

RICARDO DESTRO SAADE

**PUNÇÃO ASPIRATIVA PERCUTÂNEA DO
EPIDÍDIMO (PESA):**

estudo quantitativo, histológico e estereológico em ratos

CAMPINAS

2006

RICARDO DESTRO SAADE

**PUNÇÃO ASPIRATIVA PERCUTÂNEA DO
EPIDÍDIMO (PESA):**

estudo quantitativo, histológico e estereológico em ratos

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas, para obtenção do título de Doutor em Cirurgia,
área de concentração em Cirurgia.*

Orientador: Prof. Dr. Carlos Arturo Levi D’Ancona

Co-Orientador: Prof. Dr. Paulo Augusto Neves

CAMPINAS

2006

Banca Examinadora da Tese de Doutorado

Orientador: Carlos Arturo Levi D'Ancona

MEMBROS:

1- Prof. Dr. Carlos Arturo Levi D'Ancona

2- Prof. Dr. Sidney Glina

3- Prof. Dr. Fábio Firmbach Pasqualotto

4- Prof. Dr. Adriano Fregonesi

5- Prof. Dr. Fernandes Denardi

Curso de pós-graduação em Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 30/08/2006

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais,
Que me proporcionaram chegar até aqui,
com seus exemplos.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof.Dr. Nelson Rodrigues Netto Jr., pelo incentivo em ingressar na Pós-Graduação e pelo exemplo de professor universitário.

Ao Prof.Dr. Paulo Augusto Neves, pela orientação e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof.Dr. Carlos Arturo Levi D’Ancona, pelo incentivo e por me aceitar como seu orientando.

À Profa.Dra. Miriam Dambros, pelo auxílio na realização do estudo estereológico.

Ao Dr. Alexandre R. Paz, do Departamento de Anatomia Patológica, pela colaboração no estudo histológico.

Aos biólogos Ana Cristina de Moraes e William Adalberto Silva, do Núcleo de Cirurgia Experimental da Unicamp, pela colaboração na realização desse estudo.

Aos funcionários Miguel Luiz Candido e Waldemir Benedito Costa, do Núcleo de Cirurgia Experimental da Unicamp, pela ajuda e cuidados com os animais.

A bióloga Mara A. de Lúcio, do Laboratório de Reprodução Humana do Caism, pela colaboração nesse estudo.

Aos residentes Gustavo Borges, Ricardo Reges Oliveira e Ricardo Miyaoka da Disciplina de Urologia, pela colaboração nos procedimentos cirúrgicos e arquivo fotográfico.

*“Eu pedi forças... e Deus deu-me dificuldades para fazer-me forte.
Eu pedi sabedoria...e Deus deu-me problemas para resolver.
Eu pedi prosperidade...e Deus deu-me cérebro e músculos para trabalhar.
Eu pedi coragem...e Deus deu-me obstáculos para superar.
Eu pedi amor...e Deus deu-me pessoas com problemas para ajudar.
Eu pedi favores...e Deus deu-me oportunidades.
Eu não recebi nada do que pedi... mas eu recebi tudo de que precisava.”*

Autor desconhecido

	<i>PÁG.</i>
RESUMO	<i>xii</i>
ABSTRACT	<i>xv</i>
1- INTRODUÇÃO	18
2- OBJETIVOS	28
3- MATERIAL E MÉTODO	30
3.1- Análise histológica	35
3.2- Análise estereológica	35
3.3- Análise estatística	37
4- RESULTADOS	38
4.1- Análise quantitativa	39
4.2- Análise histológica	40
4.3- Análise estereológica	46
5- DISCUSSÃO	48
5.1- Discussão do método	49
5.2- Discussão dos resultados	50
6- CONCLUSÕES	53
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
8- APÊNDICES	61

LISTA DE ABREVIATURAS

ANO	azoospermia não obstrutiva
AO	azoospermia obstrutiva
ICSI	<i>Intracitoplasmatic sperm injection</i> (injeção intracitoplasmática de espermatozóides)
HE	hematoxilina-eosina
HTF	<i>Human Tubal Fluid</i>
IUI	Inseminação intra-uterina
M-42	Sistema-teste de multiuso
MESA	<i>Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration</i> (aspiração microcirúrgica de espermatozóides dos epidídimos)
MOC	microscopia óptica comum
RA	reprodução assistida
PESA	<i>Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration</i> (aspiração percutânea de espermatozóides dos epidídimos)
pp	número de pontos da estrutura estudada
Pt	ponto-teste
TESA	<i>Testicular Sperm Aspiration</i> (aspiração testicular de espermatozóides)
TESE	<i>Testicular Sperm Extraction</i> (extração testicular de espermatozóides)
vv	densidade de volume

	<i>PÁG.</i>
Figura 1- Esquema de MESA: evidencia-se a dissecação na cabeça do epidídimo e a aspiração com a microcânula.....	21
Figura 2- Esquema da PESA: demonstra-se a punção com escalpe na cabeça do epidídimo.....	22
Figura 3- TESE: através de pequena abertura testicular, túbulos seminíferos são coletados e enviados ao laboratório.....	25
Figura 4- Esquema de TESA: demonstra a retirada de fragmentos do parênquima testicular, por meio de biópsia aspirativa.....	26
Figura 5- Os animais sendo preparados para os procedimentos. A - Anestesia venosa do rato. B – Preparo do animal para realização dos procedimentos.....	32
Figura 6- Vasectomia, via abdominal. Ligadura e secção dos deferentes.....	33
Figura 7- A - Palpação do testículo e epidídimo. B – Punção da cabeça do epidídimo com escalpe 25G.....	34
Figura 8- A - Após a punção, o material era colocado na Câmara de Makler. B – confirmação da presença e quantificação dos espermatozóides.....	34
Figura 9- Observação de estruturas tridimensionais em cortes bidimensionais. O volume aparece como área; a área com linha e a linha como ponto.....	36
Figura 10- Sistema-Teste M-42 de multiuso. Possui 21 linhas com comprimento conhecido (d) e 2 pontos de teste em cada extremidade (total 42 pontos-teste). A área de teste é $36,36 d^2$	36

Figura 11-	Epidídimo pós-vasectomia com aumento de 200x (A) e 400x (B), denotando a dilatação dos túbulos epididimários, sem alterações inflamatórias (HE).....	39
Figura 12-	Infiltrado linfoplasmocitário, nos diferentes graus encontrados(HE 400x).....	41
Figura 13-	Reação granulomatosa, em diferentes graus de aparecimento (HE – 400x).....	42
Figura 14-	Necrose, em diferentes graus (HE – 400x).....	43
Figura 15-	Fibrose, nos diferentes graus encontrados (HE – 400x).....	44
Figura 16-	Desarranjo estrutural, em graus variados (HE – 400x).....	45

		PÁG.
Gráfico 1-	Distribuição do número de espermatozóides no grupo 1, com variação de 10 a 92 x 10 ⁶ /ml, média de 48,78 x 10 ⁶ /ml, mediana de 40 x 10 ⁶ /ml, primeiro quartil 27 x 10 ⁶ /ml e terceiro quartil 75,5 x 10 ⁶ /ml (p<0,05).....	40
Gráfico 2-	Porcentagem de animais que apresentaram infiltrado linfoplasmocitário nos grupos I a V. Diferença significativa a partir do grupo II (p < 0,05).....	41
Gráfico 3-	Porcentagem de animais que apresentaram reação granulomatosa, nos grupos I a V. Diferença significativa a partir do grupo II (p < 0,05).....	42
Gráfico 4-	Porcentagem de animais que apresentaram necrose, nos grupos I a V. Diferença significativa somente nos grupos I e V (p<0,05).....	43
Gráfico 5-	Porcentagem de animais que apresentaram fibrose, nos grupos I a V. Diferença significativa a partir do grupo II (p < 0,05).....	44
Gráfico 6-	Porcentagem de animais que apresentaram desarranjo estrutural, nos grupos I a V. Diferença significativa a partir do grupo II (p < 0,05).....	45
Gráfico 7-	A densidade volumétrica de músculo liso nos epidídimos é decrescente, de acordo com o aumento do número de punções, porém não significante (p > 0,05).....	46
Gráfico 8-	A densidade volumétrica de músculo liso nos epidídimos é decrescente, de acordo com o aumento do número de punções, porém não significante (p > 0,05).....	47

RESUMO



Introdução: O tratamento da infertilidade masculina tem evoluído muito nas últimas décadas. O advento de técnicas de reprodução assistida (RA) e, particularmente, a injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI) tornaram possível o tratamento de indivíduos até então considerados inférteis, como os casos de azoospermia obstrutiva e os de azoospermia não obstrutiva. Nestes casos, na impossibilidade de correção cirúrgica, outros procedimentos de obtenção de espermatozóides podem ser realizados como a aspiração microcirúrgica dos epidídimos (MESA), punção aspirativa percutânea dos epidídimos (PESA), aspiração testicular de espermatozóides (TESA) ou a extração testicular (TESE).

Objetivos: A proposta de trabalho foi verificar a obtenção de espermatozóides viáveis em até cinco punções percutâneas do epidídimo. Analisar as alterações histológicas inflamatórias e cicatriciais, assim como a densidade de fibras de músculo liso e colágenas nos epidídimos de ratos, após punções.

Material e método: O grupo piloto consistiu em quatro animais, sendo dois para estudo da anatomia e da histologia do epidídimo normal e outros dois para avaliação dos efeitos da vasectomia. A vasectomia bilateral foi realizada por meio de laparotomia infra-umbilical. Foi padronizado o lado direito para estudo e o esquerdo como controle. O grupo estudado consistiu em 50 ratos que realizaram vasectomia e foram separados em cinco grupos de I a V, contendo 10 animais cada. Os animais do grupo I foram submetidos a uma punção percutânea trans-escrotal; II a duas punções; III a três punções; IV a quatro punções; V a cinco punções. As punções dos epidídimos foram feitas após 30 dias da vasectomia, com escalpe 25G na cabeça do epidídimo. O material extraído foi suspenso em meio de cultura HTF e analisado em câmara de Makler. O intervalo entre cada punção foi de 15 dias e os animais foram sacrificados após 15 dias da última punção. Os epidídimos foram fixados em líquido de Bouin. Foram realizados estudos histológicos e estereológicos dos epidídimos puncionados.

Resultados: O número médio de espermatozóides recuperados nas punções foi de: $48,78 \times 10^6$ /ml, $37,55 \times 10^6$ /ml, $26,33 \times 10^6$ /ml, $33,90 \times 10^6$ /ml e $41,34 \times 10^6$ /ml, nos grupos I a V, respectivamente. Após a análise histológica, observou-se que as variáveis infiltrado linfoplasmocitário, reação granulomatosa, fibrose e desarranjo estrutural

apresentaram diferença significativa a partir da segunda punção. O efeito cumulativo das punções somente foi observado nas variáveis infiltrado linfoplasmocitário e fibrose, mostrando que existe diferença significativa entre os grupos I e II em relação aos grupos III, IV e V. No estudo estereológico, a densidade volumétrica do tecido conjuntivo foi de 21,56%, 27,60%, 35,67%, 37,56% e 38,60% no lado puncionado nos grupos I a V ($p < 0,05$).

Conclusões: No presente estudo, verificamos a obtenção de espermatozóides em todos os grupos até cinco punções. Todos os animais apresentaram alterações histológicas significativas dos epidídimos, quando comparados ao grupo controle, a partir da segunda punção, exceto na variável necrose. Somente nas variáveis infiltrado linfoplasmocitário e fibrose foram observadas efeito cumulativo das PESA. O estudo estereológico demonstrou aumento da densidade volume do tecido conjuntivo dos epidídimos provocado pelas punções.

ABSTRACT



Introduction: The treatment of male infertility had a great development in the last decades. The advent of assist reproductive techniques and specially the intra-cytoplasmic sperm injection (ICSI) has allowed the treatment of these patients otherwise considered infertile. Patients with obstructive and non-obstructive azoospermia, whose surgical reconstruction is not possible, can be submitted to retrieval spermatozoa procedures including microsurgical epididymal sperm aspiration (MESA), percutaneous epididymal sperm aspiration (PESA) testicular sperm extraction (TESE) and testicular sperm aspiration (TESA).

Objectives: To verify the retrieval of viable spermatozoa within up to five percutaneous epididymal sperm aspirations and to evaluate the histological and stereological modifications in the rat epididymis after the procedures.

Material and Methods: The pilot group consisted of four animals, two of them were used in the study about anatomy and histology of normal epididymis. The other two were used to verify the effects of the vasectomy. These procedures were performed through infra-umbilical laparotomy. The right side was standardized for the study group and the left for control. A total of 50 Wistar rats underwent vasectomy procedures and were distributed into five groups I to V, totalizing 10 animals each. In the group I, the animals underwent to one PESA procedure, II two, III three, IV four and V five. The epididymal punctures were done with 25G scalp in the caput after 30 days of the vasectomy and consecutively after 15 days of the previous puncture. The material extracted was suspended in HTF solution culture and analyzed in a Makler chamber. The epididymis were fixed in Bouin technique.

Histological and stereological analyses were performed in the punctured epididymidis.

Results: The number of retrieved spermatozoa was: mean 48.78×10^6 /ml, 37.55×10^6 /ml, 26.33×10^6 /ml, 33.90×10^6 /ml e 41.34×10^6 /ml, from group I to V. The histological analyses included evaluation of infiltration of lymphocytes and plasmocytes, granulomatous reaction, fibrosis and structural disorder; these alterations presented significant differences after the second puncture. The cumulative effect was observed only within the variables: lymphocytic and plasmocytic infiltrate and fibrosis. It was found differences in the groups I and II in comparison with III, IV and V. The stereological

analyses showed significant increase in connective tissue volume 21.56%, 27.60%, 35.67%, 37.56% and 38.60% from group I through V.

Conclusions: In this study, it was performed retrieval of spermatozoa in all groups up to five punctures. All the animals presented histological alterations in the epididymis after the second puncture when compared to the control group, except necrosis, and only lymphocytic and plasmocytic infiltrate and fibrosis were shown as cumulative effects within the punctures. The stereological analyses showed increase of connective tissue volume that was caused by the punctures.

1- INTRODUÇÃO

O tratamento da infertilidade masculina tem evoluído muito nas últimas décadas. O advento de técnicas de reprodução assistida (RA) e, particularmente, a injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI), tornaram possível o tratamento de indivíduos até então considerados inférteis, como os casos de azoospermia obstrutiva (AO) e os de azoospermia não obstrutiva (ANO).

Azoospermia, ausência de espermatozóide no sêmen ejaculado, é a forma mais grave de infertilidade masculina e está presente em aproximadamente 5% dos casais inférteis investigados (Van Peperstraten et al. 2006). A azoospermia pode ser causada por distúrbios hormonais, distúrbios da espermatogênese ou por obstrução (Saade, 2002).

Os casos de AO correspondem, aproximadamente, a 7% a 12% dos casos de infertilidade masculina, nos quais a vasectomia é a principal causa, seguida por obstruções epididimárias infecciosas, inflamatórias ou traumáticas, agenesia ductal, obstrução do ducto ejaculatório, iatrogênicas e idiopáticas (Chan et. al. 2005). Dentre os fatores que permitem a correção cirúrgica, pode-se citar a vasectomia, as obstruções inflamatórias e a obstrução do ducto ejaculador. Os procedimentos cirúrgicos realizados são a vasovasostomia, a vasoepididimoanastomose e a ressecção endoscópica dos ductos ejaculadores com resultados bastante encorajadores.

Belker et al. (1991) avaliaram 1.496 pacientes, que constituíram o Grupo de Estudo da Vasovasostomia, e evidenciaram 97% de sucesso com intervalo de até três anos da vasectomia, que decrescia para 71%, após 15 anos da cirurgia. As taxas de gravidez, após reconstrução microcirúrgica, variaram de 30 a 76% dos casos e os resultados são determinados por diversos fatores como duração da obstrução e idade da parceira. Recentemente, Silber e Grotjan (2004), avaliando 4.010 pacientes que realizaram vasovasostomia, obtiveram melhores resultados, com sucesso de 98% até dez anos da vasectomia e 93% acima, com índices de gravidez de 93,0%.

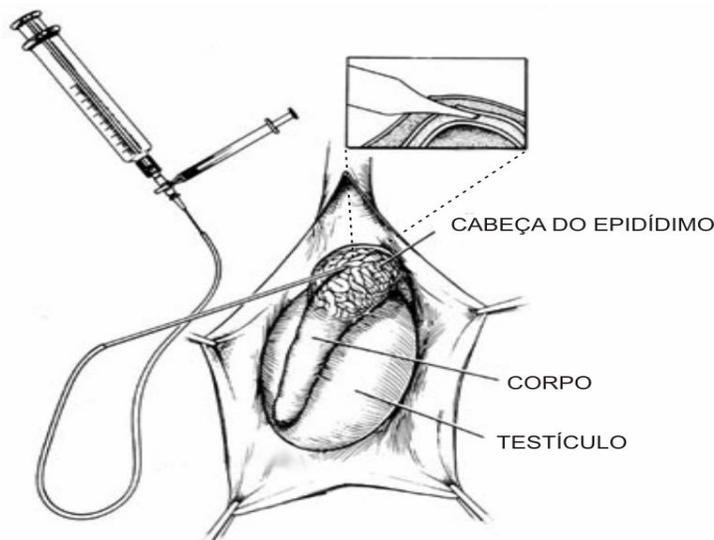
Silber (1989), Thomas (1993) e Schlegel e Goldstein (1993) mostraram resultados de 78%, 76% e 70% de sucesso com vasoepididimoanastomose e índices de gravidez de 56%, 42% e 44% respectivamente, demonstrando a viabilidade destes procedimentos.

Para os casos de obstrução do ducto ejaculatório, a ressecção endoscópica é o tratamento recomendado. Meacham et al. (1993) mostraram sucesso de 50% nos parâmetros seminais, com gravidez de 29%. Netto et al.(1998) demonstraram melhores resultados, com 83% de melhora seminal e gravidez de 66%.

Casos de azoospermia obstrutiva não passíveis de reconstrução e os casos de azoospermia não obstrutiva, não eram historicamente tratados ou empregavam sêmen de doador. Com o desenvolvimento das técnicas de RA, principalmente o ICSI, que utiliza somente um espermatozóide para a fecundação, estes pacientes passaram a ter uma nova perspectiva de tratamento. Palermo et al. (1992) apresentaram os primeiros resultados com taxa de fertilização de 81% e gravidez de 10,5%, utilizando esta técnica. A partir destes resultados, técnicas que possibilitassem a recuperação de espermatozóides ganharam lugar e importância clínica.

As técnicas de coleta de espermatozóides incluem procedimentos realizados no testículo e nas diferentes porções do epidídimo. As técnicas epididimárias incluem a aspiração microcirúrgica dos epidídimos (MESA) e a aspiração percutânea dos epidídimos (PESA), enquanto as técnicas testiculares incluem a extração testicular (TESE) e a aspiração testicular de espermatozóides (TESA).

A MESA (*Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration*), descrita por Temple –Smith et al. (1985), foi o primeiro procedimento de coleta de espermatozóides para a utilização em reprodução assistida. Consiste na microdissecção de um segmento do epidídimo proximal à obstrução, seguido da abertura do túbulo e aspiração de espermatozóides meio de microcânula (Fig 1). Essa técnica permite a obtenção de espermatozóides móveis em quantidade suficiente para realização de reprodução assistida, inclusive o armazenamento e congelamento para futuros procedimentos.



www.cornellurology.com

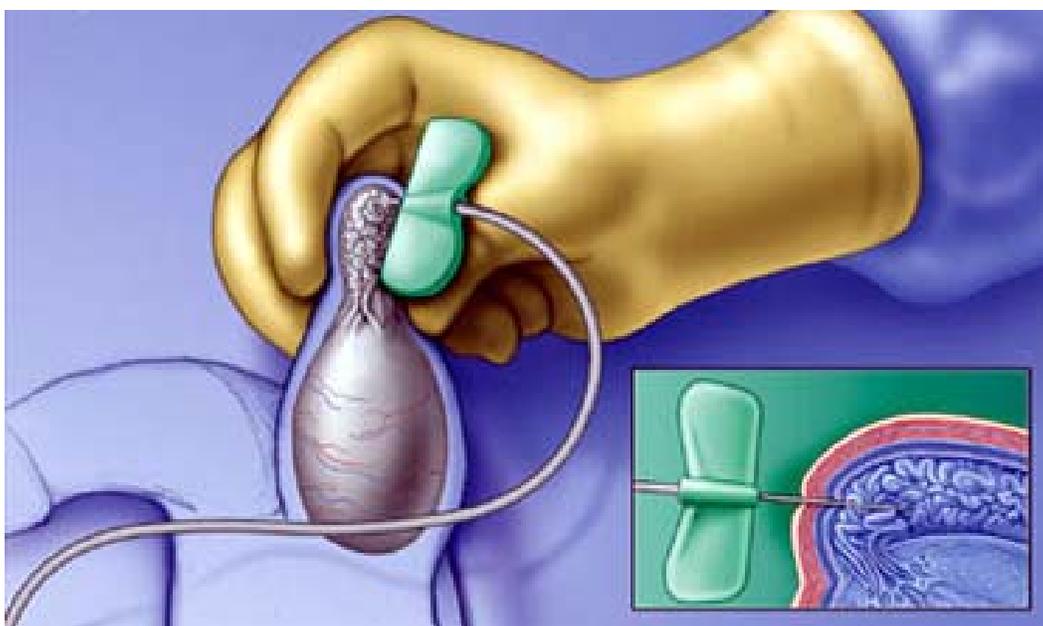
Figura 1- Esquema de MESA: evidencia-se a dissecção na cabeça do epidídimo e a aspiração com a microcânula

Esta técnica necessita de material específico e cirurgião habilitado em microcirurgia e procedimento anestésico. Apresenta maior morbidade, como dor, hematoma e infecção, além de aderências e fibrose local. Entretanto, advoga-se que esta técnica é a que melhor preserva o epidídimo, pois a dissecção é sob visão direta, assim como a reconstrução.

Utilizando esse método para obtenção de espermatozoides, Silber et al. (1988) obtiveram os primeiros resultados de gravidez, tratando pacientes com agenesia dos ductos deferentes, pela técnica de FIV. Horak et al. (2003), analisando os resultados de ICSI com espermatozoides do ejaculado e coletados por MESA, obtiveram taxas de fertilização de 53,9% e 50,1% e índices de gravidez de 37,0% e 28,0%, respectivamente, sem diferença significativa. Schroeder-Printzen et al. (2000) demonstraram recuperação de quantidade suficiente de espermatozoides, para criopreservação e posterior reutilização em ciclos de ICSI, com índices de gravidez de 42,4%.

A PESA (*Percutaneous Epididymal Sperm Aspiration*) veio como método alternativo à MESA. Desenvolvido por Craft e Shrivastav (1994), consiste na punção

percutânea da cabeça ou corpo do epidídimo com agulha 25G e aspiração do líquido, que é adicionado ao meio de cultura presente na seringa (Fig 2). Esta técnica também permite a obtenção de espermatozóides, em quantidade e qualidade suficiente para RA, porém com menor morbidade e custos, sem necessidade de treinamento ou material específico, além da possibilidade de repetição do procedimento. Os espermatozóides obtidos por meio da punção podem ser utilizados para injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI) ou inseminação intra-uterina. Ainda, a PESA pode ser realizada em ambiente ambulatorial, sob anestesia local, o que diminui consideravelmente os custos da coleta de espermatozóides para RA.



www.cornellurology.com

Figura 2- Esquema da PESA: demonstra-se a punção com escalpe na cabeça do epidídimo

Meniru et al. (1998) demonstraram sucesso na obtenção de espermatozóide com PESA em 83% e índice de gravidez de 35% por ciclo, além da possibilidade de repetição da punção até quatro vezes. Este autor também comparou resultados de ICSI, utilizando espermatozoides do ejaculado e coletados por PESA, sem diferença significativa nas taxas de fertilização e gravidez.

Chatterjee et al. 2001, utilizando esta técnica, conseguiu espermatozoides suficientes para a realização de inseminação intra-uterina (IIU), com resultados de gravidez de 20% por ciclo. Qiu et al. 2003, também conseguiu material suficiente para IIU, porém com resultado de 4,5% por ciclo. Estes dois autores ressaltam a possibilidade de obtenção de espermatozoides, com o baixo custo da IIU. As complicações descritas, como dor ou hematoma foram mínimas (Gorgy et al. 1997 e Wood et al. 2003).

A TESE (*Testicular Sperm Extraction*) é conhecida desde a primeira metade do século passado como forma de diagnóstico diferencial entre azoospermia obstrutiva e não obstrutiva. A técnica consiste na obtenção de biópsia testicular, realizada por via escrotal, com abertura da túnica vaginal, da albugínea e retirada de fragmento de parênquima testicular, único ou múltiplo (Vieira e Neves, 2002) (Fig. 3). Este fragmento é encaminhado ao laboratório para micro-dissecção com microscopia óptica comum e aumento de 400 vezes e procura de espermatozoides. Caso não sejam encontrados espermatozoides, novo fragmento é retirado e repetido o procedimento.

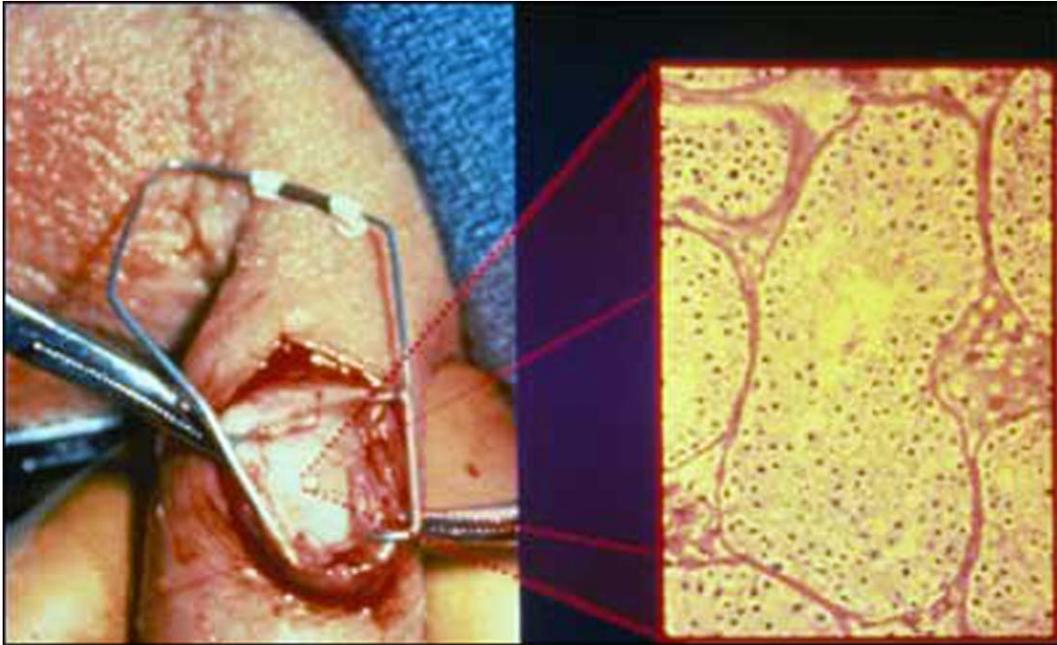
Seu uso para tratamento de homens com azoospermia não obstrutiva tem como base a existência de ilhas de espermatogênese preservada, em pacientes com síndrome de células de Sertoli, parada de maturação ou hipoplasia de células germinativas.

Segundo Ostad et al. (1998), estudando 81 pacientes com ANO, obtiveram sucesso em 58% dos casos, com média de 6,4 fragmentos. Amer et al. (1999), comparando resultado desta técnica, com um e quatro fragmentos, revelaram maior probabilidade de sucesso com fragmentos múltiplos. Esse método associado ao ICSI apresenta índice de fertilização de 55,1% e gravidez de 30,3% (Wald et al. 2006).

Nos casos de azoospermia não obstrutiva, o sucesso da biópsia varia de acordo com a histologia encontrada, sendo maior nos casos de hipoespermatogênese e menor nos casos de parada da maturação e síndrome de células de Sertoli, obtendo vantagem com relação à técnica percutânea, em virtude de identificar microrregiões produtoras de espermatozóides. Pacientes com alterações genéticas, como microdeleção do cromossomo Y, apresentam menor chance de obter espermatozóides (Neves e Schlegel, 2004).

A biópsia testicular pode levar à desvascularização de áreas do parênquima e até atrofia testicular, em razão de lesão das artérias que correm abaixo da túnica albugínea (Schlegel e Su, 1997). Deste modo, recomenda-se a incisão da albugínea em área avascular.

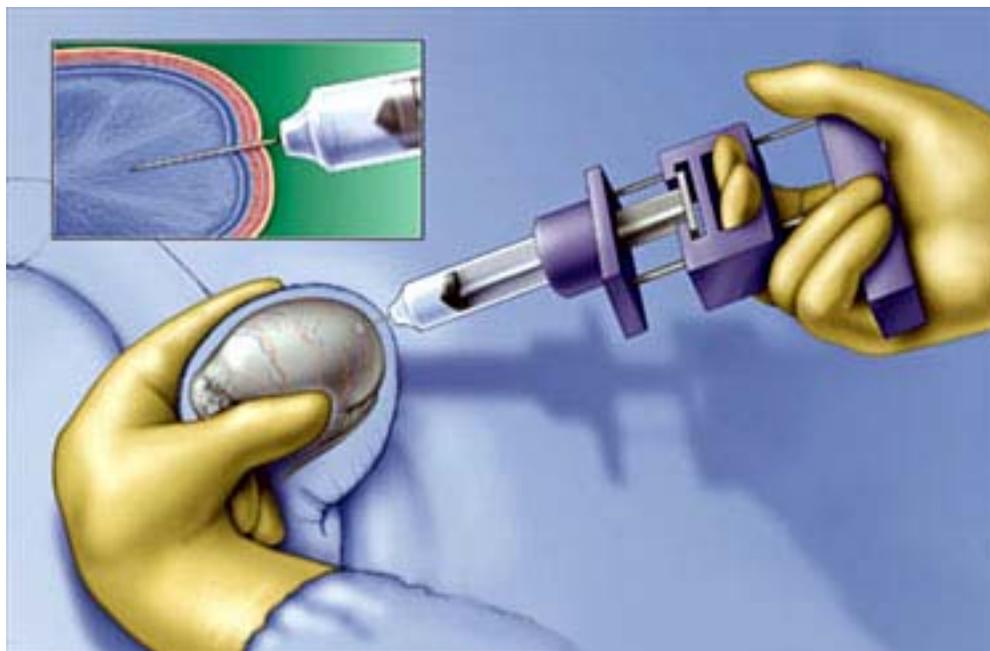
Com menor trauma cirúrgico, Schlegel (1999) descreveu a técnica de Micro-TESE, que consiste na realização de pequena janela na túnica albugínea e exteriorização do túbulo seminífero, orientada por microscópio cirúrgico, e permite a recuperação de espermatozóides suficientes para a micromanipulação e criopreservação. Esta técnica é mais utilizada em pacientes com ANO e volume testicular pequeno, onde a retirada de vários fragmentos poderia comprometer de forma importante a viabilidade do testículo. Este procedimento possibilita recuperação de espermatozóide em 63% dos casos, e pode ser realizado sob anestesia local.



www.endotext.org/female

Figura 3- TESE: através de pequena abertura testicular, túbulos seminíferos são coletados e enviados ao laboratório

TESA (*Testicular Sperm Aspiration*) técnica descrita por Lewin et al. (1996), consiste na obtenção de espermatozoides por meio de biópsia aspirativa de parênquima testicular, com agulha fina 21 e 23G, ou grossa 12G, e encaminhada para análise microscópica no laboratório (Fig. 4). Esta punção é uma alternativa à TESE, pode ser realizada com anestesia local (Gorgy et al. 1998). Lewin et al (1999) evidenciaram sucesso na obtenção de espermatozoides em 58,5% dos casos de ANO, que associado ao ICSI, obtiveram taxa de gravidez de 42,8%. Friedler et al. (1997), comparando sucesso entre TESE e TESA, em pacientes com ANO, observaram resultados superiores com TESE, 43% e 11%, respectivamente.



www.cornellurology.com

Figura 4- Esquema de TESA - demonstra a retirada de fragmentos do parênquima testicular, por meio de biópsia aspirativa

Em revisão sistemática, Van Peperstraten et al. (2006), verificaram que não existem estudos suficientes, quanto ao número e homogeneização de pacientes, assim como trabalhos randomizados, para recomendar a melhor técnica de obtenção de espermatozoides nos casos de azoospermia obstrutiva e não obstrutiva.

Atualmente, a PESA é o método mais empregado em AO, em virtude da facilidade de realização, alto índice de sucesso, baixo índice de complicações e ainda baixo custo. Nos casos de insucesso na obtenção de espermatozoides, recomenda-se a TESA. Para os casos de ANO, a técnica TESA e TESE são as alternativas indicadas.

Quando analisamos os estudos das técnicas de coleta de espermatozoides, epididimárias ou testiculares, abertas ou por punção, notamos uma grande preocupação dos autores em avaliar as taxas de recuperação e qualidade do material extraído, direcionado para realização de reprodução assistida. Poucos trabalhos clínicos apresentam resultados

quanto às complicações destas técnicas nas estruturas manipuladas. Dados sobre cicatrização, lesões estruturais ou presença de fibrose, após esses procedimentos, são raramente relatados. Em revisão sistemática da literatura não foram encontrados estudos experimentais que pudessem fornecer estas informações. Com a finalidade de esclarecer essas questões, como comporta-se o epidídimo nestas situações, propusemo-nos a estudar os epidídimos de ratos, após múltiplas punções percutâneas (PESA).

2- OBJETIVOS

- Verificar a possibilidade de obtenção de espermatozóides viáveis em até cinco punções aspirativas epididimárias percutâneas (PESA) sucessivas.

- Estudar as alterações histológicas inflamatórias e cicatriciais nos epidídimos de ratos, após punções aspirativas epididimárias percutâneas (PESA) sucessivas.

- Avaliar as alterações estereológicas das fibras musculares lisas e colágenas nos epidídimos, provocadas pelas punções aspirativas epididimárias percutâneas (PESA) sucessivas.

3- MATERIAL E MÉTODO

Neste estudo foram utilizados 54 ratos machos, da raça Wistar, fornecidos pelo Centro Multidisciplinar de Investigação Biológica (Cemib-Unicamp), na idade reprodutiva (maior de três meses de idade) e peso entre 250 – 300g. O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Técnica Cirúrgica do Núcleo de Cirurgia Experimental da Unicamp, de acordo com as normas do United State National Health Institute e do Comitê de Proteção Animal da Universidade Estadual de Campinas, com protocolo aprovado número 497-1, de 12 de Dezembro de 2002.

Os animais foram mantidos em ambiente controlado (25 +/- 2 graus C) com exposição à luz por 12 horas com água *ad libitum* e ração Labina® produzida por Purina®. Este estudo foi dividido em duas fases: o piloto, na qual se pretendeu padronizar a histologia epididimária normal e também a histologia pós-vasectomia; e o grupo de estudo, iniciado pela realização da vasectomia, com objetivo de causar um fator obstrutivo e conseqüente dilatação dos túbulos epididimários e, em seguida, a realização das punções percutâneas transescrotais. Todos os animais foram anestesiados com Pentobarbital sódico endovenoso na dose de 30mg/Kg e posicionados na prancha de contenção. Foi realizada tricotomia abdominal e a seguir, anti-sepsia com iodo-polivinilpirrolidona (Fig. 5).

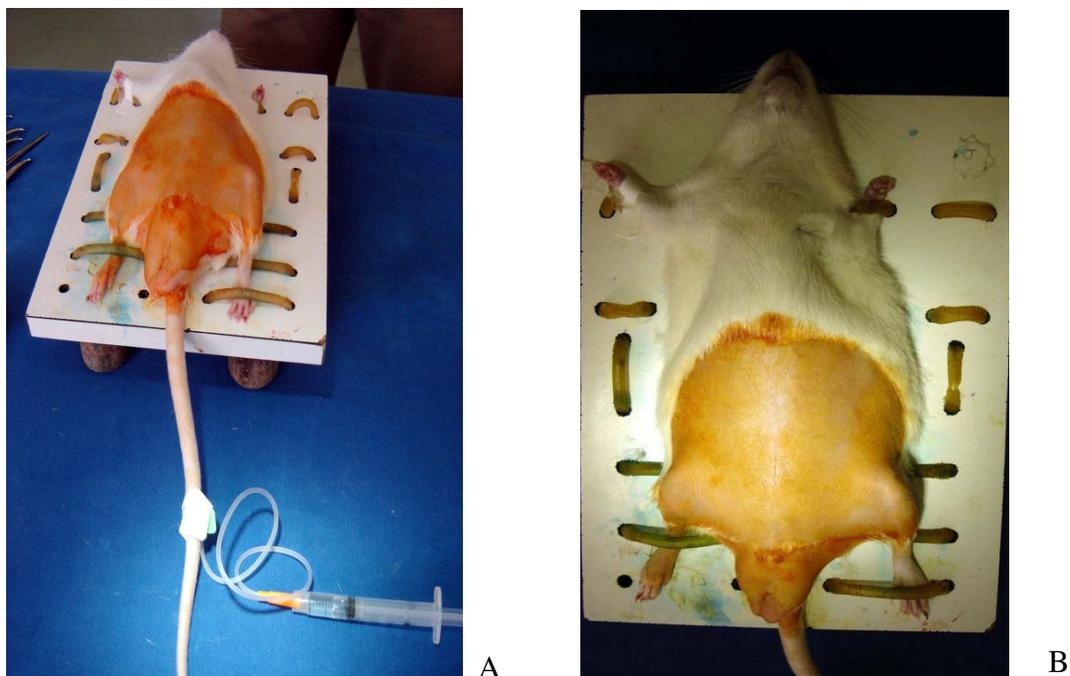


Figura 5- Os animais sendo preparados para os procedimentos. A – Anestesia venosa do rato. B – Preparo do animal para realização dos procedimentos

O piloto foi constituído de quatro animais, em que dois foram sacrificados para estudo da anatomia e da histologia do epidídimo normal. Outros dois, para padronização da técnica da vasectomia e análise das alterações histológicas do epidídimo após o procedimento (30 dias).

A vasectomia foi realizada por meio de laparotomia mediana infra-umbilical com secção e ligadura dos ductos deferentes com fio de algodão 4-0 (Fig. 6). A escolha do epidídimo a ser puncionado foi realizada por sorteio, tendo sido padronizado o lado direito para estudo e o esquerdo como controle.

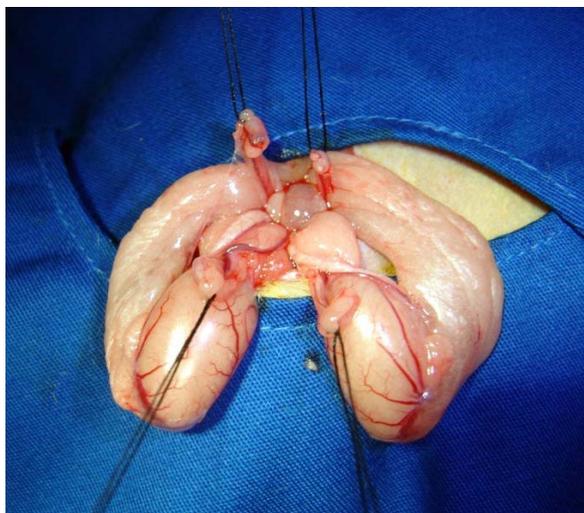


Figura 6- Vasectomia, via abdominal. Ligadura e secção dos deferentes

O grupo estudado consistiu em 50 ratos que, inicialmente, realizaram a vasectomia e que foram separados em cinco grupos (I a V) com 10 animais em cada. Os animais do grupo I foram submetidos a uma punção percutânea aspirativa transescrotal; II a duas punções; III a três punções; IV a quatro punções; V a cinco punções. As punções dos epidídimos foram feitas após 30 dias da vasectomia e sempre no lado direito, com escalpe 25G na cabeça do epidídimo (Fig. 7). Todas as punções epididimárias foram realizadas pelo autor desta pesquisa. No momento das punções, o material extraído era suspenso em meio de cultura HTF (Human Tubal Fluid) e analisado, em câmara de Makler, para constatação e quantificação dos espermatozóides daquela punção (Fig. 8). O intervalo entre cada punção foi de 15 dias e os animais foram sacrificados após 15 dias da última punção.

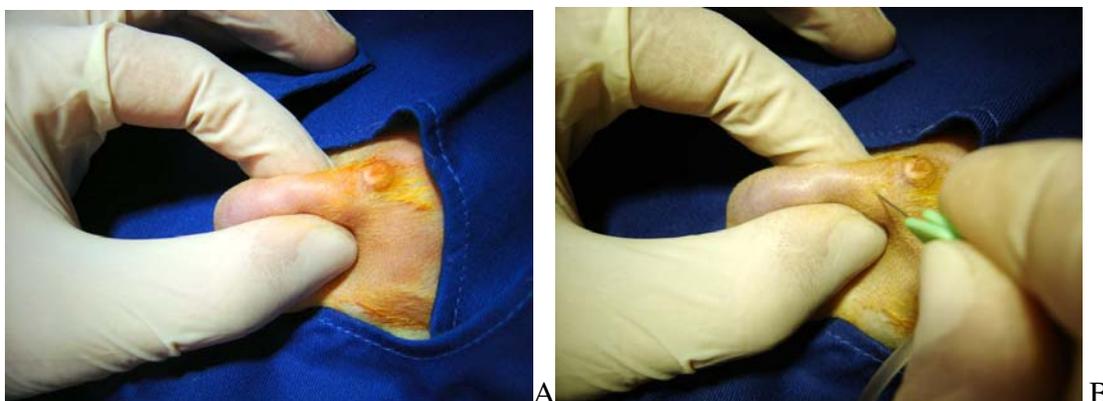


Figura 7- A - Palpação do testículo e epidídimo. B – Punção da cabeça do epidídimo com escalpe 25G

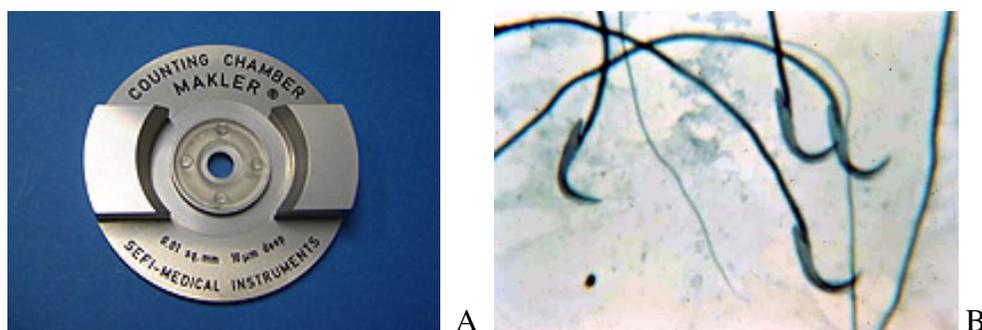


Figura 8- A - Após a punção, o material era colocado na Câmara de Makler

B – confirmação da presença e quantificação dos espermatozóides (400x)

Os animais foram sacrificados com Thiopental de sódio na dose de 60mg/Kg. Os epidídimos foram removidos por meio de laparotomia, fixados em líquido de Bouin por duas horas e, a seguir, em álcool a 90%, e incluídos em blocos de parafina. Para a confecção das lâminas, utilizamos espessuras de 5 e 7 μ m, em que as de 7 μ m foram exclusivas para o estudo estereológico.

3.1- Análise histológica

Para a análise histológica, lâminas de 5 µm foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) e sua realização deu-se por um único médico patologista do Departamento de Anatomia Patológica da FCM Unicamp. O estudo histológico dos epidídimos foi realizado com microscopia óptica comum (MOC) e aumento de 400 vezes, quando foram avaliadas as possíveis alterações inflamatórias e cicatriciais, decorrentes da agressão causada pelas punções como: infiltrado linfoplasmocitário, reação granulomatosa, necrose, fibrose e desarranjo estrutural.

3.2- Análise estereológica

O método estereológico, descrito por Delesse¹ (1847), tem como objetivo determinar parâmetros quantitativos tridimensionais de estruturas anatômicas, com base em cortes bidimensionais, utilizando a geometria e a estatística (Fig. 9). Os dois conceitos básicos da estereologia são: determinações “sem desvio” e com pouca variabilidade. Os resultados são numéricos, de fácil reprodução e comparação entre diferentes grupos. O princípio Delesse tem como base a relação entre a área ocupada por determinado material na superfície de secção e o correspondente volume deste material na estrutura.

As áreas de cortes microscópicos são determinadas com precisão e rapidez, por contagem de pontos (planimetria). Cada ponto corresponde ao centro geométrico de um polígono, cuja área deve ser conhecida.

¹ Delesse- *apud* Thiel M. Análise quantitativa da fibrose e semiquantitativa da reação inflamatória de quatro diferentes slings sintéticos. Tese de Doutorado, FCM-IUnicamp, 2006.

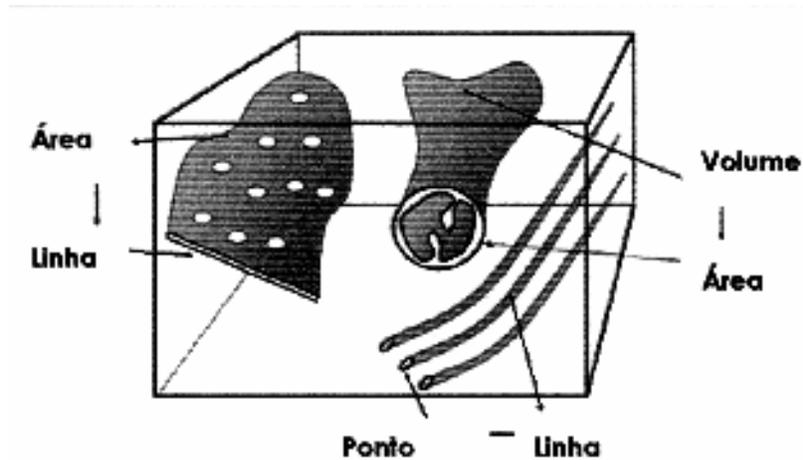


Figura 9- Observação de estruturas tridimensionais em cortes bidimensionais. O volume aparece como área; a área com linha e a linha como ponto

Fonte: Thiel M. 2006

Sistema-teste é um conjunto de linhas e pontos, que deve ser sobreposto à imagem estereológica com arranjo regular ou não (aleatório). É necessária a calibragem do sistema-teste de acordo com o aumento da imagem projetada que é analisada. O sistema-teste 42 possui 21 linhas, com dois pontos em cada extremidade, perfazendo total de 42 pontos-teste, os quais deverão ser tocados pelas estruturas para a quantificação final (Fig. 10).

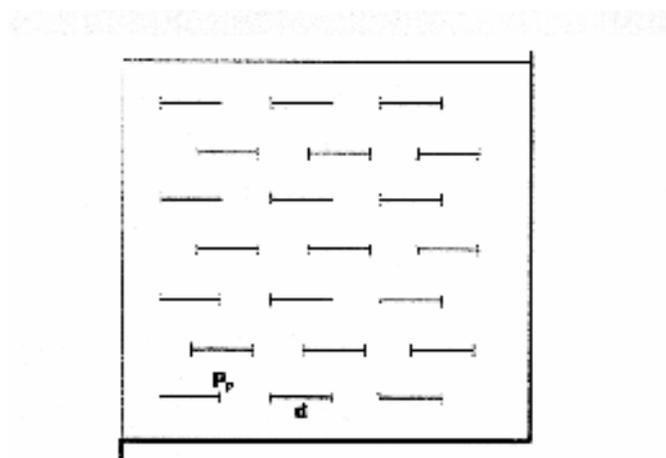


Figura 10- Sistema-Teste M-42 de multiuso. Possui 21 linhas com comprimento conhecido (d) e 2 pontos de teste em cada extremidade (total 42 pontos-teste). A área de teste é $36,36 d^2$

Para o estudo estereológico, lâminas de 5µm foram coradas com Tricromio de Masson e as de 7µm foram coradas com “sirius red”. Utiliza-se microscopia com luz polarizada e aumento de 400 vezes, empregando o sistema teste M-42 (Tonbridge®). Foram analisados doze campos microscópicos, ao acaso, de cada lâmina. Em todos os grupos, somente o epidídimo direito foi avaliado, sendo quantificada a densidade volumétrica de fibras musculares lisas e colágenas. A fórmula utilizada para o cálculo da densidade volumétrica foi:

$$V_v = \frac{P_p}{P_t} \times 100\%$$

V_v densidade volumétrica; P_p número de pontos da estrutura estudada; P_t número do ponto do teste (no caso 42)

3.3- Análise estatística

O número de espermatozóides obtidos nas punções foi descrito por meio de média e desvio-padrão, mediana, primeiro e terceiro quartil.

Na análise qualitativa foi empregado o teste de Wilcoxon para comparar as diferenças entre o epidídimo puncionado e o controle, em cada grupo, nas variáveis infiltrado linfoplasmocitário, reação granulomatosa, necrose, fibrose e desarranjo estrutural.

Os testes Qui-Quadrado e Fisher foram utilizados para avaliação da diferença entre os grupos, ou seja, do efeito cumulativo das punções.

Para a análise estereológica dos epidídimos, foi empregado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

Em todos testes acima citados, o critério de significância foi considerado $p < 0,05$.

4- RESULTADOS

No grupo piloto, observou-se que não ocorreu alteração no tamanho do testículo e do epidídimo dos ratos normais e naqueles que realizaram vasectomia. O estudo histológico demonstrou que a vasectomia promoveu dilatação dos ductos epididimários, sem sinais inflamatórios (Fig. 11).

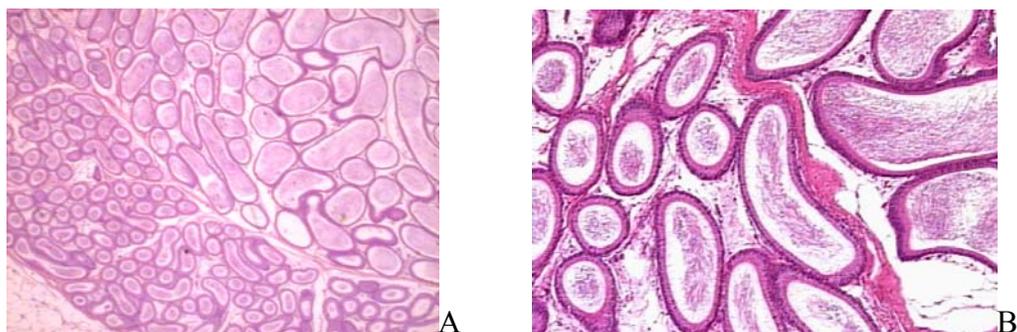


Figura 11- Epidídimo pós-vasectomia com aumento de 200x(A) e 400x (B), denotando a dilatação dos túbulos epididimários, sem alterações inflamatórias (HE)

4.1- Análise quantitativa

A análise do aspirado deu-se pela confirmação da presença e quantificação do número de espermatozoides em cada punção. Constatou-se presença de espermatozoides em 97,2% das punções, e ausência em dois casos no grupo II e dois no grupo V. A distribuição do número de espermatozoides no grupo I encontra-se no Gráfico 1. O número de espermatozoides recuperados nas punções foi bastante expressivo, com médias de $48,78 \times 10^6$ /ml, $37,55 \times 10^6$ /ml, $26,33 \times 10^6$ /ml, $33,90 \times 10^6$ /ml e $41,34 \times 10^6$ /ml, nos grupos I a V, respectivamente.

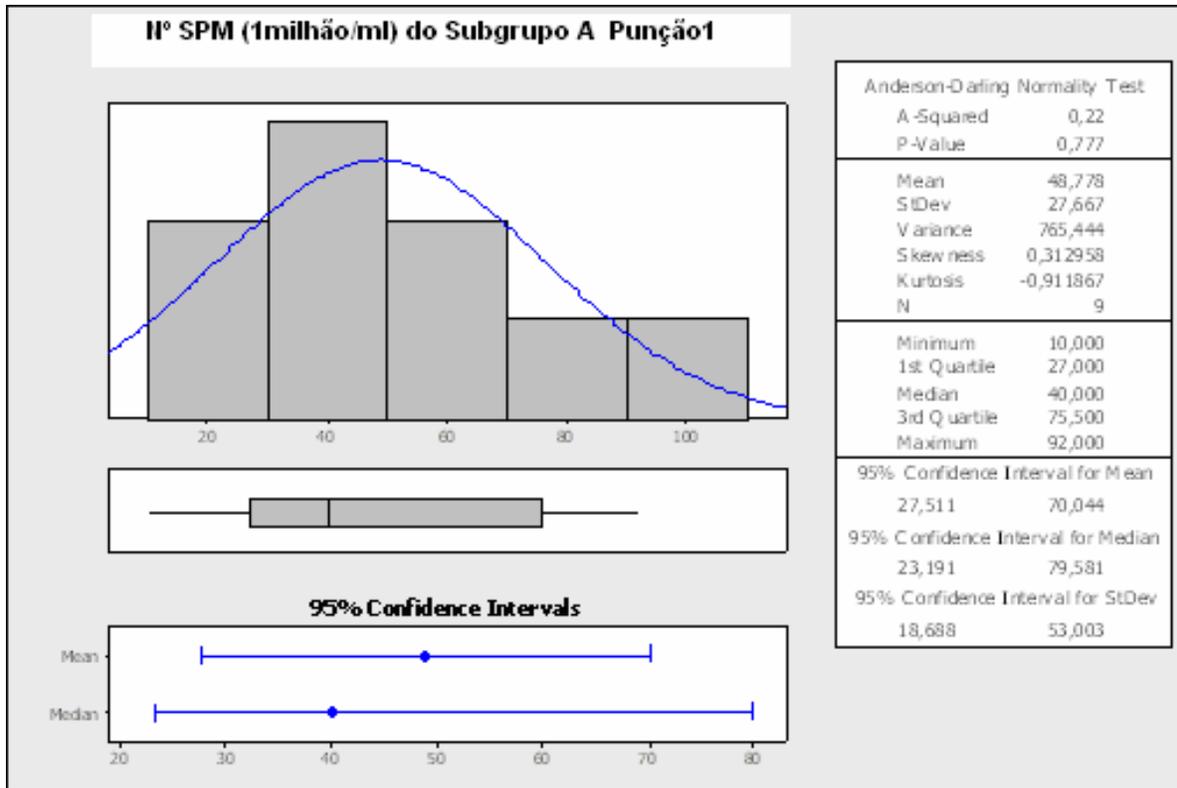


Gráfico 1- Distribuição do número de espermatozoides no grupo I, com variação de 10 a 92 x 10⁶ /ml, média de 48,78 x 10⁶ /ml, mediana de 40 x 10⁶ /ml, primeiro quartil 27 x 10⁶ /ml e terceiro quartil 75,5 x 10⁶ /ml (p<0,05)

No período de estudo, ocorreram três mortes de animais por causa desconhecida, nos grupos I, III e IV. A análise histológica e estereológica foram realizadas em 47 ratos.

4.2- Análise histológica

As análises histológicas dos epidídimos, comparando o lado direito (com punção) e esquerdo (sem punção) nas variáveis infiltrado linfoplasmocitário, reação granulomatosa, necrose, fibrose e desarranjo estrutural mostraram:

Infiltrado linfoplasmocitário – ocorreram alterações em 44%, 80%, 100%, 100% e 100% no lado direito (Fig. 12), e em 0%, 10%, 0%, 22% e 10% no lado esquerdo, nos grupos de I a V, respectivamente. Estas alterações mostraram diferença significativa a partir da segunda punção (Gráfico 2).

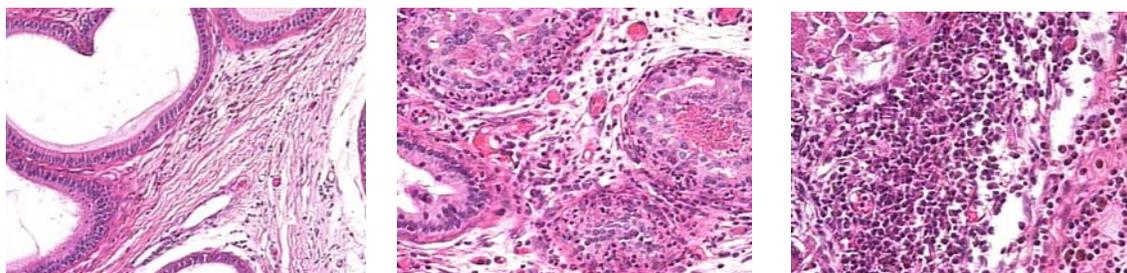


Figura 12- Infiltrado linfoplasmocitário, nos diversos graus encontrados (HE 400x)

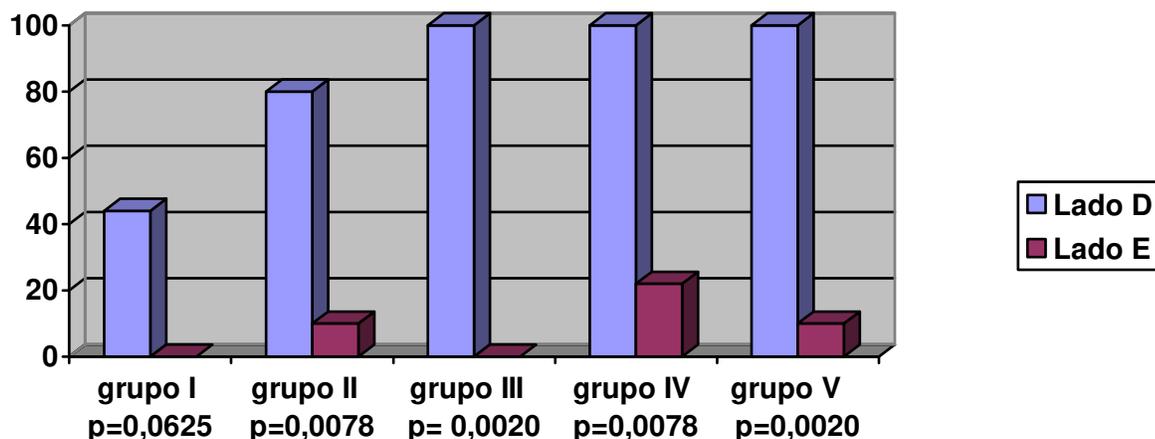


Gráfico 2- Porcentagem de animais que apresentaram alterações no infiltrado linfoplasmocitário, nos grupos I a V. Diferença significativa a partir do grupo II ($p < 0,05$)

O teste de Qui-Quadrado mostra que existe diferença entre os cinco grupos ($p = 0,0018$). O teste de Fisher identifica onde ocorreram estas diferenças nos grupos. Quando comparados, os grupos I e II, não mostraram diferença significativa ($p = 0,11$). A comparação entre o grupo I com os grupos III, IV e V mostrou que existe diferença significativa ($p = 0,0032$; $0,0032$ e $0,0013$, respectivamente). No grupo II comparado com III, IV e V não houve diferença significativa ($p = 0,60$). Entre os grupos III, IV e V não ocorreram diferenças significativas ($p=1$). Em resumo: (I=II) e (I) \neq (III = IV = V).

Reação granulomatosa – ocorreram alterações em 44%, 90%, 55%, 89% e 90% no lado direito (Fig. 13), e em 11%, 10%, 0%, 0% e 10% no lado esquerdo, nos grupos I a V, respectivamente. Este aspecto também mostrou diferença significativa a partir da segunda punção (Gráfico 3).



Figura 13- Reação granulomatosa, em diferentes graus de aparecimento (HE – 400x)

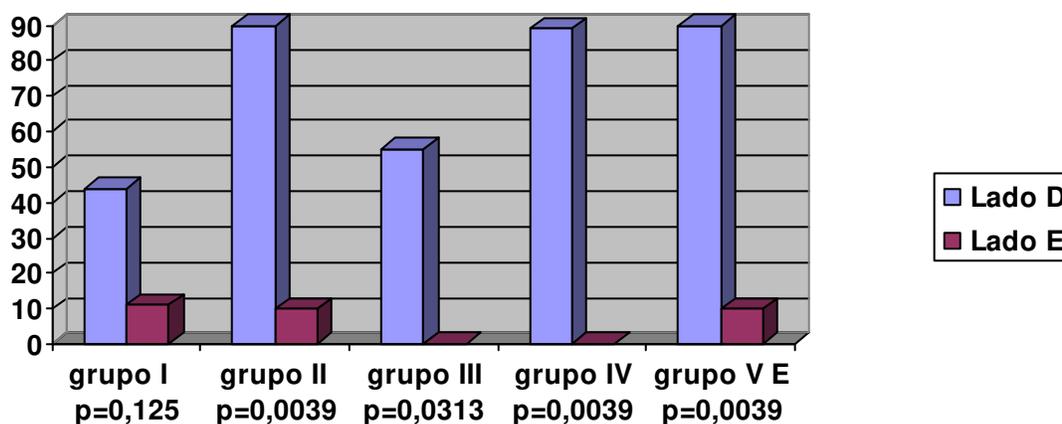


Gráfico 3- Porcentagem de animais que apresentaram reação granulomatosa, nos grupos I a V. Diferença significativa a partir do grupo II ($p < 0,05$)

O teste de Qui-Quadrado, nesta variável, demonstrou que não existe diferença significativa entre os epidídimos dos cinco grupos analisados ($p = 0,0521$).

Necrose: ocorreram alterações em 33%, 80%, 33%, 44% e 60% no lado direito (Fig. 14) e em 0%, 10%, 0%, 0% e 0% no lado esquerdo, nos grupos I a V, respectivamente. Esta análise não se mostrou significativa (Gráfico 4).

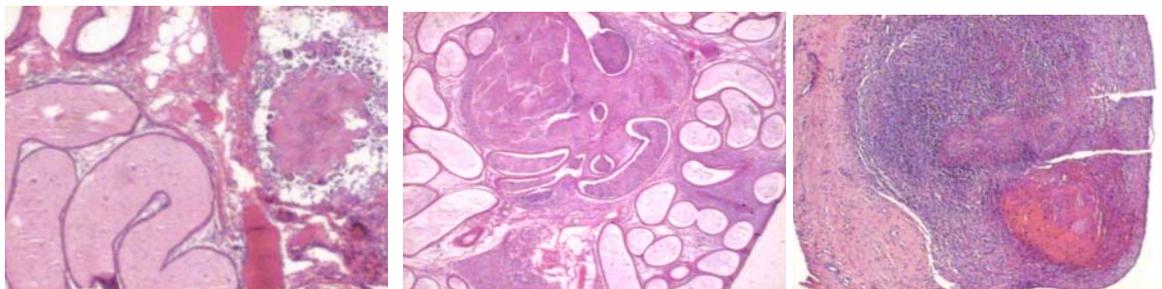


Figura 14- Necrose, em diferentes graus (HE – 400x)

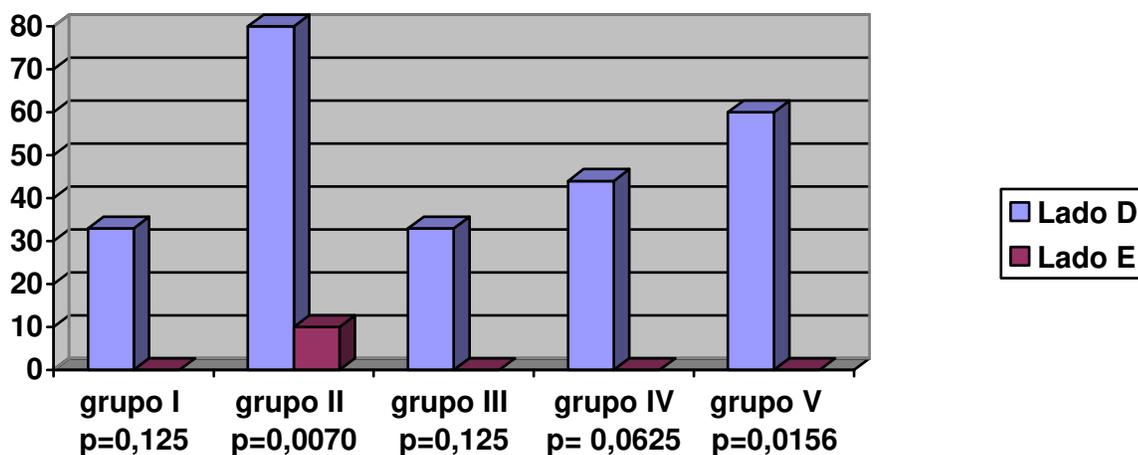


Gráfico 4- Porcentagem de animais que apresentaram necrose nos grupos I a V. Diferenças significativas somente no grupo II e V ($p < 0,05$)

O teste de Qui-Quadrado, nesta variável, demonstra que não existe diferença significativa entre os epidídimos dos cinco grupos analisados ($p = 0,2396$).

Fibrose: ocorreram alterações em 22%, 50%, 100%, 100% e 100% no lado direito (Fig. 15), e 0%, 0%, 0%, 22% e 10% no lado esquerdo, nos grupos I a V, respectivamente. Esta análise também se mostrou significativa a partir da segunda punção (Gráfico 5).

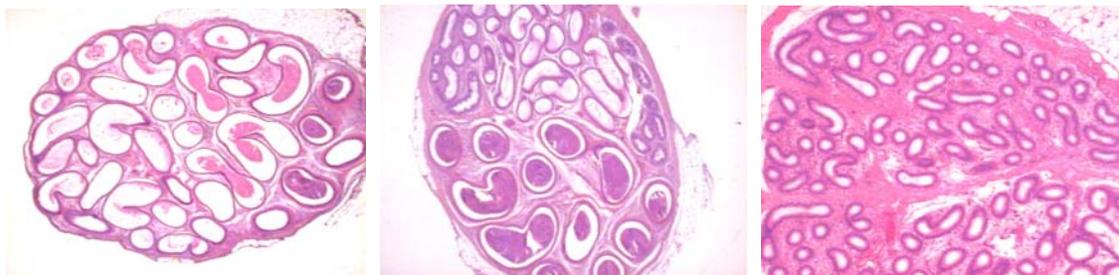


Figura 15- Fibrose, nos diferentes graus encontrados (HE – 400x).

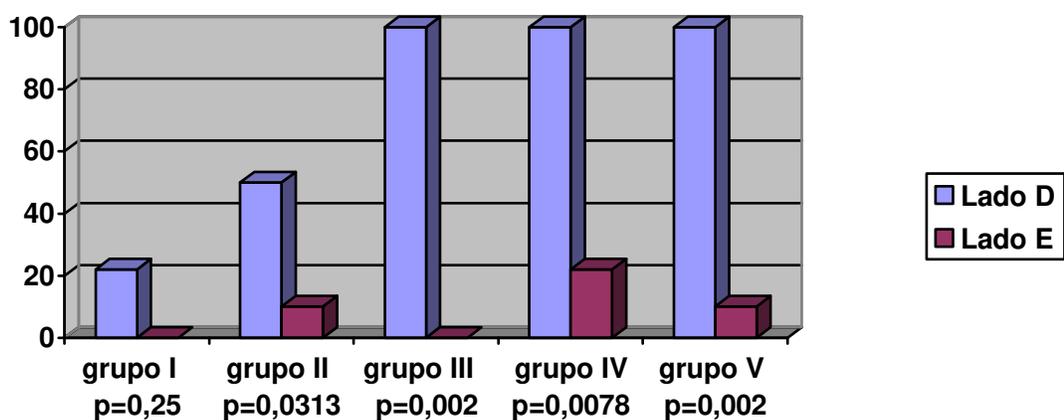


Gráfico 5- Porcentagem de animais que apresentaram fibrose, nos grupos I a V. Diferença significativa a partir do grupo II ($p < 0,05$)

O teste de Qui-Quadrado mostrou que existe diferença entre os grupos ($p = 0,0001$). O teste de Fisher identifica onde ocorreram estas diferenças nos grupos. Quando comparados, os grupos I e II não mostraram diferença significativa ($p = 0,5984$). A comparação entre o grupo I com os grupos III, IV e V, mostrou que existe diferença significativa ($p = 0,0005$; $0,0005$ e $0,0002$ respectivamente). O grupo II comparado com III, IV e V apresentou diferença significativa ($p = 0,001$). Entre os grupos III, IV e V, não ocorreram diferenças significativas ($p=1$). Em resumo: $(I = II) \neq (III = IV = V)$.

Desarranjo estrutural: apresentaram alterações em 55%, 90%, 88%, 100% e 80% no lado direito (Fig. 16), e 11%, 0%, 0%, 11% e 10% no lado esquerdo, nos grupos I a V, respectivamente. Este aspecto também se mostrou significativo a partir da segunda punção (Gráfico 6).

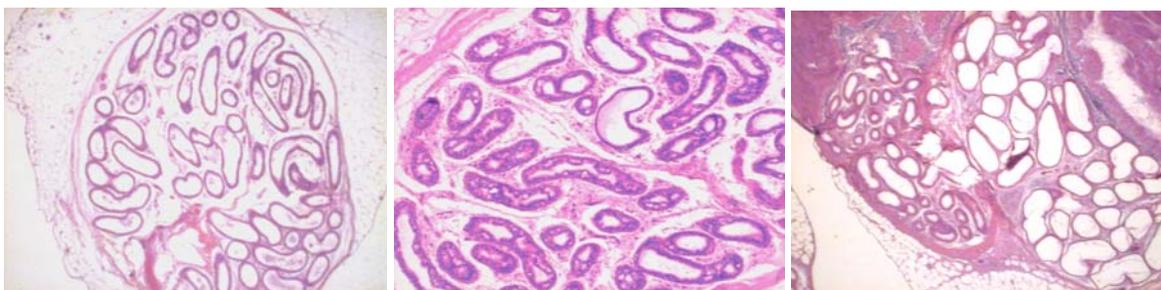


Figura 16- Desarranjo estrutural, em graus variados (HE – 400x)

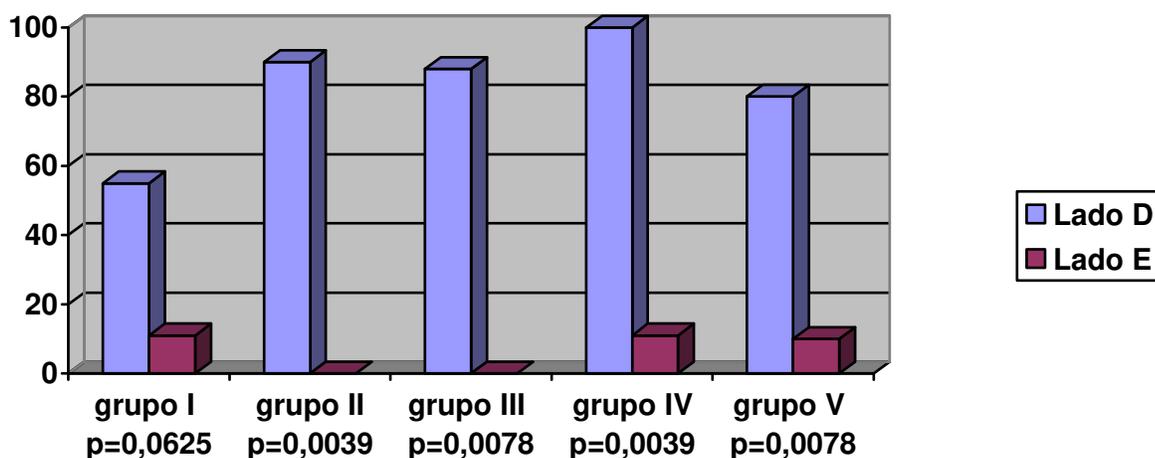


Gráfico 6- Porcentagem de animais que apresentaram desarranjo estrutural, nos grupos I a V. Diferença significativa a partir do grupo II ($p < 0,05$)

O teste de Qui-Quadrado demonstra que não existe diferença significativa entre os epidídimos dos cinco grupos analisados ($p = 0,1118$).

Após a análise dos dados, observou-se que as variáveis infiltrado linfoplasmocitário, reação granulomatosa, fibrose e desarranjo estrutural apresentam diferença significativa a partir da segunda punção. O efeito cumulativo das punções somente foi observado nas variáveis infiltrado linfoplasmocitário e fibrose.

4.3- Análise estereológica

Na análise estereológica dos epidídimos foram estudadas as densidades volumétricas de fibras de músculo liso e de fibras colágenas:

Densidade volumétrica de músculo liso: que correspondeu a 23,56%, 22,40%, 19,89%, 19,56% e 19,10% no lado direito, nos grupos I a V, respectivamente, representando diminuição total de 19%. Apesar da distribuição de músculo liso nos epidídimos apresentar diferenças, elas não foram significativas (Gráfico 7).

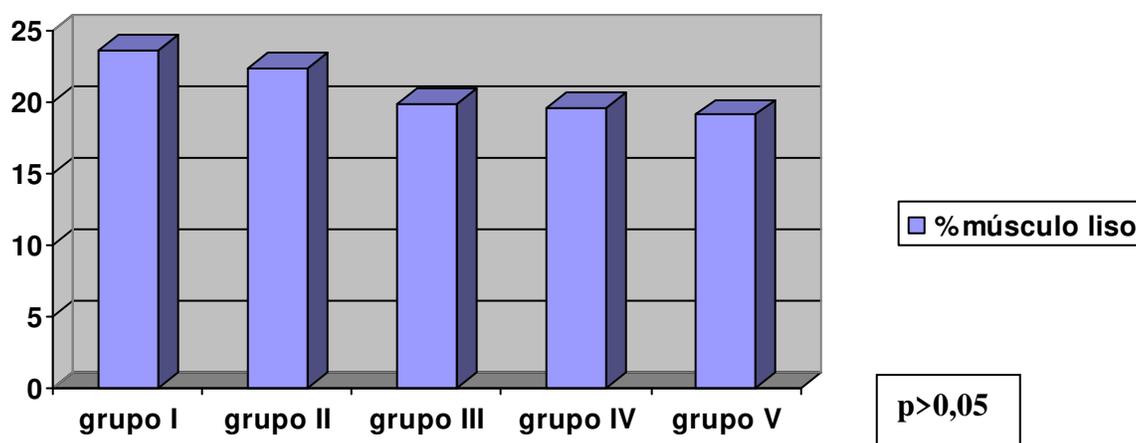


Gráfico 7- A densidade volumétrica de músculo liso nos epidídimos é decrescente, de acordo com o aumento do número de punções, porém não significante ($p > 0,05$)

Densidade volumétrica de fibras colágenas: o volume ocupado foi de 21,56%, 27,60%, 35,67%, 37,56% e 38,60% no lado puncionado (D), nos grupos I a V, respectivamente, representando aumento total de 79%. Esse resultado demonstra a existência de diferença significativa entre o grupo I e o II, assim como do grupo II com os outros grupos (Gráfico 8).

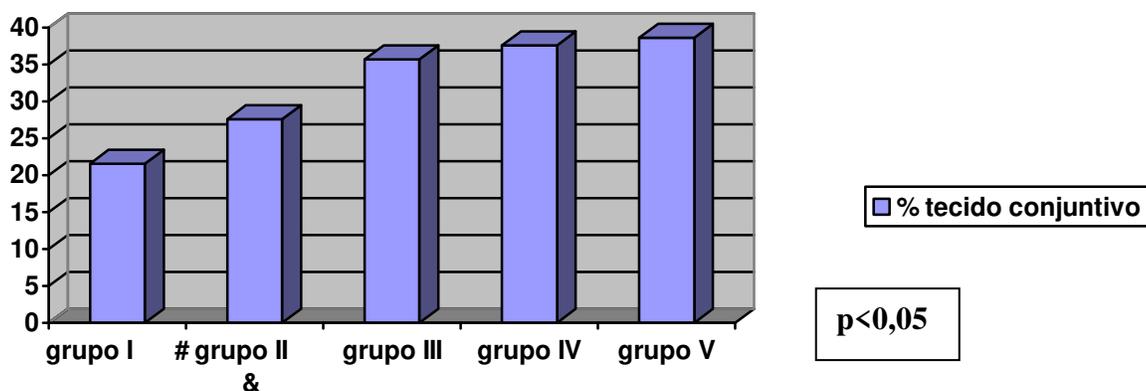


Gráfico 8- A densidade volumétrica de fibras colágenas nos epidídimos é crescente, conforme aumenta o número de punções. Grupo I e II (#) e grupo II e III (&) ($p < 0,05$)

5- DISCUSSÃO

5.1- Discussão do método

Os animais de experimentação, ratos da linhagem Wistar, foram fornecidos pelo Cemib-Unicamp com mesma idade e peso. A escolha desse animal foi pela homogeneização dos ratos, pelo tamanho dos órgãos sexuais masculino, que possibilitam a fácil manipulação e pela grande produção de espermatozóides (Mastroianni e Bigger, 1981).

O grupo piloto foi empregado para estudar a histologia normal do epidídimo do rato e as alterações decorrentes da obstrução causada pela vasectomia. O objetivo foi criar modelo experimental de azoospermia obstrutiva. A escolha da vasectomia por via abdominal evitou a manipulação das gônadas, sem qualquer interferência local.

A análise histológica confirmou a dilatação dos túbulos epididimários, demonstrando a eficiência do modelo desenvolvido. Confirmado o fator obstrutivo, justificou-se a realização da PESA que é a finalidade desse estudo. Sukcharoen et al. (2002), em estudo de 49 pacientes azoospérmicos que realizaram PESA, demonstraram facilidade da punção, quando a dilatação epididimária era presente.

A escolha da PESA ocorreu por ser a técnica mais empregada na obtenção de espermatozóides nos casos de AO, por permitir repetição do processo, nos estudos clínicos máximo de quatro punções, pela facilidade de realização, baixo custo, não utilização de microscópio e material microcirúrgico, poucos relatos clínicos das complicações decorrentes das punções e nenhum trabalho experimental (Meniru et al. 1998, Rosenlund et al. 1998, Glina et al. 2003).

O período entre as punções foi de 15 dias, que corresponde ao ciclo da espermatogênese no rato (Monesi, 1972).

A análise histológica foi importante na determinação das reações inflamatórias e cicatriciais decorrentes das punções. Este estudo permitiu mostrar danos aos epidídimos causados pelas repetidas punções.

A análise estereológica permite uma avaliação tridimensional, com caráter quantitativo, apresentando assim uma análise mais detalhada das alterações promovidas pelas punções epididimárias. Montes (1996) refere que nos estudos em que se visa estabelecer padrões de fibrose, o uso da estereologia permite um maior grau de exatidão que os estudos histológicos tradicionais, tornando-se assim o padrão ouro para a avaliação de tecido conjuntivo.

5.2- Discussão dos resultados

Em revisão na PubMed não foram encontrados outros trabalhos experimentais com PESA e múltiplas punções. Deste modo, os resultados do presente estudo serão comparados com os resultados de estudos clínicos com fins de argumentação sabendo que são grupos distintos.

A PESA realizada em ratos permitiu a obtenção de espermatozóides móveis em grande quantidade nas cinco punções, sem diferença estatística entre os grupos. Vários autores relataram a possibilidade de obtenção de espermatozóides em punções repetidas. Meniru et al (1998) demonstraram, em série de 177 pacientes, sucesso de 82%, 93%, 96% e 100% em até quatro punções sequenciais utilizando PESA e, em associação ao ICSI, obtiveram índices de gravidez de 35% por ciclo. Rosenlund et al.(1998) trataram 27 pacientes, utilizando PESA associada ao ICSI, em que realizaram repetidas punções até número de quatro. Obtiveram suficiente número de espermatozóides móveis em 91%, 89%, 86% e 100% nas quatro punções, respectivamente. A possibilidade de criopreservação ocorreu em 33%, nas duas primeiras e 14%, na terceira punção. Taxas de fertilização de 62%, 67%, 47% e 62%, respectivamente. Glina et al.(2003), em estudo retrospectivo de 58 pacientes, obtiveram 81%, 87%, 80%, 100% de espermatozóides em punções de um a quatro, respectivamente, com criopreservação em 43% e taxas de gravidez de 38%. Resultados diferentes foram relatados por Pasqualotto et al. (2003), que estudaram 19 pacientes com repetição da PESA, e obtiveram espermatozóides na primeira punção em somente 26,3% casos e 36,4%, na segunda.

Em muitos estudos, altas taxas de sucesso foram observadas na obtenção de espermatozóides, entretanto, um pequeno número de pacientes realizaram três ou quatro punções, não permitindo concluir qual o número seguro de PESA pode ser realizado. Em nosso estudo, o mesmo número de animais foi avaliado, nos diferentes grupos, possibilitando uma homogeneização dos resultados, e com obtenção de espermatozóides em todos grupos, de maneira constante, inclusive até cinco punções. Esse estudo permite inferir que, no rato Wistar, é possível obter espermatozóides em até cinco punções do epidídimo.

As análises histológicas das alterações inflamatórias dos epidídimos dos ratos mostraram que as punções promoveram danos estruturais, quando comparadas com o epidídimo contralateral. As variáveis analisadas, infiltrado linfoplasmocitário, reação granulomatosa, necrose, fibrose e desarranjo estrutural foram escolhidas por fazer parte do processo inflamatório e de cicatrização, ocorrendo alterações de maior intensidade, proporcionalmente, ao aumento do número de punções, com exceção da necrose. Essas alterações mostraram-se significativas a partir da segunda punção. O efeito cumulativo das punções somente foi verificado nos parâmetros infiltrado linfoplasmocitário e fibrose. Chan e Libman (2003) realizaram vasoepididimoanastomose em dois pacientes submetidos a PESA e observaram fibrose na cabeça, corpo e cauda dos epidídimos, além da aderência entre a túnica vaginal e o epidídimo. Outros trabalhos sugerem fibrose após PESA como causa provável da ausência de obtenção de espermatozóides numa nova punção (Pasqualotto et al. 2003). Gorgy et al. (1997) observaram formação de pequenos nódulos nos epidídimos puncionados. Esses poucos relatos clínicos sugerem a ocorrência de processo inflamatório causado pelas punções, e podem corresponder aos achados histológicos de nosso estudo.

A análise do epidídimo, após punção no homem, somente é verificada se outros procedimentos cirúrgicos forem realizados. A avaliação não invasiva por meio do ultra-som não demonstrou anormalidades decorrentes da PESA (Ron-el et al., 1998). Os resultados experimentais indicam que punções epididimárias repetidas produzem reações inflamatórias, permitindo mesmo assim a coleta de espermatozóides até cinco punções. Novos estudos com número maior de punções serão necessários para estabelecer o limite numérico da PESA.

Os resultados da análise estereológica demonstraram diminuição da densidade das fibras musculares lisas, porém sem diferença significativa, e aumento significativo da densidade do tecido conjuntivo. A literatura é insuficiente em relação à porcentagem de músculo liso e tecido conjuntivo no epidídimo de humanos e animais. Rubinstein e Mandarim-De-Lacerda (1995) realizaram estudo estereológico em epidídimos humanos sem doença conhecida e verificaram que a densidade de músculo liso em adultos era de 22% e do tecido conjuntivo variaram de 21 a 27%. Os valores encontrados em nosso estudo, após a primeira punção, são semelhantes aos de Rubinstein, mostrando que o rato é um bom modelo de estudo. Peng et al. (2002), em estudo estereológico de epidídimos e testículos de primatas, verificaram que a vasectomia não promoveu alterações das fibras colágenas no testículo e epidídimo. Isso mostra que as alterações estereológicas observadas em nosso estudo são decorrentes das punções e não da vasectomia. A importância do estudo estereológico foi demonstrar a mudança nas proporções encontradas entre o tecido conjuntivo e muscular liso decorrente do processo inflamatório secundário às PESA.

Os conhecimentos adquiridos neste estudo permitem concluir que as múltiplas PESA levam a alterações inflamatórias, com mudanças nas proporções de estruturas do epidídimo e apesar disso, essas alterações ainda possibilitam a obtenção de espermatozóides em até cinco punções. Transferindo essas informações para a clínica, maior número de punções epididimárias poderão ser realizadas. Entretanto, reconstruções epididimárias poderão estar comprometidas em virtude do processo inflamatório.

6- CONCLUSÕES

- A PESA possibilitou a obtenção de espermatozóides viáveis em todos os cinco grupos estudados.

- Todos os animais apresentaram alterações histológicas significativas dos epidídimos, quando comparados ao grupo controle, a partir da segunda punção, exceto na variável necrose. Somente nas variáveis infiltrado linfoplasmocitário e fibrose foi observado efeito cumulativo das PESA.

- O estudo estereológico demonstrou aumento significativo da densidade volumétrica de tecido conjuntivo nos epidídimos, provocadas pelas PESA.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



Amer M, Haggag SE, Moustafa T, Abd El-Naser T, Zohdy W. Testicular sperm extraction: impact of testicular histology on outcome, number of biopsies to be performed and optimal time for repetition. *Hum Reprod* 1999;14(12):3030-4.

Belker AM, Thomas AJ Jr, Fuchs EF, Konnak JW, Sharlip ID. Results of 1,469 microsurgical vasectomy reversals by the Vasovasostomy Study Group. *J Urol* 1991; 145(3):505-11.

Chan PT, Libman J. Feasibility of microsurgical reconstruction of the male reproductive tract after percutaneous epididymal sperm aspiration (PESA). *Can J Urol* 2003;10(6): 2070-3.

Chan PT, Brandell RA, Goldstein M. Prospective analysis of outcomes after microsurgical intussusception vasoepididymostomy. *BJU Int.* 2005 Sep;96(4):598-601.

Craft I, Shrivastav P. Treatment of male infertility. *Lancet* 1994; 344(8916):191-2.

Chatterjee S, Chaudhuri AR, Chowdhuri RG, Rahman S. Percutaneous epididymal sperm aspiration followed by intrauterine insemination--a new approach to achieve a pregnancy in infertility due to obstructive azoospermia. *J Indian Med Assoc* 2001; 99(8):445-7.

Friedler S, Raziel A, Strassburger D, Soffer Y, Komarovsky D, Ron-El R. Testicular sperm retrieval by percutaneous fine needle sperm aspiration compared with testicular sperm extraction by open biopsy in men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1997;12(7):1488-93.

Glina S, Fragoso JB, Martins FG, Soares JB, Galuppo AG, Wonchockier R. Percutaneous epididymal sperm aspiration (PESA) in men with obstructive azoospermia. *Int Braz J Urol* 2003;29(2):141-5.

Gorgy A, Naumann N, Meniru G, Beski S, Hogewind G, Craft IL. Postoperative morbidity following percutaneous epididymal sperm aspiration and/or testicular sperm aspiration under local anaesthesia. *Human Reprod* 1997; 12 Abstract Book 1

Gorgy A, Meniru GI, Naumann N, Beski S, Bates S, Craft IL. The efficacy of local anaesthesia for percutaneous epididymal sperm aspiration and testicular sperm aspiration. *Hum Reprod* 1998;13(3):646-50.

Horak S, Huk J, Grettka K, Tomanek G, Ogrodnik M, Polaszek M Comparison of the efficacy of ICSI using either spermatozoa aspirated microsurgically from the epididymis (MESA-ICSI) or obtained from the ejaculation. *Ginekol Pol* 2003;74(1):12-6.

Lewin A, Reubinoff B, Porat-Katz A, Weiss D, Eisenberg V, Arbel R, Bar-el H, Safran A. Testicular fine needle aspiration: the alternative method for sperm retrieval in non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1999;14(7):1785-90.

Mastrianni Jr L, Bigger JD. Collection of gametes in laboratory animals and preparation of sperm for FIV. In Oliphant T, Eng G. Editors. *Fertilization and embryonic development in vitro*. New York, Plenum Press, 1981. pg 11-26

Meacham RB, Hellerstein DK, Lipshultz LI. Evaluation and treatment of ejaculatory duct obstruction in the infertile male. *Fertil Steril* 1993;59(2):393-7.

Meniru GI, Gorgy A, Batha S, Clarke RJ, Podsiadly BT, Craft IL Studies of percutaneous epididymal sperm aspiration (PESA) and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod Update* 1998;4(1):57-71.

Monesi V. Spermatogenese und spermatozoen. In: Austin CR, Short RV. editores. *Reproduction in mammals*. London 1972. p.43-71.

Montes GS. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell Biol Int* 1996; 20(1):15-27.

Netto NR Jr, Esteves SC, Neves PA. Transurethral resection of partially obstructed ejaculatory ducts: seminal parameters and pregnancy outcomes according to the etiology of obstruction. *J Urol* 1998; 159 :2048-53.

Neves PN , Schlegel PN. Azoospermia não obstrutiva: Tratamento atual. *Urologia Contemporânea* 2004, 10: 119-32.

Ostad M, Liotta D, Ye Z, Schlegel PN. Testicular sperm extraction for nonobstructive azoospermia: results of a multibiopsy approach with optimized tissue dispersion. *Urology* 1998;52(4):692-6.

Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 1992; 340(8810):17-8.

Pasqualotto FF, Rossi-Ferragut LM, Rocha CC, Iaconelli A Jr, Ortiz V, Borges E Jr. The efficacy of repeat percutaneous epididymal sperm aspiration procedures. *J Urol* 2003;169(5):1779-81.

Peng B, Zhang RD, Dai XS, Deng XZ, Wan Y, Yang ZW. Quantitative (stereological) study of the effects of vasectomy on spermatogenesis in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Reproduction* 2002;124(6):847-56.

Qiu Y, Yang DT, Wang SM, Sun HQ, Jia YF. Successful pregnancy and birth after intrauterine insemination using caput epididymal sperm by percutaneous aspiration. *Asian J Androl* 2003; 5(1):73-5.

Ron-El R, Strauss S, Friedler S, Strassburger D, Komarovsky D, Raziel A. Serial sonography and colour flow Doppler imaging following testicular and epididymal sperm extraction. *Hum Reprod* 1998; 13(12):3390-3.

Rosenlund B, Westlander G, Wood M, Lundin K, Reismer E, Hillensjo T. Sperm retrieval and fertilization in repeated percutaneous epididymal sperm aspiration. *Hum Reprod* 1998; 13(10):2805-7.

Rubinstein I, Mandarim-De-Lacerda CA. Stereology of the human epididymis in different groups of age: fetus, children, adolescents and elderly. *J Urol (Paris)* 1995;101(3):153-8.

Saade RD. Espermatogênese: histologia e fisiologia. In: Neves PA, Rodrigues Netto NJr. editores. *Infertilidade masculina*. São Paulo, Editora Atheneu, 2002. p. 21-8.

Schlegel PN, Goldstein M. Microsurgical vasoepididymostomy: refinements and results. *J Urol* 1993; 150(4):1165-8.

Schlegel PN, Su LM. Physiological consequences of testicular sperm extraction. *Physiological consequences of testicular sperm extraction*. *Hum Reprod* 1997;12(8): 1688-92

Schlegel PN. Testicular sperm extraction: microdissection improves sperm yield with minimal tissue excision. *Hum Reprod* 1999;14(1):131-5.

Schroeder-Printzen I, Zumbe J, Bispink L, Palm S, Schneider U, Engelmann U, Weidner W. Microsurgical epididymal sperm aspiration: aspirate analysis and straws available after cryopreservation in patients with non-reconstructable obstructive azoospermia. MESA/TESE Group Giessen. *Hum Reprod* 2000; 15(12):2531-5

Sheynkin YR, Ye Z, Menendez S, Liotta D, Veeck LL, Schlegel P. Controlled comparison of percutaneous and microsurgical sperm retrieval in men with obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 1998;13(11):3086-9.

Silber SJ, Balmaceda J, Borrero C. Pregnancy with sperm aspiration from the proximal head of the epididymis: a new treatment for congenital absence of the vas deferens. *Fertil Steril* 1988; 50(3):525-8.

Silber SJ. Results of microsurgical vasoepididymostomy: role of epididymis in sperm maturation. *Hum Reprod* 1989; 4(3):298-303.

Silber SJ, Grotjan HE. Microscopic Vasectomy Reversal 30 Years Later: A Summary of 4010 Cases by the Same Surgeon. *J Androl* 2004; 25(6):845-59.

Sukcharoen N, Sithipravej T, Promviengchai S. Epididymal distension as a predictor of the success of PESA procedures. *J Assist Reprod Genet* 2002; 19(6):295-7.

Temple-Smith PD, Southwick GJ, Yates CA, Trounson AO, de Kretser DM. Human pregnancy by in vitro fertilization (IVF) using sperm aspirated from the epididymis. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 1985; 2(3):119-22.

Thiel M. Análise quantitativa da fibrose e semiquantitativa da reação inflamatória de quarto diferentes slings sintéticos. Tese de Doutorado, FCM - Unicamp, 2006.

Thomas AJ. Microsurgical end-to-side vasoepididymostomy: an analysis of 153 procedures. *J Urol* 1993; 149: 436A.

Van Peperstraten AM, Proctor ML, Phillipson G, Johnson NP. Techniques for surgical retrieval of sperm prior to ICSI for azoospermia. (Cochrane Review). In: The Cochrane Library, Issue 1, 2006.

Vieira M, Neves PA. Técnicas de coleta cirúrgica de espermatozóides: MESA, PESA, TESE, TESA. In: Neves PA, Rodrigues Netto NJr. editores. Infertilidade masculina. São Paulo, Editora Atheneu, 2002. p. 169-73.

Wald M, Ross LS, Prins GS, Cieslak-Janzen J, Wolf G, Niederberger CS. Analysis of Outcomes of Cryopreserved Surgically Retrieved Sperm for IVF/ICSI. J Androl 2006; 27: 60-65.

Wood S, Thomas K, Sephton V, Troup S, Kingsland C, Lewis –Jones I. Postoperative pain, complications, and satisfaction rates in patients who undergo surgical sperm retrieval. Fertil Steril 2003; 79:56-62.

8- APÊNDICES

Tabela 1 - dados descritivos de todas punções das variáveis: tamanho testículo (cm) direito, tamanho testículo (cm) esquerdo, nº de espermatozoides (1milhão/ml) de ratos por nº de punções (Grupos I a V).

	Variável	N	Média	Desvio Padrão	Variância	Coef. de Variância	Mínimo	1o Quartil	Mediana	3o Quartil
Grupo I	Tamanho Testículo (cm) Direito Grupo1	9	1,88	0,19	0,03	9,88	1,50	1,80	1,90	2,05
	Tamanho Testículo (cm) Esquerdo Grupo1	9	1,68	0,36	0,13	21,44	1,00	1,40	1,80	2,00
	Nº SPM (1 milhão/ml) Grupo1 Punção1	9	48,78	27,67	765,44	56,72	10,00	27,00	40,00	75,50
Grupo II	Tamanho Testículo (cm) Direito Grupo2	10	1,80	0,23	0,05	12,83	1,50	1,50	1,80	2,00
	Tamanho Testículo (cm) Esquerdo Grupo2	10	1,84	0,18	0,03	9,65	1,50	1,75	1,90	1,93
	Nº SPM (1 milhão/ml) Grupo2 Punção1	10	30,70	33,90	1147,60	110,34	3,00	6,75	14,50	48,00
	Nº SPM (1 milhão/ml) Grupo2 Punção2	10	44,40	59,20	3504,10	133,26	0,10	9,78	22,50	62,80
Grupo III	Tamanho Testículo (cm) Direito Grupo3	9	1,79	0,30	0,09	16,64	1,60	1,60	1,70	1,90
	Tamanho Testículo (cm) Esquerdo Grupo3	9	1,90	0,09	0,01	4,56	1,80	1,80	1,90	2,00
	Nº SPM (1 milhão/ml) Grupo3 Punção1	9	28,00	18,83	354,50	67,24	0,00	18,50	23,00	40,50
	Nº SPM (1 milhão/ml) Grupo3 Punção2	9	27,00	15,07	227,00	55,80	10,00	14,50	23,00	39,50
	Nº SPM (1 milhão/ml) Grupo3 Punção3	9	24,00	23,45	550,00	97,72	0,00	1,00	26,00	44,50
Grupo IV	Tamanho Testículo (cm) Direito Grupo4	9	1,81	0,18	0,03	10,12	1,60	1,65	1,80	1,90
	Tamanho Testículo (cm) Esquerdo Grupo4	9	1,87	0,10	0,01	5,36	1,70	1,80	1,90	1,95
	Nº SPM (1 milhão/ml) Grupo4 Punção1	9	36,56	13,22	174,78	36,17	21,00	26,00	35,00	47,00
	Nº SPM (1 milhão/ml) Grupo4 Punção2	9	52,70	58,40	3406,50	110,82	12,00	18,00	39,00	62,50
	Nº SPM (1 milhão/ml) Grupo4 Punção3	9	22,78	29,72	883,44	130,49	3,00	6,00	16,00	20,50
	Nº SPM (1 milhão/ml) Grupo4 Punção4	9	23,56	27,29	744,78	115,86	1,00	2,50	18,00	29,50
Grupo V	Tamanho Testículo (cm) Direito Grupo5	10	1,77	0,21	0,04	11,62	1,40	1,65	1,80	1,85
	Tamanho Testículo (cm) Esquerdo Grupo5	10	1,87	0,14	0,02	7,58	1,70	1,70	1,90	2,00
	Nº SPM (1 milhão/ml) Grupo5 Punção1	10	54,80	27,76	770,40	50,65	24,00	27,75	54,00	81,50
	Nº SPM (1 milhão/ml) Grupo5 Punção2	10	47,40	31,70	1004,00	66,85	5,00	24,30	44,00	74,50
	Nº SPM (1 milhão/ml) Grupo5 Punção3	10	39,10	32,40	1052,80	82,98	3,00	9,00	33,50	70,80
	Nº SPM (1 milhão/ml) Grupo5 Punção4	10	31,50	37,80	1432,10	120,13	0,00	3,50	23,00	48,30
	Nº SPM (1 milhão/ml) Grupo5 Punção5	10	33,90	46,10	2120,70	135,72	0,00	0,18	9,00	100,00

Tabela 2 - Teste do sinal de Wilcoxon para comparação (intragrupo) do lado DIREITO com lado ESQUERDO do testículo, segundo tipo de alteração no epidídimo

	Comparação dos lados	Variável (tipo de alteração)	N	valor p	Significância *
Grupo I	D vs E	Desarranjo G1	9	0,0625	<u>não existe diferença</u> significativa
	D vs E	Fibrose G1	9	0,25	<u>não existe diferença</u> significativa
	D vs E	Infilt.Linfop. G1	9	0,0625	<u>não existe diferença</u> significativa
	D vs E	Reac.Granul. G1	9	0,125	<u>não existe diferença</u> significativa
	D vs E	Necrose G1	9	0,125	<u>não existe diferença</u> significativa
Grupo II	D vs E	Desarranjo G2	10	0,0039	existe diferença significativa
	D vs E	Fibrose G2	10	0,0313	existe diferença significativa
	D vs E	Infilt.Linfop. G2	10	0,0078	existe diferença significativa
	D vs E	Reac.Granul. G2	10	0,0039	existe diferença significativa
	D vs E	Necrose G2	10	0,0078	existe diferença significativa
Grupo III	D vs E	Desarranjo G3	9	0,0078	existe diferença significativa
	D vs E	Fibrose G3	9	0,002	existe diferença significativa
	D vs E	Infilt.Linfop. G3	9	0,002	existe diferença significativa
	D vs E	Reac.Granul. G3	9	0,0313	existe diferença significativa
	D vs E	Necrose G3	9	0,125	<u>não existe diferença</u> significativa
Grupo IV	D vs E	Desarranjo G4	9	0,0039	existe diferença significativa
	D vs E	Fibrose G4	9	0,0078	existe diferença significativa
	D vs E	Infilt.Linfop. G4	9	0,0078	existe diferença significativa
	D vs E	Reac.Granul. G4	9	0,0039	existe diferença significativa
	D vs E	Necrose G4	9	0,0625	<u>não existe diferença</u> significativa
Grupo V	D vs E	Desarranjo G5	10	0,0078	existe diferença significativa
	D vs E	Fibrose G5	10	0,0020	existe diferença significativa
	D vs E	Infilt.Linfop. G5	10	0,0020	existe diferença significativa
	D vs E	Reac.Granul. G5	10	0,0039	existe diferença significativa
	D vs E	Necrose G5	10	0,0156	existe diferença significativa

* Considerando um nível de significância de 5 %

Tabela 3- Teste de *Qui-Quadrado da Razão de Máxima Verosimilhança* para comparar os cinco grupos de tratamento, segundo variável de alteração no epidídimo

Comparação dos subgrupos	Variável	G.L.	Teste	valor p	Significância *
I vs II vs III vs IV vs V	<i>Desarranjo</i>	4	7,4976	0,11	não existe diferença signif.
I vs II vs III vs IV vs V	<i>Reac. Granul.</i>	4	9,3888	0,05	não existe diferença signif.
I vs II vs III vs IV vs V	<i>Necrose</i>	4	6,3865	0,1721	não existe diferença signif.
I vs II vs III vs IV vs V	<i>Fibrose</i>	4	30,0041	<0,0001	existe diferença signif.
I vs II vs III vs IV vs V	<i>Infilt. Linfop.</i>	4	17,1874	0,0018	existe diferença signif.

* Considerando um nível de significância de 5 %

Tabela 4- Teste Exato de Fisher para comparações múltiplas dos cinco grupos de tratamento, segundo a variável *Infilt. Linfop.*

Comparação dos grupos	valor p (%)	Significância *
I vs II	11,51	não existe diferença signif.
I vs III	0,32	existe diferença signif.
I vs IV	0,32	existe diferença signif.
I vs V	0,13	existe diferença signif.
II vs III	60,32	não existe diferença signif.
II vs IV	60,32	não existe diferença signif.
II vs V	60,32	não existe diferença signif.
III vs IV	100,00	não existe diferença signif.
III vs V	100,00	não existe diferença signif.
IV vs V	100,00	não existe diferença signif.

* Considerando um nível de significância de 5 %

Tabela 5- Teste Exato de Fisher para comparações múltiplas dos cinco grupos de tratamento, segundo a variável Fibrose

Comparação dos grupos	<i>valor p (%)</i>	Significância *
I vs II	59,84	não existe diferença signif.
I vs III	0,05	existe diferença signif.
I vs IV	0,05	existe diferença signif.
I vs V	0,02	existe diferença signif.
II vs III	1,08	existe diferença signif.
II vs IV	1,08	existe diferença signif.
II vs V	1,08	existe diferença signif.
III vs IV	100,00	não existe diferença signif.
III vs V	100,00	não existe diferença signif.
IV vs V	100,00	não existe diferença signif.