MARTA MARIA CÍRCHIA PINTO LUPPI

**Avaliação andrológica de cães da raça *Golden Retriever* sadios
e afetados pela distrofia muscular**

São Paulo
2006

MARTA MARIA CÍRCHIA PINTO LUPPI

**Avaliação andrológica de cães da raça *Golden Retriever* sadios
e afetados pela distrofia muscular**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Departamento:
Cirurgia

Área de Concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:
Profa. Dra. Maria Angélica Miglino

São Paulo
2006

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.1799
FMVZ

Luppi, Marta Maria Círchia Pinto
Avaliação andrológica de cães de raça Golden Retriever sadios e afetados pela distrofia muscular / Marta Maria Círchia Pinto Luppi. – São Paulo: M. M. C. P. Luppi, 2006.
109 f.: il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2006.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de Concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Angélica Miglino.

1. Distrofia muscular animal. 2. Cães. 3. Reprodução animal.
4. Sêmen animal. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão de Bioética

PARECER

Interessado: Marta Maria Circhia Pinto Luppi

Assunto: Protocolo de experimentação adotado em experimento animal.

A Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, após analisar o projeto sob o número 782/2005, intitulado: "Avaliação andrológica de cães Golden Retriever sadios e afetados pela distrofia muscular", utilizando 15 cães, sob responsabilidade da Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de bioética, adotados por esta Comissão.

São Paulo, 13 de novembro de 2006

Prof. Dr. José Luiz Bernardino Merusse

Presidente da Comissão de Bioética

FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: LUPPI, Marta Maria Círchia Pinto

Título: **Avaliação andrológica de cães da raça *Golden Retriever* sadios e afetados pela distrofia muscular**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres
da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/2006.

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

*Dedico este trabalho ao meu pai JOSÉ FRANCISCO (in memorian),
pelo amor, dedicação e apoio.*

Meu grande exemplo de sabedoria!

*À minha mãe JURACI (in memorian),
pelo amor, carinho e compreensão.*

Meu grande exemplo de coragem!

“Queridos Pais,

Agradeço a Deus o privilégio de tê-los como pais.

*Com vocês aprendi que não podemos desistir de lutar pelos
nossos sonhos e que o conhecimento é nosso maior tesouro.”*

*Aos meus filhos Matheus e André,
presentes de Deus que deixam
minha vida mais colorida!!!*

*Ao meu marido Márcio,
Pelo amor, compreensão e companheirismo,
Por estar ao meu lado, acreditar nos meus sonhos
e me ajudar a realizá-los.*

*À minha doce Inês,
Pelo carinho e amor de mãe.*

*A minha irmã Virgínia,
que faz questão de estar presente e me apoiar
em todos os momentos de minha vida,
que vibra com minhas conquistas como se fossem delas.*

*Aos meus irmãos João e Júnior,
pelo companheirismo e amor.*

*“Queridos Irmãos,
A presença de vocês faz a vida ficar mais fácil de ser vivida!!!”*

*Às minhas sobrinhas Mariana, Natália e Joana,
pelo amor e incentivo.*

Aos sobrinhos Enzo e Gabriel,

Que junto com meus filhos,

dão-nos a certeza da continuidade de nossa história!!!

Aos meus sogros Ednir (in memorian) e Yara

Por me receberem e amarem como filha.

*Aos cães do Canil GRMD-Brasil
que nos mostram todos os dias que vale a pena viver!!!*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Angélica Miglino
pela orientação, oportunidade e apoio.

Ao Prof. Dr. Vicente Borelli,
pelo incentivo, confiança e amizade.

À Profa. Dra. Mayana Zatz,
pela honra de poder trabalhar em sua equipe.

Aos pesquisadores da Universidade do Missouri, Columbia, EUA
Janet Bogan, Daniel Bogan e Dr. Joe Kornegay,
por terem me recebido com atenção e consideração.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Camila Infantsi Vannucchi, pelos ensinamentos, atenção e amizade.

Às queridas Elaine e Teca, pela fundamental participação neste trabalho.

À Profa. Dra. Maria Inês Mascarenhas Jobim, pela colaboração e carinho.

Ao Prof. Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, pela oportunidade de trabalhar no canil GRMD Brasil.

À Profa. Dra. Mayra Helena Ortiz, pela atenção e apoio.

Aos colegas do Canil GRMD-Brasil, Dani, Ana Rita, Carla, Dryca, Cláudia (Xuleta), Felipe, Leandro, Cleber, Thaís, Alida, Marininha, Cris (Bisteka), Karla, Juliana, Marcelo, André e Matheus pela amizade e parceria.

À Patrícia Borelli Noronha, por ser minha grande amiga.

À Dra. Denise Simões, pelo apoio clínico aos cães.

À Profa. Dra Marileda Bonafim, pela colaboração com o canil.

Aos Professores do Setor da Anatomia, pelos ensinamentos.

Ao Maicon e Jacqueline, pela disponibilidade e atenção sempre dispensada.

Aos meus sobrinhos Mariana e Edison, pela paciência e ensinamentos na área de informática.

Às colegas Cláudia (Puff) e Tilde Rodrigues Fróes, pela realização dos exames ultrassonográficos.

Aos colegas Cristina Lúcio, Liége e Zeca, pelo auxílio na realização das avaliações seminais.

Aos funcionários da Anatomia, pelo apoio e auxílios prestados.

Aos meus colegas de pós-graduação pela amizade e agradável convívio.

À UNIP (Universidade Paulista), pela oportunidade e apoio.

À equipe do Hospital Veterinário UNIP/Campinas, Dra. Aline, Dra. Ana Paula, Dr. Marcos, Dr. Rafael, Rita, Sr. João, Fábio, Wilson, Claudemir, Edna, Gueomar, Izaqueu e às queridas Amanda, Patrícia, Jéssica e Luciane, pelo companheirismo e amizade demonstrados no trabalho diário.

Ao Prof. Dr. José Guilherme Xavier, pelo auxílio nas avaliações histopatológicas.

À colega Lúgia Gomes Miyazato, pelas análises histopatológicas.

À Juliana Passos, pelas análises estatísticas.

À Profa. Dra. Sílvia Crusco, pelos ensinamentos e amizade.

À Capes, pelo auxílio financeiro.

À equipe da Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela colaboração e gentil orientação com as referências.

Ao Canil Encrenquinhas, por ceder os animais sadios, pela amizade, confiança e carinho.

Aos meus alunos, pela oportunidade de ensinar e aprender.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

LUPPI, M. M. C. P. **Avaliação andrológica de cães da raça *Golden Retriever* sadios e afetados pela distrofia muscular.** [Breeding soundness of healthy and affected by muscular dystrophy Golden Retriever dogs]. 2006. 109 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a aptidão reprodutiva de cães da raça *Golden Retriever* afetados pela distrofia muscular. Realizou-se avaliações andrológicas em 11 cães com idades entre 10 meses e 4 anos. Destes, 7 eram afetados pela distrofia muscular e 4 sadios, utilizados como controle. Todos foram submetidos a exame clínico, análise seminal e ultra-sonografia dos órgãos reprodutores. Analisou-se também a morfologia dos testículos e seus respectivos funículos espermáticos dos cães que foram a óbito. Detectou-se as seguintes alterações nos cães afetados pela distrofia: atrofia muscular, andar rígido, pneumonia por aspiração, fragilidade do diafragma com projeção do estômago para a cavidade torácica, megaesôfago e cardiomiopatia dilatada. Em relação aos órgãos genitais dois dos cães apresentaram criptorquidismo bilateral. Os resultados das análises seminais mostraram que os cães afetados pela distrofia possuem maior quantidade de defeitos espermáticos maiores e totais. Nas avaliações ultra-sonográficas não foram identificadas diferenças entre os cães afetados pela distrofia quando comparados com cães sadios. As análises histopatológicas evidenciaram alterações morfológicas nos testículos e músculos cremáster de cães afetados pela doença. Os testículos apresentaram degeneração testicular e o músculo cremáster retração de fibras musculares com hialinização dos miócitos. Conclui-se então que a distrofia muscular em cães da raça *Golden Retriever* pode comprometer sua aptidão reprodutiva.

Palavras-chave: distrofia muscular animal, cães, reprodução animal, sêmen animal.

SUMMARY

LUPPI, M. M. C. P. **Breeding soundness of healthy and affected by muscular dystrophy Golden Retriever dogs.** [Avaliação andrológica de cães da raça *Golden Retriever* sadios e afetados pela distrofia muscular]. 2006. 109 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

The aim of the present research was to evaluate the reproductive condition of Golden Retriever dogs affected by muscular dystrophy. Breeding soundness examination was performed in 11 male dogs aged between 10 months and 4 years. Seven of this total were affected by muscular dystrophy and 4 healthy dogs that served as control. All dogs were submitted to a thorough physical exam, seminal evaluation and ultrasound of the reproductive tract. Testicle and spermatic cord morphology of post-mortem dogs were also examined. The following alterations were observed for the affected dogs: muscular atrophy, stiff walk, aspiration pneumonia, diaphragmatic fragility with stomach projection to the torax, megaesophagus e dilated cardiomyopathy. In relation to the genital tract, two dogs presented with bilateral cryptorchidism. Semen evaluation revealed high percentage of major and total sperm defects in affected dogs. Ultrasonographic exams were similar among healthy and affected dogs. Histopathology of the testicle and cremaster muscle revealed morphologic alterations in affected dogs represented by degeneration and muscular retraction with miocyte hyalinization, respectively. In conclusion, affected Golden Retriever dogs have their reproductive performance compromised by the muscular dystrophy.

Key words: Animal muscular dystrophy, dogs, animal reproduction, animal semen.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	20
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	48
4 RESULTADOS.....	55
5 DISCUSSÃO.....	68
6 CONCLUSÕES.....	74
REFERÊNCIAS.....	76
APÊNDICES.....	83

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A Distrofia Muscular Progressiva (DMP), em humanos engloba um grupo de doenças genéticas que se caracterizam por degeneração progressiva do tecido muscular (SCHATZBERG; SHELTON, 2004). A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é a forma mais comum da doença. A incidência aproximada é de 1 para cada 3500 nascimentos masculinos. A DMD ocorre por um defeito localizado no cromossomo X e os meninos afetados pela DMD possuem quantidade diminuída ou ausência de uma proteína chamada Distrofina, responsável pela manutenção da permeabilidade da membrana da célula muscular. Na deficiência total ou parcial da Distrofina, haverá degeneração progressiva dos músculos esqueléticos (COLLINS; MORGAN, 2004).

Quanto ao tratamento das distrofias musculares, muitas pesquisas têm sido realizadas a fim de se obter sua cura, uma vez que não há tratamento específico, sendo a fisioterapia a única medida terapêutica utilizada até recentemente. Desta forma, vários estudos têm sido realizados no que diz respeito à terapia celular, gênica e medicamentosa. A terapia celular consiste na utilização de células-tronco, que são células capazes de multiplicar-se e diferenciar-se nos diferentes tecidos do corpo humano (sangue, ossos, músculos, entre outros) e que são obtidas de cordão umbilical ou de células embrionárias na fase de blastocisto (ZATZ, 2004).

O modelo animal da distrofia muscular de Duchenne mais estudado é o camundongo mdx, no qual a homóloga mutação também resulta em falta de distrofina. Assim como em humanos afetados, o camundongo mdx tem necrose das

fibras musculares recorrente; a regeneração, porém, é muito eficiente e os camundongos não sofrem perda generalizada de fibras musculares e fraqueza.

Um modelo canino da distrofia muscular de Duchenne com similar mutação pode ser superior ao camundongo, pois seu tamanho e sintomas são muito próximos aos dos humanos (NICHOLS et al., 1994). A distrofia muscular ligada ao sexo e associada com deficiência de distrofina tem sido registrada em várias raças de cães, mas é melhor caracterizada na raça Golden Retriever (BERGMAN et al., 2002). Segundo Howell et al. (1997), o cão da raça Golden Retriever afetado pela distrofia muscular (GRMD), é considerado um excelente modelo para o estudo da eficácia da geneterapia em miopatias por deficiência de distrofina, pois há muitas similaridades entre cães afetados e meninos com DMD.

O Departamento de Cirurgia, área de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e o Centro de Estudo do Genoma Humano da Universidade de São Paulo mantém um canil experimental de cães da raça Golden Retriever portadores e afetados pela distrofia muscular (Canil GRMD – Brasil), com uma equipe multidisciplinar, com inúmeros projetos científicos em andamento, inclusive transplante de células tronco. Desta forma, os objetivos deste trabalho são:

- realizar avaliação andrológica dos cães do canil GRMD – Brasil para avaliar a aptidão reprodutiva dos cães afetados pela distrofia muscular e também contribuir com o avanço das pesquisas no que diz respeito às distrofias musculares progressivas.

- Correlacionar as possíveis alterações morfofuncionais dos órgãos genitais masculinos com a distrofia muscular progressiva.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DISTROFIA MUSCULAR DE DUCHENNE

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) ocorre por um defeito localizado no braço curto do cromossomo X. O homem que apresenta um gene defeituoso irá desenvolver a doença visto que ele tem um cromossomo X e um Y. A mulher por ter dois cromossomos X, estará protegida da doença mesmo que um dos seus cromossomos tenha uma mutação, sendo ela classificada em portadora; este gene defeituoso poderá ser transmitido pela mulher aos seus filhos do sexo masculino, que desenvolverão a doença, ou às suas filhas que poderão ser portadoras. Em 2/3 dos casos a mutação é adquirida da mãe e em 1/3 a mutação ocorre no próprio menino afetado. Nos meninos afetados pela DM, uma proteína chamada Distrofina está ausente ou em quantidade muito diminuída. A Distrofina faz parte de um complexo de proteínas, todas elas necessárias para a manutenção da permeabilidade da membrana da célula muscular. Na deficiência total ou parcial da Distrofina, haverá degeneração progressiva dos músculos esqueléticos (ABDIM, 2004).

Os primeiros sintomas desenvolvem-se por volta dos 3 (três) a 5 (cinco) anos, com manifestações de dificuldades dos membros inferiores: quedas freqüentes, dificuldade para subir escadas, correr, levantar do chão e as crianças apresentam aumento do volume das panturrilhas. Alterações da coluna e dos tendões são conseqüências das alterações musculares dos membros posteriores. Com o progredir da doença ocorre comprometimento dos músculos dos membros superiores. A fraqueza progressiva evolui para incapacidade de andar, em geral ao

redor da adolescência. O comprometimento do músculo cardíaco e dos músculos respiratórios ocorre a partir desta idade (ABDIM, 2004).

2.2 DISTROFIAS MUSCULARES PROGRESSIVAS EM CÃES

A distrofia muscular canina ligada ao cromossomo X em cães da raça Golden Retrievers (GRMD) tem similaridades fenotípicas e genotípicas com a distrofia muscular de Duchenne (DMD) em humanos (NGUYEN et al., 2002; SHELTON, 1994). Em ambos, há falha na transcrição do gene de Duchenne e a proteína que ele produz, a distrofina (SHELTON, 1994); constitui uma das miopatias hereditárias mais drásticas descritas nos cães (MCKERRELL, 2001).

O início dos sinais clínicos ocorre por volta da sexta e oitava semanas de idade, embora as alterações patológicas nos músculos possam ser encontradas desde o nascimento. Os cães machos afetados cansam-se com facilidade, desenvolvem andadura alternante anormal, caracterizada por passadas rígidas e curtas; podem ainda apresentar redução na capacidade de abrir os maxilares e dificuldade na apreensão e deglutição de alimentos. A maior parte da musculatura esquelética torna-se atrofica, porém, certos grupos musculares e a língua, apresentam-se com hipertrofia (MCKERRELL, 2001). Pode ocorrer a morte espontânea em neonatos de GRMD nas duas primeiras semanas de vida, porém, os cães normalmente não sobrevivem por mais que seis meses de idade. Entretanto, se ultrapassam este período crítico, apresentam expectativa de vida de três a cinco anos (NGUYEN et al., 2002). A *causa mortis* quando adultos é a cardiomiopatia. O músculo cardíaco é afetado tanto em humanos como em cães, porém, os meninos portadores de DMD morrem devido à atrofia dos músculos que levam a problemas respiratórios antes que eles progridam para o estágio de cardiomiopatia. Outra

diferença é que os cães podem continuar a se movimentar com seus problemas musculares precoces uma vez que são quadrúpedes, mas os meninos afetados perdem sua habilidade para ficar eretos e precisam utilizar-se de cadeira de rodas (SAMIEI, 2000).

2.3 EXAME ANDROLÓGICO

Para que se faça avaliação da eficiência reprodutiva de um macho é necessário a realização de um exame andrológico, incluindo um histórico detalhado e um cuidadoso exame clínico (CHRISTIANSEN, 1988). Pode-se incluir exame ultrassonográfico do aparelho reprodutor, em especial dos testículos, epidídimos e próstata (ENGLAND, 1996).

As informações gerais sobre o animal incluem idade, raça, nome, imunizações, descrição do manejo geral e nutricional, assim como histórico de doenças, incluindo resultados de sorologia para *Brucella canis*. A utilização de alguns fármacos têm sido apontada como causa de diminuição da qualidade do sêmen e da libido no homem, por isto faz-se também necessário investigar a cerca de terapia medicamentosa. Como a espermatogênese nos cães dura aproximadamente 62 (sessenta e dois) dias, deve-se investigar a utilização de algum medicamento nos últimos 2 (dois) meses. Finalmente o histórico reprodutivo deve ser avaliado (ROOT; JOHNSTON, 1994).

O exame físico dos órgãos reprodutores avalia e identifica estruturas anatômicas e suas anomalias congênitas, hereditárias e gerais (JOHNSON, 1994).

De acordo com o Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998), a avaliação da aptidão reprodutiva de um macho destinado à reprodução fundamenta-

se na observação da saúde geral, saúde hereditária, saúde genital, *potentia coeundi* e *potentia generandi*. Relata ainda que são considerados como essenciais para laudo de um exame andrológico: identificação detalhada, exame clínico, espermograma e diagnóstico e/ou conclusão.

2.3.1 Exame dos Órgãos Genitais Masculinos

O trato reprodutivo do cão é composto por escroto, testículos, epidídimos, cordões espermáticos, ductos deferentes, próstata, uretra, pênis e prepúcio (SILVA et al., 2002).

Os órgãos genitais constam de glândulas sexuais formadoras de células germinativas (testículo), de ductos excretórios, de glândulas acessórias e de órgãos copuladores (SCHWARZE, 1970).

Um completo exame físico é extremamente importante na avaliação andrológica de um cão. Anormalidades envolvendo outros órgãos, que não sejam do trato reprodutivo podem interferir na espermatogênese ou na libido. Em um cão infértil, atenção especial deve ser dada para o tamanho, forma e localização do osso peniano em relação à glândula do pênis; a abertura do prepúcio e a capacidade de expor o pênis; o tamanho e conformação do epidídimo e cordão espermático; e o tamanho, simetria, e consistência da próstata (FELDMAN; NELSON, 1996).

Escroto: deve ser inspecionado e palpado cuidadosamente, quanto a sua dimensão, presença de lesões e conteúdo (CHRISTIANSEN, 1988). A pele do escroto é fina, pigmentada, contém glândulas sudoríparas e é coberta por pêlos. O escroto exerce papel fundamental na proteção e termorregulação testicular. Uma termorregulação adequada que mantenha os testículos a uma temperatura cerca de

5 ° C abaixo da temperatura corpórea é condição *sine qua non* para garantir produção hormonal e espermatogênese normais (THIBAUT; LAVASEUR, 1991). Devido a pouca quantidade de pêlos na pele do escroto, e também pouca quantidade de gordura situada no subcutâneo e à sua habilidade em se contrair, este órgão funciona como regulador de temperatura para a cauda do epidídimo (EVANS; CHRISTENSEN, 1993).

Os testículos estão contidos numa bolsa especializada de pele, o escroto (BANKS, 1992). O escroto bastante pendular do cão é globular e situado em uma posição intermediária entre o períneo e a virilha, sendo mais facilmente inspecionado caudalmente e, por ser escassamente coberto por pêlos, seu amoldamento aos testículos é evidente (DYCE; SACK; WENSING, 2004). Possui ainda um septo mediano que o divide em duas cavidades, cada uma das quais é ocupada pelo testículo, epidídimo e a parte distal do funículo espermático (ELLENPORT, 1975).

Testículos: são examinados quanto às dimensões, consistência e quanto à presença de infecções ou tumores. Os testículos, de forma redonda a oval estão situados no escroto, com o eixo oblíquo longo dirigido dorso-caudalmente, e com os epidídimos relativamente grandes firmemente aderidos em posição dorso-lateral. Há grande variação no tamanho do testículo entre as raças de grande e pequeno porte; a média em torno dos 3 cm de comprimento x 2 cm de largura x 1,5 cm de espessura (CHRISTIANSEN, 1988).

Os testículos ficam na posição horizontal e tem contorno ovalado, sendo comprimido lateralmente e relacionado com o epidídimo ao longo de sua margem dorsal (DYCE; SACK; WENSING, 2004). Eles são relativamente pequenos no cão e ficam envolvidos pela túnica vaginal, espermática e fáscia cremastérica estando

conectados com a túnica dartos do escroto através da fáscia espermática externa (NICKEL et al., 1979).

Os testículos são órgãos exócrinos e endócrinos combinados. A porção exócrina é uma glândula tubular composta, enovelada cujo produto de secreção holócrina são os espermatozóides. A porção endócrina é representada pelas células intersticiais de Leydig e pelas células de sustentação de Sertoli. Os testículos estão encerrados numa cápsula, a túnica albugínea, composta por tecido conjuntivo denso. A túnica albugínea é contínua com o tecido conjuntivo frouxo do mediastino testicular o qual envolve a rede testicular (BANKS, 1992). O mediastino é central e bem desenvolvido, emite septos de tecido conjuntivo que dividem o testículo em lóbulos incompletos, nos quais estão os túbulos seminíferos que contêm as células de Sertoli e vários outros tipos celulares envolvidos na produção de espermatozóides. Os túbulos desembocam na rede do testículo a qual drena nos ductos eferentes, que se unem para formarem a cabeça do epidídimo o qual é grande e extremamente convoluto (ELLENPORT, 1975).

Os ductos eferentes, em número de 15 (quinze) a 16 (dezesesseis) confluem e formam o ducto epididimário que chegam até a cauda do epidídimo, da qual sai o ducto deferente.

Epidídimos: são examinados quanto a defeitos anatômicos, como aplasia, uni ou bilateral, e para evidências de infecções (CHRISTIANSEN, 1988). O epidídimo é um tubo longo, enrolado sobre si mesmo e é composto por três partes: cabeça, corpo e cauda. A cabeça do epidídimo está na margem crânio-lateral do testículo e não é facilmente palpável. O corpo localiza-se na superfície dorso-lateral do testículo e não pode ser palpável. A cauda fica no pólo dorso-caudal e é prontamente

palpável no animal normal como uma protuberância firme. O epidídimo se continua como um tubo reto denominado ducto deferente (SILVA et al., 2002).

Próstata: é examinada por palpação abdominal ou retal, quanto à presença de infecção, hipertrofia, cistos e tumores (CHRISTIANSEN, 1988). É a única glândula sexual acessória no cão. É uma estrutura bilobada situada na entrada da pelve, repousando na porção cranial da sínfise pélvica, envolvendo a porção cranial da uretra. A glândula prostática é simétrica, de forma globular, com um sulco dorsal mediano que a divide em duas metades e possui consistência elástica e tênsil. Em cães adultos, a glândula varia de comprimento, largura e espessura, entre um mínimo de 1,4 – 1,9 cm e um máximo absoluto de 2,5 – 2,8 cm, com um peso absoluto de 1,7 – 14,5 g e peso relativo (ao peso corporal) de 0,21 – 0,57 g / kg (SILVA et al., 2002). A glândula prostática é responsável pela produção do líquido prostático sob a influência de testosterona, que é uma secreção clara e expelida na uretra, consistindo na primeira e terceira fração do ejaculado (ENGLAND; ALLEN; MIDDLETON, 1990). O fluido prostático é bactericida, sendo responsável por 95% do volume total ejaculado (POULET, 1985).

No cão, as glândulas ampolares e a próstata constituem todo o complemento de glândulas sexuais acessórias, sendo a próstata a responsável pela maior parte do líquido seminal. Ela é composta por uma grande massa compacta ao redor da uretra e do colo da bexiga, e por uma pequena parte disseminada, dispersa na mucosa uretral. A parte compacta varia muito em tamanho, e isto, obviamente afeta sua posição e suas relações. Quando pequena, pode estar dentro da cavidade pélvica; porém mais freqüentemente em cães idosos e adultos, localiza-se principalmente, se não por inteira, dentro do abdome (DYCE; SACK; WENSING, 2004). Quando a bexiga urinária está vazia e contraída, a glândula está inteiramente

na cavidade pélvica a 2,5 cm ou mais, caudalmente à borda cranial do púbis. Quando a bexiga está cheia, a próstata localiza-se muitas vezes essencialmente ou inteiramente em posição pré-púbica (ELLENPORT, 1975). Dyce, Sack e Wensing, (2004) ressaltam ainda a relação da próstata com o intestino grosso que pode tornar-se obliterado em aposição ao púbis quando houver aumento da próstata.

Pênis e prepúcio: são examinados quanto a anormalidades anatômicas, lesões, doenças infecciosas e tumores (CHRISTIANSEN, 1988). O pênis no cão direciona-se cranial e ventralmente, e está em posição cranial aos membros pélvicos, ao longo da região inguinal do abdômen (EVANS; CHRISTENSEN, 1993). O pênis consiste em dois corpos cavernosos distintos. A porção posterior é separada pelo septo peniano médio; anteriormente, o osso peniano situa-se desde o bulbo da glândula até a quase extremidade da glândula, no interior da qual este osso se prolonga por uma projeção cônica de fibrocartilagem com cerca de 0,5 (meio) cm de comprimento. A glândula do pênis inicia-se na região aderida ao prepúcio e é composta do bulbo da glândula, consistindo em tecido erétil que envolve completamente o pênis e a uretra, e parte longa da glândula, composta de tecido erétil apenas dorsal e lateralmente. O bulbo é dificilmente discernível no estado relaxado. Quando o pênis fica ereto, a glândula torna-se uma estrutura espessa esférica, edemaciada que é responsável por travar o pênis na vagina durante a cópula. A parte longa compreende os $\frac{3}{4}$ (três quartos) distais da glândula e termina na abertura da uretra (SILVA et al., 2002). Para se efetuar o exame do pênis, este deve ser exteriorizado completamente, permitindo observar os bulbos eréteis. O cão, em decúbito dorsal, é colocado em posição semi-sentada, o prepúcio é então retraído, enquanto que o pênis, preso através do prepúcio e por trás dos bulbos eréteis, é empurrado para a frente (MIALOT, 1988).

2. 3. 2 Ultra-sonografia dos Órgãos Genitais Masculinos

O tamanho médio dos testículos dos cães é 3,63 cm de comprimento, 2,67 cm de diâmetro dorsoventral e 2,67 cm de diâmetro lateromedial. Sobre eles está o epidídimo, no qual distingui-se a cabeça (cranial) e a cauda (caudal) esta última acoplada ao ligamento do testículo. As medidas do epidídimo são 0,67 cm de cabeça, 0,39 cm de corpo e 0,88 cm de cauda. O testículo tem textura homogênea hipo ou isoecóica em relação à próstata, já o epidídimo varia de anecóica para hipoecóica em relação ao parênquima testicular.

As enfermidades que podem ser observadas através do exame ultra-sonográfico dos testículos são hérnia escrotal, varicocele, hidrocele e testículo ectópico.

Para a execução do exame ultra-sonográfico dos testículos e epidídimo não é necessária preparação prévia, nem tricotomia da área. O animal deve estar em decúbito dorsal e o transdutor (5 e 7,5 MHZ) deve deslizar nos planos sagital, transversal e dorsal.

Para o exame ultra-sonográfico da próstata, o transdutor deve ser de 5 a 7,5MHZ, o animal deve estar em decúbito dorsal, com a região abdominal tricotomizada. As imagens devem ser feitas nos planos sagital e transversal, o osso peniano dificulta a realização do plano transversal. A próstata é bilobada em cães e recoberta por uma cápsula de fibras musculares, quanto ao seu tamanho ela não deve ser maior que 70% da distância púbis promontório (GUIDO, 2004).

O posicionamento crâniocaudal da próstata depende do tamanho do órgão, que aumenta com a idade e o amadurecimento sexual dos cães, sendo seu

crescimento andrógeno-dependente (JOHNSTON; KUSTRITZ; OLSON, 2001), assim a castração do animal resulta na atrofia da próstata.

As enfermidades observadas no ultra-som de próstata são hipertrofia e hiperplasia benigna, cistos prostáticos, prostatite bacteriana, cistos paraprostáticos e neoplasias prostáticas (GUIDO, 2004).

Murashima Júnior (2001), em seu estudo a respeito da mensuração sonográfica da próstata de cães normais estabeleceu medidas para várias raças, encontrando altura prostática aproximada de 2,83cm em cão da raça Retriever do Labrador, com 31Kg de peso corpóreo.

Grando (2005) realizou avaliação ultra-sonográfica em cães Golden Retrievers com distrofia muscular e relatou que os órgãos reprodutivos (testículos e próstata) dos cães afetados mostraram-se diminuídos, quando comparados com cães normais.

2.3.3 Avaliação Espermática

A avaliação espermática ou espermiograma é largamente utilizada no manejo reprodutivo das diversas espécies animais e, atualmente, é de extrema importância para o monitoramento de cães reprodutores, pois é freqüentemente realizada como exame de rotina em animais selecionados para acasalamento, ou como meio de diagnóstico de alterações da esfera reprodutiva (VANNUCCHI; SATZINGER; SANTOS, 1998).

Os parâmetros seminais predizem o grau de fertilidade de um animal. Estudos correlacionando anormalidades espermáticas com diminuição da fertilidade estão bem documentados no touro, mas há poucos trabalhos que relacionam

anormalidades dos espermatozóides e infertilidade no cão. O aumento no número e nos tipos de anormalidades das amostras de sêmen reflete condições de subfertilidade. Lesões que podem resultar em alteração de morfologia espermática no ejaculado podem ocorrer nos testículos e/ou sistemas de ductos, incluindo a próstata. Equipamentos e técnica de coleta inadequados podem resultar em artefatos e afetar a motilidade e danificar os espermatozóides. A avaliação cuidadosa das frações do ejaculado pode ser um auxílio diagnóstico valioso (STOCKNER, 1991).

Para se determinar as características seminais, faz-se necessário a avaliação do ejaculado. Os critérios utilizados para o espermograma na espécie canina são similares àqueles utilizados em outras espécies. O ejaculado normal é composto por três frações. A primeira e a terceira são de origem prostática, tendo a primeira a função de limpar o canal uretral de urina e a terceira serve como carreadora de espermatozóides para o útero (SILVA et al., 2002).

A avaliação do sêmen é efetuada após o exame clínico, a avaliação de uma amostra isolada pode dar uma impressão falsa, especialmente se o cão foi recentemente utilizado intensamente para reprodução. Em tais casos, deve ser permitido um período de repouso de 4-5 dias, antes da coleta de uma nova amostra. Em cães não utilizados para a reprodução por períodos longos, deverão ser colhidas diversas amostras, antes que o ejaculado possa ser considerado representativo (CHRISTIANSEN, 1988).

A colheita do sêmen é bastante simples e, geralmente, um procedimento bem sucedido, com exceção de animais estressados, inexperientes, agressivos ou portadores de alguma anormalidade ou, ainda, quando há excessiva interferência do proprietário. Recomenda-se a presença de uma fêmea em estro ou proestro, no

sentido de estimular a libido do reprodutor, obtendo sêmen de melhor qualidade. É aconselhável que o animal urine antes do início do procedimento e, em seguida, pode-se permitir que o macho se aproxime da fêmea, mantendo-se ambos contidos (VANNUCCHI; SATZINGER; SANTOS, 1998).

A coleta do sêmen deve ser feita antes do exame físico, venopunção ou qualquer outro procedimento que possa causar stress ao animal, o conforto e cooperação do cão são essenciais para a coleta do sêmen (FRESHMAN, 2002).

O espermograma fornece subsídios para o diagnóstico de algumas enfermidades que levam à sub-fertilidade e à infertilidade, tais como degeneração testicular, orquite, epididimite, moléstias prostáticas, entre outras. A realização do espermograma pode ser indicada para:

- localização da moléstia causadora de infertilidade ou sub-fertilidade em cães machos;
- monitoramento da resposta ao tratamento de machos sub-férteis e inférteis;
- avaliação da qualidade do sêmen a ser utilizado na inseminação artificial ou criopreservação;
- colheita de fluido prostático para avaliação citológica e microbiológica em moléstias da próstata;
- cultura do sêmen para isolamento e identificação de microorganismos causadores de processo infeccioso no trato genital masculino;
- avaliação da libido apresentada pelo reprodutor, o que indiretamente caracteriza o funcionamento normal do eixo hipotálamo-hipófise-gônada (VANNUCCHI; SATZINGER; SANTOS, 1998).

A estimulação digital é o método de colheita de sêmen mais comum em cães. A eletroejaculação tem sido descrita, mas usualmente não é necessária, pois pode estar associada com contaminação do ejaculado com urina. A colheita deve ser realizada em um ambiente confortável, calmo e com um piso antiderrapante. Embora a maioria dos cães ejacule somente com estimulação manual do pênis, sempre que possível é recomendável a presença de uma fêmea em cio (proestro/estro) (JOHNSTON; KUSTRITZ; OLSON, 2001).

Alguns autores indicam a utilização de vagina artificial para colheita do sêmen (FELDMAN; NELSON, 1996; SEAGER; PLATZ, 1977; STOCKNER, 1991). Estudos mostraram efeitos negativos do látex da vagina artificial, diminuindo a motilidade dos espermatozóides caninos, mas outras pesquisas apontam que esta diminuição na motilidade somente ocorre quando houver contato por tempo prolongado, sendo desta maneira uma falha na técnica de colheita (FRESHMAN, 2002).

Segundo Vannucchi, Satzinger e Santos (1998) o sêmen deve ser colhido por estimulação manual do prepúcio e pênis, com o animal em estação. Ao início do intumescimento do bulbo do pênis, o prepúcio deve ser tracionado, com o intuito de expor o corpo do pênis. A maioria dos cães elimina a primeira fração do ejaculado (transparente; 1-5 ml; duração de 0,5-1 min) durante os movimentos pélvicos da cópula. O pênis deve, então, ser rotacionado 180° (passa-se o membro pélvico do macho sobre o braço do coletador) e, logo em seguida, o macho elimina a segunda fração do ejaculado (rica em espermatozóides, esbranquiçada; 1-3 ml; duração de 1-2 min). Desta forma, a colheita passa a ser realizada em direção oposta ao animal. Uma leve pressão pode ser aplicada por toda a circunferência peniana, próxima ao bulbo, no intuito de simular a monta natural e manter a ereção. Após a eliminação da fração rica em espermatozóides, o macho ejacula a terceira fração (transparente; 1-

30 ml; duração de 5-30 min), de origem prostática. Na dependência do intuito do exame, selecionam-se as frações seminais a serem colhidas. Para cultura de líquido prostático, deve-se coletar apenas a terceira fração. Por outro lado, se o intuito da colheita for a realização de inseminação artificial, deve ser colhida a segunda fração e líquido prostático suficiente apenas para aumentar o volume da amostra. Durante a exposição do pênis no momento da colheita, o clínico deve inspecioná-lo, observando presença de abrasões, feridas e sinais de infecção.

Uma vez coletado o sêmen deve ser mantido à temperatura de 35 a 37° C e deve ser avaliado o mais rápido possível (ESCOBAR, 2004).

2.3.3.1 Avaliação macroscópica do sêmen

1. Volume: é avaliado diretamente no tubo de colheita. O volume do ejaculado normal é de 1 a 40ml, e esta grande variação do volume seminal ocorre em função da idade, raça, atividade reprodutiva do macho e quantidade de líquido prostático colhido. O dado de volume do ejaculado é importante para o cálculo posterior do número total de espermatozóides por ejaculado. No entanto, é preciso sempre discriminar quais frações do ejaculado foram colhidas (VANNUCCHI, SATZINGER; SANTOS, 1998).

Johnston, Kustritz e Olson (2001) relatam que o volume normal do sêmen canino varia de 1 a 80 ml, mas que o volume não é indicativo de qualidade espermática, mas dependente da quantidade de fluido prostático coletado. Os cães podem ejacular fluido prostático por mais de 20 minutos durante a colheita de sêmen.

A primeira fração tem um volume variável, mas geralmente é de 0,5ml. A segunda fração varia de 0,5-1ml, em alguns cães, podendo chegar até 3ml. A última fração é a que possui maior volume e pode variar de 3 a 30ml (SILVA et al., 2002).

De acordo com Seager e Platz (1977), somente a primeira, segunda e parte da terceira fração do ejaculado devem ser coletadas para alcançar volume de 2 a 4 ml em cães de raças pequenas e 4 a 7 ml em raças grandes.

Freshman (2002) indica que o volume do sêmen coletado seja mensurado e anotado, e deve consistir da primeira e segunda fração se coletadas juntas, ou a segunda fração se coletada separadamente, a quantidade de fluido prostático é variável e não é usada.

2. Coloração: a cor do sêmen do cão é normalmente branco-opalescente, o que corresponde à segunda fração do ejaculado. O grau de opacidade depende da concentração do ejaculado, da quantidade de líquido prostático colhido e da ocorrência de ejaculação incompleta. Assim, quando a segunda fração do sêmen apresenta-se transparente é sinal de azoospermia. A contaminação do sêmen por urina ou secreção purulenta determina uma coloração amarelada. A coloração esverdeada indica presença de pus, o que é sugestivo de uma infecção no trato genital. A coloração avermelhada ou amarronzada ocorre quando há contaminação por sangue fresco ou hemolisado, respectivamente, o que decorre normalmente de uma alteração prostática ou trauma do pênis em ereção (por nesta fase apresentar intenso aporte sangüíneo). É possível associar a coloração do sêmen ao seu odor. Normalmente, o ejaculado não possui cheiro, que é notado apenas quando há contaminação por material estranho. Qualquer anormalidade em relação à coloração do ejaculado pode prejudicar outros parâmetros seminais (motilidade, concentração e viabilidade) (VANNUCCHI et al., 1998).

3. PH: uma gota de sêmen deve ser colocada em papel indicador de pH, observando-se em 30 segundos a cor correspondente à zona impregnada e comparando-se à tira de calibração para leitura de pH. Normalmente o sêmen apresenta o pH entre 6,3 e 6,7, porém esse valor depende da presença de líquido prostático já que esta fração possui pH entre 6,0 e 7,4. O aumento de pH pode ser associado à ejaculação incompleta e a processo inflamatório do trato genital masculino (VANNUCCHI; SATZINGER; SANTOS., 1998).

2.3.3.2 Avaliação microscópica do sêmen

1. Motilidade retilínea progressiva: é a capacidade do espermatozóide movimentar-se em linha reta e reflete indiretamente a capacidade e viabilidade do espermatozóide em fertilizar o óvulo. Esse parâmetro seminal deve ser avaliado imediatamente após a colheita, depositando-se uma gota do sêmen entre lâmina e lamínula limpas e previamente aquecidas a 37° C. O valor é fornecido em porcentagem, o que traduz a quantidade de espermatozoides que estão se movimentando no campo do microscópio, em aumento de 100 ou 400 x. Uma amostra de sêmen normal deve possuir motilidade superior a 70%. Os espermatozoides que apresentam movimentos circulares ou que se movimentam lado a lado sem progressão, não apresentam motilidade retilínea progressiva normal. A presença de aglutinação de espermatozoides, debris celulares e a presença excessiva de leucócitos e hemáceas também deve ser avaliada. Atualmente, tem-se disponível um sistema de avaliação microscópica da motilidade espermática em programas de computador, utilizando-se equipamento que mensura a quantidade de espermatozoides móveis por campo, eliminando a interpretação

subjetiva do parâmetro (VANNUCCHI; SATZINGER; SANTOS, 1998). Motilidade abaixo de 60% pode ser considerada como anormal (SILVA et al., 2002).

Alguns fatores podem alterar a motilidade dos espermatozóides, tais como: choque térmico; material contaminado por produtos químicos, urina, sangue, pus, água ou lubrificantes espermicidas, colheitas freqüentes de sêmen por mais de 5 meses; ou animal que há muito tempo não ejacula. Repetindo-se a colheita, se a quantidade de espermatozóides pouco móveis ou mortos persistir, pode ser indicativo de problema testicular ou em epidídimo (VANNUCCHI; SATZINGER; SANTOS, 1998).

Várias técnicas têm sido empregadas para estudar e descrever a motilidade quantitativa dos espermatozóides, a mais simples delas envolve a avaliação visual da porcentagem dos espermatozóides e da qualidade da motilidade individual do espermatozóide (HAFEZ, 1995).

A análise computadorizada do sêmen é uma técnica de avaliação padronizada e objetiva onde digitaliza a célula espermática e utiliza grande número de imagens para caracterizar qualidade do movimento da célula espermática, porém o custo dessa avaliação é muito alto, limitando esta prática (LOPES, 2001).

2. Vigor espermático ou velocidade de progressão espermática (0-5): é a velocidade de progressão do espermatozóide, e deve ser avaliada conjuntamente à motilidade espermática. A presença de vigor 0 indica a imobilidade, e vigor 5 sugere rápida mobilidade através do campo. Este parâmetro não é freqüentemente descrito em literatura, porém sugere-se sua avaliação como complemento ao dado de motilidade. Cães normais devem apresentar vigor dos espermatozóides superior a 3

(progressão moderada para a frente) (VANNUCCHI; SATZINGER; SANTOS, 1998).

O vigor é a qualidade da motilidade (SILVA et al., 2002).

3. Concentração espermática (espermatozóides/ejaculado): este parâmetro é estimado utilizando uma câmara hematóimétrica (câmara de Neubauer), avaliando-se em microscopia óptica, em aumento de 400 x. Deve-se contar o número de espermatozóides em pelo menos 5 quadrados grandes, limitados por linhas triplas, respeitando-se a padronização do “L” invertido, em uma diluição de 1:200. O valor obtido deve ser multiplicado por 10^6 (número de espermatozóides/ml) e, posteriormente, pelo volume total do ejaculado, resultando no número de espermatozóides por ejaculado. A diluição utilizada pode variar em função da estimativa da concentração espermática, observando-se a coloração do ejaculado. A concentração espermática de um macho normal deve ser superior a 200 milhões de espermatozóides por ejaculado, entretanto, podem haver variações conforme a idade, o tamanho do animal (raças grandes produzem maior concentração espermática que raças de menor porte), a atividade reprodutiva do macho, o método de colheita e a diluição com líquido prostático (VANNUCCHI; SATZINGER; SANTOS, 1998). A concentração corresponde ao número de espermatozóides por mililitro de sêmen. Como a segunda fração é rica em espermatozóides, é nesta que avaliamos tal parâmetro. No cão, a concentração espermática deve ser aproximadamente de $247 \pm 9,9 \times 10^6$ espermatozóides/ml (SILVA et al., 2002).

De acordo com Johnson, Kustritz e Olson (2001) a concentração não é um indicador de qualidade espermática, exceto nos casos em que nenhum espermatozóide estiver presente no ejaculado (azoospermia).

O número de espermatozóides por ejaculado é dependente de vários fatores, cães muito novos ou muito velhos diminuem a produção espermática e ainda, que

ao final do verão a concentração diminui quando comparada com a primavera ou com o início do verão, mas mesmo assim permanece dentro dos valores normais (FRESHMAN, 2002).

4. Morfologia espermática ou patologia espermática: dois métodos podem ser utilizados para avaliar a porcentagem de defeitos dos espermatozóides. Pode-se fazer uso da preparação úmida em formol salino, visualizando-a em microscópico de contraste ou interferência de fase (1000x), ou de esfregaços corados em colorações determinadas, tais como coloração de Williams ou Eosina-nigrosina, visualizando-as sob imersão em aumento de 1000x.

As alterações estruturais dos espermatozóides podem ser divididas em duas categorias: defeitos maiores (relacionados a espermatogênese, portanto, de origem testicular) e defeitos menores (relacionados ao transporte e armazenamento dos espermatozóides no epidídimo, alteração na técnica de colheita ou após febre, trauma, processo infeccioso e administração de glicocorticóides) (VANNUCCHI; SATZINGER; SANTOS, 1998).

Blom (1950) estudando espermatozóides de touros classifica os defeitos maiores aqueles relacionados com a espermatogênese e os menores os relacionados ao armazenamento no epidídimo, e o mesmo autor, em 1973 faz outra classificação, colocando os defeitos maiores como os que interferem com fertilidade e os menores não associados a infertilidade (BLOM, 1973).

É preciso discriminar o local do defeito, ou seja, cabeça, peça intermediária ou cauda do espermatozóide. Estudos que correlacionam porcentagem de defeitos espermáticos e infertilidade ainda são escassos, entretanto, é reconhecido que 80% ou mais dos espermatozóides no ejaculado devem ser livres de alterações estruturais

A espermatogênese do cão compreende normalmente 4 a 5 ciclos de 13 a 14 dias cada um, totalizando 55 a 70 dias desde o momento da produção até a maturação do espermatozóide e sabe-se que a espermatogênese é influenciada por inúmeros fatores, como: alimentação, hormônios, temperatura, orquites, lesões traumáticas do escroto (uma lesão grave pode determinar até esterilidade permanente).

Não é recomendado fazer um prognóstico baseado em somente um espermograma, é conveniente realizar várias avaliações em intervalos apropriados. O prognóstico deve ser reservado se após 3 meses não houver melhora do quadro, sendo considerado desfavorável se houver decorrido 6 meses e se após 12 meses não houver melhora, o prognóstico é considerado irreversível (OETTLE; SOLEY, 1988).

5. Citologia e cultura do sêmen: é possível realizar um esfregaço da segunda fração ou fluido prostático, no intuito de pesquisar a presença de células inflamatórias e bactérias. Células inflamatórias normais, hemácias, células epiteliais e bactérias são comumente encontradas no ejaculado, em função da contaminação da uretra, porém, é de bom senso avaliar a quantidade e integridade destes elementos, correlacionando-os à sintomatologia clínica. Se houver suspeita de processo infeccioso, uma amostra de sêmen deve ser submetida a cultura e antibiograma. Nestes casos, é recomendável a colheita separada das 3 frações do ejaculado, que devem ser analisadas individualmente, para identificar com maior acurácia a fonte de infecção (VANNUCCHI; SATZINGER; SANTOS, 1998).

2.4 AVALIAÇÃO SEMINAL EM CÃES COM DISTROFIA MUSCULAR

Apesar de vários grupos de pesquisas estudarem modelos caninos com distrofia muscular, identificou-se somente um trabalho se referindo a capacidade reprodutiva destes animais.

Shimatsu et al. (2003) avaliaram a capacidade de fertilização de sêmen congelado de cães Golden Retriever afetados pela distrofia muscular, na colônia de cães distróficos no Japão mediante inseminação artificial de 10 cadelas da raça beagle com sêmen congelado proveniente da colônia da Universidade do Missouri e obtiveram excelentes resultados, das 10 fêmeas inseminadas, por via vaginal, 8 geraram ninhadas com média de 5 a 6 filhotes cada, porém neste estudo não se descreve características seminais dos cães afetados.

2.5 DEGENERAÇÃO TESTICULAR

O testículo é uma gônada dupla, de forma ovóide, de localização extra-abdominal nos mamíferos e localizada na maioria dos casos no interior de uma bolsa cutânea na região inguinal. É caracterizado por uma função celular e outra endócrina, (DYCE; SACK; WENSING, 1996) já que produz espermatozóides e hormônios como a testosterona, hormônio sexual masculino, além de outros como progesterona, estrógeno e colesterol, através do processo de estereoidogênese (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995).

Apresenta-se envolvido por uma espessa cápsula de tecido conjuntivo, rico em fibras colágenas, a albugínea (BANKS, 1998), cobrindo a albugínea encontra-se,

nas porções anterior e laterais do testículo, um saco seroso derivado do peritônio, chamado de túnica vaginal (CARLTON; MCGAVIN, 1998).

A albugínea apresenta um espessamento na sua região posterior, o mediastino testicular, de onde partem septos fibrosos em sentido radial, que caminham na espessura do órgão até atingir a albugínea do lado oposto. Dessa maneira, cada testículo é dividido em aproximadamente 250 compartimentos piramidais, os lóbulos testiculares. Os septos não são completos em todo o seu trajeto e, frequentemente, há intercomunicação entre os lóbulos (BANKS, 1998).

Cada lóbulo é, por sua vez, ocupado por um a quatro túbulos seminíferos imersos em uma trama de tecido conjuntivo, frouxo, rico em vasos e nervos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995). Os túbulos são retorcidos e terminam na região posterior dos testículos, nos túbulos retos que, por sua vez, se anastomosam em uma rede de túbulos, a rede testicular (BANKS, 1998). Os túbulos são envolvidos por uma camada de células adventícias e tecido conjuntivo, a lâmina própria. A membrana basal é adjacente ao epitélio seminífero e o separa da lâmina própria. Há dois tipos celulares no epitélio seminífero: as células de Sertoli, não proliferativas e as células das linhagens germinativas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1995).

A vascularização testicular é rica e complexa e ocorre por um conjunto de vasos. De modo geral, as artérias pudendas externa e interna vascularizam todo o tecido testicular. As veias escrotais acompanham as artérias e se unem às veias pudendas e vasos linfáticos que drenam para os linfonodos inguinais superficiais. A inervação da face anterior do escroto é suprida pelos nervos escrotais anteriores, ramos do nervo ilioinguinal e pelo ramo genital do nervo genitofemoral. A face posterior, por sua vez, é suprida pelos nervos escrotais posteriores, ramos dos

nervos perineais superficiais e pelo ramo perineal do nervo cutâneo femoral posterior (DYCE; SACK; WENSING, 1996; ELLENPORT, 1975).

O testículo tem por funções básicas sintetizar hormônios e realizar a espermatogênese. Esta última é um processo longo e sensível que exige manutenção de temperatura testicular entre 2 a 6 °C abaixo da temperatura corporal para que sejam produzidos espermatozóides férteis, necessitando para isso numerosos mecanismos locais (MCENTEE, 1990). A pele escrotal é fina, pobre em gordura subcutânea e relativamente sem pêlos; contam ainda com os sistemas sangüíneo e linfático bem desenvolvidos, facilitando a perda térmica por irradiação e evaporação. A sudorese é uma perda de calor importante dada pelo escroto, graças a grande quantidade de glândulas sudoríparas presentes. O músculo cremáster e a túnica dartus, cuja ação é comandada por nervos simpáticos lombares, relaxam e contraem, afastando ou aproximando os testículos da área inguino-abdominal, posicionando-os em resposta a temperatura do meio ambiente, o que facilita a preservação do gradiente de temperatura abdomino-testicular (BARTH, 1993; BLANCHARD et al., 1992 ;).

O sucesso da espermatogênese depende, principalmente, de níveis intratesticulares adequados de testosterona e da conservação da morfologia dos túbulos seminíferos. A produção quantitativa de espermatozóides é diretamente proporcional à população de espermatogônias, que dá origem a um número determinado de espermátócitos primários. As espermatogônias são dependentes do número de células tronco e da taxa de proliferação e degeneração celular. O processo espermatogênico se desenvolve com o suporte de uma população de células não proliferantes as ditas células de Sertoli (FAWCETT, 1994). As células

germinativas exercem efeitos estimulantes e inibitórios na regulação da função das células de Sertoli, através do contacto direto entre elas ou via secreção de fatores específicos (FOUCAULT; DROSDOWKY; CARREAU, 1994). Em suma, as células de Sertoli desempenham funções de suporte físico e químico das células das linhagens germinativas, além de criarem um ambiente favorável para o desenvolvimento dos espermatozóides, separando-os através de junções de oclusão do resto do corpo (ACLAND, 1998).

Os testículos possuem estrutura dinâmica do nascimento à puberdade e todos os seus componentes sofrem etapas de proliferação e diferenciação antes da puberdade (VILAR, 1970).

A infertilidade é muito freqüente nos pacientes com quaisquer anomalias testiculares. As anomalias testiculares primárias podem ser divididas em dois grupos: anomalias de número, divididas em agenesia (unilateral ou bilateral) e testículo extranumerário e anomalias de posição, divididas em criptorquidia e ectopia (CROMIE, 1978; SCORER; FARRINGTON, 1971).

Os testículos são sítios de inúmeras afecções, entre as quais se destacam: orquite, degeneração, hipoplasia, alterações circulatórias e neoplasias (LADDS, 1993). Qualquer uma dessas afecções age de maneira deletéria no perfil reprodutivo dos animais e, dependendo da alteração e do grau de acometimento, não é possível a identificação macroscópica da lesão, como na hipoplasia testicular (NASCIMENTO; SANTOS, 2003).

A degeneração testicular é a involução do epitélio germinativo e pode ocorrer como consequência de múltiplos fatores (NASCIMENTO; SANTOS, 2003). Consiste

na redução da eficiência do órgão, diminuição ou aumento de consistência dos testículos segundo a intensidade da fibrose, com distúrbio total na espermatogênese (ARTHUR, 1977; DERIVEAUX, 1967;). Segundo Fonseca (1976), as primeiras manifestações da degeneração testicular são: a fertilidade baixa e a elevação de anomalias espermáticas.

A degeneração testicular é a causa mais comum de infertilidade nos machos; caracteriza-se por processos degenerativos e necróticos das espermatogônias, onde ao exame histológico observam-se vacuolização do epitélio seminífero e contorno irregular da membrana basal. Pode acometer os testículos de maneira uni ou bilateral, dependendo se a causa for local ou sistêmica (BLANCHARD et al., 1992; NASCIMENTO; SANTOS, 2003).

A degeneração é classificada, conforme as fases da síndrome, em: hidrópica de consistência macia, atrófica, esclerose dos testículos e calcificação testicular (ACLAND, 1998; GALLOWAY, 1974). A diminuição na consistência do parênquima testicular está associada a uma redução na produção de espermatozóides (COULTER; FOOTE, 1979) e maior número de espermatócitos e espermátides degeneradas em todos os estágios do ciclo da espermatogênese em touros (MULLER; RODRIGUEZ MARTINEZ; BRADEN, 1992).

Em cães, o criptorquidismo é considerado a principal causa de degeneração testicular (JOHNSTON; KUSTRITZ; OLSON, 2001). Criptorquidismo é uma alteração reprodutiva de machos, caracterizada pela ausência do deslocamento de um ou de ambos os testículos da cavidade abdominal para o escroto, permanecendo no tecido subcutâneo da área pré-escrotal, no abdome ou na área do anel inguinal (MEMOM; TIBARY, 2001).

Orquites traumáticas podem evoluir para degeneração testicular com calcificação e fibrose de uma ou ambas as gônadas, resultando em subfertilidade ou esterilidade (HULET; VOIGTLANDER; POPE, 1956). Estresse tem sido correlacionado à degeneração testicular em grandes animais, assim como infecções (YIN; HAWKINS; DEWOLF, 1997). Entretanto, quase sempre há alteração secundária na termorregulação escrotal, o mesmo que ocorre no criptorquidismo (MEMOM; TIBARY, 2001) e é isso que leva, em última análise, à degeneração propriamente dita (NASCIMENTO; SANTOS, 2003).

Desde a primeira metade deste século já se produziam trabalhos visando o conhecimento dos problemas decorrentes ao aumento da temperatura testicular na qualidade de sêmen produzido (GABALDI; WOLF, 2002). O estresse térmico causa efeitos deletérios tanto na espermatogênese como no processo de maturação dos espermatozóides, no epidídimo (MOREIRA; MOURA; ARAUJO, 2001). O aumento da temperatura testicular propicia a degeneração e atrofia testicular (VOGLER; SAACKE; BAME, 1991), está correlacionada com a redução na fertilidade do macho (HULET; VOIGTLANDER; POPE, 1956) e causa alterações na síntese de proteínas e expressão de genes nas células germinativas e células de Sertoli (GUO; TANG; MU, 1999; IKEDA; KODAMA; FUKUDA, 1999; KUMAGAI; FUKUDA; KODAMA, 2000). Tem sido mostrado que a exposição de testículos de ratos e camundongos a temperaturas elevadas causa apoptose em espermátides e espermátócitos (YIN; HAWKINS; DEWOLF, 1999).

A degeneração é causada indiretamente por distúrbios de saúde, principalmente quando acompanhados de febre, toxemia e infecção local com abscessos, que resultam em distúrbios da termorregulação escrotal (SILVA; DODE;

UNANIAN, 1993). Existem, ainda, fatores de origem hereditária, endócrina, nutricionais como avitaminose A, a subnutrição crônica, arsênico, e cádmio, agentes clorados e também fatores próprios do animal, que podem provocar baixa temperatura nos testículos causada por falhas circulatórias. (ARTHUR, 1977; GALLOWAY, 1974;; SILVA; DODE; UNANIAN, 1993).

Com a elevação da temperatura normal dos testículos, a espermatogênese sofre um efeito deletério, podendo ficar completamente reduzida, como é observado em animais criptorquídicos ou em indução experimental (MCENTEE, 1990).

A manutenção térmica da pele escrotal é afetada pela temperatura ambiental, umidade, temperatura corporal, quantidade de calor perdida por radiação do escroto, postura do animal, variação anatômica na forma (escroto com funículo espermático curto, escroto pequeno), grau de obesidade do animal (excesso de gordura no subcutâneo facilita a exposição do cone vascular ao meio ambiente e permite que os testículos fiquem distantes do corpo do animal) (BARTH, 1993; BLANCHARD et al., 1992).

A degeneração do epitélio seminífero pode ser causada rapidamente e, se o processo não for muito longo, a recuperação completa pode ser em um período curto de tempo; alguma melhora será visível por volta de 60 dias após a remoção do agente casual. A regeneração do epitélio germinativo é possível e dependerá da sobrevivência das espermatogônias e das células de Sertoli. Se não for possível a regeneração, pode-se instalar nos testículos uma fibrose ou calcinose (MCENTEE, 1990). A reversibilidade evidencia a resistência do epitélio seminífero a efeitos de fatores ambientais (MOREIRA; MOURA; ARAUJO, 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para a avaliação andrológica utilizou-se 11 cães com idades entre 10 meses e 4 anos, divididos em 4 grupos experimentais: adultos afetados (grupo 1 – AA), adultos normais (grupo 2 – AN), jovens afetados (grupo 3 - JA) e jovens normais (grupo 4 – JN) (Figura 1). Os animais selecionados para este experimento apresentam-se em adequada condição de saúde para os procedimentos experimentais, sem, desta forma, interferir com o bem-estar e higidez dos cães portadores da Distrofia Muscular.

Os cães afetados pela distrofia muscular e um dos cães normais utilizados neste estudo pertencem ao grupo de animais do canil GRMD Brasil, localizado no Departamento de Anatomia e Cirurgia da FMVZ-USP. Os animais são mantidos sob condições adequadas de alimentação, higiene, recreação e sob cuidados veterinários. Os outros 3 (três) cães normais pertencem ao Canil Particular Encrenquinha's, sob manejo geral similar ao anterior.

O grupo dos cães adultos afetados (grupo 1 - AA) era formado por 3 animais com manifestações clínicas da Distrofia Muscular nascidos do acasalamento de fêmea portadora da raça Golden Retriever com macho sadio da raça Labrador, com idades entre 18 meses e 3 anos ao início do experimento (Tabela1). O grupo dos adultos normais (grupo 2 – NA) continha 2 animais da raça Golden Retriever, com 3 e 4 anos de idade ao início do experimento (Tabela 2).

O grupo dos jovens afetados (grupo 3 – JA) continha 4 cães da raça Golden Retriever afetados pela Distrofia Muscular com 12 meses de idade ao início do experimento (Tabela 3) e o grupo dos jovens normais continha 2 cães da raça Golden Retriever com 10 e 11 meses (grupo 4 – JN) (Tabela 4).

Para avaliação histológica utilizou-se testículos e seus respectivos funículos espermáticos de 6 animais que vieram a óbito antes e durante o experimento (Tabela 5).

3.2 AVALIAÇÃO ANDROLÓGICA

Para realização dos exames andrológicos, os animais foram submetidos a avaliações reprodutivas periódicas em intervalos aproximadamente de 2 meses, com sucessivas colheitas e análises do sêmen. Este intervalo entre as colheitas foi instituído objetivando obter avaliações seqüenciais por um período longo, por aproximadamente 18 meses. Ainda, por ser a colheita de sêmen uma situação desgastante para os machos afetados, optou-se por espaçá-la em períodos seguros. Desta forma, foi possível observar se ao longo de 18 meses, houve alteração do quadro espermático.

O exame andrológico incluiu histórico detalhado de cada animal e a obtenção de dados acerca da alimentação, manejo, imunizações, prévios problemas de saúde e tratamentos médicos. Procedeu-se o exame clínico completo, geral e específico dos órgãos reprodutivos, o que incluiu inspeção e palpação dos órgãos reprodutivos, colheita e avaliação do sêmen.

3.2.1 Avaliação Seminal

O sêmen foi colhido por manipulação digital do pênis, com a presença de fêmea no cio. Para análise do sêmen, somente a segunda fração (fração espermática) do ejaculado foi colhida em um funil de vidro, acoplado a um tubo de vidro graduado, inserido em uma mamadeira plástica com água a 37° C. Após a colheita, o material foi mantido em banho-maria (37° C) para avaliação do volume e coloração. Uma gota do ejaculado foi depositada sobre lâmina de vidro pré-aquecida e levada ao microscópio óptico, em aumento de 100 e 400 x, para avaliação de motilidade retilínea progressiva (0 a 100%) e velocidade progressiva ou vigor (0 a 5) (SEAGER; PLATZ1977). A análise da concentração foi realizada em câmara de Neubauer na diluição 1:200, e a contagem em microscópio óptico comum, com aumento de 400 x.

A morfologia espermática foi analisada mediante duas técnicas: por preparação em câmara úmida com formol salino e por esfregaços de sêmen corados em corante comercial específico para sêmen (SPERMAC®). Realizou-se, ainda, esfregaços corados em Eosina-nigrosina (Coloração Vital), para contagem de espermatozóides vivos e mortos.

Para realização da técnica em câmara úmida (formol salino) diluiu-se o sêmen em formol salino na proporção de 1:2. Uma gota dessa solução foi depositada em lâmina para microscopia coberta com lamínula e vedada com esmalte. A morfologia foi observada em microscópio de contraste de fase, em aumento de 1000 X, para contagem total de 100 células em cada lâmina. Os defeitos espermáticos foram avaliados segundo a classificação proposta por Blom (1973).

As lâminas dos esfregaços de sêmen foram obtidas depositando uma gota do sêmen sobre uma lâmina pré-aquecida, realizado o esfregaço e subsequentemente corado com o corante SPERMAC[®]. A morfologia foi observada em microscópio de contraste de fase em objetiva de imersão (aumento de 1000X) e também contados 100 espermatozóides.

Para realização da técnica de Coloração Vital, uma gota do sêmen, do corante eosina e duas gotas do corante nigrosina foram depositadas sobre uma lâmina pré-aquecida, homogenizadas e realizado o esfregaço, também analisado em objetiva de imersão (1000X), onde contou-se 100 espermatozóides.

No grupo de cães jovens afetados, as tentativas de colheitas de sêmen iniciaram-se a partir de 11 meses de idade.

3.2.2 Teste de fertilidade *in vivo*

Foram realizados os testes de fertilidade *in vivo* de dois cães afetados pela Distrofia Muscular (AA 2 e AA 3) por meio da inseminação artificial com sêmen à fresco e acasalamento por monta natural de fêmeas portadoras da doença.

Primeiramente utilizou-se o macho AA 3 e o manejo de acasalamento foi definido somente com o acompanhamento de ciclo estral de duas fêmeas, mediante citologia vaginal, sendo uma inseminada e outra permitida a monta natural, por 3 vezes em dias intercalados.

Em outro momento utilizou-se o macho AA 2 e AA 3 e o manejo de acasalamento foi realizado de acordo com orientação recebida por Bogan (2006)

(informação verbal)¹ do canil GRMD da Universidade do Missouri. Realizou-se além da citologia vaginal, a dosagem de progesterona e foram realizadas 5 inseminações, em dias intercalados.

3.2.3 Ultra-sonografia

Os exames ultra-sonográficos foram realizados com aparelho de ultra-sonografia dinâmico, bidimensional, modelo HDI 5000 Sono-CT, marca ATL (Phillips ultrasound®), com transdutor eletrônico linear, multifrequencial, com frequências variando de 7,0 a 12,0 MHz.

Para a avaliação da próstata e testículos, os cães foram submetidos ao exame ultra-sonográfico por via trans-abdominal na região pré-pubiana, sobre a qual era aplicado o gel para ultra-sonografia. Para tanto, os animais eram posicionados em decúbito dorsal ou lateral. A avaliação das estruturas foi realizada em vários planos de imagem (ENGLAND, 1993).

Nos testículos e epidídimos foram feitos cortes sagitais que possibilitaram a análise morfológica e morfométrica (PUGH, 1996; WEICHSELBAUM et al., 1995). A próstata foi visualizada através da ultra-sonografia trans-abdominal em plano transversal e sagital, e foi considerado somente sua altura (GREEN, 1996; PUGH, 1996). O volume testicular foi calculado utilizando-se a fórmula de esferóide prolato, onde $v = \text{largura} \times \text{altura} \times \text{comprimento} \times 0.52$ (ENGLAND, 1996).

¹ Informação fornecida por Janet Bogan, em 2006, em São Paulo.

3.3 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Para o estudo histológico o material foi coletado logo após a morte dos animais, fixados em solução de formol a 10% e depois desidratados, diafanizados e incluídos em blocos de parafina, segundo técnica convencional. Efetuou-se, então, cortes de 6 μ m de espessura que foram corados pelo método de hematoxilina e eosina (H.E.), tricrômico de masson (TM) (BEHMER et al., 1976).

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para comparar os resultados dos parâmetros seminais dos animais normais e afetados pela distrofia utilizou-se o teste de Mann-Whitney que é um teste não paramétrico que compara duas amostras independentes. O pesquisador observa duas amostras vindas possivelmente de populações diferentes e deseja usar um teste estatístico para verificar se a hipótese nula que as duas populações são iguais pode ser rejeitada.

Para verificar se as variáveis estavam alterando com o tempo, ao longo do experimento utilizou-se o teste Qui-quadrado de Pearson e o teste de Verossimilhanças.

Os softwares estatísticos utilizados foram o MINITAB 14.2 e SAS 9.1.

Em todas as análises foi considerado o nível de 95% de confiança.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4. 1 AVALIAÇÃO CLÍNICA

Os cães afetados pela distrofia muscular utilizados neste experimento apresentaram diversas alterações clínicas relacionadas com a doença, com exceção de um deles, o adulto afetado 3, que à época encontrava-se bem clinicamente.

A atrofia muscular é evidente nos cães acometidos pela Distrofia Muscular, além de macroglossia acompanhada de disfagia, que leva a quadros recorrentes de pneumonia por aspiração.

A incidência de megaesôfago nos cães afetados pela distrofia muscular é grande, bem como a projeção do estômago para a cavidade torácica, secundária à fragilidade diafragmática, levando a quadros de refluxos e gastrite com emese. A medida que os cães distróficos ficam mais velhos, como foi o caso do adulto afetado 1 (AA 1) a chance de apresentarem cardiomiopatia dilatada é grande.

Os cães distróficos utilizados neste experimento, com exceção do adulto afetado 3 (AA 3) apresentam andar rígido, o que muitas vezes leva ao aparecimento de lesões de pele na região inguinal e até mesmo escrotal, pela incapacidade da eficiente função extensora de musculatura pélvica.

4. 2 AVALIAÇÃO ANDROLÓGICA E SEMINAL

As avaliações andrológicas realizadas mostraram diversas alterações clínico-reprodutivas nos cães afetados pela distrofia muscular quando comparados aos cães normais. No grupo dos animais adultos afetados observou-se que o cão AA 1 apresentou alta taxa de anormalidade espermática (teratospermia). A média das 4 colheitas realizadas, na técnica da câmara úmida (formol salino) revelou 16% de defeitos menores, 24,5% de defeitos maiores e 40,5% de defeitos totais e na técnica de esfregaço corado com Spermac[®], a média das anormalidades foi de 9% para os defeitos menores; 20,3% de defeitos maiores e 29,3% de defeitos totais (Tabela 6). Ainda, este cão apresentou 2ml como média do volume dos ejaculados, a média da motilidade espermática em 82,5%, vigor 4, concentração 542,5 milhões de espermatozóides/ml e na coloração vital (Eosina-Nigrosina) apresentou 15,75% de espermatozóides mortos (Tabela 6).

O cão adulto afetado 1 (AA 1) era o mais velho do canil e foi a óbito aos 5 anos de idade por complicações cardíacas relacionadas à distrofia muscular. Apresentou várias outras alterações clínicas decorrentes da doença, como hipertrofia da língua (macroglossia), disfagia com conseqüentes quadros de pneumonia por aspiração recorrentes, além da cardiomiopatia dilatada em grau avançado e também hérnia inguino-escrotal. Foram realizadas somente 4 análises espermáticas deste animal em virtude do aparecimento da hérnia inguino-escrotal e também da evolução da cardiomiopatia, que o levava ao risco de síncope caso fosse submetido ao esforço físico e até mesmo ao encarceramento da hérnia.

O cão adulto afetado 2 (AA 2) também apresentou elevada taxa de anormalidades espermáticas. Na técnica da câmara úmida, obteve-se como média

das colheitas 6,3% de defeitos menores e 33,5% de defeitos maiores, totalizando 39,8% de defeitos totais e na técnica de esfregaço corado com Spermac[®] apresentou como média de defeitos menores 5,7%, defeitos maiores 44,8% e 50,6% de defeitos totais. A volume médio do ejaculado foi de 1,58ml, a média da motilidade espermática 85,6%, vigor 4, concentração 672,5 milhões de espermatozóides/ml. Na coloração vital, observou-se 13,1% de espermatozóides mortos (Tabela 7).

O cão adulto afetado 2 (AA 2) também apresentava alterações clínicas decorrentes da doença, como hipertrofia de língua, disfagia, dificuldade de locomoção, inclusive apresenta luxação da patela direita, além de ter sido imunossuprimido anteriormente com Ciclosporina[®] por 60 dias, porém esta terapia foi suspensa aproximadamente 6 meses antes da primeira colheita de sêmen. Este animal apresentava protusão recorrente da glândula peniana na ausência de ereção, o que poderia estar relacionado com a distrofia muscular envolvendo o músculo retrator do pênis.

O cão adulto afetado 3 (AA 3) não apresentou o grau de anormalidades espermáticas demonstradas pelos demais. Na técnica da câmara úmida obteve-se média de defeitos menores de 4,2%, defeitos maiores 7,6% e defeitos totais 11,8% , enquanto na técnica de esfregaço corado com Spermac[®] apresentou como média de defeitos menores 8,5%, 8,4% de defeitos maiores e 17% de defeitos totais, 92,5% de motilidade, 4,5 de vigor, concentração espermática de 610,6 milhões de espermatozóides/ml e volume médio por ejaculado 1,6ml. Na coloração vital observou-se 8,3% de espermatozóides mortos (Tabela 8). Este animal encontrava-se bem clinicamente, com poucas alterações decorrentes da distrofia muscular e podemos dizer que a qualidade do sêmen deste cão assemelha-se a de um cão adulto normal.

O cão adulto normal 1 (AN 1) apresentou 11,3% de defeitos espermáticos menores, 8% de defeitos maiores e 19,3% de defeitos totais, como média de todas as colheitas utilizando a avaliação por meio da técnica da câmara úmida e 10,8% de defeitos menores, 6,1% de defeitos maiores e 17% de defeitos totais na técnica de esfregaço corado com Spermac[®]. A média da motilidade foi de 92,5%, vigor 4,6, 1089,3 milhões de espermatozóides/ml e volume do ejaculado 1,7ml. Na coloração vital observou-se 7,4% de espermatozóides mortos (Tabela 13).

O cão adulto normal 2 (AN 2) apresentou 8% de defeitos menores, 11% de defeitos espermáticos maiores e 19% de defeitos totais, médias encontradas nas avaliações por meio da técnica da câmara úmida e 6,2% de defeitos menores, 13,7% de defeitos maiores e 17,2% de defeitos totais na técnica de esfregaço corado com Spermac[®]. A média da motilidade foi de 93%, vigor 4,6, concentração espermática média de 660 milhões de espermatozóides/ml e volume do ejaculado 1,7ml. Na coloração vital observou-se média de 4,8% de espermatozóides mortos (Tabela 14). Em uma das colheitas este animal apresentou aspermia, atribuída à baixa libido no momento da colheita em função de ter sido utilizada uma fêmea em cio de pequeno porte, fato este incomum na rotina de acasalamento deste padreador.

Com o jovem afetado 1 (JA 1) foram realizadas 6 tentativas de colheitas de sêmen, porém somente em uma delas o animal ejaculou, nas outras apresentou aspermia (ereção na ausência de ejaculação), portanto os dados experimentais deste cão restringe-se a uma análise seminal: 22% de defeitos menores, 5% de defeitos totais e 27% de defeitos totais avaliados por meio da técnica da câmara úmida, sob contraste de fase (formol salino), 40% de defeitos menores, 2% de defeitos maiores e 42% de defeitos totais nos esfregaços corados com Spermac. O volume do ejaculado foi de 0,3 ml, motilidade de 90%, vigor 4, concentração de 530

milhões de espermatozóides/ml (Tabela 9). Os valores encontrados na análise seminal do cão jovem afetado 1 (JA 1) não foram considerados na comparação com cães normais, pois deste animal conseguiu-se somente uma colheita de sêmen.

Com o jovem afetado 2 (JA 2) também foram realizadas 6 tentativas de colheita de sêmen, porém o animal apresentou repetidamente aspermia, em 2 colheitas chegou a ejacular, porém uma quantidade muito pequena, nem foi possível avaliar, este animal foi a óbito aos 19 meses de idade, devido a complicações relacionadas com a distrofia muscular (Tabela 10).

Vale ressaltar que os jovens afetados 1 e 2 (JA 1 e JA 2) apresentavam muitos sinais clínicos relacionados com a doença, tais como: macroglossia, disfagia, considerável atrofia muscular, severo emagrecimento e alguns episódios de pneumonia por aspiração.

O jovem afetado 3 (JA 3) ejaculou desde a primeira colheita, também aos 11 meses de idade e foram realizadas 3 avaliações seminais deste animal, que apresentou como média 91,6% de motilidade espermática, 4,3 de vigor, 1ml de volume do ejaculado, 1411 milhões de espermatozóides/ml de concentração espermática. A avaliação da morfologia espermática na técnica da câmara úmida revelou 24,3% de defeitos menores, 15,33% de defeitos maiores e 39,66% de defeitos totais e na técnica de esfregaço corado com Spermac[®] 12,66% de defeitos menores, 25,33% de defeitos maiores e 38% de defeitos totais. Na coloração vital observou-se 10% de espermatozóides mortos (Tabela 11).

O jovem afetado 4 (JA 4) também ejaculou nas 3 colheitas e apresentou como média destas avaliações seminais 0,56 ml de volume do ejaculado, motilidade espermática de 86,6%, 4,3 de vigor, 916,6 milhões de espermatozóides/ml de concentração espermática. Na avaliação da morfologia espermática na técnica da

câmara úmida observou-se 28,3% de defeitos menores, 21,3% de defeitos maiores e 49,6% de defeitos totais e na técnica de esfregaço corado com Spermac[®] 7,3% de defeitos menores, 20,3% de defeitos maiores e 27,6% de defeitos totais (Tabela 12).

Vale ressaltar que os jovens afetados 3 e 4 apresentavam-se em ótima condição clínica durante todo o período do experimento.

O jovem normal 1 (JN 1) estava ao início do experimento com 8 meses de idade e desde a primeira tentativa foi possível realizar a colheita sem dificuldades. As médias encontradas nas avaliações de morfologia espermática pela técnica da câmara úmida foram: 11% de defeitos menores, 11% de defeitos maiores e 22% de defeitos totais e na técnica de esfregaço corado com Spermac[®] 9,3% de defeitos menores, 8,6% de defeitos maiores e 18% de defeitos totais. A média do volume do ejaculado foi 1,1ml, da motilidade 93,3%, vigor 4,6, concentração espermática 305 milhões espermatozóides/ml e na coloração vital 20,3% de espermatozóides mortos (Tabela 15).

O jovem normal 2 (JN 2) estava com 8 meses de idade ao início do experimento e também foi possível realizar as colheitas de sêmen sem dificuldades. Apresentou como média das três colheitas: 80% de motilidade, vigor 4, 376,6 milhões espermatozóides/ml de concentração espermática e 1,1ml de volume do ejaculado. Na avaliação da morfologia espermática na técnica da câmara úmida apresentou como média das colheitas 13% de defeitos menores, 11% de defeitos maiores e 24% de defeitos totais e na técnica do esfregaço corado com Spermac[®] apresentou 12,3% de defeitos menores, 16,6% de defeitos maiores e 29% de defeitos totais. Na coloração vital observou-se 11,6% de espermatozóides mortos (Tabela 16).

Com exceção do cão adulto afetado 3, que não apresentava dificuldade para se locomover, os demais cães afetados precisavam ser apoiados no momento da colheita de sêmen, em função da dificuldade em manter o equilíbrio quando apoiados somente nos membros pélvicos.

Dois animais afetados pela distrofia muscular (Afetado 6 e Afetado 7 – Tabela 5) pertencentes ao canil GRMD-Brasil apresentavam criptorquidismo bilateral à primeira avaliação. Porém, o cão afetado 6 foi avaliado aos 6 meses idade e os testículos encontravam-se alojados no escroto e posteriormente aos 10 meses de idade, os testículos haviam se deslocado para o canal inguinal.

Os animais afetados 6, 7 e 9 não foram submetidos à avaliação andrológica porque foram a óbito antes do início deste experimento, o animal afetado 8 era criptorquídico e então não foi utilizado para as avaliações seminais.

No teste de fertilidade *in vivo* conseguiu-se fecundação quando utilizou-se o manejo de acasalamento indicado pela Universidade do Missouri, realizando 5 inseminações em dias intercalados. O cão adulto afetado 3 apresentou prenhez positiva em 2 cadelas, uma com a técnica de inseminação artificial, gerando 9 filhotes e outra com monta natural gerando 12 filhotes. O cão adulto afetado 2 também gerou 07 filhotes em uma única gestação.

Os resultados demonstram que para as variáveis volume do ejaculado, motilidade espermática, vigor, concentração e porcentagem de espermatozóides mortos e defeitos menores não há diferença entre os cães distróficos e os normais. Em relação aos defeitos maiores e defeitos totais, os dados sugerem que os cães distróficos apresentam maior porcentagem do que os cães normais.

A análise do volume do ejaculado demonstra pequena variação do volume do sêmen entre as colheitas e que o volume do ejaculado em cães jovens tende a ser

menor que em cães adultos (Tabelas 19 e 20 e Gráficos 1 e 2). Não foram encontradas diferenças estatísticas no volume do ejaculado entre o grupo de cães afetados e o grupo de cães normais (Teste de Mann-Whitney; $P=0,8093$).

A análise da motilidade (%) mostra que para os cães AN2 e AA1 a variação da motilidade dos espermatozóides foi maior que para os demais cães, sendo que para os cães JA4 e JN3 o desvio padrão foi pequeno e para o cão JN4 não houve variação. A variação da motilidade dos espermatozóides foi menor em cães normais que em cães afetados (Tabela 21 e 22 e Gráficos 3 e 4). Não foram encontradas diferenças estatísticas na motilidade dos espermatozóides entre o grupo de cães afetados e o grupo de cães normais (Teste de Mann-Whitney; $P=0,1209$).

A análise estatística mostra que o vigor (0 a 5) dos espermatozóides variou pouco entre as colheitas (para três cães não houve variação) e entre os indivíduos (Tabelas 23 e 24 e Gráficos 5 e 6). Não foram encontradas diferenças estatísticas no vigor dos espermatozóides entre o grupo de cães afetados e o grupo de cães normais (Teste de Mann-Whitney; $P=0,1209$).

As análises da concentração de espermatozóides variaram sensivelmente entre as colheitas (para três cães não houve variação) e entre os cães (Tabelas 25 e 26 e Gráficos 7 e 8). Porém, não foram encontradas diferenças estatísticas na concentração de espermatozóides do ejaculado entre o grupo de cães afetados e o grupo de cães normais (Teste de Mann-Whitney; $P=0,6294$).

As análises da quantidade de espermatozóides mortos mostram que houve grande variação entre as colheitas e entre os cães. É possível afirmar também que os cães adultos tendem a apresentar menor porcentagem de espermatozóides mortos que cães jovens (Tabelas 27 e 28 e Gráficos 9 e 10). Porém, não foram encontradas diferenças estatísticas na porcentagem de espermatozóides mortos no

ejaculado entre os cães afetados e o grupo de cães normais (Teste de Mann-Whitney; $P=0,1326$). Em virtude da grande variação nas proporções de espermatozóides mortos entre as colheitas, verificou-se significativa variação. Para tanto, foram utilizados dois métodos estatísticos: o teste qui-quadrado de Pearson e o teste da Razão de Verossimilhanças. Ambos os testes demonstraram que para o cão AN2 a hipótese de homogeneidade das proporções de espermatozóides mortos entre as colheitas não foi rejeitada ao nível de 5% de significância. Portanto, conclui-se que não há homogeneidade das porcentagens de espermatozóides mortos entre as colheitas (Tabela 29).

A avaliação da quantidade de defeitos menores (%) foi realizada mediante as técnicas de câmara úmida (Formol Salino) e dos esfregaços corados com Spermac®. Os resultados não demonstram diferenças na porcentagem de defeitos menores nos espermatozóides utilizando a técnica de câmara úmida entre o grupo de cães afetados e o grupo de cães normais (Teste de Mann-Whitney; $P=0,4906$), bem como na técnica de esfregaços corados com Spermac® (Teste de Mann-Whitney; $P=0,3971$) (Tabelas 30 e 31, Gráfico 11 e 12).

Para avaliar ainda a variável de defeitos menores foi realizada uma análise comparativa entre os dois métodos e não foram encontradas diferenças estatísticas (Teste de Mann-Whitney; $P=0,1463$). Em virtude da grande variação das proporções de espermatozóides com defeitos menores entre as colheitas (Tabela 30 e Gráfico 11) decidiu-se verificar se esta variação é significativa. Para tanto, foram utilizados dois métodos estatísticos: o teste qui-quadrado de Pearson e o teste da Razão de Verossimilhanças, ambos com resultados idênticos. Para o método de câmara úmida, ambos os testes rejeitaram a hipótese de homogeneidade das proporções de espermatozóides com defeitos menores entre as colheitas dos cães AA1 e AA2 ao

nível de 5% de significância. Para o método Spermac®, na maioria dos cães foi rejeitada a hipótese de homogeneidade das proporções de espermatozóides com defeitos menores entre as colheitas ao nível de 5% de significância (Tabela 32).

A variável defeitos maiores (%) foi avaliada através de dois métodos: câmara úmida (Formol Salino) e Spermac®. Foi realizada uma análise comparativa entre estes dois métodos e não foram encontradas diferenças estatísticas (Teste de Mann-Whitney; $P=0,5508$). Foram encontradas diferenças estatísticas na porcentagem de defeitos maiores (%) avaliados tanto pela técnica do formol salino bem como pelo Spermac® entre o grupo de cães afetados e o grupo de cães normais (Teste de Mann-Whitney; $P=0,0067$ e $P=0,0015$, respectivamente). O grupo de cães afetados apresentou maior quantidade de espermatozóides com defeitos maiores (Tabelas 33 e 34 e Gráficos 13 e 14).

Foi realizada, ainda, a comparação das proporções de defeitos maiores entre as colheitas em cada cão. Para o método do formol salino, os testes estatísticos rejeitaram a hipótese de homogeneidade das proporções de espermatozóides com defeitos maiores entre as colheitas ao nível de 5% de significância para os cães AA1, AA2, JA3, JA4 e AN1. Para o método Spermac®, foi rejeitada a hipótese de homogeneidade das proporções de espermatozóides com defeitos maiores entre as colheitas ao nível de 5% de significância para AA2, AA3, JA4 e JN4 (Tabela 35). A variável defeitos totais (%) foi avaliada mediante dois métodos: câmara úmida (Formol Salino) e Spermac®. Foi realizada uma análise comparativa entre estes dois métodos e não foram encontradas diferenças estatística (Teste de Mann-Whitney; $P=0,9174$). Observando os dois métodos verificamos que a quantidade de espermatozóides com defeitos totais variou entre as colheitas e entre os cães. Os dados sugerem que os cães afetados pela distrofia muscular apresentam maior

porcentagem de espermatozóides com defeitos totais no ejaculado que cães normais. A variação da quantidade de espermatozóides com defeitos totais é maior para cães afetados pela doença muscular (Tabelas 36 e 37 e Gráficos 15 e 16). Foram encontradas diferenças estatísticas na quantidade de defeitos totais nos espermatozóides utilizando a técnica formol salino e do Spermac® entre o grupo de cães afetados e o grupo de cães normais (Teste de Mann-Whitney; $P=0,045$ e $P=0,0041$, respectivamente). O grupo de cães afetados apresentou maior quantidade de espermatozóides com defeitos totais.

Realizou-se comparação das proporções de defeitos totais entre as colheitas para cada cão. Para o método do formol salino e do Spermac®, os testes estatísticos rejeitaram a hipótese de homogeneidade das proporções de espermatozóides com defeitos totais entre as colheitas ao nível de 5% de significância para 5 dos 9 cães. Observou-se, desta maneira, que não há homogeneidade das proporções de espermatozóides com defeitos menores entre as colheitas (Tabela 38).

Os resultados desta pesquisa demonstraram que as porcentagens de defeitos espermáticos maiores e totais nos cães distróficos são maiores que os cães normais. Vale ressaltar que o animal afetado 3 apresentou adequada qualidade seminal, diferente dos demais afetados e que clinicamente também encontra-se praticamente sem sinais da distrofia muscular.

4.3 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

O estudo histológico dos testículos dos cães afetados pela distrofia muscular que vieram a óbito (Tabela 5) mostrou cortes de tecido com comprometimento variável de arquitetura testicular, caracterizada pela retração de túbulos seminíferos em formatos variáveis, com eventual aspecto de meia lua. Identificou-se incremento intersticial, múltiplos espaços lacunares, tortuosos, delimitados por células fusiformes sem estratificação, particularmente em territórios peritubulares. Observou-se baixa celularidade intertubular, ausência de conteúdo luminal e eventuais agregados de células de Leydig (Figura 3).

Nos túbulos seminíferos observou-se ocasional espermatogênese, com presença de componentes de linhagem germinativa, células mióides e células de Sertoli. Ainda, eventuais túbulos hipocelulares com comprometimento de estratificação local e azoospermia albergando células gigantes multinucleadas (gigantócitos) e debris celulares (Figura 3).

No músculo cremáster dos cães afetados pela distrofia muscular, evidenciou-se fragmentação e retração de fibras musculares com hialinização de miócitos. Esta alteração era menos freqüente nos animais mais jovens e intensa no animal que foi a óbito já aos 5 anos de idade (Figura 2).

4.4 AVALIAÇÃO ULTRA-SONOGRÁFICA

As análises estatísticas dos valores das mensurações da altura prostática, cabeça, corpo e cauda do epidídimo e volume testiculares dos cães normais e dos cães afetados pela distrofia muscular não demonstraram diferença estatisticamente significativa (Tabela 17). Não foram observadas alterações de ecogenicidade no parênquima testicular e prostático em nenhum dos cães estudados.

5 DISCUSSÃO

Atualmente existem no mundo 4 canis experimentais com cães GRMD, todos buscando uma alternativa terapêutica para a distrofia muscular. Os cães distróficos exigem um manejo cuidadoso e específico, entretanto, poucos são os trabalhos desenvolvidos com o objetivo de se padronizar os cuidados com os animais afetados por esta condição. O manejo reprodutivo é um quesito fundamental para qualquer criação e merece atenção redobrada quando se trata de modelos experimentais.

De acordo com Christiansen (1988), para que se faça a avaliação da eficiência reprodutiva de um macho é necessário a realização do completo exame andrológico, bem como o exame ultra-sonográfico dos testículos, epidídimos e próstata (ENGLAND, 1996). Os resultados desta pesquisa demonstraram que diversas alterações clínico-reprodutivas podem influenciar negativamente a capacidade reprodutiva de um cão afetado pela distrofia muscular, dentre elas podemos destacar: criptorquidismo, alta porcentagem de defeitos espermáticos maiores e totais na avaliação da morfologia espermática e degeneração testicular.

Segundo Johnston (2003), o criptorquidismo é considerado a principal causa de degeneração testicular em cães e nesta pesquisa, 2 dos 15 machos avaliados apresentaram esta disfunção, fato este também observado em proporção relativamente alta nos cães da colônia da Universidade do Missouri (BOGAN, 2006) (informação verbal)². Particularmente, um dos cães do presente estudo apresentou os testículos em posição escrotal à primeira avaliação reprodutiva, porém, posteriormente observou-se criptorquidismo bilateral abdominal.

² Informação verbal fornecida por Janet Bogan, em 2006, em São Paulo.

O músculo cremáster é um dos componentes de musculatura esquelética do funículo espermático e juntamente com a túnica dartus participa do processo de termorregulação testicular (BLANCHARD et al., 1992). As análises histológicas do músculo cremáster revelaram modificações, tais como retração de fibras musculares e hialinização de miócitos. Tais alterações poderiam influenciar a capacidade de relaxar e contrair do músculo cremáster, comprometendo sua função no papel da termorregulação testicular. Ainda, a degeneração do músculo cremáster nos cães distróficos poderia também estar relacionada como o movimento ectópico dos testículos à cavidade abdominal.

Os testículos apresentam como funções a síntese de hormônios e a espermatogênese e estas funções exigem a manutenção da temperatura testicular entre 2 a 6 graus abaixo da temperatura corporal (MCENTEE, 1990). O estresse térmico causa efeitos deletérios tanto na espermatogênese como no processo de maturação dos espermatozóides no epidídimo (MOREIRA et al., 2006). Sendo assim, poderíamos relacionar o alto número de patologias espermáticas, principalmente defeitos maiores e totais, encontrado nos cães distróficos com a significativa degeneração do músculo cremáster.

Segundo Vogler et al. (1996), o aumento de temperatura testicular propicia degeneração e atrofia testicular, embora esta seja uma condição patológica multifatorial, com envolvimento indireto de outros distúrbios, tais como quadros febris e toxêmicos; fatores endócrinos e nutricionais, como a subnutrição (SILVA et al., 1993) e também o estresse (YIN et al., 1997). Os cães distróficos apresentam um distúrbio metabólico importante decorrente da doença e apresentam condição corporal inferior aos cães normais. Muitos cães afetados apresentam megaesôfago e projeção do estômago para a cavidade torácica, decorrente de fragilidade

diafragmática o que os leva a quadros recorrentes de refluxo e gastrite crônica. Tal alteração pode comprometer a absorção de nutrientes, pois alguns animais, em fase adiantada da doença apresentam anemia. Todas estas intercorrências poderiam também levar a distúrbios reprodutivos e até mesmo estar contribuindo para a degeneração testicular.

Bogan, 2006 (informação verbal)³ relatou que os cães da colônia da Universidade do Missouri também apresentam alta porcentagem de defeitos espermáticos, atribuída em parte às escoriações escrotales decorrentes do constante trauma local em função da alteração da marcha decorrente da rigidez de membros pélvicos. O processo inflamatório local é o responsável por aumento de temperatura escrotal e contribui a acentuar o processo degenerativo dos testículos. Vale ressaltar que algumas vezes foram observadas lesões semelhantes nos cães deste estudo.

A degeneração testicular, segundo Blanchard et al. (1992), é a causa mais comum de infertilidade em machos e caracteriza-se por processos degenerativos e necróticos das espermatogônias. Ao exame histológico observam-se vacuolização do epitélio seminífero e contorno irregular da membrana basal, descrição histológica semelhante a encontrada nas avaliações dos cães distróficos.

Outro transtorno clínico reprodutivo encontrado no cão adulto afetado 1 (AA 1) foi a hérnia inguino-escrotal que poderia estar relacionada a uma fragilidade muscular na região inguinal. Já a exposição peniana recorrente do prepúcio observada no cão adulto afetado 2 (AA 2) pode estar relacionada ao comprometimento da função do músculo retrator do pênis, decorrente de um processo degenerativo da distrofia muscular.

³ Informação fornecida por Janet Bogan, em 2006, em São Paulo.

Os animais jovens afetados 1 e 2 apresentaram aspermia na maioria das tentativas das colheitas, porém na presença de libido e ereção. Estes animais apresentavam quadro bastante evoluído da doença, com comprometimento evidente da musculatura. Sabe-se que para o processo ejaculatório há um grande envolvimento muscular e, portanto, a aspermia poderia estar relacionada também à distrofia muscular.

As análises estatísticas realizadas no presente trabalho mostraram extrema variação de alguns parâmetros seminais entre os distintos momentos de colheita, como a porcentagem de espermatozóides mortos e os defeitos espermáticos: menores, maiores e totais. Para se predizer o potencial fecundante de um reprodutor, Christiansen (1988) recomenda que sejam feitas várias colheitas, pois uma amostra isolada pode gerar conclusões irreais, especialmente se o cão for recentemente utilizado para reprodução. Não é recomendado estabelecer um prognóstico baseado em somente um espermiograma, porém considera-se reservado se após 3 meses não houver melhora, desfavorável se houver decorrido 6 meses e se há 12 meses não houver melhora, o prognóstico é considerado irreversível (OETTLE; SOLEY, 1988).

A variação entre colheitas pode ser explicada pelo manejo reprodutivo a que os cães estavam submetidos. Os animais normais utilizados no experimento eram padreadores em um canil particular e para o macho AN 1 do canil GRMD, a análise seminal foi realizada algumas vezes próxima ao um determinado período de acasalamento. Já os machos afetados muitas vezes apresentaram alteração no quadro espermático quando sobrevivia alguma complicação da própria doença, como por exemplo pneumonia por aspiração.

Diante dos resultados encontrados no presente estudo, pode-se afirmar que mais pesquisas são necessárias para melhor elucidar a influência da distrofia muscular na subfertilidade destes animais, especialmente de grupos musculares envolvidos diretamente nos processos espermáticos e ejaculatórios, pois vários fatores podem influenciar a aptidão reprodutiva de um animal.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Com base nos dados obtidos neste estudo pode-se concluir que:

1) Os cães afetados pela distrofia muscular avaliados neste experimento apresentaram importantes alterações clínico-reprodutivas, tais como: criptorquidismo; hérnia inguino-escrotal; exposição constante de glândula peniana na ausência de ereção; aspermia.

2) Os cães afetados pela distrofia muscular apresentaram maior taxa de anormalidade espermática (defeitos maiores e totais), degeneração testicular e fibrose, hialinização e retração de fibras musculares do músculo cremaster.

3) A distrofia muscular em cães da raça Golden Retriever pode comprometer sua aptidão reprodutiva, porém sem alterar de forma significativa seu potencial fecundante.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABDIM: Associação Brasileira de Distrofia Muscular. *Doenças Neuromusculares*. Disponível em: <<http://www.abdim.org.br/neuro.htm>> Acesso em: 28 jul. 2004.

ACLAND, H. M. Sistema reprodutor do macho. In: CARLTON, W. W.; MCGAVIN, M. D. **Patologia veterinária especial de Thomsom**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 1998. p. 573-589.

ARTHUR, G. H. **Veterinary reproduction and obstetrics**. 4. ed. London, Bailliere & Tindal, 1977, 616 p.

BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992. p. 546-563.

BARTH, A.D. Insights to the pathogenesis of sperm abnormalities in bulls. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.1, n.4, p. 1-11, 1993.

BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C.; FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: EDART/EDUSP, 1976. v.1.

BERGMAN, R. L.; INZANA, K. D.; MONROE, W. E.; SHELL, L. G.; LIU, L. A.; ENGVALL, E.; SHELTON, G. D.. Dystrophin-deficient muscular dystrophy in a Labrador retriever. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 38, n. 3, p. 255-261, 2002.

BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D.; BRETZLAFF, K. N.; ELMORE, R. G. The causes and pathologic changes of testicular degeneration in large animals. **Veterinary Medicine**, v. 6, p. 531-536, 1992.

BLOM, E. Interpretation of spermatocytology in bulls. **Fertility and Sterility**, v. 1, n. 3, p. 223-235, 1950.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of bull spermogram. **Nordisk Veterinärmedicin**, v. 25, n. 77/8, p.383-91, 1973.

CHRISTIANSEN, I. J. Andrologia do macho normal. In:_____. **Reprodução no cão e gato**, São Paulo: Editora Manole, 1988, cap. 4, p. 93-126.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. p. 7.

COLLINS, C. A.; MORGAN, J. E. Duchenne's muscular dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 84, p.165-172, 2004.

COULTER, G. H., FOOTE, R. H. Bovine testicular measurements as indicators of reproductive performance and their relationship to productive traits in cattle: a review. **Theriogenology**, v. 11, p. 297-310, 1979.

CROMIE W. J. Congenital anomalies of the testis, vas epididymis and inguinal canal. **The Urologic Clinics of North America**, v. 5, p. 237-252, 1978.

DERIVEAUX, J. **Fisiopatologia de la reproduction y insemination artificial de los animales domesticos**. Zaragoza: Acriba, 1967. 416 p.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de anatomia veterinária**. 3. ed. São Paulo: Elsevier, 2004. p 434-442.

ELLENPORT, C. R. Aparelho urogenital do carnívoro. In: SISSON; GROSSMAN. **Anatomia dos animais domésticos**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1975. 2 v. p. 1485-1486.

ENGLAND, G. C. W. Reproductive biology in the male dog, **The Veterinary Annual**, 36. ed., 1996, p. 187-201.

ENGLAND, G. C. W.; ALLEN, W. E.; MIDDLETON; D. J. An investigation into the origin of the first fraction of the canine ejaculates. **Research in Veterinary Science**, v. 49, p. 66-70, 1990.

ESCOBAR, C. J. Inseminación artificial en caninos. In: Gobello, C. **Temas de reproducción de caninos y felinos por autores latinoamericanos**. Compilação. Buenos Aires, 203-216, 2004.

EVANS, H. E.; CHRISTENSEN, G. C. The urogenital system. In: EVANS, H. E. **Miller's anatomy of the dog**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1993. cap. 9, p. 494-558.

FAWCETT, D. Túbulos seminíferos. Sistema Reprodutor masculino. In: BLOOM, W.; FAWCETT, D. W. **Tratado de histología**. Interamericana. México. 804-809. 1994.

FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. Philadelphia: W.B. Saunders. 1996, p.718-719, 734-737.

FONSECA, V.O. **Efeito da elevação térmica experimental sobre a espermatogênese no zebu; aspectos físicos e morfológicos do sêmen, anátomo-patológicos do testículo e epidídimo e alguns processos endócrinos relacionados à afecção**. 1976. 148 p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal)- Universidade Federal de Minas Gerais, 1976. 148p.

FOUCAULT, P.; DROSDOWKY, M.; CARREAU, S. Germ cell and Sertoli cell interactions in human testis: evidence for stimulatory and inhibitory effects. **Human Reproduction**, v. 9, p. 2062-2068, 1994.

FRESHMAN, J. L. Semen collection and evaluation. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v.17, n. 3, p. 104-7, 2002.

GABALDI, S. H.; WOLF, A. Importance of Testicular Thermoregulation In Bull Seminal Quality. **Ciências Agrária e da Saúde**. FEA, Andradina, v. 2, n. 2, jul-dez, 2002, p. 66-70.

GALLOWAY, D. B. Introductory review; factors affecting fertility. In: **Bulls**. Course held at the University of Queensland Veterinary School, 18-22 February, 1974. p. 2-23.

GRANDO, A. P. **Ultra-sonografia abdominal e pélvica em cães da raça Golden Retriever sadios, portadores e afetados pela distrofia muscular progressiva**. 2005. 121 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

GREEN, R. W.; HOMCO, L. D. Prostate gland In: GREEN, R. W. **Small animal ultrasound**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1996. cap. 13, p. 237-250.

GUIDO, M.C. Ultra-sonografia do aparelho reprodutor masculino. In: CARVALHO, C. F. **Ultra-sonografia em pequenos animais**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2004. p. 213-219.

GUO, C. X.; TANG, T. S.; MU, X. M. Cloning of novel temperature-related expressed sequence tags in rat testis during spermatogenesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 258: p. 401-406. 1999.

HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 6.ed. São Paulo: Editora Manole, 1995: p.411-430.

HOWELL, J.M.; FLETCHER, S.; KAKULAS, B. A.; O'HARA, M.; LOCHMULLER, H.; KARPATI, G. (1997). Use of the dog model for Duchenne muscular dystrophy in gene therapy trials. **Neuromuscular Disorders**. v.7, n.5, p.325-328, 1997.

HULET, C. V.; VOIGTLANDER H. P.; POPE, A. L. The nature of early season infertility in sheep. **Journal of Animal Science**. v. 5, p. 607-615, 1956.

IKEDA M.; KODAMA H.; FUKUDA J.; SHIMIZU Y.; MURATA M.; KUMAGAI J.; TANAKA T. Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. **Biology of Reproduction**, v.61, p. 393-399, 1999.

JOHNSON, C. A. Distúrbios de fertilidade masculina. In: NELSON, R. W. **Medicina interna de pequenos animais**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994, cap. 59, p. 502-512.

JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V. R.; OLSON, P. N. S. **Canine and feline theriogenology**. 1. ed. Pennsylvania: Ray Kersey, 2001, p. 287-306.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, L. **Histologia básica**, 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. p. 356.

KUMAGAI J.; FUKUDA J.; KODAMA H.; MURATA M.; KAWAMURA K.; ITOH H.; TANAKA T. Germ cell-specific shock protein 105 binds to p53 in a temperature-sensitive manner in rat testis. **European Journal Biochemistry**, v. 267 p. 3073-3078, 2000.

LOPES, M. D. Assisted reproductive techniques in small animals. **Revista de Educação Continuada CRMV-SP/ Continuous education journal CRMV-SP** São Paulo, v. 4, n.1, p. 33-39, 2001.

MCENTEE, K. **Reproduction pathology of domestic mammals**. 1. ed., California: Academic Press, 1990. p. 224-270.

MCKERRELL, R.E. Miopatias caninas e felinas. In: DUNN, J.K. **Tratado de medicina de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2001. p. 690-713.

MEMOM, M.; TIBARY, A. Canine and feline cryptorchidism. In: CONCANNON, P. W.; ENGLAND, G.; VERSTEGEN, III J.; LINDE-FORSBERG, C., **Recent Advances in Small Animal Reproduction**. Disponível em:<(www.ivis.org)>. Acesso em: 07 ago 2006.

MIALOT, J. P. **Patologia da reprodução dos carnívoros domésticos**. Porto Alegre: Editora A Hora veterinária. 1988. p. 61.

MOREIRA, E. P.; MOURA, A. A. A.; ARAUJO, A. A. Effects of Scrotal Insulation on Testis Size and Semen Criteria in Santa Inês Hair Sheep Raised in the State of Ceará, Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 6, p. 1704-1711, 2001.

MULLER, E.; RODRIGUEZ MARTINEZ, H.; BRADEN, S.; EDQVIST, L. E. Testicular ultrastructure of Zebu bulls in Costa Rica. **Zentralbl Veterinarmed** , v. 39, p. 382-391, 1992.

MURASHIMA JUNIOR, J. C. **Mensuração da próstata por ultra-sonografia e sua associação com a massa corpórea de cães adultos e clinicamente sadios**. 2001. 50f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2001.

NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. **Patologia da reprodução dos animais domésticos**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 137 p.

NGUYEN, F.; CHEREL, Y; GUIGAND, L.; GOUBAULT, L.I.; WYERS, M. (2002). Muscle lesions associated with dystrophin deficiency in neonatal golden retriever puppies. **Journal of Comparative Pathology**, v. 126, n. 2-3, p. 100-108, 2002.

NICHOLS, P.L.; LYMN, R.W.; DRISCOLL, P.P.; CLEARFIELD, C. (1994). Gene therapy in duchenne muscular dystrophy **NIH Guide**. v.23, n.7, Feb., 1994.

NICKEL, R.; SCHUMMER, A.; SEIFERLE, E.; SACK, W. O. **The viscera of the domestic mammals**. Berlin: Verlag Paul Parey, 1979. p. 324-328.

OETTLE, E. E.; SOLEY, J. T. Anomalias de los espermatozoides en el perro: estudio de imagines obtenidas en el microscópio óptico y electrónico. **Noticias médico-veterinarias**, v. 59, n. 1, p. 28-70, 1988.

POULET, F. Evolution de la prostate canine en fonction de l'age. **Annales de Médecine. Vétérinaire**, v.129, p. 577-584, 1985.

PUGH, C. R. Testes. In: GREEN, R. W. **Small animal ultrasound**. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1996. cap. 14, p. 251-263.

ROOT, M. V.; JOHNSTON, S. D. Basics for a complete reproductive examination of the male dog. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)**, v. 9, n.1, p. 41-45, 1994.

SAMIEI, H. V. Genetic surgery for muscular dystrophy in golden retrievers. **Genome News Network**, June, 2000. Disponível em:
<http://www.genomenewsnetwork.org/articles/06_00/muscular_dystrophy.shtml>
Acesso em 12 set 2004.

SCHATZBERG, S.J.; SHELTON, D.G. Newly identified neuromuscular disorders. **The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 34, p. 1497-1524, 2004.

SCHWARZE, E. **Compendio de anatomia veterinaria**. 6. ed. Zaragoza: Acribia, 1970. v. 2. p. 249-263.

SCORER, C.G., FARRINGTON, G.H.: Development and descent of the testis. In: **Congenital Deformities of the Testis and Epididymis**. NewYork: Appleton-Century-Crofts, p 6-27, 1971.

SEAGER, S.W.J.; PLATZ, C.C., Collection and Evaluation of canine semen. **Veterinary Clinics of North America**, v.7, n.4, p. 765-73. 1977.

SHELTON, G. D. Neuromuscular disorders. In: BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Saunders manual of small animal practice**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1994. p. 1173.

SHIMATSU, Y.; KATAGIRI, K.; FURUTA, T.; NAKURA, M.; TANIOKA, Y.; YUASA K.; TOMOHIRO, M.; KORNEGAY, J.N.; NONAKA, I.; TAKEDA, S. Canine x-linked muscular dystrophy in japan (CXMDJ). **Experimental Animals**, v. 52, n. 2, p. 93-97, 2003.

SILVA, A. E. D. F.; DODE, M. A. N.; UNANIAN, M. M. Capacidade reprodutiva do touro de corte: funções, anormalidades e outros fatores que influenciam. **Embrapa Gado de Corte**, 1993.

SILVA, L. D. M.; SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C. S. Inseminação Artificial em cães. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIQUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Editora Varela, 2002. p. 70-73.

STOCKNER, P. K. The relationship of semen parameters to fertility in the dog. **Canine practice** v. 16, n. 2, p. 15-23, 1991.

THIBAUT, C.; LAVASSEUR, M. L. **La reproduction chez les mammifères et l'homme**. Paris: INRA-Ellipses, p. 768, 1991.

VANNUCCHI, C. I.; SATZINGER, S.; SANTOS, S. E. C. Avaliação seminal em cães. **Clínica Veterinária**, v. 3, n.15, p. 22-26, 1998.

VILAR O. Histology of the human testis from neonatal period to adolescence. **Advances in Experimental Medicine Biology**, v. 10, p. 95-111, 1970.

VOGLER, C. J., SAACKE, R. G., BAME, J. H. Effects of scrotal insulation on viability characteristics of cryopreserved bovine semen. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 3827-3835, 1991.

WEICHSELBAUM, R. C.; JOHNSTON, G. R.; FEENEY, D. A.; WALTER, P. A. Imaging the reproductive tract in the male dog. In: BONAGURA, J. D. **Kirk's current veterinary therapy XII ed. small animal practice**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1995. p.1052-1060.

YIN, Y. Z., HAWKINS, K. L., DEWOLF, W. C. Heat stress causes testicular germ cell apoptosis in adult mice. **Journal of Andrology**, v. 18, p. 159-165, 1997.

ZATZ, M. Células-tronco. Disponível em:
<<http://www.drauziovarella.com.br/entrevistas/celulastronco.asp>> Acesso em: 28 de julho de 2004.

APÊNDICE A – Figuras

Figura 1 – Fotografia dos cães dos diferentes grupos experimentais, mostrando:

- A – Adulto afetado pela distrofia muscular
- B – Adulto normal
- C – Jovem afetado pela distrofia muscular
- D – Jovem normal

Figura 2. Alterações histopatológicas identificadas no músculo cremáster de cães distróficos.

(A) Cão com 10 meses de idade. Variações no diâmetro (*) e hialinização (seta) de fibras musculares (TM). Bar: 12,5µm.

(B) Cão com 10 meses de idade. Fibras musculares hialinizadas (*) e discreta fibrose (seta) (TM). Bar: 1,25 µm.

(C) Cão com 5 anos de idade. Fibras musculares hialinizadas (seta), variações no diâmetro (*) e fibrose acentuada (cabeça da seta) (HE). Bar: 50µm.

(D) Músculo cremáster no corte longitudinal sem alterações. (HE). Bar: 6,25µm.

Figura 3. Alterações histopatológicas identificadas no testículo de cães distróficos.

(A) Desarranjo na arquitetura dos túbulos seminíferos (*) (HE). Bar: 50 μ m.

(B) Degeneração de células da linhagem espermática (*) e presença de gigantócitos (seta) (HE). Bar: 6,25 μ m.

(C) Degeneração de células da linhagem espermática (seta) e presença de gigantócitos (*) (HE). Bar: 1,25 μ m.

(D) Túbulo seminífero com intensa degeneração celular (seta) e com a presença de edema intersticial (*) (HE). Bar: 1,25 μ m.

APÊNDICE B - Tabelas

Tabela 1 – Grupo 1 adultos afetados (AA) pela distrofia muscular. São Paulo, 2004, 2006

Animal	Nascimento
AA 1	26/12/2001
AA 2	12/06/2003
AA 3	12/06/2003

Tabela 2 – Grupo 2 adultos normais. São Paulo, 2004, 2006

Animal	Nascimento
AN 1	*
AN 2	06/06/2001

*aproximadamente 3 anos de idade no início do experimento (idade exata desconhecida)

Tabela 3 – Grupo 3 jovens afetados (JA) pela distrofia muscular. São Paulo, 2004-2006

Animal	Nascimento
JA 1	23/07/2004
JA 2	23/07/2004
JÁ 3	14/02/2005
JA 4	14/02/2005

Tabela 4 – Grupo 4 jovens normais (JN). São Paulo, 2004-2006

Animal	Nascimento
JN 1	25/09/2004
JN 2	21/08/2004

Tabela 5 – Animais afetados pela distrofia muscular que vieram a óbito, material utilizado para histologia, São Paulo, 2004-2006

Animal	Nascimento	Óbito
Afetado 6	20/11/2003	26/12/2004
Afetado 7	15/07/2003	16/03/2004
Afetado 8	23/07/2004	09/04/2005
Afetado 9	13/06/2003	17/04/2004
AA 1	26/12/2001	
JA 2	23/07/2004	14/02/2006

Tabela 6 – Cão Adulto Afetado 1 (AA 1) segundo as características seminais e estatísticas, São Paulo, 2004 – 2005

Colheita	Volume (ml)	Motilidade (%)	Vigor (0-5)	Concentração X10 ⁶ /ml	Espermatozóides Mortos (%)	Morfologia espermática					
						Formol salino			Spermac®		
						Defeitos Menores (%)	Defeitos Maiores (%)	Defeitos Totais (%)	Defeitos Menores (%)	Defeitos Maiores (%)	Defeitos Totais (%)
1 ^a	2	90	4	715	25	9	9	18	14	18	32
2 ^a	1	75	4	155	23	14	37	51	6	26	32
3 ^a	2,5	75	4	450	6	18	27	45	*	*	*
4 ^a	2,5	90	4	850	9	23	25	48	7	17	24
Média	2	82,5	4	542,5	15,75	16	24,5	40,5	9	20,3	29,3

* Impossível a avaliação. A lâmina não corou.

Tabela 7 – Cão Adulto Afetado 2 (AA 2) segundo as características seminais e estatísticas, São Paulo, 2004 – 2005

Colheita	Volume (ml)	Motilidade (%)	Vigor (0-5)	Concentração X10 ⁶ /ml	Espermatozóides Mortos (%)	Morfologia espermática					
						Formol salino			Spermac®		
						Defeitos Menores (%)	Defeitos Maiores (%)	Defeitos Totais (%)	Defeitos Menores (%)	Defeitos Maiores (%)	Defeitos Totais (%)
1 ^a	1,5	95	4	630	13	9	25	34	8	53	61
2 ^a	1,5	80	4	305	9	1	31	32	4	35	39
3 ^a	2	80	4	725	11	2	29	31	12	74	86
4 ^a	1,5	90	4	725	14	9	43	52	6	32	38
5 ^a	2,5	90	4	965	27	5	33	38	3	75	78
6 ^a	0,5	80	4	330	10	6	20	26	9	28	37
7 ^a	1,5	80	4	990	15	16	50	66	2	27	29
8 ^a	1,5	90	4	710	6	3	37	40	2	35	37
Média	1,5	85,6	4	672,5	13,1	6,3	33,5	39,8	5,7	44,8	50,6

Tabela 8 – Cão Adulto Afetado 3 (AA 3) segundo as características seminais e estatísticas, São Paulo, 2004 – 2005

Colheita	Volume (ml)	Motilidade (%)	Vigor (0-5)	Concentração X10 ⁶ /ml	Espermatozóides Mortos (%)	Morfologia espermática					
						Formol salino			Spermac®		
						Defeitos Menores (%)	Defeitos Maiores (%)	Defeitos Totais (%)	Defeitos Menores (%)	Defeitos Maiores (%)	Defeitos Totais (%)
1 ^a	1,5	95	5	590	14	7	11	18	8	13	21
2 ^a	0,5	95	5	440	2	5	8	13	*	*	*
3 ^a	2	85	4	155	2	4	7	11	11	15	26
4 ^a	1,8	95	5	620	3	5	6	11	7	7	14
5 ^a	2,2	95	5	765	11	5	8	13	11	11	22
6 ^a	2	95	4	1250	15	2	9	11	7	3	10
7 ^a	2	85	3	505	14	4	2	6	11	6	17
8 ^a	1	95	5	560	6	2	10	12	5	4	9
Média	1,6	92,5	4,5	610,6	8,3	4,2	7,6	11,8	8,5	8,4	17

* Impossível a avaliação. A lâmina não corou.

Tabela 9 – Cão Jovem Afetado 1 (JA 1) segundo as características seminais e estatísticas, São Paulo, 2005 - 2006

Colheita	Volume (ml)	Motilidade (%)	Vigor (0-5)	Concentração X10 ⁶ /ml	Espermatozóides Mortos (%)	Morfologia espermática					
						Formol salino			Spermac®		
						Defeitos Menores (%)	Defeitos Maiores (%)	Defeitos Totais (%)	Defeitos Menores (%)	Defeitos Maiores (%)	Defeitos Totais (%)
1 ^a	*										
2 ^a	*										
3 ^a	*										
4 ^a	*										
5 ^a	0,3	90	4	530	10	22	5	27	40	2	42
6 ^a	*										
Média	0,3	90	4	530	10	22	5	27	40	2	42

* aspermia

Tabela 10 – Cão Jovem Afetado 2 (JA 2) segundo as características seminais e estatísticas, São Paulo, 2005 - 2006

Colheita	Volume (ml)	Motilidade (%)	Vigor (0-5)	Concentração X10 ⁶ /ml	Espermatozóides Mortos (%)	Morfologia espermática					
						Formol salino			Spermac®		
						Defeitos Menores (%)	Defeitos Maiores (%)	Defeitos Totais (%)	Defeitos Menores (%)	Defeitos Maiores (%)	Defeitos Totais (%)
1 ^a	*										
2 ^a	*										
3 ^a	*										
4 ^a	**										
5 ^a	**										
6 ^a	*										

* aspermia

** ejaculou pequena quantidade – não foi possível realizar avaliação

Tabela 11 – Cão Jovem Afetado 3 (JA 3) segundo as características seminais e estatísticas, São Paulo, 2006

Colheita	Volume (ml)	Motilidade (%)	Vigor (0-5)	Concentração X10 ⁶ /ml	Espermatozóides Mortos (%)	Morfologia espermática					
						Formol salino			Spermac®		
						Defeitos Menores (%)	Defeitos Maiores (%)	Defeitos Totais (%)	Defeitos Menores (%)	Defeitos Maiores (%)	Defeitos Totais (%)
1 ^a	1	90	4	960	19	19	22	41	8	20	28
2 ^a	1,5	85	4	1870	13	22	17	39	22	30	52
3 ^a	0,5	95	5	1405	0	32	7	39	2	26	34
Média	1	91,6	4,3	1411,6	10,6	24,3	15,33	39,66	12,66	25,33	38

Tabela 12 – Cão Jovem Afetado 4 (JA 4) segundo as características seminais e estatísticas, São Paulo, 2006

Colheita	Volume (ml)	Motilidade (%)	Vigor (0-5)	Concentração X10 ⁶ /ml	Espermatozóides Mortos (%)	Morfologia espermática					
						Formol salino			Spermac®		
						Defeitos Menores (%)	Defeitos Maiores (%)	Defeitos Totais (%)	Defeitos Menores (%)	Defeitos Maiores (%)	Defeitos Totais (%)
1 ^a	0,5	75	4	340	32	25	27	52	5	33	38
2 ^a	0,5	90	4	1470	17	34	25	59	12	16	28
3 ^a	0,7	95	5	940	1	26	12	38	5	12	17
Média	0,56	86,6	4,3	916,6	16,6	28,3	21,3	49,6	7,3	20,3	27,6

Tabela 13 – Cão Adulto Normal 1 (AN 1) segundo as características seminais e estatísticas, São Paulo, 2004 – 2005

Colheita	Volume (ml)	Motilidade (%)	Vigor (0-5)	Concentração $\times 10^6/\text{ml}$	Espermatozóides Mortos (%)	Morfologia espermática					
						Formol salino			Spermac®		
						Defeitos Menores (%)	Defeitos Maiores (%)	Defeitos Totais (%)	Defeitos Menores (%)	Defeitos Maiores (%)	Defeitos Totais (%)
1 ^a	2	95	5	400	13	9	9	18	*	*	*
2 ^a	1,5	90	5	865	3	15	5	20	14	12	26
3 ^a	1	80	4	945	*	11	4	15	15	4	19
4 ^a	2	95	4	2045	9	9	3	12	14	2	16
5 ^a	2,8	95	5	915	8	14	8	22	8	8	16
6 ^a	1,5	100	5	1725	5	11	6	17	2	8	10
7 ^a	2	90	4	160	11	17	19	36	18	4	22
8 ^a	1	95	5	1660	3	5	10	15	5	5	10
Média	1,7	92,5	4,6	1089,3	7,4	11,3	8	19,3	10,8	6,1	17

* Impossível avaliação. A lâmina não corou.

Tabela 14 – Cão Adulto Normal 2 (Adulto Normal 2) segundo as características seminais e estatísticas, São Paulo, 2004 – 2006

Colheita	Volume (ml)	Motilidade (%)	Vigor (0-5)	Concentração $\times 10^6/\text{ml}$	Espermatozóides Mortos (%)	Morfologia espermática					
						Formol salino			Spermac®		
						Defeitos Menores (%)	Defeitos Maiores (%)	Defeitos Totais (%)	Defeitos Menores (%)	Defeitos Maiores (%)	Defeitos Totais (%)
1 ^a	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
2 ^a	1,5	95	5	290	4	10	16	26	2	11	13
3 ^a	1,5	95	5	530	2	11	12	23	*	*	*
4 ^a	**	**	**	**	**	**	**	**	***	***	***
5 ^a	2	90	4	930	9	5	9	14	4	16	20
6 ^a	1,5	95	5	680	5	11	8	19	15	14	29
7 ^a	2	90	4	870	4	3	10	13	4	14	17
Média	1,7	93	4,6	660	4,8	8	11	19	6,2	13,7	17,2

* Impossível a avaliação. A lâmina não corou.

** Não foi realizada colheita de sêmen neste dia.

*** Animal apresentou aspermia.

Tabela 15 – Cão Jovem Normal 1 (JN 1) segundo as características seminais e estatísticas, São Paulo, 2005 – 2006

Colheita	Volume (ml)	Motilidade (%)	Vigor (0-5)	Concentração $\times 10^6/\text{ml}$	Espermatozóides Mortos (%)	Morfologia espermática					
						Formol salino			Spermac®		
						Defeitos Menores (%)	Defeitos Maiores (%)	Defeitos Totais (%)	Defeitos Menores (%)	Defeitos Maiores (%)	Defeitos Totais (%)
1 ^a	0,5	95	5	145	40	7	12	19	10	8	18
2 ^a	1	90	4	210	19	16	15	31	6	9	15
3 ^a	2	95	5	560	2	10	6	16	12	9	21
Média	1,1	93,3	4,6	305	20,3	11	11	22	9,3	8,6	18

Tabela 16 – Cão Jovem Normal 2 (JN 2) segundo as características seminais e estatísticas, São Paulo, 2005 – 2006

Colheita	Volume (ml)	Motilidade (%)	Vigor (0-5)	Concentração $\times 10^6/\text{ml}$	Espermatozóides Mortos (%)	Morfologia espermática					
						Formol salino			Spermac®		
						Defeitos Menores (%)	Defeitos Maiores (%)	Defeitos Totais (%)	Defeitos Menores (%)	Defeitos Maiores (%)	Defeitos Totais (%)
1 ^a	1,5	80	4	280	22	15	14	29	2	5	7
2 ^a	0,5	80	4	60	9	9	10	19	10	13	23
3 ^a	1,5	80	4	790	4	15	9	24	25	32	57
Média	1,1	80	4	376,6	11,6	13	11	24	12,3	16,6	29

Tabela 17 – Valores das mensurações ultra-sonográficas de Próstata e Testículos em cm, São Paulo 2006

Animal	Peso (Kg)	Idade (meses)	Testículo Esquerdo			Volume Testicular	Testículo Direito			Volume Testicular	Próstata (altura)
			comprimento	largura	diâmetro		comprimento	largura	diâmetro		
AA 2	25	34	3,45	1,82	1,92	6,26	3,28	2,05	2,33	8,14	2,48
AA 3	31	34	3,37	1,97	2,04	7,20	3,29	2,13	2,60	9,47	3,38
JA 1	21,9	21	3,30	1,84	2,53	8,35	3,03	2,02	2,49	7,92	*
JA 3	20	15	3,39	1,84	2,50	8,25	3,11	1,83	2,28	6,74	1,44
JA 4	23	15	2,95	1,77	2,37	6,43	3,18	2,18	2,76	9,94	1,91
AN 1	28	***	3,86	2,02	3,03	12,28	3,63	2,03	2,58	9,88	2,58
AN 2	40	58	3,81	2,16	2,64	11,29	4,04	2,79	2,95	17,29	3,10
JN 1	38	19	3,71	2,26	2,42	10,55	3,58	1,64	2,22	6,77	2,68 **
JN 2	40	20	4,36	2,02	2,58	11,81	3,70	2,14	2,18	8,97	2,75

* Próstata intra-pélvica, não foi possível avaliar

** Próstata parcialmente intra-pélvica

*** idade desconhecida

Tabela 18 - Valores das mensurações ultra-sonográficas dos Epidídimos em cm, São Paulo 2006

Animal	Peso (Kg)	Idade	Epidídimo Esquerdo			Epidídimo Direito		
			Cabeça*	Corpo*	Cauda*	Cabeça*	Corpo*	Cauda*
AA 2	25	34	0,96	0,55	0,81	0,86	0,53	0,72
AA 3	31	34	1,07	0,49	0,81	1,03	0,48	0,83
JA 1	21,9	21	0,85	0,61	0,84	0,88	0,53	0,92
JA 3	20	15	0,93	0,56	0,61	0,79	0,52	0,62
JA 4	23	15	0,83	0,46	0,63	0,77	0,48	0,88
AN 1	28	**	0,94	0,48	0,77	1,08	0,55	0,80
AN 2	40	58	0,8	0,68	1,06	0,69	0,72	1,14
JN 1	38	19	0,66	0,51	0,70	0,70	0,59	0,81
JN 2	40	20	0,69	0,88	1,07	0,56	0,60	0,93

* espessura

** idade desconhecida

Tabela 19 – Estatísticas descritivas da variável Volume, em ml para cada cão, São Paulo, 2004-2006

Animal	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
AA1	2,0	0,7	1,0	2,3	2,5
AA2	1,6	0,6	0,5	1,5	2,5
AA3	1,6	0,6	0,5	1,9	2,2
JA3	1,7	0,6	1,0	1,8	2,8
JA4	1,7	0,3	1,5	1,5	2,0
AN1	1,0	0,5	0,5	1,0	1,5
AN2	0,6	0,1	0,5	0,5	0,7
JN1	1,2	0,8	0,5	1,0	2,0
JN2	1,2	0,6	0,5	1,5	1,5

Tabela 20 – Estatísticas descritivas da variável Volume: Comparação entre Afetados e Normais, São Paulo, 2004-2006

Condição do Cão	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Afetado	1,5	0,7	0,5	1,5	2,5
Normal	1,5	0,6	0,5	1,5	2,8

Tabela 21 – Estatísticas descritivas da variável Motilidade (%) para cada cão, São Paulo, 2004-2006

Cão	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
AA1	82,5	8,7	75,0	82,5	90,0
AA2	85,6	6,2	80,0	85,0	95,0
AA3	92,5	4,6	85,0	95,0	95,0
JA3	92,5	6,0	80,0	95,0	100,0
JA4	94,0	2,2	90,0	95,0	95,0
AN1	90,0	5,0	85,0	90,0	95,0
AN2	86,7	10,4	75,0	90,0	95,0
JN1	93,3	2,9	90,0	95,0	95,0
JN2	80,0	0,0	80,0	80,0	80,0

Tabela 22 – Estatísticas descritivas da variável Motilidade: Comparação entre Afetados e Normais, São Paulo, 2006

Condição do Cão	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Afetado	87,9	7,1	75,0	90,0	95,0
Normal	91,1	6,4	80,0	95,0	100,0

Tabela 23 – Estatísticas descritivas da variável Vigor (0-5) para cada cão, São Paulo, 2004 -2006

Cão	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
AA1	4,0	0,0	4,0	4,0	4,0
AA2	4,0	0,0	4,0	4,0	4,0
AA3	4,5	0,8	3,0	5,0	5,0
JA3	4,6	0,5	4,0	5,0	5,0
JA4	4,6	0,5	4,0	5,0	5,0
AN1	4,3	0,6	4,0	4,0	5,0
AN2	4,3	0,6	4,0	4,0	5,0
JN1	4,7	0,6	4,0	5,0	5,0
JN2	4,0	0,0	4,0	4,0	4,0

Tabela 24 – Estatísticas descritivas da variável Vigor: Comparação entre Afetados e Normais, São Paulo, 2004-2006

Condição do Cão	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Afetado	4,2	0,5	3,0	4,0	5,0
Normal	4,5	0,5	4,0	5,0	5,0

Tabela 25 – Estatísticas descritivas da variável Concentração ($\times 10^6$ espermatozóides /ml) para cada cão e resultado do TRV, São Paulo, 2004-2006

Cão	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo	P-valor
AA1	543,0	307,0	155,0	583,0	850,0	0,5489
AA2	672,5	252,8	305,0	717,5	990,0	0,3251
AA3	611,0	312,0	155,0	575,0	1250,0	0,1317
JA3	1089,0	664,0	160,0	930,0	2045,0	0,2403
JA4	660,0	260,0	290,0	680,0	930,0	0,0127*
AN1	1412,0	455,0	960,0	1405,0	1870,0	0,0001*
AN2	917,0	565,0	340,0	940,0	1470,0	0,3447
JN1	305,0	223,0	145,0	210,0	560,0	0,1055
JN2	377,0	374,0	60,0	280,0	790,0	0,3031

* Significativo ao nível de 95% de confiança.

Tabela 26 - Estatísticas descritivas da variável Concentração ($\times 10^6$ espermatozóides /ml: Comparação entre Afetados e Normais, São Paulo, 2004-2006

Condição do Cão	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Afetado	746,9	411,8	155,0	712,5	1870,0
Normal	740,0	563,0	60,0	680,0	2045,0

Tabela 27 – Estatísticas descritivas da variável Espermatozóides Mortos para cada cão, São Paulo, 2004-2006

Cão	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
AA1	15,8	9,6	6,0	16,0	25,0
AA2	13,1	6,3	6,0	12,0	27,0
AA3	8,4	5,7	2,0	8,5	15,0
JA3	10,7	9,7	0,0	13,0	19,0
JA4	16,7	15,5	1,0	17,0	32,0
AN1	7,4	3,9	3,0	8,0	13,0
AN2	4,8	2,6	2,0	4,0	9,0
JN1	20,3	19,0	2,0	19,0	40,0
JN2	11,7	9,3	4,0	9,0	22,0

Tabela 28 – Estatísticas descritivas da variável Espermatozóides Mortos: Comparação entre Afetados e Normais, São Paulo, 2004-2006

Condição do Cão	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Afetado	12,2	8,2	0,0	12,0	32,0
Normal	9,6	9,5	2,0	6,5	40,0

Tabela 29 – Comparação das proporções de espermatozóides mortos entre as colheitas para cada cão, P-valores para os testes Qp e TRV, São Paulo, 2004-2006

Cão	Q _p	TRV
AA1	0,0001	<0,0001
AA2	0,0010	0,0022
AA3	<0,0001	<0,0001
JA3	<0,0001	0,0003
JA4	<0,0001	<0,0001
AN1	0,0383	0,0299
AN2	0,2104	0,2321
JN1	<0,0001	<0,0001
JN2	0,0002	0,0002

Células sombreadas contêm p-valores menores que 0,05.

Tabela 30 – Estatísticas descritivas dos Defeitos Menores (%) para cada cão, São Paulo, 2004-2006

Cão	Formol Salino					Spermac®				
	Média	D.P.	Mín.	Méd.	Máx.	Média	D.P.	Mín.	Méd.	Máx.
AA1	16,0	5,9	9,0	16,0	23,0	9,0	4,4	6,0	7,0	14,0
AA2	6,4	4,9	1,0	5,5	16,0	5,8	3,7	2,0	5,0	12,0
AA3	4,3	1,7	2,0	4,5	7,0	8,6	2,4	5,0	8,0	11,0
JA3	24,3	6,8	19,0	22,0	32,0	10,7	10,3	2,0	8,0	22,0
JA4	28,3	4,9	25,0	26,0	34,0	7,3	4,0	5,0	5,0	12,0
AN1	11,4	3,9	5,0	11,0	17,0	10,9	5,9	2,0	14,0	18,0
AN2	8,0	3,7	3,0	10,0	11,0	6,3	5,9	2,0	4,0	15,0
JN1	11,0	4,6	7,0	10,0	16,0	9,3	3,1	6,0	10,0	12,0
JN2	13,0	3,5	9,0	15,0	15,0	12,3	11,7	2,0	10,0	25,0

Tabela 31 – Estatísticas descritivas da variável Defeitos Menores (%): Comparação entre Afetados, São Paulo, 2004-2006

Condição do Cão	Formol Salino					Spermac®				
	Média	D.P.	Mín.	Méd.	Máx.	Média	D.P.	Mín.	Méd.	Máx.
Afetado	11,8	10,0	1,0	8,0	34,0	7,8	4,6	2,0	7,0	22,0
Normal	10,7	4,0	3,0	11,0	17,0	9,8	6,5	2,0	10,0	25,0

Tabela 32 – Comparação das proporções de defeitos menores entre as colheitas para cada cão, P-valores para os testes Qp e TRV, São Paulo, 2004-2006

Cão	Formol Salino		Spermac®	
	Q _p	TRV	Q _p	TRV
AA1	0,0002	0,0440	0,0990	0,1103
AA2	0,0002	0,0003	0,0160	0,0158
AA3	0,6861	0,6520	0,2610	0,5841
JA3	0,0814	0,0848	<0,0001	<0,0001
JA4	0,3029	0,3074	0,0910	0,1046
AN1	0,1727	0,1467	0,0010	0,0003
AN2	0,1077	0,0750	0,0010	0,0013
JN1	0,1179	0,1258	0,3330	0,3143
JN2	0,3473	0,3261	<0,0010	<0,0001

Células sombreadas contêm p-valores menores que 0,05.

Tabela 33 – Estatísticas descritivas da variável Defeitos Maiores (%) para cada cão, São Paulo, 2004-2006

Cão	Formol Salino					Spermac®				
	Média	D.P.	Mín.	Méd.	Máx.	Média	D.P.	Mín.	Méd.	Máx.
AA1	24,5	11,6	9,0	26,0	37,0	20,3	4,9	17,0	18,0	26,0
AA2	33,5	9,7	20,0	32,0	50,0	44,9	20,0	27,0	35,0	75,0
AA3	7,6	2,8	2,0	8,0	11,0	8,4	4,6	3,0	7,0	15,0
JA3	15,3	7,6	7,0	17,0	22,0	25,3	5,0	20,0	26,0	30,0
JA4	21,3	8,1	12,0	25,0	27,0	20,3	11,2	12,0	16,0	33,0
AN1	8,0	5,1	3,0	7,0	19,0	6,1	3,4	2,0	5,0	12,0
AN2	11,0	3,2	8,0	10,0	16,0	13,8	2,1	11,0	14,0	16,0
JN1	11,0	4,6	6,0	12,0	15,0	8,7	0,6	8,0	9,0	9,0
JN2	11,0	2,7	9,0	10,0	14,0	16,7	13,9	5,0	13,0	32,0

Tabela 34 – Estatísticas descritivas da variável Defeitos Maiores (%): Comparação entre Afetados e Normais, São Paulo, 2004-2006

Condição do Cão	Formol Salino					Spermac®				
	Média	D.P.	Mín.	Méd.	Máx.	Média	D.P.	Mín.	Méd.	Máx.
Afetado	20,7	12,9	2,0	21,0	50,0	25,7	19,2	3,0	23,0	75,0
Normal	9,7	4,2	3,0	9,0	19,0	10,2	6,9	2,0	9,0	32,0

Tabela 35 - Comparação das proporções de defeitos maiores, entre as colheitas para cada cão, P-valores para os testes Qp e TRV, São Paulo, 2004-2006

Cão	Formol Salino		Spermac®	
	Q _p	TRV	Q _p	TRV
AA1	<0,0001	<0,0001	0,2240	0,2315
AA2	0,0001	0,0001	<0,0001	<0,0001
AA3	0,3655	0,2415	0,0110	0,0094
JA3	0,0114	0,0075	0,2630	0,2572
JA4	0,0195	0,0143	0,0010	0,0006
AN1	0,0010	0,0027	0,0640	0,0653
AN2	0,3956	0,4171	0,7840	0,7778
JN1	0,1179	0,1008	0,9590	0,9582
JN2	0,4904	0,4985	<0,0001	<0,0001

Células sombreadas contêm p-valores menores que 0,05.

Tabela 36 – Estatísticas descritivas da variável Defeitos Totais (%) para cada cão, São Paulo, 2004-2006

Cão	Formol Salino					Spermac®				
	Média	D.P.	Mín.	Méd.	Máx.	Média	D.P.	Mín.	Méd.	Máx.
AA1	40,5	15,2	18,0	46,5	51,0	29,3	4,6	24,0	32,0	32,0
AA2	39,9	13,1	26,0	36,0	66,0	50,6	21,5	29,0	38,5	86,0
AA3	11,9	3,3	6,0	11,5	18,0	17,0	6,4	9,0	17,0	26,0
JA3	39,7	1,2	39,0	39,0	41,0	36,0	13,9	28,0	28,0	52,0
JA4	49,7	10,7	38,0	52,0	59,0	27,7	10,5	17,0	28,0	38,0
AN1	19,4	7,4	12,0	17,5	36,0	17,0	5,9	10,0	16,0	26,0
AN2	19,0	5,6	13,0	19,0	26,0	20,0	6,7	13,0	19,0	29,0
JN1	22,0	7,9	16,0	19,0	31,0	18,0	3,0	15,0	18,0	21,0
JN2	24,0	5,0	19,0	24,0	29,0	29,0	25,5	7,0	23,0	57,0

Tabela 37 – Estatísticas descritivas da variável Defeitos Totais (%): Comparação entre Afetados e Normais, São Paulo, 2004-2006

Condição do Cão	Formol Salino					Spermac®				
	Média	D.P.	Mín.	Méd.	Máx.	Média	D.P.	Mín.	Méd.	Máx.
Afetado	32,5	17,1	6,0	36,0	66,0	33,5	19,3	9,0	28,5	86,0
Normal	20,4	6,5	12,0	19,0	36,0	20,0	11,1	7,0	18,0	57,0

Tabela 38 - Comparação das proporções de defeitos totais entre as colheitas para cada cão, P-valores para os testes Qp e TRV, São Paulo, 2004-2006

Cão	Formol Salino		Spermac®	
	Q _p	TRV	Q _p	TRV
AA1	<0,0001	<0,0001	0,3590	0,3496
AA2	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
AA3	0,3947	0,3728	0,0080	0,0069
JA3	0,9460	0,9459	0,0010	0,0014
JA4	0,0105	0,0099	0,0040	0,0035
AN1	0,0009	0,0002	0,0210	0,0195
AN2	0,0855	0,0831	0,0330	0,0356
JN1	0,0202	0,0280	0,5450	0,5422
JN2	0,2551	0,2520	<0,0001	<0,0001

Células sombreadas contêm p-valores menores que 0,05.

APÊNDICE C – GRÁFICOS

Gráfico 1 – Representação gráfica (Boxplot) do Volume seminal (ml) para cada cão, São Paulo, 2004-2006

Gráfico 2 – Representação gráfica (Boxplot) do Volume seminal (ml) para cães afetados e normais, São Paulo, 2004-2006

Gráfico 3 – Representação gráfica (Boxplot) da Motilidade (%) para cada cão, São Paulo, 2004-2006

Gráfico 4 – Representação gráfica (Boxplot) da Motilidade (%) para cães afetados e normais, São Paulo, 2004-2006

Gráfico 5 – Representação gráfica (Boxplot) do Vigor (1 a 5) para cada cão, São Paulo, 2004-2006

Gráfico 6 – Representação gráfica (Boxplot) do Vigor (1 a 5) para cães afetados e normais, São Paulo, 2004-2006

Gráfico 7 – Representação gráfica (Boxplot) da Concentração Espermática ($\times 10^6$ espermatozoides/ml) para cada cão, São Paulo, 2004-2006

Gráfico 8 – Representação gráfica (Boxplot) da Concentração espermática ($\times 10^6$ espermatozoides/ml) para cães afetados e normais, São Paulo, 2004-2006

Figura 9 – Representação gráfica (Boxplot) da % de Espermatozóides Mortos para cada cão, São Paulo, 2004-2006

Figura 10 – Representação gráfica (Boxplot) da % de Espermatozóides Mortos para cães afetados e normais, São Paulo, 2004-2006

Gráfico 11 – Representação gráfica (Boxplot) da % de Defeitos Menores para cada cão, São Paulo, 2004-2006

Gráfico 12 – Representação gráfica (Boxplot) da % de Defeitos Menores para cães afetados e normais, São Paulo, 2004-2006

Gráfico 13 – Representação gráfica (Boxplot) da % de Defeitos Maiores para cada cão, São Paulo, 2004-2006

Gráfico 14 – Representação gráfica (Boxplot) da % de Defeitos Maiores para cães afetados e normais, São Paulo, 2004-2006

Gráfico 15 – Representação gráfica (Boxplot) da % de Defeitos Totais para cada cão, São Paulo, 2004-2006

Figura 16 – Representação gráfica (Boxplot) da % de Espermatozóides com defeitos totais para cães afetados e normais, São Paulo, 2004-2006