

Validação de software de análise de imagens para estudos com morfometria testicular e espermatogênese

Marcela Ribeiro Santiago (Bolsista PIBITI/UFPI), Antonio Augusto Nascimento Machado Júnior (Orientador, Curso de Medicina Veterinária, CPCE, Bom Jesus), Elizângela Soares de Menezes, Layanne de Macêdo Praça, Richard Átila de Sousa, Maria Acelina Martins de Carvalho (Colaboradores)

Introdução

Estudos sobre reprodução são necessários para melhor conhecimento da biologia reprodutiva das espécies. Estudar a espermatogênese abre uma porta para compreensão da dinâmica de funcionamento testicular. O estudo da espermatogênese pode ser realizado por meio de um método que utiliza uma ocular micrométrica acoplada ao microscópio de luz, entretanto, esta técnica, mesmo sendo de fácil execução, demanda muito tempo do pesquisador, ao microscópio, para análise das lâminas histológicas. Como técnica alternativa tem surgido softwares destinados a facilitar o estudo morfométrico e aumentar a acurácia das informações obtidas (Amoroso et al, 2008; Carrijo-Junior et al, 2008; Silva et al, 2009). Deste modo, objetivou-se avaliar um software para estudo sobre morfometria testicular e espermatogênese tomando como hipótese a não existência de diferenças estatísticas entre as medidas realizadas com a ocular micrométrica e com o software.

Metodologia

Foram utilizados, 12 galos (*Gallus gallus domesticus*), machos adultos, oriundos de criatórios localizados em Bom Jesus – PI. O protocolo de eutanásia foi aprovado pelo CEEA/UFPI nº 003/09 consistindo de eletronarose. Antes do abate os animais foram pesados e, após o abate, os testículos foram removidos separados do epidídimo e pesados em balança eletrônica, para obtenção do índice gonadossomático (peso do testículo/peso do animal). Em seguida os testículos foram seccionados obtendo-se 15 fragmentos que foram fixados em Bouin, sob refrigeração a 8°C, por 24 horas. Os fragmentos foram processados para microscopia de luz, com base no protocolo: Desidratação em concentração crescente de álcool (70%, 80%, 90% e 100%) durante uma hora em cada concentração. Em seguida os fragmentos foram imersos em duas soluções de xilol por 30 minutos e foram colocados em parafina. Por fim, secções transversais com 4 µm foram obtidas com micrótomo Reichert Jung (Modelo Bright M3500), corados com Hematoxilina/Eosina – HE, para análise em microscópio de luz. Para a avaliação morfométrica dos testículos, duas técnicas foram utilizadas sendo uma técnica convencional e uma alternativa. Para realização da técnica convencional foi usada metodologia descrita na literatura (França, 1991; Costa et al, 2007), sendo que o diâmetro dos túbulos seminíferos (DT) e altura do epitélio seminífero (AE) foram mensurados a partir de secções transversais de túbulos com contorno o mais circular possível, utilizando a ocular micrométrica de 10x acoplada à objetiva de 40x. A técnica alternativa refere-se à utilização de um software para análises de imagem (Leica Qwin D1000, versão 4.1), realizando mensurações sob as mesmas condições supracitadas para a técnica convencional. Foi determinado também o comprimento total dos túbulos seminíferos (CTTS) por testículo, em metros, com base na fórmula: $CTTS = \text{Volume total dos túbulos seminíferos} / (\pi R^2)$, onde, R é o diâmetro tubular, que foi obtido pelas duas técnicas utilizadas, dividido por dois. Todos esses dados foram submetidos à análise de variância para um delineamento

inteiramente casualizado. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey em um nível de significância de 1%.

Resultados e Discussão

Os dados referentes ao peso corporal, peso testicular e índice gonadossomático médio (peso médio dos testículos dividido pelo peso corporal) estão expressos na (Tabela 1).

Tabela 1. Dados sobre peso corporal (g), peso testicular (g) e índice gonadossomático dos galos domésticos criados extensivamente em Bom Jesus – PI.

Animal	Peso Corporal (g)	Peso testicular* (g)	Índice gonadossomático
01	2600	7,13	0,0027
02	2700	7,53	0,0028
03	1850	4,41	0,0023
04	3000	4,78	0,0015
Média	2530	5,96	0,0023

As mensurações referentes ao diâmetro tubular (DT), altura do epitélio (AE) e comprimento total dos túbulos seminíferos (CTTS) estão expressos na tabela 2.

Verificou-se que as medidas do diâmetro tubular e do comprimento total dos túbulos seminíferos apresentaram valores semelhantes ($p > 0,01$) tanto pela técnica convencional quanto pela técnica alternativa. Este fato demonstra que o programa de análise de imagens, quando utilizado para mensurações que não apresentem subjetividade, é confiável.

Diferente do observado acima, a altura do epitélio seminífero mostrou diferença ($p < 0,01$) entre as medidas obtidas com o analisador de imagens e a ocular micrométrica. Esta observação permite inferir que em medidas nas quais os pontos de mensuração não sejam fixos, podem ocorrer alterações entre os dois métodos de avaliação.

Na literatura consultada não foram encontrados trabalhos utilizando o software Leica Qwin D1000 para análise da histometria testicular. Este fato, aliado à necessidade de introduzir técnicas mais modernas para análise de imagens justificaram a execução desta pesquisa que vem apresentar resultados motivadores com relação à utilização deste software em pesquisas desta natureza. Outras pesquisas, no entanto, em estudos envolvendo avaliação testicular têm utilizado outros softwares como o “Image Pro Plus 5.0” e “Image J” apresentando resultados semelhantes ao observado neste trabalho (Gomes, 2007; Diagone, 2009; Silva et al., 2009; Mcmanus et al., 2010; Scagion et al., 2010).

Tabela 2. Médias dos diâmetros tubulares, altura do epitélio seminífero e comprimento total dos túbulos seminíferos mensurados pela técnica convencional e pela técnica alternativa

Parâmetros	Técnica Convencional	Técnica Alternativa
Diâmetro tubular (DT)	221,57 ± 68 µm	238 ± 35,95 µm
Altura epitélio seminífero (AE)	63,22 ± 6,75 ^b µm	79,19 ± 9,33 ^a µm
Comprimento total dos túbulos seminíferos (CTTS)	139 ± 16 m	120 ± 14 m

Médias seguidas de letras diferentes apresentam diferença estatística ($p < 0,01$) pelo teste de Tukey.

O diâmetro tubular observado para os galos domésticos, independente do técnica de mensuração, encontra-se dentro do limite conhecido para maioria dos animais que é de 180 a 300 µm (Roosen-Runge, 1977). Em alguns animais, como a capivara, o diâmetro tubular expressa valores de

213 µm (Paula, 1999), já em aves como a codorna japonesa esse valor é de 308,81 µm (AMOROSO et al, 2006), no periquito maracanã (*Aratinga Leucophthalma*) utilizando a ocular micrométrica o valor médio é de 122,6 µm (Peixoto, 2006), nos catetos (*Tayassu tajacu*) 278,94 µm (Costa et al, 2004), jaguatiricas (*Leopardus pardalis*, Linnaeus,1758) 211,37 µm (Sarti, 2006).

A técnica alternativa permitiu encontrar um valor de altura do epitélio seminífero mais próximo ao encontrado em codornas que foi de 84,05 µm (Amoroso et al., 2006), no entanto este fato não expressa nenhum mérito especial ao software utilizado sendo portanto esta variação entre os galos e a codorna advinda de diferenças entre as espécies.

A altura média do epitélio seminífero segundo informação da literatura mostra valores de 63,29 µm no gato doméstico (*Felis catus*), de 66,33 µm no cateto (*Tayassu tajacu*) e 75,38 µm em jaguatiricas (*Leopardus pardalis*, Linnaeus,1758) (Costa et al, 2004; Sarti, 2006 Silva et al, 2009). Estes valores estão bem próximos do encontrado tanto pela técnica convencional quanto técnica alternativa.

Conclusão

Frente aos resultados expostos e, com base na metodologia proposta, conclui-se que o software Leica Qwin D1000 apresenta confiabilidade para ser utilizado em pesquisas envolvendo avaliação histológica de testículos sendo sua acurácia mais bem observada em mensurações que não envolvam nenhum grau de subjetividade na análise.

Referências bibliográficas

AMOROSO, L.; ARTONI, S.M.B.; MORAES, V.M.B.; PERECIN, D.; FRANZO, V.S.; AMOROSO, P. Influência da espermatogênese e dos níveis de testosterona no aspecto reprodutivo de codornas. **Revista Brasileira de Zootecnia / Brazilian Journal of Animal Science**. v. 37, p. 61-66, 2008.

COSTA, D.S.; MENEZES, C.M.C.; PAULA, T.A.R. Spermatogenesis in White-lipped peccaries (*Tayassu pecari*). **Anim. Reprod. Sci.**, v. 98, p.322-334, 2007.

DIAGONE, K.V. **Histologia e morfometria de gatos domésticos adultos**. Jaboticabal, 2009. 44p. Tese (Doutorado em Cirurgia Veterinária) – Universidade Estadual Paulista.

FRANÇA, L.R. **Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau**. Belo Horizonte, 1991. 185p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

GOMES, M.L.M. **Morfometria testicular de ratos Wistar adultos tratados com infusão aquosa de catuaba**. Viçosa, 2007. 49p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) – Universidade Federal de Viçosa.

McMANUS, C.; SASAKI, L.C.B.; LOUVANDINI, H.; DIAS, L.T.; TEIXEIRA, R.A. Avaliação histológica dos testículos de ovinos da raça Santa Inês nascidos em diferentes estações do ano. **Ciência Rural**, v. 40, n. 2, p. 369-402, 2010.

SILVA, C.A.O.; PERRI, S.H.V.; KOIVISTO, M.B.; SILVA, A.M.; CARVALHO, R.G.; MONTEIRO, C.M.R. Aspectos histológicos e morfométricos dos testículos de gatos domésticos (*Felis catus*). **Pesq. Vet. Bras.** p. 312-316, 2009.

Palavras-chave: Galos. Software. Espermatogênese.