

Citologia aspirativa por agulha fina (CAAF), em testículo de onça pintada (*Panthera onca*), utilizada como ferramenta no diagnóstico de infertilidade

Testicular fine needle aspiration cytology as a diagnostic tool in jaguar (*Panthera onca*) infertility

Regina Celia Rodrigues da PAZ¹;
Denise Pereira LEME²;
Roberta Mara ZÜGE¹;
Cecília PESSUTI³;
Eliana Ferraz SANTOS⁴;
Renato Campanarut BARNABE¹

1-Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, São Paulo - SP
2-Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, Botucatu - SP
3-Parque Zoológico Municipal "Quinzinho de Barros", Sorocaba - SP
4-Bosque dos Jequitibás, Campinas - SP

Resumo

Técnicas de biópsia, caracterizadas pela remoção de segmentos de órgãos e tecidos para análise histopatológica, não são indicadas no auxílio diagnóstico de alterações testiculares para animais ameaçados de extinção, por não serem totalmente isentas de riscos. Neste sentido, é de grande interesse que se desenvolvam técnicas de biópsia testicular cada vez mais seguras e com o mínimo de consequências negativas. Com este intuito três onças pintadas (*Panthera onca*) foram submetidas a exames de Citologia Aspirativa por Agulha Fina (CAAF). Amostras foram obtidas através da punção aspirativa dos testículos, esfregaços foram confeccionados, corados com Panótico e analisados sob Microscopia Óptica. Simultaneamente foram realizadas coletas de sêmen para avaliação do volume, pH, concentração, motilidade, vigor e morfologia espermáticas. Quanto à avaliação espermática, os animais apresentaram valores semelhantes aos encontrados na literatura quanto ao volume, pH, motilidade, vigor e morfologia espermáticas. Quanto a concentração espermática os animais apresentaram valores abaixo dos encontrados na literatura. Nos exames de CAAF, todas as gerações de células germinativas foram identificadas, indicando espermatogênese normal em todos os animais, com exceção das espermátides finais duplas que ainda não foram relatadas como achados em punções testiculares de outras espécies, o que vem confirmar a elevada porcentagem de células teratólogicas encontradas nesses animais. Desta forma, podemos concluir que a CAAF testicular é um método diagnóstico auxiliar importante na detecção de alterações testiculares em casos de sub ou infertilidade, podendo ser utilizados na rotina de investigação do trato reprodutivo masculino, quando o exame histopatológico, por ser um método altamente invasivo, é desaconselhável.

Palavras-chave

Animais selvagens.
Espermatogênese.
Sêmen animal.

Correspondência para:

REGINA CELIA RODRIGUES DA PAZ
Departamento de Reprodução Animal
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP
Avenida Prof. Orlando Marques de Paiva, 87
Cidade Universitária Armando Salles de Oliveira
05508-270 - São Paulo - SP
e-mail: repaz@usp.br

Recebido para publicação: 03/07/2002
Aprovado para publicação: 27/09/2002

Introdução

A onça pintada (*Panthera onca*), o maior felino das Américas¹, é considerada como espécie ameaçada de extinção pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). A perda e constante fragmentação de seu habitat são um dos principais fatores causadores de diminuição no número de animais em vida livre. Em cativeiro, o reduzido número de animais, o alto grau de parentesco e o baixo sucesso reprodutivo, tem sido uma barreira para sobrevivência da espécie. Considerando a importância da propagação de animais em cativeiro para preservação da espécie, a reprodução de indivíduos com procedência torna-se um componente indispensável para conservação.

A biópsia testicular, por não ser um procedimento totalmente isento de riscos, podendo trazer conseqüências indesejáveis à vida reprodutiva do animal, é de uso desaconselhável em animais em vias de extinção, principalmente quando linhas genéticas não podem ser perdidas.

A Citologia Aspirativa por Agulha Fina (CAAF), por ser um método simples, rápido e seguro na obtenção de amostras de órgãos e tecidos², surge como método alternativo na determinação da atividade espermatogênica³. Esta técnica pode ser utilizada como parte do exame andrológico, indicada nos casos de aumento de volume testicular, oligozoospermia ou azoospermia^{4,5,6}, ou na seleção de animais ameaçados de extinção sub ou inférteis, porém importantes geneticamente para a espécie, para participação em programas de reprodução assistida, utilizando-se biotecnologias da reprodução, como a fertilização *in vitro* (FIV) ou injeção intra-citoplasmática

(ICSI) visando sua reprodução e conseqüentemente a conservação da espécie.

Com o objetivo de verificar a eficiência da CAAF testicular em onças pintadas (*Panthera onca*), na tentativa de avaliar a atividade espermatogênica e identificar células germinativas com alterações morfológicas que justifiquem o elevado índice de anormalidades espermáticas e baixa concentração espermática, encontradas nesta espécie em cativeiro, esta metodologia foi aplicada, já que somente o exame histopatológico poderia revelar com exatidão a causa efetiva das alterações observadas.

Material e Método

Foram utilizados três machos de onças pintadas (*Panthera onca*), com idade entre 10 e 12 anos, mantidas no Bosque dos Jequitibás, em Campinas/SP (n=2) e no Parque Zoológico Municipal “Quinzinho de Barros”, em Sorocaba/SP (n=1).

Os animais foram anestesiados por meio da utilização de dardos, com auxílio de zarabatana, utilizando-se a associação Tiletamina Zolazepan (ZOLETIL 50®-Virbac), na proporção de 10mg/kg⁷.

Citologia aspirativa por agulha fina foi realizada através da punção testicular, com agulha (30x8mm) e seringa (10ml) descartáveis, após antissepsia local com álcool 70%. Com o material obtido, foram confeccionados esfregaços em lâminas histológicas, secos ao ar ambiente e coradas com Panótico. As células da espermatogênese e de Sertoli foram identificadas e quantificadas por microscopia óptica, sob aumento de 1200x. Foram contadas 200 células consecutivas da série espermatogênica, separadas em porcentagens de espermatogônias, espermátocitos

primários, espermatócitos secundários, espermatídes iniciais, espermatídes finais e espermatozóides. As células de Leydig não foram identificadas. As células de Sertoli, interpostas às células espermáticas, foram contadas separadamente e verificou-se sua porcentagem em relação ao total de células espermatogênicas³.

A consistência dos testículos foi aferida por palpação e classificada como rígido, normal e flácido. Biometria Testicular foi realizada externamente, com auxílio de paquímetro. Foram aferidos comprimento e largura dos testículos direito e esquerdo. Os resultados obtidos foram analisados segundo a fórmula: $V = C \times L^2 \times 0,524$, onde V é o volume a ser calculado; C é o comprimento do testículo; L é a largura do testículo elevada à segunda potência⁸. Obtendo-se, dessa forma, o volume do testículo medido. Para aferição do volume total foram somados os volumes de cada testículo.

A coleta de sêmen foi realizada por eletroejaculação utilizando-se aparelho Torjet 65C (Eletrovet) e eletrodo retal bipolar, com três tiras longitudinais em cobre. O diâmetro do eletrodo utilizado foi de 2,3 cm com comprimento de 29 cm. A série de

eletrochoques seguiu o protocolo sugerido por Howard⁹.

Para obtenção do pH, uma gota do material obtido foi colocada sobre tira reagente (Sigma). Para avaliação da motilidade, uma alíquota do ejaculado foi depositada sobre lâmina de vidro para microscopia, coberta com lamínula, previamente aquecidas a 37°C em mesa aquecedora (Eletrovet) e levada ao microscópio ótico binocular (Olimpus BHK). Sobre placa aquecida (Eletrovet) à 37°C foi avaliada quanto à motilidade espermática em escala de 0 a 100 por cento e vigor na escala de 0 a 5⁹. A morfologia e concentração dos espermatozóides foi avaliada por meio da fixação do ejaculado (1:3) em formol salino 10,00%. A concentração foi realizada utilizando-se câmara hematimétrica (câmara de Neubauer), sob microscopia ótica em aumento de 400x¹⁰. Para determinação da morfologia espermática foi utilizada preparação em câmara úmida. Foram contadas 100 células por lâmina em microscópio de contraste de fase (ZEISS), em aumento 1200 vezes, e as anormalidades, classificadas em defeitos maiores e defeitos menores, apresentadas em porcentagem¹¹.

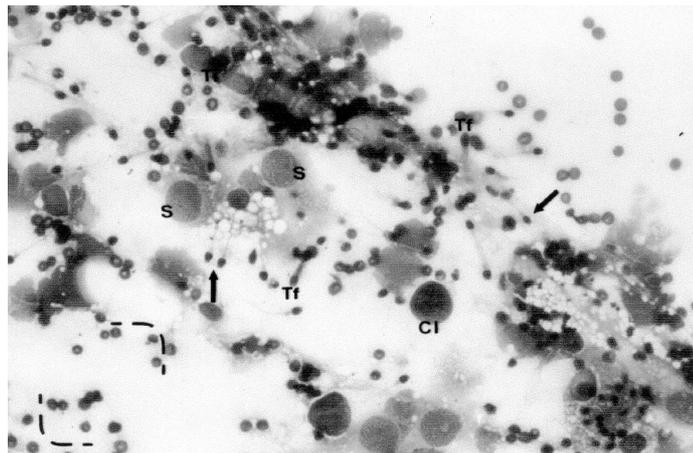


Figura 1

Tipos celulares encontrados em esfregaços de CAAF de testículos de onça pintada (*Panthera onca*): CI = Espermatócito I; Ti = Espermatíde inicial; Tf = Espermatíde final; S = Célula de Sertoli; Setas = Espermatozóide; Tracejado = Hemácias

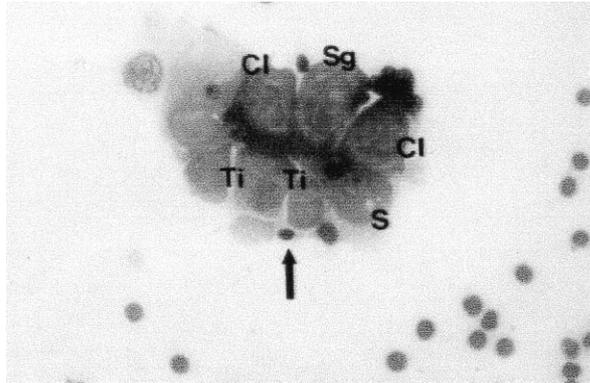


Figura 2

Tipos celulares encontrados em esfregaços de CAAF de testículos de onça pintada (*Panthera onca*): Sg = Espermatogônia; Cl = Espermatócito I; Ti = Espermátide inicial; Tf = Espermátide final; S = Célula de Sertoli; Seta = Espermatozóide

Resultados

Nos exames de CAAF, todas as gerações de células germinativas foram observadas. Células espermatogênicas e células de Sertoli foram identificadas (Figuras 1 e 2) e avaliadas quantitativamente (Tabela 1) indicando espermatogênese normal em todos os animais, com exceção das espermátides finais duplas que ainda não foram relatadas como achados em punções testiculares de outras espécies. Das seis amostras dos três pares de testículos puncionados apenas uma foi descartada pela grande contaminação com sangue, impedindo sua avaliação.

Na avaliação clínica dos testículos estes foram classificados como normais, sendo os dados de volume testicular apresentados na Tabela 3. Quanto à avaliação espermática foram aferidos volume, pH, motilidade, vigor, anormalidades espermáticas e concentração espermática em todos os animais, estando os dados apresentados na Tabela 2.

Discussão

As características das células espermatogênicas e células de Sertoli observadas nos exames de CAAF testicular destes animais foram semelhantes às descritas em outras espécies, o que facilitou a identificação, e conseqüentemente a avaliação quantitativa dos tipos celulares descritos^{3,6,12}.

Contaminação das amostras por sangue foi citada por Rajwanshi, Radhika e Vaidyanathan¹³, onde 6,00% de seus pacientes (humanos) apresentaram contaminação total por sangue, impossibilitando a interpretação do exame.

Em relação à quebra da barreira hemato-testicular, Leme¹⁴ não evidenciou nenhuma das alterações seminais compatíveis com degeneração testicular de origem auto-imune, em equinos submetidos a uma média de oito punções testiculares até 100 dias da primeira

Tabela 1Tipos celulares (%) encontrados em esfregaços de CAAF de testículos de onças pintadas (*Panthera onca*), São Paulo, 2000

Tipos celulares	1	2	3	M/DP
Espermatogônia (Sg)	4,0	3,2	6,0	4,40 ± 1,44
Espermatócitos I (CI)	8,0	4,2	7,5	6,57 ± 2,06
Espermatócitos II (CII)	1,0	—	0,5	0,75 ± 0,35
Espermátides iniciais (Ti)	11,0	11,5	20,5	14,33 ± 5,35
Espermátides finais (Tf)	28,0	37,0	24,0	29,66 ± 6,66
Espermatozóides (Seta)	43,0	43,5	31,75	39,42 ± 6,64
Células de Sertoli (S)	26,5	13,2	9,75	16,48 ± 8,84
* Teratológicas	0,5	0,5	14,25	5,08 ± 7,94

*Espermátides finais duplas.

Tabela 2Análise do sêmen de onças pintadas (*Panthera onca*) mantidas em cativeiro, São Paulo, 2000

Animais	Volume	Motilidade	Vigor	pH	Concentração	Defeitos	
						Maiores	Menores
1	6,0 ml	70 %	4	8,0	1,2 x 10 ⁶ /ml	29 %	12 %
2	5,1 ml	50 %	3	8,5	1,0 x 10 ⁶ /ml	27 %	08 %
3	6,0 ml	70 %	3	8,5	0,2 x 10 ⁶ /ml	37 %	41 %
M/DP	5,7±0,5	63,3±11,5	3,3±0,6	8,3±0,3	0,8±0,53	31±5,29	20,3±18

Tabela 3Biometria testicular e Palpação testicular e do epididímo de onças pintadas (*Panthera onca*), mantidas em cativeiro, São Paulo, 2000

Animais	Biometria testicular	Consistência
1	15,0 cm ³	Normal
2	16,2 cm ³	Normal
3	23,3 cm ³	Normal
M/DP	18,17±4,48	-

punção. Foresta e Varotto⁵, até três meses após a CAAF testicular em humanos, não detectaram o desenvolvimento de anticorpos antiespermatozóides.

Na avaliação clínica dos testículos a consistência foi normal para os três animais, porém com relação à biometria testicular, estes apresentaram volume médio

testicular (18,17±4,48) inferior aos dados encontrados por Morato et al.⁷.

A literatura apresenta poucos trabalhos avaliando sêmen de onça pintada (*Panthera onca*)^{7,9,15,16}, no entanto, foi possível verificar, que a qualidade do sêmen de onças mantidas em Zoológicos no Brasil foi inferior a encontrada por Howard⁹ em onças mantidas em Zoológicos

americanos.

A avaliação espermática dos animais experimentais apresentou valores semelhantes aos obtidos de outros animais em cativeiro no Brasil quanto ao volume, pH, motilidade, vigor e anormalidades espermáticas, porém estes animais apresentaram concentração espermática inferior^{7,15,16}.

Todos os animais apresentaram elevado índice de defeitos maiores ($31 \pm 5,29$), sendo que o animal 3 apresentou índice de defeitos menores (41,00%) elevado em relação aos demais. A presença de elevada porcentagem de defeitos menores neste animal pode estar relacionada a má manipulação do ejaculado, podendo também estar relacionada ao aumento de temperatura do epidídimo¹⁷. Com relação aos defeitos maiores, suas principais causas envolvem fatores nutricionais, genéticos e ambientais, sendo originados durante a espermatogênese¹⁷.

Alterações e redução na espermatogênese foram associadas a deficiência de vitamina A por vários autores^{18,19,20}, sendo o restabelecimento de espermatogênese normal conseguido após fornecimento adequado de vitamina A. A presença de alterações degenerativas nos testículos podem estar relacionadas a deficiência de vitamina E²¹. Esta deficiência, por sua vez, pode determinar danos irreversíveis aos testículos, sendo que mesmo após o restabelecimento de fornecimento adequado de vitamina E não haveria melhora na morfologia espermática.

Considerando-se o fator

genético, a baixa qualidade espermática em felinos silvestres tem sido associada à baixa variabilidade genética²². Elevado grau de consangüinidade e concomitante perda de variabilidade genética determinam uma maior ocorrência de espermatozoides anormais²³. A realização de análise de variabilidade genética e/ou o estudo de paternidade podem contribuir substancialmente para a elucidação da causa da baixa qualidade espermática, já que os animais estudados são de origem desconhecida.

Fatores ambientais também podem promover alterações na qualidade espermática. O tipo de recinto, o número de animais por recinto e a interação tratador-animal são determinantes para o sucesso reprodutivo de felinos em cativeiro²⁴. Segundo o padrão determinado pelo plano de manejo de pequenos felinos²⁵, o qual atende às necessidades básicas para felinos, os recintos nos quais os animais são mantidos são inadequados quanto à estrutura e ambientação. Segundo Mellen²⁴, o sucesso reprodutivo dos animais é maior quando os animais são mantidos aos pares e não em grupos, o que se justifica pelo fato de se tratar de animais de hábito solitário e territorial, que formam casais apenas nos períodos de acasalamento.

O elevado índice de espermátides finais duplas ($5,08 \pm 7,94$) encontrado nos esfregaços de CAAF vem confirmar a presença de espermatozoides teratológicos, principalmente a elevada proporção de espermatozoides com 2 cabeças, encontrados no sêmen destes animais.

Conclusões

Nas condições de realização deste experimento, e dentro das finalidades a que foi proposto, podemos concluir que a Citologia Aspirativa por Agulha Fina (CAAF) mostrou-se uma técnica simples e eficiente na avaliação da atividade espermatogênica. Além disso, foi um determinante qualitativo e quantitativo

nos diferentes tipos celulares. Caracterizou-se como atividade espermatogênica normal nos animais estudados, porém não totalmente livre de contaminação hemática. Aparece, ainda, como um importante método auxiliar no diagnóstico de casos de sub/infertilidade, no qual a biópsia testicular seria de uso desaconselhável por se tratar de uma espécie em extinção.

Summary

Several methods of testicular punch biopsy were proposed for obtaining material for histologic or cytologic evaluation, but did not received enough clinical acceptance because it was considered to be too traumatizing. The fine Needle Aspiration (FNA) is considered a useful, simple and fast method to obtain samples from tissues. Regarding the importance of FNA in wild animals, this technique was tried in captive adult jaguar (*Panthera onca*) aiming the evaluation and possible causes of infertility. Using a needle and disposable syringe, the testis were aspirated. The whole aspirated was smeared onto a microscope slide and stained with Diff-quick method. Semen samples were collected by electroejaculation and analyzed for pH, total volume, motility, status, total spermatozoa count and morphology. Evaluation of sperm volume, pH, motility vigor and morphology were normal. However, was found below concentration. Cytologic quantification revealed germinative cells in all testicles. Among serial types of morphological normal spermatogenesis cells, there were found theratological forms of double final spermatids. These anomalous forms of final spermatids have not been noticed yet in FNA papers. So, we concluded that FNA together with other techniques, provides a useful tool in male infertility diagnostics, mainly when related to endangered species.

Key-words

Wild animal.
Spermatogenesis.
Semen.

Referências

- 1 - OLIVEIRA, T. G. **Cats: ecological and conservation**. São Luís: Edusma, 1994. p. 244.
- 2 - DE NICOLA, D. B.; REBAR, A. H.; BOON, G. D. Cytology of the canine male urogenital tract. In: DE NICOLA, D. B.; REBAR, A. H.; BOON, G. D. **Abnormal cytology in the male urogenital tract**. St. Louis: Ralston Purina, 1980. p. 17-25.
- 3 - PAPIĆ, Z.; KATONA, G.; SKRABALO, Z. The cytologic identification and qualification of testicular cell subtypes. **Acta Cytological**, v. 32, n. , p. 697-706, 1988.
- 4 - DAHLBOM, M.; MÄKINEN, A.; SUOMINEN, J. Testicular fine needle aspiration cytology as a diagnostic tool in dog infertility. **Journal of Small Animal Practice**, v. 38, p. 506-512, 1997.
- 5 - FORESTA, C.; VAROTTO, A. Assesment of testicular cytology by fine needle aspiration as a diagnostic parameter in the evaluation of the oligospermic subject. **Fertility & Sterility**, v. 58, p. 1028-1033, 1992.
6. FORESTA, C.; VAROTO, A.; MIONI, R.; ROSSATO, M.; ZORZI, M. **Citologia testicolare per agoaspirazione nella diagnostica dell'infertilità maschile**. Padova: Piccin Nuova Libreria, 1993. 152 p.
- 7 - MORATO, R. G.; GUIMARÃES, M. A. B. V.; NUNES, A. L. V.; CARCIOFI, A. C.; FERREIRA, F.; BARNABE, R. V. Semen collection and evaluation in the jaguar. **Brazilian Journal Veterinary Animal Science**, v. 35, 1998.

- 8 - JOHNSTON, L. A.; ARMSTRONG, D. L.; BROWN, J. L. Seasonal effects on seminal and endocrine traits in the captive snow leopard (*Panthera uncia*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 102, n. 1, p. 229-236, 1994.
9. HOWARD, J. G. Semen collection and analysis in carnivores. In: FOLWER, M. E. **Zoo & wild animal medicine current therapy**. 3. ed. Philadelphia: Saunders, 1993. p. 390-399.
- 10 - FELDMAN, E. D.; NELSON, R. C. Clinical and diagnostic evaluation of the male reproductive tract. In: FELDMAN, E. D.; NELSON, R. C. **Canine and Feline Endocrinology and Reproduction**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996. p. 673-690.
- 11 - BLOM, E. **On the evaluation of bull semen with special reference to the employment for artificial insemination**. 1950. Thesis. Copenhagen, 1950.
- 12 - LEME, D. P.; PAPA, F. O. Identificação das células testiculares de cão através da punção aspirativa por agulha fina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 21, n. , p. 67-68, 1997.
- 13 - RAJWANSHI, A.; RADHIKA, S.; VAIDYANATHAN, S. Fine needle aspiration cytology in azoospermic males. **Diagnostic Cytolopathology**, v. 7, p. 3-5, 1991.
- 14 - LEME, D. P. **Características seminais, citológicas e histológicas antes e depois do estresse testicular em garanhões**. 1998, 129 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1998.
- 15 - CARVALHO, C. T. Sêmen em grandes felinos. **Revista de Medicina Veterinária**, v. 2, n. 4, p. 195-201, 1968.
- 16 - MIES-FILHO, A.; TELECHEA, N. L.; BOHRER, J. L.; WALLAWER, W. P. Produção espermática de *Panthera onca*. **Arquivos da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, v. 2, n. 1, p. 55-65, 1974.
- 17 - BARTH, A. D.; OTO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames, Iowa: University Press, 1989. 285 p.
- 18 - GANGULY, J.; RAO, M. R. S.; MURTHY, S. K.; SARADA, K. Systemic mode of action of vitamin A. **Vitamins Hormones**, v. 38, p. 1, 1980.
19. HUANG, H. F. S.; DYRENFURTH, I.; HEMBREE, W. C. Endocrine changes associated with germ cell loss during vitamin A induced recovery of spermatogenesis. **Endocrinology**, v. 112, n. 4, p. 1163-1171, 1983.
- 20 - JOHNSON, A. D.; GOMES, W. R.; VANDERMARK, N. L. **The testis**. New York: Academic Press, 1970. v. 3, p. 170.
- 21 - THREFFALL, W. R.; LEPINE, A. R.; BURR, J. R. The influence of diet on sperm quality and quantity. In: CAREY, D. P.; NORTON, S. A.; BOLSER, S. M. **Recent advances in canine and feline nutrition research**, [s. l. : s. n.], 1996. p. 99-114.
- 22 - WILDT, D. E.; BROWN, J. L.; BUSH, M.; BARONE, M. A.; COOPER, K. A.; GRISHAM, J.; HOPWARD, J. G. Reproductive status of cheetahs (*Acynonix jubatus*) in north american zoos: the benefits of physiological surveys for strategic planning. **Zoo Biology**, v. 12, n. 1, p. 45-80, 1993.
23. ROELKE, M. E.; MARTENSON, J. S.; O'BRIEN, S. J. The consequences of demographic reduction and genetic depletion in the endangered *Florida panther*. **Current Biology**, v.3, n.6, p.340-350, 1993.
- 24 - MELLEEN, J. D. Factors influencing reproductive success in small captive exotic felids (*Felis spp*) : a multiple regression analysis. **Zoo Biology**, v. 10, n. 2, p. 95-110, 1991.
- 25 - ADANIA, C. H.; DINIZ, L. S. M.; GOMES, M. S.; FILONI, C.; SILVA, J. C. R. Avaliação das condições veterinárias e de manejo dos pequenos felinos neotrópicos em cativeiro no Estado de São Paulo. **Revista de Educação Continuada do Conselho Regional de Medicina Veterinária do Estado de São Paulo**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 44-54, 1998.