I got soul, but I'm not a soldier
I got soul, but I'm not a soldier
I got soul, but I'm not a soldier
(Time, truth, and hearts)*

*Yeah, you know you gotta help me out, yeah
Oh don't you put me on the back burner
You know you gotta help me out, yeah*

*You're gonna bring yourself down, yeah
Oh don't you put me on the back burner
You're gonna bring yourself down, yeah
You're gonna bring yourself down*

*Over and in, last call for sin
While everyone's lost, the battle is won
With all these things that I've done*

*All these things that I've done
(Time, truth, and hearts)
If you can hold on, If you can hold on*

(The Killers – All the Things That I've Done)

RESUMO

ANGRIMANI, D. S. R. **Caracterização seminal e das alterações hemodinâmicas da próstata e testículos de cães com hiperplasia prostática benigna** [Seminal features and hemodynamic changes of the prostate and testes of dogs with benign prostatic hyperplasia]. 2017. 137 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A hiperplasia prostática benigna (HPB) é a doença de maior incidência em cães senis. Assim, a caracterização da patogênese da doença é de suma importância, tal como a avaliação de animais submetidos a tratamento clínico ou cirúrgico (terapia com finasterida e orquiectomia). Neste contexto, o objetivo dessa pesquisa foi caracterizar as alterações seminais, hormonais e hemodinâmicas da próstata e testículos de cães com HPB, submetidos a diferentes tratamentos. Assim, foram utilizados 25 cães entre doentes e hígidos e empregados as seguintes ferramentas experimentais: ultrassonografia Doppler com o intuito de caracterizar mudanças hemodinâmicas da próstata e testículos, imunohistoquímica e PCR para a expressão do fator VEGF na próstata, avaliação morfohistológica dos testículos, dosagem hormonal (testosterona, estrógeno e di-hidrotestosterona), análise andrológica, seminal e do estresse oxidativo e enzimas antioxidantes. Foi possível observar redução do escore de vascularização prostático (Doppler Colorido) em animais tratados com finasterida ou orquiectomizados, além de redução do volume prostático. O tratamento com finasterida reduziu a imunomarcagem para o VEGF na próstata, porém a orquiectomia também inibiu a expressão gênica do VEGF. A finasterida, ainda, reduziu os níveis séricos de di-hidrotestosterona, não causando impactos significativos na qualidade seminal. Já a HPB promoveu alterações significativas na concentração de testosterona e na qualidade seminal (baixa concentração espermática, alteração da cinética espermática e altos índices de fragmentação de DNA espermático). Em conclusão, a atividade prostática do VEGF é dependente da ocorrência de HPB e dos diferentes tratamentos empregados, promovendo diferenças na vascularização e volume prostático. Ademais, cães com HPB possuem alterações no perfil hormonal e na espermatogênese, porém o período de tratamento com finasterida (2 meses) favorece a recuperação da doença, auxiliando em novas abordagens de diagnóstico e prognóstico da hiperplasia prostática benigna em cães.

Palavras-chave: Finasterida, 5 α -redutase, VEGF, Doppler, caninos.

ABSTRACT

ANGRIMANI, D. S. R. Seminal features and hemodynamic changes of the prostate and testes of dogs with benign prostatic hyperplasia [**Caracterização seminal e das alterações hemodinâmicas da próstata e testículos de cães com hiperplasia prostática benigna**]. 2017. 137 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Benign prostatic hyperplasia (BPH) is the disease of highest incidence in senile dogs. Thus, it is essential to characterize the pathogenesis of the disease, including the evaluation of animals submitted to clinical or surgical treatment (finasteride therapy and orchiectomy). In this context, the aim of this study was to characterize BPH changes of dogs submitted to different treatments. Therefore, a total of 25 dogs were used (BPH and healthy), applying distinct experimental tools: Doppler ultrasonography to characterize prostatic and testicular hemodynamic changes involved, immunohistochemistry and PCR for the expression of prostatic VEGF factor, testicular morphohistologic analysis, hormonal assay (testosterone, estrogen and dihydrotestosterone), breeding soundness examination, seminal analysis and oxidative stress and antioxidant enzymes evaluation of the prostatic fluid. It was possible to observe a reduction in prostatic vascularization score (by Color Doppler) in finasteride treated and orchiectomized animals, with an additional reduction of the prostatic volume. Finasteride treatment reduced VEGF expression by immunohistochemistry, however, orchiectomy also reduced VEGF gene expression. In addition, finasteride treatment reduced dihydrotestosterone concentration, without significant impact to seminal quality. On the other hand, BPH promoted significant changes in testosterone concentration and seminal quality, such as poor sperm concentration, changes in the sperm kinetics and high rates of sperm DNA fragmentation. In conclusion, prostatic VEGF activity in dogs is dependent on the occurrence of BPH and different therapies, promoting also differences in prostatic vascularization and volume. Furthermore, dogs with BPH had hormonal and spermatogenesis changes, however, the short course of finasteride treatment (2 months) was able to favor the disease overcome, favoring the application of new approaches to HPB diagnosis and prognosis in dogs.

Keywords: Finasteride, 5 α reductase, VEGF, Doppler, canine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Delineamento experimental adotado no Experimento 1. São Paulo, 2017.....	46
Figura 2 – Imagem ultrassonográfica em modo bidimensional. Corte transversal da próstata (A) e testículo direito (B), evidenciando a biometria e ecogenicidade do parênquima.....	48
Figura 3 – Diagrama dos parâmetros de velocidade do fluxo sanguíneo para cálculo dos índices hemodinâmicos.....	49
Figura 4 – Imagem ultrassonográfica no modo Doppler. Aspecto de onda da artéria prostática (A) e artéria testicular (B).....	50
Figura 5 – Diferentes escores utilizados na avaliação qualitativa da vascularização prostática por meio do modo Doppler colorido em corte longitudinal. Escores de 1 a 3.....	50
Figura 6 – Escore de vascularização da próstata (1-3) nos grupos Tratamento com finasterida vs. Não tratado durante o período experimental.....	62
Figura 7 – Relação sístole:diástole (S/D) nos grupos HPB não tratado, HPB tratado com Finasterida, Hígido não tratado e Hígido tratado com Finasterida.....	63
Figura 8 – Média e erro padrão do volume prostático (VP - cm ³) e volume de próstata esperado (VPE - cm ³) nos grupos HPB não tratado, HPB tratado com Finasterida, Hígido não tratado e Hígido tratado com Finasterida nos dias 0 (A), 30 (B) e 60 (C). São Paulo, 2017.....	65
Figura 9 – Média e erro padrão do índice de resistência (PI) da artéria testicular nos animais tratados e não tratados com finasterida. São Paulo, 2017.....	66
Figura 10 – Média e erro padrão da concentração sérica de testosterona nos diferentes grupos experimentais (HPB não tratado, HPB tratado com Finasterida, Hígido não tratado e Hígido tratado com Finasterida). São Paulo, 2017.....	67

Figura 11 – Média e erro padrão dos níveis séricos de estrógeno nos diferentes grupos experimentais (Hígido vs. HPB), independente do tratamento com finasterida. São Paulo, 2017.....	68
Figura 12 – Média e erro padrão dos níveis séricos de di-hidrotestosterona nos diferentes grupos experimentais (Tratados com finasterida vs. não tratados), independente da ocorrência de HPB. São Paulo, 2017.....	68
Figura 13 – Média e erro padrão da porcentagem de espermatozoides com baixa atividade mitocondrial nos diferentes grupos experimentais (HPB não tratado, HPB tratado com Finasterida, Hígido não tratado e Hígido tratado com Finasterida). São Paulo, 2017.....	71
Figura 14 – Média e erro padrão da porcentagem de espermatozoides com velocidade rápida (A) e batimento flagelar cruzado (BCF - B) nos diferentes grupos experimentais (Hígido vs. HPB). São Paulo, 2017.....	72
Figura 15 – Média e erro padrão da porcentagem de espermatozoides com integridade de DNA espermático, avaliado pela coloração de azul de toluidina (A) e da susceptibilidade à fragmentação de DNA (SCSA - B) nos diferentes grupos experimentais (Hígido vs. HPB). São Paulo, 2017.....	73
Figura 16 – Cortes histológicos dos testículos de cães dos grupos experimentais: HPB não tratado (A), HPB tratado com Finasterida (B), Hígido não tratado (C) e Hígido tratado com Finasterida (D). 100x. São Paulo, 2017.....	74
Figura 17 – Diagrama gráfico das correlações estatísticas nos grupos relativos ao tratamento com finasterida. Setas verdes indicam correlações positivas, enquanto setas vermelhas indicam correlações negativas. São Paulo, 2017.....	75
Figura 18 – Diagrama gráfico das correlações estatísticas nos grupos relativos à HPB. Setas verdes indicam correlações positivas, enquanto setas vermelhas indicam correlações negativas entre as variáveis estudadas. São Paulo, 2017.....	76
Figura 19 – Fluxograma e biossíntese e metabolismo dos hormônios sexuais. São Paulo, 2017.....	81

Figura 20 – Delineamento experimental referente ao Experimento 2. São Paulo, 2017.....	86
Figura 21 – Realização de biópsia prostática guiado por ultrassom. São Paulo, 2017.....	88
Figura 22 – Média e erro padrão do índice de resistividade (RI) nos grupos Não tratado, Finasterida e Orquiectomia nos dias 0, 30 e 60. São Paulo, 2017.....	94
Figura 23 – Média e erro padrão para o escore de vascularização (1-3) da próstata nos grupos Não tratado, Finasterida e Orquiectomia nos dias 0, 30 e 60. São Paulo, 2017.....	94
Figura 24 – Média e erro padrão da relação sístole e diástole (S/D) da artéria prostática nos grupos Não tratado, Finasterida e Orquiectomia nos dias 0, 30 e 60. São Paulo, 2017.....	95
Figura 25 – Média e erro padrão do volume prostático (VP - cm ³) e volume de próstata esperado (VPE - cm ³) nos grupos Não tratado, Finasterida e Orquiectomia nos dias 0 (A), 30 (B) e 60 (C). São Paulo, 2017.....	97
Figura 26 – Avaliação do volume prostático nos grupos Não tratado, Finasterida e Orquiectomia. São Paulo, 2017.....	98
Figura 27 – Média e erro padrão da concentração de testosterona nos grupos Não tratado, Finasterida e Orquiectomia nos dias 0, 30 e 60. São Paulo, 2017.....	99
Figura 28 – Média e erro padrão da concentração de di-hidrotestosterona nos grupos Não tratado, Finasterida e Orquiectomia nos dias 0, 30 e 60. São Paulo, 2017.....	99
Figura 29 – Quantificação relativa (log2 - Fold change) do gene VEGF no tecido prostático. São Paulo, 2017.....	102
Figura 30 – (I) Áreas citoplasmáticas e de epitélio glandular imunomarcadas para VEGF-A (seta) nos grupos Não tratado (A), Finasterida (B) e Orquiectomia (C). 200x. (II) Médias e erro padrão do escore de imunomarcagem para VEGF-A nos grupos Não tratado, Finasterida e Orquiectomia.....	103
Figura 31 – Diagrama gráfico das correlações entre as variáveis-resposta nos grupos Não tratado, Finasterida e Orquiectomia. São Paulo, 2017.....	104

Figura 32 – Delineamento experimental da padronização das técnicas de avaliação do DNA espermático em cães. São Paulo, 2017.....	129
Figura 33 – Coloração de azul de toluidina. Espermatozoide canino apresentando fragmentação de DNA (seta A) e integridade de DNA (seta B).....	129
Figura 34 – Teste de dispersão da cromatina espermática. Espermatozoide canino apresentando núcleo com grande halo, considerado com DNA íntegro (seta A) e espermatozoide canino apresentando ausência de halo, considerado com fragmentação de DNA (seta B). Magnificação 1000x.....	130
Figura 35 – Gráfico de regressão linear para a padronização da técnica de integridade do DNA espermático por coloração de azul de toluidina. São Paulo, 2017.....	130
Figura 36 – Gráfico de regressão linear para padronização do teste de dispersão da cromatina espermática. São Paulo, 2017.....	131

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Poder do Teste e respectivas unidades experimentais (n), por grupo, nas comparações entre os grupos experimentais (HPB não tratado vs. Hígido não tratado vs. HPB tratado com Finasterida vs. Hígido tratado com Finasterida). São Paulo, 2017.....	47
Tabela 2 – Efeito da Hiperplasia Prostática Benigna (HPB vs. Hígido) na análise ultrassonográfica da próstata por Doppler. São Paulo, 2017.....	64
Tabela 3 – Efeito do tratamento com finasterida (tratado com finasterida vs. Sem tratamento) na análise da ultrassonografia Doppler dos testículos. São Paulo, 2017.....	66
Tabela 4 – Efeito do tratamento com finasterida (tratado com finasterida vs. não tratado com finasterida) na análise de libido e dos parâmetros seminais dos cães avaliados. São Paulo, 2017.....	69
Tabela 5 – Efeito da Hiperplasia Prostática Benigna (animais hígidos vs. com HPB) na análise de libido e dos parâmetros seminais. São Paulo, 2017.....	70
Tabela 6 – Efeito da Hiperplasia Prostática Benigna (animais hígidos vs. HPB) na análise computadorizada do sêmen (CASA). São Paulo, 2017.....	72
Tabela 7 – Valores de probabilidade para o efeito principal do tratamento (Não tratado vs. Orquiectomia vs. Finasterida) e tempo (Dias 0 vs. 30 vs. 60) e sua interação para as variáveis ultrassonográficas e concentração hormonal. São Paulo, 2017.....	93
Tabela 8 – Valores médios e erros padrão das variáveis hemodinâmicas da artéria prostática nos grupos Não tratado, Finasterida e Orquiectomia. São Paulo, 2017.....	96
Tabela 9 – Média e erro padrão da concentração de testosterona nos grupos Não tratado, Finasterida e Orquiectomia nos dias 0, 30 e 60 em relação aos valores de referência para animais hígidos e acometidos por HPB. São Paulo, 2017.....	100

Tabela 10 – Média e erro padrão da concentração de estrógeno nos grupos Não tratado, Finasterida e Orquiectomia nos dias 0, 30 e 60 em relação aos valores de referência para animais hígidos e acometidos por HPB. São Paulo, 2017.....	100
Tabela 11 – Média e erro padrão da concentração de di-hidrotestosterona nos grupos Não tratado, Finasterida e Orquiectomia nos dias 0, 30 e 60 em relação aos valores de referência para animais hígidos e acometidos por HPB. São Paulo, 2017.....	101
Tabela 12 – Valores de probabilidade para o efeito dos tratamentos (HPB não tratado vs. HPB tratado com Finasterida vs. Hígido não tratado vs. Hígido tratado com Finasterida) e tempo (0, 30 e 60 dias) e sua interação para as variáveis experimentais. São Paulo, 2017.....	132
Tabela 13 – Efeito da Hiperplasia Prostática Benigna (animais hígidos vs. com HPB) na análise de citometria de fluxo e perfil oxidativo das amostras espermáticas. São Paulo, 2017.....	135
Tabela 14 – Efeito do tratamento com finasterida (não tratado vs. tratado com finasterida) na análise de citometria de fluxo e perfil oxidativo das amostras espermáticas. São Paulo, 2017.....	136
Tabela 15 – Valores de probabilidade para o efeito dos tratamentos (Não tratado vs. Orquiectomia vs. Finasterida) e tempo (Dias 0 vs. 30 vs. 60) e sua interação nas variáveis ultrassonográficas e concentração sérica de estrógeno. São Paulo, 2017.....	137

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Idade, peso, raça e distribuição dos cães (n=20) nos grupos experimentais. São Paulo, 2017.....	45
Quadro 2 – Idade, peso, raça e distribuição dos cães nos grupos experimentais (n=15). São Paulo, 2017.....	85
Quadro 3 – Sequência de oligonucleotídeos dos genes VEGF, B2M e GAPDH. São Paulo, 2017.....	91
Quadro 4 – Idade, peso, raça e parâmetros seminais (motilidade, vigor e concentração) dos cães selecionados (n=6). São Paulo, 2017.....	128

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
2	REVISÃO DE LITERATURA	28
2.1.	Anatomia da próstata	28
2.2.	Funções da próstata	29
2.3.	Hiperplasia Prostática Benigna (HPB)	29
2.3.1.	ETIOPATOGENIA	30
2.3.1.1.	Homeostase oxidativa na HPB	31
2.3.1.2.	Ação do VEGF na HPB	32
2.3.2.	SINAIS CLÍNCOS	33
2.3.3.	DIAGNÓSTICO	33
2.3.3.1.	Anamnese	34
2.3.3.2.	Exame físico	34
2.3.3.3.	Exames de imagem	34
2.3.3.4.	Espermograma	35
2.3.3.5.	Exame histopatológico	36
2.3.4.	TRATAMENTO	37
2.4.	Perspectivas decorrentes do estudo da hiperplasia prostática benigna	38
3	HIPÓTESE	41
4	CAPÍTULO 1: Avaliação dos efeitos da finasterida na próstata e testículos de cães isentos e acometidos por HPB.	43
4.1	Material e Métodos	43
4.1.1.	ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS	43
4.1.1.1.	Delineamento Experimental	46
4.1.2.	ANÁLISE DO PODER DE TESTE	46
4.1.3.	AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA	47
4.1.3.1.	Avaliação ultrassonográfica bidimensional.	47
4.1.3.2.	Avaliação ultrassonográfica por Doppler espectral.	48
4.1.3.3.	Avaliação ultrassonográfica por Doppler colorido.	50
4.1.4.	AVALIAÇÃO DA LIBIDO	51
4.1.5.	ANÁLISES SEMINAIS	51

4.1.5.1. Exames imediatos do sêmen (motilidade e vigor, concentração e morfologia espermática).....	51
4.1.5.2. Testes espermáticos funcionais (integridade de membrana acrossomal e plasmática, atividade mitocondrial e fragmentação de DNA).....	52
4.1.5.3. Análise da integridade do DNA espermático.....	54
4.1.5.4. Análise por citometria de fluxo (integridade das membranas acrossomal e plasmática e potencial de membrana mitocondrial)	56
4.1.5.5. Perfil oxidativo e antioxidante do fluido prostático	57
4.1.6. PERFIL HORMONAL	58
4.1.7. ORQUIECTOMIA	58
4.1.8. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DOS TESTÍCULOS	59
4.1.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	59
4.2. Resultados	61
4.2.1. AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA DA PRÓSTATA.....	62
4.2.2. AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA DOS TESTÍCULOS.....	65
4.2.3. AVALIAÇÃO DO PERFIL HORMONAL	67
4.2.4 AVALIAÇÃO SEMINAL	68
4.2.5. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DOS TESTÍCULOS	74
4.3. Discussão	77
5 CAPÍTULO 2: Comparação dos efeitos prostáticos do tratamento cirúrgico (orquiectomia) e medicamentoso (finasterida) na HPB em cães.	84
5.1. Material e Métodos	84
5.1.1. ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS	84
5.1.1.1. Delineamento Experimental	86
5.1.2. AVALIAÇÃO ULTRASONOGRÁFICA.....	87
5.1.3. PERFIL HORMONAL	87
5.1.4. ORQUIECTOMIA	87
5.1.5. BIÓPSIA PROSTÁTICA	87
5.1.6. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DO FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL (VEGF-A) NO PARÊNQUIMA PROSTÁTICO	88
5.1.7. AVALIAÇÃO POR PCR QUANTITATIVO (<i>REAL TIME</i>) DO VEGF NO PARÊNQUIMA PROSTÁTICO	90
5.1.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	91

5.2. Resultados	92
5.2.1. AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA	93
5.2.2. AVALIAÇÃO DO PERFIL HORMONAL	98
5.2.3. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO VEGF NO PARÊNQUIMA PROSTÁTICO POR PCR QUANTITATIVO (<i>REAL TIME</i>)	101
5.2.4. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DO FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL (VEGF-A) NO PARÊNQUIMA PROSTÁTICO	102
5.3. Discussão	104
6 CONCLUSÕES	110
7 REFERÊNCIAS	113

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a senescência em cães vem ascendendo como foco de estudo em diferentes especialidades ligadas à Medicina Veterinária (WATERS, 2014). Tal fato decorre da maior longevidade da espécie canina que, como em humanos, a cada ano observa-se aumento da expectativa de vida (CREEVY et al., 2016). Diferentes teorias acerca do envelhecimento biológico foram desenvolvidas, porém o centro em comum é a perda da funcionalidade progressiva com a idade, com o consequente aumento da susceptibilidade e incidência de doenças (WALLIS et al., 2016). Assim, os médicos veterinários depararam-se com diversas afecções intercorrentes da senilidade, até então não observadas e tampouco estudadas. Na andrologia, destaca-se a diminuição do potencial fecundante, justificada por alterações seminais e prostáticas, em razão do desenvolvimento de alterações reprodutivas.

A senescência está intimamente relacionada à ocorrência da hiperplasia prostática benigna (HPB), condição análoga em homens e cães não orquiectomizados, caracterizada por aumento do número (hiperplasia) e tamanho (hipertrofia) das células prostáticas, acompanhada de angiogênese local (KRAWIEC; HEFLIN, 1992; MEMON, 2007; KIM et al., 2011). Segundo estudo clássico de Berry et al. (1986), a incidência de HPB em cães é de 16%, 50% e 95% aos 2, 5 e 9 anos de idade, respectivamente. Todavia, a afecção terá característica sintomática apenas quando o aumento do volume glandular promover a compressão de segmentos dos tratos urinário e/ou intestinal, resultando em sinais clínicos como constipação, tenesmo, polaquiúria, disúria, hematúria e hematospermia (BADAWY; ABDELHAFEZ; ABUZEID, 2012; ZELLI et al., 2013).

Além dos referidos sinais clínicos, a senescência, concomitante ou não às alterações prostáticas, desencadeia o estresse oxidativo local, ocasionando acúmulo de espécies reativas de oxigênio e diminuição da defesa antioxidante nos segmentos do trato reprodutivo (PACE et al., 2010). Aydin et al. (2006), em estudo comparativo de HPB e tumor prostático em homens, observaram alterações nos marcadores de peroxidação lipídica (TBARS) e enzimas antioxidantes em ambas condições patológicas. Ainda, segundo Wallis et al. (2016), o envelhecimento é agravado pelo acúmulo de lesões provocadas pelos radicais livres (substâncias

químicas altamente instáveis), principalmente as espécies reativas de oxigênio (EROs) nos componentes celulares, levando à perda de funcionalidade e afecções no decorrer da vida. Portanto, a precisa análise do perfil oxidativo e antioxidante na hiperplasia prostática benigna pode, eventualmente, ser utilizado futuramente como ferramenta de diagnóstico, prognóstico e mesmo contribuindo com informações acerca da etiopatogenia da doença.

A etiologia da HPB decorre do conhecido desequilíbrio hormonal, no qual a di-hidrotestosterona (DHT) atua como hormônio chave no desenvolvimento da afecção. Entretanto, a completa explicação endocrinológica da etiologia da doença não está elucidada (WOLF et al., 2012). Sabe-se que a testosterona é convertida em DHT pela enzima 5 α -redutase, presente nos tecidos responsivos a andrógenos, e que tal biotransformação intensifica-se na senilidade, bem como as maiores concentrações séricas de testosterona e estrógeno (IEHLÉ et al., 1995; LANGE et al., 2001). Por tais motivos, as causas endocrinológicas envolvidas na HPB precisam ser melhor compreendidas, de forma a trazer maiores informações sobre sua etiologia, tanto na espécie canina como em homens.

Atualmente, o diagnóstico presuntivo da HPB é clínico, associado a exames de imagem, principalmente, a ultrassonografia. Todavia, dentre tais avaliações, ainda não foi encontrado sinais patognomônicos da doença, sendo o diagnóstico definitivo realizado apenas por meio da biópsia da próstata (ZELLI et al., 2013). Desta forma, a ultrassonografia Doppler surge como alternativa para elucidar a etiopatogenia e auxiliar o diagnóstico da HPB (KOJIMA et al., 1997). Ozdemir et al. (2005) observaram aumento dos índices de resistividade intravascular (RI) da próstata de homens doentes, em comparação aos hígidos. Porém, Zelli et al. (2013), em estudo com cães, não relataram diferenças hemodinâmicas por ultrassonografia Doppler na presença ou ausência da HPB. Portanto, maiores estudos acerca da HPB são necessários, com abordagem na análise hemodinâmica e vascularização da próstata hipertrófica. Ainda, acredita-se que o aumento do número de vasos sanguíneos, bem como da permeabilidade vascular e proliferação celular, ocorrem por maior expressão do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), presente em diversas afecções prostáticas, como neoplasias, prostatites e hiperplasia prostática benigna (WALSH et al., 1999). Assim, a detecção do VEGF no tecido prostático pode ser capaz de prever o estágio da afecção e a evolução clínica do paciente, além de permitir o desenvolvimento de marcadores moleculares

importantes para o uso na prática clínica (BOTELHO et al., 2010). Fortalecendo tais assertivas, Lekas et al (2006) sugerem que o tratamento medicamentoso para a redução do volume prostático deva associar à diminuição da expressão do fator de crescimento vascular (VEGF) e do fator de indução de hipóxia 1 α (HIF-1 α).

Para o tratamento medicamentoso da hiperplasia prostática benigna, preconiza-se a instituição da finasterida, inibidor sintético da enzima 5 α -redutase. Ao bloquear a ação enzimática, o tratamento resulta em diminuição dos níveis séricos de DHT e, conseqüentemente, no diâmetro e volume prostático, reduzindo os sinais clínicos da afecção (KAPLAN, 2001). Portanto, a finasterida vem sendo amplamente utilizada como o fármaco de escolha para controlar os efeitos da hiperplasia prostática benigna na espécie humana (PARSONS et al., 2012). Para os cães, a terapia medicamentosa surge como alternativa para o tratamento cirúrgico (orquiectomia), principalmente, no caso de cães reprodutores de alto valor genético (LAROQUE et al., 1995). Contudo, alguns estudos em homens relatam que a Finasterida pode impactar a qualidade espermática, promovendo oligospermia e azoospermia (CHIBA et al., 2011; TU; ZINI, 2011). Embora Samplaski et al. (2013), tenham sugerido o retorno da produção espermática após a interrupção do tratamento, Vidigal et al. (2008), em estudo com hamsters, observaram redução da espermatogênese e atrofia dos túbulos seminíferos, o que indicaria efeito severo do medicamento, possivelmente irreversível. Por tais motivos, estudos direcionados à produção espermática são necessários, principalmente, ao se considerar a espécie canina como modelo experimental de escolha para o homem, por haver semelhança funcional e morfológica do aparelho reprodutor (KRIEGER; REIN, 1982; KIRCHHOFF, 2002).

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

A presente revisão de literatura tem como intuito compilar informações acerca da morfofisiologia da próstata, assim como a etiologia, desenvolvimento e abordagem clínica da Hiperplasia Prostática Benigna.

2.1. Anatomia da próstata

A próstata é a única glândula sexual acessória nos cães (BARSANTI; FINCO, 1986). Localiza-se topograficamente ventral ao reto, dorsal à sínfise púbica, caudal à bexiga e envolve completamente a uretra proximal (SMITH, 2008). A glândula é dividida em dois lóbulos pelo septo médio e é constituída por um conjunto de 30 a 50 glândulas tubulares acessórias, por estroma e envolta por cápsula fibromuscular espessa (VANNUCCHI et al., 1997; SMITH, 2008). A localização anatômica da próstata nos cães é a região pélvica, entretanto, com o decorrer da idade e em animais não orquiectomizados, pode-se localizá-la em região abdominal por aumento glandular gradativo (BARSANTI; FINCO, 1986). O tamanho e o peso da próstata alteram-se de acordo com a raça, idade e peso corpóreo do animal (BUSH, 1988).

A principal artéria responsável pela irrigação sanguínea da glândula é a artéria prostática, a qual penetra na próstata dorso-lateralmente, originando-se da artéria pudenda interna (STEFANOV, 2004). Já a rede venosa é formada pelas veias prostáticas e uretrais as quais desembocam na veia ilíaca (STEFANOV, 2004). Os vasos linfáticos drenam em direção aos linfonodos ilíacos e a inervação da glândula prostática é realizada pelo nervo hipogástrico (controle simpático) e pelo nervo pélvico (controle parassimpático) (SMITH, 2008).

A próstata de homens e cães são similares embriologicamente, anatomicamente e nas funções fisiológicas, além de possuírem a predisposição à hiperplasia prostática benigna com o decorrer da idade (KRIEGER; REIN, 1982).

2.2. Funções da próstata

A principal propriedade fisiológica da próstata é a produção de fluido prostático, representado pela primeira e terceira fração do ejaculado canino. O papel desempenhado pelo plasma seminal é fornecer o suporte e transporte para os espermatozoides durante a ejaculação (SMITH, 2008). A composição do fluido prostático em cães é basicamente de citrato, lactato, colesterol, sais, glicoproteínas, tais como a CPSE (proteína específica prostática canina) e antioxidantes enzimáticos, como a superóxido dismutase e glutathione peroxidase (FRENETTE et al., 1985; ANGRIMANI et al., 2014; KRAKOWSKI et al., 2015; HOLST et al., 2017)

Ademais, a próstata desempenha função primordial na dinâmica da testosterona (IEHLÉ et al., 1995), pois é responsável pela metabolização da testosterona livre em di-hidrotestosterona (DHT), pela ação da enzima 5 α -redutase (SHIDAIFAT; LIN, 2012). Dentre as funções da DHT, está a formação dos órgãos genitais externos masculinos durante a fase do desenvolvimento embrionário (AMORY et al., 2008). A deficiência na produção de DHT favorece o aparecimento de quadros de pseudo-hermafroditismo em humanos (SHABIR et al., 2015). Em adultos, a DHT contribui para a manutenção da homeostase entre os processos de proliferação e apoptose celular (CARSON; RITTMASER, 2003).

2.3. Hiperplasia Prostática Benigna (HPB)

O cão é a única espécie doméstica conhecida por desenvolver a HPB, sendo esta a afecção de maior incidência dentre os distúrbios de próstata em caninos machos, adultos e não castrados (BERRY; COFFEY; EWING, 1986; BAUZAITE; ANIULIENE, 2003). A HPB é homóloga entre caninos e homens, perfazendo o cão o modelo de estudo ideal da doença (GILMORE; GREER, 2015). Tanto em homens, quanto em cães, a hiperplasia prostática benigna está intimamente relacionada à senescência. O estudo clássico de Berry et al. (1986) demonstrou que a incidência de HPB em cães é de 16%, 50% e 95%,

respectivamente, aos 2, 5 e 9 anos de idade. Ainda, Barsanti; Finco (1986) descrevem a incidência da afecção em 40%, 80% e 95%, respectivamente, entre 2, 5 e aos 6 e 9 anos de idade.

O aumento simétrico da próstata inicia-se mesmo em animais jovens, ocorrendo acréscimo no número (hiperplasia) e tamanho (hipertrofia) das glândulas secretoras. Tal aumento possui característica de proliferação primariamente epitelial, com pouco envolvimento estromal, sem significado clínico (GALVÃO et al., 2011; MANTZIARAS et al., 2017). Contudo, com o decorrer do tempo, pode ocorrer o aumento acentuado da próstata, com aparecimento de sinais clínicos que caracterizam a afecção.

2.3.1. ETIOPATOGENIA

A etiopatogenia da HPB ainda não está totalmente elucidada. Porém, sabe-se que para o desenvolvimento da hiperplasia prostática benigna, há desequilíbrio hormonal inicial, sendo que cães doentes secretam 40% menos testosterona e 60% mais estradiol comparados aos animais hígidos (COCHRAN; EWING; NISWENDER, 1981). Acredita-se que altos níveis de estrogênio circulantes estimulam ao aumento do número de receptores androgênicos no tecido prostático (KRAWIEC, 1994; LEE, 1996), promovendo maior conversão de testosterona, pela enzima 5 α -redutase, em di-hidrotestosterona (IEHLÉ et al., 1995; LANGE et al., 2001; CARSON; RITTMASER, 2003). Assim, altas concentrações de DHT acarretam em maior proliferação celular no parênquima prostático, em comparação à morte celular, caracterizando a hiperplasia e hipertrofia da próstata (CARSON; RITTMASER, 2003). Ademais, supõe-se que altas quantidades de DHT na HPB estimulem a ação local de fatores de crescimento e catecolaminas, as quais contribuem para o aumento das dimensões e contratilidade da próstata (SHAPIRO; TSITLIK; LEPOR, 1987; BARTSCH; RITTMASER; KLOCKER, 2002; CARSON; RITTMASER, 2003).

2.3.1.1. Homeostase oxidativa na HPB

O aumento nos receptores androgênicos no tecido prostático pode estimular, ainda, a formação de metabólitos com atividade semelhante aos radicais livres, os quais desencadeiam o estresse oxidativo, resultando em acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROS) e diminuição da defesa antioxidante local (PACE et al., 2010). Fisiologicamente, as espécies reativas de oxigênio encontram-se em equilíbrio com os antioxidantes, no entanto, quando este balanço é rompido, caracteriza-se o estresse oxidativo (KASHOU; SHARMA; AGARWAL, 2013). Sabe-se que o organismo produz fisiologicamente antioxidantes que minimizam os efeitos das EROS em condições naturais (MICHAEL et al., 2009; BARNABE et al., 2012). Dentre os antioxidantes enzimáticos encontrados no sêmen ejaculado, destacam-se a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxirredoxinas (Prx), glutathione (GSH), glutathione redutase (GR) e glutathione peroxidase (GPx) (NORDBERG; ARNÉR, 2001; BIRBEN et al., 2012; ANGRIMANI et al., 2014).

Aydin et al. (2006), em estudo comparativo da HPB e tumor prostático em homens, relataram diminuição nos níveis de glutathione peroxidase (GPx) durante a HPB, possivelmente por maior consumo antioxidante no estresse oxidativo agudo relacionado à hiperplasia prostática benigna (GARCIA-DIAZ et al., 2015; LI et al., 2015). Por outro lado, Pace et al. (2010) não observaram alterações nas concentrações de superóxido dismutase (SOD) no plasma sanguíneo de humanos acometidos pela HPB. Os referidos autores justificam tal resultado como preservação do tecido prostático, pois a produção da enzima SOD altera-se apenas em casos graves e crônicos de afecções prostáticas (LI et al., 2015).

Até o momento, não há estudos caracterizando o perfil das enzimas antioxidantes no plasma seminal de cães acometidos por HPB. Portanto, a análise criteriosa do sistema antioxidante na afecção faz-se necessária, pois podem, eventualmente, serem utilizadas como ferramentas de diagnóstico e prognóstico.

2.3.1.2. Ação do VEGF na HPB

Durante o processo de hiperplasia da próstata, ocorre a formação de pequenos cistos intraparenquimatosos contendo líquido sanguíneo ou sero-sanguíneo, além de angiogênese local, os quais propiciam sangramento prostático (KRAWIEC; HEFLIN, 1992; MEMON, 2007; KIM et al., 2011). Acredita-se que o aumento do número de vasos sanguíneos, bem como a permeabilidade vascular e proliferação celular, ocorrem por ação do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), presente em diversas afecções prostáticas, como neoplasias, prostatites e hiperplasia prostática benigna em homens (WALSH et al., 1999) e cães (PALMIERI, 2015). A expressão de VEGF é modulada diretamente proporcional à concentração do DHT, ou seja, na HPB ocorre maior expressão de VEGF, em função do aumento das concentrações de DHT (CARSON; RITTMASER, 2003).

O VEGF, importante agente mitogênico, já foi identificado na próstata de homens com HPB, estimulando a proliferação de células endoteliais, bem como o aumento da vascularização local (STACHON et al., 2009). Ainda, Kim et al. (2011) relacionam a maior expressão de VEGF ao aumento na expressão de COX-2 durante a HPB, caracterizando uma inflamação crônica.

Fortalecendo tais assertivas, Lekas et al (2006) sugerem que o tratamento medicamentoso para a redução do volume prostático deve ser associado à diminuição da expressão do fator de crescimento vascular (VEGF) e do fator de indução de hipóxia 1α (HIF-1 α). Assim, a detecção do VEGF pode ser capaz de prever precocemente o diagnóstico da hiperplasia prostática, permitindo o desenvolvimento de marcadores moleculares importantes para o uso na prática clínica (BOTELHO et al., 2010).

2.3.2. SINAIS CLÍNCOS

Nos cães, a HPB pode apresentar-se de forma assintomática, portanto, a hiperplasia prostática pode ser um achado incidental durante os exames de rotina em cães idosos. Todavia, a afecção terá característica sintomática quando o aumento de volume glandular promover a compressão de segmentos dos tratos urinário e/ou intestinal, resultando em sinais clínicos como constipação, tenesmo, alterações no diâmetro das fezes, polaquiúria, disúria, hematúria e hematospermia (BADAWY; ABDELHAFEZ; ABUZEID, 2012; ZELLI et al., 2013). Em alguns casos, os animais podem apresentar secreção uretral sero-sanguínea à sanguínea (READ; BRYDEN, 1993).

Assim como nos cães, em homens, a maior prevalência ocorre em indivíduos idosos, causando principalmente alterações de micção por compressão da uretra prostática (PATEL; PARSONS, 2014). Contudo, esta condição clínica é rara em cães, visto que, em humanos, a hiperplasia da próstata é caracterizada pela proliferação estromal, ocasionando invasão e obstrução da uretra, enquanto, em cães, o crescimento é centrífugo em todas as direções, envolvendo principalmente o tecido glandular (BLACK et al., 1998; TESKE et al., 2002; PALMIERI et al., 2014).

2.3.3. DIAGNÓSTICO

Atualmente, o diagnóstico presuntivo da HPB é clínico, associado a exames de imagem, principalmente a ultrassonografia. Todavia, dentre tais avaliações, ainda não foram encontrados sinais patognomônicos da doença, sendo o diagnóstico definitivo realizado apenas por meio da biópsia da próstata (ZELLI et al., 2013).

2.3.3.1. Anamnese

No paciente que apresenta sinais clínicos sugestivos de HPB, deve ser investigado o histórico clínico e reprodutivo. Assim, os proprietários devem ser questionados sobre padrões de urina e fezes, pois é comum o aparecimento de fezes em fita ou de forma cônica, por compressão do reto pelo próstata hipertrofiada. Além disto, nos cães, associa-se tenesmo e disquesia. Sinais urinários, tais como, hematúria, descarga prepucial e disúria também são comuns em cães com doença prostática (SMITH, 2008).

2.3.3.2. Exame físico

Durante o exame físico, a realização do toque transretal é imprescindível, sendo o melhor método clínico para avaliação da próstata. Pode-se realizar concomitante ao toque retal, pressão na região ventral à bexiga com a mão oposta, com o intuito de direcionar a próstata ao canal pélvico, facilitando o exame. A glândula acometida pela HPB irá apresentar-se significativamente aumentada, com consistência firme, contornos regulares, superfície lisa, móvel e indolor (JOHNSTON; KUSTRITZ; OLSON, 2001; SMITH, 2008). Ainda, é possível evidenciar o sulco dorsal, diferenciando os dois lóbulos da glândula (SMITH, 2008).

2.3.3.3. Exames de imagem

Os exames de imagem de escolha para auxiliar no diagnóstico da HPB são a radiografia e ultrassonografia. Ao exame radiográfico, a glândula terá volume aumentado, podendo deslocar cranialmente a bexiga e dorsalmente, o reto (ATALAN; HOLT; BARR, 1999). Ainda, em casos de HPB, a próstata irá ocupar 70% ou mais da distância entre a face cranial do osso púbico ao sacro em projeção radiográfica lateral (PROVIDE; FOLLOWING, 2015).

Ao exame ultrassonográfico, observa-se aumento de volume simétrico da próstata, com a cápsula lisa permanecendo com margens regulares. Além disto, o parênquima prostático apresenta-se homogêneo a levemente hiperecótico, com pequenos cistos parenquimatosos preenchidos por líquido (RUSSO; VIGNOLI; ENGLAND, 2012).

Atualmente, na rotina veterinária, o diagnóstico presuntivo da HPB é clínico, associado à ultrassonografia. Porém, ainda não foram encontrados sinais ultrassonográficos patognomônicos da doença, assim, a ultrassonografia Doppler surge como alternativa para auxiliar no diagnóstico da HPB (KOJIMA et al., 1997). Ozdemir et al. (2005) observaram aumento dos índices de resistividade intravascular (RI) da próstata de homens doentes, em comparação aos hígidos. Porém, Zelli et al. (2013), em estudo com cães, não relataram diferenças no índice de resistividade intravascular (RI) por ultrassonografia Doppler na presença ou ausência da HPB, apenas constatarem diferenças na velocidade do fluxo sanguíneo. Corroborando tais achados, Gunzel-Apel et al. (2001) descreveram alterações significativas nos índices de pico sistólico, diastólico (PS e ED, respectivamente) e na velocidade média (TAMAX) em cães com HPB. Portanto, há poucos estudos utilizando a ultrassonografia Doppler para caracterizar a cinética da perfusão vascular da próstata durante a HPB. Desta forma, novas pesquisas devem ser estimuladas, pois a ferramenta apresenta-se como um método válido de avaliação clínica não invasiva (RUSSO; VIGNOLI; ENGLAND, 2012).

2.3.3.4. Espermograma

A análise do sêmen pode auxiliar no diagnóstico presuntivo de HPB, embora possa ser considerado achado incidental durante o espermograma de rotina. O líquido prostático colhido por massagem peniana em cães acometidos por hiperplasia prostática benigna caracteriza-se pela coloração translúcida ou vermelho-acastanhada (KUSTRITZ, 2006). Ocasionalmente, hemácias, assim como, células de descamação podem estar presentes na terceira fração do ejaculado canino, entretanto, o grande número de eritrócitos pode indicar hemorragias agudas ou crônicas, características da HPB (LING et al., 1983).

A hematospermia pode predispor ao estresse oxidativo local, ocasionando efeitos deletérios na qualidade seminal, podendo influenciar na motilidade espermática, porcentagem de defeitos morfológicos e até mesmo na maior fragmentação de DNA espermático (KRAKOWSKI et al., 2015; LI et al., 2015)

2.3.3.5. Exame histopatológico

O diagnóstico definitivo de HPB é realizado apenas por meio do exame histopatológico, por meio da biópsia da próstata guiada por ultrasonografia (SMITH, 2008; ZELLI et al., 2013). A alternativa do exame citológico por punção aspirativa por agulha fina (PAAF) não evidencia resultados desejados, pois a citologia não aponta características estruturais e patognomônicas da HPB (PAULA et al., 2011).

Desta maneira, para a realização da biópsia, o animal deve estar sob anestesia geral e um cateter uretral deve ser introduzido para a visualização da uretra prostática. A agulha Tru-Cut geralmente é utilizada e o ultrassom deve ser empregado para o rastreamento da próstata (HAYDEN et al., 1992; KUSTRITZ, 2006; PACLIKOVA; KOHOUT; VLASIN, 2006). As complicações mais comuns relativas à biópsia prostática são hematúria, hematospermia e lesão uretral (KUSTRITZ, 2006).

Durante o exame histopatológico da próstata canina, é possível observar dois padrões histológicos, a hiperplasia prostática glandular (HPg) e a hiperplasia prostática cística (HPc). A HPg é caracterizada por aumento simétrico da glândula, com proliferação apenas de células secretoras, com projeção do epitélio hiperplásico e hipertrófico em direção centrífuga ao lúmen alveolar (epitélio glandular) (DEKLERK et al., 1979; SHIMOMURA et al., 2009) Tal condição pode ser observada em cães com aproximadamente dois anos e meio de idade, evoluindo por volta dos quatro anos para a HPc, na qual é possível observar pequenos cistos contendo líquido no interior do parênquima (DEKLERK et al., 1979; BLACK et al., 1998). Histologicamente, a HPc é caracterizada pela presença de epitélio cúbico, com formação de cavidades e aumento na relação estroma:epitélio, além de áreas de atrofia e hiperplasia glandular (DEKLERK et al., 1979; SHIMOMURA et al., 2009)

2.3.4. TRATAMENTO

O tratamento de escolha para a HPB nos cães é a orquiectomia. Nos casos assintomáticos da doença, o tratamento não é necessário, pois a terapia tem como objetivo cessar os sinais clínicos e reduzir o tamanho da próstata (POLISCA et al., 2013).

Nenhuma terapia medicamentosa, até hoje, assemelhou-se ao procedimento cirúrgico em relação à eficácia para reduzir o tamanho da próstata e interromper os sinais clínicos da afecção a longo prazo (WHITE, 2000). A cirurgia causa resolução dos sinais clínicos da HPB à quarta semana após a gonadectomia, e redução do tamanho prostático em 70% à nona semana aproximadamente (JOHNSTON; KUSTRITZ; OLSON, 2001). Todavia, a orquiectomia não é considerada como primeira escolha para cães reprodutores de alto valor genético, ou para animais nos quais o estado clínico geral contraindique o procedimento cirúrgico (LAROQUE et al., 1995). Desta forma, terapias medicamentosas podem ser alternativas à orquiectomia, entretanto, o tratamento clínico apresenta resultados transitórios quanto à redução da próstata.

Como alternativa terapêutica, sugere-se a terapia estrogênica, uma vez que ocorre bloqueio da liberação do hormônio luteinizante pela hipófise e, desta maneira, declínio na produção de testosterona pelas células de Leydig (BAMBERGTHALEN; LINDEFORSBERG, 1993). Entretanto, tal tratamento está em desuso, por haver potencial tóxico e efeitos colaterais do estrogênio (SMITH, 2008). Assim, os análogos ou antagonistas de GnRH, os quais reduzem as concentrações de testosterona (por *feedback* negativo) surgiram como alternativa (POLISCA et al., 2013). Porém, não sobrepujam as vantagens da gonadectomia em cães, uma vez que interrompem a produção espermática e possuem alto valor no mercado (GOBELLO, 2006).

Desta forma, atualmente, preconiza-se para o tratamento da HPB a instituição da Finasterida, inibidor sintético da enzima 5 α -redutase. Ao bloquear a ação enzimática, o tratamento resulta em redução dos níveis séricos de DHT e, conseqüentemente, no diâmetro e volume prostático, cessando os sinais clínicos (KAPLAN, 2001). Trata-se do fármaco utilizado como medicamento de escolha para o tratamento da HPB na espécie humana (PARSONS et al., 2012), porém alguns

estudos apontam que a Finasterida pode causar disfunção erétil, perda da libido e da qualidade espermática, promovendo oligospermia e azoospermia (ROEHRBORN et al., 2002; GLINA et al., 2004; CHIBA et al., 2011; TU; ZINI, 2011).

Embora Samplaski et al. (2013) tenham sugerido o retorno da produção espermática após a interrupção do tratamento, Vidigal et al. (2008), em estudo com hamsters, observaram redução da espermatogênese e atrofia dos túbulos seminíferos, o que indicaria efeito severo do medicamento, possivelmente irreversível. Por tais motivos, estudos direcionados à produção espermática são necessários, principalmente ao se considerar a espécie canina como modelo experimental de escolha para o homem, por semelhança funcional e morfológica do aparelho reprodutor (KRIEGER; REIN, 1982; KIRCHHOFF, 2002).

Destarte tal semelhança, poucos estudos foram realizados até hoje caracterizando os efeitos colaterais da Finasterida em cães. Iguer-Ouda; Verstegen (1997) não observaram quaisquer alterações no ejaculado e fertilidade de cães tratados. Contudo, Sirinarumitr et al. (2001) relatam alterações no volume do ejaculado e Juniewicz et al. (1993) descrevem alterações na arquitetura das células de Leydig. Assim, novos estudos devem ser realizados utilizando avaliações mais acuradas, afim de caracterizar os reais efeitos da Finasterida em cães.

2.4. Perspectivas decorrentes do estudo da hiperplasia prostática benigna

Diante das distintas informações científicas arroladas nesta revisão de literatura, cabem algumas considerações, com o intuito de reforçar o potencial científico para o estudo da hiperplasia prostática benigna em cães.

Por ser a HPB homóloga entre caninos e homens, o cão configura o modelo biológico de estudo da afecção (GILMORE; GREER, 2015; SUN; BÁEZ-DÍAZ; SÁNCHEZ-MARGALLO, 2017). Desta forma, estratégias para aperfeiçoar o diagnóstico e tratamento da doença são imprescindíveis para a manutenção da função reprodutiva de homens e caninos. Por tais motivos, as pesquisas que objetivam elucidar a etiopatogenia da hiperplasia prostática benigna podem gerar protocolos e técnicas específicas para o diagnóstico precoce e tratamentos não comprometedores do potencial reprodutivo dos indivíduos acometidos. Perfazem,

neste quadro, a identificação de marcadores bioquímicos da HPB, tais como, a fosfatase ácida prostática (PAP) e esterase específica prostática canina (CPSE), em homens e cães doentes (BELL et al., 1995; HOLST, 2017; PINHEIRO et al., 2017). Ainda, a hemodinâmica vascular avaliada por meio da ultrassonografia Doppler, aliada à identificação da expressão do VEGF no tecido prostático, podem contribuir para a etiopatogenia da afecção, assim como o estudo da homeostase oxidativa local (AYDIN et al., 2006; KIM et al., 2011; ZELLI et al., 2013; KRAKOWSKI et al., 2015). Tais dados podem, ao serem analisados conjuntamente, auxiliar o diagnóstico precoce da HPB.

Embora a Finasterida apresente destaque no tratamento clínico para HPB em homens e cães (PARSONS et al., 2012), a ação do fármaco na hemodinâmica vascular da próstata e os efeitos colaterais na qualidade espermática continuam pouco esclarecedores (TU; ZINI, 2011). Por outro lado, há ascendente demanda pela reprodução de indivíduos senescentes, em função da maior longevidade da espécie canina e humana verificada a cada ano (CREEVY et al., 2016).

Hipótese

3 HIPÓTESE

As distintas modalidades terapêuticas para a hiperplasia prostática benigna determinam diferentes graus de redução na expressão do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) no tecido prostático, na resistividade intravascular da artéria prostática e na irrigação sanguínea do parênquima prostático, promovendo alterações bioquímicas do fluido prostático. Ainda, o tratamento da HPB impõe variações no perfil hormonal e, portanto, promove redução na qualidade seminal e alterações hemodinâmicas e estruturais do parênquima testicular.

Para testar as variadas hipóteses, o presente estudo foi dividido em dois capítulos distintos.

U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE

4 CAPÍTULO 1: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA FINASTERIDA NA PRÓSTATA E TESTÍCULOS DE CÃES ISENTOS E ACOMETIDOS POR HPB.

Foram objetivos deste capítulo:

- Avaliar o efeito do tratamento com finasterida nos parâmetros seminais de cães.
- Avaliar as características hemodinâmicas e vasculares dos testículos de cães submetidos a tratamento com finasterida.
- Avaliar a biometria e integridade do parênquima testicular de cães submetidos a tratamento com finasterida.
- Comparar o perfil hormonal de testosterona, estrógeno e di-hidrotestosterona em cães submetidos ou não ao tratamento com finasterida.
- Caracterizar as diferenças histo-morfológicas do parênquima testicular em cães submetidos ao tratamento com finasterida.
- Correlacionar os dados histológicos com a caracterização vascular do testículo, os níveis hormonais e os parâmetros seminais em cães submetidos a tratamento com finasterida.

4.1 Material e Métodos

O presente experimento foi realizado segundo as normas de bem-estar animal, sendo aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP) (protocolo nº 7122171213).

4.1.1. ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

O presente estudo foi conduzido utilizando-se cães não castrados, de raças distintas, com idade mínima de 5 a 15 anos e peso corpóreo entre 10 a 30 kg.

O critério de exclusão adotado referiu-se ao monorquidismo e criptorquidismo uni ou bilateral e quaisquer afecções do cunho reprodutivo e hormonal. Os cães foram alocados em quatro grupos experimentais, a saber:

- **Grupo Hígido não tratado com Finasterida (n=5):** cães isentos de HPB, não submetidos a tratamento com finasterida. Idade média: 7,2 anos. Peso médio: 22,3 kg.
- **Grupo Hígido tratado com Finasterida (n=5):** cães isentos de HPB, submetidos a tratamento com finasterida. Idade média: 7,4 anos. Peso médio: 20,8 kg.
- **Grupo HPB não tratado com Finasterida (n=5):** cães com HPB, não submetidos a tratamento com finasterida. Idade média: 10,8 anos. Peso médio: 18,8 kg.
- **Grupo HPB tratado com Finasterida (n=5):** cães com HPB, submetidos a tratamento com finasterida. Idade média: 9,2 anos. Peso médio: 23,4 kg.

O diagnóstico de hiperplasia prostática benigna (HPB) foi efetuado por meio da associação dos dados obtidos na anamnese, sinais clínicos e biometria prostática por ultrassonografia em modo B. Dentre os sinais clínicos mais comumente apresentados, destaca-se a hematospermia, tenesmo, disúria e hematúria.

Após o diagnóstico presuntivo de HPB, os cães foram aleatoriamente alocados nos grupos experimentais, de acordo com as características descritas no Quadro 1.

Quadro 1 - Idade, peso, raça e distribuição dos cães (n=20) nos grupos experimentais. São Paulo, 2017.

ANIMAL	RAÇA	PESO (kg)	IDADE (anos)	GRUPO
1	Cocker	13,6	10	HPB não tratado
2	Akita	18,7	13	HPB não tratado
3	Dachshund	10,1	13	HPB não tratado
4	Pastor Malinois	29,5	8	HPB não tratado
5	SRD	22,2	10	HPB não tratado
6	Cocker	22	12	HPB tratado com Finasterida
7	Pastor Alemão	28,2	6	HPB tratado com Finasterida
8	Pit Bull	25,5	9	HPB tratado com Finasterida
9	SRD	13,7	11	HPB tratado com Finasterida
10	Pit Bull	27,6	8	HPB tratado com Finasterida
11	Akita	20,2	10	Hígido tratado com Finasterida
12	Labrador	27,9	7	Hígido tratado com Finasterida
13	Chow-Chow	24,7	6	Hígido tratado com Finasterida
14	SRD	10,5	6	Hígido tratado com Finasterida
15	Bulldog Inglês	20,8	8	Hígido tratado com Finasterida
16	Labrador	29,1	10	Hígido não tratado
17	SRD	28,9	8	Hígido não tratado
18	SRD	15,6	6	Hígido não tratado
19	Lhasa Apso	10,2	7	Hígido não tratado
20	Labrador	27,7	5	Hígido não tratado

Todos os cães foram acompanhados por dois meses, pontualmente, em três avaliações: Dia 0, Dia 30 e Dia 60, sendo o dia inicial (dia 0) aquele no qual iniciou-se a terapia medicamentosa ou estabeleceu-se o diagnóstico presuntivo da HPB (Figura 1). Nos referidos momentos, foi realizada a ultrassonografia prostática e testicular, colheita de sangue para as dosagens hormonais e avaliações dos aspectos bioquímicos do fluido prostático e seminal. Após dois meses (Dia 60), os animais foram submetidos à orquiectomia bilateral, e os testículos destinados à análise histológica. Adotou-se o protocolo de tratamento com Finasterida na dose de 5 mg por animal, via oral, a cada 24 horas durante 2 meses (KAMOLPATANA et al., 1998).

4.1.1.1. Delineamento Experimental

Figura 2 – Delineamento experimental adotado no Experimento 1. São Paulo, 2017.

4.1.2. ANÁLISE DO PODER DE TESTE

A análise do poder de teste foi realizada através do aplicativo SAS Power and Sample Size 12 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA), utilizando valores de médias e desvios padrão provenientes de resultados previamente obtidos em experimento piloto. Foram selecionadas as variáveis correspondentes à integridade de DNA espermático (avaliado pela coloração de azul de toluidina), porcentagem de espermatozoides em média atividade mitocondrial (DAB – Classe II) e volume prostático, avaliado por ultrassom em modo-B. A descrição metodológica das referidas técnicas, bem como, os resultados e a respectiva discussão estarão detalhadamente elucidados posteriormente no capítulo 1.

Para tanto, foram utilizadas duas comparações em cada variável; aquela relacionada ao tempo final de tratamento (dia 60; n=5 – Tabela 1); e a relacionada ao tratamento, imergindo todos os períodos avaliados (n=15 – Tabela 1). Ambas as análises mostraram poder de teste acima de 0,80, demonstrando que o número de animais assegura o valor-científico do experimento.

Tabela 1 – Poder do Teste e respectivas unidades experimentais (n), por grupo, nas comparações entre os grupos experimentais (HPB não tratado vs. Hígido não tratado vs. HPB tratado com Finasterida vs. Hígido tratado com Finasterida). São Paulo, 2017.

Grupos	DAB – Classe II				DNA Íntegro				Volume Prostático			
	n	<i>Poder do Teste</i>	n	<i>Poder do Teste</i>	n	<i>Poder do Teste</i>	n	<i>Poder do Teste</i>	n	<i>Poder do Teste</i>	n	<i>Poder do Teste</i>
HPB não tratado	15	>0,99	5	>0,99	15	>0,99	5	>0,99	15	>0,99	5	0,86
HPB tratado com Finasterida	15	>0,99	5	>0,99	15	>0,99	5	>0,99	15	>0,99	5	0,86
Hígido não tratado	15	>0,99	5	>0,99	15	>0,99	5	>0,99	15	>0,99	5	0,86
Hígido tratado com Finasterida	15	>0,99	5	>0,99	15	>0,99	5	>0,99	15	>0,99	5	0,86

4.1.3. AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA

A avaliação ultrassonográfica da próstata e do testículo foi realizada com equipamento da marca Mindray®, modelo M5 (Shenzhen, China), equipado com transdutor linear de 5,5 MHz. Os cães foram posicionados em decúbito dorsal, e a avaliação realizada por via transabdominal para avaliação prostática e transescrotal para os testículos.

4.1.3.1. Avaliação ultrassonográfica bidimensional.

A avaliação de ecogenicidade do parênquima prostático e testicular foi realizada pelo modo-B convencional, com imagens em escala de cinza (Figura 2). As mensurações relacionadas ao comprimento (C) e profundidade (PT) da próstata foram realizadas em cortes transversais, enquanto em cortes longitudinais foram aferidos a largura (L) e novamente a profundidade (PL) da próstata. O volume prostático foi calculado segundo a fórmula de Atalan; Holt; Barr, (1999):

$$\text{Volume Prostático (cm}^3\text{)} = \underline{0,487 \times C \times L \times (PL + PT)} + 6,38$$

As mensurações de comprimento (C) e largura (L) foram realizadas nos testículos direito e esquerdo, e o volume foi calculado segundo a seguinte fórmula (ORTEGA-PACHECO et al., 2006; VANNUCCHI et al., 2015):

$$\text{Volume Testicular (cm}^3\text{)} = C \times L^2 \times 0,71$$

Figura 2 – Imagem ultrassonográfica em modo bidimensional. Corte transversal da próstata (A) e testículo direito (B), evidenciando a biometria e ecogenicidade do parênquima.

Fonte: Angrimani, D.S.R. (2016).

Com o intuito de realizar o controle do volume prostático de cada cão em relação ao seu peso corpóreo, foi mensurado o Volume Prostático Esperado (VPE), de acordo com a seguinte fórmula (ATALAN; HOLT; BARR, 1999; ZELLI et al., 2013):

$$\text{Volume Prostático Esperado (cm}^3\text{)} = 8,48 + (0,238 \times \text{Kg de peso corpóreo})$$

4.1.3.2. Avaliação ultrassonográfica por Doppler espectral.

A avaliação da perfusão tecidual e velocidade do fluxo sanguíneo na próstata e testículos foram realizadas pela ultrassonografia Doppler. As artérias testiculares e prostáticas foram escaneadas, respectivamente, na região do funículo espermático e em região abdominal hipogástrica craniodorsal à próstata

(STEFANOV, 2004). O Doppler pulsado ou espectral (PW, *pulsed-wave* Doppler) foi utilizado para caracterizar a forma da onda. Os parâmetros de velocidade do fluxo sanguíneo (PS, ED e TAMAX) e os índices hemodinâmicos (RI, PI, S/D) foram calculados automaticamente pelo software do equipamento (Figura 3), utilizando-se as seguintes fórmulas matemáticas ou índice de Pourcelot:

$$RI = \frac{\text{Velocidade do pico sistólico (PS)} - \text{Velocidade ao fim da diástole (ED)}}{\text{Velocidade do pico sistólico (PS)}}$$

$$PI = \frac{\text{Velocidade do pico sistólico (PS)} - \text{Velocidade ao fim da diástole (ED)}}{\text{Velocidade média de um ciclo cardíaco (TAMAX)}}$$

$$\text{Relação sístole / diástole} = \frac{\text{Velocidade do pico da sístole (PS)}}{\text{Velocidade ao fim da diástole (ED)}}$$

Figura 3 – Diagrama dos parâmetros de velocidade do fluxo sanguíneo para cálculo dos índices hemodinâmicos.

Fonte: Angrimani, D.S.R. (2016).

O volume da amostra sanguínea foi posicionado no centro do vaso e o ângulo de insonação foi corrigido e não ultrapassou 60°. O total de 9 ondas estáveis

de cada artéria testicular e prostática foi obtido para calcular a média de cada variável (Figura 4).

Figura 4 – Imagem ultrassonográfica no modo Doppler. Aspecto de onda da artéria prostática (A) e artéria testicular (B).

Fonte: Angrimani, D.S.R. (2016).

4.1.3.3. Avaliação ultrassonográfica por Doppler colorido.

O Doppler colorido (*CF, colour-flow Doppler*) foi utilizado para o mapeamento e caracterização qualitativa da vascularização, segundo escore previamente estabelecido de 1 a 3, sendo 1 considerado grau mínimo, 2 grau médio e 3 grau máximo de vascularização (Figura 5).

Figura 5 – Diferentes escores utilizados na avaliação qualitativa da vascularização prostática por meio do modo Doppler colorido em corte longitudinal. Escores de 1 a 3.

Fonte: Angrimani, D.S.R. (2016).

4.1.4. AVALIAÇÃO DA LIBIDO

Para a colheita de sêmen, foi utilizado swab de fêmea em cio (proestro ou estro) para estimulação da libido. Assim, a libido foi classificada em graus de 0 a 3, sendo considerado: 0- a total falha de ereção do pênis e interesse pela fêmea; 1- interesse transitório pela fêmea, mas sem ereção durante a manipulação do pênis e prepúcio; 2- interesse sexual constante, e ereção parcial da glândula do pênis durante a massagem prepucial; 3- rápida ereção e movimentos pélvicos durante a colheita.

4.1.5. ANÁLISES SEMINAIS

O sêmen dos cães foi colhido por manipulação digital do pênis, diferenciando-se as três frações ejaculatórias (frações 1, 2 e 3) por inspeção visual (aspecto do ejaculado). O volume da fração espermática rica (segunda fração) foi avaliado em tubo graduado e, então, a amostra seminal foi destinada às análises morfológicas e funcionais dos espermatozoides. Já a terceira fração, correspondente ao fluido prostático, foi acondicionada em tubos plásticos a -20°C, para posterior processamento.

4.1.5.1. Exames imediatos do sêmen (motilidade e vigor, concentração e morfologia espermática).

Para avaliação da motilidade e vigor espermáticos, foi utilizado 5 µL de cada amostra, depositado entre lâmina e lamínula previamente aquecidas a 37°C, e avaliado em microscópio de luz transmitida em aumento de 40x (Nikon, Eclipse E200, Japão). A classificação de motilidade espermática respeitou a capacidade do espermatozoide de movimentar-se em linha reta, sendo pontuada entre 0 a 100%, enquanto o vigor espermático correspondeu à velocidade de progressão dos espermatozoides, sendo classificado de 0-5 (FRESHMAN, 2002).

A concentração espermática foi avaliada em câmara de Neubauer, sob microscópio óptico. Para tanto, os espermatozoides foram diluídos em solução de formol associada a azul de metileno na diluição 1:200. Para a avaliação da morfologia espermática, foi utilizada a técnica de câmara úmida, sob diluição do sêmen em formol salino na proporção de 1:2 e, posteriormente, 5 µL desta solução foi depositada entre lâmina e lamínula e avaliada em microscópio de luz transmitida sob objetiva de imersão (Nikon, Eclipse E200, Japão), mediante a contagem de 200 espermatozoides, classificados em normais, com defeitos menores ou maiores, expressos em porcentagem (%) (FRESHMAN, 2002).

Ademais, foi realizada a avaliação da motilidade espermática utilizando-se a análise computadorizada do sêmen (Computer Assisted Sperm Analysis - CASA; Hamilton-Thorne Ivos 12.3) no Laboratório de Andrologia Animal do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ-USP. Desta forma, foram observados diferentes padrões de motilidade do sêmen, segundo Verstegen et al. (2002): porcentagem de espermatozoides móveis e progressivos, velocidade curvilínea (VCL- µm/s), velocidade linear progressiva (VSL- µm/s), velocidade média da trajetória (VAP- µm/s), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH - µm), frequência de batimento flagelar cruzado (BCF- Hz), retilinearidade (STR - %), linearidade (LIN - %) e porcentagem de espermatozoides rápidos, em velocidade média, baixa e estáticos.

Para a avaliação no CASA, dez microlitros de cada amostra foram depositados entre lâmina e lamínula previamente aquecidas a 37°C. Sete campos foram selecionados aleatoriamente e avaliados quanto à motilidade dos espermatozoides. Em seguida, o resultado foi calculado, em porcentagem, com a média dos sete campos avaliados.

4.1.5.2. Testes espermáticos funcionais (integridade de membrana acrossomal e plasmática, atividade mitocondrial e fragmentação de DNA).

Para a avaliação da integridade da membrana plasmática, foi realizada a coloração de eosina/nigrosina, a qual possibilitou a diferenciação das células com alterações de permeabilidade da membrana plasmática. Em lâmina pré-aquecida a

37°C, 5 µL da amostra espermática e 5 µL do corante eosina/nigrosina foram depositados para a confecção do esfregaço. A lâmina foi analisada em microscópio de luz transmitida, sob objetiva de imersão (Nikon, Eclipse E200, Japão), mediante a contagem de 200 espermatozoides (BARTH; OKO, 1989). Os resultados foram expressos em porcentagem (%) de membrana lesionada e íntegra.

A coloração Fast Green/Rosa-Bengala foi realizada para avaliar a integridade de membrana acrossomal dos espermatozoides. O esfregaço espermático foi realizado utilizando 5 µL da amostra e 5 µL do corante Fast Green/Rosa-Bengala em lâmina aquecida a 37°C e analisado em microscópio de luz transmitida sob objetiva de imersão (Nikon, Eclipse E200, Japão) (POPE; ZHANG; DRESSER, 1991). Após contagem de 200 espermatozoides, os resultados foram expressos em porcentagem (%) de acrossomo lesionado e íntegro.

Com o objetivo de avaliar a atividade mitocondrial, foi utilizada a técnica citoquímica da 3,3'-diaminobenzidina (DAB), a qual categorizou os espermatozoides em quatro classes: alta (DAB – Classe I), média (DAB – Classe II), baixa (DAB – Classe III) e ausência de atividade mitocondrial (DAB – Classe IV) (HRUDKA, 1986). Para tanto, uma alíquota da amostra foi incubada ao abrigo da luz a 37°C por 1 hora com a DAB na proporção de 1:1 (20 µL de amostra : 20 µL de DAB). Após este período, foram feitos esfregaços das amostras em lâminas de vidro com posterior fixação em formol 10% por 15 minutos. A leitura transcorreu em microscópio de luz transmitida, sob objetiva de imersão (Nikon, Eclipse E200, Japão), com contagem de 200 espermatozoides. Os resultados foram expressos em porcentagem (%). Ademais, foi calculado o índice de atividade mitocondrial (Índice de DAB), proposto por Hrudka (1987). Este foi estimado multiplicando a porcentagem de células obtidas (de acordo com a respectiva classe) pelo escore relativo, sendo este: Classe I x 1,0; Classe II x 0,50; Classe III x 0,25 e Classe IV x 0. Todos esses valores foram somados, obtendo o escore total de atividade mitocondrial, o qual foi submetido a seguinte formula:

$$\text{Índice de DAB} = \frac{\text{Escore Total de Atividade Mitocondrial}}{\text{Número de Espermatozoides Avaliados}} \times 100$$

4.1.5.3. Análise da integridade do DNA espermático

Para a avaliação da integridade de DNA espermático, foram utilizadas diferentes técnicas, com o intuito de promover análise específica e etiológica dos danos na cromatina espermática.

Para avaliar a susceptibilidade à dispersão da cromatina, foi utilizada a técnica modificada de coloração do azul de toluidina (ERENPREISA et al., 2003). Para tal, a padronização prévia na espécie canina foi realizada (Anexo A). Desta forma, os esfregaços de sêmen foram fixados na solução álcool 96% e acetona (1:1) a 4°C por 30 minutos. Em seguida, os esfregaços secaram por 30 minutos e só então, introduzidos em solução ácida de HCl (0.1N) a 4°C por 5 minutos, para hidrólise celular. Então, as lâminas foram lavadas três vezes em água destilada por 2 minutos. Após a lavagem, as lâminas foram coradas em solução de azul de toluidina (0,05%) por 20 minutos. Por fim, as lâminas foram lavadas duas vezes em água destilada por dois minutos e após secagem em temperatura ambiente, a leitura foi realizada em microscópio de luz transmitida, sob objetiva de imersão (Nikon, Eclipse E200, Japão), com contagem de 200 espermatozoides. A avaliação ocorreu de maneira duplo-cega e os resultados foram expressos em porcentagem (%).

Para a avaliação da susceptibilidade do DNA espermático à fragmentação, foi utilizado o ensaio baseado na Sperm Chromatin Structure Test (SCSA), desenvolvido inicialmente por Evenson et al. (1999), e validado posteriormente para cães por Lucio et al. (2016). A instabilidade da cromatina foi quantificada utilizando citometria de fluxo pela sonda fluorescente laranja de acridina (LA), a qual emite coloração verde (DNA de cadeia dupla) e vermelha (DNA de fita simples desnaturado). Foi utilizado o aparelho Guava EasyCyte™ Mini System (Guava® Technologies, Hayward, CA, USA) e 20.000 espermatozoides foram avaliados em cada amostra e os dados foram analisados usando FlowJo v8.7 Software (Flow Cytometry Analysis Software - Tree Star Inc., Ashland, Oregon, EUA).

As amostras foram diluídas em 100 µL de TNE buffer (0,01 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 1mM EDTA, pH 7,4), com adição de 400 µL de solução detergente

ácido (0,08 M HCl, 0,1% Triton X-100, 0,15 M NaCl, pH 1,2). Após 30 segundos, os espermatozoides foram corados adicionando 600 µL da solução de coloração LA (0,037 M ácido cítrico, 0,126 M Na₂HPO₄, 0,0011 M EDTA dissódico, 0,15 M NaCl, pH 6,0). Após 5 minutos de coloração, as amostras foram avaliadas por citometria de fluxo. A taxa de fragmentação de DNA foi calculada com base na porcentagem de espermatozoides distais à população principal em histograma (MINERVINI et al., 2013).

Para avaliação direta das quebras de DNA espermático, foi utilizado o teste de dispersão da cromatina espermática (FERNANDEZ et al., 2003; SHANMUGAM et al., 2014). Contudo, antes do emprego da técnica, a padronização prévia para a espécie canina foi realizada (Anexo A). Desta forma, volumes semelhantes (1:1) de sêmen diluído (10×10^6 espermatozoides/mL) e 1% de low-melting agarose foram misturados a 37°C. Então, uma alíquota de 100 µL da mistura foi pipetada em laminas preparadas previamente com 0,65% de normal melting agarose, recobertas por lamínulas e mantidas a 4°C durante 10 minutos. Após a solidificação, as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram imersas em solução de desnaturação ácida (0,08 N HCl) durante 3 minutos em temperatura ambiente no escuro, com o objetivo de causar quebras de DNA em espermatozoides que já possuíam fitas simples de DNA. Em seguida, a desnaturação foi interrompida e as proteínas foram removidas imergindo as lâminas na solução neutralizante e de lise (10mM Tris, 4 mM DTT, 2% Triton X-100, 100 mM Na₂ - EDTA, 2,5M NaCl, pH 11) a 4°C durante 2 horas. As lâminas, então, foram lavadas em solução de Tris-borato-EDTA (0,09 M Tris-borato e 0,002 M EDTA, pH 7,5) por 2 minutos, e a desidratação em 70%, 90% e 100% de etanol (2 minutos cada). A coloração das lâminas foi efetuada usando coloração de Wright's diluída em buffer (380mg Na₂ PO₄, 547mg KH₂ PO₄ em 100mL de água destilada) por 10 minutos, com lavagem em água corrente e secagem em temperatura ambiente.

As lâminas foram avaliadas em microscópio de luz transmitida, sob objetiva de imersão (Nikon, Eclipse E200, Japão), com contagem de 200 espermatozoides. Núcleos espermáticos apresentando halo grande ou médio foram considerados íntegros, enquanto a ausência ou pequenos halos foram avaliados como fragmentados. A avaliação ocorreu de maneira duplo-cega controlada e os resultados foram expressos em porcentagem (%).

4.1.5.4. Análise por citometria de fluxo (integridade das membranas acrossomal e plasmática e potencial de membrana mitocondrial)

Empregou-se a avaliação da membrana plasmática, acrossomo e mitocôndria dos espermatozoides, por citometria de fluxo em aparelho BD FACSCalibur (Becton Dickinson, East Rutherford, NJ, USA), com as respectivas sondas fluorescentes para cada região espermática. A concentração de sêmen utilizado foi de 188.000 espermatozoides diluídos em 37,5 µL de TALP.

Para avaliar a integridade de membrana plasmática, utilizou-se a sonda fluorescente de iodeto de propídio (PI), na concentração de 6 µM, diluído em 200 µL de TALP, o qual penetrou em células com alterações na permeabilidade da membrana plasmática, corando-as em vermelho (CELEGHINI et al., 2007). Para a avaliação da integridade acrossomal, utilizou-se 5 µL da sonda fluorescente aglutinina de *Psium sativum* conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA), na concentração de 100 µg/mL, diluído em 1995 µL de Azida Sódica 1%, corando os acrossomos lesionados em verde. Desta forma, foram adicionados 11,2 µL de PI, na concentração 6 µM na solução de FITC-PSA em Azida Sódica 1%. Então, o volume de 188.000 espermatozoides diluídos em 37,5 µL de TALP foram incubados a 37°C por 5 minutos, em 13 µL da solução de FITC-PI. Posteriormente, foram adicionados 300 µL de TALP para a amostra ser processada no citômetro de fluxo. Tal procedimento foi realizado com o intuito de obter o resultado combinado entre integridade de membrana plasmática e acrossomal, da mesma população de células. Ainda, utilizou-se os devidos controles para compensação das sondas separadamente, assim como amostras sem corante (branco) para propiciar a separação adequada das populações de espermatozoides.

O JC-1 (iodeto de 5,5',6,6' tetracloro 1,1,3,3' tetraetilbenzimidazolilcarbocianina) foi a sonda fluorescente de escolha para a avaliação do potencial de membrana mitocondrial dos espermatozoides, classificando-os em elevado potencial de membrana mitocondrial (fluorescência vermelha) e baixo potencial (fluorescência verde). Para tal análise, foi adicionado

1 μL da sonda JC-1, na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ em 188.000 espermatozoides diluídos em 37,5 μL de TALP. As amostras foram incubadas a 37°C por 10 minutos e, então, 300 μL de TALP foram adicionados para, em seguida, a amostra ser processada no citômetro de fluxo. Os espermatozoides foram separados em três populações, os que continham baixo, médio e alto potencial mitocondrial.

4.1.5.5. Perfil oxidativo e antioxidante do fluido prostático

A avaliação da susceptibilidade ao estresse oxidativo foi realizada pelo teste desenvolvido por Ohkawa et al. (1979), comumente designado de TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico). Foram adicionados 600 μL de ácido tricloroacético 10% (TCA 10%, Sigma Aldrich®) a 300 μL da amostra (plasma seminal). Então, a amostra foi centrifugada na capacidade de rotação de 20.817 x g na centrífuga *Eppendorf 5810R*, durante 15 minutos a temperatura de 5°C para que ocorresse a precipitação das proteínas da amostra. Sequencialmente, alíquotas de 800 μL de sobrenadante foram transferidas para criotubos, nos quais foram adicionados 800 μL de ácido tiobarbitúrico 1% (TBA 1%, Sigma Aldrich®) e submetidos à 100°C durante 10 minutos. Em seguida, as amostras foram imersas em gelo para interrupção da reação. Ao ocorrer a peroxidação lipídica das amostras, houve formação de malondialdeído, substância reativa ao ácido tiobarbitúrico, a qual em contato ao TBA formou uma coloração rósea. A mudança de coloração das amostras foi quantificada em espectrofotômetro (Ultrospec 3300 pro®) com comprimento de onda de 532 nanômetros. Sendo assim, a avaliação da susceptibilidade ao estresse oxidativo foi expressa em nanogramas de TBARS.

A dosagem das enzimas antioxidantes catalase, glutathiona peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) foi realizada nas mesmas amostras utilizadas para a determinação de concentrações de TBARS. A atividade da SOD foi avaliada por meio da mensuração indireta pela redução do citocromo-c pelo ânion superóxido (O_2^-), sendo que o ensaio ocorreu em comprimento de onda de 550 nm a 25°C durante 5 minutos (FLOHE; OTTING, 1984; NICHI et al., 2006) A GPx foi avaliada por consumo de NADPH, observado em espectrofotômetro em comprimento de onda de 340 nm durante 10 minutos a 37°C (FLOHÉ; GÜNZLER, 1984; NICHI et al.,

2006). A quantificação da atividade da catalase foi mensurada pelo consumo de H_2O_2 durante 8 minutos em comprimento de onda de 230 nm a 30°C (NICHII et al., 2006).

4.1.6. PERFIL HORMONAL

Amostras de sangue (3 mL) de todos os cães foram coletadas por punção da veia cefálica ou jugular, direita ou esquerda, em tubos de vácuo sem anticoagulante mensalmente e sempre nos mesmos horários (período da manhã). As amostras foram então centrifugadas a 1500 x g por 10 minutos e o soro obtido (0.5 mL) foi armazenado a -20°C até a análise hormonal.

A concentração de testosterona (BECKMAN, Coulter Company IM-1841/IM-1119-Immunotech-, Praga, Republica Tcheca) e estrógeno (BECKMAN, Coulter Company IM-1841/DSL4800-Immunotech-, Praga, Republica Tcheca) foram mensuradas via kit comercial de radiomunoensaio, ambos previamente validados para cães (KAWAKAMI et al., 2001; POLISCA et al., 2013). Para a dihidrotestosterona, foi utilizado kit de ELISA competitivo (BECKMAN, Active® DSL9600i-Immunotech-, Praga, Republica Tcheca) (WOLF et al., 2012). A detecção limite para o ensaio de testosterona foi de 0,01 ng/mL e o coeficiente de variação intra-ensaio foi de 4,52%. Já para o estrógeno, a detecção limite do ensaio foi de 1,12 pg/mL e o coeficiente de variação foi entre 7,15% e 3,45%. Para dihidrotestosterona, a detecção limite foi de 6,58% e o coeficiente de variação foi entre 9,86% e 3,03%.

4.1.7. ORQUIECTOMIA

Previamente ao procedimento anestésico, os cães foram submetidos à fluidoterapia intravenosa com solução de NaCl a 0,9%. A acepromazina (0,03 mg/kg) e/ou Meperidina (2,0 mg/kg) foram utilizadas como medicação pré-anestésica. Para

a indução anestésica, foi utilizado o Propofol (5,0 mg/kg) por via intravenosa. Após intubação oro-traqueal, os animais foram submetidos à oxigenioterapia e a manutenção anestésica foi realizada com Isoflurano. Para a realização da orquiectomia bilateral, o animal foi posicionado em decúbito dorsal. Após a tricotomia e antisepsia local, foi utilizada a técnica cirúrgica da orquiectomia pré-escrotal. A analgesia pós-operatória foi realizada com dipirona (25 mg/kg) e o antibiótico utilizado no pós-operatório foi a enrofloxacina (5 mg/kg).

4.1.8. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DOS TESTÍCULOS

Após orquiectomia, fragmentos de 0,5 cm do parênquima testicular foram lavados em solução fisiológica a 0,9% para imediata fixação em solução tamponada de formaldeído a 10% por 24 horas. Em seguida, os fragmentos foram armazenados em álcool 70%, posteriormente, incluídos em parafina. Cortes histológicos de 0,5 µm foram submetidos à desparafinização seguindo o protocolo padrão. O corante Hematoxilina-Eosina (HE) foi utilizado para avaliação do aspecto histomorfológico do testículo, visibilizado em microscopia de luz transmitida em aumentos de 10 a 100 vezes, possibilitando a diferenciação estrutural entre os tecidos, como realizado anteriormente (VANNUCCHI et al., 2015). As análises microscópicas basearam-se em um escore de 0 a 3 (0: sem lesões, 1: reação inflamatória com conteúdo de células mononucleares, 2: degeneração parcial do parênquima testicular e pequenas áreas de integridade funcional dos túbulos seminíferos, 3: desorganização completa do parênquima testicular, com comprometimento da espermatogênese).

4.1.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram avaliados utilizando o Sistema SAS para Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). As diferenças entre os tratamentos foram analisados por meio de testes paramétricos e não paramétricos, de acordo

com a normalidade residual (distribuição de Gauss) e homogeneidade de variância. Sempre que um desses pressupostos não foi respeitado, os dados foram transformados. Se transformações não foram bem-sucedidas, foram utilizados os testes não paramétricos. A concentração espermática, lesão de membrana plasmática, lesão acrossomal, lesão de membrana plasmática e acrossomal, baixo e médio potencial de membrana mitocondrial, DAB - Classe II, volume do ejaculado, porcentagem de defeitos maiores, dosagem de estrógeno e testosterona, atividade de GPx e SOD, porcentagem de espermatozoides estáticos, concentração de TBARS, escore de vascularização prostático, SD do Doppler prostático e SD, ED e TAMAX do Doppler da artéria testicular foram log transformados. Já a PI da artéria testicular foi inversamente transformado, enquanto DAB - Classe I, porcentagem de integridade de DNA espermático (avaliado por coloração de azul de toluidina), linearidade, retilinearidade e motilidade espermática subjetiva foram elevados ao quadrado.

As diferenças entre os grupos foram analisadas utilizando o teste t de Student (variáveis paramétricas) e o teste de Wilcoxon (variáveis não paramétricas). O teste LSD foi utilizado para comparar as diferenças ao longo do tempo. Os efeitos do diagnóstico de HPB, tratamento com finasterida e tempo de avaliação e interações entre esses fatores foram estimados pelas medidas repetidas de variância (Mixed Procedure - SAS). Como não foram observadas interações triplas (Afecção X Tratamento X Tempo), foram consideradas as seguintes interações: Tratamento X Tempo, Afecção X Tempo, Afecção X Tratamento. No caso de não ocorrer significativas interações, o efeito dos grupos foi analisado ao fundir todos os momentos de avaliação e, inversamente, os tempos de avaliação foram comparados combinando todos os grupos, tendo em conta a correção Bonferroni (PROC GLIMMIX); caso contrário, as comparações foram realizadas tendo em conta os efeitos. Para o volume prostático (VP) e volume prostático esperado (VPE), as variáveis foram analisadas comparando os quatro grupos usando o teste de LSD em cada momento de avaliação (Dia 0, 30 e 60). Além disto, para comparar o VP e VPE, o teste t de Student (variáveis paramétricas) e o teste de Wilcoxon (variáveis não paramétricas) foram utilizados. A análise da covariância (ANCOVA) com correção de Bonferroni foi aplicada para o escore de vascularização prostática.

As variáveis respostas foram também submetidas à análise de correlação de Pearson. Os resultados foram descritos como a média e erro padrão.

O nível de significância utilizado foi de 5%. Em outras palavras, foram consideradas diferenças estatísticas entre as variáveis de classificação para uma determinada variável resposta se $P \leq 0,05$.

4.2. Resultados

Não foram observadas interações triplas entre os momentos de avaliação (dias 0, 30 e 60), o diagnóstico da HPB (Doença) e tratamento com finasterida (Tratamento) (Tabela 12 no Anexo B). Entretanto, ocorreram interações significativas entre o tratamento e a ocorrência da HPB nas variáveis relacionadas à concentração de testosterona ($p < 0,04$), baixa atividade mitocondrial dos espermatozoides ($p < 0,04$), volume prostático ($p < 0,04$) e relação sístole:diástole na artéria prostática ($p < 0,03$) (Tabela 12 no Anexo B). Além disto, interações entre os momentos de avaliação (dias 0, 30 e 60) e o tratamento (finasterida) ocorreram nas variáveis de escore de vascularização da próstata ($p < 0,02$) (Tabela 12 no Anexo B).

Para as demais variáveis (Tabela 12 - Anexo B), optou-se por unir todos os momentos de avaliação (Dias 0, 30 e 60), com o intuito de observar os principais efeitos: ocorrência da afecção (HPB) e tratamento com finasterida. Por outro lado, não foram observados quaisquer efeitos relevantes dos momentos de avaliação (Dias 0 vs. 30 vs. 60), independente dos grupos avaliados (HPB e Finasterida).

4.2.1. AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA DA PRÓSTATA

Foi possível observar redução do escore de vascularização da próstata entre o dia 0 e 60 (Figura 6) em cães tratados com finasterida. Ademais, cães não tratados apresentaram maior escore no dia 60 ($1,9 \pm 0,23$) quando comparados aos animais tratados com finasterida ($0,9 \pm 0,15$) (Figura 6), independente do diagnóstico de HPB.

Figura 6 – Escore de vascularização da próstata (1-3) nos grupos Tratamento com finasterida vs. Não tratado durante o período experimental.

* indica diferença significativa entre grupos ($p < 0,05$). ^{a-c} indica diferença significativa entre tempos ($p < 0,05$).

Os animais Hígidos não tratados ($4,3 \pm 0,14$) apresentaram maior relação sístole:diástole (S/D) da artéria prostática em comparação aos animais HPB não tratados ($3,6 \pm 0,14$) (Figura 7). Do mesmo modo, o grupo de animais HPB não tratados apresentaram menor S/D ($3,6 \pm 0,14$) comparando-se aos animais HPB tratados com finasterida ($4,5 \pm 0,31$ – Figura 7).

Figura 7 – Relação sístole:diástole (S/D) nos grupos HPB não tratado, HPB tratado com Finasterida, Hígido não tratado e Hígido tratado com Finasterida.

* indica diferença significativa entre Hígido e HPB, ambos não tratados ($p < 0,05$). † indica diferença significativa entre HPB não tratado e HPB tratado com finasterida ($p < 0,05$).

Na comparação entre os grupos não tratados e submetidos ao tratamento com finasterida, não foram observadas diferenças para as variáveis hemodinâmicas PS, ED, TAMAX, RI e PI da artéria prostática, independente do diagnóstico de HPB. Por outro lado, animais com HPB apresentaram maior velocidade ao fim da diástole (ED) da artéria prostática e escore da vascularização da próstata em comparação aos Hígidos, independente do tratamento com finasterida (Tabela 2).

Tabela 2 – Efeito da Hiperplasia Prostática Benigna (HPB vs. Hígido) na análise ultrassonográfica da próstata por Doppler. São Paulo, 2017.

	Hígido	HPB	P
Velocidade do pico sistólico (PS – cm/s)	69.36±3.4	74.49±3.2	0.28
Velocidade ao fim da diástole (ED – cm/s)	17.18±0.8	19.98±0.9	0.03
Tempo médio de um ciclo cardíaco (TAMAX – cm/s)	24.50±1.4	27.98±1.4	0.09
Índice de resistividade (RI)	0.74±0.09	0.72±0.08	0.18
Índice de pulsatilidade (PI)	2.34±0.2	2.09±0.1	0.28
Escore de vascularização da próstata (1-3)	1.03±0.1	2.03±0.1	<0.0001

No dia 0 (anterior ao tratamento), os grupos HPB não tratado ($50,5 \pm 10,7 \text{ cm}^3$) e HPB tratado com finasterida ($63,8 \pm 15,5 \text{ cm}^3$) obtiveram maior volume prostático (VP) em relação aos Hígidos não tratados ($23,9 \pm 5,8 \text{ cm}^3$) (Figura 8). Porém, nos dias 30 e 60, nenhuma diferença no volume prostático foi observada entre os grupos HPB tratado com finasterida (Dia 30: $48,7 \pm 12,3 \text{ cm}^3$; Dia 60: $42,5 \pm 12,3 \text{ cm}^3$) e Hígidos não tratados (Dia 30: $25,7 \pm 6,42 \text{ cm}^3$; Dia 60: $27,8 \pm 5,6 \text{ cm}^3$) (Figura 8). Adicionalmente, o VP foi superior ao VPE (volume de próstata esperado) nos grupos HPB não tratado, HPB tratado com finasterida e Hígido tratado com finasterida nos dias 0 e 30 (Figura 8). Contudo, no dia 60, não foram observadas diferenças entre o PV e VPE no grupo HPB tratado com finasterida (Figura 8).

Figura 8 – Média e erro padrão do volume prostático (VP - cm^3) e volume de próstata esperado (VPE - cm^3) nos grupos HPB não tratado, HPB tratado com Finasterida, Hígido não tratado e Hígido tratado com Finasterida nos dias 0 (A), 30 (B) e 60 (C). São Paulo, 2017.

*Indica diferença entre VP e VPE ($p < 0,05$). ^{a-b} indicam diferença entre grupos ($p < 0,05$).

4.2.2. AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA DOS TESTÍCULOS

À análise do índice de pulsatilidade (PI) da artéria testicular, foi possível observar maior PI nos animais não tratados com finasterida ($1,6 \pm 0,1$), em relação aos tratados com finasterida ($1,2 \pm 0,008$) (Figura 9), independente da

ocorrência de HPB. Por outro lado, o tempo médio de um ciclo cardíaco (TAMAX) foi superior nos animais tratados com finasterida em relação aos não tratados (Tabela 3), independente da ocorrência de HPB. As demais variáveis ultrassonográficas não sofreram efeito do tratamento (finasterida) e da HPB (Tabela 3).

Figura 9 – Média e erro padrão do índice de resistência (PI) da artéria testicular nos animais tratados e não tratados com finasterida. São Paulo, 2017.

*Indica diferença entre tratamentos (tratado com finasterida vs. sem tratamento).

Tabela 3 – Efeito do tratamento com finasterida (tratado com finasterida vs. Sem tratamento) na análise da ultrassonografia Doppler dos testículos. São Paulo, 2017.

	Não Tratado	Tratados com Finasterida	P
Velocidade do pico sistólico (PS – cm/s)	19±1	21,4±1,3	0,16
Velocidade ao fim da diástole (ED – cm/s)	8,5±0,6	9,6±0,6	0,16
Tempo médio de um ciclo cardíaco (TAMAX – cm/s)	8,3±0,8	10,6±0,7	0,01
Índice de resistividade (RI)	0,56±0,01	0,55±0,01	0,30
Relação sístole:diástole (S/D)	2,3±0,07	2,3±0,08	0,88
Volume testicular (Testículo Direito - cm ³)	6,8±0,6	7,6±0,7	0,40
Volume testicular (Testículo Esquerdo - cm ³)	6,9±0,6	7,4±0,5	0,57

4.2.3. AVALIAÇÃO DO PERFIL HORMONAL

Para a dosagem de testosterona, observou-se maior concentração hormonal no grupo de animais Hígidos não tratados ($3,3 \pm 0,7$ ng/mL) em relação aos animais acometidos pela HPB sem tratamento ($1,5 \pm 0,3$ ng/mL) (Figura 10). Ainda, o grupo Hígido sem tratamento ($3,3 \pm 0,7$ ng/mL) apresentou maior concentração de testosterona em comparação aos animais Hígidos tratados com finasterida ($1,2 \pm 0,2$ ng/mL) (Figura 10).

Figura 10 – Média e erro padrão da concentração sérica de testosterona nos diferentes grupos experimentais (HPB não tratado, HPB tratado com Finasterida, Hígido não tratado e Hígido tratado com Finasterida). São Paulo, 2017.

* indica diferença significativa entre os grupos Hígido não tratado e Hígido tratado com finasterida ($p < 0,05$). † indica diferença significativa entre HPB não tratado e Hígido não tratado ($p < 0,05$).

À análise de estrógeno sérico, foi observada maior concentração nos cães Hígidos ($7,5 \pm 1$ pg/mL) em comparação aos acometidos pela HPB ($5,1 \pm 1,1$ pg/mL), independente do tratamento com finasterida (Figura 11). Já a concentração sérica de di-hidrotestosterona apresentou-se elevada no grupo de animais sem tratamento ($264,5 \pm 51,6$ pg/mL), em relação aos tratados com finasterida ($149,3 \pm 25,1$ pg/mL), independente da ocorrência da HPB (Figura 12).

Figura 11 – Média e erro padrão dos níveis séricos de estrógeno nos diferentes grupos experimentais (Hígido vs. HPB), independente do tratamento com finasterida. São Paulo, 2017.

* indica diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Figura 12 – Média e erro padrão dos níveis séricos de di-hidrotestosterona nos diferentes grupos experimentais (Tratados com finasterida vs. não tratados), independente da ocorrência de HPB. São Paulo, 2017.

* indica diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

4.2.4 AVALIAÇÃO SEMINAL

Não ocorreram diferenças estatísticas comparando-se os efeitos do tratamento com finasterida (independente da ocorrência de HPB), para as variáveis: libido, volume do ejaculado, concentração espermática, motilidade e vigor

espermáticos (análise subjetiva), atividade mitocondrial dos espermatozoides (índice de DAB, alta, média e ausente), integridade de membrana espermática (analisada pela coloração de eosina/nigrosina) e morfologia espermática (Tabela 4). Contudo, à análise da integridade acrossomal, pela coloração espermática Fast Green/Rosa Bengala, o grupo sem tratamento apresentou maior porcentagem de espermatozoides íntegros em relação aos animais tratados com finasterida (Tabela 4).

Tabela 4 – Efeito do tratamento com finasterida (tratado com finasterida vs. não tratado com finasterida) na análise de libido e dos parâmetros seminais dos cães avaliados. São Paulo, 2017.

	Não Tratado	Tratados com Finasterida	P
Libido (0-3)	2,3±0,1	2,5±0,1	0,29
Volume (mL)	2,3±0,4	1,9±0,4	0,27
Concentração espermática (espermatozoides/mL)	354±67	468,7±75,1	0,19
Motilidade espermática (Subjetiva - %)	68,2±3,7	67,5±4,1	0,98
Vigor espermático (Subjetivo – 0 a 5)	2,5±0,1	2,7±0,1	0,58
Alta atividade mitocondrial (%)	79,7±3,5	72,8±2,7	0,05
Média atividade mitocondrial (%)	9,4±1,1	14,7±2	0,05
Ausência de atividade mitocondrial (%)	6,1±1,9	7,7±1,6	0,52
Índice de atividade mitocondrial (Índice de DAB)	85,4±3,0	81,4±1,9	0,12
Integridade de membrana plasmática (%)	78,7±3,0	80,3±3,1	0,65
Integridade acrossomal (%)	96,3±0,5	94,2±0,8	0,04
Defeitos menores (%)	5,4±1,6	6,4±1,7	0,70
Defeitos maiores (%)	27±5,1	30,4±5,1	0,48
Defeitos totais (%)	25,7±5	33,3±5,3	0,30

À análise dos efeitos da HPB, independente do tratamento com finasterida, as variáveis de média atividade mitocondrial e defeitos espermáticos menores apresentaram valores inferiores nos animais hígdos em comparação aos doentes (Tabela 5). Por outro lado, a concentração espermática foi superior nos animais hígdos em relação aos acometidos por HPB (Tabela 5).

Tabela 5 – Efeito da Hiperplasia Prostática Benigna (animais hígdos vs. com HPB) na análise de libido e dos parâmetros seminais. São Paulo, 2017.

	Hígido	HPB	P
Libido (0-3)	2,4±0,1	2,4±0,1	0,88
Volume (mL)	1,53±0,2	2,6±0,5	0,73
Concentração espermática (espermatozoides/mL)	531,6±86	299,1±48,8	0,04
Motilidade espermática (Subjetiva - %)	72,1±3,8	64±3,8	0,05
Vigor espermático (Subjetivo – 0 a 5)	2,7±0,1	2,5±0,1	0,22
Alta atividade mitocondrial (%)	80,6±3,4	72,2±2,8	0,02
Média atividade mitocondrial (%)	7,6±1,1	16,2±1,8	<0,01
Ausência de atividade mitocondrial (%)	7,4±2,1	6,4±1,5	0,70
Índice de atividade mitocondrial (Índice de DAB)	85,2±2,9	81,7±2,1	0,20
Integridade de membrana plasmática (%)	80,1±2,9	79,0±3,2	0,86
Integridade acrossomal (%)	96,1±0,5	94,5±0,8	0,13
Defeitos menores (%)	3,3±0,8	8,3±2,1	0,03
Defeitos maiores (%)	25,7±5,4	31,4±4,8	0,11
Defeitos totais (%)	27,6±5,5	31,2±4,9	0,62

Os espermatozoides provenientes do ejaculado de cães com HPB, não submetidos a tratamento, apresentaram menor porcentagem de espermatozoides com baixa atividade mitocondrial (3,6±0,9%) em relação aos animais doentes (HPB)

tratados com finasterida ($6,9 \pm 1,2\%$) (Figura 13). Ademais, dentre os animais tratados com finasterida, os cães com HPB ($6,9 \pm 1,2\%$) apresentaram maior porcentagem de espermatozoides com baixa atividade mitocondrial em relação aos hígidos ($2,5 \pm 0,5\%$) (Figura 13).

Figura 13 – Média e erro padrão da porcentagem de espermatozoides com baixa atividade mitocondrial nos diferentes grupos experimentais (HPB não tratado, HPB tratado com Finasterida, Hígido não tratado e Hígido tratado com Finasterida). São Paulo, 2017.

* indica diferença significativa entre os grupos HPB não tratado e HPB tratado com finasterida ($p < 0,05$). † indica diferença significativa entre HPB tratado e Hígido tratado com finasterida ($p < 0,05$).

Considerando a análise computadorizada do sêmen (CASA), foi possível observar maior porcentagem de espermatozoides com velocidade rápida no grupo de animais Hígidos ($47,6 \pm 4,3\%$) em comparação ao grupo HPB ($41,7 \pm 4,8\%$), independente do tratamento com finasterida (Figura 14). Contudo, na frequência de batimento flagelar cruzado (BCF) e porcentagem de espermatozoides com velocidade lenta, o grupo Hígido (BCF: $24 \pm 2,2\%$; velocidade lenta: $8,1 \pm 1,6\%$) apresentou resultados inferiores ao HPB (BCF: $30,9 \pm 1,5\%$; velocidade lenta: $15,6 \pm 2,2\%$) (Figura 14 e Tabela 6). As demais variáveis relacionadas à cinética espermática não sofreram alteração à análise dos efeitos da doença (Tabela 6) e do tratamento com finasterida.

Figura 14 – Média e erro padrão da porcentagem de espermatozoides com velocidade rápida (A) e batimento flagelar cruzado (BCF - B) nos diferentes grupos experimentais (Hígido vs. HPB). São Paulo, 2017.

* indica diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Tabela 6 – Efeito da Hiperplasia Prostática Benigna (animais hígidos vs. HPB) na análise computadorizada do sêmen (CASA). São Paulo, 2017.

	Hígido	HPB	P
Motilidade total (%)	70,8±5	60,6±4,4	0,13
Motilidade progressiva (%)	47,6±4,3	36,3±4	0,06
Espermatozoides em velocidade média (%)	15±2	18,8±2,1	0,21
Espermatozoides em velocidade lenta (%)	8,1±1,6	15,6±2,2	0,008
Espermatozoides estáticos (%)	21,1±4,7	23,8±3,9	0,57
Velocidade média da trajetória (VAP - $\mu\text{m/s}$)	98,9±6,6	95,7±5,8	0,71
Velocidade linear progressiva (VSL - $\mu\text{m/s}$)	86,6±6,2	85,4±5,5	0,89
Velocidade curvilínea (VCL - $\mu\text{m/s}$)	138,6±9,1	137,3±7,4	0,90
Amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH - $\mu\text{m/s}$)	5±0,3	6±0,3	0,05
Retilinearidade (%)	82±3,3	86,2±1,3	0,25
Linearidade (%)	61,8±3,1	63±2,4	0,89

Quanto à análise da integridade do DNA espermático por meio da técnica de coloração por azul de toluidina, observou-se maior integridade nos animais Híidos ($94,7 \pm 1,3\%$) em relação aos acometidos pela HPB ($76,8 \pm 4,6\%$), independente do tratamento com finasterida (Figura 15). O mesmo padrão ocorreu à avaliação das taxas de susceptibilidade à fragmentação de DNA (SCSA), ou seja, o grupo HPB ($1,8 \pm 0,6\%$) apresentou superioridade em relação ao grupo Híido ($0,3 \pm 0,06\%$) (Figura 15). Entretanto, na análise do teste de dispersão da cromatina espermática, não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais (Híido: $89,5 \pm 2,1\%$ e HPB: $84,2 \pm 2,1\%$). Ademais, não houve diferenças na comparação entre os grupos de tratamento com finasterida.

Figura 15 – Média e erro padrão da porcentagem de espermatozoides com integridade de DNA espermático, avaliado pela coloração de azul de toluidina (A) e da susceptibilidade à fragmentação de DNA (SCSA - B) nos diferentes grupos experimentais (Híido vs. HPB). São Paulo, 2017.

* indica diferença significativa entre os grupos ($p < 0,05$).

Na avaliação espermática por citometria de fluxo (potencial de membrana mitocondrial e integridade de membrana plasmática e acrossomal), assim como, no perfil oxidativo (TBARS e dosagem das enzimas antioxidantes), não foram observadas diferenças estatísticas considerando o efeito da doença (Híido vs. HPB), independente do tratamento com finasterida (Tabela 13 – Anexo C). O mesmo padrão foi observado na avaliação do efeito do tratamento (não tratado vs. tratado

com finasterida), a despeito da HPB (Tabela 14 – Anexo D). Ressalta-se que a enzima catalase não apresentou sinais detectáveis para a técnica empregada neste estudo.

4.2.5. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DOS TESTÍCULOS

Não foi possível observar diferenças entre as amostras avaliadas dos grupos HPB não tratado, HPB tratado com Finasterida, Hígido não tratado e Hígido tratado com Finasterida (Figura 16). Todas as amostras (testículos direito e esquerdo) apresentaram celularidade dos túbulos seminíferos discreta a moderada, por vezes focalmente elevada, sem indícios de atipias celulares. Multifocalmente, havia túbulos preenchidos com material amorfo eosinofílico acelular, na ausência de infiltrado inflamatório ou hemorragia (Figura 16).

Figura 16 – Cortes histológicos dos testículos de cães dos grupos experimentais: HPB não tratado (A), HPB tratado com Finasterida (B), Hígido não tratado (C) e Hígido tratado com Finasterida (D). 100x. São Paulo, 2017.

A análise de correlação entre as variáveis-resposta foi realizada de acordo com o efeito da HPB e do tratamento com finasterida separadamente. Nos grupos relativos ao tratamento com finasterida, foi possível observar correlações negativas entre o volume prostático e a relação sístole:diástole da artéria prostática ($r=-0,37$; $p=0,03$), enquanto o volume prostático correlacionou positivamente com o escore de vascularização da próstata ($r=0,61$; $p=0,0003$) (Figura 17).

Figura 17 – Diagrama gráfico das correlações estatísticas nos grupos relativos ao tratamento com finasterida. Setas verdes indicam correlações positivas, enquanto setas vermelhas indicam correlações negativas. São Paulo, 2017.

Com relação aos grupos relativos à HPB, houve correlações positivas entre: o escore de vascularização da próstata e o volume prostático ($r=0,49$; $p=0,005$), o volume prostático e a velocidade média de um ciclo cardíaco da artéria prostática (TAMAX - $r=0,45$; $p=0,01$), o volume prostático e os defeitos menores ($r=0,37$; $p=0,04$) e o índice de pulsatilidade (PI) da artéria testicular e os defeitos menores ($r=0,55$; $p=0,001$) (Figura 18). Não obstante, a concentração de testosterona correlacionou-se positivamente com a motilidade total ($r=0,44$; $p=0,01$), a motilidade progressiva ($r=0,39$, $p=0,02$) e a concentração espermática ($r=0,48$; $p=0,006$ – Figura 18). Ainda, a porcentagem de espermatozoides com lesão de membrana plasmática apresentou correlação positiva com o baixo potencial de membrana mitocondrial ($r=0,38$; $p=0,04$) e correlação negativa com a integridade de DNA espermático ($r=0,43$; $p=0,02$ – Figura 18).

Figura 18 – Diagrama gráfico das correlações estatísticas nos grupos relativos à HPB. Setas verdes indicam correlações positivas, enquanto setas vermelhas indicam correlações negativas entre as variáveis estudadas. São Paulo, 2017.

4.3. Discussão

No presente estudo, foi avaliada a influência da hiperplasia prostática benigna, em cães submetidos ou não ao tratamento com finasterida, sobre a avaliação seminal, perfil hormonal, análise ultrassonográfica de próstata e testículos e histologia testicular.

A hiperplasia prostática benigna é uma condição homóloga entre homens e cães, considerada a afecção de maior incidência dentre os distúrbios prostáticos em cães adultos e não castrados (BERRY et al., 1984; BAUZAITE; ANIULIENE, 2003; GILMORE; GREER, 2015). Atualmente, a instituição do tratamento utilizando a finasterida, um inibidor sintético da enzima 5 α -redutase, amplamente utilizado em homens, surge como alternativa à orquiectomia para animais reprodutores (LAROQUE et al., 1994; PARSONS et al., 2012).

Neste estudo, foi possível observar aumento do volume prostático em todos os cães avaliados, independente do grupo experimental, o qual atribuímos à faixa etária e à senescência (BERRY; COFFEY; EWING, 1986). A hiperplasia e hipertrofia das células prostáticas são mediadas pelo aumento da síntese hormonal de di-hidrotestosterona que, por sua vez, modula a expressão do agente mitogênico VEGF (fator de crescimento vascular e endotelial) (CARSON; RITTMASER, 2003; STACHON et al., 2009), e, conseqüentemente, promove a angiogênese local (STACHON et al., 2009). De fato, nossos dados demonstram que os cães acometidos por HPB apresentam aumento de volume prostático e alto escore de vascularização prostática, similar à condição descrita em homens (RIFKIN; SUDAKOFF; ALEXANDER, 1993). Contudo, nos cães com HPB submetidos a tratamento com finasterida após 60 dias, nenhuma diferença foi verificada entre o volume prostático e o volume de próstata esperado, efeito anteriormente descrito por diversos autores (JUNIEWICZ et al., 1993; LAROQUE et al., 1994). Ademais, simultaneamente à redução do volume prostático, observamos decréscimo no escore de vascularização local, além da correlação positiva entre o escore de vascularização e o volume prostático. Desta forma, nossos dados sugerem que a finasterida promove redução do volume prostático e da vascularização local, mesmo na ausência da HPB, conforme reportado anteriormente em homens (PAREEK et al., 2003). Acreditamos, portanto, que o mecanismo de ação da finasterida nos cães

seja por meio da redução da síntese de di-hidrotestosterona e, conseqüentemente, da inibição na expressão de VEGF e vascularização local. De fato, observamos menor concentração circulante de DHT nos animais tratados com finasterida, em relação aos não tratados, simultaneamente à redução hormonal de testosterona.

O aumento da angiogênese prostática na HPB é acompanhado pela elevação do fluxo sanguíneo da artéria prostática, com o intuito de aumentar o suprimento sanguíneo para a glândula hipertrófica (GUNZEL-APEL; MOHRKE; POULSEN NAUTRUP, 2001; POLISCA et al., 2013; ZELLI et al., 2013). No presente estudo, observamos aumento da velocidade ao fim da diástole (ED) e da relação sístole:diástole (S/D) da artéria prostática em cães com HPB, atestando maior fluxo sanguíneo prostático durante o curso da doença (GUNZEL-APEL; MOHRKE; POULSEN NAUTRUP, 2001). Ademais, a correlação positiva entre o volume prostático e a velocidade média de um ciclo cardíaco (TAMAX) da artéria prostática, sob efeito da HPB, confirma a influência da hipertrofia prostática na hemodinâmica local. É interessante ressaltar que os demais parâmetros hemodinâmicos (PS, RI, PI e TAMAX) permaneceram inalterados com o diagnóstico de HPB, conforme descrito anteriormente em cães (GUNZEL-APEL; MOHRKE; POULSEN NAUTRUP, 2001; ZELLI et al., 2013). Desta maneira, é possível sugerir a análise das variáveis hemodinâmicas S/D e ED da artéria prostática como marcadores vasculares da HPB em cães.

No presente experimento, os valores de S/D da artéria prostática foram superiores nos cães com HPB tratados com finasterida em relação aos não tratados, igualando-se aos cães hígidos. Tais resultados podem indicar que a HPB reduz os valores de S/D durante o curso clínico da doença (LEOCI et al., 2014) e que a terapia com finasterida tem efeito positivo no fluxo sanguíneo da próstata. De fato, observamos correlação negativa entre o volume prostático e a S/D sob efeito da finasterida, ou seja, a redução do volume da próstata é acompanhada da maior relação sístole:diástole da artéria prostática. Portanto, a avaliação da relação S/D da artéria prostática, além da importância na caracterização da HPB em cães, também pode ser empregada como parâmetro de acompanhamento na terapia com finasterida, contribuindo com a análise da resposta à terapia.

É interessante ressaltar a correlação positiva entre o volume prostático e a porcentagem de defeitos espermáticos menores, sob efeito da HPB. Os dados do nosso estudo demonstram, ainda, que os cães acometidos pela HPB apresentam

reduzida concentração hormonal de testosterona, anteriormente reportado por Cochran; Ewing; Niswender (1981). A testosterona atua fundamentalmente na espermatogênese, espermiogênese e maturação epididimária (KERR et al., 1993; TOOCHECK et al., 2016), ação corroborada no presente estudo por correlações positivas entre a concentração de testosterona e distintos parâmetros espermáticos, tais como a concentração, motilidade total e progressiva. Desta forma, alterações na concentração de testosterona podem afetar diretamente a qualidade do ejaculado de cães (KRAKOWSKI et al., 2015) e homens (GLINA et al., 2015) com HPB. De fato, nossos dados demonstram que os cães acometidos pela HPB apresentam menor concentração espermática, maior atividade média mitocondrial e porcentagem de defeitos menores. Desta forma, acreditamos que a disfunção hormonal na HPB promova alterações na espermatogênese, influenciando diretamente a funcionalidade mitocondrial, morfologia espermática e o número de células no ejaculado, consequentemente, reduzindo a qualidade seminal (GRAYHACK; KOZLOWSKI; LEE, 1998). Corroborando tal assertiva, observamos correlações positivas entre o baixo potencial de membrana mitocondrial e a lesão de membrana plasmática, bem como correlação negativa entre a integridade de DNA espermático e o baixo potencial de membrana mitocondrial, sob efeito da HPB. Ainda, analisando os resultados das análises histológicas dos testículos de cães com HPB, evidencia-se que as alterações na espermatogênese não decorrem de perdas teciduais ou alterações morfológicas testiculares. Portanto, sugerimos que o comprometimento da espermatogênese na HPB esteja relacionado às variações das concentrações de testosterona.

No presente estudo, evidenciamos alta porcentagem de espermatozoides com batimento flagelar cruzado (BCF) nos cães com HPB, sugerindo um padrão de hiperativação espermática prematura (CHAMBERLAND et al., 2001). O excesso de espécies reativas ao oxigênio (EROs), alterações do pH e osmolaridade podem estimular a hiperativação prematura (KIME; TVEITEN, 2002). Porém, o estresse oxidativo e geração de EROs ocorrem apenas em casos severos e crônicos de afecções prostáticas, sem preservação do parênquima prostático (LI et al., 2015). De fato, neste trabalho, não foram observadas diferenças entre o estresse oxidativo (TBARS) e a atividade antioxidante (SOD e GPx) nos grupos experimentais. Desta maneira, os resultados de BCF podem estar relacionados a alterações bioquímicas nos componentes do fluido prostático nos cães com HPB,

tais como os níveis de cobre, potássio, magnésio, sódio, ferro, zinco e proteínas de ligação (FRENETTE et al., 1985; KRAKOWSKI et al., 2015; HOLST et al., 2017). Por exemplo, de acordo com Bjorndahl; Kvist, (2011), as concentrações de zinco no fluido prostático estão relacionadas à estabilização do DNA espermático após a ejaculação. É importante salientar que observamos maior porcentagem de fragmentação de DNA espermático (técnicas de azul de toluidina e SCSA) nos cães com HPB, resultado observado anteriormente em cães (KRAKOWSKI et al., 2015) e em homens (LOTTI et al., 2016). Desta forma, é possível inferir que as alterações bioquímicas do fluido prostático na HPB tenham promovido modificações estruturais (movimentação cinética alterada e dano ao DNA) nos espermatozoides após a ejaculação. Entretanto, não é possível descartar a influência intrínseca do desequilíbrio hormonal na HPB (WDOWIAK et al., 2014) sobre a falha na espermatogênese (CHAMBERS; RICHARD, 2015), e, consequentemente, danos à cromatina espermática. Desta maneira, acreditamos que a fragmentação do DNA espermático em cães com HPB decorre tanto de falhas na função testicular como de alterações bioquímicas no fluido prostático. Portanto, o diagnóstico preciso da integridade do DNA espermático é necessário em cães portadores de HPB, no sentido de fornecer suporte necessário para a adequada seleção de indivíduos com alto potencial reprodutivo.

Neste experimento, embora as concentrações séricas de estrógeno e testosterona encontravam-se dentro do limite de normalidade para cães (BRENDLER et al., 1983), os níveis hormonais dos cães hígdos foi superior aos doentes. A reduzida concentração de testosterona e, consequentemente, a redução na conversão estrogênica (ABNEY, 1999), são consideradas patogênicas para o desenvolvimento da HPB, uma vez que estimula a formação de novos receptores androgênicos na próstata (KRAWIEC, 1994; LEE, 1996). Por outro lado, os cães hígdos tratados com finasterida apresentaram menor concentração de testosterona em relação aos não tratados, bem como redução das concentrações de DHT. Neste caso, acreditamos que, após o bloqueio da 5α -redutase, a conversão da testosterona em DHT foi inibida, resultando em concentrações excessivas de testosterona circulante e, por conseguinte, feedback negativo para a produção de testosterona pelas células de Leydig (ABNEY, 1999; KAPLAN, 2001). Tal relação entre as conversões hormonais e biossíntese dos hormônios podem ser observadas na Figura 19.

Figura 19 – Fluxograma e biossíntese e metabolismo dos hormônios sexuais. São Paulo, 2017.

Adaptado de Pescovitz; Cutler (1995)

É interessante ressaltar que a administração de finasterida promoveu redução no Índice de Pulsatilidade (PI) e também elevação da velocidade média de um ciclo cardíaco (TAMAX) da artéria testicular. Em cães, as velocidades do fluxo sanguíneo da artéria testicular não produzem dados precisos, por não ser possível determinar a direção do fluxo (GUMBSCH; GABLER; HOLZMANN, 2002). Desta forma, apenas os índices de resistividade e pulsatilidade devem ser considerados (DE SOUZA et al., 2014). Bergh; Collin; Lissbrant (2001) descrevem que a discreta redução no fluxo sanguíneo da artéria testicular pode afetar o processo inicial de espermatogênese. Embora não tenhamos evidenciado diferenças hemodinâmicas na artéria testicular nos cães com HPB, houve correlação positiva entre o PI da artéria testicular e a porcentagem de defeitos menores, sob efeito da HPB, sugerindo que a doença prostática interfere na hemodinâmica testicular e, conseqüentemente,

induz a falhas na espermatogênese. Por outro lado, os animais tratados com finasterida apresentaram menores resultados de PI, em relação aos não tratados, indicando que a finasterida parece atuar como regulador da homeostase vascular dos testículos, uma vez que baixos índices de RI e PI da artéria testicular indicam eficiência na espermatogênese (ZELLI et al., 2013). Desta maneira, sugere-se que a análise do PI da artéria testicular possa ser empregada como possível marcador complementar da evolução terapêutica com finasterida.

Embora Vidigal et al. (2008) tenham observado alterações no parênquima testicular em hamsters tratados com finasterida, não foi possível observar tais alterações na avaliação histológica dos testículos de cães submetidos à terapia com finasterida. Porém, acreditamos que o período de 2 meses da terapia não tenha sido suficiente para promover alterações significativas tanto na histologia testicular como na qualidade seminal, a despeito do maior dano acrossomal e quantidade de espermatozoides com baixa atividade mitocondrial. Garcia et al. (2017) descrevem alterações na integridade da membrana plasmática de espermatozoides de ratos tratados com finasterida, por aumento na velocidade do trânsito epididimário e, por conseguinte, falha na maturação espermática. Desta maneira, podemos inferir que, também em cães, o uso da finasterida pode alterar o perfil hormonal e a fisiologia reprodutiva nos epidídimos. Porém, a terapia por 2 meses não promoveu alterações impactantes na qualidade seminal, tornando possível a recomendação do emprego do sêmen de cães submetidos a tratamento com finasterida em biotecnologias da reprodução.

Capítulo 2

5 CAPÍTULO 2: COMPARAÇÃO DOS EFEITOS PROSTÁTICOS DO TRATAMENTO CIRÚRGICO (ORQUIECTOMIA) E MEDICAMENTOSO (FINASTERIDA) NA HPB EM CÃES.

Foram objetivos deste capítulo:

- Avaliar as características hemodinâmicas e vasculares prostáticas de cães com hiperplasia prostática benigna após distintos tratamentos.
- Identificar a expressão de VEGF no parênquima prostático de cães com hiperplasia prostática benigna após distintos tratamentos.
- Avaliar o perfil hormonal de testosterona, estrógeno e di-hidrotestosterona em cães com hiperplasia prostática benigna após distintos tratamentos.
- Correlacionar os dados encontrados na expressão de VEGF com a caracterização vascular da próstata e os níveis hormonais após distintos tratamentos para hiperplasia prostática benigna.

5.1. Material e Métodos

O presente experimento foi realizado segundo as normas de bem-estar animal, sendo aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP) (protocolo nº 7122171213).

5.1.1. ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

O presente estudo foi conduzido utilizando-se cães não castrados, de raças distintas, com idade entre 6 a 13 anos e peso corpóreo de 10 a 30 kg. O critério de exclusão adotado referiu-se ao monorquidismo e criptorquidismo uni ou bilateral e quaisquer afecções do cunho reprodutivo e hormonal.

Os cães apresentaram o diagnóstico de hiperplasia prostática benigna (HPB) por meio da associação dos dados obtidos na anamnese, sinais clínicos e biometria prostática por ultrassonografia em modo B. Dentre os sinais clínicos mais comumente apresentados, destaca-se a hematospermia, tenesmo, disúria e hematúria. Após o diagnóstico presuntivo de HPB, os cães foram aleatoriamente alocados nos seguintes grupos experimentais:

- **Grupo Orquiectomia (n=5):** cães submetidos à orquiectomia bilateral após o diagnóstico de HPB. Idade média: 10,4 anos. Peso médio: 27,9 kg.
- **Grupo Finasterida (n=5):** cães submetidos à terapia medicamentosa com Finasterida após o diagnóstico de HPB. Idade média: 9,2 anos. Peso médio: 23,4 kg.
- **Grupo Não Tratado (n=5):** cães não tratados após o diagnóstico de HPB. Idade média: 10,8 anos. Peso médio: 18,8 kg.

O perfil e a distribuição dos animais nos grupos experimentais encontram-se no Quadro 2.

Quadro 2 - Idade, peso, raça e distribuição dos cães nos grupos experimentais (n=15). São Paulo, 2017.

ANIMAL	RAÇA	PESO (kg)	IDADE (anos)	GRUPO
1	Cocker	13,6	10	Não tratado
2	Akita	18,7	13	Não tratado
3	Dachshund	10,1	13	Não tratado
4	Pastor Malinois	29,5	8	Não tratado
5	SRD	22,2	10	Não tratado
6	Cocker	22	12	Finasterida
7	Pastor Alemão	28,2	6	Finasterida
8	Pit Bull	25,5	9	Finasterida
9	SRD	13,7	11	Finasterida
10	Pit Bull	27,6	8	Finasterida
11	SRD	22,2	10	Orquiectomia
12	Labrador	28,6	10	Orquiectomia
13	Pastor Malinois	29,5	8	Orquiectomia
14	Golden Retriever	29,8	7	Orquiectomia
15	SRD	29,8	9	Orquiectomia

Todos os cães foram acompanhados por dois meses, pontualmente, em três avaliações: Dia 0, Dia 30 e Dia 60, sendo o dia inicial aquele no qual iniciou-se a terapia medicamentosa ou o procedimento cirúrgico (Figura 20). Nos referidos momentos, foi realizada a ultrassonografia prostática e colheita de soro sanguíneo para dosagens hormonais. Após dois meses (Dia 60), os animais foram submetidos à biópsia prostática, por meio da qual o tecido foi processado para análise histológica, imunohistoquímica e PCR quantitativo para expressão do VEGF. Para os animais dos grupos tratados com Finasterida, foi adotada a posologia de 5 mg por animal, VO, a cada 24 horas durante 2 meses (KAMOLPATANA et al., 1998).

5.1.1.1. Delineamento Experimental

Figura 20 – Delineamento experimental referente ao Experimento 2. São Paulo, 2017.

5.1.2. AVALIAÇÃO ULTRASONOGRÁFICA

A avaliação ultrassonográfica da próstata, assim como a dopplervelocimetria da artéria prostática foram realizadas como descrito anteriormente no Capítulo 1.

5.1.3. PERFIL HORMONAL

A coleta de soro sanguíneo, assim como a realização das dosagens hormonais de di-hidrotestosterona, testosterona e estrógeno foram executadas como descrito anteriormente no Capítulo 1.

5.1.4. ORQUIECTOMIA

Os procedimentos anestésico e cirúrgico foram realizados como descrito anteriormente no Capítulo 1.

5.1.5. BIÓPSIA PROSTÁTICA

Previamente à realização da biópsia, os cães foram submetidos à fluidoterapia intravenosa com solução de NaCl a 0,9%. A acepromazina (0,03 mg/kg) e/ou meperidina (2,0 mg/kg) foram utilizadas como medicação pré-anestésica. Para a indução anestésica, foi utilizado o propofol (5,0 mg/kg) por via intravenosa. Após intubação oro-traqueal, os animais foram submetidos à oxigenioterapia e a manutenção anestésica realizada com isoflurano.

As amostras de tecido prostático foram colhidas por meio da punção aspirativa utilizando a agulha Tru-Cut semi-automática de 18 gauges guiada por ultrassom (HOLAK et al., 2010). Após a tricotomia da região abdominal, foi procedida a punção com acesso transabdominal, após a devida antisepsia do local (Figura 21). A agulha foi introduzida manualmente em um dos lobos da glândula prostática. Posteriormente, os fragmentos obtidos foram conservados em solução de formalina 10% ou destinados ao processamento de amostras para o PCR quantitativo (HAGER; NYLAND; FISHER, 1985). A analgesia pós-operatória foi realizada com dipirona (25 mg/kg).

Figura 21 – Realização de biópsia prostática guiado por ultrassom. São Paulo, 2017.

Fonte: Angrimani, D.S.R. (2016).

5.1.6. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DO FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL (VEGF-A) NO PARÊNQUIMA PROSTÁTICO

Imediatamente após a colheita, os fragmentos prostáticos foram lavados em solução fisiológica a 0,9% e fixados em solução tamponada a 10% de fosfato de formaldeído por 24 horas. Após este período, as amostras

permaneceram armazenadas em álcool 70% até a inclusão em parafina. Sucessivas lavagens em soluções compostas por diferentes concentrações de álcool e xilol foram realizadas nos fragmentos prostáticos. Os blocos de parafina foram posteriormente seccionados em cortes histológicos de até 5 µm e corados com hematoxilina-eosina (HE) para avaliação em microscopia de luz transmitida (Nikon, Eclipse E200, Japão). A HPB foi considerada quando foi possível identificar hiperplasia epitelial e fibrose estromal, segundo classificação de Palmieri et al. (2014).

Para a análise da imunohistoquímica do VEGF-A, foram utilizadas secções de 3 µm da próstata. A recuperação antigênica foi realizada utilizando buffer de Tris/EDTA em pH 9 utilizando o anticorpo primário e subsequentemente o secundário. Foi utilizado anticorpo monoclonal de camundongo específico para VEGF-A (VG-1, AB1316, ABCAM, UK; diluído em 1:100) em sistema overnight. Então, foi realizada incubação com anticorpo secundário (específico para IgG de coelhos – *antirabbit*) e adicionados 3,3'-diaminobenzidina (durante 5 minutos) para marcação e hematoxilina para contra coloração (GIANTIN et al., 2012). Todas as reações de imunohistoquímica foram acompanhadas por controle negativo (próstatas do grupo Não tratado, sem aplicação de anticorpo primário) e controle positivo (fragmentos de tumor mamário).

As avaliações foram realizadas em microscópio (Leitz, Dialux 20, Alemanha) no aumento de 400x por três diferentes operadores de maneira cega controlada. Apenas o citoplasma do epitélio glandular prostático foi avaliado, sendo considerado 10 campos aleatórios. Os resultados foram analisados usando a relação entre a porcentagem da área de coloração (0 – de 0 até 5%, 1 – de 6 até 33%, 2 – de 34 até 66%, 3 – acima de 67%) e intensidade (0 – negativo, 1 – baixa, 2 – moderada e 3 – alta), sendo considerado o resultado médio dos três avaliadores. Portanto, o escore foi definido segundo o cálculo de Veiga et al. (2017):

$$\text{ESCORE} = \% \text{ de Área corada} \times \text{Intensidade de Coloração}$$

5.1.7. AVALIAÇÃO POR PCR QUANTITATIVO (*REAL TIME*) DO VEGF NO PARÊNQUIMA PROSTÁTICO

As amostras de tecido prostático provenientes da biópsia foram acondicionadas em criotubos, imersas em nitrogênio líquido e acondicionadas em freezer -80°C para posterior extração de RNA. As amostras foram maceradas e a extração do RNA foi realizada utilizando o kit de extração RNeasy spin mini Illustra (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ).

Após a extração, o RNA foi quantificado com espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA), utilizando 1 µL de amostra. Na sequência, 1 µg de RNA total foi utilizado para síntese do cDNA, através do kit comercial Superscript VILO cDNA Synthesis (Life Technologies). O cDNA sintetizado foi, então, quantificado utilizando o Qubit 2.0 Fluorometer (Qubit dsDNA BR, Life Technologies) e as amostras foram armazenadas a -20°C.

Para determinar a expressão gênica do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), o primer foi selecionado de acordo com Giantin et al. (2012) (Quadro 3). Já os primers dos genes endógenos GAPDH e B2M foram desenhados através do software online primer-Blast (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome, NCBI, NIH, EUA - Quadro 3). Foi realizada a padronização dos primers através de curva padrão de diluição seriada das amostras 1:10 com 7 pontos.

As reações foram realizadas em triplicatas para cada amostra em aparelho *Realplex² Mastercycler* (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). Para cada reação foi utilizado o kit SYBR GreenER qPCR Supermix Universal (Life Technologies) e 2 µL do cDNA. O programa qPCR consistiu de 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos.

A concentração dos primers foi definida como 200:200 para o VEGF e GAPDH e 300:300 para o B2M.

Quadro 3 – Sequência de oligonucleotídeos dos genes VEGF, B2M e GAPDH. São Paulo, 2017.

Gene	Forward	Reverse
VEGF	CGTGCCCACTGAGGAGTT	GCCTTGATGAGGTTTGATCC
B2M	TCCTCATCCTCCTCGCT	TTCTCTGCTGGGTGTCTG
GAPDH	GTAGTGAAGCAGGCATCGGA	GTCGAAGGTGGAAGAGTGGG

Foi observada a eficiência da reação conforme cálculo por meio do software Realplex do PCR, sendo a eficiência entre 0.9 e 1.1 considerada ideal. Foi avaliada a amplificação de cada gene em cada amostra para verificar se os valores de Ct obtidos estavam contidos na curva padrão linear de eficiência desejada.

Os dados do qRT-PCR foram analisados utilizando o método $\Delta\Delta Ct$ (PFAFFL, 2001). A média geométrica dos genes *housekeeping* GAPDH e B2M foram utilizadas para normalizar a quantificação relativa dos genes alvo. O valor de Ct dessa amostra foi então subtraído das outras amostras para gerar o valor de $\Delta\Delta Ct$ e consequentemente a quantidade relativa (Fold Change) da expressão gênica.

5.1.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram avaliados utilizando o Sistema SAS para Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). Os efeitos de grupo, tempo de avaliação, e as interações entre esses fatores foram estimados pelas medidas repetidas ANOVA (procedimento MIXED do SAS). Diferenças entre os tratamentos foram analisados por meio de testes paramétricos e não paramétricos, de acordo com a normalidade residual (distribuição de Gauss) e homogeneidade das variâncias. Sempre que um desses pressupostos não foi respeitado, os dados foram transformados. Se transformações não foram bem-sucedidas, foram utilizados os testes não paramétricos. O PI, S/D e escore de vascularização foram log transformados.

No caso de não ocorrer significativas interações, o efeito dos grupos foi analisado ao fundir todos os momentos de avaliação, e, inversamente, os tempos de avaliação foram comparados combinando todos os grupos, tendo em conta a correção de Bonferroni (PROC GLIMMIX); caso contrário, as comparações foram realizadas tendo em conta os efeitos principais combinados. As variáveis respostas foram também submetidas à análise de correlação de Pearson. Os resultados foram descritos como a média e erro padrão. O nível de significância utilizado foi de 5%. Em outras palavras, foram consideradas diferenças estatísticas entre as variáveis de classificação para uma determinada variável resposta se $P \leq 0,05$.

Os dados do qPCR relativo em amostras prostáticas foram analisados pelo procedimento MIXED, como descrito por Steibel et al. (2009).

5.2. Resultados

Interações significativas ($p < 0,05$) entre os grupos experimentais (Não tratado vs. Finasterida vs. Orquiectomia) e o momento de avaliação (Dias 0 vs. 30 vs. 60) foram observadas para as seguintes variáveis: escore de vascularização da próstata, volume prostático, relação sístole:diástole (S/D) e índice de resistividade (RI) da artéria prostática e concentrações de testosterona e di-hidrotestosterona (Tabela 7). Para as demais variáveis, os resultados do coeficiente de probabilidade na interação entre fatores encontram-se descritos na Tabela 15 (Anexo E). Para tais variáveis, optou-se por ressaltar, como efeito principal, a comparação entre os grupos experimentais, independente do momento de avaliação. Para a avaliação do tempo como efeito principal, independente dos grupos experimentais, não foram observadas diferenças estatísticas importantes.

Tabela 7 - Valores de probabilidade para o efeito principal do tratamento (Não tratado vs. Orquiectomia vs. Finasterida) e tempo (Dias 0 vs. 30 vs. 60) e sua interação para as variáveis ultrassonográficas e concentração hormonal. São Paulo, 2017.

	Tratamento	Tempo	Tratamento x Tempo
Volume Prostático (cm ³)	0,20	<0,01	<0,01
Relação sístole:diástole (S/D)	0,03	0,02	0,01
Índice de Resistividade (RI)	0,08	0,15	0,02
Escore Vascularização (1-3)	<0,01	0,01	0,03
Testosterona (ng/mL)	<0,01	<0,01	0,01
Di-hidrotestosterona (pg/mL)	<0,01	<0,01	0,01

Após 30 dias de observação, tanto para os cães tratados com Finasterida, como os submetidos à Orquiectomia, os sinais clínicos (hematospermia, tenesmo, disúria e hematúria) cessaram. Os animais do Grupo Não tratado permaneceram estáveis clinicamente, permitindo a continuidade do experimento.

5.2.1. AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA

Quanto à análise do Índice de Resistividade, foi observado aumento significativo ao longo do tempo somente para o grupo Orquiectomia, especialmente entre os dias 0 ($0,7 \pm 0,01$) e 30 ($0,78 \pm 0,02$) (Figura 22). Após 60 dias, o RI do grupo Orquiectomia ($0,8 \pm 0,009$) foi superior ao grupo Não tratado ($0,6 \pm 0,01$) (Figura 22).

Figura 22 – Média e erro padrão do índice de resistividade (RI) nos grupos Não tratado, Finasterida e Orquiectomia nos dias 0, 30 e 60. São Paulo, 2017.

A-B indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$). a-b indicam diferença estatística entre os tempos ($p < 0,05$).

O escore de vascularização da próstata sofreu redução no decorrer do tempo para os grupos Finasterida e Orquiectomia, mais precocemente para os animais submetidos ao tratamento cirúrgico [diferença estatística entre o dia 0 ($2 \pm 0,3$) e dia 30 (1 ± 0)] Figura 23). À comparação entre grupos, os animais não tratados apresentaram o maior escore de vascularização nos tempos 30 e 60, seguido pelo grupo Finasterida e Orquiectomia (Figura 23).

Figura 23 – Média e erro padrão para o escore de vascularização (1-3) da próstata nos grupos Não tratado, Finasterida e Orquiectomia nos dias 0, 30 e 60. São Paulo, 2017.

A-C indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$). a-c indicam diferença estatística entre os tempos ($p < 0,05$).

A relação sístole e diástole (S/D) da artéria prostática apresentou aumento significativo no grupo Orquiectomia após 60 dias. (Figura 24). No dia 30, os animais orquiectomizados ($5 \pm 0,4$) apresentaram valores superiores de S/D apenas em relação aos não tratados ($3,7 \pm 0,3$) (Figura 24). Já após 60 dias, o grupo Orquiectomia ($6,1 \pm 0,2$) apresentou valor de S/D superior tanto ao grupo Não tratado ($3,4 \pm 0,1$), como ao grupo Finasterida ($4,7 \pm 0,6$) (Figura 24).

Figura 24 – Média e erro padrão da relação sístole e diástole (S/D) da artéria prostática nos grupos Não tratado, Finasterida e Orquiectomia nos dias 0, 30 e 60. São Paulo, 2017.

A-B indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$). a-c indicam diferença estatística entre os tempos ($p < 0,05$).

À comparação entre grupos, a velocidade ao fim da diástole (ED) da artéria prostática foi inferior no grupo Orquiectomia, em relação aos grupos Não tratado e Finasterida (Tabela 8). Entretanto, o grupo Finasterida apresentou resultados de TAMAX superiores apenas ao grupo Orquiectomia (Tabela 8).

Tabela 8 – Valores médios e erros padrão das variáveis hemodinâmicas da artéria prostática nos grupos Não tratado, Finasterida e Orquiectomia. São Paulo, 2017

	Não Tratado	Finasterida	Orquiectomia
PS (cm/s)	71,2±2,5	73,3±4,1	64,3±4
ED (cm/s)	20,3±0,78 ^A	18,8±1,5 ^A	14,9±1,3 ^B
TAMAX (cm/s)	26±1,9A ^{AB}	28,7±2,1 ^A	22,4±1,9 ^B
PI	2,1±0,2	1,9±0,1	2,5±0,2

A-B

na mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,05$). Legenda: PS: Velocidade do pico sistólico. ED: Velocidade ao fim da diástole. TAMAX: Velocidade média de um ciclo cardíaco. PI: Índice de Pulsatilidade.

Tanto nos dias 0 e 30, o volume prostático (VP), mensurado por ultrassonografia, foi estatisticamente superior ao volume de próstata esperado (VPE) para todos os grupos experimentais (Figura 25). Entretanto, após 60 dias, não houve diferença entre o VP e VPE para os grupos Finasterida (PV: $42.5 \pm 12.3 \text{ cm}^3$; VPE: $14.3 \pm 0.6 \text{ cm}^3$) e Orquiectomia (PV: $16.2 \pm 2.4 \text{ cm}^3$; EPV: $15.13 \pm 0.3 \text{ cm}^3$ - Figura 25), sendo o menor volume prostático encontrado no grupo Orquiectomia (Figura 25). Ao longo do tempo, o VP do grupo Orquiectomia reduziu-se gradativamente (tempo 0: $51,1 \pm 3,7 \text{ cm}^3$, tempo 30: $30 \pm 4,8 \text{ cm}^3$, tempo 60: $16,2 \pm 2,4 \text{ cm}^3$ – Figura 25).

Figura 25 – Média e erro padrão do volume prostático (VP - cm^3) e volume de próstata esperado (VPE - cm^3) nos grupos Não tratado, Finasterida e Orquiectomia nos dias 0 (A), 30 (B) e 60 (C). São Paulo, 2017.

*Indica diferença entre VP e VPE ($p < 0,05$). A-C indicam diferença entre os tempos ($p < 0,05$). a-b indicam diferença entre grupos ($p < 0,05$). Legenda: NT = Grupo Não Tratado, FIN= Grupo Finasterida, ORQ= Grupo Orquiectomia

Após 60 dias, foi constatado redução de $67,4 \pm 6,1\%$ no volume prostático dos cães orquiectomizados, diferindo significativamente dos tratados com finasterida ($35,2 \pm 5,4\%$) e dos não tratados, os quais apresentaram aumento de $15,4 \pm 7,9\%$ no volume prostático (Figura 26).

Figura 26 – Avaliação do volume prostático nos grupos Não tratado, Finasterida e Orquiectomia. São Paulo, 2017.

A-C indicam diferença entre os grupos ($p < 0,05$). Legenda: NT = Grupo Não Tratado, FIN= Grupo Finasterida, ORQ= Grupo Orquiectomia

5.2.2. AVALIAÇÃO DO PERFIL HORMONAL

Para a análise da concentração de estrógeno, não houve diferença entre os grupos Não tratado ($6,74 \pm 2,1$ pg/mL), Finasterida ($3,62 \pm 0,7$ pg/mL) e Orquiectomia ($2,99 \pm 0,5$ pg/mL). Contudo, apenas no grupo Orquiectomia foi observada redução significativa da concentração de testosterona entre o dia 0 ($2,1 \pm 1,4$ ng/mL) e os dias 30 ($0,01 \pm 0,004$ ng/mL) e 60 ($0,01 \pm 0,004$ ng/mL), resultando em diferenças estatísticas entre os grupos experimentais (Figura 27).

Figura 27 – Média e erro padrão da concentração de testosterona nos grupos Não tratado, Finasterida e Orquiectomia nos dias 0, 30 e 60. São Paulo, 2017.

A-B indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$). ^{a-b} indicam diferença estatística entre os tempos ($p < 0,05$).

Em relação às concentrações de di-hidrotestosterona (DHT), após 30 dias da orquiectomia, houve redução significativa em comparação aos grupos Não tratado e Finasterida (Figura 28).

Figura 28 – Média e erro padrão da concentração de di-hidrotestosterona nos grupos Não tratado, Finasterida e Orquiectomia nos dias 0, 30 e 60. São Paulo, 2017.

A-B indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

Ainda, no dia 0, em todos os grupos as concentrações de testosterona (Tabela 9), estrógeno (Tabela 10) e di-hidrotestosterona (Tabela 11) foram compatíveis com animais acometidos por hiperplasia prostática benigna.

Tabela 9 - Média e erro padrão da concentração de testosterona nos grupos Não tratado, Finasterida e Orquiectomia nos dias 0, 30 e 60 em relação aos valores de referência para animais hígidos e acometidos por HPB. São Paulo, 2017.

Concentração de Testosterona (ng/mL)					
	Dia 0	Dia 30	Dia 60	Referência HPB	Referência Hígido
Não Tratado	1,8±0,7	1,3±0,4	1,2±0,3	<3.5*	1-5**
Finasterida	1,9±0,9	1,5±0,5	1,6±0,9	<3.5*	1-5**
Orquiectomia	2,1±0,01	0,01±0,004	0,01±0,004	<3.5*	1-5**

* Adaptado de Brendler et al. (1983). ** Adaptado de Feldman; Nelson (1987).

Tabela 10 - Média e erro padrão da concentração de estrógeno nos grupos Não tratado, Finasterida e Orquiectomia nos dias 0, 30 e 60 em relação aos valores de referência para animais hígidos e acometidos por HPB. São Paulo, 2017.

Concentração de Estrógeno (pg/mL)					
	Dia 0	Dia 30	Dia 60	Referência HPB	Referência Hígido
Não Tratado	11,8±5,5	5,8±2,5	2,4±0,9	<8.0*	<15**
Finasterida	5,4±1,9	3,6±1,0	1,7±0,4	<8.0*	<15**
Orquiectomia	2,9±0,9	4±1,4	2,0±0,5	<8.0*	<15**

* Adaptado de Brendler et al. (1983). ** Adaptado de Feldman; Nelson (1987).

Tabela 11 - Média e erro padrão da concentração de di-hidrotestosterona nos grupos Não tratado, Finasterida e Orquiectomia nos dias 0, 30 e 60 em relação aos valores de referência para animais hípidos e acometidos por HPB. São Paulo, 2017.

Concentração de Di-hidrotestosterona (pg/mL)					
	Dia 0	Dia 30	Dia 60	Referência HPB	Referência Hípido
Não Tratado	173,9±64,7	157,4±46,4	247,6±154,2	>230*	155±32,3**
Finasterida	224,9±81,5	96±28,4	69,6±11,0	>230*	155±32,3**
Orquiectomia	290,1±185,5	11,6±4,1	6,5±0,1	>230*	155±32,3**

* Adaptado de Brendler et al. (1983). ** Adaptado de Feldman; Nelson (1987).

5.2.3. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO VEGF NO PARÊNQUIMA PROSTÁTICO POR PCR QUANTITATIVO (*REAL TIME*)

Na análise da expressão do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) no parênquima prostático, foi possível observar menor expressão no grupo Orquiectomia em relação ao grupo HPB ($p < 0,0049$ – Figura 29) e ao grupo Finasterida ($p < 0,0165$ – Figura 29).

Figura 29 – Quantificação relativa (log2 - Fold change) do gene VEGF no tecido prostático. São Paulo, 2017.

Legenda: NT = Grupo Não Tratado, FIN= Grupo Finasterida, ORQ= Grupo Orquiectomia

5.2.4. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA E IMUNOHISTOQUÍMICA DO FATOR DE CRESCIMENTO VASCULAR ENDOTELIAL (VEGF-A) NO PARÊNQUIMA PROSTÁTICO

À análise histológica, os grupos Não tratado e Finasterida apresentaram discreta a moderada dilatação de ácinos, por vezes formando projeções papilíferas, associadas à hiperplasia e hipertrofia de epitélio glandular. Tais células apresentaram citoplasma apical expandido, eosinofílico e discretamente granular, observando baixa anisocitose e anisocariose. Não foram observados indícios de processo neoplásico. Por outro lado, o grupo Orquiectomia apresentou massiva redução do epitélio glandular, permanecendo apenas tecido conjuntivo, caracterizando como atrofia da glândula prostática.

Em relação à avaliação imunohistoquímica do VEGF-A no parênquima prostático, o grupo Não tratado apresentou maior escore de expressão de VEGF-A, seguido do grupo Finasterida, ambos superiores ao grupo Orquiectomia (Figura 30).

Figura 30 – (I) Áreas citoplasmáticas e de epitélio glandular imunomarcadas para VEGF-A (seta) nos grupos Não tratado (A), Finasterida (B) e Orquiectomia (C). 200x. (II) Médias e erro padrão do escore de imunomarcção para VEGF-A nos grupos Não tratado, Finasterida e Orquiectomia.

^{a-c} indicam diferença estatística entre os tempos ($p \leq 0,05$). Legenda: NT = Grupo Não Tratado, FIN= Grupo Finasterida, ORQ= Grupo Orquiectomia

Realizou-se a análise de correlação entre as variáveis-resposta apenas considerando cada grupo experimental. Assim, no grupo Não tratado, houve correlações positivas entre: escore de vascularização da próstata e velocidade ao fim da diástole (ED) da artéria prostática ($r=0,60$; $p=0,01$); e entre o ED e volume prostático ($r=0,70$; $p=0,003$) (Figura 31). Já no grupo Finasterida, destaca-se a correlação positiva entre o escore de vascularização e o volume prostático ($r=0,69$; $p=0,003$) (Figura 31). Por outro lado, no grupo Orquiectomia, o

índice de resistividade da artéria prostática correlacionou negativamente com o volume prostático ($r=-0.76$; $p=0.0008$). Adicionalmente, houve correlação positiva entre a concentração de di-hidrotestosterona e o escore de vascularização prostática ($r=0.85$; $p=0.0002$) (Figura 31).

Figura 31 – Diagrama gráfico das correlações entre as variáveis-resposta nos grupos Não tratado, Finasterida e Orquiectomia. São Paulo, 2017.

5.3. Discussão

No presente capítulo, foram avaliadas as modificações relacionadas à vascularização e hemodinâmica da próstata, bem como, o perfil hormonal de cães

submetidos ao tratamento médico e cirúrgico (finasterida e orquiectomia, respectivamente) para a hiperplasia prostática benigna.

Em cães, o curso da HPB envolve o desbalanço entre a concentração de testosterona e estrógeno (CARSON; RITTMASER, 2003) e, conseqüentemente, aumento nas concentrações de di-hidrotestosterona (COCHRAN; EWING; NISWENDER, 1981). De fato, no presente experimento, os animais diagnosticados presuntivamente com HPB apresentaram perfil hormonal estrogênico, de DHT e testosterona inicialmente alterados (dia 0), como o esperado para animais acometidos pela doença (BRENDLER et al., 1983). Entretanto, apenas os cães orquiectomizados apresentaram decréscimo significativo das concentrações de DHT e testosterona ao longo do período experimental. Por outro lado, o perfil hormonal dos cães tratados com finasterida permaneceu inalterado, embora fosse esperado redução da concentração de DHT por bloqueio da enzima 5α -redutase (KAPLAN, 2001). Entretanto, vale ressaltar que homens medicados com finasterida apenas apresentam redução dos níveis séricos de DHT após 10 semanas de tratamento (AMORY et al., 2007). Portanto, acreditamos que a redução significativa dos níveis hormonais de DHT possa ocorrer mais tardiamente em cães, assim como em homens, pois verifica-se que o fármaco induz a alterações prostáticas significativas somente após longo período de administração, por exemplo, em cães a atrofia máxima da glândula prostática ocorre após 9 semanas de tratamento com finasterida (COHEN et al., 1995).

Embora o tratamento com finasterida não tenha reduzido os níveis hormonais de DHT ao longo de 60 dias, observamos significativa redução do volume prostático, não havendo diferença estatística com o volume esperado da próstata (VPE), de forma semelhante a estudos prévios (JUNIEWICZ et al., 1993; LAROQUE et al., 1994). Ademais, em corroboração a Iguer-Ouada; Verstegen (1997), o medicamento mostrou-se eficaz na redução dos sinais clínicos da HPB, comprovando-se como opção de tratamento clínico para a afecção. Por outro lado, cães submetidos à orquiectomia apresentaram significativa redução do volume prostático já aos 30 dias de avaliação, igualando-se ao volume esperado da próstata (VPE) após 60 dias. Pode-se atribuir tal resultado ao decréscimo significativo das concentrações de testosterona e DHT logo aos 30 dias após a gonadectomia. De fato, o tratamento cirúrgico reduziu em 67,4% o volume

prostático após 60 dias, resultando em atrofia histológica da próstata. De forma semelhante, Barsanti; Finco (1986), e Chen et al. (2004) observaram, respectivamente, redução em 50% do volume prostático após três semanas da orquiectomia e atrofia prostática.

Para os cães não tratados ou submetidos ao protocolo com finasterida, a biópsia prostática após 60 dias revelou hipertrofia do tecido glandular, caracterizando histologicamente o diagnóstico de HPB (TESKE et al., 2002; PALMIERI et al., 2014). Dentre os fatores que estimulam a mitose tecidual do parênquima prostático (ex. fator epidermal, fator de crescimento de queratinócitos e fatores de crescimento semelhantes à insulina), o VEGF é considerado o principal responsável por aumento da angiogênese local (CARSON; RITTMASER, 2003; STACHON et al., 2009). De fato, nossos dados demonstram que os cães não tratados apresentam maior escore de vascularização prostática ao longo de todo o período experimental, bem como maior expressão de VEGF no epitélio prostático, similar ao já descrito em homens (RIFKIN; SUDAKOFF; ALEXANDER, 1993) e cães (GUNZEL-APEL; MOHRKE; POULSEN NAUTRUP, 2001). Ainda, observamos correlações positivas entre o volume prostático e o fluxo sanguíneo local nos grupos Não tratado e Finasterida, sugerindo que o aumento do volume prostático é acompanhado por maior vascularização local. De fato, diversos autores comprovaram o maior aporte sanguíneo para a próstata hipertrofiada, ao observarem aumento nos índices hemodinâmicos da artéria prostática (GUNZEL-APEL; MOHRKE; POULSEN NAUTRUP, 2001; POLISCA et al., 2013; ZELLI et al., 2013). Em nosso estudo, verificamos que os cães não tratados apresentam maior RI (índice de resistividade), ED (velocidade ao fim da diástole) e TAMAX (velocidade média de um ciclo cardíaco), além de menor S/D (relação sístole e diástole) da artéria prostática, em comparação aos cães orquiectomizados. Ainda, houve correlação positiva entre o ED, volume prostático e escore de vascularização no grupo Não tratado. Desta forma, sugerimos que a análise do fluxo sanguíneo da próstata, por meio do Doppler pulsátil da artéria prostática, possa ser empregada como meio complementar ao diagnóstico presuntivo e prognóstico da HPB em cães.

Ao longo do período experimental, os grupos submetidos a tratamento para a HPB apresentaram decréscimo na vascularização prostática analisada por meio do Doppler espectral. É possível atribuir tal resultado ao menor escore de

imunomarcacão e expressão gênica para o VEGF no tecido prostático após 60 dias de tratamento, em comparação ao grupo Não tratado. O fator de modulação mais relevante da expressão de VEGF no tecido prostático é a concentração de di-hidrotestosterona (EISERMANN; FRAIZER, 2017), uma vez que a redução dos níveis de DHT acarretam em inibição da neovascularização prostática. De fato, foi verificada correlação positiva entre os níveis de DHT e o escore de vascularização prostática no grupo Orquiectomia, sugerindo que o perfil hormonal está influenciando o fluxo sanguíneo da próstata. Ainda, para o grupo Orquiectomia, houve simultaneamente redução significativa da concentração de DHT e testosterona ao longo do período experimental, além da menor expressão do gene VEGF no tecido prostático após 60 dias da cirurgia. A partir de tais resultados, sugerimos que a intensa privação de andrógenos seja a causa da atrofia prostática, por ser capaz de alterar a síntese proteica de forma pós-translacional, ou seja, previamente à transcrição do mRNA no tecido prostático de cães, modificando a expressão gênica dos fatores de crescimento tecidual. Desta forma, o decréscimo das concentrações de DHT, assim como a redução do parênquima prostático, vascularização e interrupção dos sinais clínicos comprovam a eficácia da orquiectomia, de modo similar ao observado em homens (PAREEK et al., 2003). Ademais, além da eficácia do tratamento, nossos dados podem ser utilizados como base para novos estudos da neovascularização no câncer de próstata e tratamentos oncológicos em homens e cães (CHENG et al., 2004).

É interessante ressaltar que o grupo tratado com Finasterida não apresentou redução dos níveis hormonais ao longo do período experimental, a despeito da menor imunomarcacão para o VEGF na próstata, vascularização e volume do órgão (redução em 35,2%). Além do bloqueio enzimático da 5 α -redutase, a finasterida também atua modulando a expressão de receptores para andrógenos na próstata (KAPLAN, 2001; BAUMAN et al., 2014). Assim, acreditamos que a regulação negativa dos receptores androgênicos pela finasterida, além de auxiliar o bloqueio da DHT, promoveu diminuição do volume prostático e, conseqüentemente, redução na expressão tecidual de VEGF, alterando o estímulo para a angiogênese (BAUMAN et al., 2014; OPOKU-ACHEAMPONG; HENNINGSON; LINDSHIELD, 2017). Desta forma, inferimos que o tratamento farmacológico (finasterida) para a HPB bloqueia os receptores de

andrógeno na próstata, inibindo a ação local da DHT, mesmo sem haver significativa diminuição da síntese hormonal. Já o tratamento cirúrgico (orquiectomia) promove intensa atrofia da próstata, gerando alterações morfofuncionais, tais como a redução na expressão gênica de fatores de crescimento (ex: VEGF).

A gonadectomia é considerada importante tratamento cirúrgico para a redução do volume prostático, vascularização local e fluxo sanguíneo (GHAFAR et al., 2002). Em nosso experimento, os cães orquiectomizados apresentaram significativa alteração da hemodinâmica prostática após 60 dias da cirurgia, possivelmente por diminuição acentuada dos níveis androgênicos (testosterona e DHT), uma vez que o fluxo sanguíneo da próstata é regulado principalmente por andrógenos (LEKÅS et al., 1997; SHABSIGH et al., 1998; BUTTYAN; GHAFAR; SHABSIGH, 2000). De tal modo, a redução esperada no suprimento sanguíneo para a próstata pode ser considerado um sinal indireto da eficácia da gonadectomia como forma de tratamento para a HPB (GHAFAR et al., 2002). Em nosso experimento, observamos correlação negativa entre o volume de próstata e o índice de resistividade no Grupo Orquiectomia, sugerindo que o aumento da resistência intravascular da artéria prostática pode ser usado como marcador da resolução da hipertrofia e da ocorrência de significativa atrofia da próstata, indicando o efeito benéfico da orquiectomia terapêutica.

Em conclusão, as terapias médica e cirúrgica (finasterida e orquiectomia, respectivamente) para a HPB promovem redução da dimensão da próstata e expressão local de VEGF e, conseqüentemente, redução da vascularização prostática. Ademais, a orquiectomia promoveu acentuada diminuição androgênica e intensa atrofia da próstata, reduzindo a expressão genica do VEGF e hemodinâmica prostática. Tais resultados podem atestar o prognóstico favorável de cães tratados para a HPB e sugerir estudos adicionais referentes ao diagnóstico e tratamento da afecção em cães.

[illegible]

6 CONCLUSÕES

Em relação ao capítulo 1 (*Avaliação dos efeitos da finasterida na próstata e testículos de cães isentos e acometidos por HPB*) é possível concluir que:

1. Os cães acometidos pela hiperplasia prostática benigna apresentam alterações seminais relativas à cromatina espermática, cinética dos espermatozoides, morfologia e concentração espermática. Por outro lado, a terapia com finasterida por 2 meses não promove alterações significativas na qualidade seminal de cães.
2. A terapia com finasterida por 2 meses altera a hemodinâmica da artéria testicular e o Índice de Pulsatilidade (PI) pode ser utilizado como regulador da homeostase vascular dos testículos durante a terapia.
3. Os cães com hiperplasia prostática benigna apresentam reduzida concentração de testosterona e estrógeno, enquanto a terapia com finasterida por 2 meses diminui o padrão hormonal de di-hidrotestosterona e testosterona.
4. Foi possível observar correlação entre as alterações vasculares do testículo e próstata, o perfil hormonal e os parâmetros seminais em cães submetidos a tratamento com finasterida.

Em referência ao capítulo 2 (*Comparação dos efeitos prostáticos do tratamento cirúrgico (orquiectomia) e medicamentoso (finasterida) na HPB em cães*), pode-se concluir que:

- 1 – O tratamento medicamentoso e cirúrgico para a HPB promovem redução do escore de vascularização prostático e volume prostático. Porém, apenas a gonadectomia provocou atrofia severa e mudanças hemodinâmicas da próstata.

8 – O tratamento medicamentoso com finasterida e a orquiectomia reduzem a imunomarcagem para o VEGF no tecido prostático, porém apenas o tratamento cirúrgico é capaz de reduzir a expressão gênica para o VEGF.

9 – Apenas o tratamento cirúrgico para a HPB (orquiectomia) reduz de forma significativa as concentrações séricas de testosterona e di-hidrotestosterona.

10 – Foi possível observar correlações entre as alterações vasculares da próstata e os níveis hormonais após distintos tratamentos para hiperplasia prostática benigna.

7 REFERÊNCIAS

- ABNEY, T. O. The potential roles of estrogens in regulating Leydig cell development and function: A review. **Steroids**, v. 64, n. 9, p. 610–617, 1999.
- AMORY, J. K.; ANAWALT, B. D.; MATSUMOTO, A. M.; PAGE, S. T.; BREMNER, W. J.; WANG, C.; SWERDLOFF, R. S.; CLARK, R. V. The effect of 5 α -reductase inhibition with dutasteride and finasteride on bone mineral density, serum lipoproteins, hemoglobin, prostate specific antigen and sexual function in healthy young men. **The Journal of urology**, v. 179, n. 6, p. 2333–2338, 2008.
- AMORY, J. K.; WANG, C.; SWERDLOFF, R. S.; ANAWALT, B. D.; MATSUMOTO, A. M.; BREMNER, W. J.; WALKER, S. E.; HABERER, L. J.; CLARK, R. V. The effect of 5 α -reductase inhibition with dutasteride and finasteride on semen parameters and serum hormones in healthy men. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 92, n. 5, p. 1659–1665, 2007.
- ANGRIMANI, D. S.; LUCIO, C. F.; VEIGA, G. A.; SILVA, L. C.; REGAZZI, F. M.; NICHI, M.; VANNUCCHI, C. I. Sperm Maturation in Dogs: Sperm Profile and Enzymatic Antioxidant Status in Ejaculated and Epididymal Spermatozoa. **Andrologia**, v. 46, n. 7, p. 814–819, 2014.
- ATALAN, G.; HOLT, P. E.; BARR, F. J. Ultrasonographic Estimation of Prostate Size in Normal Dogs and Relationship to Bodyweight and Age. **J Small Anim Pract**, v. 40, n. 3, p. 119–122, 1999.
- AYDIN, A.; ARSOVA-SARAFINOVSKA, Z.; SAYAL, A.; EKEN, A.; ERDEM, O.; ERTEN, K.; ÖZGÖK, Y.; DIMOVSKI, A. Oxidative stress and antioxidant status in non-metastatic prostate cancer and benign prostatic hyperplasia. **Clinical Biochemistry**, v. 39, n. 2, p. 176–179, 2006.
- BADAWY, A. A.; ABDELHAFEZ, A. A.; ABUZEID, A. M. Finasteride for treatment of refractory hemospermia: Prospective placebo-controlled study. **International Urology and Nephrology**, v. 44, n. 2, p. 371–375, 2012.
- BAMBERGTHALEN, B.; LINDEFORSBERG, C. Treatment of canine benign prostatic hyperplasia with medroxyprogesterone acetate. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 29, n. 3, p. 221–226, 1993.
- BARNABE, V. H.; BARNABE, R. C.; GOES, P.; PEREZ, E. G.; LOSANO, J. D.; ROCHA, C. C.; DALMAZZO, A.; TSUNODA, R. H.; RODRIGUES, M. P.; PACHECO

- FILHO, P. I.; LEZCANO, F. A.; NICHI, M. 242 protective effect of vitamin e treatment in heat-stressed bos taurus bulls. **Reprod Fertil Dev**, v. 25, n. 1, p. 269, 2012.
- BARSANTI, J. A.; FINCO, D. R. Canine Prostatic Diseases. **Veterinary Clinics of North America-Small Animal Practice**, v. 16, n. 3, p. 587–599, 1986.
- BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Iowa State University Press, Ames; 1989.
- BARTSCH, G.; RITTMASER, R. S.; KLOCKER, H. Dihydrotestosterone and the role of 5 alpha-reductase inhibitors in benign prostatic hyperplasia. **Urologe A**, v. 41, n. 5, p. 412–424, 2002.
- BAUMAN, T. M.; SEHGAL, P. D.; JOHNSON, K. A.; PIER, T.; BRUSKEWITZ, R. C.; RICKE, W. A.; HUANG, W. Finasteride treatment alters tissue specific androgen receptor expression in prostate tissues. **Prostate**, v. 74, n. 9, p. 923–932, 2014.
- BAUZAITE, N.; ANIULIENE, A. Enlarged Prostate Lesions of Pure-Bred and Mongrel Dogs. **Medycyna Weterynaryjna**, v. 59, n. 8, p. 686–690, 2003.
- BELL, F. W.; KLAUSNER, J. S.; HAYDEN, D. W.; LUND, E. M.; LIEBENSTEIN, B. B.; FEENEY, D. A.; JOHNSTON, S. D.; SHIVERS, J. L.; EWING, C. M.; ISAACS, W. B. Evaluation of Serum and Seminal Plasma Markers in the Diagnosis of Canine Prostatic Disorders. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 9, n. 3, p. 149–153, 1995.
- BERGH, a; COLLIN, O.; LISSBRANT, E. Effects of acute graded reductions in testicular blood flow on testicular morphology in the adult rat. **Biology of reproduction**, v. 64, p. 13–20, 2001.
- BERRY, S. J.; COFFEY, D. S.; EWING, L. L. Effects of Aging on Prostate Growth in Beagles. **Am J Physiol**, v. 250, n. 6 Pt 2, p. R1039-46, 1986.
- BERRY, S. J.; COFFEY, D. S.; WALSH, P. C.; EWING, L. L. The development of human benign prostatic hyperplasia with age. **The Journal of urology**, v. 132, n. 3, p. 474–9, 1984.
- BERRY, S. J.; STRANDBERG, J. D.; SAUNDERS, W. J.; COFFEY, D. S. Development of Canine Benign Prostatic Hyperplasia with Age. **Prostate**, v. 9, n. 4, p. 363–373, 1986.
- BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; SACKESSEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **World Allergy Organ J**, v. 5, n. 1, p. 9–19, 2012.
- BJÖRNDAHL, L.; KVIST, U. A model for the importance of zinc in the dynamics of

- human sperm chromatin stabilization after ejaculation in relation to sperm DNA vulnerability. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 57, n. 1–2, p. 86–92, 2011.
- BLACK, G. M.; LING, G. V.; NYLAND, T. G.; BAKER, T. Prevalence of prostatic cysts in adult, large-breed dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 34, n. 2, p. 177–180, 1998.
- BOTELHO, F.; PINA, F.; SILVA, P.; FIGUEIREDO, G.; CRUZ, F.; LUNET, N. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and prostate pathology. **International Braz J Urol**, v. 36, n. 4, p. 430–437, 2010.
- BRENDLER, C. B.; BERRY, S. J.; EWING, L. L.; MCCULLOUGH, A. R.; COCHRAN, R. C.; STRANDBERG, J. D.; ZIRKIN, B. R.; COFFEY, D. S.; WHEATON, L. G.; HILER, M. L.; BORDY, M. J.; NISWENDER, G. D.; SCOTT, W. W.; WALSH, P. C. Spontaneous benign prostatic hyperplasia in the beagle. Age-associated changes in serum hormone levels, and the morphology and secretory function of the canine prostate. **Journal of Clinical Investigation**, v. 71, n. 5, p. 1114–1123, 1983.
- BUSH, B. M. Canine and feline endocrinology and reproduction. **British Veterinary Journal**, v. 144, n. 6, p. 616–618, 1988.
- BUTTYAN, R.; GHAFAR, M. a; SHABSIGH, a. The effects of androgen deprivation on the prostate gland: cell death mediated by vascular regression. **Current opinion in urology**, v. 10, n. 5, p. 415–20, 2000.
- CARSON, C.; RITTMASER, R. The Role of Dihydrotestosterone in Benign Prostatic Hyperplasia. **Urology**, v. 61, n. 4 Suppl 1, p. 2–7, 2003.
- CELEGHINI, E. C. C.; DE ARRUDA, R. P.; DE ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 5, p. 479–488, 2007.
- CHAMBERLAND, A.; FOURNIER, V.; TARDIF, S.; SIRARD, M. A.; SULLIVAN, R.; BAILEY, J. L. The effect of heparin on motility parameters and protein phosphorylation during bovine sperm capacitation. **Theriogenology**, v. 55, n. 3, p. 823–835, 2001.
- CHAMBERS, T. J.; RICHARD, R. A. The Impact of Obesity on Male Fertility. **Hormones (Athens)**, v. 14, n. 4, p. 563–568, 2015.
- CHEN, H.; LIU, J.; LUO, L.; ZIRKIN, B. R. Dibutyl cyclic adenosine monophosphate restores the ability of aged leydig cells to produce testosterone at the high levels

- characteristic of young cells. **Endocrinology**, v. 145, n. 10, p. 4441–4446, 2004.
- CHENG, L.; ZHANG, S.; SWEENEY, C. J.; KAO, C.; GARDNER, T. A.; EBLE, J. N. Androgen withdrawal inhibits tumor growth and is associated with decrease in angiogenesis and VEGF expression in androgen-independent CWR22Rv1 human prostate cancer model. **Anticancer Research**, v. 24, n. 4, p. 2135–2140, 2004.
- CHIBA, K.; YAMAGUCHI, K.; LI, F.; ANDO, M.; FUJISAWA, M. Finasteride-Associated Male Infertility. **Fertil Steril**, v. 95, n. 5, p. 1786 e9-11, 2011.
- COCHRAN, R. C.; EWING, L. L.; NISWENDER, G. D. Serum levels of follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, prolactin, testosterone, 5 alpha-dihydrotestosterone, 5 alpha-androstane-3 alpha, 17 beta-diol, 5 alpha-androstane-3 beta, 17 beta-diol, and 17 beta-estradiol from male beagles with sponta. **Investigative Urology**, v. 19, n. 3, p. 142–147, 1981.
- COHEN, S. M.; WERRMANN, J. G.; RASMUSSEN, G. H.; TANAKA, W. K.; MALATESTA, P. F.; PRAHALADA, S.; JACOBS, J. G.; HARRIS, G.; NETT, T. M. Comparison of the Effects of New Specific Azasteroid Inhibitors of Steroid 5 Alpha-Reductase on Canine Hyperplastic Prostate: Suppression of Prostatic DHT Correlated with Prostate Regression. **Prostate**, v. 26, n. 2, p. 55–71, 1995.
- CREEVY, K. E.; AUSTAD, S. N.; HOFFMAN, J. M.; O'NEILL, D. G.; PROMISLOW, D. E. L. The companion dog as a model for the longevity dividend. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 1, 2016.
- DE SOUZA, M. B.; DA CUNHA BARBOSA, C.; PEREIRA, B. S.; MONTEIRO, C. L. B.; PINTO, J. N.; LINHARES, J. C. S.; DA SILVA, L. D. M. Doppler velocimetric parameters of the testicular artery in healthy dogs. **Research in Veterinary Science**, v. 96, n. 3, p. 533–536, 2014.
- DEKLERK, D. P.; COFFEY, D. S.; EWING, L. L.; MCDERMOTT, I. R.; REINER, W. G.; ROBINSON, C. H.; SCOTT, W. W.; STRANDBERG, J. D.; TALALAY, P.; WALSH, P. C.; WHEATON, L. G.; ZIRKIN, B. R. Comparison of spontaneous and experimentally induced canine prostatic hyperplasia. **Journal of Clinical Investigation**, v. 64, n. 3, p. 842–849, 1979.
- EISERMANN, K.; FRAIZER, G. The androgen receptor and VEGF: Mechanisms of androgen-regulated angiogenesis in prostate cancer. **Cancers**, v. 9, n. 4, E32, 2017.
- ERENPREISA, J.; ERENPREISS, J.; FREIVALDS, T.; SLAIDINA, M.; KRAMPE, R.; BUTIKOVA, J.; IVANOV, A.; PJANOVA, D. Toluidine Blue Test for Sperm DNA Integrity and Elaboration of Image Cytometry Algorithm. **Cytometry A**, v. 52, n. 1, p.

19–27, 2003.

EVENSON, D. P.; JOST, L. K.; MARSHALL, D.; ZINAMAN, M. J.; CLEGG, E.; PURVIS, K.; DE ANGELIS, P.; CLAUSSEN, O. P. Utility of the Sperm Chromatin Structure Assay as a Diagnostic and Prognostic Tool in the Human Fertility Clinic. **Hum Reprod**, v. 14, n. 4, p. 1039–1049, 1999.

FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. **Canine and Feline Endocrinology and Reproduction**. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1987.

FERNANDEZ, J. L.; MURIEL, L.; RIVERO, M. T.; GOYANES, V.; VAZQUEZ, R.; ALVAREZ, J. G. The Sperm Chromatin Dispersion Test: A Simple Method for the Determination of Sperm DNA Fragmentation. **Journal of Andrology**, v. 24, n. 1, p. 59–66, 2003.

FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods in enzymology**, v. 105, n. July, p. 114–120, 1984.

FLOHE, L.; OTTING, F. Superoxide-Dismutase Assays. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 93–104, 1984.

FRENETTE, G.; DUBÉ, J. Y.; MARCOTTE, J. R.; TREMBLAY, R. R. Arginine esterase from isolated dog prostate secretory granules is fully active enzymatically. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 63, n. 12, p. 1603–1607, 1 dez. 1985.

FRESHMAN, J. L. Semen collection and evaluation. **Clinical techniques in small animal practice**, v. 17, n. 3, p. 104–7, 1 ago. 2002.

GALVÃO, A. L. B.; FERREIRA, G. S.; LÉGA, E.; COSTA, P. F.; ONDANI, A. C.; DENICOL, A. Main prostatic gland affections in adult dogs. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 4, p. 456–466, 2011.

GARCIA-DIAZ, E. C.; GOMEZ-QUIROZ, L. E.; ARENAS-RIOS, E.; ARAGON-MARTINEZ, A.; IBARRA-ARIAS, J. A.; DEL SOCORRO, I. R.-M. M. Oxidative Status in Testis and Epididymal Sperm Parameters after Acute and Chronic Stress by Cold-Water Immersion in the Adult Rat. **Syst Biol Reprod Med**, v. 61, n. 3, p. 150–160, 2015.

GARCIA, P. V.; BARBIERI, M. F.; PEROBELLI, J. E.; CONSONNI, S. R.; MESQUITA, S. de F. P.; KEMPINAS, W. de G.; PEREIRA, L. A. V. Morphometric-stereological and functional epididymal alterations and a decrease in fertility in rats treated with finasteride and after a 30-day post-treatment recovery period. **Fertility and Sterility**, v. 97, n. 6, p. 1444–1451, 17 nov. 2017.

- GHAJAR, M. A.; PUCHNER, P. J.; ANASTASIADIS, A. G.; CABELIN, M. A.; BUTTYAN, R. Does the prostatic vascular system contribute to the development of benign prostatic hyperplasia? **Current urology reports**, v. 3, n. 4, p. 292–6, 2002.
- GIANTIN, M.; ARESU, L.; BENALI, S.; ARICÒ, A.; MORELLO, E. M.; MARTANO, M.; VASCELLARI, M.; CASTAGNARO, M.; LOPPARELLI, R. M.; ZANCANELLA, V.; GRANATO, A.; MUTINELLI, F.; DACASTO, M. Expression of Matrix Metalloproteinases, Tissue Inhibitors of Metalloproteinases and Vascular Endothelial Growth Factor in Canine Mast Cell Tumours. **Journal of Comparative Pathology**, v. 147, n. 4, p. 419–429, 2012.
- GILMORE, K. M.; GREER, K. A. Why Is the Dog an Ideal Model for Aging Research? **Exp Gerontol**, v. 71, p. 14–20, 2015.
- GLINA, S.; NEVES, P. A.; SAADE, R.; NETTO JR., N. R.; SOARES, J. B.; GALUPPO, A. G. Finasteride-Associated Male Infertility. **Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo**, v. 59, n. 4, p. 203–205, 2004.
- GLINA, S.; ROEHRBORN, C. G.; ESEN, A.; PLEKHANOV, A.; SORSABURU, S.; HENNEGES, C.; BUTTNER, H.; VIKTRUP, L. Sexual Function in Men with Lower Urinary Tract Symptoms and Prostatic Enlargement Secondary to Benign Prostatic Hyperplasia: Results of a 6-Month, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of Tadalafil Coadministered with Finasteride. **J Sex Med**, v. 12, n. 1, p. 129–138, 2015.
- GOBELLO, C. Dopamine agonists, anti-progestins, anti-androgens, long-term-release GnRH agonists and anti-estrogens in canine reproduction: A review. **Theriogenology**, v. 66, n. 6–7, p. 1560–1567, 2006.
- GRAYHACK, J. T.; KOZLOWSKI, J. M.; LEE, C. The pathogenesis of benign prostatic hyperplasia: A proposed hypothesis and critical evaluation. **Journal of Urology**, v. 160, n. 6 II, p. 2375–2380, 1998.
- GUMBSCH, P.; GABLER, C.; HOLZMANN, A. Colour-coded duplex sonography of the testes of dogs. **Vet Rec**, v. 151, n. 5, p. 140–144, 2002.
- GUNZEL-APEL, A. R.; MOHRKE, C.; POULSEN NAUTRUP, C. Colour-Coded and Pulsed Doppler Sonography of the Canine Testis, Epididymis and Prostate Gland: Physiological and Pathological Findings. **Reprod Domest Anim**, v. 36, n. 5, p. 236–240, 2001.
- HAGER, D. A.; NYLAND, T. G.; FISHER, P. ULTRASOUND-GUIDED BIOPSY OF THE CANINE LIVER, KIDNEY, AND PROSTATE. **Veterinary Radiology**, v. 26, n. 3,

p. 82–88, 1985.

HAYDEN, D. W.; BARTGES, J. W.; BELL, F. W.; KLAUSNER, J. S. Prostatic hemangiosarcoma in a dog: clinical and pathologic findings. **J Vet Diagn Invest**, v. 4, n. 2, p. 209–211, 1992.

HOLAK, P.; ADAMIAK, Z.; JAŁYŃSKI, M.; CHYCZEWSKI, M. Laparoscopy-guided prostate biopsy in dogs - a study of 13 cases. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 13, n. 4, p. 765–766, 2010.

HOLST, B. S. Diagnostic possibilities from a serum sample—Clinical value of new methods within small animal reproduction, with focus on anti-Müllerian hormone. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, p. 303–309, 2017.

HOLST, B. S.; HOLMROOS, E.; FRILING, L.; HANÅS, S.; LANGBORG, L. M.; FRANKO, M. A.; HANSSON, K. The association between the serum concentration of canine prostate specific esterase (CPSE) and the size of the canine prostate. **Theriogenology**, v. 93, p. 33–39, 2017.

HRUDKA, F. Cytochemical Demonstration of Cytochrome-Oxidase - an Objective Vitality Test of Spermatozoa. **Development Growth & Differentiation**, v. 28, p. 89, 1986.

HRUDKA, F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. **International Journal of Andrology**, v. 10, n. 6, p. 809–828, 1987.

IEHLÉ, C.; DÉLOS, S.; GUIROU, O.; TATE, R.; RAYNAUD, J. P.; MARTIN, P. M. Human prostatic steroid 5 alpha-reductase isoforms--a comparative study of selective inhibitors. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 54, n. 5–6, p. 273–9, 1995.

IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J. P. Effect of finasteride (Proscar MSD) on seminal composition, prostate function and fertility in male dogs. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 51, p. 139–49, 1997.

JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V; OLSON, P. N. Disorders of the canine prostate. In: **Canine and feline theriogenology**. [s.l.] WB Saunders, 2001. p. 337–355.

JUNIEWICZ, P. E.; HOEKSTRA, S. J.; LEMP, B. M.; BARBOLT, T. A.; DEVIN, J. A.; GAUTHIER, E.; FRENETTE, G.; DUBE, J. Y.; TREMBLAY, R. R. Effect of Combination Treatment with Zanolone (WIN 49596), a Steroidal Androgen

- Receptor Antagonist, and Finasteride (MK-906), a Steroidal 5 Alpha-Reductase Inhibitor, on the Prostate and Testes of Beagle Dogs. **Endocrinology**, v. 133, n. 2, p. 904–913, 1993.
- KAMOLPATANA, K.; JOHNSTON, S. D.; HARDY, S. K.; CASTNER, S. Effect of Finasteride on Serum Concentrations of Dihydrotestosterone and Testosterone in Three Clinically Normal Sexually Intact Adult Male Dogs. **Am J Vet Res**, v. 59, n. 6, p. 762–764, 1998.
- KAPLAN, S. a. 5Alpha-Reductase Inhibitors: What Role Should They Play? **Urology**, v. 58, n. 6 Suppl 1, p. 65–70; discussion 70, 2001.
- KASHOU, A. H.; SHARMA, R.; AGARWAL, A. Assessment of Oxidative Stress in Sperm and Semen. **Methods Mol Biol**, v. 927, p. 351–361, 2013.
- KAWAKAMI, E.; AMEMIYA, E.; NAMIKAWA, K.; KASHIWAGI, C.; HORI, T.; TSUTSUI, T. High plasma estradiol-17beta levels in dogs with benign prostatic hyperplasia and azoospermia. **The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 63, n. 4, p. 407–12, 2001.
- KERR, J. B.; MILLAR, M.; MADDOCKS, S.; SHARPE, R. M. Stage-Dependent changes in spermatogenesis and sertoli cells in relation to the onset of spermatogenic failure following withdrawal of testosterone. **The Anatomical Record**, v. 235, n. 4, p. 547–559, 1993.
- KIM, B. H.; KIM, C. II; CHANG, H. S.; CHOE, M. S.; JUNG, H. R.; KIM, D. Y.; PARK, C. H. Cyclooxygenase-2 overexpression in chronic inflammation associated with benign prostatic hyperplasia: Is it related to apoptosis and angiogenesis of prostate cancer? **Korean Journal of Urology**, v. 52, n. 4, p. 253–259, 2011.
- KIME, D. E.; TVEITEN, H. Unusual motility characteristics of sperm of the spotted wolffish. **Journal of Fish Biology**, v. 61, n. 6, p. 1549–1559, 2002.
- KIRCHHOFF, C. The Dog as a Model to Study Human Epididymal Function at a Molecular Level. **Mol Hum Reprod**, v. 8, n. 8, p. 695–701, 2002.
- KOJIMA, M.; WATANABE, H.; WATANABE, M.; OKIHARA, K.; NAYA, Y.; UKIMURA, O. Preliminary results of power Doppler imaging in benign prostatic hyperplasia. **Ultrasound in medicine & biology**, v. 23, n. 9, p. 1305–9, 1997.
- KRAKOWSKI, L.; WACHOCKA, A.; BRODZKI, P.; WRONA, Z.; PIECH, T.; WAWRON, W.; CHALABIS-MAZUREK, A. Sperm Quality and Selected Biochemical Parameters of Seminal Fluid in Dogs with Benign Prostatic Hyperplasia. **Anim Reprod Sci**, v. 160, p. 120–125, 2015.

- KRAWIEC, D. . Canine prostate disease. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 204, n. 10, p. 1561–1564, 1994.
- KRAWIEC, D. R.; HEFLIN, D. Study of prostatic disease in dogs: 177 cases (1981-1986). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 200, p. 1119-1122, 1992.
- KRIEGER, J. N.; REIN, M. F. Canine prostatic secretions kill *Trichomonas vaginalis*. **Infection and Immunity**, v. 37, n. 1, p. 77–81, 1982.
- KUSTRITZ, M. V. R. Collection of tissue and culture samples from the canine reproductive tract. **Theriogenology**, v. 66, n. 3 SPEC. ISS., p. 567–574, 2006.
- LANGE, K.; CORDES, E. K.; HOPPEN, H. O.; GUNZEL-APEL, A. R. Determination of Concentrations of Sex Steroids in Blood Plasma and Semen of Male Dogs Treated with Delmadinone Acetate or Finasteride. **J Reprod Fertil Suppl**, v. 57, p. 83–91, 2001.
- LAROQUE, P. A.; PRAHALADA, S.; GORDON, L. R.; NOBLOT, S. M.; BAGDON, W. J.; DUPRAT, P.; PETER, C. P.; VAN ZWIETEN, M. J. Effects of Chronic Oral Administration of a Selective 5 Alpha-Reductase Inhibitor, Finasteride, on the Dog Prostate. **Prostate**, v. 24, n. 2, p. 93–100, 1994.
- LAROQUE, P. A.; PRAHALADA, S.; MOLON-NOBLOT, S.; COHEN, S. M.; SOPER, K.; DUPRAT, P.; PETER, C. P.; VAN ZWIETEN, M. J. Quantitative Evaluation of Glandular and Stromal Compartments in Hyperplastic Dog Prostates: Effect of 5-Alpha Reductase Inhibitors. **Prostate**, v. 27, n. 3, p. 121–128, 1995.
- LEE, C. Role of androgen in prostate growth and regression: stromal-epithelial interaction. **Prostate Suppl**, v. 6, p. 52–56, 1996.
- LEKAS, A. G.; LAZARIS, A. C.; CHRISOFOFOS, M.; PAPATSORIS, A. G.; LAPPAS, D.; PATSOURIS, E.; DELIVELIOTIS, C. Finasteride effects on hypoxia and angiogenetic markers in benign prostatic hyperplasia. **Urology**, v. 68, n. 2, p. 436–441, 2006.
- LEKÅS, E.; JOHANSSON, M.; WIDMARK, A.; BERGH, A.; DAMBER, J. E. Decrement of blood flow precedes the involution of the ventral prostate in the rat after castration. **Urological Research**, v. 25, n. 5, p. 309–314, 1997.
- LEOCI, R.; AIUDI, G.; SILVESTRE, F.; LISSNER, E.; LACALANDRA, G. M. Effect of Pulsed Electromagnetic Field Therapy on Prostate Volume and Vascularity in the Treatment of Benign Prostatic Hyperplasia: A Pilot Study in a Canine Model. **Prostate**, v. 74, n. 11, p. 1132–1141, 2014.
- LI, N.; HOU, Y. H.; MA, D. D.; JING, W. X.; DAHMS, H. U.; WANG, L. Lead

- Accumulation, Oxidative Damage and Histopathological Alteration in Testes and Accessory Glands of Freshwater Crab, *Sinopotamon Henanense*, Induced by Acute Lead Exposure. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 117, p. 20–27, 2015.
- LING, G. V.; BRANAM, J. E.; RUBY, A. L.; JOHNSON, D. L. Canine prostatic fluid: techniques of collection, quantitative bacterial culture, and interpretation of results. **J Am Vet Med Assoc**, v. 183, n. 2, p. 201–206, 1983.
- LOTTI, F.; TAMBURRINO, L.; MARCHIANI, S.; MASEROLI, E.; VITALE, P.; FORTI, G.; MURATORI, M.; MAGGI, M.; BALDI, E. DNA Fragmentation in Two Cytometric Sperm Populations: Relationship with Clinical and Ultrasound Characteristics of the Male Genital Tract. **Asian J Androl**, 2016.
- LUCIO, C. F.; REGAZZI, F. M.; SILVA, L. C.; ANGRIMANI, D. S.; NICHI, M.; VANNUCCHI, C. I. Oxidative Stress at Different Stages of Two-Step Semen Cryopreservation Procedures in Dogs. **Theriogenology**, v. 85, n. 9, p. 1568–1575, 2016.
- MANTZIARAS, G.; ALONGE, S.; FAUSTINI, M.; LUVONI, G. C. Assessment of the age for a preventive ultrasonographic examination of the prostate in the dog. **Theriogenology**, v. 100, p. 114–119, 2017.
- MEMON, M. A. Common Causes of Male Dog Infertility. **Theriogenology**, v. 68, n. 3, p. 322–328, 2007.
- MICHAEL, A. J.; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E. A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. J.; SARATSIS, P.; VERVERIDIS, H. N.; BOSCOS, C. M. Effect of Antioxidant Supplementation in Semen Extenders on Semen Quality and Reactive Oxygen Species of Chilled Canine Spermatozoa. **Anim Reprod Sci**, v. 112, n. 1–2, p. 119–135, 2009.
- MINERVINI, F.; GUASTAMACCHIA, R.; PIZZI, F.; DELL'AQUILA, M. E.; BARILE, V. L. Assessment of different functional parameters of frozen-thawed buffalo spermatozoa by using cytofluorimetric determinations. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. 2, p. 317–324, 2013.
- NICHI, M.; BOLS, P. E. J.; ZÜGE, R. M.; BARNABE, V. H.; GOOVAERTS, I. G. F.; BARNABE, R. C.; CORTADA, C. N. M. Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. **Theriogenology**, v. 66, n. 4, p. 822–828, 2006.
- NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 11, p.

1287-1312, 2001.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351–358, 1979.

OPOKU-ACHEAMPONG, A. B.; HENNINGSON, J. N.; LINDSHIELD, B. L. The impact of finasteride and dutasteride treatments on proliferation, apoptosis, androgen receptor, 5 α -reductase 1 and 5 α -reductase 2 in TRAMP mouse prostates. **Heliyon**, v. 3, n. 7, 2017.

ORTEGA-PACHECO, A.; SEGURA-CORREA, J. C.; BOLIO-GONZALEZ, M. E.; JIMÉNEZ-COELLO, M.; LINDE FORSBERG, C. Reproductive patterns of stray male dogs in the tropics. **Theriogenology**, v. 66, n. 9, p. 2084–2090, 2006.

OZDEMIR, H.; ONUR, R.; BOZGEYIK, Z.; ORHAN, I.; OGRAS, M. S.; OGUR, E. Measuring resistance index in patients with BPH and lower urinary tract symptoms. **Journal of clinical ultrasound : JCU**, v. 33, n. 4, p. 176–80, 2005.

PACE, G.; DI MASSIMO, C.; DE AMICIS, D.; CORBACELLI, C.; DI RENZO, L.; VICENTINI, C.; MIANO, L.; TOZZI CIANCARELLI, M. G. Oxidative stress in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. **Urologia Internationalis**, v. 85, n. 3, p. 328–333, 2010.

PACLIKOVA, K.; KOHOUT, P.; VLASIN, M. Diagnostic possibilities in the management of canine prostatic disorders. **Veterinarni Medicina**, v. 51, n. 1, p. 1–13, 2006.

PALMIERI, C. Immunohistochemical Expression of Angiogenic Factors by Neoplastic Epithelial Cells Is Associated With Canine Prostatic Carcinogenesis. **Veterinary Pathology**, v. 52, n. 4, p. 607–613, 2015.

PALMIERI, C.; LEAN, F. Z.; AKTER, S. H.; ROMUSSI, S.; GRIECO, V. A retrospective analysis of 111 canine prostatic samples: Histopathological findings and classification. **Research in Veterinary Science**, v. 97, n. 3, p. 568–573, 2014.

PAREEK, G.; SHEVCHUK, M.; ARMENAKAS, N. A.; VASJOVIC, L.; HOCHBERG, D. A.; BASILLOTE, J. B.; FRACCHIA, J. A. The Effect of Finasteride on the Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Microvessel Density: A Possible Mechanism for Decreased Prostatic Bleeding in Treated Patients. **J Urol**, v. 169, n. 1, p. 20–23, 2003.

PARSONS, J. K.; SCHENK, J. M.; ARNOLD, K. B.; MESSER, K.; TILL, C.; THOMPSON, I. M.; KRISTAL, A. R. Finasteride Reduces the Risk of Incident Clinical Benign Prostatic Hyperplasia. **Eur Urol**, v. 62, n. 2, p. 234–241, 2012.

- PATEL, N. D.; PARSONS, J. K. Epidemiology and etiology of benign prostatic hyperplasia and bladder outlet obstruction. **Indian journal of urology : IJU : journal of the Urological Society of India**, v. 30, n. 2, p. 170–6, 2014.
- PAULA, T. M.; TONIOLO, G. H.; HONSHO, D. K.; DUQUE, C. Y. N.; PÁFARO, V.; MOMO, C. Punção aspirativa com agulha fina guiada por ultrassom e biópsia por videolaparoscopia em próstata de cães. **Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria E Zootecnia**, v. 63, p. 866–872, 2011.
- PESCOVITZ, W. P. O.; CUTLER, G. J. **Synthesis and metabolismo of corticosteroid**. 1. ed. Philadelphia: Becker, K, 1995.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 45e–45, 2001.
- PINHEIRO, D.; MACHADO, J.; VIEGAS, C.; BAPTISTA, C.; BASTOS, E.; MAGALHÃES, J.; PIRES, M. A.; CARDOSO, L.; MARTINS-BESSA, A. Evaluation of biomarker canine-prostate specific arginine esterase (CPSE) for the diagnosis of benign prostatic hyperplasia. **BMC Veterinary Research**, v. 13, n. 1, p. 76, 2017.
- POLISCA, A.; ORLANDI, R.; TROISI, A.; BRECCHIA, G.; ZERANI, M.; BOITI, C.; ZELLI, R. Clinical Efficacy of the GnRH Agonist (Deslorelin) in Dogs Affected by Benign Prostatic Hyperplasia and Evaluation of Prostatic Blood Flow by Doppler Ultrasound. **Reprod Domest Anim**, v. 48, n. 4, p. 673–680, 2013.
- POPE, C. E.; ZHANG, Y. Z.; DRESSER, B. L. A Simple Staining Method for Evaluating Acrosomal Status of Cat Spermatozoa. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 22, n. 1, p. 87–95, 1991.
- PROVIDE, P.; FOLLOWING, T. H. E. Canine prostatic disease--comparison of ultrasonographic appearance with morphologic and microbiologic findings: 30 cases (1981-1985). **Read**, p. 1–4, 2015.
- READ, R. a; BRYDEN, S. Urethral bleeding as a presenting sign of benign prostatic hyperplasia in the dog: a retrospective study (1979-1993). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 31, n. 3, p. 261–7, 1993.
- RIFKIN, M. D.; SUDAKOFF, G. S.; ALEXANDER, A. A. Prostate: Techniques, Results, and Potential Applications of Color Doppler US Scanning. **Radiology**, v. 186, n. 2, p. 509–513, 1993.
- ROEHRBORN, C. G.; BOYLE, P.; NICKEL, J. C.; HOEFNER, K.; ANDRIOLE, G. Efficacy and safety of a dual inhibitor of 5-alpha-reductase types 1 and 2 (dutasteride) in men with benign prostatic hyperplasia. **Urology**, v. 60, n. 3, p. 434–

441, 2002.

RUSSO, M.; VIGNOLI, M.; ENGLAND, G. C. W. B-mode and contrast-enhanced ultrasonographic findings in canine prostatic disorders. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. SUPPL. 6, p. 238–242, 2012.

SAMPLASKI, M. K.; LO, K.; GROBER, E.; JARVI, K. Finasteride use in the male infertility population: Effects on semen and hormone parameters. **Fertility and Sterility**, v. 100, n. 6, p. 1542–1546, 2013.

SHABIR, I.; KHURANA, M. L.; JOSEPH, A. A.; EUNICE, M.; MEHTA, M.; AMMINI, A. C. Phenotype, Genotype and Gender Identity in a Large Cohort of Patients from India with 5alpha-Reductase 2 Deficiency. **Andrology**, v. 3, n. 6, p. 1132–1139, 2015.

SHABSIGH, A.; CHANG, D. T.; HEITJAN, D. F.; KISS, A.; OLSSON, C. A.; PUCHNER, P. J.; BUTTYAN, R. Rapid reduction in blood flow to the rat ventral prostate gland after castration: Preliminary evidence that androgens influence prostate size by regulating blood flow to the prostate gland and prostatic endothelial cell survival. **Prostate**, v. 36, n. 3, p. 201–206, 1998.

SHANMUGAM, M.; VINOTH, A.; RAJARAVINDRA, K. S.; RAJKUMAR, U. Evaluation of semen quality in roosters of different age during hot climatic condition. **Animal Reproduction Science**, v. 145, n. 1–2, p. 81–85, 2014.

SHAPIRO, E.; TSITLIK, J. E.; LEPOR, H. Alpha2 adrenergic receptors in canine prostate: Biochemical and functional correlations. **Journal of Urology**, v. 137, n. 3, p. 565–570, 1987.

SHIDAIFAT, F.; LIN, Y. C. Testosterone effect on the expression of genes that mediate testosterone metabolism and genes that mediate the effect of those metabolites on the prostate. **Life Sciences**, v. 91, n. 5–6, p. 194–198, 2012.

SHIMOMURA, J. Z.; EUGENIO, F. R.; LUZIVOTTO, M. C. R.; PERRI, S. H. V. Hiperplasia prostática benigna no cão: comparação entre métodos diagnósticos. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, p. 117–126, 2009.

SIRINARUMITR, K.; JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V; JOHNSTON, G. R.; SARKAR, D. K.; MEMON, M. a. Effects of finasteride on size of the prostate gland and semen quality in dogs with benign prostatic hypertrophy. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 218, n. 8, p. 1275–1280, 2001.

SMITH, J. Canine prostatic disease: A review of anatomy, pathology, diagnosis, and treatment. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 375–383, 2008.

STACHON, A.; AWEIMER, A.; STACHON, T.; TANNAPFEL, A.; THOMS, S.; UBRIG,

- B.; KOLLER, M.; KRIEG, M.; TRUSS, M. C. Secretion of Soluble VEGF Receptor 2 by Microvascular Endothelial Cells Derived by Human Benign Prostatic Hyperplasia. **Growth Factors**, v. 27, n. 2, p. 71–78, 2009.
- STEFANOV, M. Extraglandular and Intraglandular Vascularization of Canine Prostate. **Microsc Res Tech**, v. 63, n. 4, p. 188–197, 2004.
- STEIBEL, J. P.; POLETTO, R.; COUSSENS, P. M.; ROSA, G. J. M. A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. **Genomics**, v. 94, n. 2, p. 146–152, 2009.
- SUN, F.; BÁEZ-DÍAZ, C.; SÁNCHEZ-MARGALLO, F. M. Canine prostate models in preclinical studies of minimally invasive interventions: part II, benign prostatic hyperplasia models. **Translational Andrology and Urology**, v. 6, n. 3, p. 547–555, 2017.
- TESKE, E.; NAAN, E. C.; VAN DIJK, E. M.; VAN GARDEREN, E.; SCHALKEN, J. A. Canine prostate carcinoma: Epidemiological evidence of an increased risk in castrated dogs. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 197, n. 1–2, p. 251–255, 2002.
- TOOCHECK, C.; CLISTER, T.; SHUPE, J.; CRUM, C.; RAVINDRANATHAN, P.; LEE, T.-K.; AHN, J.-M.; RAJ, G. V.; SUKHWANI, M.; ORWIG, K. E.; WALKER, W. H. Mouse Spermatogenesis Requires Classical and Nonclassical Testosterone Signaling1. **Biology of Reproduction**, v. 94, n. 1, 2016.
- TU, H. Y.; ZINI, A. Finasteride-Induced Secondary Infertility Associated with Sperm DNA Damage. **Fertil Steril**, v. 95, n. 6, p. 2125 e13-4, 2011.
- VANNUCCHI, C. I.; ANGRIMANI, D. S.; EYHERABIDE, A. R.; MAZZEI, C. P.; LUCIO, C. F.; MAIORKA, P. C.; SILVA, L. C.; NICHI, M. Effects of Intratesticular Administration of Zinc Gluconate and Dimethyl Sulfoxide on Clinical, Endocrinological, and Reproductive Parameters in Dogs. **Theriogenology**, v. 84, n. 7, p. 1103–1110, 2015.
- VANNUCCHI, C. I.; VENTURA, N. P.; SATZINGER, S. .; SANTOS, S. E. C. Afecções prostáticas em cães: sinais clínicos, diagnóstico e tratamento. **Clínica Veterinária**, v. 2, p. 37–42, 1997.
- VEIGA, G. A. L.; MIZIARA, R. H.; ANGRIMANI, D. S. R.; PAPA, P. C.; COGLIATI, B.; VANNUCCHI, C. I. Cystic endometrial hyperplasia-pyometra syndrome in bitches: identification of hemodynamic, inflammatory, and cell proliferation changes. **Biology of reproduction**, v. 96, n. 1, p. 58–69, 2017.

- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer Assisted Semen Analyzers in Andrology Research and Veterinary Practice. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 149–179, 2002.
- VIDIGAL, D. J. A.; SILVA, A. L. da; FONSECA, L. M. A. da; VASCONCELOS, A. C.; RESENDE, D. F. de; VIDIGAL, F. E. C. The effect of finasteride on spermatogenesis of *Mesocricetus auratus*. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 23, n. 3, p. 282–286, 2008.
- WALLIS, L. J.; VIRÁNYI, Z.; MÜLLER, C. A.; SERISIER, S.; HUBER, L.; RANGE, F. Aging effects on discrimination learning, logical reasoning and memory in pet dogs. **Age**, v. 38, n. 1, p. 1–18, 2016.
- WALSH, K.; SHERWOOD, R. A.; DEW, T. K.; MULVIN, D. Angiogenic peptides in prostatic disease. **BJU International**, v. 84, n. 9, p. 1081–1083, 1999.
- WATERS, D. J. Longevity in Pet Dogs: Understanding What's Missing. **Vet J**, v. 200, n. 1, p. 3–5, 2014.
- WDOWIAK, A.; RACZKIEWICZ, D.; STASIAK, M.; BOJAR, I. Levels of FSH, LH and Testosterone, and Sperm DNA Fragmentation. **Neuro Endocrinol Lett**, v. 35, n. 1, p. 73–79, 2014.
- WHITE, R. A. Prostatic surgery in the dog. **Clinical techniques in small animal practice**, v. 15, n. 1, p. 46–51, 2000.
- WOLF, K.; KAYACELEBI, H.; URHAUSEN, C.; PIECHOTTA, M.; MISCHKE, R.; KRAMER, S.; EINSPANIER, A.; OEI, C.; GÜNZEL-APEL, A. Testicular Steroids, Prolactin, Relaxin and Prostate Gland Markers in Peripheral Blood and Seminal Plasma of Normal Dogs and Dogs with Prostatic Hyperplasia. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. SUPPL. 6, p. 243–246, 2012.
- ZELLI, R.; ORLANDI, R.; TROISI, A.; CARDINALI, L.; POLISCA, A. Power and Pulsed Doppler Evaluation of Prostatic Artery Blood Flow in Normal and Benign Prostatic Hyperplasia-Affected Dogs. **Reprod Domest Anim**, v. 48, n. 5, p. 768–773, 2013.

ANEXO A

Padronização das técnicas de avaliação da integridade do DNA espermático (teste de dispersão da cromatina espermática e coloração de azul de toluidina) para a espécie canina

Com o intuito de avaliar a fragmentação de DNA nos espermatozoides obtidos no presente experimento, foi utilizada a técnica modificada de coloração do azul de toluidina (ERENPREISA et al., 2003) e o teste de dispersão da cromatina espermática (FERNANDEZ et al., 2003; SHANMUGAM et al., 2014). Para tal, foi realizada a padronização prévia com sêmen ejaculado de seis cães, com parâmetros seminais dentro da normalidade (Quadro 4).

Quadro 4 - Idade, peso, raça e parâmetros seminais (motilidade, vigor e concentração) dos cães selecionados (n=6). São Paulo, 2017.

	1	2	3	4	5	6
Raça	Golden Retriever	SRD	Pit Bull	Labrador	Bulldog Inglês	SRD
Peso (kg)	16,6	10,5	29,1	25,5	20,8	22,2
Idade (anos)	6	6	9	10	8	10
Motilidade (%)	90	80	70	80	80	80
Vigor (0-5)	3-4	3-4	3-4	2-3	3	3-4
Concentração (milhão/mL)	820	1120	490	1100	1105	705

Após a colheita de sêmen por manipulação digital, a amostra seminal foi dividida em duas alíquotas, sendo uma armazenada em geladeira (espermatozoides íntegros) e outra submetida à indução da fragmentação de DNA por exposição à luz ultravioleta por 4 horas. Então, as alíquotas foram combinadas entre células com DNA fragmentado e íntegro, promovendo progressiva proporção de DNA lesionado (0%, 25%, 50%, 75% e 100%).

A **B**

Esfregaços de sêmen foram realizados e as lamínas submetidas à coloração com azul de toluidina (ERENPREISA et al., 2003) e teste de dispersão da cromatina espermática (FERNANDEZ et al., 2003; SHANMUGAM et al., 2014). A técnica de coloração por azul de toluidina consiste em um corante nuclear básico utilizado para a coloração da cromatina, tornando-se fortemente incorporado a regiões de dispersão da cromatina. Portanto, os espermatozoides com fragmentação de DNA são corados em azul, enquanto os íntegros permanecem sem coloração (Figura 33).

Já o teste de dispersão da cromatina espermática é avaliado de acordo com a formação de halos. Espermatozoides com halos grandes e médios são considerados com DNA íntegro, já na ausência ou na formação de pequenos halos, o DNA é considerado como fragmentado (Figura 34). A descrição e avaliação de tais técnicas foram abordadas anteriormente na sessão de *Material e Métodos – Capítulo 1*. O delineamento experimental da padronização da técnica de coloração por azul de toluidina e teste de dispersão da cromatina espermática encontram-se na Figura 32.

Figura 32 – Delineamento experimental da padronização das técnicas de avaliação do DNA espermático em cães. São Paulo, 2017.

Figura 33 – Coloração de azul de toluidina. Espermatozoide canino apresentando fragmentação de DNA (seta A) e integridade de DNA (seta B).

Fonte: Angrimani, D.S.R. (2017).

A

Figura 34 – Teste de dispersão da cromatina espermática. Espermatozoide canino apresentando núcleo com grande halo, considerado com DNA íntegro (seta A) e espermatozoide canino apresentando ausência de halo, considerado com fragmentação de DNA (seta B). Magnificação 1000x.

Fonte: Angrimani, D.S.R. (2017).

Os dados obtidos foram avaliados utilizando o Sistema SAS para Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA), sendo a regressão linear efetuada com o Guide Data Analysis.

Para o teste de azul de toluidina, foi possível observar significância ($p < 0,00001$) e alto coeficiente de regressão linear ($R^2 = 0,9912$ – Figura 35). O mesmo padrão foi observado para o teste de dispersão da cromatina espermática, ou seja, significância ($p < 0,00001$) e alto coeficiente de regressão linear ($R^2 = 0,9780$ – Figura 36). Desta maneira, foi possível considerar as técnicas adequadas para o estudo do DNA espermático em cães.

Figura 35 – Gráfico de regressão linear para a padronização da técnica de integridade do DNA espermático por coloração de azul de toluidina. São Paulo, 2017.

Figura 36 – Gráfico de regressão linear para padronização do teste de dispersão da cromatina espermática. São Paulo, 2017.

ANEXO B – Tabela 12

Tabela 12 - Valores de probabilidade para o efeito dos tratamentos (HPB não tratado vs. HPB tratado com Finasterida vs. Hígido não tratado vs. Hígido tratado com Finasterida) e tempo (0, 30 e 60 dias) e sua interação para as variáveis experimentais. São Paulo, 2017.

	Tempo	Finasterida	HPB	Tempo X Finasterida	Tempo X HPB	Finasterida X HPB	Tempo X Finasterida X HPB
DHT	0,24	0,03	0,09	0,26	0,55	0,18	0,86
Testosterona	0,50	0,06	0,20	0,64	0,44	0,04	0,91
Estrógeno	0,06	0,04	0,02	0,77	0,28	0,58	0,98
Vol. Testículo (D)	0,99	0,44	0,75	0,99	0,99	0,13	0,99
Vol. Testículo (E)	0,96	0,60	0,74	0,98	0,99	0,15	0,92
PS – Art. Testicular	0,46	0,17	0,05	0,51	0,32	0,43	0,42
ED – Art. Testicular	0,05	0,17	0,31	0,66	0,68	0,30	0,44
TAMAX– Art. Testicular	0,42	0,01	0,85	0,66	0,97	0,31	0,34
RI – Art. Testicular	0,05	0,34	0,36	0,83	0,79	0,72	0,92
PI – Art. Testicular	0,36	0,01	0,14	0,08	0,62	0,62	0,29
S/D – Art. Testicular	0,39	0,85	0,09	0,67	0,19	0,81	0,91
Libido	0,75	0,30	0,88	0,97	0,24	0,66	0,26
Volume do Ejaculado	0,91	0,30	0,79	0,90	0,30	0,96	0,13
Concentração Espermática	0,98	0,17	0,04	0,98	0,87	0,19	0,37
Motilidade (Visual)	0,57	0,91	0,06	0,99	0,56	0,67	0,31
Vigor (Visual)	0,79	0,56	0,26	0,73	0,37	0,40	0,61
Integridade de Membrana Plasmática	0,65	0,58	0,78	0,97	0,06	0,26	0,33

	Tempo	Finasterida	HPB	Tempo X Finasterida	Tempo X HPB	Finasterida X HPB	Tempo X Finasterida X HPB
Motilidade (CASA)	0,77	0,96	0,14	0,70	0,55	0,54	0,61
Progressiva (CASA)	0,77	0,68	0,06	0,78	0,49	0,44	0,75
Velocidade Rápida	0,87	0,54	0,05	0,71	0,50	0,51	0,97
Velocidade Média	0,01	0,07	0,15	0,08	0,93	0,82	0,16
Velocidade Lenta	0,25	0,20	0,01	0,81	0,31	0,13	0,95
Estáticos	0,98	0,48	0,53	0,68	0,17	0,75	0,49
VAP	0,75	0,67	0,63	0,74	0,18	0,05	0,67
VSL	0,59	0,72	0,79	0,85	0,21	0,05	0,43
VCL	0,66	0,50	0,84	0,74	0,19	0,05	0,95
ALH	0,54	0,52	0,07	0,79	0,69	0,25	0,55
BCF	0,87	0,77	0,02	0,75	0,70	0,62	0,54
Retilinearidade	0,44	0,76	0,32	0,17	0,47	0,93	0,16
Linearidade	0,25	0,66	0,94	0,54	0,71	0,69	0,15
Integridade Acrossomal	0,86	0,05	0,12	0,77	0,69	0,72	0,35
Defeitos Menores	0,91	0,67	0,04	0,42	0,68	0,45	0,18
Defeitos Maiores	0,76	0,57	0,14	0,71	0,88	0,64	0,76
Defeitos Totais	0,53	0,40	0,61	0,48	0,87	0,16	0,63
SOD	0,35	0,80	0,60	0,14	0,40	0,60	0,48
TBARS	0,76	0,28	0,21	0,82	0,98	0,33	0,77
GPx	0,14	0,61	0,30	0,94	0,51	0,76	0,27
APMM	0,68	0,97	0,52	0,59	0,99	0,98	0,93
MPMM	0,22	0,96	0,94	0,52	0,38	0,92	0,63
BPMM	0,27	0,90	0,33	0,94	0,15	0,64	0,96

	Tempo	Finasterida	HPB	Tempo X Finasterida	Tempo X HPB	Finasterida X HPB	Tempo X Finasterida X HPB
LMP	0,79	0,36	0,26	0,40	0,88	0,53	0,65
LMPA	0,44	0,61	0,35	0,80	0,06	0,67	0,18
LA	0,25	0,60	0,17	0,19	0,47	0,92	0,11
IMPA	0,57	0,27	0,66	0,35	0,21	0,98	0,53
DAB I	0,38	0,05	0,02	0,32	0,31	0,40	0,30
DAB II	0,89	0,02	<0,01	0,45	0,56	0,28	0,98
DAB III	0,08	0,70	0,21	0,26	0,47	0,04	0,10
DAB IV	0,01	0,54	0,76	0,89	0,61	0,30	0,41
Índice de DAB	0,18	0,14	0,17	0,41	0,31	0,67	0,21
SCD – DNA	0,54	0,98	<0,01	0,63	0,63	0,97	0,18
SCSA – DNA	0,56	0,07	0,04	0,50	0,61	0,08	0,58
AT – DNA	0,73	0,08	<0,01	0,63	0,57	0,20	0,58
Volume Prostático	0,87	0,13	<0,01	0,34	0,89	0,04	0,93
Escore Vascularização	0,41	0,41	<0,01	0,02	0,74	0,40	0,51
RI – Art. Prostática	0,59	0,46	0,20	0,81	0,44	0,15	0,81
PI – Art. Prostática	0,83	0,60	0,30	0,36	0,83	0,18	0,57
PS – Art. Prostática	0,75	0,71	0,29	0,29	0,81	0,92	0,09
ED – Art. Prostática	0,95	0,57	0,03	0,15	0,69	0,24	0,28
TAMAX – Art. Prostática	0,43	0,73	0,09	0,14	0,98	0,29	0,57
S/D – Art. Prostática	0,84	0,25	0,67	0,82	0,41	0,03	0,74

DHT: Di-hidrotestosterona, Vol. Testículo (D): Volume Testículo Direito, Vol. Testículo (E): Volume Testículo Esquerdo, PS: Velocidade do pico sistólico, ED: Velocidade do pico diastólico, TAMAX: Velocidade média de um ciclo cardíaco, RI: Índice de resistência, PI: Índice de pulsatilidade, S/D: Relação sistole:diástole, VAP: Velocidade média da trajetória, VCL: Velocidade curvilínea, VSL: Velocidade linear progressiva, ALH: Amplitude de deslocamento lateral da cabeça, BCF: Frequência de batimento flagelar cruzado, LMP: Lesão de membrana plasmática, LMPA: Lesão de membrana plasmática e acrossomal, LA: Lesão acrossomal, IMPA: Integridade de membrana plasmática e acrossomal, APMM: Alto potencial de membrana mitocondrial, MPMM: Médio potencial de membrana mitocondrial, BPMM: Baixo potencial de membrana mitocondrial, SOD: Superóxido Dismutase, TBARS: Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico, GPx: Glutathione Peroxidase, DAB I: Alta atividade mitocondrial, DAB II: Média atividade mitocondrial, DAB III: Baixa atividade mitocondrial, DAB IV: Ausência de atividade mitocondrial, SCD: Teste de dispersão da cromatina do DNA espermático, SCSA: Sperm Chromatic Structure Assay para avaliação do DNA espermático, AT: Coloração de azul de toluidina para avaliação do DNA espermático.

ANEXO C – Tabela 13

Tabela 13 – Efeito da Hiperplasia Prostática Benigna (animais hígidos vs. com HPB) na análise de citometria de fluxo e perfil oxidativo das amostras espermáticas. São Paulo, 2017.

	Hígido	HPB	P
Lesão de membrana plasmática (%)	14,7±3,1	19,9±3,1	0,29
Lesão de membrana plasmática e acrossomal (%)	19,2±2,8	19±2,8	0,41
Lesão acrossomal (%)	22,4±4,6	15,6±3,4	0,26
Integridade de membrana plasmática e acrossomal (%)	43,9±5	45,4±4,3	0,82
Alto potencial de membrana mitocondrial (%)	47±4,6	41,5±5,2	0,44
Médio potencial de membrana mitocondrial (%)	26,5±4,9	22,3±3,2	0,98
Baixo potencial de membrana mitocondrial (%)	26,4±3,1	36±4,7	0,37
TBARS (ng/TBARS)	469,8±63,6	377,8±53,4	0,25
Superóxido dismutase (SOD - IU ml ⁻¹)	30,7±4,6	23,3±3,8	0,45
Glutathione peroxidase (SOD - IU ml ⁻¹)	247,1±38,4	196,7±32,8	0,33

TBARS - Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

ANEXO D – Tabela 14

Tabela 14 – Efeito do tratamento com finasterida (não tratado vs. tratado com finasterida) na análise de citometria de fluxo e perfil oxidativo das amostras espermáticas. São Paulo, 2017.

	Hígido	HPB	P
Lesão de membrana plasmática (%)	17,2±3,1	17,9±3,2	0,39
Lesão de membrana plasmática e acrossomal (%)	21,8±3,3	16,5±2,2	0,78
Lesão acrossomal (%)	19,8±4,2	17,6±3,8	0,67
Integridade de membrana plasmática e acrossomal (%)	41,2±4,7	48±4,4	0,29
Alto potencial de membrana mitocondrial (%)	44,1±4,7	44,2±4,9	0,99
Médio potencial de membrana mitocondrial (%)	24,9±4,2	23,7±4	0,92
Baixo potencial de membrana mitocondrial (%)	30,8±3,7	32,1±4,6	0,98
TBARS (ng/TBARS)	386,9±56,9	467±61,5	0,28
Superóxido dismutase (SOD - IU ml ⁻¹)	28,5±5,1	25,3±3,2	0,74
Glutathiona peroxidase (SOD - IU ml ⁻¹)	199,5±33,4	244,2±38	0,68
TBARS - Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico			

ANEXO E – Tabela 15

Tabela 15 - Valores de probabilidade para o efeito dos tratamentos (Não tratado vs. Orquiectomia vs. Finasterida) e tempo (Dias 0 vs. 30 vs. 60) e sua interação nas variáveis ultrassonográficas e concentração sérica de estrógeno. São Paulo, 2017.

	Tratamento	Tempo	Tratamento x Tempo
PS (cm/s)	0,44	0,42	0,47
ED (cm/s)	0,13	0,16	0,33
TAMAX (cm/s)	0,32	0,33	0,56
Índice de Pulsatilidade (PI)	0,43	0,98	0,97
Estrógeno (pg/mL)	0,30	0,02	0,72

Legenda: PS: Velocidade do pico sistólico. ED: Velocidade ao fim da diástole. TAMAX: Velocidade média de um ciclo cardíaco.