

**HUMBERTO FERNANDES VELOSO NETO**

**ULTRASSONOGRAFIA QUANTITATIVA DA DEGENERAÇÃO  
TESTICULAR INDUZIDA EM OVINOS**

**RECIFE**

**2017**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**HUMBERTO FERNANDES VELOSO NETO**

**ULTRASSONOGRAFIA QUANTITATIVA DA DEGENERAÇÃO  
TESTICULAR INDUZIDA EM OVINOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Veterinária do Departamento de Medicina  
Veterinária da Universidade Federal Rural de  
Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do  
grau de Doutor em Ciência Veterinária.

Orientador: Professor Dr. Paulo Fernandes de Lima

**RECIFE**

**2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE  
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

V438u Veloso Neto, Humberto Fernandes.  
Ultrassonografia quantitativa da degeneração testicular induzida  
em ovinos / Humberto Fernandes Veloso Neto . – 2017.  
81 f. : il.

Orientador: Paulo Fernandes de Lima.  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de  
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária,  
Recife, BR-PE, 2017.

Inclui anexo(s) e referências.

1. Ultrassonografia 2. Histograma 3. Ovino I. Lima, Paulo  
Fernandes de, orient. II. Título

CDD 636.089

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**ULTRASSONOGRAFIA QUANTITATIVA DA DEGENERAÇÃO  
TESTICULAR INDUZIDA EM OVINOS**

Tese de Doutorado elaborada por

**HUMBERTO FERNANDES VELOSO NETO**

Apresentada em ...../...../.....

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Paulo Fernandes de Lima  
Orientador - DMV/UFRPE

---

Prof. Dr. Marcos Antônio Lemos de Oliveira  
Examinador -DMV/UFRN

---

Dr. Fernando Tenório Filho  
Examinador -IPA/PE

---

Prof. Dr. Fabiano Séllos Costa  
Examinador -DMV/UFRPE

---

Dr. Marlon Vasconcelos Azevedo  
Examinador – Equestre Clínica de Equinos

**Com lembranças e saudades**

À minha madrinha

*Mariana do Lar da Silva Santos*  
*(in memoriam)*

**DEDICO...**

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus, pelo dom da vida, pela força e coragem durante esta longa caminhada e por colocar em meu caminho pessoas excepcionais sem as quais nada disso faria sentido, minha família e amigos.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, por ser minha base de formação acadêmica e com aprendizado que levarei por toda vida “*Ex Semine Seges - Como semeares, colherás*”.

À minha mãe, Lúcia de Fátima Dutra Veloso, fonte inesgotável de energia positiva, por ser minha maior incentivadora e meu maior exemplo de pessoa e de profissional.

Ao meu pai Joaquim da Silva Neto, que mesmo distante sempre acreditou e cobrou o melhor de mim.

Aos meus irmãos, Flávio e Kim Rafael que me estimularam a buscar novos conhecimentos e me deram apoio incondicional à minhas empreitadas. Minhas tias e tios Célia, Maisa, Diana, José e tantos outros, meu primos e primas que fazem parte da minha Grande Família Veloso – Areolino Silva, onde sempre encontrei meu porto seguro e encontro incentivo para ser uma pessoa melhor, sei que torceram muito, mesmo estando distantes.

Ao meu Orientador Professor Paulo Fernandes de Lima que desde os tempos da graduação me acompanha e ao longo de todos esses anos sempre se mostrou um exemplo de profissional a se espelhar, obrigado pela amizade, ensinamentos e a oportunidade do doutorado.

Ao Professor Marcos Antônio Lemos de Oliveira pela co-orientação e os ensinamentos, sempre atencioso e solícito durante os anos de pós-graduação, obrigado pela amizade e conselhos inestimáveis.

Aos demais professores e funcionários do departamento: Professor Coutinho, Dra. Joana D'Árc e Alcir (presidente), pela valiosa ajuda em vários momentos de minha formação. Professora Éllen Cordeiro por compartilhar um pouco de sua experiência. Dona Sônia, Seu Jorge, Cleide (irmã), pela convivência diária e as boas conversas na pausa do café.

Aos amigos do laboratório de Biotecnologia de Reprodução Animal: Maiana, Pábola, Ludymila, José Carlos, Priscila e Marcelo, pelo companheirismo durante a caminhada nessa vida de pós-graduando. Mateus, pela ajuda com a aquisição dos animais.

Aos amigos que a Veterinária me deu e que sempre torceram por mim: Professora Jeine, Joely, Amanda, Ana, Arlindo, Bruno, Paty, Dr. Renan e Dra. Karol, David, Joyce, Ana Beatriz e tantos outros (são muitos, impossível citar todos os nomes), mas que contribuíram para meu desenvolvimento pessoal e profissional em algum momento da minha formação.

Aos caros amigos que Campina Grande me deu, que estão ao meu lado em outra jornada tão fascinante e transformadora quanto esta, que desde o início me estimularam a ir adiante e sempre acreditaram em mim, um conglomerado de bandoleiros: Ana Luíza (Analu), Víctor (Bitel), Camila, Chico, Erick (Ericão) Ana Flavia (Flavinha), Gaby, Igor (Surubim), Isabela (Diniz), Jéssica, Ju Lustosa, Ju Pierre, Grande Kaio, Ketila (Maga), Keyvid, Lisyá, Marco, Pedrão, Ronaldo, Rudá (Budá), Samile (Preta), Yasmin, minha afilhada Yú, Anne, Maria

Eduarda (Dudinha), Ayanne, Leo Porto, e em especial ao amigo Renan Vilar Correia de Lima Junior, pelas conversas compartilhadas e o forte apoio; a todos amigos e colegas das ligas acadêmicas que convivi e convivo da LANNECG na pessoa da ex-presidente Adysia Moreira (chefinha) e o Dr. Amauri exemplo notável de profissional, aos colegas da LATECG todos possuem uma parcela de contribuição, direta ou indiretamente e que se traduz na conclusão dessa etapa.

E por último e não menos importante, agradeço a todos os animais, que mesmo inocentemente, contribuíram de forma indispensável para o meu desenvolvimento e evolução científica.

Obrigado a todos!

“O sonho é que leva a gente para a frente. Se a gente for seguir a razão, fica quietado, acomodado”

**Ariano Vilar Suassuna**

## RESUMO

**Título:** Ultrassonografia Quantitativa da Degeneração Testicular Induzida em Ovinos

**Autor:** Humberto Fernandes Veloso Neto

**Orientador:** Paulo Fernandes de Lima

Nesta Tese, constituída de dois experimentos, avaliou-se a eficiência da ultrassonografia com a técnica de histograma da escala de cinza em diferentes processos de degeneração testicular em ovinos. **O Primeiro Experimento** foi conduzido objetivando-se acompanhar a progressão da degeneração isquêmica testicular induzida com intuito de validar as análises de padrões de ecogenicidade e ecotextura, avaliando-se também o perímetro escrotal e o volume testicular. Os machos (n=6), com idade 11 e 18 meses foram submetidos a análise de biometria testicular com obtenção do perímetro escrotal e volume testicular, e aquisição de imagens ultrassonográficas foram realizadas para determinação de valores de ecogenicidade e ecotextura no software GIMP 2.8® para determinação de padrões pré isquemia. As aferições desses parâmetros foram realizadas antes da isquemia mecânica induzida com burdizzo (D0) e nos dias 1 (D1), 4 (D4), 8 (D8), 16 (D16), 24 (D24), 35 (D35) e 50 (D50). O valor da ecogenicidade no testículo hígado foi de  $105,01 \pm 8,23$  e o da ecotextura pela variação do eco foi de  $13,24 \pm 0,88$ . O comportamento da ecogenicidade, representado pelo valor numérico de pixel, mostrou que o impedimento mecânico da irrigação testicular exerceu influência ( $P < 0,05$ ) já a partir do primeiro dia (D1) após o procedimento, o qual continuou em declínio que foi observado no D4 com valor de  $50,11 \pm 7,21$  ( $P < 0,05$ ). O valor numérico de pixel manteve-se constante até o 35º dia, sendo apenas recuperado ao final do experimento (D50), quando o processo de fibrose substituiu os tecidos do parênquima testicular e proporcionou significativo aumento ( $P < 0,05$ ) da ecogenicidade para valor de  $62,19 \pm 7,15$ , semelhante ao valor verificado em D1 ( $P > 0,05$ ). O comportamento do valor numérico da ecotextura que inicialmente foi  $13,24 \pm 0,88$ , mostrou que somente a partir do D4 ocorreu aumento ( $P < 0,05$ ) da homogeneidade do parênquima testicular em relação ao D0 diminuindo para valores de  $11,01 \pm 1,61$ , fato também verificado nos demais dias de avaliação, exceto aquela realizada no D50 que aumentou a heterogeneidade subindo para  $14,42 \pm 1,77$ . Conclui-se que perante uma lesão aguda, os valores da ecotextura obtidos pela amplitude de variação do eco não são suficientes para respaldar uma avaliação diagnóstica precisa, sendo necessário correlacionar à alteração dos valores da ecogenicidade e que macroscopicamente, a degeneração testicular se caracteriza pela redução significativa do perímetro escrotal e do volume testicular. **O Segundo Experimento** objetivou-se avaliar o

papel da análise quantitativa da escala de cinza nas imagens ultrassonográficas de testículos de ovinos com insulação escrotal, acompanhando sua fase de degeneração e recuperação. Foram utilizados 6 animais adultos sem raça definida com idade entre 18 - 20 meses de idade. O experimento foi dividido em três períodos. No período pré-insulação, foram realizados exames de análise do sêmen, biometria testicular e aquisição de imagens ultrassonográficas para posterior análise computacional quantitativa da ecotextura e da ecogenicidade através do histograma de cinza e assim estabelecer um padrão de normalidade. Na fase de insulação escrotal, colocou-se bolsas de tecido, envolvendo o escroto, com dupla parede e camada interna de algodão hidrófobo com cerca de 5 mm de espessura tendo a duração de oito dias, ao quarto dia (D4I) realizou-se medidas da biometria testicular, espermograma e análises das imagens ultrassonográficas. A fase de pós-insulação iniciou com a retirada das bolsas sendo considerado este dia como o dia 0 e foram realizadas aferições testiculares, coletas de sêmen, aferição das medidas testiculares e acompanhamento ultrassonográfico a cada sete dias, até a recuperação dos parâmetros seminais. Na biometria testicular observou diminuição das medidas de comprimento e volume escrotal no primeiro dia do período pós-insulação ( $P < 0,05$ ). Dentre os parâmetros espermáticos foram observados diminuição ( $P < 0,05$ ), com 4 dias de estresse térmico da motilidade, vigor e turbilhonamento,  $35 \pm 20,74$  %,  $1,83 \pm 0,75$  (0-5),  $2,3 \pm 0,47$  (0-5) respectivamente, associado a uma diminuição da ecogenicidade, que inicialmente era  $100 \pm 4,9$  e  $99,69 \pm 5,3$  de intensidade pixel. Após quatro dias de estresse térmico, a ecogenicidade teve uma queda para valores de  $73,1 \pm 14,2$  ( $P < 0,05$ ) aumento para os valores próximos aos do período pré-insulação que ocorreu aos 63 dias do período pós-insulação. A ecotextura não apresentou variação nos valores inicialmente ( $P > 0,05$ ). Ecogenicidade demonstrou uma precocidade com relação aos outros parâmetros no retorno aos padrões definidos no período pré-insulação. Conclui-se portanto que a indução do estresse térmico caracterizou com redução da biometria testicular, declínio na qualidade seminal e diminuição da intensidade pixel na imagem ultrassonográfica, esta última sendo um parâmetro sensível tanto na fase aguda em conjunto a com motilidade, vigor e turbilhonamento quanto na recuperação testicular, mostrando-se mais precocemente que outros parâmetros.

## ABSTRACT

**Title:** Quantitative Ultrasonography of Testicular Induced Degeneration in Rams

**Author:** Humberto Fernandes Veloso Neto

**Advisor:** Paulo Fernandes de Lima

In this thesis, made up of two experiments, in different processes of testicular degeneration in rams it was evaluated the efficiency of ultrasonography with the grayscale histogram technique. The **First Experiment** was carried out with the aim of monitoring the progression of induced ischemic degeneration validate analyzes of echogenicity and ecotexture patterns, also evaluating the scrotal perimeter and testicular volume. The males ( $n = 6$ ), aged 11 and 18 months, underwent testicular biometry analysis to obtain the scrotal and testicular volume, and acquisition of ultrasound images were performed to determine echogenicity and echotexture values in the GIMP software 2.8® for determination of pre-ischemia patterns. The measurements of these parameters were performed before mechanical ischemia induced with burdizzo (D0) and on days 1 (D1), 4 (D4), 8 (D8), 16 (D16), 24 (D24), 35 (D35) and 50 (D50). The value of echogenicity in the healthy testicle was  $105.01 \pm 8.23$  and that of the ecotexture by echo variation was  $13.24 \pm 0.88$ . The behavior of the echogenicity, represented by the numerical value of the pixel, showed that the mechanical impedance of the testicular irrigation exerted influence ( $P < 0.05$ ) already from the first day (D1) after this procedure, which continued in decline that was observed in D4 with a value of  $50.11 \pm 7.21$  ( $P < 0.05$ ). It was remained the pixel value constant until the 35<sup>th</sup> day and was only recovered at the end of the experiment (D50), when the fibrosis process replaced. The tissues of the testicular parenchyma and provided a significant increase ( $P < 0.05$ ) in echogenicity to a value of  $62.19 \pm 7.15$ , similar to the value verified in D1 ( $P > 0.05$ ). The behavior of the numerical value of the ecotexture, which was initially  $13.24 \pm 0.88$ , showed that only from the D4, there was an increase ( $P < 0.05$ ) in the homogeneity of the testicular parenchyma ecotexture relative to the D0 decreasing to values Of  $11.01 \pm 1.61$ . A fact also observed on the other days of evaluation, except for the one performed in the D50 that increased the heterogeneity to  $14.42 \pm 1.77$ . It is ended that for an acute lesion, echocardiographic values obtained by amplitude of echo variation is not sufficient to support a precise diagnostic evaluation, being necessary to correlate with the alteration of echogenicity values and that, macroscopically; testicular degeneration is characterized by the reduction of the scrotal perimeter and testicular volume. The **Second Experiment** aimed to evaluate the role

of quantitative gray scale analysis in the ultrasonographic images of sheep testicles with scrotal insulation, accompanying their degeneration and recovery phases. We used six adult non - defined animals aged 18 to 20 months. We divided the experiment into three periods. It performed in the pre-insulation period, semen analysis, testicular biometry and ultrasonographic imaging for subsequent quantitative computational analysis of ecotexture and echogenicity using the gray histogram to establish a normality pattern. It placed in the scrotal insulation phase, tissue pouches, involving the scrotum, with a double wall and inner layer of hydrophobic cotton with about five mm. (D4I). We performed measurements of testicular biometric, spermogram, and ultrasonographic imaging. The post-insulation phase started with the withdrawal of the bags, it considered this day as day 0 and testicular measurements, semen collections, and testicular measurements and ultrasound monitoring were performed every seven days until the seminal parameters were recovered. In testicular biometry, the length and scrotal volume measurements decreased on the first day of the post-insulation period ( $P < 0.05$ ). Among the sperm parameters, a decrease ( $P < 0.05$ ) was observed, with 4 days of thermal stress of motility, vigor and turbulence,  $35 \pm 20.74\%$ ,  $1.83 \pm 0.75$  (0-5),  $2, 3 \pm 0.47$  (0-5) respectively, associated with a decrease in echogenicity, which was initially  $100 \pm 4.9$  and  $99.69 \pm 5.3$  pixel intensity. After four days of thermal stress, echogenicity had a Drop to values of  $73.1 \pm 14.2$  ( $P < 0.05$ ) increase for values close to those of the pre-insulation period that occurred at 63 days post-insulation period. The ecotexture did not change in the values initially ( $P > 0.05$ ) without variation in the ecotexture. Ecogenicity showed a precocity with respect to the other parameters in return to the standards defined in the preinsulation period. It was concluded that the induction of thermal stress was characterized by a reduction of testicular biometry, a decline in seminal quality and a decrease in pixel intensity in the ultrasound image, the latter being a sensitive parameter both in the acute phase together with motility, vigor and turbulence, and Testicular recovery, showing itself earlier than other parameters.

## LISTA DE TABELAS

### Páginas

#### Experimento II

|                 |   |    |
|-----------------|---|----|
| <b>Tabela 1</b> | Valores médios dos parâmetros da biometria escrotal (perímetro escrotal, comprimento, largura e volume testicular) em carneiros submetidos à insulação escrotal por oito dias nos períodos de pré- insulação, insulação e pós-insulação escrotal. Letras diferentes na mesma coluna indica diferença ( $P < 0,05$ ) dos valores médios ( $\bar{X} \pm s$ )..... | 56 |
| <b>Tabela 2</b> | Valores médios dos parâmetros da análise seminal em carneiros submetidos à insulação escrotal por oito dias nos períodos de pré-insulação, insulação e pós-insulação escrotal. Letras diferentes na mesma coluna indica diferença ( $P < 0,05$ ) dos valores médios ( $\bar{X} \pm s$ ).....  | 58 |

## LISTA DE FIGURAS

|                      |   | <b>Páginas</b> |
|----------------------|---|----------------|
| <b>Experimento I</b> |   |                |
| <b>Figura 1</b>      | Imagem ultrassonografica de testículo de ovino em corte longitudinal (A) e transversal (B) para delimitação e aferição da escala de cinza em seis áreas no sentido longitudinal após identificação do mediastino e quatro áreas na posição transversal.....   | 40             |
| <b>Figura 2</b>      | Histograma de cinza elaborado pelo software GIMP® 2.8, à partir da análise da área selecionada da imagem ultrassonográfica do testículo de ovino.....   | 41             |
| <b>Figura 3</b>      | Valores médios da ecogenicidade, representada pelo valor numérico de pixel, do parênquima testicular de ovinos após a indução da isquemia durante o período experimental. Letras diferentes indicam diferença ( $P < 0,05$ ) entre os valores médios ( $\bar{X} \pm s$ ) .....                                      | 42             |
| <b>Figura 4</b>      | Valores médios da ecotextura representada pela amplitude de variação do eco (desvio padrão da intensidade pixel) do parênquima testicular de ovinos após a indução da isquemia durante o período experimental. Letras diferentes indicam diferença ( $P < 0,05$ ) entre os valores médios ( $\bar{X} \pm s$ ) ..... | 42             |
| <b>Figura 5</b>      | Valores médios do volume testicular ( $\text{cm}^3$ ) em ovinos após a indução da isquemia durante o período experimental. Letras diferentes indicam diferença ( $P < 0,05$ ) entre os valores médios ( $\bar{X} \pm s$ ) comparados ao D0.....   | 43             |
| <b>Figura 6</b>      | Valores médios do perímetro escrotal ( $\text{cm}^3$ ) em ovinos após a indução da isquemia durante o período experimental. Letras diferentes indicam   |                |

diferença ( $P < 0,05$ ) entre os valores médios ( $\bar{X} \pm s$ ) comparados ao D0..... 43

**Figura 7** Gráfico de regressão linear com as variáveis de volume testicular e perímetro escrotal em ovinos após a indução da isquemia. (Valor de Pearson  $r = 0,97$ ;  $P < 0,05$ )..... 44

### Experimento II

**Figura 1** Variação da ecogenicidade testicular em carneiros submetidos à insulação escrotal por oito dias nos diferentes períodos do experimento. Letras diferentes indica diferença ( $P < 0,05$ ) entre os valores médios ( $\bar{X} \pm s$ ) ..... 59

**Figura 2** Variação da ecotextura testicular em carneiros submetidos à insulação escrotal por oito dias nos diferentes períodos do experimento. Letras diferentes indica diferença ( $P < 0,05$ ) entre os valores médios ( $\bar{X} \pm s$ )..... 59

## SUMÁRIO

|  | <b>Páginas</b> |
|--|----------------|
| DEDICATÓRIA.....   | v              |
| AGRADECIMENTOS.....  | vi             |
| EPIGRAFE.....  | vii            |
| RESUMO.....  | vii            |
| ABSTRACT.....  | x              |
| LISTA DE TABELAS.....  | xii            |
| LISTA DE FIGURAS.....  | xiii           |
| SUMÁRIO.....   | xv             |
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>1</b>       |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>   | <b>4</b>       |
| <b>2.1. Testículos e seu Parênquima.....</b>   | <b>4</b>       |
| <b>2.1.1 Desenvolvimento Testicular.....</b>   | <b>6</b>       |
| <b>2.1.1 Espermatogênese.....</b>  | <b>7</b>       |
| <b>2.2 Degeneração Testicular.....</b>   | <b>9</b>       |
| <b>2.2.1 Estresse Térmico.....</b>   | <b>10</b>      |
| <b>2.2.2 Regeneração Testicular.....</b>   | <b>12</b>      |
| <b>2.2.3 Fibrose Testicular.....</b>   | <b>12</b>      |
| <b>2.3 Ultrassonografia na Reprodução Animal.....</b>  | <b>13</b>      |
| <b>2.3.1 Ultrassonografia na Andrologia.....</b>   | <b>14</b>      |
| <b>2.3.2 Escala de Cinza na Ultrassonografia.....</b>  | <b>15</b>      |
| <b>3. REFERÊNCIAS.....</b>   | <b>19</b>      |
| <b>4. ARTIGOS.....</b>   | <b>35</b>      |
| <b>4.1 Análise da isquemia testicular induzida em carneiros por meio da ultrassonografia com escala de cinza.....</b>          | <b>37</b>      |
| <b>4.2 Análise do estresse térmico testicular induzido em carneiros por meio da ultrassonografia com escala de cinza .....</b> | <b>52</b>      |

## 1 - INTRODUÇÃO

Dentro do contexto de crescimento da ovinocultura no país, segundo Simplício et al. (2007) os reprodutores são de fundamental importância na produtividade. A seleção de machos ovinos para serem utilizados com reprodutores é um passo importante para melhorar o desempenho do rebanho (PACHECO e QUIRINO, 2010). Os machos podem ser utilizados em monta natural, em programas de inseminação artificial ou outras biotécnicas da reprodução e por serem passíveis de maior pressão de seleção são responsáveis por um acelerado melhoramento genético do rebanho (SIMPLICIO et al., 2007).

Carneiros reprodutores com alto desempenho sexual levará a uma maior disseminação do material genético desejável, com o aumento da eficiência produtiva. Assim, dentre as aptidões para uma avaliação da fertilidade na escolha de reprodutores, além do teste de progênie, incluem a qualidade seminal, aspectos testiculares e genitália externa e o comportamento reprodutivo (PACHECO e QUIRINO, 2010).

O declínio da fertilidade em machos tem como causa mais comum, a degeneração testicular, que pode ser resultante de vários fatores, como a temperatura do ambiente elevada, alterações vasculares, intoxicações, infecções, desequilíbrios nutricionais e distúrbios hormonais (CUNHA et al., 2015). Na região Nordeste do Brasil, as altas temperaturas ambientais estão associadas às variações na qualidade do sêmen em épocas mais quentes do ano, principalmente nas raças que não estão adaptadas à região (MAIA et al., 2011).

A avaliação da capacidade reprodutiva dos machos, seja por infertilidade, subfertilidade ou mesmo para seleção de reprodutores é analisada, com precisão, através da realização de um exame clínico-andrológico minucioso (UNANIAN, 2000; MARTINS, 2006). Porém, se fez necessário a evolução das técnicas de diagnóstico, e com a introdução da ultrassonografia no exame andrológico houve um grande avanço nos estudos (SANCHES e AFONSO, 2000; NEVES et al., 2010). Em seu trabalho, TEIXEIRA et al. (2011) demonstraram que a ultrassonografia é eficiente para diagnosticar alterações escrotais assintomáticas aos exames convencionais e contribui para o melhoramento da reprodução animal.

O diagnóstico ultrassonográfico é uma técnica inócua e não invasiva que permite a visualização das interfaces teciduais (AHMAD et al., 1999). O uso da ultrassonografia surgiu para complementar outras formas de diagnóstico, no caso da andrologia, o espermograma, tornando mais rápido e preciso a chegada ao diagnóstico definitivo (PEIXOTO et al., 2010).

Na andrologia, como em outras áreas, a ultra-sonografia é comumente usada para a avaliação de estruturas macroscópicas internas e tem sido umas das principais ferramentas para avaliação testicular, epididimal e de glândulas sexuais acessórias em ovinos sadios e férteis (JUCÁ et al., 2009; ANDRADE et al., 2012). Estudos evidenciaram que as alterações de ecogenicidades na ultrassonografia do parênquima testicular estão intimamente relacionadas com as características histomorfológicas dos túbulos seminíferos (EVANS et al., 1996).

Achados ultrassonográficos de degeneração do parênquima testicular em bodes naturalmente inférteis, foram descritos na literatura (AHMAD et al., 1993) e também a associação de achados ultrassonográficos e histopatológicos de testículo e epidídimo submetidos a isquemia induzida unilateral em caprinos e ovinos (AHMAD et al., 1999). No entanto, ultrassonografia é um exame operador-dependente, logo existe uma subjetividade na análise da imagem ultrassonográfica contribuindo para divergências de interpretação entre examinadores. (LEE et al., 2006). Para formação de uma imagem ultrassonográfica é necessária existe a combinação de vários pixels “picture elements” que corresponde a densidade de um tecido observada por ultrassonografia, o olho humano não consegue quantificar os pixels, o que leva a diferentes percepções individuais e conseqüentemente variações na interpretação da imagem (PIERSON e ADAMS, 1995).

A análise da escala-cinza ultrassonográfica surgiu como uma ferramenta para analisar de forma quantitativa o brilho e a uniformidade da imagem através de softwares, o que levou a um grande impacto no campo da pesquisa animal e da reprodução clínica (GINTHER, 1995). A análise computacional destas imagens permite identificar diferenças de ecotextura imperceptíveis ao olho humano, assim como mensurá-las de forma bastante objetiva, quantificando os valores de cada pixel da imagem, com objetivo de reduzir as inconsistências da avaliação visual subjetiva (SINGH et al., 2003).

Em estudos com touros Arteaga et al. (2005) concluíram que os efeitos deletérios na qualidade do semên devido a insulação escrotal induzida experimentalmente, foi associado

com alterações da intensidade pixel do ultrassonograma testicular. Giffin et al. (2012) afirmaram que o valor da intensidade pixel é um bom indicador da microestrutura dos túbulos seminíferos *in situ* e *ex vivo* .

Haja vista, que o estudo de imagens com análise quantitativa de cinza pode vir aumentar a sensibilidade das observações dos padrões de ecoextura e ecogenicidade tornando-as mais objetivas. A aplicação dessa ferramenta poderá contribuir para melhor interpretação de imagens da degeneração testicular tanto isquêmica quanto decorrente da insulação escrotal em carneiros.

## 2 - REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 TESTÍCULOS E SEU PARÊNQUIMA

Os testículos têm como função a secreção hormonal de testosterona e espermatogênese, esta última resulta de um processo contínuo e diário de produção de espermatozóides a partir das espermatogônias, que são células da linhagem germinativa (STANBENFELD e EDQVIST, 1996). Os testículos estão localizados na bolsa escrotal, onde mantêm a uma temperatura de 2 a 6°C abaixo da temperatura corporal, sendo cobertos por uma cápsula fibrosa de tecido conjuntivo denso chamada túnica albugínea, que contém as artérias e veias testiculares (O'DONNELL et al., 2001). As gônadas masculinas migram da cavidade abdominal em direção à bolsa escrotal por volta dos 80 dias de gestação nos ovinos (KILGOUR et al., 1998).

O parênquima testicular é em grande parte constituído por túbulos seminíferos bastante contorcidos, exceto por uma região curta denominada *tubulus* reto, que estão em contato com a *rete testis*, uma rede anastomosada de canais que facilita a passagem do espermatozóide para fora do testículo. (DYCE et al., 1996). Em carneiros, a *rete testis* está localizado centralmente e se estende até aproximadamente três quartos do comprimento do testículo (HEMEIDA et al., 1978). Na borda caudo-medial do testículo se encontra o epidídimo que fica firmemente unido ao testículo nos polos. A cabeça (*caput*) do epidídimo é anexada ao pólo dorsal do testículo através dos ductos eferentes, uma extensão da *rete testis* (DYCE et al., 1996) que nos ovinos são em torno de 17–20 ductos (HEMEIDA et al., 1978) que se juntam para formar um único ducto epididimal, através do qual os espermatozóides são transportados para o corpo (*corpo*) e finalmente para a cauda do epidídimo. O tempo de transporte dos espermatozóides pelo epidídimo dura em média 14 -16 dias (JONES, 1999) para em seguida serem liberados no ducto deferente e posteriormente na uretra.

Os testículos e epidídimos são suspensos do abdômen em carneiros pelo cordão espermático que pode ser identificado no colo escrotal contendo vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e o ducto deferente (DYCE et al., 1996). Todo esse conjunto se localiza no interior do saco escrotal, que possui várias camadas. Mais externamente há a pele, que está aderida a uma camada fibromuscular chamada de túnica dartos, que auxilia na termorregulação, mais internamente existe as fâscias espermáticas (interna e externa) e mais profundamente há a fâscia

cremasterica contendo o músculo cremáster, que regula a posição do escroto em relação ao corpo (SETCHELL, 1998) revestindo o parênquima testicular há a túnica albugínea uma membrana fibrosa espessa que compreende a maior parte da cápsula testicular. A *túnica vasculosa*, às vezes referida como a camada interna da túnica albugínea (ARENAS et al., 1997), consiste de um tecido conjuntivo frouxo rico em vasos sanguíneos que nutre o parênquima (O'DONNELL et al., 2001).

O parênquima testicular está dividido em dois compartimentos distintos. Nessa divisão morfofuncional, um compartimento é constituído pelos túbulos seminíferos, que ocupam cerca de 85% do volume testicular nos ovinos (WROBEL et al., 1995), com aspecto enovelado contendo o epitélio germinativo e as células de Sertoli em seu interior. O outro compartimento consiste no espaço entre os túbulos, composto pelo estroma testicular formado pelo tecido conjuntivo, onde se localizam, os vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e as células de Leydig (ARAI et al., 1998; McMANUS et al., 2010), além de uma camada de células musculares lisas modificadas que rodeiam os túbulos seminíferos, conhecidos como células mióides peritubulares (KERR et al., 2006). Em carneiros, estas células são circundadas em um tecido conjuntivo solto com um vaso linfático localizado centralmente e vasos sanguíneos posicionados periféricamente (FAWCETT et al., 1973).

As células da linhagem germinativa são estágios sucessivos de um processo contínuo de diferenciação até a formação do gameta masculino. O epitélio germinativo é composto por espermatogônias do tipo A e B, espermatócitos primário e secundário, espermatídes e espermatozoides. As células de Sertoli fornecem suporte mecânico para as células germinativas, formam a barreira hematotesticular e participam da nutrição e diferenciação através da manutenção da alta concentração de testosterona no túbulo seminífero, sendo condição importante para manutenção da espermatogênese. As células de Leydig são as principais células de secreção de testosterona e localizam-se no interstício, junto com fibroblastos, macrófagos, mastócitos, células conjuntivais indiferenciadas. (NASCIMENTO e SANTOS, 2003; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2012). Nos ovinos, as células de Leydig são relativamente discretas, ocorrendo isoladamente ou em pequenos aglomerados em um abundante tecido conjuntivo. O estroma que inclui muitos fibroblastos e colágeno com interstício bem vascularizado por vasos sanguíneos de pequeno e grande calibre. As células de Leydig, compreendem cerca de 7,5% do tecido intersticial ou 1% de todo o testículo em carneiros, (FAWCETT et al., 1973).

### 2.1.1. DESENVOLVIMENTO TESTICULAR

O desenvolvimento testicular em carneiros possui três fases que são divididas em: pré-púbere, púbere e pós-puberal. Nas fases pré-púbere e púbere há o aumento acelerado do perímetro escrotal (SANFORD et al., 2000; MARTINS et al., 2003) devido principalmente ao desenvolvimento acelerado do parênquima testicular (FRANÇA e RUSSELL, 1998). Enquanto que a fase de pós-adolescência é caracterizada por crescimento testicular lento, com tendência à estabilização (MARTINS et al., 2003; SOUZA et al., 2000). Esse crescimento lento se deve ao fato de que, mesmo após a maturidade sexual, os túbulos seminíferos ainda apresentam pequenos crescimentos em seu comprimento. Contudo, os túbulos já ocupam seu volume adulto, cerca de 84 a 86% do testículo (STEGER; WROBEL, 1996).

A taxa de crescimento testicular é determinada pelo início da atividade funcional das células de Leydig, que são essenciais para a função normal do sistema reprodutivo do macho (RUSSELL et al., 1994). Em carneiros, o volume total de tecido intersticial está correlacionado positivamente com a produção de células germinativas e a população das células de Sertoli está relacionada ao tamanho adulto dos testículos junto com produção espermática (SOUZA, 2003).

Entre o nascimento e a puberdade, o número de células de Sertoli aumenta consideravelmente, e pode ser influenciado por fatores tais como: a raça do animal, estação de nascimento, nutrição e ambiente hormonal (HOCHEREAU-DE-REVIERS et al., 1987).

O volume testicular de cordeiros entre duas e oito semanas de vida é de aproximadamente 1,5cm<sup>3</sup>. O epitélio seminífero nessa faixa etária é composto por células de Sertoli indiferenciadas e pré-espermatogônias I, localizadas no centro dos túbulos seminíferos. Entre oito e treze semanas, o volume testicular alcança 5cm<sup>3</sup>, com os túbulos ocupando cerca da metade do volume, (STEGER e WROBEL, 1996). As células de Sertoli indiferenciadas multiplicam-se, em processo mediado pelo FSH (KILGOUR et al., 1998), e formam uma camada contínua ao redor dos túbulos. As pré-espermatogônias I migram para a periferia dos túbulos e delas originam-se as primeiras pré-espermatogônias II (STEGER e WROBEL, 1996).

Durante o desenvolvimento testicular entre treze e dezoito semanas de idade, o volume testicular ultrapassa 15cm<sup>3</sup>, com cerca de 60% ocupados pelos túbulos seminíferos que possuem com o diâmetro de 80µm. As células de suporte já apresentam características típicas das células

de Sertoli, e formam as primeiras junções entre si, ainda incompletas (STEGER e WROBEL, 1996).

No início da puberdade, aproximadamente entre dezoito e 24 semanas, o perímetro escrotal pode atingir cerca de 18 cm (SOUZA et al., 2001). O volume testicular supera os 25cm<sup>3</sup>. As células de Sertoli param de multiplicar-se e se diferenciam e suas junções intercelulares separam os compartimentos basal e adluminal. A espermatogênese inicia-se nesta fase, com a formação das primeiras espermatogônias A (STEGER e WROBEL, 1996).

Na pós-puberdade, as células de Sertoli passam a ligar-se mutuamente, formando a barreira hematotesticular e participando dos eventos cíclicos do epitélio seminífero (RUSSELL et al., 1994; STEGER e WROBEL, 1996). Correlação positiva e significativa foi descrita entre o número total de células de Sertoli e de espermatogônias A por testículo, confirmando que a eficiência da produção espermatogênica é estabelecida no início da espermatogênese (JOHNSON et al., 1994) com eficiência da espermatogênese de 47,58% em ovinos (BILASPURI e GURAYA, 1986).

### **2.1.2 ESPERMATOGÊNESE**

A espermatogênese é um processo altamente organizado que envolve a proliferação e diferenciação de células germinativas para formar espermatozóides maduros. (SHARPE et al., 2003).

Na fase proliferativa, as espermatogônias que são células germinativas primitivas, localizadas próximas da lâmina basal do epitélio se dividem por mitose como células-tronco e produzem várias gerações de células que podem continuar se dividindo sendo auto-renováveis ou progenitoras de outras espermatogônias, sendo essas chamadas de espermatogônias tipo A (OATLEY e BRINSTER, 2012; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2012) ou podem diferenciar-se em tipos mais avançados de células germinativas passando por diversos processos de divisão com a proliferação de tipos de espermatogônias diferenciadas como espermatogônias A2 e A3, espermatogônia intermediária e espermatogônias B1 e B2, a partir das espermatogônias B é que vão se diferenciar os espermatócitos (LOK et al., 1982). Em carneiros pode ocorrer até dez ciclos de divisão, com crescimento de forma exponencial, a população de espermatogônias

teoricamente resulta na produção de 1024 espermatócitos primários de uma única célula tronco (WROBEL et al., 1995).

A fase de meiose da espermatogênese inicia com os espermatócitos primários que são originados da divisão das espermatogônias B2, são células diploides e vão passar pela primeira divisão meiótica. Dessa divisão, serão formados os espermatócitos secundários que são células haploides que vão passar pela segunda divisão meiótica originando duas espermatídes. (HANDEL e SCHIMENTI, 2010; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2012) Assim, um espermatócito primário diplóide pode teoricamente dar origem a quatro espermatídes elevando o número potencial total de células filhas de uma célula tronco germinativa para 4096 espermatídes (WROBEL et al., 1995).

Na fase final da espermatogênese, não há divisões de células germinativas, sendo uma fase de diferenciação chamada de espermiogênese, na qual as espermatídes, inicialmente arredondadas sofrem amplas modificações nucleares e citoplasmáticas para formar o espermatozoide. Cinco eventos morfológicos principais ocorrem durante a espermiogênese: a formação do acrossoma que contém uma variedade de enzimas envolvidas na fecundação, a condensação e alongamento do núcleo; desenvolvimento do flagelo, perda do excesso de citoplasma com formação de corpos residuais e a formação de junções especializadas com as células Sertoli para orientar as cabeças de espermatídes no sentido da lâmina basal e o flagelo em desenvolvimento se projetando no lúmen do túbulo seminífero (KERR et al., 2006; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2012). Em carneiros as espermatídes redondas ocupam entre 34% e 40% do epitélio (WROBEL et al., 1995).

Ao final da espermiogênese, as espermatídes alongadas são liberadas para o lúmen através do processo de espermição, sendo resultado final o espermatozóide. Os espermatozoides recém-formados são transportados por contrações do músculo liso das células mióides peritubulares e da cápsula testicular e pelo fluxo de fluido no lúmen do túbulo seminífero para a *rete testis* (KERR et al., 2006).

## **2.2 DEGENERAÇÃO TESTICULAR**

A degeneração testicular é considerada uma das causas mais frequentes de redução da fertilidade dos machos domésticos, caracterizando-se por processos degenerativos e necróticos das células germinativas (JAINUDEEN e HAFEZ, 2003). É uma afecção de origem

multifatorial, e pode apresentar-se de maneira uni ou bilateral, a depender da causa, temporária ou permanente e podendo variar de discreta a severa sob o ponto de vista patológico (CAMP, 1997) sendo considerada a principal causa da subfertilidade e infertilidade nos animais que vivem em condições climáticas desfavoráveis (GABALDI e WOLF, 2002).

A degeneração causa alterações no epitélio germinativo dos túbulos seminíferos, os quais perdem a capacidade de produzir espermatozóides normais, dentre as causas têm-se: o estresse térmico, infecções localizadas ou sistêmicas, fatores nutricionais, distúrbios circulatórios, biópsias testiculares, fatores hormonais, traumatismos, radiações, substâncias tóxicas e medicamentos, tumores testiculares, fatores hereditários e processos auto-ímmunes. Porém, existem fatores que podem interferir na produção normal de espermatozóides como a estação do ano, idade, volume testicular e integridade dos tecidos envolvidos na reprodução como epidídimo (NASCIMENTO e SANTOS, 2003).

Como características iniciais do processo degenerativo, os testículos apresentam consistência flácida, o tamanho pode ser normal ou discretamente diminuído de volume. Em estágios mais avançados, o órgão diminui de tamanho, adquire consistência firme à palpação e se torna resistente ao corte devido ao aumento do tecido conjuntivo intersticial, em alguns casos pode ocorrer a mineralização de túbulos seminíferos (NASCIMENTO e SANTOS, 2003).

Histologicamente, caracteriza-se por degeneração de espermátides, baixa espermiogênese, células gigantes multinucleadas da fusão de várias espermátides, espermatogônias com citoplasma vacuolizado e com núcleo picnótico. Alguns túbulos vão mostrar ausência total de epitélio seminífero, membrana basal espessa e hialinizada com proliferação de tecido conjuntivo fibroso que invade e destroem os túbulos seminíferos nos casos avançados (JONES et al., 2000; NASCIMENTO e SANTOS, 2003).

### **2.2.1 ESTRESSE TÉRMICO**

Para que ocorra uma espermatogênese e esteroidogênese adequada, a temperatura testicular deve ser mantida 2-6 ° C mais baixa do que a temperatura corporal (KASTELIC e COULTER, 1993; MIEUSSET; BUJAN, 1995; O'DONNELL et al., 2001). Com o objetivo de manter a temperatura testicular menor que a corporal, a termorregulação escroto-testicular é um fenômeno complexo que tem numerosos mecanismos locais incluindo perda de calor por

contracorrente, regulação do fluxo sanguíneo, posição do testículo dada pelo músculo cremáster e túnica dartus, além da capacidade de produção de suor pelas glândulas sudoríparas (GABALDI e WOLF, 2002).

A localização testicular em bolsa cutânea pendulosa aumenta a área de superfície que facilita a exposição do cone vascular ao meio ambiente e permite que os testículos fiquem distantes do corpo do animal. O mecanismo de contracorrente do cordão espermático permite a troca de calor através do sangue venoso resfriado que sobe pelas veias do plexo pampiniforme e do sangue arterial na temperatura corporal que desce pela artéria testicular. A grande quantidade de glândulas sudoríparas e ausência de gordura no tecido subcutâneo da pele escrotal, facilita a sudorese que é importante na perda de calor. (KASTELIC e COULTER, 1993; SETCHELL, 1998). Portanto a falha de um ou a combinação de alguns destes mecanismos pode levar à infertilidade devido as alterações que podem ocorrer na espermatogênese e esteroidogênese (GABALDI e WOLF, 2002).

Estudos comprovam que altas temperaturas afetam a qualidade seminal, esse efeito deletério ocorre principalmente como resultado de um aumento na temperatura testicular que provoca degenerações específicas com o surgimento de alterações espermáticas em momentos críticos e precisos do ciclo espermatogênico (NUNES, 2002). As células germinativas são mais atingidas pelo estresse térmico devido ao seu alto metabolismo (SHIRAIISHI et al., 2012). Dentre as células da espermatogênese mais afetadas, os espermatócitos e espermátides, que são mais termo-sensíveis, são os que sofrem maior dano, em seguida, com menos intensidade a espermatogônia e os espermatozóides. (CARLSEN et al., 2003). Os espermatozóides maduros podem sofrer alterações estruturais, metabólicas, aumento dos radicais livres e danos no DNA e no seu mecanismo de reparo, durante o final do desenvolvimento ou quando estão presentes na região do epidídimo. Entretanto, mesmo sem alteração na morfologia estes espermatozoides apresentam baixa capacidade de fertilização e há um aumento na incidência de morte embrionária (MIEUSSET et al., 1992; SETCHELL, 1998; DURAIRAJANAYAGAM et al., 2015).

O aumento da temperatura do escroto, seja natural ou induzida pela insulação escrotal, interfere na termorregulação testicular, predispondo à degeneração do epitélio germinativo gonadal (MIEUSSET et al., 1992; SHIRAIISHI et al., 2012). A degeneração é o resultado de alterações na síntese de proteínas e expressão de genes nas células germinativas e células de

Sertoli (IKEDA et al., 1999; GUO et al., 1999), acarretando grandes consequências para a qualidade do sêmen e subsequentemente para a fecundação, interferindo assim diretamente sobre os resultados de fertilidade (BONILLA et al., 2013; FLORENTINO et al., 2003; MOREIRA et al., 2001). Os efeitos deletérios do estresse térmico escrotal variam conforme o tempo de exposição dos testículos e estão associados a alterações na intensidade de pixel em touros (ARTEAGA et al., 2005). Setchell (1998) sugere que o aumento de temperatura testicular resulta num incremento do metabolismo e demanda de oxigênio, de tal forma que a vascularização sanguínea testicular não consegue neutralizá-la, levando à hipóxia e formação de uma espécie reativa de oxigênio e conseqüentemente, à formação de anormalidades espermáticas.

Estudos mais recentes indicam que o estresse oxidativo é o principal fator responsável pelos danos testiculares causados pelo estresse térmico. (NICHII et al., 2006; FLEMMING et al., 2004.). Temperaturas mais elevadas levariam ao aumento do metabolismo testicular sem um aumento correspondente no suprimento sanguíneo, resultando em hipóxia local e efeitos deletérios para o parênquima (AITKEN e ROMAN, 2008). Nesta condição, o desequilíbrio oxidativo pode ocorrer após o restabelecimento da temperatura normal e reperfusão tecidual acarretando em um fenômeno de lesão por hipóxia-reperfusão (REYES et al., 2012). Esta situação tem sido descrita em estudos em que a supressão da função testicular sob estresse térmico levou a uma diminuição da fertilidade em ruminantes (NICHII et al., 2006; FLEMMING et al., 2004). Em seus estudos, Hamilton et al. (2016) concluíram que o estresse testicular induziu estresse oxidativo que levou a lesões temporárias que regeneravam após um ciclo espermático no sêmen ejaculado e também após trinta dias em espermatozóides localizados no epidídimo.

### **2.2.2 REGENERAÇÃO TESTICULAR**

Quando não há degeneração severa do epitélio germinativo, pode ocorrer a recuperação do epitélio seminífero, que dependerá do tempo de duração e da intensidade da lesão. A regeneração completa acontece de forma lenta sendo observado alguma melhora 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 e células de Leydig.

A maior resistência dessas células permite o retorno da função espermatogênica quando removida a causa. Se não for possível a regeneração, pode-se instalar nos testículos uma fibrose ou calcinose. (FONSECA e CHOW, 1995; NASCIMENTO e SANTOS, 2003).

Nas lesões severas em que é atingida a espermatogônia A pode ocorrer a azoospermia. (FONSECA e CHOW, 1995). A fase regenerativa caracteriza-se por uma recuperação da concentração, motilidade, vigor e espermatozóides morfologicamente normais (GABALDI, 2000).

### **2.2.3 FIBROSE TESTICULAR**

As principais alterações que determinam distúrbios circulatórios no testículo, com consequente degeneração são: a torção ou compressão do cordão espermático, a obstrução embólica da artéria testicular e as inflamações da artéria e veia testicular. A varicocele das veias testiculares também leva a degeneração, principalmente em ovinos. (NASCIMENTO e SANTOS, 2003) devido a uma trombose desses vasos, há um comprometendo assim o fluxo sanguíneo do testículo, causando uma hipóxia e consequente isquemia decorrente do aumento da pressão venosa testicular. Histologicamente essa degeneração se apresenta com fibrose no interstício associada a ausência de epitélio germinativo nos túbulos seminíferos caracterizando-se pelas lesões regressivas e atróficas, peculiares em casos de degeneração e atrofia levando a infertilidade do macho. (SHIRAISHI et al., 2012; LIMA et al., 2015).

O epitélio seminífero possui um metabolismo intenso, porém não está em contato direto com vasos sanguíneos e todo transporte de oxigênio e nutrientes depende dos vasos que estão no espaço intersticial (CREASY, 2001).

A fisiopatologia da isquemia testicular resultante da oclusão da artéria testicular ocorrem desde a primeira hora com lesão das espermatogônias e espermátides que estão no interior dos túbulos seminíferos, que são muito sensíveis à hipóxia, com 24 horas o testículo pode-se apresentar edemaciado com vacuolização das células de Sertoli, sendo o período de uma semana para ocorrer uma necrose de coagulação de todos os túbulos seminíferos (LEE et al., 1999; JONES et al., 2000). Em estudos mais recentes com camundongos, Yazama et al.

(2015) observaram alterações na células de Sertoli e conseqüentemente na barreira hematotesticular, poucas horas após a isquemia induzida.

As células de Leydig que estão no espaço intersticial, são mais resistentes a anóxia, manifestando sinais de degeneração somente após 2 semanas, a partir de então inicia-se a fibrose testicular com aumento da presença de fibroblastos (LEE et al., 1999; JONES et al., 2000). De acordo com Suskind et al. (2008), existe uma correlação entre o grau de fibrose tecidual com a progressiva diminuição do diâmetro dos túbulos seminíferos e diminuição do número das células germinativas. Logo, a fibrose testicular pode estar associada a uma diminuição do potencial de produção diária de espermatozoides (ARTEAGA et al., 2005; BARTH et al., 2008).

A fibrose testicular se apresenta na imagem ultrassonográfica como áreas hipoeecóicas focais únicas e múltiplas, áreas hipereecóicas focais e/ou difusas, promovendo um especto heterogêneo (EINSTEIN et al., 1992).

### **2.3 ULTRASSONOGRAFIA NA REPRODUÇÃO ANIMAL**

Na Medicina Veterinária a primeira aplicação da ultrassonografia em diagnósticos, foi na espécie ovina, para diagnóstico da gestação, conforme relatado por Lindahl (1966). Desde então, as melhorias na qualidade do equipamento combinado com uma maior conscientização dos benefícios do ultrassom com uma técnica de imagem têm levado à sua utilização generalizada no campo veterinário (KING, 2006).

A capacidade do ultrassom para distinguir o fluido dos tecidos moles e diferenciar os tecidos moles com base na sua composição torna-o melhor do que a radiografia para examinar as estruturas dos tecidos moles. Ultrassonografia, portanto, fornece uma alternativa não invasiva para muitos procedimentos de contraste radiográfico, embora as duas técnicas ainda devem ser considerados como exames complementares (NYLAN e MATOON, 2005).

A ultrassonografia em tempo real se mostrou uma técnica de exame segura, não invasiva, precisa e de grande praticidade, mas que depende da qualidade do equipamento

utilizado, e da experiência do operador. A utilização da ultrassonografia permite a reconstituição anatômica do órgão estudado de forma dinâmica (CRUZ e FREITAS, 2001).

O impacto da ultrassonografia em tempo real no estudo da reprodução animal tem sido acompanhado com notáveis descobertas e aplicações, sendo inicialmente nos animais de produção mais utilizada para monitorar a anatomia e involução uterina, patologias, detectar gestações, estudar a mortalidade embrionária e monitorar o desenvolvimento e sexagem fetal. Os recentes avanços na tecnologia de ultrassom resultaram na produção de imagens superiores e no seu uso generalizado (MEDAN e ABD EL ATY, 2010).

### **2.3.1 ULTRASSONOGRAFIA NA ANDROLOGIA**

A ultrassonografia escrotal foi relatada pela primeira vez em homens em 1974 (MISKIN e BAIN), e posteriormente em touros (PECHMAN e EILTS, 1987). Como sendo uma técnica com bom custo benefício, praticidade em sua realização, com aparelhos que podem ser portáteis, tornou-se integrada em numerosos protocolos de avaliação para detecção de patologias escrotais como massas escrotais, dor escrotal aguda, microlitíase além da infertilidade (RAGHEB e HIGGINS, 2002).

Na andrologia, a ultrassonografia testicular é utilizada para avaliar mudanças palpáveis e não palpáveis, para diferenciar doenças testiculares de origem no epidídimo daquelas próprias do testículo, para localizar gônadas que não desceram, além de permitir a avaliação da anatomia do parênquima do órgão e de estruturas vizinhas relacionadas (NYLAND e MATOON, 2005). Sendo considerada uma valiosa técnica de diagnóstico para avaliação testicular em bovinos (PECHMAN e IELTS, 1987; ABDEL-RAZEK e ALI 2005; PASTORE et al., 2015), bem como em caprinos e ovinos (AHMAD e NOAKES, 1995, ANDRADE et al., 2012).

No entanto, vários fatores podem influenciar no estabelecimento do diagnóstico ultrassonográfico como: a frequência do transdutor, regulagem de profundidade, ganho e contraste (KENNETH et al., 1986; ZWEIBEL, 1995). A avaliação subjetiva das imagens constitui uma desvantagem do método, sendo que a impressão visual muitas vezes se torna insuficiente para determinar a ecogenicidade exata dos tecidos (SANTOS FILHO et al., 2009; SCHURICH et al., 2009; LOTTI e MAGGI, 2015). Onde, em seu trabalho, Souza (2010)

afirmou que o exame ultrassonográfico mostrou atraso no diagnóstico de degeneração testicular em ovinos em relação ao exame clínico por palpação testicular, uma vez que o órgão ainda apresentava características de normalidade ultrassonográfica mesmo sendo observado alterações do exame físico e andrológico, onde o avanço da lesão observada, ocorria de uma forma mais lenta e gradual do que as alterações no exame clínico.

Para minimizar os erros de interpretação da subjetividade e aumentar a sensibilidade do exame, foram pesquisadas técnicas que quantificam a ecogenicidade e a ecotextura de várias formas por exemplo: através da análise por sinal de vídeo (WALLER et al., 2003), da estimação da atenuação (TAYLOR et al., 1986, LU et al., 1997), backscatter (PARKER et al., 1984, LU et al., 1997) e do histograma dos níveis de cinza (MAEDA et al., 1998, LEE et al., 2006).

No entanto, a ausência de parâmetros normais do parênquima testicular das espécies domésticas, assim como a ausência de estudos de correlação entre as lesões reveladas pelas imagens ultrassonográficas e o estágio da afecção tem sido um gargalo para a utilização da ultrassonografia com diagnóstico andrológico veterinário (AGUMBAH et al., 1995). O estabelecimento de parâmetros ultrassonográficos de normalidade para morfologia, dimensões testiculares ecogenicidade e ecotextura permite estudos sobre processos degenerativos dos testículos (GRIFFIN e GINTHER, 1992).

### **2.3.2 ESCALA DE CINZA NA ULTRASSONOGRAFIA**

Escala de cinza na ultrasonografia é usada principalmente para a avaliação da estimativa da densidade e textura do tecido com base nas alterações dos valores numéricos da ecogenicidade e da ecotextura (SCHURICH et al., 2009).

A imagem ultrassonográfica é composta por um arranjo de “pixels-picture elements”, e o valor numérico da intensidade “pixels” varia dependendo da característica do tecido examinado (CHANDOLIA et al., 1997). O histograma de cinza de uma imagem descreve a distribuição dos níveis de cinza em termos do número de amostras (pixels) com cada nível. Além disso, permite a visualização gráfica da forma de distribuição da variável em consideração (BUSSAB et al., 1987).

A análise de imagens de ultrassom tem sido muito estudadas com o intuito de superar as inconsistências da avaliação visual subjetiva, e para fornecer uma abordagem quantitativa à escala cinzenta (análise de valor de pixel) assim tem sido utilizado para a avaliação da ecogenicidade e ecotextura de diversos órgãos e em várias espécies tais como: cicatriz uterina em humanos (SANTOS FILHO et al., 2009), avaliação de nódulos na tireoide em humanos (GRANI et al., 2015), avaliação de malignidade de tumores pulmonares em humanos (NGUYEN et al., 2015), fígado em felinos (SANTOS et al., 2009, MONTEIRO et al., 2010), baço em felinos (VESCOVI et al., 2009), medula espinhal de cães (BONELLI et al., 2011), Testículos em equinos (VARONI, 2014), Útero em suínos (KAUFFOLD et al., 2010) Ovário em bovinos (VASSENA et al., 2003), testículos em bovinos (CHANDOLIA et al., 1997; GABOR et al., 1998; KASTELIC et al., 2001, ARTEAGA et al., 2005, PASTORE et al., 2015) testículos em pequenos ruminantes (GIFFIN et al., 2009, TEIXEIRA et al., 2011; TEIXEIRA et al., 2012; CARAZZO et al., 2014, SILVA et al., 2015) revelando importante aplicabilidade clínica desta metodologia.

Cada pixel representa um refletor de tecido discreto e pode assumir um dos 256 tons de cinza. O olho humano pode perceber "suavidade" de uma imagem com o aumento tons de cinza, mas só pode distinguir entre 18 e 20 tons de cinza (BAXES, 1994). A avaliação dos valores numéricos de pixel assistidos por computador (VNP), expressos em escala de 0 (preto absoluto) para 255 (branco absoluto), aumentou tanto a precisão quanto a gama de variação de resultados que pode ser perceptível nas estruturas examinadas. O valores numéricos de pixel são um parâmetro de avaliação da ecotextura ou ecogenicidade do tecido que depende da sua densidade e do teor macromolecular (GABOR et al., 1998; ARTEAGA et al., 2005; SANTOS FILHO et al., 2009; GIFFIN et al., 2012). A associação da ultrassonografia escrotal com a análise de imagem em escala de cinza, pode fornecer uma indicação da microestrutura do tecido e da secreção da hormonal reprodutiva (EVANS et al., 1996; BRITO et al., 2012), o que poderia melhorar consideravelmente a interpretação visual.

O uso da ferramenta de escala de cinza na imagem ultrassonográfica para avaliação microestrutural e funcional de órgãos reprodutivos tem aumentado o conhecimento na dinâmica da histofisiologia do órgão (EVANS et al., 1996). Esta técnica demonstra a alteração da ecogenicidade em testículos atroficos, bem como a alteração da ecogenicidade em testículos com infarto parcial ou isquemia em comparação com o tecido testicular normal. A ecotextura e ecogenicidade alteradas indica uma diminuição da função testicular (SCHURICH et al., 2009) observado que até 70-80% do volume testicular consiste nos túbulos seminíferos, e reflete a

espermatogênese (ARAI et al., 1998; STEGER e WROBEL, 1996). Urt (2014) determinou que a área mínima representativa do parênquima testicular em ovinos para uma avaliação da ecotextura deveria ser de no mínimo 1600 mm<sup>2</sup>.

Em seus estudos, Evans et al. (1996) e Chandolia et al. (1997) observaram aumento na escala de cinza nos testículos em diferentes fases da maturação sexual, coincidindo com a puberdade em bovinos. Cardilli et al. (2014) sugeriram-se que a ultrassonografia testicular com análise quantitativa de cinza pode ser utilizada como indicador de precocidade sexual em touros Nelore. Silva et al. (2015) e Teixeira et al. (2012) observaram o mesmo evento em ovinos, tornando necessária a padronização da escala de cinza nas diferentes idades, para que possa ser possível o diagnóstico preciso de puberdade. Em seus experimentos com touros, Arteaga et al. (2005) observaram que alterações na escala de cinza do parênquima testicular eram um bom fator preditivo da qualidade insatisfatória do sêmen na insulação escrotal de bovinos. A ecotextura testicular observada à ultrasonografia tem sido associada à área total dos túbulos seminíferos, à produção de espermatozóides e à qualidade do sêmen em touros (KASTELIC et al., 1997, 2001; GABOR et al., 1998).

Em ovinos, Teixeira et al. (2011), demonstraram uma correlação moderada nos valores de ecogenicidade com a concentração espermática e com a motilidade massal em animais com testículos sadios.

O aumento da ecogenicidade está relacionada à maturação dos túbulos seminíferos, o aumento do seu diâmetro e a diferenciação das células de Sertoli e uma maior proporção do parênquima testicular ocupado não só pelos túbulos seminíferos, como também caracterizado por atividade das células germinativas (BRITO et al., 2002). Estudos em touros e carneiros durante a transição para puberdade demonstraram que as variáveis ecotexturais quantitativas são bons indicadores de alterações na histomorfologia testicular, nesses animais observaram a ecogenicidade aumentou durante as fases mais ativas de crescimento dos túbulos seminíferos e quando houve maior atividade das células germinativas. (EVANS et al., 1996; CHANDOLIA et al., 1997; GIFFIN et al., 2014).

O testículo pré-púbere, comparado com o adulto, é ligeiramente mais hipocogênico, já que os túbulos seminíferos ainda não desenvolveram um lúmen. Durante a puberdade, em função do desenvolvimento do lúmen, a ecogenicidade dos testículos aumenta

progressivamente, até o nível pós puberal. Uma redução ou um aumento na estrutura do espaço intersticial pode conduzir a uma ecogenicidade hipoecóica e / ou ecotextura heterogênea (BERES et al., 1989, LOBERANT et al., 2010). Nos animais pré-puberes essa hipoecogenicidade testicular pode reduzir a sensibilidade das observações de lesões hipoecóicas, principalmente se não houver alterações de tamanho ou à palpação (HAMM e FOUBE, 1994).

A avaliação ultrassonográfica dos testículos fornece dados que contribuem para o aprimoramento da avaliação andrológica, como a caracterização da morfologia testicular e correlações das imagens ultrassonográficas. Assim, a análise da escala de cinza para determinação da intensidade de branco dos pontos que formam a imagem ecogenicidade e ecotextura pode fornecer informações mais detalhadas sobre o estado fisiológico do testículo. (GABOR et al., 1998; CRUZ e FREITAS, 2001; ARTEAGA et al., 2005).

Em situações para avaliação de lesões fibróticas dos testículos, Tomlinson et al. (2010) relatou um efeito de associação de 40,5% com análise quantitativa da ecotextura, respaldando a utilidade da avaliação computadorizada da homogeneidade testicular.

### 3- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAZEK, A.KH. ALI, A. Development Changes of Bull (*Bos taurus*) Genitalia as Evaluated by Caliper and Ultrasonography. **Reproduction in Domestic Animals**, v.40, n.1 p. 23-27, 2005.

AITKEN, R.J.; ROMAN, S.D. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes, **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 1, n. 1, p. 15–24, 2008.

AGUMBAH, G.J.O.; ODIANO, G.O.; TYREL, D.; OGAA, J.S. Ultrasonography to diagnose testicular lesions in infertile Angora buck. **Irish Veterinary Journal**, v.48, n.1, p.416-418, 1995.

AHMAD, N. ; SAMAD, H.S. ; REHMAN, N.U. ; AHMAD, K.M. ; AHMAD, M, An ultrasonographic and histopathological study of the testis and epididymis following experimentally induced unilateral ischemia in male goats and rams. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 19, n.4, p. 204-209, 1999.

AHMAD, N.; NOAKES, D. E. A clinical and ultrasonographic study of induced testicular and epididymal lesions in goats and a ram. **Animal Reproduction Science** n.39, n.1, p.35-48, 1995.  
 AHMAD, N.; NOAKES, D.E.; MIDDLETON, D.J Use of ultrasound to diagnose testicular degeneration in a goat. **Veterinary Record**. v. 132, n.17, p. 436-439, 1993.

ANDRADE, A.K.G.;SOARES, A.T.;CARTAXO, F.Q.;PENNAALFARO, C.E.;GUERRA, M. M. P.;. Achados ultrassonográficos nos testículos e epidídimos de carneiros deslanados jovens e clinicamente sadios. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia** v.64, n.2, p.371-379, 2012.

ARAI, T.; KITAHARA, S.; HORIUCHI, S.; SUMI, S.; YOSHIDA, K. Relationship of testicular volume to semen profiles and serum hormone concentrations in infertile Japanese males. **International Journal of Fertility and Women's Medicine**, v.43, n.1, p.40-47, 1998.

ARENAS, M.I.; BETENCOURT, F.R.; FRAILE, B.; PANAIQUA, R. Immunocytochemical and quantitative study of the tunica albuginea testis in young and aging men. **Histochemistry and Cell Biology**, v.107, n.6, p.469-477, 1997.

ARTEAGA, A.A.; BARTH, A.D.; BRITO, L.F.C. Relationship between semen quality and pixel-intensity of testicular ultrasonograms after scrotal insulation in beef bulls. **Theriogenology** v.64, n.2 p. 408–415, 2005.

BAILEY, T.L.; HUDSON, R.S.; POWE, T.A.; RIDDELL, M.G.; WOLFE, D.F.; CARSON, R.L. Caliper ultrasonographic measurements of bovine testicles and a mathematical formula for determining testicular volume and weight in vivo. **Theriogenology**, v.49, n.3, p.581-594, 1998.

BARTH, A.D.; ALISIO, L.; AVILÉS, M.; ARTEAGA, A.A.; JOHN, R.; CAMPBELL, J.R.; HENDRICK, S.H. Fibrotic lesions in the testis of bulls and relationship to semen quality **Animal Reproduction Science** v. 106, n. 3–4, July, p.274-288,2008.

BAXES, G.A. Digital Image Processing: Principles and Applications. Wiley; New York: 1994. Fundamentals of digital image processing; pp. 13–36.

BILASPURI, G.S.; GURAYA, S.S. The seminiferous epithelial cycle and spermatogenesis in rams (*ovis aries*). **Theriogenology** , v. 25, n. 4, p. 485 – 505, 1986.

BÉRES, J.; PAPP, G.; PAZONYI, I.; CZEIZEL, E. Testicular volume variations from 0 to 28 years of age. **International Urology and Nephrology**; v.21, n.2, p.159-167, 1989.

BONELLI, M.A.; SANTOS, C.R.O.; COSTA, F.S.; TUDURY, E.A.; Análise de histograma dos níveis de cinza da medula espinhal normal em cães **Medicina Veterinária**, v.5, n.4, Supl. 1, p. 136-141, 2011.

BONILLA, L; SANTOS, A.Q.; BORGES, J.C.; SIQUEIRA, J.B. PINHO\*,R.O.; GURZONI,W.S.; MARTINS,L.F.; LIMA,D.M.A.; GUIMARÃES,S.E.F.; GUIMARÃES , J.D.; Effect of scrotal insulation on physical and orphological semen features in young cattle **Acta Veterinaria Brasilica**, v.7, n.4, p.311-318, 2013.

BRITO, L.F.; SILVA, A.E.; RODRIGUES, L.H.; VIEIRA, F.V.; DERAGON, L.A.; KASTELIC, J.P. Effect of age genetic group on characteristics of the scrotum, testes and testicular vascular cones and sperm production and semen quality in AI bulls in Brazil. **Theriogenology**, v.8, n.6, p.1175-86, 2002

CAMP, S.D.V. Common Causes of Infertility in the Bull. *Veterinary Clinics of North America: Food animal Practice*. v.13, n. 2, p. 203 – 231, 1997.

CARAZO, L.R.B.; GUIMARÃES, J.D.; MACHADO, T.P.; MACHADO, T.P.L.C.; OLIVEIRA, F.A.S.A.M.; PEREIRA, D.B. Ultrassonografia testicular em caprinos jovens da raça Alpina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 66, n. 2, p. 388-394, Apr. 2014.

CARDILLI, D.J.; TONIOLLO, G.H.; PASTORE, A.A.; CANOLA, J.C.; OLIVEIRA, J.A.; MERCADANTE, M.E.Z. Precocidade sexual em bovinos Nelore avaliada por ultrassonografia testicular, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66, n.4, p.1296-1298, 2014.

CARLSEN, E.; ANDERSSON, A.M.; PETERSEN, J.H.; SKAKKEBAEK, N.E. History of febrile illness and variation in semen quality. **Human Reproduction**, v.18, n. 10 p.2089–2092, 2003.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL-CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal, 2ed. Belo Horizonte, 1998. 49 p.

CUNHA, M.S.; BONATO, D.V.; TAIRA, A.R.; TEIXEIRA, P.P.M. Degeneração testicular em machos: dos animais ao homem, **Revista Investigação Medicina veterinária**, v. 14, n. 6, p.54-61, 2015.

CREASY, D.M. Pathogenesis of Male Reproductive Toxicity, **Toxicologic Pathology** v.29, n.1,p. 64-76, 2001.

CRUZ, J. F.; FREITAS, V. J. de F; A Ultra-Sonografia Em Tempo Real Na Reprodução De Caprinos. **Ciência Animal**, v.11, n.1, p.53-61, 2001.

DURAIRAJANAYAGAM, D.; ASHOK AGARWAL, A.; ONG, C. Causes, effects and molecular mechanisms of testicular heat stress Reproductive. **BioMedicine Online** v.30, n.1, p.14 – 27, 2015.

DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. A pelve e o órgãos reprodutivos masculinos dos ruminantes In: DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. **Tratado de anatomia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1997. p.559 – 566.

EINSTEIN, D. M.; PAUSHTER, D. M.; SINGER, A. A.; THOMAS, A. J; LEVIN, H. S.: Fibrotic lesions of the testicle: sonographic patterns mimicking malignancy. **Urologic Radiology**, v.14, n.3, p. 205-210, 1992.

EVANS, A.C.O.; PIERSON, R.A.; GARCIA, A.; MCDUGALL, L.M.; HRUDKA, F.; RAWLINGS, N.C. Changes in circulating hormone concentrations, testes histology and testes ultrasonography during sexual maturation in beef bulls. **Theriogenology**, v.46, n.2 p. 345–357, 1996.

FAWCET, D.W.; NEAVES, W.B; FLORES, M.N. Comparative Observations on Intertubular Lymphatics and the Organization of the Interstitial Tissue of the Mammalian Testis. **Biology of Reproduction**. v.9, n.5, p.500-532, 1973.

FLEMING, S.; YU, F.; MCDONALD, R.M. et al., Effects of scrotal heating on sperm surface protein PH-20 expression in sheep, **Molecular Reproduction and Development**, v. 68, n. 1, p. 103–114, 2004.

FLORENTINO, C.M.; REIS, J.C.; GUERAA, M.M.P.; SOUZA, A.F.; MERGULHÃO, F.C.C.; BATISTA, A.M.; COLETO, Z.F. Efeito do tempo de insulação escrotal sobre os constituintes do plasma seminal de caprinos (*Capra hircus* L.) sem raça definida. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, Recife, v. 6, n. 1, p. 39-45, 2003.

FONSECA, V.O.; CHOW, L.A. Características seminais de touros zebus com degeneração testicular transitória. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.47, n.5, p.707-716, 1995.

FONSECA, V.O.; VALE FILHO, V.R.; MIES FILHO, A.; ABREU, J.J. Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Belo Horizonte, **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**, 1991.

FRANÇA, L. R.; RUSSEL, L. D. The testis of domestic mammals. In: MARTÍNEZ-GARCÍA, F.; REGADERA, J. **Male reproduction: a multidisciplinary overview**. ChurchillComm. Europe, 1998.

GABALDI, S.H. Alterações espermáticas e dos níveis plasmáticos de testosterona e cortisol em touros da raça Nelore, submetidos à insulação escrotal. Botucatu, 2000, 85p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), FMVZ - Universidade Estadual Paulista. Botucatu. 2000. 85p.

GABALDI, S. H; WOLF, A. Importância da termorregulação testicular na qualidade do sêmen em touros. **Ciências agrárias e da saúde**. v. 2, n. 2, Andradina-SP, p. 66-70, 2002.

GABOR G.; SASSER, R.G.; KASTELIC, J.P.; MÉZES, M.; FALKAY, G.; BOZÓ, S.; CSÍK, J.V.; BÁRÁNY, I.; HIDAS, A.; SZÁSZ, F. J.R.; BOROS, G. Computer analysis of video and ultrasonographic images for evaluation of bull testes. **Theriogenology** v. 50, n.2, p.223–228, 1998.

GIFFIN, L.; FRANKS, S.E.; RODRIGUEZ-SOSA, J.R.; HAHNEL, A.; BARTLEWSKI, P.M. A Study of Morphological and Haemodynamic Determinants of Testicular Echotexture Characteristics in the Ram **Experimental Biology and Medicine**, v. 234, n.7 p. 794-801, 2009.

GINTHER, O.J. Ultrasonic Imaging and Animal Reproduction: Fundamentals. Book 1. Cross-Plains, WI: Equiservices Publishing, 1995; 225p.

GRIFFIN, P.G.; GINTHER, O. J. Research applications of ultrasonic imaging in reproductive biology. **Journal of Animal Science**. v. 70, n.3, p. 953-972, 1992.

GUO, C. X.; TANG, T.S.; MU, X.M.; LI, S.H.; FU, G.Q.; LIU, H.; LIU, Y.X. Cloning of novel temperature-related expressed sequence tags in rat testis during spermatogenesis. **Biochemical Biophysics**. v. 258, n.2, p.401-406, 1999.

HANDEL, M.A.; SCHIMENTI, J.C. Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. **Nature Reviews Genetics**, v.11, n.2, p.124-136, 2010.

HAMILTON, T. R. DOS S.; MENDES, C. M.; DE CASTRO, L. S.; DE ASSIS, P. M.; SIQUEIRA, A. F. P.; DELGADO J.C.; GOISSIS M.D.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.Á.; NICHI, M.; VISINTIN, J.A.; ASSUMPCÃO, M.E.. Evaluation of Lasting Effects of Heat Stress on Sperm Profile and Oxidative Status of Ram Semen and Epididymal Sperm. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2016, Article ID 1687657, 12p. <http://doi.org/10.1155/2016/1687657>

HAMM, B.; FOBBE, F. Maturation of the Testis: ultrasound evaluation. **Ultrasound in Medicine and Biology**, Elmsford, v. 21, n. 2, p. 143-147, 1994.

HEMEIDA, N.A.; SACK, W.O.; MCENTEE, K. Ductuli efferentes in the epididymis of boar, goat, ram, bull, and stallion. **American Journal of Veterinary Research**, v. 39, n.12, p.1892-1900, 1978.

HOCHEREAU-DE-REVIERS, M.T.; MONET-KUNTZ, C.; COUROT, M. Spermatogenesis and Sertoli cell numbers and function in rams and bulls. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement.**, v. 34, p. 101-114, 1987.

IKEDA, M.; KODAMA, H.; FUKUDA, J.; SHIMIZU, Y.; MURATA, M.; KUMAGAI, J.; TANAKA, T. Role of radical oxygen species in rat testicular germ cells apoptosis induced by heat stress. **Biology and Reproduction**, n.61, n.2, p.393-399, 1999.

JAINUDEEN, M.R. & HAFEZ, E.S.E. Distúrbios Reprodutivos nos Machos. In: HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**, 7a ed. São Paulo, Manole, cap.23, p.545-69, 2003.

JOHNSON, L.; WILKER, C. E.; CERELLI, J. S. (1994) Spermatogenesis in the bull; **Proceedings...** 15th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction; National Association of Animal Breeders v.15 (1994), p.9-27.

JONES T.C.; HUNT R.D.; KING N.W. Sistema Genital. In:\_\_\_\_\_. **Patologia Veterinária**. 6ª ed. São Paulo: Manole, 2000. p.1169-1244.

JONES, R.C. To store or mature spermatozoa? The primary role of the epididymis. **International Journal of Andrology**, v.22, n.2, p.57-67, 1999.

JUCÁ, A.F.; ANDRADE MOURA, J.C.; GUSMÃO, A.L.; BITTENCOURT, T.C.; NASCIMENTO, M.C.; BARBOSA, C.M.P. Avaliação Ultrassonográfica Dos Testículos E Das Glândulas Sexuais Anexas De Carneiros Santa Inês. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 2, p. 650-659, 2009.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. Aparelho Reprodutor Masculino. In: \_\_\_\_\_. **Histologia Básica**. 11ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012, p.414-430.

KAUFFOLD, J.; VON DEM BUSSCHE, B.; FAILING, K., WEHREND, A.; WENDT, M. Use of B-mode ultrasound and grey-scale analysis to study uterine echogenicity in the pig. **Journal of Reproduction and Development**. v.56, n.4, p. 444-448, 2010.

KASTELIC, J.P.; COULTER, G.H. Scrotal and testicular thermoregulation in the bull and ram. Soc. for Theriogenology – **Proc. Annual Meeting**, Florida, p.67-72, 1993.

KASTELIC, J.P.; COOK, R.B.; PIERSON, R.A.; COULTER, G.H. Relationships among scrotal and testicular characteristics, sperm production, and seminal quality in 129 beef bulls. **The Canadian Journal of Veterinary Research**. v.65, n.2, p.111-115, 2001.

KASTELIC, J.P.; SILVA, A.E.D.F.; BARBOSA, R.T.; PINEDA, N.R.; FREITAS, A.R.; COOK, R.B. Relationships between pixel intensity of testicular ultrasonograms and sperm morphology in Nelore and Canchim bulls. **Revista Brasileira Reprodução Animal**. v.21, n.2, p.40-42, 1997.

KENNETH, J.W.; TAYLOR, M.D.; RIELY, C.A.; HAMMERS, L.; FLAX, S.; WELTIN, G.; GARCIA-TSAO, G.; CONN, H.O.; KUC R. & BARWICK K.W. Quantitative US attenuation in normal liver and in patients with diffuse liver disease: importance of fat. **Radiology**, v.160, n.1 p.65-71, 1986.

KERR, J.B.; LOVELAND, K.L.; O'BRYAN, M.K.; KRETSEK, D.M. Cytology of the testis and intrinsic control mechanisms, In: JD Neill, J.D. & Kretser, D.M. (Eds.), **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. St. Louis, MO: Elsevier Academic Press, 3<sup>a</sup> ed. 2006, p. 827-947.

KILGOUR, R.J.; PISSELET, C.; DUBOIS, M.P.; COUROT, M. Ram lambs need FSH for normal testicular growth, sertoli cell numbers and onset of spermatogenesis. **Reproduction, Nutrition, Development**, v.38, n.5, p.539-550, 1998.

KING, A.M. Development, advances and applications of diagnostic ultrasound in animals. **The Veterinary Journal**. v. 171, n.3, p.408-420, 2006.

KISHORE, P.N.; RAO, A.R. Effect of induced testicular degeneration on characteristics of bucks. **Indian Veterinary Journal**, Madras, v.60, n.4, p.281-286, 1983.

LINDAHL, I.L. Detection of Pregnancy in Sheep by means of Ultrasound. **Nature**, v.212, n.5062 p.642-643, 1966.

LEE ,H.C.; CHOI, J.W.; KIM, K.A.; SEO, T.S.; LEE, J.M.; PARK, C.M. Usefulness of standard deviation on the histogram of ultrasound as a quantitative value for hepatic parenchymal echo texture; preliminary study. **Ultrasound in Medicine and Biology**. v.32, n.12, p.1817-1826, 2006.

LEE, J.; RICHBURG, J.H.; SHIPP, E.B.; MEISTRICH, M.L.; BOEKELHEIDE, K. The Fas system a regulator of testicular germ cell apoptosis is differentially up regulated in Sertoli cell versus germ cell injury of the testis. **Endocrinology** v.140, n.1, p.852– 858, 1999.

LIMA, E. B.; CARVALHO, J. S.; MADUREIRA, K. M.; PEIXOTO, T. C.; FARIAS, S. S. MACÊDO, A. G. C.; MENEZES, R. V.; FERREIRA, M. M.; CARVALHO, V. S. Varicocele bilateral em ovino: relato de caso, **Scientia Plena**, v. 11, n. 4, p.1-4, 2015.

LOK, D.; WEENK, D.; DE ROOIJ, D.G. Morphology, proliferation, and differentiation of undifferentiated spermatogonia in the Chinese hamster and the ram. **The Anatomical Record**, v.203, n.1, p.83-99, 1982.

LOTTI, F.; MAGGI, M. Ultrasound of the male genital tract in relation to male reproductive health. **Human Reproduction Update**, v. 21, n.1, p.56-83. 2015.

LU, Z.F.; ZAQZEBSKI, J.A.; O'BRIEN, R.T. & STEINBERG, H. Ultrasound attenuation and backscatter in the liver during prednisone administration. **Ultrasound in Medicine and Biology**. v.23, n.1, p.1-8, 1997.

MAIA, M.S.; MEDEIROS, I.M.; LIMA, C.A.C. Características reprodutivas de carneiros no Nordeste do Brasil: parâmetros seminais. **Revista Brasileira de Reprodução. Animal**. Belo Horizonte, v.35, n.2, p.175-179, abr./jun. 2011.

MAEDA, K.; UTSU, M. & KIHAILE, P.E. Quantification of sonographic echogenicity with grey-level histogram width: A clinical tissue characterization. **Ultrasound in Medicine and Biology**, v.24, n.2, p.225-234, 1998.

MARTINS, R.D.; McMANUS, C.; CARVALHÊDO, A.S. BORGES, H. V., SILVA, A. E. D. F., & SANTOS, N. R. Avaliação Da Sazonalidade Reprodutiva De Carneiros Santa Inês Criados No Distrito Federal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.6, supl. 1 p.1594-1603, 2003.

MARTINS, L.F.; PEREIRA, M.C.B.; GUIMARAES, J.D., COSTA, E. P., SILVEIRA, T.S., TORRES, C. A. AL., RODRIGUES, M.T., BRAZ, V. B. Avaliação espermática e da concentração de proteínas solúveis no plasma seminal de bodes da raça Alpina em regime de monta controlada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.4, p.1653-1659, 2006.

MCMANUS, C.; SASAKI, L.C.B.; LOUVANDINI, H.; DIAS, L.T.; TEIXEIRA, R., DE ALMEIDA, A.; MENEZES, J.; LUCCI, C.M.; MARSIAJ, P.H.P.; MURATA, L.S. Avaliação histológica dos testículos de ovinos da raça Santa Inês nascidos em diferentes estações do ano. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 2, p. 366-372, Feb. 2010.

MEDAN, M.S.; ABD EL ATY, A.M. Advances in ultrasonography and its applications in domestic ruminants and other farm animals reproduction, **Journal of Advanced Research**, v.1, n. 2, p. 123–128, 2010.

MIEUSSET, R.; BUJAN, L. Testicular heating and its possible contributions to male infertility: a review. **International Journal of Andrology** v.18, n. 4, p.169-184, Aug; 1995.

MIEUSSET, R.; QUINTANA CASARES, P.; SANCHEZ PARTIDA, L.G.; SOWRBUTTS, S.F.; ZUPP, J.L.; SETCHELL, B.P. Effects of heating the testis and epididymites of ram by scrotal insulation on fertility and embryo mortality in ewes inseminated with frozen semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, Grã-Bretanha, v.94, n.2, p.337-344, 1992.

MISKIN, M.; BAIN, J. B-mode ultrasonic examination of the testes. **Journal of Clinical Ultrasound**, v.2, n.4, p. 307-311, 1974.

MONTEIRO, J.N.M.; SANTOS, W.G.; OLIVEIRA, D.C.; BORLINI, D.C.; MARTINS FILHO, S.; MACHADO, F.M. & COSTA, F.S. Ultrassonografia quantitativa do fígado de gatos hípidos – Nota prévia. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.**, São Paulo, v. 47, n. 5, p. 367-370, 2010.

MOREIRA, E.P.; MOURA, A.A.A. ARAUJO, A. A. Efeitos da Insulação Escrotal sobre a Biometria Testicular e Parâmetros Seminais em Carneiros da Raça Santa Inês Criados no Estado do Ceará. **Revista Brasileira de Zootecnia** v.30, n.6, p. 1704-1711, 2001.

MOULE, G.R.; WAITES, G.M.H. Seminal degeneration in the ram and its relation to the temperature of the scrotum. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, Grã-Bretanha, v.5, p.433-446, 1963.

MUCCIOLO, R.G.; BARBABÉ, R.C.; BARNABÉ, V.H. Variações no quadro espermático de carneiros submetidos à degeneração testicular experimental. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v.11, n.1 p.155-177, 1974.

NASCIMENTO, E.F.; SANTOS, R.L. Patologias da Bolsa Escrotal e dos Testículos, In: \_\_\_\_\_. **Patologia da reprodução dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: ed Guanabara Koogan, 2ª ed. 2003, p.93-116.

NEVES, J.P.; MIRANDA, K.L.; TORTORELLA, R.D. Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, Supl. Especial, p.414-421, 2010.

NICHI, M.; BOLS, P. E. J.; ZÜGE, R. M.; BARNABE, V.H.; GOOVAERTS, I.G.; BARNABE, R.C.; CORTADA, C.N. Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions, **Theriogenology**, vol. 66, n. 4, p. 822–828, 2006.

NYLAND, T.G.; MATTOON; J.S. **Ultra-Som Diagnostico em Pequenos Animais**. São Paulo-SP, ed. Roca, 2ªed, 2005, 469p.

NUNES. J.F. 2002 Inseminação artificial em caprinos. In: Golsalves P.B.D., Figueiredo J.R.; Freitas V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. Livraria Varela, São Paulo, p. 111-125.

O'DONNELL, L.; ROBERTSON, K.M.; JONES, M.E.; SIMPSON, E.R. Estrogen and spermatogenesis. **Endocrine Reviews**, v.22, n.3, p.289-318, 2001.

OATLEY, J.M.; BRINSTER, R.L. The germline stem cell niche unit in mammalian testes. **Physiological Reviews**, v.92, n.2, p.577-595, 2012.

PACHECO, A.; QUIRINO, C.R. Comportamento sexual em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.34, n.2, p.87-97, abr./jun. 2010.

PARKER, K.J.; LERNER, R.M. & WAAG R.C. Attenuation of ultrasound: magnitude and frequency dependence for tissue characterization. **Radiology**, v.153, n.3, p.785-788, 1984.

PASTORE, A. A.; TONIOLLO, G.H.; CARDILLI, D.J.; CANOLA, J.C.; MERCADANTE, M.E.Z. Contribuição da ultrassonografia na avaliação andrológica de bovinos Nelore, **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v.39, n.1, p.32-40, jan./mar. 2015.

PECHMAN, R.D.; EILTS, B.E. B-mode ultrasonography of the bull testicle **Theriogenology**, v. 27, n. 2, p. 431-441, 1987.

PEIXOTO, G.C.X.; LIRA, R.A.; ALVES, N.D.; SILVA, A.R. Bases físicas da formação da imagem ultrassonográfica. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.4, n.1, p.15-24, 2010.

PIERSON, R.A.; ADAMS, G.P. Computer-assisted image analysis, diagnostic ultrasonography and ovulation induction: strange bedfellows. **Theriogenology**, v.43, n.1 p.105–112., 1995.

RAGHEB, D.; HIGGINS. J. L. Ultrasonography of the scrotum: Technique, anatomy, and pathologic entities. **Journal of Ultrasound in Medicine**, v.21, n.2, p. 171-185, 2002.

REYES, J.G.; FARIAS, J.G.; HENRÍQUEZ-OLAVARRIETA, S.; MADRID, E.; PARRAGA, M.; ZEPEDA, A.B.; MORENO, R.D. The hypoxic testicle: physiology and pathophysiology, **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, Article ID 929285, 15 pages, 2012.

RUSSELL, L. D.; CHANDRASHEKAR, V.; BARTKE, A.; HIKIM, A. F. S. The hamster Sertoli cell in early testicular regression and early Recrudescence: a stereological and endocrine study. **International Journal of Andrology**, v.17, n.2, p. 93–106, 1994.

SÁNCHEZ, R.; ALFONSO, E. Ultrasonografía en reproducción animal. **TecnoVet**, v.1, n.1, p.6, 2000.

SANFORD, L.M.; MOORE, C.; VOGLMAYR, J.K; FAHMY, M.H. Sexual maturational changes in circulatory inhibin concentration in relation to FSH concentration and testicular size in Suffolk and DLS rams **Theriogenology** v.54, n. 5, p.719–730, 2000.

SANTOS FILHO, O.O.; NARDOZZA, L. M. M.; ARAÚJO JUNIOR, E.; ROLO, L. C.; CAMANO, L.; MORON, A. F. Estudo da cicatriz uterina de cesariana avaliada pelo histograma escala-cinza **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.56, n.1, p. 99-102, 2009.

SANTOS, W.G.; MONTEIRO, J. N. M.; OLIVEIRA, D.L C.; BORLINI, D. C.; MARTINS FILHO, S.; MACHADO, F. M.; NUNES, L. C.; COSTA, F. S. Ultrassonografia quantitativa do fígado em gatos com tirotoxicose induzida **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** v. 46, n. 6, p. 438-447, 2009.

SCHURICH, M.; AIGNER, F.; FRAUSCHER, F.; PALLWEIN, L. The role of ultrasound in assessment of male fertility. **European Journal of Obstetrics and Gynecology Reproductive Biology**. May, v.144, Suppl 1, p.192-198, 2009.

SETCHELL, B.P. The Parkes Lecture. Heat and the Testis. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.4, n.2, p.179-194, 1998.

SHARPE, R.M.; MCKINNELL, C.; KIVLIN, C.; FISHER, J.S. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. **Reproduction**, v.125, n.6, p. 769-784, 2003.

SHIRAIISHI, K.; MATSUYAMA, H.; TAKIHARA, H. Pathophysiology of varicocele in male infertility in the era of assisted reproductive technology. **International Journal of Urology**, v.19, n.6 p.538–550, 2012.

SILVA, E.G.; GONÇALVES, M.T.C.; PINTO, S.C.C.; SOARES, D.M.; OLIVEIRA, R.A.; ALVES, F.R.; ARAÚJO, A.V.C.; GUERRA, P.C. Análise quantitativa da ecogenicidade testicular pela técnica do histograma de ovinos da baixada ocidental maranhense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.35, n.3, p.297-303, março 2015.

SIMPLÍCIO, A.A.V.; FREITAS, V.J.F., FONSECA, J.F. Biotécnicas da reprodução como técnicas de manejo reprodutivo em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.2, p. 234- 246, 2007.

SOUZA C.E.A.; MOURA A.A.; ARAÚJO A.A.; LIMA A.C.B.; Estudo das interações entre o desenvolvimento gonadal, produção espermática, concentrações de testosterona e aspectos ligados à puberdade em carneiros Santa Inês ao longo do primeiro ano de vida. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.2, p.199-201, 2003.

SOUZA, M.W.P. Avaliação da degeneração testicular causada por insulação escrotal em carneiros: morfometria testicular, características seminais e ultrassonográficas. 2010. 41 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, 2010.

SOUZA, C.E.A.; MOURA, A.A.; LIMA, A.C.B. et al. Desenvolvimento testicular, idade à puberdade e características seminais em carneiros Santa Inês no estado do Ceará. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 37. 2000, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2000. p.160.

SOUZA, C. E. A. Estudo das interações entre o desenvolvimento gonadal, produção espermática, concentrações de testosterona e aspectos ligados à puberdade em carneiros Santa Inês ao longo do primeiro ano de vida. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.2, p.199-201, 2003.

SOUZA, C. E. A.; MOURA, A. A.; LIMA, A. C. B. Circunferência escrotal e características seminais em carneiros Santa Inês. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, n. 2, p.196-199. 2001.

STANBENFELD, G. H.; EDQVIST, L. Processos reprodutivos do macho. In: SWENSON M. J.; REECE, W. O. **Dukes – Fisiologia dos Animais Domésticos**. Rio de Janeiro: editora Guanabara Koogan S. A., 1996. Cap. 35, p. 603-614.

STEGER, K.; WROBEL, K.H. Postnatal development of ovine seminiferous tubules: an Electron microscopical and morphometric study. **Annals of Anatomy**, v.178, n. 3, p.201-213, 1996.

SUSKIND, A.; HAYNER-BUCHAN, A.; FEUSTEL, P. J.; KOGAN, B. A. Fibrosis correlates with detailed histological analysis of human undescended testes. **British Journal of Urology International**, v.101, n.11, p. 1441–1445, 2008.

TAYLOR, M.D.; RIELY, C.A.; HAMMERS, L.; FLAX, S.; WELTIN, G.; GARCIA-TSAO, G.; CONN, H.O.; KUC, R. & BARWICK, K.W. Quantitative US attenuation in normal liver and in patients with diffuse liver disease: importance of fat. **Radiology**, v.160, n.1, p.65-71, 1986.

TEIXEIRA, P.P.M.; OLIVEIRA, M.E.F.; D'AMATO, C.C.; RODRIGUES, L.F.S. & VICENTE, W.R.R. Avaliação ultrassonografia da ecogenicidade do parênquima testicular como exame complementar no andrológico de carneiros. **Nucleus Animalium**, v.3, n.1, p.31-36, 2011

TEIXEIRA, P.P.M.; CARDILLI, D.J.; PADILHA, L. C.; D'AMATO, C. C.; BARROS, F. F. P. DA C.; COUTINHO, L. N.; SANTOS, V. J. C. DOS; MARIANO, R. S.; VICENTE, W. R. R. Evaluation of the Testicular Stroma Echogenicity in Prepubertal Ram, **Ciência Animal**, v. 22, n.3, p. 25-29, 2012.

TOMLINSON, M.; JENNINGS, A.; MACRAE, A.; TRUYERS, I. The value of trans-scrotal ultrasonography at bull breeding soundness evaluation (BBSE): The relationship between testicular parenchymal pixel intensity and semen quality. **Theriogenology**. Feb, v.89, n.1, p.169-177, 2017.

UNANIAN, M.M.; SILVA, A. E. D. F.; MCMANUS, C.; CARDOSO, E.P. Características biométricas testiculares para avaliação de touros zebuínos da raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 1, p. 136-144, 2000.

URT, M.A.G. Ecotextura testicular e qualidade seminal em ovinos da raça Texel. 2014. 67 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2014.

VARONI, M.S. Avaliação da Espermatogênese e da Ecotextura testicular do cavalo Pantaneiro. 2014. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2014.

VASSENA, R.; ADAMS, G.P.; MAPLETOFT, R.J.; PIERSON, R.A.; SINGH, J. Ultrasound image characteristics of ovarian follicles in relation to oocyte competence and follicular status in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.76, n.1, p.25–41, 2003.

VESCOVI, L.A.; MONTEIRO, J. N. M.; SANTOS, W.G.; OLIVEIRA, D.C.; BORLINI, D. C.; MACHADO, F.M.; MARTINS FILHO, S.; COSTA, F. S. Ultrassonografia quantitativa do baço de gatos normais, **VETERINÁRIA EM FOCO Revista de Medicina Veterinária**, v. 7, n.1, p. 4-10. 2009.

WALLER, K.R.; KNIPP, B.S.; O'BRIEN, R.T. & ZAQZEBSKI, J.A. The effect of body wall on video signal analysis measurements. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v.44, n.2, p.222-225, 2003.

WROBEL, K-H.; REICHOLD, J.; SCHIMMEL, M. Quantitative morphology of the ovine seminiferous epithelium. **Annals of Anatomy**, v.177, n.1, p.19-32, 1995.

YAZAMA, F.; SATO, H. & SONODA, T. Malfunction of spermatogenesis in experimental ischemic mice. **The Journal of Reproduction and Development**, v.61, n.5, p.399–406, 2015.

ZWEIBEL, W.J. Sonographic diagnosis of diffuse liver disease. **Seminars in Ultrasound, CT and MRI**, v.16, n.1, p.8-15, 1995.

# ARTIGOS

---

# **ARTIGO I**

## **Análise da isquemia testicular induzida em carneiros por meio da ultrassonografia com escala de cinza**

*Analysis of testicular ischemia in rams by ultrasonography with grayscale*

Humberto Fernandes **Veloso Neto**<sup>1</sup>, José Carlos **Ferreira-Silva**<sup>1</sup>, Fernando **Ténório Filho**<sup>2</sup>,

Fernanda Pereira da Silva **Barbosa**<sup>4</sup>, Jorge Motta **Rocha**<sup>3</sup>, Fabiano Séllos **Costa**<sup>4</sup> & Paulo Fernandes de **Lima**<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biotécnicas Aplicadas a Reprodução Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife-PE, Brasil.

<sup>2</sup>Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), Estação Experimental de Itambé (EEI), Itambé, PE, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife-PE, Brasil.

<sup>4</sup>Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife-PE, Brasil.

### **Resumo**

Objetivou-se acompanhar a progressão da degeneração isquêmica testicular induzida em seis carneiros de idade entre 11 e 18 meses com intuito de validar as análises de padrões de ecogenicidade e ecotextura, avaliando-se também o perímetro escrotal e o volume testicular. As aferições desses parâmetros foram realizadas antes da isquemia mecânica induzida com burdizzo (D0) e nos dias 1 (D1), 4 (D4), 8 (D8), 16 (D16), 24 (D24), 35 (D35) e 50 (D50), armazenando-se as imagens ultrasonográficas para posterior análise computacional quantitativa da ecotextura e da ecogenicidade através do histograma de cinza. O valor da ecogenicidade no testículo hígado foi de  $105,01 \pm 8,23$  e o da ecotextura pela variação do eco foi de  $13,24 \pm 0,88$ . Não houve variação significativa ( $P > 0,05$ ) dos valores da ecotextura entre o D0 e o D1, razão pela qual conclui-se que perante uma lesão aguda, os valores da ecotextura obtidos pela amplitude de variação do eco não são suficientes para respaldar uma avaliação diagnóstica precisa, sendo necessário correlacionar à alteração dos valores da ecogenicidade. Além disso, também é possível concluir que macroscopicamente, a degeneração testicular se caracteriza pela redução significativa do perímetro escrotal e do volume testicular.

**Palavras chave:** ovino, ultrassonografia, isquemia, testículo

### **Abstract**

The objective of this study was to monitor the progression of experimentally induced testicular ischemic degeneration in rams, in order to ascertain the analysis of patterns of echotexture and echogenicity. It used six males' sheep between 11 and 18 months of age. We performed measurements of scrotal and testicular volume. The induction of the failure in testicular was performed vascularization by noninvasive method. Before performing the vascular procedure, it was performed ultrasound evaluation and subsequently evaluated on days 1, 4, 8, 18, 24, 35, 50. The images were stored for subsequent computer analysis of quantitative echotexture and echogenicity through the histogram of gray. The mean and standard deviation of echogenicity of testicular health were  $105,01 \pm 8,23$ , and the echotexture values obtained either by variation amplitude of the echo were  $13,24 \pm 0,88$  and size of the base of the histogram were  $32,41 \pm 2,68$ . Echotexture values obtained either by variation amplitude of the echo, before an acute injury, does not support a diagnostic evaluation because there was no statistically significant variation between the values D0 and D1, being necessary to correlate changes in values of echogenicity. Macroscopically, testicular degeneration characterized by a significant reduction of testicular and scrotal circumference observed statistically significant differences of these parameters.

**Keywords:** ram, ultrasound, ischemia, testicle.

## Introdução

O uso da ultrassonografia surgiu para complementar outras formas de diagnóstico por imagem, conferindo maior rapidez e precisão na conclusão diagnóstica. É uma técnica não invasiva que permite a visualização das interfaces teciduais com aplicações promissoras nas áreas de medicina interna, vascular e oncológica (AHMAD et al., 1999; PEIXOTO et al., 2010).

Na medicina veterinária, a ultrassonografia modo-B em tempo real tem sido umas das principais ferramentas para avaliar a função dos testículos, epidídimos e glândulas sexuais acessórias em ovinos sadios e férteis (ANDRADE et al., 2012; JUCÁ et al., 2009). Alguns estudos têm demonstrado que as alterações de ecogenicidades na ultrassonografia do parênquima testicular estão relacionadas com as características histomorfológicas dos túbulos seminíferos (EVANS et al., 1996). No entanto, devido a subjetividade da análise da imagem ultrasonográfica contribui para divergências de interpretação entre examinadores (LEE et al., 2006).

A técnica do histograma da imagem descreve a distribuição estatística dos tons de cinza em termo numérico de amostra (pixels) em cada segmento de imagem (CHANDOLIA et al., 1997), sendo utilizada para avaliar a ecogenicidade e a ecotextura de diversos órgãos nas diferentes espécies, como parede de útero em humanos (SANTOS FILHO et al., 2009), fígado em felinos (SANTOS et al., 2009) e humanos (LEE et al., 2006), baço em felinos (VESCOVI et al., 2009), testículos em touros e carneiros (GABOR et al., 1998; GIFFIN et al., 2009) e medula espinhal em cães (BONELLI et al., 2011),

revelando importante aplicabilidade clínica dessa metodologia.

A imagem ultrassonográfica é composta por uma matriz de elementos de imagem (pixels) que representa uma densidade de tecido dentro da escala de cinza (CHANDOLIA et al., 1997). Na técnica do histograma a partir de uma área da imagem ultrassonográfica selecionada é criada uma representação gráfica do número de pixels dentro da escala de cinza (QUEIROZ e GOMES, 2001), sendo posteriormente calculada a média dos pixels presentes na imagem (ecogenicidade) para determinar a avaliação dos pixels na representação de um desvio padrão (ecotextura) (LEE et al., 2006).

A avaliação dos valores numéricos de pixel estão distribuídos em uma escala que varia do preto (0) ao branco (255) absolutos, essa análise aumenta tanto a precisão dos resultados quanto a variação desses resultados que pode ser perceptível nas estruturas examinadas. A quantificação desses parâmetros de ecotextura e ecogenicidade no tecido depende da sua densidade e do teor macromolecular (GABOR et al., 1998; ARTEAGA et al., 2005; SANTOS FILHO et al., 2009; GIFFIN et al., 2009).

ANDRADE et al. (2012) verificaram que a nomenclatura utilizada para descrever o aspecto ultrassonográfico do parênquima testicular apresenta variações entre autores, havendo necessidade de padronizá-la a fim de facilitar a realização de novos estudos, assim como o estabelecimento de parâmetros de normalidade para a espécie ovina.

Devido a importância da análise da escala de cinza para aumentar a sensibilidade das observações nas estruturas com ecogenicidade aparentemente semelhante, objetivou-se acompanhar através de tal análise, a progressão da degeneração testicular isquêmica induzida em carneiros, visando validar os padrões de ecotextura e ecogenicidade.

## **Material e Métodos**

O trabalho foi conduzido de acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA-UFRPE licença 112/2015).

O experimento foi realizado no setor da Clínica de Grandes Animais do Hospital Veterinário da UFRPE, utilizando-se seis ovinos machos, sem raça definida, púberes, com faixa etária entre 11 e 18 meses, sem alterações da genitália externa e clinicamente sadios. Os animais foram colocados em baias com dois animais e a alimentação consistiu de feno de ração balanceada comercial e sal mineral específico para ovinos, além de água ad libitum.

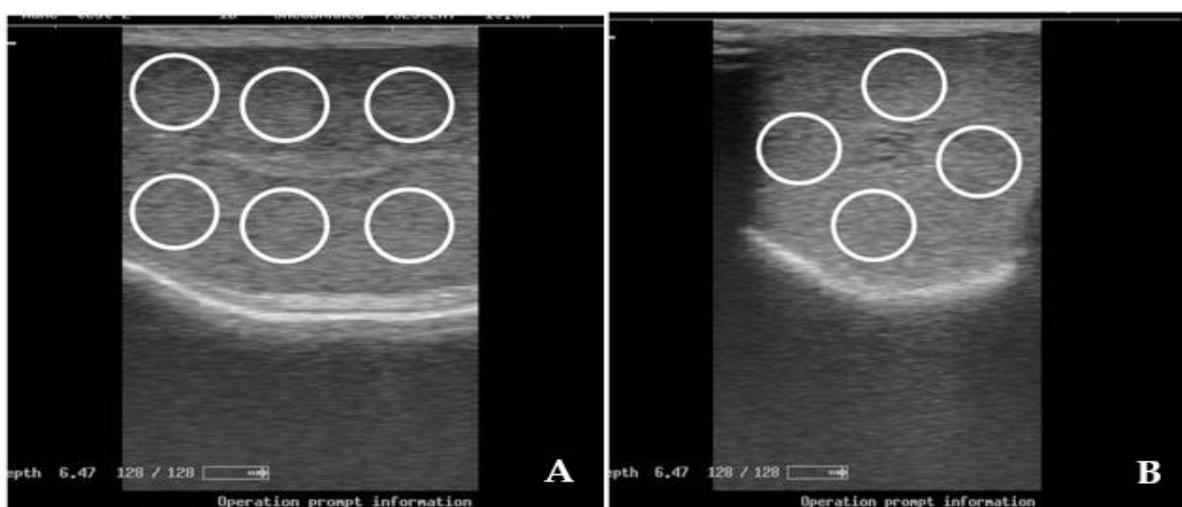
A irrigação sanguínea testicular foi interrompida com auxílio de um burdizzo próprio para

pequenos ruminantes, posicionando-se os animais em decúbito lateral. Anteriormente aos procedimentos, os animais foram tranquilizados com acepromazina a 1% na dose de 0,1 mg/kg administrada por via endovenosa. Em seguida foi realizada assepsia e bloqueio da região dos plexos vasculares do testículo com lidocaína a 2% aplicada por via subcutânea.

No dia anterior da indução da isquemia (D0), os testículos foram ultrassonograficamente avaliados com um aparelho Mindray® (modelo DP 2200) equipado com transdutor linear na frequência de 10 MHz. Com auxílio de paquímetro e fita métrica foram realizadas medidas de perímetro escrotal(cm) e o volume testicular(cm<sup>3</sup>) determinado pela fórmula matemática sugerida por Bayley et al. (1998). Essas avaliações continuaram sendo realizadas em todo período experimental nos dias 1º (D1), 4º (D4), 8º (D8), 16º (D16), 24º (D24), 35º (D35) e 50º (D50).

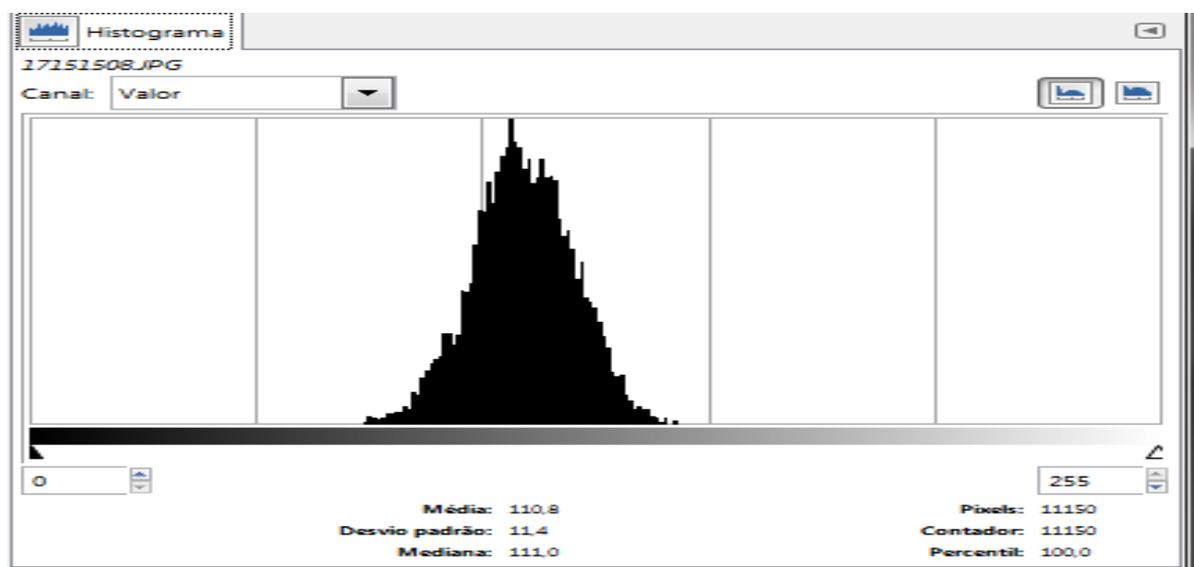
As imagens foram armazenadas em dispositivo de memória removível (SanDisk Cruzer Blade®) para posterior análise computacional quantitativa da ecotextura e da ecogenicidade realizada através do histograma de cinza utilizando o software GIMP® 2.8.

Na análise da imagem ultrassonográfica testicular em posição longitudinal do testículo após identificação do mediastino foram selecionadas seis áreas para avaliação ultrassonográfica, sendo três pontos acima e três pontos abaixo do mediastino e quatro áreas do corte transversal, conforme citado por Giffin et al. (2014), totalizando dez áreas em cada testículo. Cada área, medindo aproximadamente 25 mm de diâmetro (Figura 1), forneceu um histograma de cinza (Figura 2) em que a média e o desvio-padrão dos valores numéricos de pixel demonstrados no gráfico de histograma corresponde, respectivamente a ecogenicidade e a ecotextura.



**Figura 1.** Imagem ultrassonográfica de testículo de ovino em corte longitudinal (A) e transversal (B) para delimitação e aferição da escala de cinza em seis áreas no

sentido longitudinal após identificação do mediastino e em quatro áreas na posição transversal.

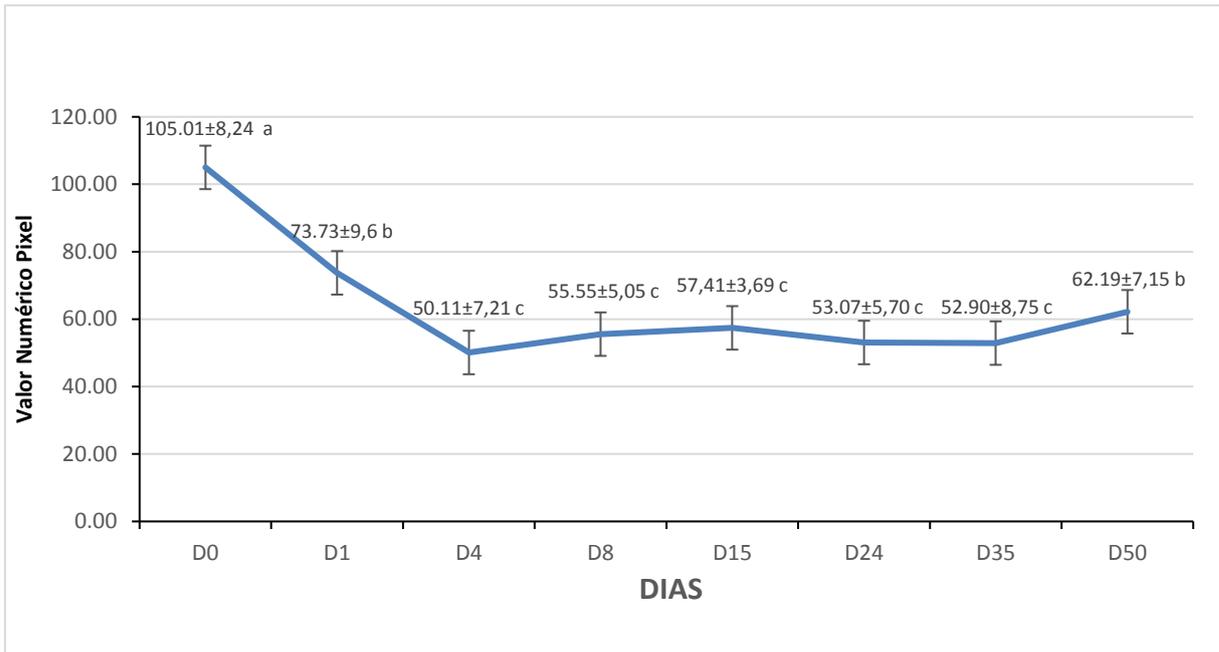


**Figura 2.** Histograma de cinza elaborado pelo software GIMP® 2.8, à partir da análise da área selecionada da imagem ultrassonográfica do testículo de ovino.

Para análise estatística foi realizado teste de normalidade de distribuição dos dados pelo método Kolmogorov e Smirnov. Em seguida foi utilizada a análise de variância com  $\alpha = 5\%$  e post hoc de Tukey para avaliar os valores da ecogenicidade e da ecotextura. A correlação entre perímetro e o volume escrotal, bem como entre ecogenicidade e ecotextura foi calculada através da correlação de Pearson através do software GraphPad InStat® 5.0.

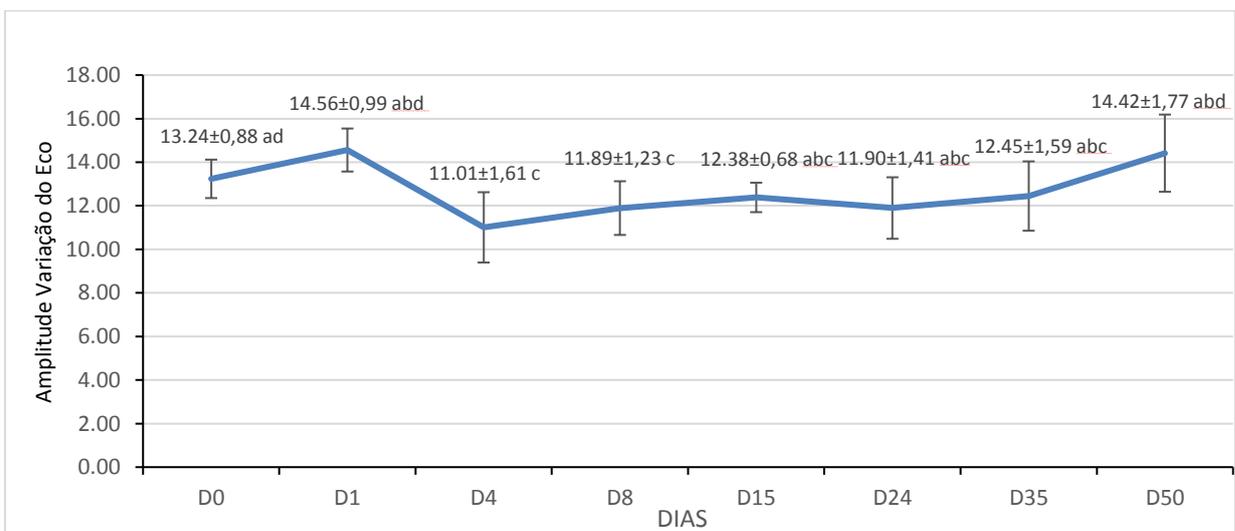
## Resultados

Os dados relativos a ecogenicidade do parenquima dos testículos submetidos a isquemia mecânica estão representados na Figura 3. O comportamento da ecogenicidade, representado pelo valor numérico de pixel, mostrou que o impedimento mecânico da irrigação testicular exerceu influência ( $P < 0,05$ ) já a partir do primeiro dia (D1) após esse procedimento. O valor numérico de pixel manteve-se constante até o 35º dia, sendo apenas recuperado ao final do experimento (D50), quando o processo de fibrose substituiu os tecidos do parenquima testicular e proporcionou significativo aumento ( $P < 0,05$ ) da ecogenicidade para valor de  $62,19 \pm 7,15$ , semelhante ao valor verificado em D1.



**Figura 3.** Valores médios da ecogenicidade, representada pelo valor numérico de pixel, do parênquima testicular de ovinos após a indução da isquemia durante o período experimental. Letras diferentes indicam diferença ( $P < 0,05$ ) entre os valores médios ( $\bar{X} \pm s$ ).

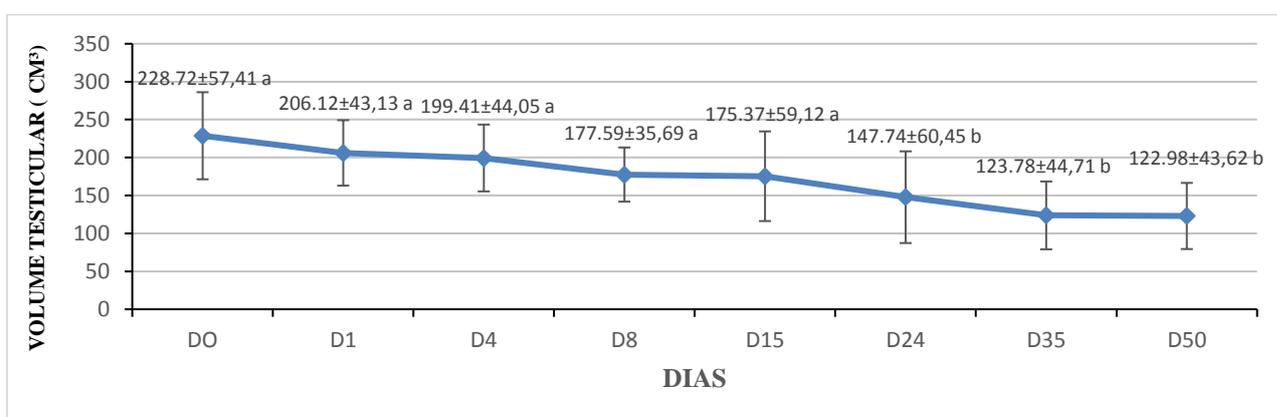
Os dados da ecotextura do parênquima dos testículos submetidos a isquemia mecânica estão representados na Figura 4. O comportamento do valor numérico da ecotextura, representado pela amplitude de variação do eco (AVE), mostrou que o bloqueio mecânico da irrigação testicular não exerceu influência ( $P > 0,05$ ) até o primeiro dia (D1) depois do procedimento de isquemia. Somente a partir do D4 é que ocorreu aumento ( $P < 0,05$ ) da homogeneidade da ecotextura do parênquima testicular em relação ao D0, fato também verificado nos demais dias de avaliação, exceto aquela realizada no D50.



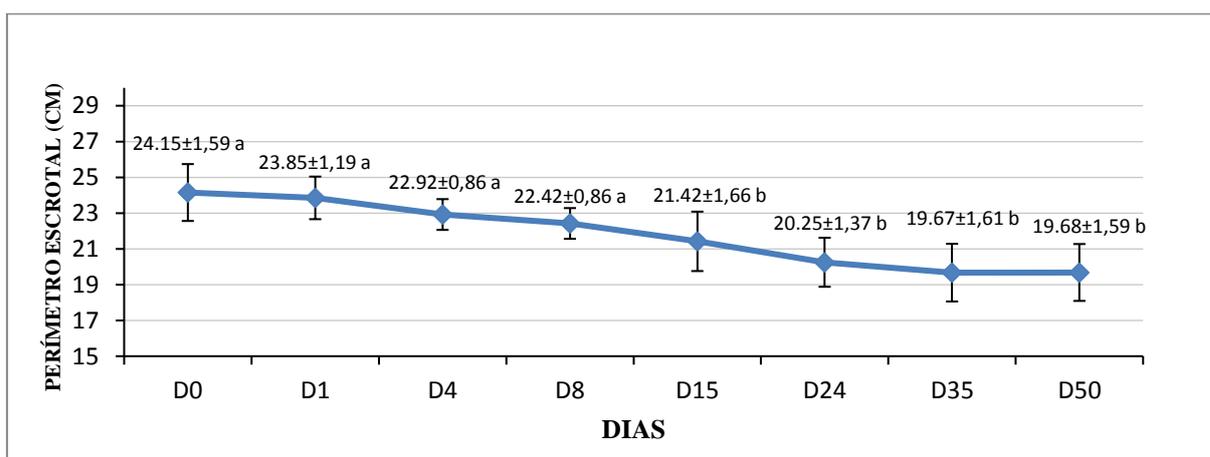
**Figura 4.** Valores médios da ecotextura representada pela amplitude de variação do eco (desvio padrão da intensidade pixel) do parênquima testicular de ovinos após a indução da isquemia durante

o período experimental. Letras diferentes indicam diferença ( $P < 0,05$ ) entre os valores médios ( $\bar{X} \pm s$ ).

O comportamento do volume testicular e do perímetro escrotal estão representados na Figuras 5 e 6. Nas figuras é possível observar a significativa ( $P < 0,05$ ) influência que a isquemia mecânica induzida determinou sobre ambos os parâmetros. No que concerne ao perímetro escrotal, essa influência começou ser evidenciada na avaliação do 15º dia, quando o perímetro escrotal mostrou-se estatisticamente reduzido ( $P < 0,05$ ) em relação a primeira avaliação (D0). Do mesmo modo, o volume testicular também diminuiu gradativamente ao longo do experimento, contudo, somente a partir da avaliação do D24 é que essa redução foi acentuada ( $P < 0,05$ ) em relação a do D0.

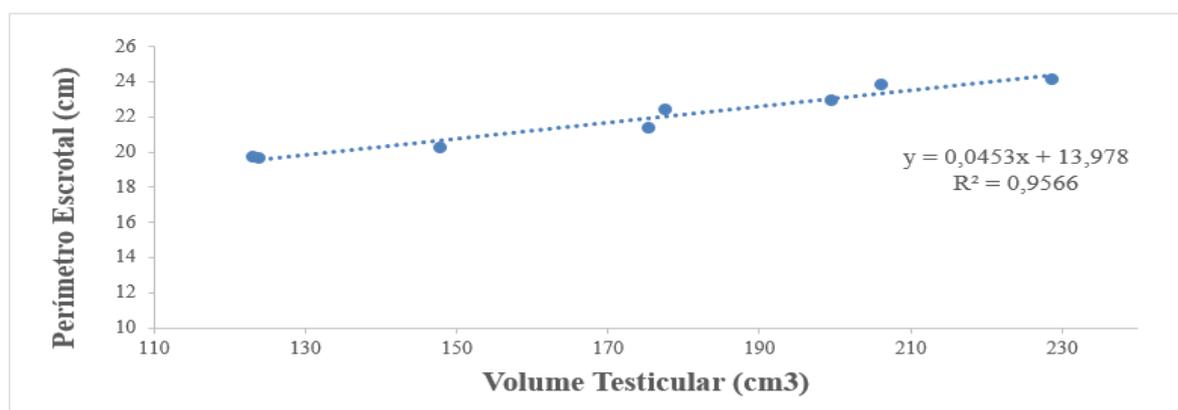


**Figura 5.** Valores médios do volume testicular ( $\text{cm}^3$ ) em ovinos após a indução da isquemia durante o período experimental. Letras diferentes indicam diferença ( $P < 0,05$ ) entre os valores médios ( $\bar{X} \pm s$ ) comparados ao D0.



**Figura 6.** Valores médios do perímetro escrotal ( $\text{cm}^3$ ) em ovinos após a indução da isquemia durante o período experimental. Letras diferentes indicam diferença ( $P < 0,05$ ) entre os valores médios ( $\bar{X} \pm s$ ) comparados ao D0.

Não houve correlação entre ecogenicidade e ecotextura, ( $P > 0,05$ ) sendo variáveis independentes, assim como não houve correlação entre os valores dos parâmetros de imagem e biometria testicular. Todavia, existiu correlação linear positiva entre perímetro escrotal e volume testicular (Figura4).



**Figura 7.** Gráfico de regressão linear com as variáveis de volume testicular e perímetro escrotal em ovinos após a indução da isquemia. (Valor de Pearson  $r = 0,97$ ;  $P < 0,05$ ).

## Discussão

A ecogenicidade testicular em carneiros, quando avaliada de forma subjetiva, varia de baixa a moderada, independentemente do testículo, se direito ou esquerdo, e ainda do plano de varredura (ANDRADE et al., 2012). No entanto, a ecogenicidade aumenta em relação direta com a idade dos animais (CARTEE et al., 1990; AHMAD et al., 1991; GOULETSOU et al., 2003; ANDRADE MOURA et al., 2008; GIFFIN et al., 2009; SILVA et al., 2015), os dados aqui obtidos, através da análise objetiva pelo histograma de cinza, são semelhantes aos encontrados por Giffin et al. (2009) e em grupos da mesma faixa etária no trabalho de Silva et al. (2015).

A redução significativa da ecogenicidade média do parênquima testicular sugere edema intersticial decorrente da interrupção da drenagem venosa e da irrigação arterial, como igualmente relatado por Ahmad et al. (1999). A lesão isquêmica resulta em um processo de necrose do parênquima testicular, o que provoca atrofia do órgão com degeneração dos túbulos seminíferos, como previamente descrito por Ferreira et al. (2000) e a fibrose decorrente da ausência de vascularização testicular

contribuiu para o aumento da ecogenicidade registrada na última avaliação.

Na análise objetiva, as alterações da ecotextura são avaliadas pela amplitude de variação do eco ou pela porcentagem do tamanho da base do histograma, no qual os valores menores indicam homogeneidade da imagem e os maiores heterogeneidade (SANTOS et al., 2009). Em condições fisiológicas, o testículo apresenta, na análise subjetiva, ecotextura homogênea (AHMAD et al., 1999, JUCÁ et al., 2009) e na análise objetiva utilizada nesse trabalho, a ecotextura do parênquima testicular ao iniciar o experimento, recebeu o valor de  $13,24 \pm 0,88$ , correspondente ao que foi classificado como homogênea por Ahmad et al. (1999) e Jucá et al. (2009).

Nesse trabalho não foi verificada alterações significativas dos valores da ecotextura do parênquima testicular durante as duas primeiras avaliações, fato contrário ao observado na análise subjetiva realizada por Ahmad et al. (1999) ao relatarem perda da homogeneidade após o processo de isquemia testicular. As alterações verificadas por esses autores pode ter sido decorrente da acentuada diminuição da ecogenicidade, também verificada nesse trabalho, comprometendo a avaliação da ecotextura, quando realizada pela análise subjetiva. Por outro lado, a partir da terceira avaliação observou-se significativa diminuição dos valores da ecotextura do parênquima em relação a primeira avaliação, achado que foi possivelmente decorrente da necrose dos túbulos seminíferos. Segundo Eilts et al. (1989), do ponto de vista histológico, essa necrose progride para uma autólise total a partir do terceiro e quinto dia após a lesão inicial.

No início do processo de substituição do parênquima testicular por tecido fibroso ocorre aumento significativo da homogeneidade, no entanto, com a progressão da lesão, a ecotextura também aumenta de valor, promovendo aspecto heterogêneo da imagem. Diante desses aspectos é possível admitir que nos primeiros dias de uma lesão aguda, os valores de ecotextura não são suficientes para respaldar o diagnóstico de degeneração testicular, fazendo-se necessário correlacionar os valores da ecotextura com os da ecogenicidade, a qual evidencia essas alterações de forma mais precoce. Segundo Kaye et al. (2008) e Nogueira et al., (2009), a ecotextura do parênquima testicular tem um valor prognóstico. Logo, no contexto de uma isquemia testicular, a heterogeneidade testicular indica a presença de lesão crônica ou mesmo de longa evolução que acarreta uma inviabilidade testicular.

Os poucos pontos de calcificação testicular observados nesse trabalho foi possivelmente decorrente da pouca idade dos animais utilizados. De modo geral, a maior quantidade desses pontos pode estar associada unicamente ao aumento da idade dos animais sem relação com alteração da função reprodutiva, como relatado por Jucá et al. (2009) e Andrade et al. (2012), ou ainda decorrente de patologias testiculares conforme mencionado por Sartori et al. (2002) e Ganem et al. (1999). Esses pontos podem influenciar na avaliação da ecotextura e da ecogenicidade quando estiverem presentes na área selecionada para determinação do histograma de cinza.

Durante o experimento foi observado aumento da espessura das túbicas testiculares, fato semelhante ao relatado por Ahmad et al. (1999), além de descreverem que também ocorre pontos hiperecóticos no parênquima testicular. Esses autores ainda relataram que esses achados são inicialmente decorrentes da hipocogenicidade do parênquima e da congestão das veias capsulares, as quais nos estágios mais avançados da lesão há espessamento hiperecótico das túbicas decorrente do processo de fibrose das túbicas testiculares.

No que concerne a avaliação da biometria testicular ficou evidenciado redução progressiva tanto do volume testicular quanto do perímetro escrotal, características de degeneração testicular isquêmica, conforme mencionado por Dellabianca et al. (2011) e Nogueira et al. (2009), sendo o perímetro escrotal mais sensível.

À longo prazo, a isquemia é caracterizada por redução de medidas escrotais fazendo-se necessário relacionar a ecogenicidade com a ecotextura, para uma melhor avaliação do parênquima testicular em lesões testiculares que sejam decorrentes de processos isquêmicos. Os resultados permitem concluir que a avaliação objetiva realizada pelo histograma de cinza é uma técnica eficiente e pode auxiliar futuras avaliações de lesões isquêmicas testiculares em ovinos.

## Referências

AHMAD, N. ; SAMAD, H.S. ; REHMAN, N.U. ; AHMAD, K.M. ; AHMAD, M, An ultrasonographic and histopathological study of the testis and epididymis following experimentally induced unilateral ischemia in male goats and rams. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 19, n.4, p. 204-209, 1999.

AHMAD, N., NOAKES, D.E., SUBANDRIO, A.L. B-mode real time ultrasonographic imaging of the testis and epididymis of sheep and goats. **Veterinary Record**. v.128, n.21, p.491-496, 1991.

ANDRADE A.K.G., SOARES, A.T., CARTAXO, F.Q., PEÑA-ALFARO, C.E., GUERRA, M.M.P. \_Achados ultrassonográficos nos testículos e epidídimos de carneiros deslanados jovens e clinicamente sadios. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinário e Zootecnia** v.64, n.2, p.371-379, 2012.

ANDRADE MOURA, J.C.; JUCÁ, A.F.; GUSMÃO, A.L. PINHO, T.G., BITTENCOURT, T. C. B., BARBOSA, C. M. P. Ecotextura testicular do carneiro Santa Inês. **Hora Veterinária**, v.27, n.162, p.19-22, 2008.

ARTEAGA, A.A., BARTH, A.D., BRITO, L.F.C. Relationship between semen quality and pixel-intensity of testicular ultrasonograms after scrotal insulation in beef bulls. **Theriogenology** v. 64, n.2, p.408–415, 2005.

BAILEY, T.L., HUDSON, R.S., POWE, T.A., RIDDELL, M.G., WOLFE, D.F., CARSON, R.L. Caliper ultrasonographic measurements of bovine testicles and a mathematical formula for determining testicular volume and weight in vivo. **Theriogenology**, v.49, n.3, p.581-594, 1998.

BONELLI M.A.; SANTOS, C.R.O.; COSTA, F.S.; TUDURY, E.A.; Análise de histograma dos níveis de cinza da medula espinhal normal em cães. **Medicina Veterinária**, v.5, n.4, Supl. 1, p. 136-141, 2011.

CARTEE, R.E.; RUMPH, P.F.; ABUZOID, S., CARSON, R. Ultrasonographic examination and measurement of ram testicles. **Theriogenology**, v.33, n.4, p.867-875, 1990.

CHANDOLIA, R.K., HONARAMOOZ, A., OMEKE, B.C., PIERSON, R., BEARD, A.P., RAWLINGS, N.C. Assessment of development of the testes and accessory glands by ultrasonography in bull calves and associated endocrine changes. **Theriogenology**, v.48, n.1, p.119-32, 1997.

DELLABIANCA, C., BONARDI, M., ALESSI, S. Testicular ischemia after inguinal hernia repair. **Journal of Ultrasound**, v.14, n.4, p. 205–207, 2011.

EILTS, B.E.; PECHMAN, R.D.; TAYLOR, H.W.; USENIK, E.A.; Ultrasonographic evaluation of induced testicular lesions on male goats. **American Journal Veterinary Research**, v. 50, n.8, p. 1361-1364, 1989.

EVANS, A.C.O., PIERSON, R.A., GARCIA, A., MCDUGALL, L.M., HRUDKA, F., RAWLINGS, N.C. Changes in circulating hormone concentrations, testes histology and testes ultrasonography during sexual maturation in beef bulls. **Theriogenology**, v.46, n.2 p. 345–357, 1996.

FERREIRA, A.L.; CRISCI, A.R.; FIORANI, S.A.S.; LAUS, J.L.; JORGE, A.T. Lesões isquêmicas do testículo de cães mediante garroteamento temporário do cordão espermático. **Ciência Rural**, v.30, n.5, p.841-845, 2000.

GABOR G.; SASSER, R.G., KASTELIC, J.P., MÉZES, M., FALKAY, G., BOZÓ, S., CSÍK, J.V., BÁRÁNY, I., HIDAS, A., SZÁSZ, F. J.R., BOROS, G. Computer analysis of video and ultrasonographic images for evaluation of bull testes. **Theriogenology** v. 50, n.2, p.223–228, 1998.

GANEM, J. P.; WORKMAN, K.R.; SHABAN, S.F. Testicular microlithiasis associated with testicular pathology. **Adult Urology**, v.53, n.1, p.209-213, 1999.

GIFFIN, L. FRANKS, E.S.; RODRIGUEZ-SOSA, J. R.; HAHNEL, A. BARTLEWISKI P.M. A Study of Morphological and Haemodynamic Determinants of Testicular Echotexture Characteristics in the Ram Experimental. **Biology and Medicine**, v.234, n.7 p.794-801, 2009.

GIFFIN, J.L., BARTLEWISKI, P.M., HAHNEL, A.C. Correlations among ultrasonographic and microscopic characteristics of prepubescent ram lamb testes. **Experimental Biology and Medicine** .v.239, n.12, p.1606-1608, 2014.

GOULETSOU, P.G.; AMIRIDIS, G.S.; CRIPPS, P.J., LAINAS, T., DELIGIANNIS, K., SARATSIS, P., FTHENAKIS, G.C. Ultrasonographic appearance of clinically healthy testicles and epididymes of rams. **Theriogenology**, v.59, n.9, p.1959-1972, 2003.

JUCÁ, A.F., ANDRADE MOURA, J.C.; GUSMÃO, A.L., BITTENCOURT, T.C., NASCIMENTO, M.C., BARBOSA, C.M.P. Avaliação ultrassonográfica dos testículos e das glândulas sexuais anexas de carneiros santa inês. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 2, p. 650-659, 2009.

KAYE, J. D., SHAPIRO, E. Y., LEVITT, S. B., FRIEDMAN, S. C., GITLIN, J., FREYLE, J., PALMER, L. S. Parenchymal echo texture predicts testicular salvage after torsion: potential impact on the need for emergent exploration. **The Journal of urology**, v.180, n.4, p.1733-1736, 2008.

LEE, H.C., CHOI, J.W., KIM, K.A., SEO, T.S., LEE, J.M., PARK, C.M. Usefulness of standard deviation on the histogram of ultrasound as a quantitative value for hepatic parenchymal echo texture; preliminary study. **Ultrasound Medicine and Biology**. v.32, n.12, p.1817-1826, 2006.

NOGUEIRA, V.H., VILA, F., OSÓRIO, L., CAVADAS, V., TEVES, F., SABEL, F., OLIVEIRA, M., BRANCO, F., CARVALHO, M.F., MARCELO, F. Torção do cordão espermático: aspectos de diagnóstico e terapêutica. **Revista Internacional de Andrologia**. v.7, n.1, p.28-33, 2009.

PEIXOTO G.C.X., LIRA, R., ALVES, N., SILVA, A. Bases físicas da formação da imagem ultrassonográfica. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.4, n.1, p.15-24, 2010.

QUEIROZ J.E.R., GOMES, H.M. Introdução ao processamento digital de imagens. **Revista de Informática Teórica e Aplicada**. v.8, n.1, p.1-31, 2001.

SANTOS, W.G.; MONTEIRO, J.N.; OLIVEIRA D.C.; BORLINI, D.C.; MARTINS FILHO, S.; MACHADO, F.M.; NUNES, L.C.; COSTA, F.S. Ultrassonografia quantitativa do fígado em gatos com tirototoxicose induzida. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 46, n. 6, p. 438-447, 2009.

SANTOS FILHO, O.O.; NARDOZZA, L.M.M.; ARAÚJO JUNIOR, E.; ROLO, L.C.; CAMANO, L.; MORON, A.F. Estudo da cicatriz uterina de cesariana avaliada pelo histograma escala-cinza. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n.1, p. 99-102, 2009.

SARTORI, R.; PRESTES, N.C.; CANAVESSI, A.M.O., KEMPINAS, W.G., ROSA, G.J.M. Avaliações ultrassonográfica, macroscópica e histológica da biopsia testicular em ovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, n.3, p.233-241, 2002.

SILVA, E. G., GONÇALVES, M. T.C., PINTO, S. C.C., SOARES, D. M., OLIVEIRA, R. A., ALVES, F. R., ARAÚJO, A. V.C., & GUERRA, P. C., Análise quantitativa da ecogenicidade testicular pela técnica do histograma de ovinos da baixada ocidental maranhense. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 35, n. 3, p. 297-303, 2015.

VESCOVI, L.A.; MONTEIRO, J.N.M., SANTOS, W.G.; OLIVEIRA, D.C.; BORLINI, D.C.; MACHADO, F.M.; MARTINS FILHO, S.; COSTA, F.S. Ultrassonografia quantitativa do baço de gatos normais Veterinária em Foco. **Revista de Medicina Veterinária**, v. 7, n. 1, p.4-10, 2009.

# **ARTIGO II**

## **Análise do estresse térmico testicular em carneiros por meio da ultrassonografia com escala de cinza**

*Analysis of testicular heat stress in rams with grayscale ultrasound*

Humberto Fernandes **Veloso Neto**<sup>1</sup>, José Carlos **Ferreira-Silva**<sup>1</sup>, Fernando **Ténório Filho**<sup>2</sup>,  
Emanuela Polimeni de **Mesquita**<sup>3</sup>, Alexandre Rodrigues de **Paula Junior**<sup>3</sup>, Jeine Emanuele Santos da **Silva**<sup>4</sup> &  
Paulo Fernandes de **Lima**<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Biotécnicas Aplicadas a Reprodução Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife-PE, Brasil.

<sup>2</sup>Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), Estação Experimental de Itambé (EEI), Itambé, PE, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife-PE, Brasil

<sup>4</sup>Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife-PE, Brasil.

### **Resumo**

Com este trabalho, objetivou-se avaliar o papel da análise quantitativa da escala de cinza nas imagens ultrassonográficas de testículos de ovinos submetidos a insulação escrotal, acompanhando as fases de degeneração e recuperação. Foram utilizados seis ovinos, sem raça definida com idade entre 18 e 20 meses. O experimento foi dividido em três períodos. No período pré-insulação foram realizados exames de análise do sêmen, biometria testicular e aquisição de imagens ultrassonográficas para posterior análise computacional quantitativa da ecotextura e da ecogenicidade através do histograma de cinza e assim estabelecer um padrão de normalidade. Na fase de insulação escrotal, colocou-se bolsas de tecido, envolvendo o escroto, com dupla parede e camada interna de algodão hidrófobo com cerca de 5 mm, durante de oito dias. No quarto dia (D4I) foi realizada medidas da biometria testicular, espermograma e análises das imagens ultrassonográficas. A fase de pós-insulação iniciou com a retirada das bolsas sendo considerado este dia como o dia 0 e foram realizadas aferições testiculares, coletas de sêmen e aferição das medidas testiculares e acompanhamento ultrassonográfico a cada sete dias, até a recuperação dos parâmetros seminais. Na biometria testicular observou diminuição das medidas de comprimento e volume escrotal no primeiro dia do período pós-insulação. Dentre os parâmetros espermáticos foram observados diminuição da motilidade, vigor e turbilhonamento, com 4 dias de estresse térmico, associado a uma diminuição da ecogenicidade, sem variação na ecotextura. Ecogenicidade demonstrou uma precocidade com relação aos outros parâmetros no retorno aos padrões definidos no período pré-insulação. Conclui-se portanto que a indução do estresse térmico caracterizou

com redução da biometria testicular, declínio na qualidade seminal e diminuição da intensidade pixel na imagem ultrassonográfica, esta última sendo um parâmetro sensível tanto na fase aguda em conjunto a com motilidade, vigor e turbilhonamento quanto na recuperação testicular, se mostrando mais precocemente que outros parâmetros.

**Palavras chave:** escala de cinza; estresse térmico; ovino; testículo

### **Abstract**

This paper aims to evaluate the role of quantitative grayscale analysis in ultrasonographic images of ram testicles with scrotal insulation, following their degeneration and recovery phases. We used six undefined ram between 18 and 20 months of age. We divided the experiment into three periods. It performed in the pre-insulation period, semen analysis, testicular biometry and ultrasonographic imaging for subsequent quantitative computational analysis of ecotexture and echogenicity using the grayscale histogram to establish a normality pattern. In the scrotal insulation phase, tissue pouches were placed, involving the scrotum, with a double wall and an inner layer of hydrophobic cotton of about 5 mm. Eight-day duration lasted, on the fourth day (D4I) measurements of testicular biometry, spermogram and ultrasonographic imaging were performed. The post-insulation phase started with the withdrawal of the bags, constituting this day as day 0, and testicular measurements, semen collections and testicular measurements and ultrasonographic monitoring were performed every seven days until the seminal parameters were recovered. In testicular biometry, the length and scrotal volume measurements decreased on the first day of the post-insulation period. Sperm parameters decreased motility, vigor and gross motility, with 4 days of thermal stress, associated with a decrease in echogenicity, with no variation in ecotexture. Ecogenicity showed a precocity with respect to the other parameters in return to the standards defined in the pre-insulation period. It was concluded that the induction of thermal stress was characterized by a reduction of testicular biometry, a decline in seminal quality and a decrease in pixel intensity in the ultrasound image, the latter being a sensitive parameter both in the acute phase together with motility, vigor and turbulence, and Testicular recovery, showing itself earlier than other parameters.

**Keywords:** greyscale; ram; testis, heat stress

### **Introdução**

Na região nordeste para maximizar o desempenho produtivo dos rebanhos ovinos é necessário uma adaptação às condições climáticas, visando um melhor desempenho reprodutivo principalmente quando há introdução de raças exóticas e não adaptadas, porém mais produtivas com intuito de promover o melhoramento genético (MAIA et al., 2015). A exposição dos carneiros à temperatura elevada ambiental é geralmente causa de estresse térmico e degeneração testicular, cuja intensidade varia entre as raças de ovinos (CRUZ JÚNIOR et al. 2016).

A diminuição na qualidade seminal que ocorre devido à exposição de carneiros a altas temperaturas do ambiente é decorrente dos efeitos diretos do calor sobre o testículo, onde os mecanismos de termoregulação não são suficientes para dissipação do calor consequentemente a temperatura testicular aumenta (MOREIRA et al., 2001). A degeneração causada por estresse térmico é uma importante causa de infertilidade e subfertilidade nos animais que vivem em condições de clima desfavorável (GABALDI e WOLF, 2002), esse aumento da temperatura escrotal afeta os parâmetros físicos e morfológicos do sêmen de maneira consistente evidenciando-se o efeito negativo sobre a qualidade do sêmen (SANTOS e SIMPLICIO, 2000; MOREIRA et al., 2001) assim os efeitos da elevação da temperatura testicular têm merecido atenção na reprodução (BARROS et al., 2009).

O uso da ultrassonografia testicular no exame andrológico é um importante teste complementar, especialmente em se tratando de desordens subclínicas (GABOR et al., 1998). Quando utilizada em conjunto com a ferramenta de análise quantitativa da escala de cinza têm permitido novos aspectos na análise estrutural e funcional do tecido testicular e portanto, da fertilidade auxiliando assim no diagnóstico precoce de diversas alterações reprodutivas (SCHURICH et al., 2009, TEIXEIRA et al., 2011).

O objetivo desse estudo é avaliar o papel da análise quantitativa da escala de cinza nas imagens ultrassonográficas testiculares de ovinos com insulação escrotal, acompanhando sua fase de degeneração e recuperação.

## **Material e Métodos**

O trabalho foi conduzido de acordo com as normas do Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Rural de Pernambuco (CEUA-UFRPE licença 112/2015).

O experimento foi realizado no setor da Clínica de Grandes Animais do Hospital Veterinário da UFRPE, localizado em Recife - Mesorregião Metropolitana, durante a estação seca (Dezembro a Junho), com índice pluviométrico 2.500 mm/ano, média anual de temperatura 25°C e umidade do ar 70%. Os animais foram acomodados em baias cobertas sendo dois animais por espaço, alimentados com: feno de tifton (*Cynodon spp.*), ração balanceada comercial própria para espécie, (400g/animal/dia), sal mineral específico para ovinos e água *ad libitum*, com regime de manejo semi-intensivo.

Foram utilizados seis ovinos machos sem raça definida, sexualmente maduros com idade variando entre 18 - 20 meses de idade, sem alterações da genitália externa e clinicamente sadios. Os animais passaram por um período de treinamento durante de 20 dias para adaptação ao método de coleta de sêmen através vagina artificial e para avaliar a sua qualidade seminal e classificá-los como sexualmente maduros e hípidos.

O experimento foi dividido em três períodos: pré-insulação, insulação e pós-insulação. No período pré-insulação, foram realizados exames de análise do sêmen, biometria testicular e aquisição de imagens ultrassonográficas para observação de ecogenicidade e ecotextura e assim estabelecer um padrão de normalidade servindo de dados de controle para os animais. As análises foram realizadas em dois momentos (I e II) com intervalo de quatro dias sendo a última análise no dia anterior à colocação das bolsas escrotais de insulação.

Na fase de insulação escrotal, os testículos foram envolvidos em bolsas de insulação confeccionadas com dupla camada de tecido intercalada com uma camada de 5mm de algodão hidrófobo. Esta fase teve a duração de 8 dias, e foi realizada uma coleta de sêmen ao quarto dia de insulação (D4I).

A fase de pós-insulação iniciou-se com a retirada das bolsas de insulação o qual foi considerado como dia 0. Nesta fase foram realizadas coletas de sêmen, acompanhamento ultrassonográfico e aferição das medidas testiculares a cada sete dias.

Durante esses três períodos, os parâmetros morfométricos do perímetro escrotal e volume testicular foram aferidos com auxílio de paquímetro e fita métrica, obtendo dados de circunferência escrotal, comprimento e largura testicular, o volume testicular foi obtido através da fórmula sugerida por Bayley et al. (1998).

O sêmen foi coletado pelo método da vagina artificial, usando uma fêmea como manequim e avaliado macroscopicamente quanto ao volume, aspecto e coloração e microscopicamente quanto a turbilhonamento (0-5), motilidade progressiva (0-100%), vigor (0-5) e concentração ( $\times 10^9$  células/mL).

Determinou-se a concentração espermática através da diluição 10  $\mu$ L de sêmen para diluição em 4 mL de formol salino, obtendo uma diluição de 1:400. A análise morfológica dos espermatozoides foi realizada utilizando-se a técnica de câmara úmida. Foram contadas 200 células/ejaculado, determinando-se o percentual de espermatozoides anormais. Todas as avaliações foram de acordo com o Manual de Exame Andrológico do CBRA (1998).

Os testículos foram avaliados com um aparelho de ultrassonografia da marca Mindray® (modelo DP 2200) equipado com transdutor linear multifrequencial ajustado na frequência de 10MHz.

Após tricotomia da região posterior da bolsa escrotal, as imagens ultrassonográficas foram obtidas em plano sagital localizando o mediastino testicular e no plano transversal, com auxílio de gel condutor para ultrassonografia e em seguida foram armazenadas em dispositivo de memória removível (SanDisk Cruzer Blade®). Para análise computacional quantitativa da ecotextura e ecogenicidade através do histograma de cinza utilizou-se o software GIMP® 2.8. Em cada imagem do testículo foram selecionadas 10 regiões com 25 mm de diâmetro de parênquima, sendo seis em plano sagital (acima e

abaixo do mediastino) e quatro em plano transversal. No software de análise, cada região selecionada da imagem gerou um histograma de cinza que indicou a média dos valores de intensidade pixel (ecogenicidade) e seu desvio padrão (ecotextura), a partir daí era realizado uma média geral dos dados para cada testículo.

Foi realizado teste de normalidade de distribuição dos dados, pelo método Kolmogorov e Smirnov. Para os dados paramétricos realizou-se comparação das médias e com análise de variância (ANOVA) com  $\alpha = 5\%$  e teste de Tukey, para os dados não paramétricos utilizou-se teste de Kruskal Wallis e teste de Dunn. Os dados em porcentagem foram transformados em arco seno  $\sqrt{x(\%)}$  para análise estatística. Para todos os testes utilizou-se o software GraphPad Prism 5.01®.

## **Resultados**

Os resultados da biometria testicular são observados na Tabela 1. O comprimento e o volume testicular foram os parâmetros que apresentaram diminuições de forma mais precoce, sendo observado diferença a partir da primeira avaliação pós-insulação. No entanto, aos 63 dias, diferente do volume que aos 49 dias não apresentava diferença com relação ao período pré-insulação.

TABELA 1: Valores médios dos parâmetros da biometria escrotal (perímetro escrotal, comprimento, largura e volume testicular) em carneiros submetidos à insulação escrotal por oito dias nos períodos de pré- insulação, insulação e pós-insulação escrotal. Letras diferentes na mesma coluna indica diferença ( $P < 0,05$ ) dos valores médios ( $\bar{X} \pm s$ ).

|                           | DIAS                      | PERÍMETRO<br>ESCROTAL(cm) | COMPRIMENTO<br>(cm) | LARGURA<br>(cm) | VOLUME<br>TESTICULAR(cm <sup>3</sup> ) |                |
|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------|-----------------|--|----------------|
| <b>Pré-<br/>insulação</b> | I                         | 26,9± 2,68a               | 7,49±1,35a          | 4,90± 0,7a      | 201,4± 77,4a                           |                |
|                           | II                        | 26,58± 2,52a              | 7,45±1,21a          | 4,94± 0,79a     | 202,4± 87,43a                          |                |
| <b>Insulação</b>          | D4I                       | 25,43± 3,25a              | 7,15± 1,1a          | 4,70± 0,73ab    | 176,0± 73,35a                          |                |
|                           | 0                         | 23,35± 2,24ab             | 6,53± 1,01b         | 4,43± 0,59ab    | 140,7± 54,58b                          |                |
|                           | 7                         | 21,58± 1,74b              | 6,15±0,85c          | 4,30±0,50b      | 123,8±42,17b                           |                |
|                           | 14                        | 21,37± 1,05b              | 6,1± 0,91c          | 4,05±0,49bc     | 110,0±39,12b                           |                |
|                           | <b>Pós-<br/>insulação</b> | 21                        | 21,35±1,14b         | 6,06±0,88c      | 3,97±0,56cd                            | 105,0±39,59b   |
|                           |                           | 28                        | 23,05± 2,31b        | 6,06±0,68c      | 4,18±0,54bcd                           | 115,5±33,69b   |
|                           |                           | 35                        | 23,27± 2,52b        | 5,95± 0,56c     | 4,06± 0,67bcd                          | 113,1± 41,39b  |
|                           |                           | 42                        | 24,13± 2,56ab       | 6,14± 0,45bc    | 4,41±<br>0,82abcd                      | 129,8± 56,24b  |
|                           |                           | 49                        | 24,72± 2,84ab       | 6,52± 0,63b     | 4,77± 0,78ab                           | 163,0± 62,0ab  |
|                           |                           | 56                        | 25,68± 2,83 a       | 6,50± 0,66b     | 4,6± 0,89ab                            | 156,1± 60,23ab |
| 63                        | 26,25± 2,80 a             | 6,84± 0,61ab              | 5,04± 0,75a         | 186,5± 62,73a   |  |                |
| 70                        | 26,35± 2,53 a             | 6,85±0,56a                | 5,05± 0,74a         | 190,4± 62,77a   |  |                |

Os parâmetros seminais estão apresentados na Tabela 2. O volume seminal apresentou-se com média de 1,08±0,22 a 1,11 ± 0,17 mL no período pré-insulação, não apresentando variação significativa entre os períodos. O aspecto do sêmen que no período pré-insulação era cremoso, tornou-se totalmente aquoso após 28 dias permanecendo com esse aspecto até a sexta semana pós-insulação.

Um decréscimo nos parâmetros de turbilhamento, vigor e motilidade, foram observados a partir do quarto dia de insulto térmico. Porém, os valores retornaram à normalidade com 56 dias após a retirada das bolsas.

Os valores referentes à concentração espermática antes da indução da insulação foram de  $3,2 \pm 0,5 \times 10^9$  e  $3,06 \pm 0,74 \times 10^9$  células/mL de ejaculado. A redução significativa no valor da concentração espermática ocorreu no dia 0. Os animais apresentaram um quadro de azoospermia com 21 dias após a retirada das bolsas de insulação. Após 28 dias detectou-se espermatozóides móveis nos ejaculados de alguns animais, mas somente com 63 dias da fase pós-insulação.

Antes do estresse térmico, os animais apresentaram médias de  $11,16 \pm 2,04$  % e  $12 \pm 2$  % de espermatozóides anormais no ejaculado, vindo ter um aumento nas porcentagens com sete a catorze dias após a retirada do estresse térmico prevalecendo com valores altos até aos 63 dias.

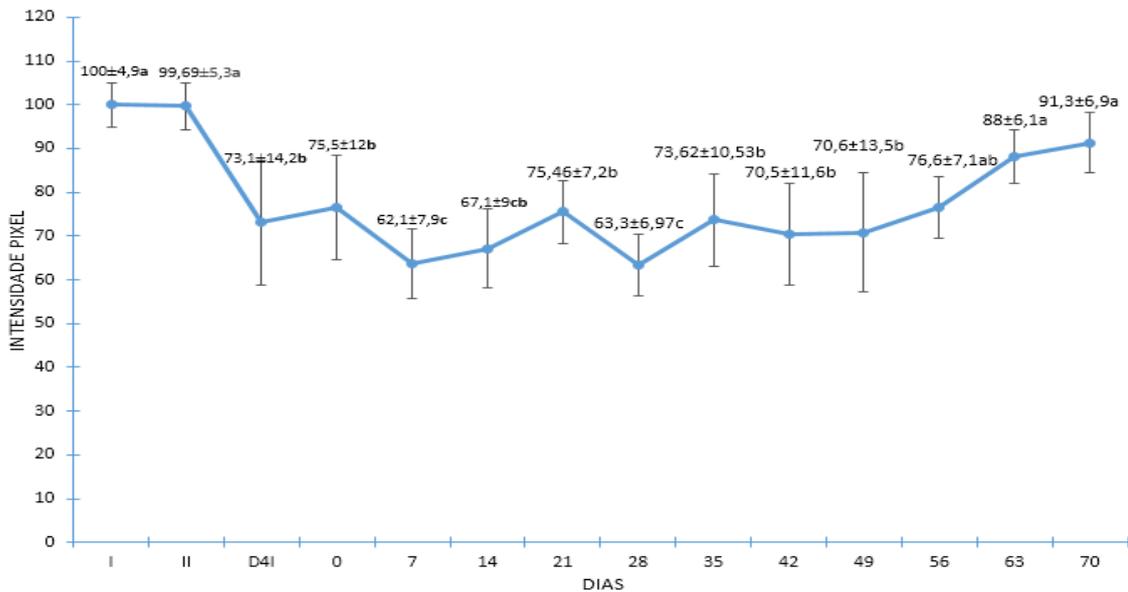
TABELA 2: Valores médios dos parâmetros da análise seminal em carneiros submetidos à insulação escrotal por oito dias nos períodos de pré-insulação, insulação e pós-insulação escrotal. Letras diferentes na mesma coluna indica diferença ( $P < 0,05$ ) dos valores médios ( $\bar{X} \pm s$ ).

|                      |            | PARÂMETROS SEMINAIS |                          |                |                   |                                      |                   |
|----------------------|------------|---------------------|--------------------------|----------------|-------------------|--------------------------------------|-------------------|
|                      | DIA        | Volume<br>(mL)      | Turbilhonamento<br>(0-5) | Vigor<br>(0-5) | Motilidade<br>(%) | Concentração<br>( $\times 10^9$ /mL) | Patologias<br>(%) |
| <b>Pré-insulação</b> | <b>I</b>   | 1,08±0,2a           | 4,6±0,47a                | 4,3±0,81 a     | 83,33±5,16a       | 3,2±0,5 a                            | 11,16±2,04a       |
|                      | <b>II</b>  | 1,1±0,17a           | 4,3±0,47a                | 4,5±0,57 a     | 81,67±7,52a       | 3,06±0,74 a                          | 12±2a             |
| <b>Insulação</b>     | <b>D4I</b> | 1,2±0,28a           | 2,3±0,47b                | 1,83±0,75 b    | 35,00±20,74 b     | 3,3±0,81 a                           | 13,33±3,01a       |
|                      | <b>0</b>   | 1,2±0,25a           | 0c                       | 0,3±0,51 c     | 3,3±5,16 c        | 1,71±0,42 b                          | 22±3,77b          |
|                      | <b>7</b>   | 1,25±0,1a           | 0c                       | 0 d            | 0 d               | 0,14±0,06 c                          | 52,66±8,5c        |
|                      | <b>14</b>  | 1,28±0,1a           | 0c                       | 0 d            | 0 d               | 0,07±0,01 c                          | 68,8±6,8d         |
|                      | <b>21</b>  | 1,13±0,2a           | 0*                       | 0 *            | 0 *               | 0 *                                  | 0*                |
| <b>Pós-insulação</b> | <b>28</b>  | 1,35±0,3a           | 0c                       | 0 d            | 0 d               | 0,12±0,07 c                          | 52,4±17,67c       |
|                      | <b>35</b>  | 1,2±0,17a           | 0c                       | 0 d            | 0 d               | 0,05±0,03 c                          | 51±5,56c          |
|                      | <b>42</b>  | 1,2±0,28            | 0c                       | 0 d            | 0 d               | 0,02±0,01 c                          | 42,4±10,16c       |
|                      | <b>49</b>  | 1,08±0,2a           | 0c                       | 0,83±0,75 c    | 0,66±0,81 e       | 0,1±0,07 c                           | 44±5,09c          |
|                      | <b>56</b>  | 1,1±0,17a           | 1,3±1,37b                | 2,16±1,47b     | 25,00±22,58 b     | 0,69±0,38 c                          | 38,83±9,7c        |
|                      | <b>63</b>  | 1,23±0,2 a          | 4,0±1 a                  | 4,3±0,81a      | 78,33±14,72a      | 2,75±1,16 a                          | 27,33±4,32bc      |
|                      | <b>70</b>  | 1,3±0,25a           | 4,3±0,74 a               | 4,5±0,57a      | 81,67±7,58a       | 3,13±0,75 a                          | 20,33±5,04b       |

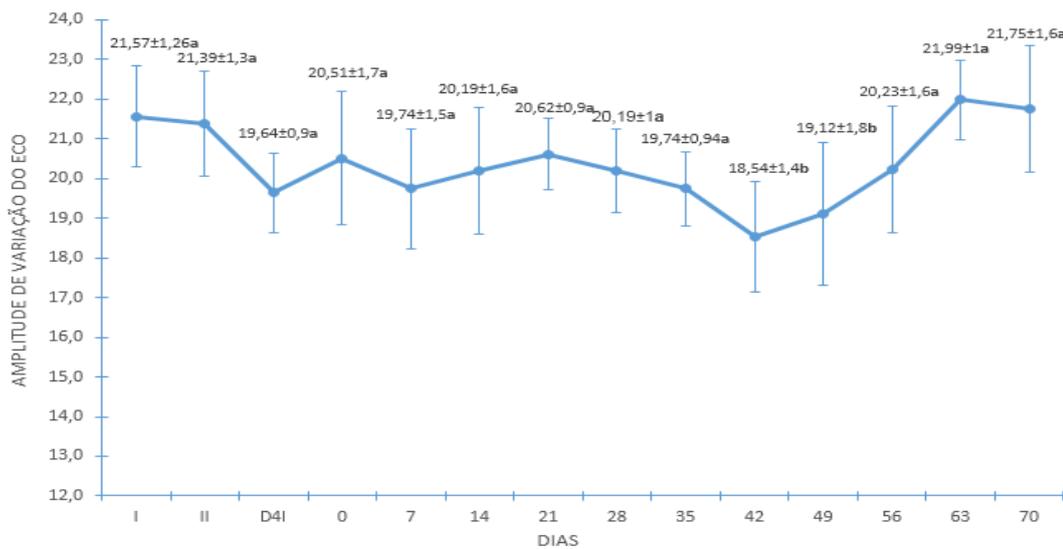
\*Azoospermia nos animais

As variações dos valores de ecogenicidade durante o experimento estão representados na Figura 2. A ecogenicidade testicular no período de pré-insulação apresentou médias de  $100 \pm 4,9$  e  $99,69 \pm 5,3$  de intensidade pixel. Após quatro dias de estresse térmico, a ecogenicidade teve uma queda para valores de  $73,1 \pm 14,2$ , não havendo diferença entre quatro e oito dias de insulação. Com sete dias da fase de pós-

insulação, chegou a um valor de  $62,1 \pm 7,9$ . Um aumento da ecogenicidade seguido de queda, foi observado aos 21 dias. A partir de 28 dias iniciou uma curva de aumento da ecogenicidade chegando aos valores semelhantes da fase pré-insulação aos 63 dias. A ecotextura apresentou uma queda do valores entre 42 e 49 dias do período pós-insulação, indicando uma maior homogeneidade, após esse período retornou a valores próximos do período de pré-insulação (FIGURA 2).



**Figura 1:** Variação da ecogenicidade testicular em carneiros submetidos à insulação escrotal por oito dias nos diferentes períodos do experimento. Letras diferentes indica diferença ( $P < 0,05$ ) entre os valores médios ( $\bar{X} \pm s$ ).



**Figura 2:** Variação da ecotextura testicular em carneiros submetidos à insulação escrotal por oito dias nos diferentes períodos do experimento. Letras diferentes indica diferença ( $P < 0,05$ ) entre os valores médios ( $\bar{X} \pm s$ ).

## Discussão

Neste trabalho, a biometria testicular sofreu um efeito negativo após o estresse térmico, se apresentando com uma diminuição em suas medidas corroborado por Florentino et al. (2003a) ao relatarem o mesmo fato em caprinos submetidos a insulação escrotal e Moreira et al. (2001) em ovinos. O comprimento e o volume testicular foram os primeiros parâmetros a reduzirem suas medidas, corroborando o trabalho de Moreira et al. (2001), que evidenciaram que as medidas de volume e comprimento são indicadores viáveis dos efeitos do estresse térmico sobre as gônadas masculinas, por se apresentarem de forma precoce quando comparadas as outras medidas testiculares. Na recuperação testicular, o volume retornou de uma forma mais rápida às medidas semelhantes a fase de pré-insulação, tal fato pode ter sido auxiliado pelas medidas da largura escrotal que teve uma recuperação aos 42 dias e influenciou no cálculo do volume testicular.

O volume seminal não apresentou alterações após a insulação escrotal, sendo corroborado por Mucciolo et al. (1974), uma vez que a maior contribuição do volume do ejaculado seja das glândulas anexas ao sistema reprodutor do macho (MOULE e WAITES, 1963). Nesse trabalho houve declínio nos parâmetros de turbilhamento, vigor e motilidade espermática com quatro dias na fase de insulação, discordando de Florentino et al.(2003b) e Santos et al.(1998) observaram que há redução do vigor espermático em caprinos com seis dias. Segundo Voglmayr et al. (1971) o aumento do número de espermatozoides mortos pelo estresse térmico no sêmen influenciou para a queda desses parâmetros. Porém, essas alterações foram mais precoces que aquelas observadas na concentração espermática e nas medidas testiculares, fato corroborado por Mucciolo et al. (1974) e Moreira et al. (2001).

O retorno da motilidade espermática, juntamente com o vigor e turbilhamento, aconteceu aos 63 dias do período de pós-insulação, ocorrendo ao mesmo tempo em que a concentração espermática, fato visto por Cóser et al. (1979) em ovinos, em que observou o retorno da motilidade com 60 dias e por Santos e Simplício, (1993) em caprinos que observaram o retorno com 63 dias. Moreira et al. (2001) relataram em seu trabalho que o retorno da motilidade espermática, aos padrões observados antes da insulação, ocorreu com 90 dias após o término do estresse térmico, justificando que provavelmente que a temperatura elevada causou danos à funcionalidade do epidídimo, os quais também levaram mais tempo para serem reparados.

A diminuição da concentração espermática foi observada na primeira coleta do período pós insulação, fato também observado no trabalho de Moreira et al. (2001) e que pode ser decorrente de uma destruição e absorção de espermatozoides com defeitos morfológicos no epidídimo pois eram espermatozoides já formados antes da insulação. Em um estudo Florentino et al, (2003a) observaram que após seis dias de insulação em caprinos observaram histologicamente no ducto epididimário a

presença de corpos residuais e uma diminuição dos espermatozóides e aumento no número de patologias espermáticas na cauda do epidídimo. Estudos em touros relatam que no epidídimo há reabsorção de espermatozóides com defeitos morfológicos (RAO et al., 1980; SUTOVSKY et al. 2001). O tempo de insulação escrotal tem efeito negativo sobre concentração do sêmen (FLORENTINO et al., 2003b).

A concentração de espermatozóides recuperou a níveis fisiológicos após 63 dias o que caracterizou que o estresse térmico causou lesões a nível de células germinativas, visto que Cardoso e Queiroz (1988) descreveram que o tempo da primeira mitose da espermatogônia A até a liberação em espermatozóides são 42,28 dias e associado ao tempo de transporte e maturação dos espermatozóides pelo epidídimo que em média é de 14 dias segundo Amir et al. (1968), havendo assim tempo suficiente para o retorno a níveis satisfatórios de concentração encontrados neste trabalho. Em seus trabalhos, Florentino et al. (2003a) e Mucciolo et al. (1974) observaram que um período de insulação maior que seis dias acarretava uma redução na quantidade, não só das espermatídes como também das espermatogônias e células de Sertoli, túbulo seminífero se encontrava com maior destruição do epitélio germinativo, áreas de vacuolização e aumento de número das células multinucleadas, o que prejudicaria a formação dos espermatozóides. Arteaga et al. (2005) afirmaram que o insulação escrotal tem um efeito deletério na qualidade do espermatozóides e também que a gravidade dos defeitos está relacionada com a duração do período de estresse térmico.

Nesse trabalho o aumento do número de patologias espermáticas foi observado logo após retirada das bolsas de insulação, semelhante ao trabalho de Moreira et al. (2001) que observaram um aumento da porcentagem de defeitos espermáticos (defeitos menores) logo após a retirada das bolsas e afirmaram que existe uma maior sensibilidade ao estresse térmico para o surgimento desses defeitos. O aumento da porcentagem de defeitos nos espermatozóides na fase aguda da insulação segundo Moreira et al. (2001) foi decorrente do efeito do estresse térmico no epidídimo afetando os espermatozóides que estavam armazenados. Nesse trabalho, comprometeu também os estágios finais da espermiogênese, pela observação dos defeitos espermáticos mesmo após 15 dias de retirada das bolsas de insulação.

A variação da ecogenicidade testicular apresentou uma diminuição ao quarto dia do início do estresse térmico, assim como o decréscimo na motilidade, turbilhonamento e vigor, Mieusset et al. (1992) relataram que os primeiros efeitos observados do estresse térmico são em espermatozóides que são localizados no epidídimo, logo o reflexo dessa diminuição na ecogenicidade foi observada no sêmen após quinze dias na qualidade seminal. Segundo Moreira et al. (2001), como visto também nesse trabalho, a motilidade espermática apresenta maior sensibilidade ao estresse térmico e alterações neste parâmetro pode surgir antes mesmo de serem detectadas alterações na biometria testicular. Florentino et al. (2003a) relataram que aos seis dias de estresse térmico nos testículos em caprinos, há a preservação dos túbulos seminíferos com células de Sertoli, espermatogônias e espermátócitos mas com presença de células gigantes multinucleadas e raras espermatídes, corroborado por Carlsen et al. (2003) e Setchell

(1998) ao afirmarem que dentre as células da espermatogênese mais afetadas pelo estresse térmico, os espermatócitos e espermátides, são mais termo-sensíveis, enquanto que as espermatogônias são mais resistentes, o que contribui para a queda da ecogenicidade, vista nesse trabalho.

A variação na ecogenicidade testicular antecipou a variação nos parâmetros seminais, visto que diminuiu aos quatro dias de insulação com declínio acentuado da qualidade do sêmen nas semanas posteriores e retornou aos valores de normalidade mais cedo que as alterações na qualidade seminal, corroborando por Arteaga et al. (2005) que em seus estudos com touros, afirmaram que a intensidade pixel testicular teve uma melhor associação com a qualidade futura do sêmen.

Houve um pico de ecogenicidade aos 21 dias no período pós insulação. Mesmo fato foi observado por Arteaga et al. (2005), não explicando esse fenômeno. A alteração na ecogenicidade pode ser resultante de atividade mitótica nas células germinativas para recuperação das lesões. Em seus estudos, Czarnota e Kolius (2010) relataram que alterações celulares do tipo, mitose e apoptose, afetam a ecogenicidade dos tecidos, corroborado por Giffin et al. (2014) que descreveram oscilações na análise quantitativa da ecogenicidade em testículos de cordeiros pré-púberes durante o início da primeira onda da espermatogênese devido proliferação das células germinativas.

Nesse trabalho, as alterações degenerativas testiculares produzidas pela insulação escrotal foram demonstradas com a queda na ecogenicidade testicular com sua recuperação aos 56 dias, no entanto a normalização da qualidade seminal ocorreu somente na semana seguinte, porém ainda com algum comprometimento da função testicular visto que havia com alta porcentagem de patologias espermáticas.

A ecotextura manteve-se sem alterações até aos 42 dias, havendo uma diminuição, que caracterizou uma maior homogeneidade e retornou a valores próximos a fase pré-insulação nas análises posteriores. Apesar de ser comprovado o efeito do estresse térmico sobre o parênquima testicular, o tempo de 8 dias, como nesse experimento não houve tempo suficiente para uma perda da integridade estrutural dos túbulos seminíferos ou formação de calcificação e/ou fibrose tecidual, alterações que poderiam causar desorganização na estrutura tecidual e conseqüentemente alterações na ecotextura, corroborado por Florentino et al. (2003a) onde relataram que somente após 12 dias de estresse térmico nos testículos de caprino ocorreu uma perda da integridade dos túbulos seminíferos com pontos de calcificação no parênquima e com 24 dias de estresse térmico ocorreu proliferação de tecido conjuntivo entre os túbulos seminíferos. Mucciolo et al. (1974) ao analisar testículos com 4 e 8 dias de insulação não observou diferenças no tecido intersticial para os períodos de insulação. Um fato que pode ter contribuído para a homogeneidade aos 42 dias, seja uma alta produção espermática, que foi observada no ejaculado 15 dias após com a normalização da concentração espermática a partir daquela semana.

Este trabalho permite concluir que a indução do estresse térmico em testículos de ovinos se caracterizou com redução da biometria testicular, declínio na qualidade seminal e diminuição da intensidade pixel na imagem ultrassonográfica, esta última sendo um parâmetro sensível tanto na fase aguda em conjunto a com motilidade, vigor e turbilhonamento quanto na recuperação testicular, se mostrando mais precocemente que outros parâmetros.

### Referências

- AMIR, D., ORTAVANT, R., BURE, A. Influence de la fréquence des collectes sur la durée du transit des spermatozoïdes dans le canal epididymaire du belier. **Annales de biologie animale, biochimie, biophysique**, v. 8, n.2, pp.195-207, 1968.
- BARROS, C.M.Q., OBA, E., SIQUERIA, J.B., LEAL, L.S., KASTELIC, J.P. Efeito da temperatura ambiente sobre as temperaturas escrotal, intratesticular, intravascular e fluxo sanguíneo testicular de touros. *Veto e Zotec.*, p.354-362, v.16, n.2, jun., 2009.
- BAILEY, T.L., HUDSON, R.S., POWE, T.A., RIDDELL, M.G., WOLFE, D.F., CARSON, R.L. Caliper ultrasonographic measurements of bovine testicles and a mathematical formula for determining testicular volume and weight in vivo. **Theriogenology**, v.49, n.3, p.581-594, 1998.
- CARDOSO, F.M. AND QUEIROZ, G.F., Duration of the cycle of the seminiferous epithelium and daily sperm production of Brazilian hairy rams. **Animal Reproduction Science**, v.17, n.1-2, p. 77-84, 1988.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL-CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal 2ed. Belo Horizonte, 1998. 49 p.
- CÓSER, A.M.L., GODINHO, H.P., FONSECA, V.O. Efeito de altas temperaturas sobre a espermatogênese de carneiros brancos deslanados em condições experimentais. **Arquivos da Escola de Veterinária da. UFMG**, v.31, n.2, p.147-154, 1979.

CRUZ JÚNIOR, C.A., LUCCI, C.M., PERIPOLLI, V., TANURE C.B., SILVA, A.F., MENEZES, A.M.; RAMOS, A.F., McMANUS, C. Breed comparison for heat adaptation in rams using multivariate analysis, **Bioscience Journal**, v. 32, n. 1, p. 178-190, 2016.

CHANDOLIA, R.K., BARTLEWSKI, P.M., OMEKE, B.C., BEARD, A.P., RAWLINGS, N.C., PIERSON, R.A. Ultrasonography of the developing reproductive tract in ram lambs: effects of a GnRH agonist. **Theriogenology**, v.48, n.1, p.99–117, 1997.

CZARNOTA, G.J., KOLIOS, M.C. Ultrasound detection of cell death. **Imaging in Medicine** v.2, n.1, p.17–28, 2010.

EVANS, A.C.O., PIERSON, R.A., GARCIA, A., MCDUGALL, L.M., HRUDKA, F., RAWLINGS, N.C. Changes in circulating hormone concentrations, testes histology and testes ultrasonography during sexual maturation in beef bulls. **Theriogenology**, v.46, n.2, p.345–57, 1996.

FLORENTINO, C.M., REIS, J.C., GUERRA, M.M.P., MAIA, F.C.L., COLETO, Z.F. Efeito do tempo de insulação escrotal sobre a estrutura do parênquima testicular de caprinos (*Capra hircus*) sem raça definida. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v.6, n.1, p.29-38, 2003a.

FLORENTINO, C.M., REIS, J.C., GUERRA, M.M.P., SOUZA, A.F., MERGULHÃO F.C.C., BATISTA, A.M., COLETO, Z.F. Efeito do tempo de insulação escrotal sobre os constituintes do plasma seminal de caprinos (*Capra hircus*) sem raça definida. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v.6, n.1, p.39-45, 2003b.

GABALDI, S. H; WOLF, A. Importância da termorregulação testicular na qualidade do sêmen em touros. **Ciências agrárias e da saúde**. v. 2, n. 2, Andradina-SP, p. 66-70, 2002.

GABOR, G.; SASSER, R.G., KASTELIC, J.P., MÉZES, M., FALKAY, G., BOZÓ, S., CSÍK, J.V., BÁRÁNY, I., HIDAS, A., SZÁSZ, F. J.R., BOROS, G. Computer analysis of video and ultrasonographic images for evaluation of bull testes. **Theriogenology** v. 50, n.2, p.223–228, 1998.

GIFFIN, J.L., BARTLEWSKI, P.M., HAHNEL, A.C. Correlations among ultrasonographic and microscopic characteristics of prepubescent ram lamb testes. **Experimental Biology and Medicine**, v.239, n.12, p.1606-1618, 2014.

MAIA, M.S., SILVA, J.V.C., MEDEIROS, I.M., LIMA, C.A.C., MOURA, C.E.B. Características seminais de carneiros das raças Dorper, Santa Inês e mestiços em condições de clima tropical **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 18, n. 1 p. 20-25, 2015.

MIEUSSET, R., QUINTANA CASARES, P., SANCHEZ PARTIDA, L.G., SOWERBUTTS, S.F., ZUPP, J.L., SETCHELL, B.P. Effects of heating the testes and epididymides of rams by scrotal insulation on fertility and embryonic mortality in ewes inseminated with frozen semen, **Journal of Reproduction and Fertility**, v.94, n.2, p.337-343, 1992.

MOULE, G.R.; WAITES, G.M.H. Seminal degeneration in the ram and its relation to the temperature of the scrotum. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, Grã-Bretanha, v.5, p.433-446, 1963.

MOREIRA, E.P.; MOURA, A.A.A. ARAUJO, A. A. Efeitos da Insulação Escrotal sobre a Biometria Testicular e Parâmetros Seminais em Carneiros da Raça Santa Inês Criados no Estado do Ceará. **Revista Brasileira de Zootecnia** v.30, n.6, p. 1704-1711, 2001.

VOGLMAYR, J. K., SETCHELL, B. P., WHITE, I. G. The effects of heat on the metabolism and ultrastructure of ram testicular spermatozoa, **Journal of Reproduction and Fertility**, vol. 24, n. 1, p. 71-80, 1971.

MUCCIOLO, R.G., BARNABE, R.C., BARNABE, V.H. Variações no quadro espermático de carneiros submetidos a degeneração testicular experimental, **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, v.11, n.1, p.155-177 1974.

RAO, A.R., BANE, A., GUSTAFSSON, B.K. Changes in the morphology of spermatozoa during their passage through the genital tract in dairy bulls with normal and impaired spermatogenesis. **Theriogenology**.v.14, n.1, p.1-12. 1980.

SANTOS, D.O., SIMPLÍCIO, A.A. A insulação escrotal na fertilidade de caprinos adultos. **Ciência Animal**, v.3, p.14-25, 1993.

SANTOS, D.O., SIMPLÍCIO, A.A. Parâmetros escroto-testiculares e de sêmen em caprinos adultos submetidos à insulação escrotal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 9, p. 1835-1841, 2000.

SANTOS, D.O., SIMPLÍCIO, A.A., MACHADO, R. Características escroto-testiculares e do ejaculado em bodes mestiços submetidos à insulação escrotal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.50, n.3, p. 287-297, 1998.

SCHURICH, M., AIGNER, F., FRAUSCHER, F., PALLWEIN, L. The role of ultrasound in assessment of male fertility. **European journal of obstetrics & gynecology and reproductive biology**, v.144, Suppl.1, p.192-198, 2009.

SETCHELL, B.P. The Parkes Lecture. Heat and the Testis. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.4, n.2, p.179-194, 1998.

SUTOVSKY, P., MORENO, R., RAMALHO-SANTOS, J., DOMINKO, T., THOMPSON, W.E., SCHATTEN, G. A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. **Journal of Cell Science** v.114, n.9, p.1665-1675, 2001.

TEIXEIRA, P.P.M.; OLIVEIRA, M.E.F.; D'AMATO, C.C.; RODRIGUES, L.F.S; VICENTE, W.R.R. Avaliação ultrassonografia da ecogenicidade do parênquima testicular como exame complementar no andrológico de carneiros. **Nucleus Animalium**, v.3, n.1, p.31-36, 2011.





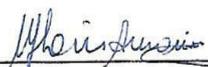
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,  
Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE

Comissão de ética no uso de animais - CEUA

### Licença para o uso de animais em experimentação e/ou ensino

O Comitê de ética no uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto discriminado abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.

|  |   |
|--|---|
| Número da licença                            | 112/2015  |
| Número do processo                           | 23082.016162//2015  |
| Data de emissão da licença                   | 28 de Setembro de 2015  |
| Título do Projeto                            | Análise ultrassonográfica quantitativa com escala de cinza da degeneração testicular em carneiros.                  |
| Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão)      | Pesquisa  |
| Responsável pela execução do projeto         | Paulo Fernandes de Lima   |
| Colaboradores                                | Humberto Fernandes Veloso Neto; Marcelo Tigre Moura; Ludymila Furtado Cantanhêde; Marcos Antônio Lemos de Oliveira. |
| Tipo de animal e quantidade total autorizada | Ovino ; total 12 animais (machos).  |

  
Prof. Dra. Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim  
(Coordenadora da CEUA-UFRPE)



Prof. Dra. Marleyne Amorim  
Coordenadora CEUA

