

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

CARLOS HENRIQUE SOUSA DE MELO

**APLICAÇÃO DE BIÓPSIAS DE FÍGADO, BAÇO E TESTÍCULO
VISANDO ESTUDOS DE EXPRESSÃO GÊNICA EM CAPRINOS
TRANSGÊNICOS**

**FORTALEZA
2013**

CARLOS HENRIQUE SOUSA DE MELO

APLICAÇÃO DE BIÓPSIAS DE FÍGADO, BAÇO E TESTÍCULO VISANDO
ESTUDOS DE EXPRESSÃO GÊNICA EM CAPRINOS TRANSGÊNICOS.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da
Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Linha de Pesquisa: Reprodução e Sanidade Pequenos
Ruminantes.

Orientador: Prof. Dr. Dárcio Ítalo Alves Teixeira

FORTALEZA
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Estadual do Ceará
Biblioteca Central Prof. Antônio Martins Filho

Bibliotecário Responsável – Francisco Welton Silva Rios – CRB-3/919

M528a Melo, Carlos Henrique Sousa de

Aplicação de biópsias de fígado, baço e testículo visando estudos de expressão gênica em caprinos transgênicos / Carlos Henrique Sousa de Melo . – 2013.

CD-ROM. 86 f. : il. (algumas color.) ; 4 ½ cm

“CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico, acondicionado em caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm)”.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias, Fortaleza, 2013.

Área de Concentração: Reprodução e sanidade de carnívoros, onívoros, herbívoros e aves.

Orientação: Prof. Dr. Dárcio Ítalo Alves Teixeira.

Co-orientação; Prof.^a Dr.^a Luciana Magalhães Melo.

1. Biópsia. 2. Caprinos. 3. Transgênicos. I. Título.

CDD: 636.08

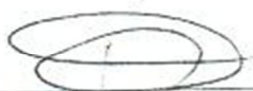
CARLOS HENRIQUE SOUSA DE MELO

APLICAÇÃO DE BIÓPSIAS DE FÍGADO, BAÇO E TESTÍCULO VISANDO
ESTUDOS DE EXPRESSÃO GÊNICA EM CAPRINOS TRANSGÊNICOS.

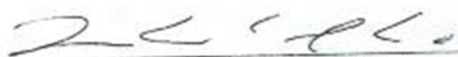
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da
Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias.

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Dárcio Italo Alves Teixeira
Universidade Estadual do Ceará – UECE
Orientador



Dr. Luiz Sergio de Almeida Camargo
EMBRAPA Gado de Leite
Examinador

Profª. Dra. Lúcia Daniel Machado da Silva
Universidade Estadual do Ceará – UECE
Examinadora



Profª. Dra. Luciana Magalhães Melo
Universidade Estadual do Ceará – UECE
Co-Orientadora

Dedico.

*A Deus e aos meus pais Carlos Paulino de Melo
(in memoriam) e Rosa Maria Souza de Melo*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Ceará (UECE), à Faculdade de Veterinária (FAVET) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) por terem propiciado subsídio físico, estrutural e intelectual para minha formação e a realização deste projeto. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de pesquisa durante a realização do mestrado.

À Deus, por ter me dado o bem mais precioso que é a vida, pelo amparo nos momentos difíceis, por mostrar os caminhos nas horas incertas me dando força para superar as dificuldades e alcançar meus objetivos.

Aos meus pais, Carlos Paulino de Melo (*in memoriam*) e Rosa Maria Souza de Melo, pelo amor incondicional, incentivo e dedicação. Os meus maiores exemplos de força, superação e caráter.

Aos meus irmãos, Rosangela Souza de Melo, Francisco José Souza de Melo e Tiago Sousa de Melo, por todos os momentos de alegria, incentivo, amizade e apoio nos momentos de dificuldade.

Às minhas cunhadas Derijane Rebouças de Melo e Patrícia Rodrigues pela amizade e incentivo.

À minha sobrinha Lara Melo que chegou trazendo muita harmonia, felicidade e alegria.

À Livia Correia Magalhães, por todo carinho, incentivo e, sobretudo por estar ao meu lado. Obrigado por tornar tudo mais especial.

À A.º.R.º.L.º.S.º. Professor Euclides César nº 28, por todos os ensinamentos e apoio.

Ao Prof. Dr. Dárcio Ítalo Alves Teixeira, por todo o aprendizado, confiança e oportunidades que me foram dadas, a quem tenho muito a agradecer.

Ao Prof. Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas, pela confiança, incentivo e oportunidades que me foram dadas, a quem tenho muito respeito.

À Dra. Luciana Magalhães Melo, por todo o aprendizado, incentivo, dedicação e apoio, a quem tenho muito respeito.

Ao Prof. Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo, pelas sugestões e participação na avaliação deste trabalho.

À Profa. Dra. Lúcia Daniel Machado da Silva, por seus ensinamentos, sugestões e por sua participação na avaliação deste trabalho.

À Dra. Alexandra Fernandes Pereira, pela amizade, incentivo, dedicação e companheirismo, a quem tenho muito carinho, admiração e respeito.

Aos amigos Alexandre Rodrigues, Antônio Carlos Telles, Deisy Sanchez, Francisco Carlos de Sousa, Ribrio Ivan Tavares e Thais Thatiane, por todo carinho, companheirismo, amizade e respeito.

Aos amigos de laboratório, Joanna Maria Gonçalves de Souza, Dowglish Ferreira Chaves, Iana Campelo, Amanda Albuquerque Rocha, Bruna Raquel Cavalcante Barroso, Caíque Teixeira Ramos, Felipe Tersi, Rodrigo Rabelo de Castro Sousa e Yara Diógenes, por todas as contribuições e companheirismo.

Aos amigos, Danilo Lima, Diego Aguiar, José Claudio Filho, Patrícia Lustosa, Paulo Victor Pontes Araújo, Pedro Henrique Rodrigues pela amizade, companheirismo, convivência e apoio.

Aos funcionários e amigos Carlos, César e Selmar pelo apoio e amizade.

Agradeço a todos que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional e àqueles que não mediram esforços para que tudo ocorresse de forma desejável no decorrer deste projeto.

RESUMO

Este trabalho objetivou avaliar a aplicação de diferentes técnicas de biópsia para obtenção de amostras teciduais de fígado, baço e testículo, visando estudos de expressão gênica em caprinos. Seis machos Canindé foram utilizados, dois pertencentes à linhagem transgênica 10M para o Fator Estimulante de Colônia de Granulócitos humanos (hG-CSF; T) e quatro não transgênico (NT). Dois animais NT não foram submetidos a nenhum procedimento de biópsia e utilizados como controles comportamentais. O tempo de cada procedimento, o número de tentativas por biópsia e o peso do fragmento foram registrados. Foram realizadas biópsias de baço e fígado guiadas por ultrassonografia (US) e laparoscópica (LAP). As biópsias testiculares foram realizadas de forma percutânea com agulha Tru-Cut e 100 dias após as mesmas, avaliações seminais foram realizadas. Após a realização dos procedimentos os animais foram avaliados nas primeiras 24 h (a cada 8h) para verificar manifestações de dor, levando em consideração a curvatura do dorso, dificuldade em se mover e diminuição do apetite. Um acompanhamento ultrassonográfico dos órgãos biopsiados foi realizado nas primeiras 48 h. Além disso, durante o período experimental, os animais foram submetidos a exames clínicos. O RNA total foi extraído utilizando RNeasy mini kit de acordo com as instruções do fabricante e quantificado por fluorimetria. As amplificações do qPCR foram realizadas no Master-Cycler EP Realplex 4 S para os seguintes genes: SP1, BAFF, GAPDH e hG-CSF. Para a biópsia hepática, respectivamente, o tempo operatório médio, o número de tentativas, peso do fragmento e rendimento de RNA nos grupos US ($10,0 \pm 1,5$ min; $1,1 \pm 0,2$; $23,2 \pm 1,0$ mg; $1,0 \pm 0,5$ µg RNA/mg) e LAP ($13,7 \pm 2,5$ min; $1,1 \pm 0,2$; $21,7 \pm 1,3$; $1,0 \pm 0,3$) foram similares ($P > 0,05$). De forma análoga, para a biópsia esplênica o grupo US ($9,2 \pm 0,9$ min; $1,4 \pm 0,3$; $20,1 \pm 1,1$ mg; $0,4 \pm 0,04$ µg RNA/mg) e LAP ($13,7 \pm 1,3$ min; $1,3 \pm 0,4$; $19,5 \pm 1,9$ mg; $0,5 \pm 0,05$ µg RNA/mg) sendo $P < 0,05$ apenas para o tempo operatório. Já biópsia testicular $12,2 \pm 1,9$ min; $1,0 \pm 0,0$; $21,2 \pm 1,8$ mg; $2,0 \pm 0,2$ µg RNA/mg), além disso, não ocorreu alteração nos parâmetros seminais avaliados. Para todos os órgãos, os parâmetros clínicos avaliados permaneceram dentro dos valores normais para a espécie. Os transcritos de SP1 e BAFF foram detectados com sucesso de forma semelhante em ambos os métodos em fígado e baço, respectivamente. Em relação aos níveis de transcrição de hG-CSF, não foram detectados em nenhum dos tecidos estudados, sugerindo que não há expressão ectópica nestes órgãos. As execuções dos

métodos de biópsia utilizados nesse estudo permitem a obtenção de amostras teciduais de fígado, baço e testículo sem a ocorrência de processos dolorosos intensos.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the application of different techniques to obtaining biopsy tissue samples from liver, spleen and testis, targeting gene expression studies in goats. Six Canindé male goats were used, two belonging to 10M transgenic lineage for human granulocyte colony stimulating factor (hG-CSF) and four non-transgenic. Two non-transgenic bucks were not subjected to biopsy procedures being used as controls on behavioral assessments. The length for each procedure, the number of attempts and weight of the biopsy fragment were recorded. Biopsies of the liver and spleen were performed guided by ultrasound and laparoscopy. The testicular biopsies were performed percutaneously with Tru-Cut needle and 100 days after the biopsy and seminal evaluation was conducted. After biopsy procedures bucks were examined during the first 24 h (every 8 h) to verify any signal of pain, such as curvature of the back, difficulty of moving, and decreased appetite. Additionally, the organs were submitted to ultrasonography for 48 h. Total RNA was prepared using the RNeasy mini kit according to the manufacturer's instructions. The PCR amplifications were performed in a Master-Cycler EP Realplex 4 S for the target gene SP1, BAFF, GAPDH e hG-CSF. For liver biopsy, respectively, the mean operative time, number of attempts, fragment weight and RNA yield obtained by ultrasound (US) (10.0 ± 1.5 min, 1.1 ± 0.2 ; 23.2 ± 1.0 mg, 1.0 ± 0.5 mg RNA / mg) and laparoscopic (LAP) (13.7 ± 2.5 min, 1.1 ± 0.2 , 21.7 ± 1.3 , 1.0 ± 0.3) procedure were similar ($P > 0.05$). Similarly, for splenic biopsy guided by US procedures (9.2 ± 0.9 min, 1.4 ± 0.3 , 20.1 ± 1.1 mg, 0.4 ± 0.04 mg RNA / mg) and LAP (13.7 ± 1.3 min, 1.3 ± 0.4 , 19.5 ± 1.9 mg, 0.5 ± 0.05 mg RNA / mg) with $P < 0.05$ only for operative time. Already testicular biopsy, 12.2 ± 1.9 min, 1.0 ± 0.0 , 21.2 ± 1.8 mg, 2.0 ± 0.2 mg RNA / mg) and no change in seminal parameters evaluated. For both organs, the clinical parameters evaluated were within the normal range for the species. Transcripts SP1 and BAFF were successfully detected similarly in both methods in liver and spleen, respectively. Regarding to hG-CSF no transcripts were detected in any tissue studied, suggesting no ectopic expression in these organs. The executions of the biopsy methods used in this study allow obtaining tissue samples from the liver, spleen and testis without the occurrence of severe pain processes.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de literatura

Figura 1. Execução das técnicas de biópsia hepática percutânea conduzida às cegas em ovinos. A. Agulha introduzida no 11º espaço intercostal, no sentido ventro-cranial com mecanismo de gatilho armado e a haste obturadora recolhida dentro da cânula externa. B. Haste obturadora exposta através de pressão do polegar até o ponto de disparo do dispositivo (NÉSPOLI et al., 2010)26

Figura 2. Execução das técnicas de biópsia hepática percutânea guiada por ultrassonografia em ovinos. A. Posicionamento da agulha e transdutor durante realização da técnica. B. Imagem ultrassonográfica linear do fígado correspondente à figura A. (NÉSPOLI et al., 2010).....27

Figura 3. Biópsia hepática assistida por laparoscopia em ovinos. (A) Imagem endoscópica da introdução da agulha Tru-cut na cavidade abdominal e no parênquima hepático. (B) Imagem endoscópica do posicionamento da pinça de Blakesley para apreensão da borda hepática. (C) Imagem endoscópica da ressecção de fragmento hepático com tesoura de dissecação. (D) Lâmina profunda do omento maior sobre a superfície do lobo direito do fígado (NÉSPOLI et al., 2010)30

Figura 4. Execução das técnicas de biópsia esplênica percutânea guiada por ultrassonografia ou assistida por laparoscopia em caprinos. A. Posicionamento da agulha e transdutor durante realização da técnica de ultrassonografia. B. Acesso laparoscópico pela via transumbilical e posicionamento da agulha para realização da biópsia em caprinos (Fonte: LFCR).....32

Figura 5. Execução das técnicas de biópsia testicular percutânea com agulha Tru-Cut em caprinos. A incisão através da pele escrotal e túnicas permite a identificação de seus vasos sanguíneos e o desvio dos mesmos no momento da inserção da agulha de biópsia (Fonte: LFCR).....34

Capítulo 1

Figure 1. Methods of liver biopsy in goats: A, C and E – ultrasound-guided and ultrasonographic images of the liver immediately before (T0) and 48 h (T48) after the procedure; B, D and F – by laparoscopy, and ultrasound images of the liver immediately before (T0) and 48 h (T48) after the procedure. The arrow shows the Tru-Cut needle.....63

Figure 2. Real-time PCR analysis of BAFF expression in spleen (A) and SP1 expression in liver (B) obtained by different biopsy methods in goats. The fold differences in mRNA expression after normalization to the internal standard (GAPDH) are shown.....64

Figure 3. Methods of splenic biopsy in goats: A, C and E – ultrasound-guided and ultrasonographic images of the spleen immediately before (T0) and 48 h (T48) after the procedure; B, D and F – by laparoscopy, and ultrasound images of the spleen

mmediately before (T0) and 48 h (T48) after the procedure. The arrow shows the Tru-Cut needle.....65

Figure 4. Transgene expression analysis in liver by real-time PCR. Derivative melting curves of hG-CSF and GAPDH amplicons in non-transgenic (A and B) and transgenic (C and D) goats. Negative controls are mRNA templates without reverse transcriptase. Positive control (E) are reactions with transcripts of human leukocytes. The curve slopes, effience and linearity values were calculated. The results for gene expression in the spleen are presented similarly to liver.....66

Capítulo 2

FIG 1: Transgene expression analysis in testicle by real-time PCR. SP1 relative transcript levels in testicle samples of T and NT (a) $P > 0.05$. Derivative melting curves of hG-CSF and GAPDH amplicons in non-transgenic (b) and transgenic goats(c). Positive controls (d) are reactions with transcripts of human leukocytes. Arrows indicate the negative controls are mRNA templates without reverse transcriptase. The curve slopes, efficiency and linearity values were calculated.....76

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Table 1. Values of rectal temperature (°C), heart frequency (bpm), respiratory frequency (bpm) and ruminal movements (contractions/3 min) according to the groups, immediately after (T0) and at 24 (T24) and 48 h (T48) after the biopsy in transgenic and non-transgenic goats using different methods (Means $\pm$ SD).....61

Capítulo 2

TABLE 1: Values (Means $\pm$ SEM) of quantitative and qualitative analysis of Canindé goat semen subjected to testicular biopsy with Tru-Cut needle or control bucks which did not undergo surgery.....75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% – Porcentagem

°C – Grau Celsius

ANOVA – Análise de Variância

b.w – Peso corporal (*body weight*)

BAFF – Biópsia Aspirativa por Agulha Fina

BAFF – Fator ativador de células B (*B-cell activating factor*)

bpm – Batimentos por minuto

cDNA – DNA complementar (*complementary DNA*)

CEUA – Comissão de Ética para o Uso de Animais

cm – Centímetro

CNPQ – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Cq – Ciclo de quantificação (*quantification cycle*)

Ct – Limiar do ciclo (*cycle threshold*)

CTNBio – Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

D – Dia

dHuEPO – Dímero da Eritropoietina Humana

DNA – Ácido desoxirribonucleico (*desoxirribonucleic acid*)

Dr. – Doutor (*doctor*)

E – Eficiência (*efficiency*)

E – Expiração

EI – Espaço intercostal

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

F1 – Primeira geração

G – Gauge

GAPDH – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*)

GFP – Proteína Fluorescente Verde

h – Horas

hG-CSF – Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos Humanos

I – Inspiração

i.m – Intramuscular

i.v. – Intravenoso

kg – Quilograma

L – Litro

LFCR – Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução

LP – Laparoscopia

mg – Miligramas

MHz – Mega-Hertz

min – Minutos

mm – Milímetros

mM – Milimolar

mpm – Movimentos por minuto

mRNA – RNA mensageiro (*messenger RNA*)

NT – Não transgênico

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase (*Polimerase Chain Reaction*)

PI – Intensidade da dor (*Pain intensity*)

PPGCV – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

Prof. – Professor

qPCR – PCR quantitativo (*quantitative PCR*)

R^2 – Linearidade

RNA – Ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)

RT – Transcrição reversa (*reverse transcription*)

S – Síntese/Inclinação (*slope*)

SD – Desvio padrão (*standard deviation*)

SEM – Erro Padrão Médio

SP1 – Fator de transcrição (*transcription factor*)

T – Transgênico

T_m – Temperatura de melting (*melting temperature*)

U – Unidade

UECE – Universidade Estadual do Ceará

US – Ultrassom

Δ – Delta

μg – Micrograma

μL – Microlitro

μM – Micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1. REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM ANIMAIS TRANSGÊNICOS	20
2.2. FERRAMENTAS DIAGNÓSTICAS NA VETERINÁRIA	23
2.3. BIÓPSIA HEPÁTICA EM RUMINANTES	25
2.3.1. Percutânea.....	25
2.3.2. Guiada por ultrassonografia.....	27
2.3.3. Guiada por laparoscopia	29
2.4. BIÓPSIA ESPLÊNICA.....	31
2.5. BIÓPSIA TETICULAR.....	33
3. JUSTIFICATIVA	36
4. HIPÓTESE CIENTÍFICA.....	37
5. OBJETIVOS	38
5.1. OBJETIVO GERAL	38
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
6. CAPÍTULO 1	39
7. CAPÍTULO 2	68
8. CONCLUSÕES.....	78
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

1. INTRODUÇÃO

A partir do primeiro relato demonstrando a possibilidade de utilização de um plasmídeo recombinante como vetor de transferência de genes exógenos diretamente em embriões de camundongo e que os mesmos poderiam manter essa construção ao longo do seu desenvolvimento (GORDON et al., 1980), a tecnologia transgênica tem se destacado nos avanços das biotecnologias em diversos segmentos.

Diversas aplicações desta ferramenta biotecnológica, como a produção de produtos farmacológicos, a produção de modelos para estudos de doenças animais ou humanas, a melhoria de características de produção animal, o estudo da regulação e a expressão gênica, entre outras, são direta ou indiretamente relacionadas ao bem estar do homem (HOUDEBINE, 2000; WHEELER; WALTERS; CLARK, 2003).

As técnicas de obtenção de animais transgênicos já demonstraram que a inserção do transgene no genoma hospedeiro é predominantemente aleatória (CLARK et al., 2000), o que torna a expressão transgênica, quando presente, de regulação imprevisível. Os eventuais impactos que essa integração aleatória pode vir a proporcionar ao bem estar dos animais transgênicos são decorrentes da expressão ectópica do transgene e/ou reabsorção de proteínas biologicamente ativas (RÜLICHE; HÜBSCHER, 2000; DUNN; PINKERT; KOOYMAN, 2005).

Os estudos que visam à avaliação das mudanças fenotípicas oriundas da inserção aleatória do transgene realizam uma avaliação da expressão gênica em diferentes tecidos (HUANG et al., 2012; SEROVA et al., 2012), no entanto, a coleta das amostras para realização de tal metodologia é sempre realizada posteriormente à eutanásia dos animais estudados (KONG et al., 2009; YIN et al., 2012). Dessa forma, faz-se necessária a busca por alternativas metodológicas que possam viabilizar o estudo da expressão gênica em diferentes tecidos sem a necessidade da realização da eutanásia.

Atualmente diversas ferramentas diagnósticas estão disponíveis para a medicina veterinária e quando utilizadas de maneira adequada podem proporcionar informações específicas a respeito da fisiologia animal e de condições patológicas. A exigência de uma instrumentação aplicada para melhorar a capacidade de diagnóstico tem impulsionado avanços no desenvolvimento, adequação e utilização de diferentes recursos (KING, 2006).

Na medicina veterinária, dentre os recursos auxiliares disponíveis para investigação ou estabelecimento do diagnóstico de doenças ou alterações de órgãos em animais domésticos, encontram-se as provas bioquímicas, a radiologia e a ultrassonografia (RADOSTITS; MAYHEW; HOUSTON, 2002). Embora possam confirmar indícios de comprometimento do órgão e determinar a relativa severidade da doença, esses métodos raramente fornecem informações específicas (BUNCH; POLAK; HORNBuckle, 1985; BARR, 1995).

As biópsias guiadas por imagem surgem com uma alternativa promissora que permitem informações específicas do tecido avaliado. Os benefícios da utilização das ferramentas de biópsia na medicina veterinária são muitos. As facilidades de realização, assim como as infrequentes complicações e a importância diagnóstica, tem incrementado seu uso (KING, 2006). Em grandes animais, as principais ferramentas de imagem que vem sendo utilizada são a ultrassonografia e laparoscopia e a associação dessas técnicas à realização de biópsias teciduais tem permitido a realização de estudos anatomopatológicos (SILVA; STOPIGLIA; FANTONI, 2002; GONZALO-ORDEN et al., 2003; NÉSPOLI et al, 2010).

O fragmento coletado através das técnicas de biópsias possibilita a realização de diferentes avaliações como a histologia clássica, imuno-histoquímica, exame histopatológico e métodos moleculares, tais como a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) (NÉSPOLI et al, 2010). A utilização de ferramentas biotecnológicas como a RT-PCR no estudo funcional de genes tem sido descrita com sucesso na avaliação da expressão ectópica em animais transgênicos (KONG et al., 2009; SEROVA et al., 2012). Por conseguinte, o emprego de biópsias teciduais nos estudos que visam à avaliação da expressão gênica em diferentes tecidos pode vir a diminuir a necessidade de sacrifício dos animais, assegurando o bem estar animal e viabilizando este tipo de estudos em espécies produtivas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM ANIMAIS TRANSGÊNICOS

Para ser expresso corretamente, um transgene deve conter idealmente um promotor, acentuador, silenciadores, introns, e um terminador de transcrição (HOUEBINE, 2007). Um fragmento de DNA genômico longo contendo o promotor de interesse geralmente fornece níveis de expressão elevados do transgene (BISCHOFF et al., 1992; RIVAL-GERVIER et al., 2002). Alguns investigadores acreditam que a secreção de proteínas recombinantes em 1-2 mg/mL no leite é economicamente aceitável. Esta estimativa é relevante para as proteínas que estão normalmente presentes em concentrações elevadas, tais como albumina ou fibrinogênio (WALL; KERR; BONDIOLI, 1997; HOUEBINE, 2009).

Para as proteínas com atividade biológica elevada, tais como fatores de crescimento e citocinas, estes níveis não são adequados porque as proteínas recombinantes podem ser potencialmente prejudiciais para os animais transgênicos (HOUEBINE, 2009). Não é surpreendente que uma lista das proteínas humanas produzidas por animais transgênicos não inclui quaisquer fatores de crescimento ou citocinas (LUBON, 1998; RUDOLPH, 1999; GOL'DMAN; KADULIN; RAZIN, 2002; HOUEBINE, 2007; NIEMANN; KUES, 2007). O efeito deletério que podem vir a ocorrer em animais transgênicos pode ser devido à expressão ectópica do transgene e/ou absorção de proteínas biologicamente ativas a partir de leite quando a concentração de proteína é excessiva.

As primeiras tentativas da engenharia genética em animais resultaram em alguns problemas fisiológicos nos animais transgênicos, atribuídas ao controle inadequado da expressão do transgene, resultando na superexpressão ou expressão em tecidos não específicos (PURSEL et al., 1990). O acoplamento de gene exógeno com um promotor específico para um tecido modula os padrões de expressão diminuindo os impactos negativos no bem-estar devido à expressão gênica.

As sequências proximais ao sítio de integração do transgene são responsáveis por regular a expressão do transgene, resultando em um complexo efeito de posição de variação. O efeito de posição de variação pode causar diferentes modificações epigenéticas, semelhantes à metilação do DNA e acetilação da histona. No entanto, ainda não se conhece quais dos fatores, efeito de posição ou modificações epigenéticas,

possuem um papel mais importante na regulação da expressão do transgene (YIN et al., 2012).

Os mecanismos que provocam o fenômeno de instabilidade do transgene são pouco compreendidos. Geralmente, o número de cópias do transgene e estado de metilação do DNA podem influenciar a expressão gênica (GARRICK et al., 1998). Estes são muitas vezes considerados como principais fatores que resultam em silenciamento incompleto ou completo da expressão do gene de interesse (MARTIN; WHITELOW, 1996). Em alguns casos, múltiplas cópias do transgene são dispostas no sentido 3'-5', e assim integradas aleatoriamente no genoma do hospedeiro, podendo causar interferências de transcrição e consequentemente reprimir a expressão (ESZTERHAS et al., 2002; STRATHDEE; IBBOTSON; GRANT, 2006). A metilação do DNA é o candidato mais forte para o silenciamento de expressão, porque pode levar para inatividade transcricional de determinados genes, podendo ser estavelmente herdada através de mitose, e transmitidos a gerações subsequentes (KEARNS et al., 2000; SHUMACHER et al., 2000). Em particular a metilação do promotor foi associada com o silenciamento do transgene tanto *in vitro* quanto *in vivo* (PROSCH et al., 1996; MEHTA et al., 2009).

Em suínos transgênicos para a Proteína Fluorescente Verde (GFP) diferentes níveis de expressão foram detectados em intestino, ovário, útero, pulmão, fígado, língua, rim, coração, músculo, tecido adiposo, baço e estômago. Nestes animais a expressão de mRNA na descendência foi significativamente menor, mais de cinco vezes, em comparação com o fundador. A regulação da expressão do transgene nesses animais foi regulada pelo número de cópias do transgene e padrão de metilação do promotor (KONG et al., 2009).

Tendo por finalidade analisar o efeito da posição e modificações epigenéticas sobre a regulação da expressão do transgene, estudos utilizando dois suínos transgênicos que expressavam GFP sob o controle do promotor de citomegalovírus demonstraram que o efeito da posição está associado com os locais de integração, podendo controlar a expressão do transgene diretamente por elementos reguladores, como potenciadores e silenciadores, e indiretamente por modificações epigenéticas (YIN et al., 2012).

Estudos realizados em diferentes linhagens de camundongos transgênicos para a eritropoietina humana observaram uma taxa de mortalidade de 39% nos animais transgênicos, cerca de oito vezes maior que a mortalidade do controle. Ainda no mesmo

estudo, expressão ectópica do mRNA do Dímero da Eritropoietina Humana (dHuEPO) foi detectada através da RT-PCR em diversos tecidos, incluindo coração, fígado, rim, pulmão e baço. Assim, é possível que a expressão ectópica da dHuEPO tenha vindo a causar falência múltipla dos órgãos nos camundongos transgênicos (YUN et al., 2012).

Com o intuito de estudar possíveis consequências adversas de uma elevada e persistente produção de neutrófilos, camundongos transgênicos, expressando o Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos Humanos (hG-CSF) no leite, foram monitorados por um período de mais de um ano (SERIZAWA et al., 2000). Estes animais apresentaram granulocitopoiese e neutrofilia. A contínua granulocitopoiese medular e extramedular resultaram em alterações nos ossos e fígado. Entretanto, mesmo tendo sido observada uma infiltração pulmonar por neutrófilos maduros, lesões pulmonares raramente foram encontradas. Embora tenha existido um aumento persistente nos neutrófilos, a mortalidade não diferiu entre os camundongos transgênicos e não transgênicos. Desta forma, os autores concluíram que outros fatores, além da elevada produção de hG-CSF e da neutrofilia, possivelmente, foram necessários para o desenvolvimento de danos teciduais crônicos e agudos mediados por neutrófilos.

Linhagens de camundongos transgênicos foram obtidas para promover secreção tecido-específica do hG-CSF no leite, apresentando uma faixa de 19-40 µg/mL. A análise em RT-PCR de vários tecidos de camundongos transgênicos demonstraram que a expressão do hG-CSF foi detectada apenas na glândula mamária da progênie de todos os fundadores. Além disso, nenhum camundongo transgênico mostrou quaisquer alterações na hematopoiese com base no número de granulócitos no sangue e também foram capazes de produzir progênie transgênica por herança mendeliana (SEROVA et al., 2012).

Diante do exposto fica evidente que as mudanças fenotípicas resultantes da inserção aleatória do transgene no hospedeiro podem ser cruciais para o bem estar animal. Dessa forma, após obtenção de animais transgênicos biorreatores, são necessários estudos que visem à caracterização fenotípica dos mesmos a fim de conhecer os possíveis impactos causados na fisiologia do animal.

2.2. FERRAMENTAS DIAGNÓSTICAS NA VETERINÁRIA

Os exames complementares se destinam a auxiliar os profissionais da área de saúde no estabelecimento de um diagnóstico correto, juntamente com a avaliação dos sinais e sintomas do paciente. Com a evolução da medicina veterinária, notou-se que a relação entre sinal patognomônico e doença nem sempre é biunívoca. Nesse ponto, surge a necessidade de se lançar mão de exames complementares, residindo sua importância no fato de os exames fornecerem subsídios indispensáveis para o estabelecimento do diagnóstico definitivo como também para a elaboração do prognóstico, planejamento terapêutico e preservação do paciente (VIGNOLI; SAUNDERS, 2010).

Os benefícios da ultrassonografia como uma ferramenta de diagnóstico por imagem veterinária são inúmeros. Exames de rotina têm demonstrado a ausência de efeitos biológicos prejudiciais, embora constantes revisões sejam realizadas para garantir que esta afirmativa permanece verdadeira. A ultrassonografia é considerada um procedimento seguro para o paciente, operador e pessoas próximas, o que lhe permite ser realizada em qualquer localização sem a necessidade de precauções de segurança específicas (PRESTON; SHAW, 2001). É uma técnica não invasiva e, portanto, bem tolerada em animais não sedados, permite a realização de exames seriados para monitorar a progressão da doença, resposta ao tratamento, ou para a prática de técnicas de escaneamento possíveis (NYLAND; MATTOON, 2002).

Embora seja preciso prática e experiência para alcançar competência e confiança com a técnica, específicas aplicações podem ser facilmente e rapidamente aprendidas até mesmo por operadores inexperientes (DICKIE et al., 2003). A capacidade da ultrassonografia em distinguir fluidos de tecidos moles e realizar a diferenciação entre os mesmos com base nas suas características a torna mais adequada que a radiografia para examinar tais estruturas (NYLAND; MATTOON, 2002). A ultrassonografia, portanto, fornece uma alternativa não invasiva para muitos procedimentos de contraste radiológico, embora as duas técnicas ainda devam ser consideradas como complementares. A ultrassonografia também pode muitas vezes fornecer informações que anteriormente só estavam disponíveis através de laparotomia exploratória.

A ultrassonografia, no entanto, também possui limitações. A interpretação é necessária no momento do estudo, podendo se tornar difícil a obtenção de informação

significativa somente a partir das imagens do exame. Os resultados são, portanto, dependentes da experiência e habilidade do operador, embora aplicações específicas possam ser aprendidas rapidamente, é necessária prática e experiência para alcançar um amplo conhecimento técnico e, portanto, a confiança nos resultados. Também é necessário ter um conhecimento profundo da anatomia regional relevante, uma vez que a interpretação precisa de imagens depende diretamente da diferenciação entre a anatomia normal e anormal. Outra limitação refere-se incapacidade dos ultrassons em penetrar estruturas cheias de gás ou ósseas, portanto, janelas acústicas devem ser encontradas a fim de evitar a interposição de osso ou de gás entre o transdutor e a região de interesse, apesar de muitas vezes isso pode ser conseguido através do posicionamento judicioso do paciente (HERRING; BJORNTON, 1985; NYLAND; MATTOON, 2002).

Por meio da ultrassonografia é possível detectar alterações em tamanho, contornos, textura e arquitetura de órgãos abdominais. Sendo que estas podem sugerir uma lesão, mas não permite a diferenciação de lesão em benigna ou maligna. Entretanto, a ausência de alterações ultrassonográficas não exclui a existência de doença (CARVALHO, 2004).

Para um diagnóstico definitivo é necessário recorrer às biópsias, que são indicadas para confirmar, sustentar ou eliminar probabilidades diagnósticas. Baseiam-se no histórico do animal, exame físico, laboratoriais, avaliação radiográfica e ultrassonográfica, a fim de obter um prognóstico e planejamento terapêutico (VIGNOLI; SAUNDERS, 2010).

As biópsias percutâneas podem ser guiadas por ultrassom e assim aumentar a probabilidade de se obter boas amostras das lesões, haja vista que a agulha será direcionada exatamente para o órgão alterado e, mais precisamente, para a área de lesão detectada ultrassonograficamente. Também evita atingir áreas de tecidos normais, grandes vasos e áreas com conteúdo líquido, que apresentam pouca celularidade ou que podem ser áreas de necrose, minimizar os riscos (NYLAND; MATTON, 2005).

A laparoscopia é um procedimento cirúrgico minimamente invasivo no qual por meio de um endoscópio inserido transabdominal é possível observar os órgãos dentro das cavidades abdominais e pélvicas. Durante a laparoscopia, o cirurgião pode inspecionar visualmente as vísceras e superfícies peritoniais. A laparoscopia exploratória ou procedimentos cirúrgicos laparoscópicos simples, como a realização de

biópsia laparoscópica, são realizados utilizando técnicas laparoscópicas básicas (ANDERSON; GAUGHAN; ST-JEAN, 1993; KASSEM et al., 2011).

As biópsias conduzidas com auxílio da videolaparoscopia proporcionam o controle visual do procedimento e monitoramento das hemorragias decorrentes do mesmo. No entanto, o procedimento laparoscópico não é uma técnica cirúrgica fácil. Exige um bom conhecimento da anatomia e topografia abdominal e treinamento rigoroso. Deve ser realizado com grande cuidado e delicadeza porque complicações tais como perfurações de órgãos podem ocorrer. Além disso, também requer a utilização de tecnologia sofisticada e dispendiosa (BOURÉ, 2005).

2.3. BIÓPSIA HEPÁTICA EM RUMINANTES

A biópsia hepática em ruminantes tem aplicação clínica importante, pois fornece aos profissionais informações sobre a estrutura morfológica e a composição bromatológica do órgão (AMORIM et al., 2003).

2.3.1. Biópsia Percutânea

Há grande variação entre os locais utilizados para realização das biópsias percutâneas. Na espécie ovina, são utilizados, geralmente, como referência principal os Espaços Intercostais (EI), que varia desde o 8º (PEARSON; CRAIG, 1980) e 9º EI (DICK, 1944), até porções mais caudais como o início da fossa paralombar direita (HOGAN; MONEY; WALKER, 1971).

Na espécie bovina, a maior parte dos estudos utiliza o 11º EI como referência principal (LOOSMORE; ALLCROFT, 1951; PEARSON; CRAIG, 1980; BRAGA; CASTILHOS; SANTOS, 1985; AMORIM et al., 2003), seguidos pelo 12º (GARNER, 1950; WHITEHAIR et al., 1952) e 10º EI (UDALL; WARNER; SMITH, 1952; HUGHES, 1962). Nos trabalhos mais antigos, a segunda referência mais comumente utilizada era uma distância fixa da coluna vertebral até o EI determinado (GARNER, 1950; LOOSMORE; ALLCROFT, 1951; WHITEHAIR et al., 1952).

Nos ovinos, os procedimentos são realizados com os animais em estação (PEARSON; CRAIG, 1980; HARVEY et al., 1984; FERREIRA; VAN DER MERWE; SLIPPERS, 1996), com membros anteriores suspensos (DONALD; PAULL;

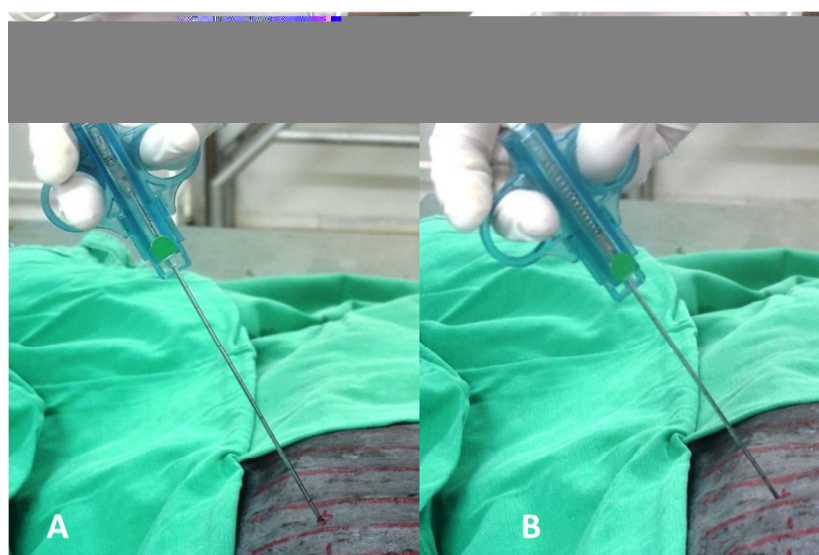
LANGLANDS, 1984) ou em decúbito dorsal (DICK, 1944). Já entre os bovinos, verifica-se que na grande maioria dos estudos, os animais foram contidos em estação (UDALL; WARNER; SMITH, 1952; WHITEHAIR et al., 1952; PEARSON; CRAIG, 1980; BRAGA; CASTILHOS; SANTOS, 1985; AMORIM et al., 2003).

A técnica empregada nos diferentes estudos variam de acordo com o local da biópsia e o tipo de instrumental utilizado. Com instrumentais de maior diâmetro a introdução nas cavidades corpóreas era realizada através de uma incisão na pele (HUGHES, 1962; CHAPMAN et al., 1963; BUCKLEY; EIGENDORF; DORWARD, 1980; AMORIM et al., 2003). Já as agulhas de menor calibre são introduzidas tanto através de pequena incisão (PEARSON; CRAIG, 1980; FERREIRA; VAN DER MERWE; SLIPPERS, 1996), como também através da pele íntegra (SCHERER et al., 1999; SCHERER et al., 2000) ou por intermédio de agulha hipodérmica de grosso calibre (BRAGA, 1985). A adoção de infiltração de anestésico local variou entre os autores. Na maior parte dos estudos a infiltração anestésica foi empregada.

O sentido para introdução dos aparatos teve influência direta do local escolhido para a realização das biópsias. Quando o instrumento foi introduzido nos EI mais caudais, como 11° ou 12°, geralmente se adotou o sentido crânio-ventral (SEGHETTI; MARSH, 1953; BONE, 1954; PEARSON; CRAIG, 1980; NÉSPOLI et al., 2010 - Figura 1). Em contrapartida, nos EI mais craniais, como 8°, 9° e 10°, o aparato foi direcionado no sentido caudo-medial (HUGHES, 1962; HARVEY et al., 1984).

O uso das agulhas Tru-Cut e de Vim-Silverman não está sujeito a variações substanciais. A agulha de Vim-Silverman é introduzida na cavidade com mandril. Uma vez sob a cápsula do órgão procede-se a retirada do mandril. Em seguida, o estilete em forquilha munido com farpas é introduzido além da ponta da agulha no tecido hepático. Então, ambas as partes são retiradas junto com o fragmento de tecido preso entre as farpas do estilete. A agulha Tru-Cut, por sua vez, é introduzida no tecido hepático com o mandril recolhido. A cânula externa é puxada para trás, para que o tecido possa penetrar nos sulcos do mandril. Em seguida, à medida que a cânula avança sobre o entalhe, o fragmento hepático é seccionado (DIRKSEN, 1993).

Na grande maioria dos estudos realizados em ovinos e bovinos, as biópsias hepáticas percutâneas foram conduzidas sem complicações clínicas relevantes, a despeito do calibre do instrumental utilizado ou da frequência de procedimentos adotada pelos autores.



*. !# > : 0.\$%&)# "G0(0#) 5 , ' # 8 '1" 0# ' !0."S(# 0&().E)# C 0 *# +
 &3 (& ' & 0 &(#)& +) 0M5 "& 2#" !#2 4. !)& *.28# ("!&).E)# (& >>J '\$\$&
 (" !0& "#2 (& (")& 3 ("!&-0!#(#2 0&+ + 0#(+&) *#" 28& #!+#)& # 8# "
 &5".!#)& !# ! 0&28)#) ("!&)# 0S(.2# : " !(# # " &5".!#)& !# : '& "# #!"#3G)
 ' ! %&)& ' &2 *#! #"G & ' &(" &)) ' #!&)&) ' & " 3& A ^ " #2 <=>=B

< ? < , ' # *. #)# '& ! .2"!# &(&*!#9 #

5&3 (& %& 0&(")& + "\$\$%& A R R e >_B &
 ' 4. (& !.+ (#(" + "\$\$%& AQ R >\KTB &.) 0M5 "& 2#" !#2 4. !)&
 A ; - " #2 <==?B ' , !#2 E#\$%&) " ! 0&"&+ # 4. " ()))
 & ZJ #"G & ><J) ! "& A R R e > _B) # '2 0#\$%&)& * 2
 '#!# .2"!# &(&*!#9 # &)& 2#)&) ! "& %& 0#(#)&)) & M2" +& (& (")&
 3 ("!&-)& ! #2)# 0& " 2# #"G # ' & ! \$L 3 ("!#)& ZJ 9D*#)& #'#! 0 #+'2&)&
 ><J #& >=J + 5&3 (& A R R e >\ _B 0#! (&
 AQ R >\KTB "& ! (#- ' !& *! 3#+ (" + (& ! 0!#(#2+ (" + 3 !".)
)# &5! ' & \$%&)& '.2+%&) ! "& "# 9& !+ # # #!" !)& \J '\$\$& %& 3 D3
 # ' (# # ' & ! \$L + # 3 ("!#)& , ! *%& A R R e >_B
 4. '#+ ("& ." 2 E#)& 3#! # ("! #. "& ! + # + 5&3 (& &5 !3#- 2#!* &
 . &) " !#(). "& ! + " + '& ! #2) ? W E 2 (#! AQ R >\KTB &.
 "& ! # A R H R Q >\K\B &) #3 # # # '2 0#\$%&)
 " !#(). "& !) < W E ' &) ! (0 1! # + # (+ # 0&+ 9D*#)&) *!#()

'!&'&L '#!# 3 .#2 E#\$%&) "!.!.!# + # '!'& 9.()# &! &."!& 2#)& 0&()!#-
4. "!()."&! 0&+ 9! 4./(0 #)# &!) +) W = E F#+ (.9 0 (" '#!# &
:#+) 5&3 (& '!'& (%& #" (*!+ # '!'&9.())#) (0 1! # '#!# # #3#2 #\$\$\$&
A R R e >_B + 0#! (& &3 (& %&) 0! "& "#+5G+ &
. &) "!()."&!) ? W E A Q R >\KTB +5&!# + &3 (& #
9! 4./(0 # + # &!) W = E) #"G Z W E " (8#+)& ." 2 E#)# A ; -
" #2 <==?B
. &)# .2"!# &(&*!#9 # (& +& ("&!#+ ("&)# 5 ,' # ' !0."S(# + (+ E#
& ! 0&) '!(\$%&) ,!*%& #)F#0 (") 2#0! #\$\$\$&) *!#() 3# & #(*.D(&
A >\WB 5 + 0&+& '!' + " #) (" 9 0#\$\$\$& ' ! 0 &0) 8 +&!!#* # #(")&
##! 0 + ("&) (# 02D(0& ' & 5 2)#)) 3 .#2 E#! & " 0)& & ' !0.! &
)# #*.28# (& + +& '2#(& '!' + " 4. & & ' !#)&! !# 2 E 5 ,' #) + # # 9&0# &.
) ,!*%& 0&+ + (&! 3&2.+ 0&+ *!#() ' ! 0 %& A R Q R
>\KWR f e >\WB 5 + 0&+&) # (+ # &5 & & .) # (+ # + 4. (%& 8&.3
.0 & 0&+ # "G0(0# 0 *# 0&(3 (0 &(# A R Q R >\KW -
*!# <B

*!# < : 0.\$%&)# "G0(0#) 5 ,' # 8 '1" 0# ' !0."S(# *.#)# '&!
.2"!# &(&*!#9 # + &3 (& ' & 0 &(#)& +) 0M5 "&2#" !#2) ! "& & 0 &(# + ("&
)# #*.28# "!()."&!).!#(" ! #2 E#\$%&)# "G0(#0 + #* + .2"!# &(&*!#9 0# 2 (#!
)& 9D*#)& 0&!! ' &() (" C 9 *!# A ^ " #2 <=>=B

("! # #*.28#) '&(D3 # !.-." %& # + # !0&+ ()#)# + 9.(\$%&
)& . 910 2 + #(. &)# 4.#2)#))# #+& " !# &5 ")#)# *!#()) '&(5 2)#)
)# '& 5 2)#)) !." 2 E#\$%& Af e >\WB 2 G+) & #2*.() '& " 3&
#."&+1" 0&)# 2 (8#) '!&)."& 8.+#(& "/+)& " '#)& + 0% *#'"& A -
R f >\?R f e >\WB %&) 0! "& & . &) ("!.+ ("&
h &"Oi h &("&Oi 4. 0&(" + +) .# '#!" 7 .+) '& " 3& + 0S(0&)
+&2# #" 3#)# .+ # #*.28# ' 0 #2 E#)# 0&+ 9.(0&+ ("& + 2#! #&)# #*.28#
!.-." & ' !+ !& " '& #' (# & 0#(8%& G !." 2 E13 2 & *.())& " '& #+5# #
'#!" %&) 0#!"13 Af e >\WB &)&) '& " 3& & #3#(\$&)& " 2 "
)# 0S(.2# : " !(#)# #*.28# &0&!! #."&+#" 0#+ (" + " !0 !& +&) 2& 0&(")
.+ + 0#(+& + #."&+1" 0& + 4. & + #(!) 2 G #3# (\$#)& + #(.#2+ (" (& ,!%&
#23& C +))# 4.) '#!# & *# " 28&) .+) ' & " 3&) +&2# # 0S(.2# : " !(# G
#3#(\$#)# #."&+#" 0#+ (" &5! & ("#28)& " 2 " A - R f
>\?B

+ 0&(" !# " C "G0(0# 0&(3 (0 &(# # 5 , ' # ' !0."S(# *. #)# '&!
.2"!# &(&*!#9 # '&) ! ! #2 E#)# + 4.#24. ! ! * %&)# 1!#) '&F \$%&
.2"!# &(&*!19 0#)& 9D*#)& 2&0#2 0&28)&())# 2&0#2 E#\$%&)# 2 %&)&
!#() 3# & #(.D(&)# 3 D0.2# 5 2 #! '# ! " !)# + # * + .2"!# &(&*!19 0# #
#*.28#) 5 , ' # G) ! 0 &(#)# # " ! #3G)# 0#3)# #5)&+ (#2)& '#!/(4. + #
8 '1" 0& #"G & 9&0&) 0&28 "#) (" ! +G&)&) # ' !# \$%&)& '#!/(4. + # &.
) 0&2 \$L) 2D4.)& "#+5G+ '&) + ! +&("& !#)&)# + + # 9& !+ # A R
R e >_B ' #!)& . &)# .2"!# &(&* !#9 # + (+ E#! & ! 0&
(! (")# 5 , ' # ' !0."S(# A >\WB & +G"&)& (%& G ("&)
0&+ '2 0#\$L

< ? ? , ' # *. #)# '& ! 2# '#!& 0&' #

'#!" !)# (" !&).\$%&)#)& 0&' # (# '1" 0# 3 " ! (1! # (& (D0 &)#)G0#)#
) >\Z= . . & " +)& (" (9 0#)& (#)G0#)# .5 4. (" C +))# 4.
"& ! (#!# + (& , ! # .#) 0#\$L) #*(, " 0# " !# !." 0# (" ! & ' ! (0 '#
9# "& ! 4. F. " 9 0# + "#2 :#(%& "%& (02. & 0#1" ! '&.0& (3# 3&)# "G0(0#
#2 #)& C *!#() 0#'#0)#) '!&3! + #*(+ #2" #) 9 (\$%& # &5" (\$%&
) ! 0 &(#)#) #+& " !#) " 0)&) 31! & , !*%& AH R >\=B
2# '#!& 0&' # G .+ # "G0(0# + (+ # + (" (3# 3# 4. ' !+ " # 3 .#2 E#\$%&) , !*%&

)

("!(&)# 0#3)#) #5)&+ (#2 4. '#+ ("& ." 2 E#)&).!#(" 2##!& 0&' # 9&!(0
#& 0 !!* %& .+ # + #* +)& (" ! & !)# 0#3)#) #5) &+ (#2 A ^ <==WB

& 0# & ' 0D9 0&)# 2##!& 0&' # '#!# !#2 E#\$%&5 , ' # 8 '1" 0#
3 ! 9 0#- .+ #0 & #+'2& #& 9D*#)& 3 D0.2# 5!2 &."!& ,!*%& #5)&+ (#)
#(+ #) ' 4. (& ' & ! " # " & 4. ' !+ " # & & ' !#)& ! !#2 E#! 5 , ' #) 9& !+ #
#0. !#)# + 2 L 9&0# & .) 9. #)& '#!/(4. + # 5 + 0&+& + 9D*#)& 0&+ ' 4. (&
3&2.+ Af e >\\WB 2G+) & & + ' ! * &) " +G"&)& ! 4. ! 0. ! "& ' # \$ &)
" + ' & ' !+ " # 0&28 " #) + # " !#2 * (9 0#" 3& A R R
<==<B ' ! & ' 0 # #) " 0\$%& ' ! 0&0)# 8 + & ! !#* # .+ #)# ' ! (0 ' # 0&+ ' 2 0#\$L
! 2#0 & (#)# 0&+ # 5 , ' # 8 '1" 0# # !#2 E#\$%& +) # " #) 8 + & " # # ' & ! + &
) 0&+ ' ! %&)& 2&0#2 & . + ' ! * &) 2 " !&0&#*.2#\$%& A " #2 <==WB +
0&(" !# # ! ")# #) 3#(" #* ()& +G"&)& %& ' ! + # ! # + (" & 0. " &)& 4. '#+ ("&
5 + 0&+& # (0)#)) " ! (# + ("& ' 0D9 0& & #0 & (0&+ ' 2 "& C : ' 2& !# \$ %&
#5)&+ (#2 Af e >\\WR ^ <==WB 0&+) "#4. '#!# (0#'#0)#)
(" ! 3 (\$%& (& 2&5& 4. !)& 8 '1" 0&) 5&3 (& ' 2# 3 # '#!#2&+5#!) ! " #
A f " #2 <=>=B

("! & " ' &) 5 , ' # 8 '1" 0# ' & ! 2##!& 0& ' #) 0! " # 9 * . !# + #
5 , ' # ' ! 0. " S(# A >\\Z?R R f R f >\\KWR
" #2 <==\\B # 5 , ' # !#2 E#)# 0&+ ' (\$# 2##!& 0, ' 0#
A R >\\?R R R <==<B # ! 0\$%&
) 9!#*+ ("& 8 '1" 0& + & ("& !#)# ' & ! 3)& 2##!& 0&' # A " #2 <==WR
f " #2 <=>> - * . !# ?B & ' !+ !& ' !& 0) + ("& & ()& 0, ' & & & . " !&
(" !&).E)& (# 0#3)#) # " !#3G) .+ # 0S(.2# '#!# + & ("& !# ! # + # (' .2#\$%&) #*.28#
A " #2 <==\\B & .) 0&(F. ("& " !& 0# ! " Y0S(. 2#) 5 , ' # A >\\Z?B
& * .)& %& . " 2 E#)&)& ' & ! " # 7 .+ '#!# # (" !&).\$%&)& ()& 0, ' & & & . " !&
' # !# # ' (\$# 2##!& 0, ' 0#) 5 , ' # A R >\\?B # & 8#F#
) ' & (5 2)#)) .+ * . # '#!# ' # #* +)# ' (\$#) 5 , ' # (& ()& 0, ' & # ' (#
.+ ' & ! " #2 G (0 1! & A " #2 <==<B # " ! 0 !# + &)#2)#) 5 , ' # ' & !
2##!& 0&' # %& . " 2 E#)& " ! / ' & ! " # 7 .+ '#!# & ()& 0, ' & &) + # '#!#
' # #* +) .+ ' (\$#) .+ # " & . !# " # 9& !+ # + & ("& !#- # ! 0\$%&) .+
9!#*+ ("&)& 5& !)& 8 '1" 0&)) # (0 %& 0&+ # " & . !# # " G # 2 " !& 0&#*.2#\$%&)#
9 !)# 0 ! M ! * 0# A " #2 <==WR f " #2 <=>>B
2G+)# 0&+ ' 2 0#\$L (! (" # & ' !& 0) + ("&) 5 , ' # A R
e R >\\W<R >_<R " #2 < ==\\R f " #2

2011), minimizadas pelo controle visual dos procedimentos laparoscópicos e pela possibilidade de inspeção e correção precoce de hemorragias excessivas (COSTA et al., 2005), estão inclusas as complicações relacionadas com a própria abordagem laparoscópica. Neste contexto, são descritos o embolismo por ar, distúrbios ácido-base induzidos por CO₂, redução do débito pulmonar por compressão diafragmática (KERWIN, 1995), pneumotórax, perfuração de vísceras durante a introdução dos conjuntos trocar/cânula, enfisema subcutâneo (COSTA et al., 2005) e introdução do endoscópio no saco omental (PHILLIPPO, 1973; HIDIROGLOU; IVAN, 1993).

Figura 3. Biópsia hepática assistida por laparoscopia em ovinos. (A) Imagem endoscópica da introdução da agulha Tru-cut na cavidade abdominal e no parênquima hepático. (B) Imagem endoscópica do posicionamento da pinça de Blakesley para apreensão da borda hepática. (C) Imagem endoscópica da ressecção de fragmento hepático com tesoura de dissecação. (D) Lâmina profunda do omento maior sobre a superfície do lobo direito do fígado (NÉSPOLI et al., 2010).

2.4. BIÓPSIA ESPLÊNICA

O baço é um órgão hematopoiético cuja principal função é a filtração do sangue através do seu sistema sinusoidal (VALLI, 2007), sendo responsável pela estocagem de

plaquetas e eritrócitos maduros, pela maturação de reticulócitos, fagocitose e destruição de eritrócitos, plaquetas e leucócitos e hematopoiese extramedular (FRY; MCGAVIN, 2009), além de atuar no metabolismo do ferro (CHRISTOPHER, 2003). A natureza destas funções faz com que o baço tenha sua aparência macro e microscópica afetadas por uma grande variedade de doenças sistêmicas inflamatórias e doenças hematológicas (VALLI, 2007).

Diferentes alterações podem comprometer o baço. Dentre elas, os distúrbios de crescimento, anormalidades circulatórias (hematoma, congestão, trombose, infarto e inflamação) e as neoplasias, primárias ou metastáticas, são os principais exemplos (VALLI, 2007). Todos estes processos, sozinhos ou combinados, podem resultar em aumento esplênico uniforme ou nodular (FRY; MCGAVIN, 2009).

Por meio da ultrassonografia é possível avaliar o tamanho e o parênquima hepático, detectando a presença de lesões difusas ou focais, sólidas ou cavitárias. O ultrassom também pode guiar as biopsias aspirativas ou Tru-Cut (Figura 4), facilitando a obtenção de amostragem de lesões focais ou auxiliando a determinar a causa de esplenomegalia difusa (NYLAND; MATTON, 2005).

Alguns autores relatam que as biopsias aspirativas de baço são mais indicadas que as Tru-Cut, devido ao risco de hemorragias, tanto nos homens, quanto nos animais (CHRISTOPHER, 2003). Nyland; Matton (2005) indicam para a realização da Biópsia Aspirativa por Agulha Fina (BAAF), o método indireto ou à mão livre, utilizando agulhas de 20 a 22 gauge. Já LeBlanc et al. (2009) indicam agulhas de 22 a 25 gauge. Em lesões focais menores, os usos de um guia de biopsia e de uma agulha espinhal contribuem para um posicionamento preciso da agulha. Em lesões de massas esplênicas sólidas, as biopsias Tru-Cut são úteis e podem ser realizadas com segurança, quando o aspirado não for conclusivo (NYLAND; MATTON, 2005).

Os clínicos manifestam muitas preocupações com as possíveis complicações da aspiração do baço, especialmente a hemorragia. Mas estas complicações também dependem do tamanho e número de amostras obtidas, da probabilidade de dano aos vasos, da natureza da patologia, bem como a localização da lesão. No entanto, não há evidências que o sangramento seja tão importante ao ponto de limitar a técnica por complicações em cães, gatos ou seres humanos (CHRISTOPHER, 2003). Soderstrom (1979) aspirou mais de 1000 fígados humanos com agulhas de 22 gauge ou com menor diâmetro, porém não observou nenhuma complicação hemorrágica. Segundo Chou et al. (2008), a incidência de hemorragia esplênica pós-biopsia está entre 0% e 2%.

Christopher (2003) também relata que BAAF realizadas em 28 cães e cinco gatos não observaram nenhum tipo de complicação. No que se refere aos pequenos ruminantes, a realização de biópsia esplênica ainda não é bem relatada na literatura.

Sempre é recomendado avaliar os parâmetros de coagulação antes da realização de qualquer tipo de biópsia esplênica, pois a biópsia ou aspirado de baço geralmente são indicados em animais com doenças hematológicas, que muitas vezes estão associadas à trombocitopenia. Além disso, embora haja um risco teórico de semear células tumorais ou propagação de organismos com aspiração por agulha fina, não há nenhuma evidência de que isto resultou da aspiração do baço nos animais (CHRISTOPHER, 2003).

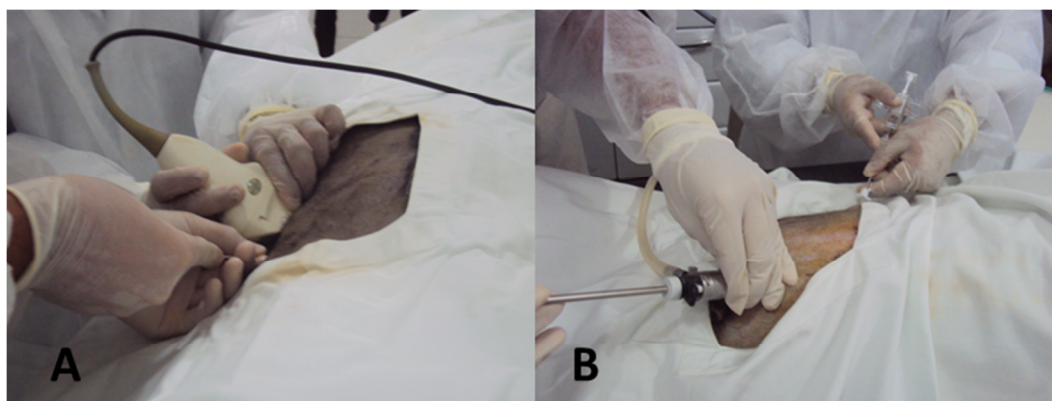


Figura 4. Execução das técnicas de biópsia esplênica percutânea guiada por ultrassonografia ou assistida por laparoscopia em caprinos. A. Posicionamento da agulha e transdutor durante realização da técnica de ultrassonografia. B. Acesso laparoscópico pela via transumbilical e posicionamento da agulha para realização da biópsia em caprinos (Fonte: LFCR).

2.5. BIÓPSIA TETICULAR

A avaliação do desempenho reprodutivo em machos de diversas espécies tem sido realizada através de exames físicos, ultrassonográficos, avaliação seminal e ensaios hormonais (LEONG ; MATTHEWS, 1982; LOPATE; THERELFALL; ROSOL, 1989). Adicionalmente, técnicas de exames complementares são frequentemente necessárias para determinar a severidade, etiologia e prognóstico de alterações reprodutivas (LARSEN, 1977).

A biópsia testicular vem sendo utilizada em estudos da fisiologia e patologias reprodutivas, em animais domésticos e silvestres, por ser um método conservativo da capacidade reprodutiva dos animais, não apresentando efeitos deletérios na produção

espermática em longo prazo (LOPATE; THERELFALL; ROSOL, 1989; ATTIA et al., 2000). Este método é uma excelente alternativa à castração ou hemicastração, uma vez que fornece material suficiente para a análise microscópica representativa do testículo, pelo fato de não se observarem diferenças significativas na composição do parênquima testicular entre as diferentes regiões do mesmo (AMANN; SCHAMBACHER, 1983).

O procedimento de biópsia testicular pode ser útil no diagnóstico de aplasia de células germinativas, hipoespermatogênese, inflamação, neoplasias (LOPATE; THERELFALL; ROSOL, 1989), infertilidade imunomediada (OLSON; SCHULTHEISS; SEIM, 1992), anormalidades cromossômicas sexuais e distúrbios de diferenciação sexual (WONG; STRAUS; WARNER, 1973). Além disso, pode ser utilizado na avaliação da fisiologia reprodutiva masculina (FRENEAU et al., 1989; GUIMARÃES et al, 1989) e mensurações hormonais (BLANCHARD; VARNER, 1996).

A biópsia testicular é recomendada para diagnóstico de azoospermia nas diferentes espécies domésticas (FINCO, 1974; ATTIA et al., 2000), podendo fornecer informação adicional sobre o estado espermatogênico de animais inférteis, assim como a etiologia, o tratamento e o prognóstico (LOPATE; THERELFALL; ROSOL, 1989). Esta técnica, entretanto, pode ocasionar lesões no parênquima testicular que poderiam afetar a qualidade espermática e a fertilidade dos animais (HEDGER, 1997). As complicações potenciais da biópsia são danos que provocam interrupção local da espermatogênese ou aderências que podem impedir a termorregulação testicular. Estas complicações têm feito com que a técnica de biópsia testicular seja pouco aceita, tendo assim uso limitado (ATTIA et al., 2000).

Sendo um método direto de avaliação do órgão afetado, a técnica de biópsia permite na maioria dos casos verificar a extensão da lesão, quando presente (LEVIN, 1979). Diferentes técnicas de biópsia testicular foram desenvolvidas, com vantagens e desvantagens (BLANCHARD; VARNER, 1996; SARTORI et al., 2002a,b). Dentre essas se destacam: biópsia aberta ou incisional, biópsia por punção com agulhas Tru-Cut (Figura 5) e punção aspirativa com agulha fina, sendo a primeira muito invasiva e a última pouco invasiva, mas com poder de diagnóstico limitado. Quando realizadas de maneira inadequada, especialmente as técnicas aberta ou incisional, podem ocorrer complicações como hemorragia, hematoma, calcificação, fibrose, inflamação, infecções, reações autoimunes e degeneração do epitélio germinativo e dos túbulos seminíferos

(COHEN et al., 1984; LOPATE; THERELFALL; ROSOL, 1989; SARTORI et al., 2002a).



Figura 5. Execução das técnicas de biópsia testicular percutânea com agulha Tru-Cut em caprinos. A incisão através da pele escrotal e túnicas permite a identificação de seus vasos sanguíneos e o desvio dos mesmos no momento da inserção da agulha de biópsia (Fonte: LFCR).

3. JUSTIFICATIVA

A obtenção de animais transgênicos expressando moléculas biologicamente ativas, como o hG-CSF, traz consigo a preocupação com a potencial efeito *in vivo* da proteína recombinante. Nesse contexto, quando se refere ao controle do promotor, a expressão ectópica do gene exógeno tem sido relatada na literatura (SERIZAWA et al., 2000; YUN et al., 2012), podendo ser a principal causa da ação biológica *in vivo* da proteína recombinante no animal transgênico.

Em se tratando de transgenia, muitos estudos que visam à avaliação das mudanças fenotípicas oriundas da inserção aleatória do transgene realizam avaliação da expressão em diferentes órgãos (HUANG et al., 2012; SEROVA et al., 2012). Para esse fim, a coleta das amostras teciduais é realizada posteriormente a eutanásia dos animais (KONG et al., 2009; YIN et al., 2012). Além disso, no modelo caprino para transgênese, assim como nas demais espécies animais de produção, a avaliação dos diversos tecidos é dificultada, ou mesmo inviabilizada, devido ao restrito número de exemplares existentes. Assim, tendo em vista a importância de um animal transgênico, faz-se necessária a busca por alternativas metodológicas que possa viabilizar o estudo da expressão gênica em diferentes tecidos sem a necessidade da realização da eutanásia animal.

A medicina veterinária diagnóstica é, hoje, um conglomerado de especialidades direcionadas à realização de exames complementares no auxílio ao diagnóstico, com impacto nos diferentes estágios da cadeia de saúde animal: prevenção, diagnóstico, prognóstico e acompanhamento terapêutico. Nesse âmbito, os métodos de diagnóstico por imagem estão em constante renovação e incorporação de novas tecnologias, tudo em favor da saúde e do bem estar dos animais (CAMPANA et al., 2009).

Em ruminantes, as técnicas de ultrassonografia e laparoscopia são de uso mais frequentes e tornam-se necessárias para a realização de uma investigação diagnóstica acurada. Além disso, a associação dessas técnicas à realização de biópsias teciduais tem promovido informações ainda mais específicas de determinadas patologias e condições fisiológicas. Nesse âmbito, a utilização de técnicas de imagens associada com estudos de expressão gênica em animais geneticamente modificados pode trazer informações importantes no estudo da fisiologia dos mesmos e quando associado com biópsias teciduais torna-se essencial para viabilizar a investigação da expressão do transgene.

4. HIPÓTESE CIENTÍFICA

- Técnicas de biópsia minimamente invasivas são ferramentas eficientes para obtenção de amostras teciduais de caprinos visando estudos de expressão gênica;
- Caprinos transgênicos da linhagem 10M não apresentam expressão do Fator Estimulante de Colônia de Granulócitos humano (hG-CSF) nos seguintes órgãos: fígado, baço e testículo.

5. OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a aplicação de diferentes técnicas de biópsia para obtenção de amostras teciduais de caprinos visando estudos de expressão gênica.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adequar os procedimentos de biópsias teciduais de fígado, baço e testículo para aplicação na espécie caprina;
- Avaliar acesso laparoscópico aos órgãos da cavidade abdominal pela via transumbilical;
- Avaliar janela acústica para obtenção de imagens adequadas para a realização de biópsia percutânea guiada por ultrassom em fígado e baço;
- Comparar as técnicas de laparoscopia e ultrassonografia para guiar procedimentos de biópsia hepática e esplênica;
- Estabelecer uma metodologia de biópsia testicular percutânea com agulha Tru-Cut;
- Avaliar a recuperação animal após os procedimentos de biópsia;
- Identificar possíveis alterações ecoestruturais dos órgãos biopsiados;
- Obter amostras teciduais de fígado, baço, e testículo viáveis para o isolamento de RNA mensageiro de qualidade e à síntese de cDNA;
- Detectar e quantificar de forma acurada e precisa os transcritos de hG-CSF em fígado, baço e testículo de caprinos transgênicos utilizando qRT-PCR.

Capítulo 1

Periódico: Research in Veterinary Science; Submetido em 08/11/2013

**Laparoscopic and ultrasound-guided methods to collect liver and splenic biopsies
for gene expression analysis in transgenic goats**

C.H.S. Melo^a, F.C. Sousa^a, R.I.P.T. Batista^a, D.J.D. Sanchez^a, J.M.G. Souza-Fabjan^a,
V.J.F. Freitas^a, L.M. Melo^a, D.I.A. Teixeira^{a*}

^aLaboratory of Physiology and Control of Reproduction, School of Veterinary
Medicine, State University of Ceará, Av. Dedé Brasil 1700, Fortaleza, 60714-903,
Brazil.

*Corresponding author: Dárcio Ítalo Alves Teixeira
Universidade Estadual do Ceará/Faculdade de Veterinária
Av. Dedé Brasil, 1700 – Fortaleza-CE, Brazil 60714-903
Fax: +55 85 31019840
Phone: +55 85 31019861
E-mail: darcioitalo@yahoo.com.br

Abstract. The present study aimed to compare laparoscopic (LP) and ultrasound-guided (US) biopsy methods to obtain either liver or splenic tissue samples reliable for gene expression analysis in transgenic goats. For this, tissue samples were collected from hG-CSF-transgenic bucks and submitted to real-time PCR aiming endogenous genes (SP1, BAFF and GAPDH) and transgene (hG-CSF) amplifications. Both LP and US biopsy methods allowed to collect liver and splenic samples compatible with PCR procedures,

concerning sample weight (mg) and RNA yield ($\mu\text{g}/\text{mg}$ tissue). However, inspite of the number of attempst to achieve the tissue samples were similar ($P>0.05$), LP presented a longer procedure time than US method ($P=0.03$). Finally, no transgene transcripts were detected neither in spleen nor in liver samples. For phenotypic characterization of a transgenic line, investigation of ectopic expression in goats can be successfully made by LP or US biopsy avoiding the traditional approach of euthanasia of a specimen.

Keywords: Biopsy, Ultrasonography, Laparoscopy, Tru-Cut, PCR, Goat.

1. Introduction

Biotechnological applications of animal transgenesis are diverse and include the production of pharmaceuticals, generation of human and animal disease models, livestock improvement and gene expression studies (Houdebine, 2000). Several experiments have shown that the level and specificity of transgene expression cannot be easily predicted. DNA introduction by microinjection generates lines of animals expressing the foreign gene at different levels (Clark et al., 2000). In light of the recombinant protein being produced in the target tissue, the potential for systemic biological activity in the transgenic animal is a possibility and has previously been reported (Ko et al., 2000; Kim et al., 2006). This side effect can be generated by unexpected events such as ectopic transgene expression or non-exocrine pathway of the protein from the target-tissue to the blood (Rülicke and Hübscher, 2000; Dunn et al., 2005). In this context, investigation of ectopic expression in different tissues/organs is an important and unavoidable step to phenotypic characterization of the transgenic animals (Huang et al., 2012; Serova et al., 2012).

In a wide range, investigations of ectopic expression in transgenic animals are performed with tissue samples collected after euthanasia of the specimens (Kong et al., 2009; Yin et al., 2012). However, this strategy has little relevance for application in livestock transgenic animals which are usually limited in number. Thus, development of alternative tissue-collection methods to avoid euthanasia of livestock transgenic animals is necessary.

The percutaneous biopsy is a promising approach because is a widely well-established and routinely used procedure besides being slightly invasive which leads to the low morbidity and small risks to the patient (Yu et al., 2001; Appelbaum et al., 2009; Saloura et al., 2010). Despite the wide variation of the clinical practice concerning

technical issues (Duarte et al., 2009; Akkan et al., 2010; Néspoli et al., 2010; Kassem et al., 2011) the traditional approach is the blind percutaneous needle biopsy. Concerning intra-abdominal organs, such as liver and spleen, an important issue is to safely obtain diagnostic-reliable tissue samples without performing laparotomy (Zinzani et al., 1998; Lipp et al., 2010). In these cases, percutaneous biopsy can successfully be assisted by image-based techniques such as ultrasound or laparoscopy. Therefore, the aim of the current study was to compare laparoscopic (LP) and ultrasound-guided (US) biopsy methods to collect liver and splenic tissue samples reliable for gene expression analysis in transgenic goats. For this, we used first generation (F1) male specimens of a transgenic line for hG-CSF (human Granulocyte Colony-Stimulating Factor) milk expression, previously produced by our group (Freitas et al, 2012). Also, samples were analyzed concerning appropriateness of both size and quality for real-time PCR purposes.

2. Materials and methods

2.1. Animals and management

The study was performed in the facilities of the Laboratory of Physiology and Control of Reproduction (LFCR), located in Fortaleza, Brazil, at 3°47'38" S (latitude) and 38°33'29" W (longitude). All animal protocols were approved by the Animal Ethics Committee of the State University of Ceará (CEUA/UECE N° 12237087-2) and Brazil's Biosafety Technical National Committee (CTNBio 228/06).

The experimental animals were six Canindé male goats, two of which were transgenic (T) for hG-CSF milk expression (F1 specimens of the 10M line described by Freitas et

al., 2012) and four were non-transgenic (NT). The bucks were 2-3 years old and showed body weight of 41.2 ± 0.9 kg and body condition score 3.0 ± 0.6 (1-5 scale).

All animals were maintained under similar feeding and management conditions. Briefly, the males were raised under an intensive production system, receiving Tifton (Cynodon dactylon) hay in stalls. The diet was supplemented with commercial concentrate (18% crude protein). Water and mineralized salt were available ad libitum. It is noteworthy that before the start of the experiment all animals were monitored and clinically evaluated.

2.2. Biopsy

Each animal was subjected to biopsy procedures either ultrasound-guided or by laparoscopy, at different moments. Both biopsy methods were randomly performed at intervals of 15 days to obtain liver and splenic samples. In each procedure, the biopsies were repeated to obtain three tissue fragments of appropriate size to perform the subsequent steps. The time for performing each procedure, the number of attempts for biopsy and weight of the obtained fragment were recorded. Two NT bucks were not subjected to biopsy procedures being used as controls on behavioral assessments.

2.2.1. Ultrasound-guided biopsy

All procedures for ultrasound biopsy were performed under strict aseptic conditions. The bucks were deprived of feed and water for 24 h prior to ultrasound-guided biopsy. All animals were subjected to dissociative anesthetic protocol which consisted in the administration of 0.2 mg/kg b.w. of xylazine hydrochloride (Kensol, König, Avellaneda, Argentina) i.m. associated with 10 mg/kg b.w. of ketamine hydrochloride (Vetanarcol

5%, König, Avellaneda, Argentina) i.m. and infiltrative local anesthesia with 2% lidocaine (Lidovet, Brasvet, Rio de Janeiro, Brazil). For both organs, biopsy was guided by B-mode ultrasound (Pie Medical, Maastricht, Netherlands), connected to 3.5 MHz convex transducer. To obtain hepatic fragment, the animals were contained in the right lateral position and ultrasound of the liver tissue carried from the 7th to 12th intercostal space on the right flank. For splenic biopsy, the animals were placed in the left lateral position and sonographic identification of spleen carried from 8th to 12th intercostal space of the left flank. The biopsy sites were surgically prepared and the transducer positioned perpendicular to the ribs. A coaxial semi-automatic biopsy system (Achieve, Cardinal Health, Ohio, EUA) attached to the Tru-Cut type needle (14 G x 20 cm x 20 mm) was introduced crossing the intercostal muscle and thus reaching the organ of interest. A biopsy route avoiding critical structures and major vessels was selected under ultrasound guidance. Tissue samples were weighed on an analytical balance and immediately stored at -80° C until RNA extraction.

2.2.2. *Laparoscopic biopsy*

The bucks were deprived of feed and water for 24 h prior to laparoscopy. All LP biopsy procedures were performed under strict aseptic conditions. Anesthesia was induced by administration of 20 mg/kg b.w. of thiopental sodium (Tiopentax 2.5%; Cristália, São Paulo, Brazil) i.v.; 5 min after, the goats were placed in dorsal recumbency with their legs tied to the surgical table, and 10% lidocaine spray (Xylestesin, Cristália, São Paulo, Brazil) was administered in the oropharynx. The animals were intubated with endotracheal tube with cuff (Endotracheal Tube Solidor, Medic International Trading, Tianjin, China). Anesthesia was maintained by continuous

infusion of 3% isoflurane (Isofrine; Cristália), using an inhalational system with medical oxygen (HB Hospitalar, São Paulo, Brazil). The airway pressure was maintained within 20 cm of water. The tracheal intermittent positive pressure of 10 cm of water, with oxygen flow of 1 L/min, an inspiration: expiration (I: E) of 1:2, and a respiratory rate of 12 mpm.

Ventral midline was taken as a basic laparoscopic surgical approach and pneumoperitoneum was conducted according to the technique described by Liem et al. (1994) and Kassem et al. (2011). A laparoscope (Storz, Tuttlingen, Germany) of 5 mm of diameter, 35 cm length, straight forward Hopkins with 0° viewing angle was used. Three ports were used; one optical and two 5 mm secondary ports including one operating port and one assisting port. The laparoscope passed through the cannula of the primary port into the peritoneal cavity. A systemic examination of the entire abdominal cavity was done by video camera connected to the eye piece of the laparoscope and the images were transferred through the control unit to the TV monitor. A 360° scan was performed for orientation and to determine if any trauma occurred by the cannula insertion. Secondary ports were inserted to allow the passage of accessory instruments used for manipulation of abdominal viscera. To perform liver and splenic biopsies by laparoscopy, tertiary ports were inserted in locations that provided optimal access to the organ of interest. They were inserted whereas the laparoscope was removed, allowing to better evaluate the trocar entering into the abdominal cavity. After the observation of the desirable organ (either liver or spleen), the same coaxial semi-automatic biopsy system attached to the Tru-Cut type needle was used, directing the needle above and perpendicular to the organ of interest in order to perform the puncture and fragment removal. Before cannula removal, pneumoperitoneum was removed by gentle massage

and compression of the abdomen. Biopsy samples were weighed on an analytical balance and immediately stored at -80° C until RNA extraction.

2.3. Clinical examination and post-operative care

Before the start of the experiment and during the eight experimental weeks all animals were daily monitored. After performed the biopsy procedures, the bucks were examined (every 8 h) during the first day post biopys to verify any signal of pain, such as curvature of the back, difficulty of moving, and decreased appetite (Mellor et al., 2000). In order to quantify the intensity of the pain intensity, a numerical scale varying from 0 to 2 (0: signal absent, 1: moderate signal manifestation, 2: intense signal manifestation) was attributed to each pain signal. Futher, the pain intensity (PI) for each animal was represented by the sum of the values attributed to all pain signals and could reach a maximum degree of 6 (PI=0-2: absent to mild pain, PI=2-4: mild to moderate pain and PI=4-6: moderate to severe pain).

Additionally, the organs were submitted to ultrasonography before the procedures (T0) and at 24 h (T24) and 48 h (T48) after the biopsies, aiming to monitor morphological recovery and to access potential echostructural changes. Simultaneously, measurements of rectal temperature (° C), heart and respiratory rates (bpm) and ruminal movements (n°/3 min) were also recorded.

2.4. RNA extraction and reverse transcription

Total RNA was prepared in triplicate from each sample using the RNeasy mini kit (Qiagen Science, Germantown, MD, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 600 µL lysis buffer was added to the frozen sample and submitted to 2 cycles of 6.500 Hz in a Precellys 24 homogenizer (Precellys, Bertin Technologies, Montigny-le-

Bretonneux, France). The lysates were diluted 1:1 with 70% ethanol and transferred to a spin column. After on-column DNase treatment, total RNA was eluted with 50 μ L RNase-free water. The reverse transcription was performed with 1 μ L of Improm II (Promega, Madison, WI, USA) in buffer, combined with 0.5 mM of each dNTP (Promega), 40 U of RNaseOUT (Invitrogen, Grand Island, NY, USA), and RNase-free water to make a final reaction volume of 20 μ L. Reverse transcription was performed at 42° C for 60 min, followed by enzyme inactivation at 70° C for 15 min. The first strand cDNA was then stored at –80° C for later use as template in real-time PCR amplifications. Negative controls or RT blanks were prepared under the same conditions, but with no inclusion of reverse transcriptase. RNA concentrations were accurately accessed by fluorimetry using the Qubit fluorimeter (Invitrogen, USA) and Quant-iT RNA Assay Kit (Invitrogen, USA), following the manufacturer's instructions. The yield of total RNA per tissue sample was expressed as μ g RNA/mg tissue.

2.5. Real-time PCR

The PCR amplifications were performed in a Master-Cycler EP Realplex 4 S (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). The cDNA of each group run in triplicates for target and reference genes. For liver, the target gene was Sp1 transcription factor (SP1) and, for spleen, the B-cell activating factor (BAFF). The reference gene was glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). The hG-CSF expression was analyzed in both organs for T and NT animals. Each reaction consisted of 20 μ L total volume containing 10 μ L 2 $\times$ Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 0.3 μ M of each primer and 0.5 μ L cDNA. The qPCR protocol comprehended an initial incubation at 95° C for 10 min, followed by 40

cycles of an amplification program of 95° C for 15 s, 55° C for 15 s and 60° C for 30 s. Fluorescence data was acquired during the 72° C extension steps. Threshold and quantification cycle (Cq) values were automatically determined by Realplex 2.2 software (Eppendorf AG), using default parameters. Melting procedure (55–95° C, starting fluorescence acquisition at 55° C and taking measurements at 10 s intervals until the temperature reached 95° C) was performed to assess amplification specificity. To determine the linearity and the efficiency (E) of the PCR amplifications, standard curves were generated for each gene using serial dilutions of a cDNA. The corresponding real-time PCR efficiencies were calculated from the given slopes (S) of the standard curves, according to the equation: $E=10^{(-1/S)} - 1$. Linearity was expressed as the square of the Pearson correlation coefficient (R^2).

2.6. Statistical analysis

All of the results are given as the mean values $\pm$ SEM and P values less than 0.05 were considered to be statistically significant using Prism 6.0 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). For normality, the data were subjected to Kolmogorov-Smirnov test. Parametric variables related to samples weight, time of procedure and RNA yield were subjected to one-way analysis of variance (ANOVA) and the averages compared by t-test. The number of attempts in biopsy procedures was subjected to Mann Whitney test. The relative quantification of the gene transcripts was performed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Livak and Schmittgen, 2001). The PCR signal was normalized against GAPDH transcript levels. The differences in relative abundance of specific transcripts were compared using the Mann-Whitney test.

3. Results

3.1. Technical issues and clinical aspects

The duration of food and water fasting was considered adequate for performing the procedure, and there was no visceral distension and regurgitation of food during the biopsy. Furthermore, the anesthesia employed in each technique and its association with lidocaine (local anesthesia) was considered appropriate since the bucks showed no clinical pain signals during the procedures. Regardless to the organ or technique used, none of 16 procedures performed caused any complications that could compromise bucks survival and welfare. All clinical parameters were maintained within the reference values for the species throughout the observation period and are summarized in Table 1. Concerning to liver biopsy, the indirect visualization of the organ parenchyma by US method was adequate to perform sample collection with minor difficulties and was specially improved when working at the 9th to 12th intercostal space. On the other hand, the LP method provided a clear visualization of the parietal face of the liver which was important to avoid multiple perforations and unnecessary bleeding. The main difficulties found during LP procedures were related to organ fixation with atraumatic grasper and to the need for maintenance of general anesthesia. Only the LP procedure allowed the observation of any potential bleeding in real-time. Regardless to the technique used it was possible to obtain liver tissue samples in all procedures. Concernin spleen biopsy, likewise to liver biopsy, US technique allowed an easy organ identification and collection of splenic fragments. Similarly to the liver LP biopsy, the procedure provided a total visual control of abdominal cavity. The same advantages and obstacle earlier reported for the hepatic biopsy by laparoscopy (3.1.2) were detected in the procedure for splenic biopsy. In both techniques used it was possible to obtain splenic tissue samples in all procedures

3.2. Liver biopsies

Both LP and US allowed to recover three tissue samples realible for real-time PCR analysis after a similar ($P>0.05$) number of attempts (1.1 ± 0.2 vs 1.1 ± 0.2 , respectively). Also, the two methods spent comparable ($P>0.05$) surgical times (13.7 ± 2.5 vs 10.0 ± 1.5 minutes, for LP and US procedures, respectively). After US procedure, 25% (1/4) of the animals presented PI = 1 (absent or mild pain) whereas the remaining animals (3/4) showed no signs of pain (PI=0). While performing LP biopsies, 50% (2/4) of the animals shown PI=1 and the other half presented PI=0. Furthermore, for both biopsy methods no echostructural alteration was observed throughout the experimental period (Fig. 1). Tissue samples collected by LP and US have similar ($P>0.05$) average weight (21.7 ± 1.3 and 23.2 ± 1.0 mg, for LP and US, respectively) and yielded the same ($P > 0.05$) total RNA amount (1.0 ± 0.3 vs 1.0 ± 0.5 μg RNA/mg tissue for LP and US, respectively). In addition, SP1 transcript levels did not differ ($P>0.05$) beteween LP and US samples (Fig. 2A). The PCR reactions were specific according to the melting analysis of the amplicons and no amplification product was observed for negative controls.

3.3. Splenic biopsies

Similar to that observed to liver, both LP and US allowed to recover three splenic samples realible for real-time PCR analysis after a similar ($P>0.05$) number of attempts (1.3 ± 0.4 vs 1.4 ± 0.3 , respectively). However, LP procedures had a mean operative time longer ($P=0.03$) than US (13.7 ± 1.3 vs 9.2 ± 0.9 minutes, respectively). Despite of this found, the highest PI was 1 for all animals in both methods. Thus, this PI value was calculated for 100% (4/4) of the animals submitted to LP and for 50% (2/4) of the

animals subjected to US. The remaining animals (2/4) showed no signs of pain after US. Furthermore, no echostructural alterations were observed in spleen neither after LP nor US biopsies throughout the experimental period (Fig. 3).

Regarding to fragment weight, LP and US biopsy methods have similar ($P>0.05$) yields (19.5 ± 1.9 vs 20.1 ± 1.1 mg). Additionally, total RNA yield were comparable (0.4 ± 0.04 vs 0.5 ± 0.05 μ g RNA/mg tissue for LP and US, respectively). Finally, no differences ($P>0.05$) were measured by real-time PCR in BAFF transcripts between splenic samples achieved by LP and US (Fig. 2B). Similar to described before for SP1, the PCR reactions were specific and no amplicons was observed in negative controls.

3.2. Gene expression

It is noteworthy that transcript levels of hG-CSF were neither detected in spleen nor liver tissues, suggesting no ectopic expression in these organs (Fig. 4). As expected, amplification was not observed for the samples which reverse transcriptase enzyme was not added (negative controls).

4. Discussion

It was possible to successfully perform liver and splenic biopsy either ultrasound-guided or by laparoscopy. Both methodologies allowed to obtain tissue samples without affecting animal welfare and are feasible for molecular studies. In goats there are few reports describing biopsy techniques in soft tissues (Duarte et al., 2009; Kassem et al., 2011). In ruminants, most of the studies have been conducted from variations of the percutaneous biopsy technique (Harvey et al., 1984; Ferreira et al., 1996; Molgaard et al., 2012). However, ultrasound-guided (Lofstedt et al., 1988; Néspoli et al., 2010), or

laparoscopic biopsies (Phillippo, 1973; Duarte et al., 2009; Kassem et al., 2011) have been quite unexplored, even with their recognized accuracy and safety.

Liver biopsy resulted in lower (NS) average of surgical time for ultrasound-guided (~10 min) than by laparoscopy (13 min), demonstrating that the use of ultrasound besides less invasive, promoted some other benefits. The time duration reported in our study was lower than 23 min earlier obtained in goats subjected to liver laparoscopic biopsy (Duarte et al., 2009).

The average number of attempts to obtain a liver fragment was ~1.1 for both methods, similar to 1.0 (ultrasound-guided) and 1.1 (laparoscopy) described by Nespoli et al. (2010) which performed liver biopsy with the same needle as us, but in sheep. The Tru-Cut needle allowed the recovery of serial tissue samples. In our perspective, one of the main factors which contributed for the biopsy success was the semiautomatic mechanism of the needle cannula. This system reduced the need to repeat the technique for assuring the recovery of larger samples than those obtained with manual Tru-Cut needles (Hoope et al., 1986).

Regardless to the biopsy method used, liver samples presented uniform weight. Furthermore, the results obtained are consistent to those of percutaneous biopsy performed with the same type of needle (Harvey et al., 1984; Ferreira et al., 1996; N scoli et al., 2010). Confirming previous reports, the amount of blood observed from liver biopsy was considered clinically irrelevant (Fantinatti et al., 2003; Duarte et al. 2009), due to the favorable postoperative evolution. Furthermore, no alterations of physical examination parameters were observed (Table 1) and according to Pugh (2005), these data are considered physiological for the goats. Regarding to pain intensity in both methods, it was not detected any buck showing moderate and severe pain. Furthermore, the absence of ultrasound alterations after the procedure

demonstrating an organ with defined contours, homogeneous and hypoechoic echotexture corroborates with this affirmation (Fig. 1).

For splenic biopsy, the average surgical time for ultrasound-guided (~9 min) was lower than laparoscopy (14 min) ($P < 0.05$). Laparoscopic access to the organ via the transumbilical was difficult to perform considering the large amount of viscera overlapping the organ, thus resulting in a longer time to obtain the fragment.

In the current study, the average number of attempts to obtain a splenic fragment was ~1.4 for both methods. In a general way, splenic biopsy aspiration is more indicated than the Tru-Cut due to the risk of bleeding in men and animals (Christopher, 2003). However, our work demonstrated that in goats, the techniques used were safe and easy to perform, needing only few attempts to obtain a fragment.

The average of splenic fragments obtained was ~20 mg (ultrasound-guided and laparoscopy). Sample weight varies directly with the type and caliber of the biopsy instrument, however for splenic biopsy there are no reports in the literature describing the expected sample weight. Many concerns were expressed about the possible complications of the splenic biopsy, especially bleeding. However, these complications also depend on the size and number of samples obtained, of the probability of vessel damage, on the nature of the pathology as well as the location of the lesion. Just like dogs, cats or humans (Christopher, 2003) our results demonstrate that the amount of blood was not a limiting factor for the execution of splenic biopsy technique. The ultrasonography evaluations demonstrated that the organ remained with a homogeneous echotexture and hyperechoic compared with the cortical left kidney and liver (Fig. 2).

During the biopsy procedure, the behavioural changes might indicate pain (Dobromylskyj et al., 2000) and it is important to highlight that in the current study no behavioral changes were identified. In cattle, even though the cows received local

anesthesia during the procedure of percutaneous needle liver biopsy, they presented increased restlessness, head shaking and decreased rumination, possibly indicating pain (Molgaard et al., 2012).

SP1 transcripts were successfully detected in liver and no significant differences were observed between both biopsy methods. The precise knowledge regarding the tissue-specific and inducible expression of various members of the Sp/KLF family will elucidate its interactions within and outside the family. There is emerging evidence to indicate that SP proteins play a key role in regulating the mechanisms of nuclear signaling elicited by hormones other than insulin (Solomon et al., 2008). SP1 may be more directly involved in the regulation of insulin signaling via its role in regulating the transcription of insulin receptor (Fukuda et al., 2001; Copland et al., 2007).

Furthermore, a potential role of SP1 and related proteins in the metabolic consequences of hyperinsulinemia and obesity are associated to metabolic syndrome. The chronic hyperinsulinemia in type II diabetes is characterized by abnormalities of metabolism and energy homeostasis in the liver, adipose and skeletal muscle (Muoio and Newgard, 2006; Solomon et al., 2008).

In the current study, the BAFF transcripts were successfully detected in the spleen and were not found statistically significant differences between the two methods used biopsy splenic. The knowledge of the levels of expression of these transcripts is very important. Based on previous studies, BAFF is mainly produced by innate immune cells such as macrophages/monocytes, neutrophils, dendritic cells, activated T cells and malignant B cells, and by non-lymphoid cells like epithelial cells as well (Mackay et al., 2007; Mackay and Schneider, 2009). Several lines of evidence indicates that BAFF plays an important role not only in B-cell survival and tolerance, but also in B-cell maturation and diversification, including IgG and IgA class switching (Cerutti and

Chen, 2010). Moreover, it is now clear that BAFF can also modulate T cell function *in vitro* and *in vivo* (Mackay and Leung, 2006). Thus, BAFF plays an important role in humoral immunity. Most studies demonstrate that overproduction of BAFF is associated with human autoimmune diseases and B cell malignancies (Khan, 2009).

In the current study, hG-CSF transcript levels were neither detected in liver or spleen, indicating that the T goats have no ectopic expression in these organs. Tissue-specific secretion of hG-CSF into the milk of transgenic mice was ranged ~ 19–40 µg/mL. RT-PCR analysis of various tissues of transgenic mice demonstrated that hG-CSF expression was detected in only the mammary gland in the progeny of all founders (Serova et al., 2012). In general, the data obtained in this study show that the vector was able to provide correct tissue-specific hG-CSF expression.

Regarding the need of fasting prior to biopsy procedures, its importance has been emphasized by some authors (Duarte et al., 2009; Néspoli et al., 2010). One of the main problems derived from inappropriate fasting is the regurgitation of food during the biopsy. Sheep subjected to laparoscopy after fasting for 72 h and hydric for 24 h had regurgitation of rumen contents resulting from pneumoperitoneum and intravenous anesthesia with ketamine and acepromazine (Bittencourt et al., 2004). In our study, these complications were not observed due to the association between a time of fasting and anesthetic protocols appropriate for each procedure.

In conclusion, liver and spleen biopsies either ultrasound-guided or by laparoscopy were effective in obtaining a tissue fragment viable for studies of gene expression without compromising goat's health and welfare. Furthermore, the use of biopsy methods allowed demonstrating that the transgenic goats do not have ectopic expression in these organs, with no need of euthanasia. It is important to highlight that all experimental animals are still healthy until the moment.

References

- Akkan Cetinkaya, Z., Sezikli, M., Güzelbulut, F., Benek, Y.Z., Ozkara, S., Gökden, Y., Yaşar, B., Ovünç Kurdaş, O. 2010. Liver biopsy: ultrasonography guidance is not superior to the blind method. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases* 19, 49–52.
- Appelbaum, L., Kane, R.A., Kruskal, J.B., Romero, J., Sosna, J. 2009. Focal hepatic lesions: US-guided biopsy lessons from review of cytologic and pathologic examination results. *Radiology* 250, 453–458.
- Bittencourt, R.H.F.P.M., Silva, M.C., Moreira, V.M.S., Sousa, S.K.S.A., Colino, E.C.V. 2004. Observações sobre o uso de cetamina, acepromazina e halotano em ovelhas submetidas a procedimentos laparoscópicos. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária* 26, 150–154.
- Cerutti, A., Chen, K., 2010. Role of BAFF and APRIL in antibody production and diversification. In: Cancro, M.P. (Ed.), *BLyS Ligands and Receptors*. Humana Press, Pennsylvania, pp. 65–92.
- Christopher, M.M. Cytology of spleen. 2003. *Veterinary Clinical North American Small Animal* 33, 135–152.
- Clark, A. J., Burl, S., Denning, C., Dickinson, P. 2000. Gene targeting in livestock: a preview. *Transgenic Research* 9 (4-5), 263–275.
- Copland, J.A., Pardini, A.W., Wood, T.G., Yin, D., Green, A., Bodenburg, Y.H., Urban, R.J., Stuart, C.A., 2007. IGF-1 controls GLUT3 expression in muscle via the transcriptional factor Sp1. *Biochimica et Biophysica Acta* 1769 (11–12), 631–640.
- Dobromylskyj, P., Flecknell, P.A., Lascelles, D.B., Pascoe, P.J., Taylor, P., Waterman-Pearson, A., 2000. Pain assessment. In: Flecknell, P., Waterman-Pearson, A. (Eds.), *Pain Management in Animals*. W.B. Saunders, Glasgow, Scotland, UK, pp. 53–79.

- 446 Duarte, A.L.L., Cattelan, J.W., Bezerra, M.B, Vicente, W.R.R., Cordeiro, M.F. 2009.
447 Videolaparoscopic guided hepatic biopsy with tru-cut needle in goats. *Arquivo*
448 *Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia* 61, 12–19.
- 449 Dunn, D.A., Pinkert, C.A., Kooyman, D.L. 2005. Foundation Review: Transgenic
450 animals and their impact on the drug discovery industry. *Drug Discovery Today* 10
451 (11), 757–67.
- 452 Fantinatti, A.P., Daleck, C.R., Nunes, N., Alessi, A.C., Costa Neto, J.M., Vicenti,
453 F.A.M., Duque, J.C., Santos, P.S.P., 2003. Laparoscopy hepatic biopsy through
454 cauterization. *Ciência Rural* 33,703-707.
- 455 Ferreira, A.V., Van der Merwe, H.J., Slippers, S.C., 1996. A technique for obtaining
456 liver biopsies from mature sheep. *Small Ruminant Research* 22, 89-92.
- 457 Freitas, V.J.F., Serova, I.A., Moura, R.R., Andreeva, L.E., Melo, L.M., Teixeira, D.I.A.,
458 Pereira, A.F., Lopes-Jr, E.S., Dias, L.P.B., Nunes-Pinheiro, D.C.S., Sousa, F.C.,
459 Alcântara-Neto, A.S., Albuquerque, E.S., Melo, C.H.S., Rodrigues, V.H.V., Batista,
460 R.I.T.P., Dvoryanchikov, G.A., Serov, O.L. 2012. The establishment of two transgenic
461 goat lines for mammary gland hG-CSF expression. *Small Ruminant Research* 105, 105–
462 113.
- 463 Fukuda, H., Noguchi, T., Iritani, N. 2001. Transcriptional regulation of insulin receptor
464 gene promoter in rat hepatocytes. *Biochemical and Biophysical Research*
465 *Communications* 280 (5), 1274–1278.
- 466 Harvey, R.B., Lovering, S.L., Bailey, E.M., Norman, J.O., 1984. The influence of
467 multiple liver biopsies on hematologic and serum biochemical values of sheep. *Cornel*
468 *Veterinary* 74, 322-330.

- 469 Hoope, F.E., Hager, D.A., Poulos, P.W., Ekman, S., Lindgren, P.G., 1986. Comparison
470 of manual and automatic ultrasound guided biopsy techniques. *Veterinary Radiology*
471 27, 99-101.
- 472 Houdebine, L.M. 2000. Transgenic animal bioreactors. *Transgenic Research* 9 (4) 305–
473 320.
- 474 Huang, J., Xiong, Y., Li, T., Zhang, L., Zhang, Z., Zuo, B., Xu, D., Ren, Z. 2012.
475 Ectopic overexpression of swine PPAR α 2 upregulated adipocyte genes expression and
476 triacylglycerol in skeletal muscle of mice. *Transgenic Research* 21, 1311–1318.
- 477 Kassem, M.M., El-Gendy, S.A.A., Abdel-Wahed, R.E., El-Kammar, M. 2011.
478 Laparoscopic anatomy of caprine abdomen and laparoscopic liver biopsy. *Research in*
479 *Veterinary Science* 90, 9–15.
- 480 Khan, W.N., 2009. B Cell receptor and baffle receptor signaling regulation of b cell
481 homeostasis. *Journal of Immunology* 183, 3561–3567.
- 482 Kim, M.O., Kim, S.H., Lee, S.R., Kim, K.S., Min, K.S., Lee, H.T., Kim, S.J., Ryoo,
483 Z.Y. 2006. Transgene expression of biological active recombinant human granulocyte-
484 colony stimulating factor (hG-CSF) into mouse urine. *Life Sciences* 78, 9, 1003-1009.
- 485 Ko, J.H., Lee, C.S., Kim, K.H., Pang, M.G., Koo, J.S., Fang, N., Koo, D.B., Oh, K.B.,
486 Youn, W.S., Zheng, G.D., Park, J.S., Kim, S.J., Han, Y.M., Choi, I.Y., Lim, J., Shin,
487 S.T., Jin, S.W., Lee, K.K., Yoo, O. J. 2000. Production of biologically active human
488 granulocyte colony stimulating factor in the milk of transgenic goat. *Transgenic*
489 *Research* 9, 3, 215-222.
- 490 Kong, Q., Wu, M., Huan, Y., Zhang, L., Liu, H., Bou, G., Luo, Y., Mu, Y., Liu, Z.
491 2009. Transgene expression is associated with copy number and cytomegalovirus
492 promoter methylation in transgenic pigs. *PLoS ONE* 4, 1–10.

- 493 Liem, T., Applebaum, H., Herzberger, B., 1994. Hemodynamic and ventilatory effects
494 of abdominal CO₂ insufflation at various pressures in young swine. *Journal of Pediatric*
495 *Surgery* 29, 966–969.
- 496 Lipp, M.J., D’Souza, L.S., Clain, D.J., Bodenheimer, H.C. Jr., Min, A.D. 2010. Trends
497 in the indication and method of liver biopsy for hepatitis B and C. *Digestive Diseases*
498 *and Sciences* 55, 2971–2976.
- 499 Livak, K. J., Schmittgen, T. D. , 2001. Analysis of relative gene expression data using
500 real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, pp. 402–408.
- 501 Lofstedt, J., Schelling, S., Stowater, J., Morris, E., 1988. Antemortem diagnosis of
502 hepatic adenocarcinoma in a ewe. *Journal of American Veterinary Medical Association*
503 193, 1537-1538.
- 504 Mackay, F., Leung, H., 2006. The role of the BAFF/APRIL system on T cell function.
505 *Seminars in Immunology* 18, 284–289.
- 506 Mackay, F., Schneider, P., 2009. Cracking the BAFF code. *Nature Reviews*
507 *Immunology* 9, 491–502.
- 508 Mackay, F., Silveira, P.A., Brink, R., 2007. B cells and the BAFF/APRIL axis: fast-
509 forward on autoimmunity and signaling. *Current Opinion in Immunology* 19, 327–336.
- 510 Mellor, D.J., Cook, C.J., Stafford, K.J., 2000. Quantifying some responses to pain as a
511 stressor. In: Moberg, G.P., Mench, J. (Eds.), *The Biology of Animal Stress – Basic*
512 *Principles and Implications for Animal Welfare*. CABI Publishing, Wallingford, UK,
513 pp. 171–198.
- 514 Mølgaard, L., Damgaard, B.M., Bjerre-Harpøth, V., Herskin, M.S. 2012. Effects of
515 percutaneous needle liver biopsy on dairy cow behaviour. *Research in Veterinary*
516 *Science* 93(3), 1248–54.

- 517 Muoio, D.M., Newgard, C.B., 2006. Obesity-related derangements in metabolic
518 regulation. *Annual Review of Biochemistry* 75, 367–401.
- 519 Néspoli, P.B., Gheller, V.A., Peixoto, P.V., França, T.N., Carvalho, A.U., Godoy de
520 Araújo, D.K., Malm, C. 2010. Evaluation of techniques for liver biopsy in sheep.
521 *Pesquisa Veterinária Brasileira* 30(1), 29–36.
- 522 Phillippo, M. A technique for liver biopsy in sheep., 1973. *Journal of Agricultural*
523 *Science* 80, 313-314.
- 524 Pugh, D.G. (Ed.), 2005. *Clínica de ovinos e caprinos*. Roca, São Paulo, 1-15pp.
- 525 Rüllicke, T., Hübscher, U. 2000. Special Review Series–Gene Manipulation and
526 Integrative Physiology Germ line transformation of mammals by pronuclear
527 microinjection. *Experimental Physiology* 85 (6), 589–601.
- 528 Saloura, E.A., Bizimi, V., Theodoropoulos, E., Motogna-Kalokairinou, M., Balanika,
529 A.P., Baltas, C.S. 2010. Focal hepatic lesion ultrasound-guided biopsies. *Medical*
530 *Ultrasonography* 12, 295–299.
- 531 Serova, I.A., Dvoryanchikov, G.A., Andreeva, L.E., Burkov, I.A., Dias, L.P.B.,
532 Battulin, N.R., Smirnov, A.V., Serov, O.L. 2012. A 3,387 bp 5'-flanking sequence of
533 the goat alpha-S(1)-casein gene provides correct tissue-specific expression of human
534 granulocyte colony-stimulating factor (hG-CSF) in the mammary gland of transgenic
535 mice. *Transgenic Research* 21 (3), 485–98.
- 536 Solomon, S.S., Majumdar, G., Hernandez, A.M., Raghov, R., 2008. A critical role of
537 Sp1 transcription factor in regulating gene expression in response to insulin and other
538 hormones. *Life Sciences* 83, 305–312.
- 539 Yin, Z., Kong, Q.R., Zhao, Z.P., Wu, M.L., Mu, Y.S., Hu, K., Liu, Z.H. 2012. Position
540 effect variegation and epigenetic modification of a transgene in a pig model. *Genetics*
541 *and Molecular Research* 11, 355–369.

542 Yu, S.C., Liew, C.T., Lau, W.Y., Leung, T.W., Metreweli, C. 2001. US-guided
543 percutaneous biopsy of small ($\leq$ 1-cm) hepatic lesions. *Radiology* 218, 195–199.
544 Zinzani, P.L., Colecchia, A., Festi, D., Magagnoli, M., Larocca, A., Ascani, S.,
545 Bendandi, M., Orcioni, G.F., Gherlinzoni, F., Albertini, P., Pileri, S.A., Roda, E., Tura,
546 S. 1998. Ultrasound-guided core-needle biopsy is effective in the initial diagnosis of
547 lymphoma patients. *Haematologica* 83, 989–992.
548

549 Table 1. Values of rectal temperature (°C), heart frequency (bpm), respiratory frequency (bpm) and ruminal movements (contractions/3 min)
 550 according to the groups, immediately after (T0) and at 24 (T24) and 48 h (T48) after the biopsy in transgenic and non-transgenic goats using
 551 different methods (Means $\pm$ SD).

Group	Liver biopsy			Splenic biopsy		
	T0	T24	T48	T0	T24	T48
	Temperature (°C)			Temperature (°C)		
Ultrasound	39.4 $\pm$ 0.6	39.6 $\pm$ 0.5	39.1 $\pm$ 0.6	38.4 $\pm$ 1.3	39.1 $\pm$ 0.6	39.5 $\pm$ 1.1
Laparoscopic	39.5 $\pm$ 0.4	39.7 $\pm$ 0.6	39.3 $\pm$ 0.6	38.4 $\pm$ 0.4	38.8 $\pm$ 0.2	38.9 $\pm$ 0.6
	Heart frequency (bpm)			Heart frequency (bpm)		
Ultrasound	104.0 $\pm$ 23.6	94.0 $\pm$ 20.0	99.0 $\pm$ 15.4	96.0 $\pm$ 28.9	100.0 $\pm$ 25.5	114.0 $\pm$ 23.2
Laparoscopic	118.0 $\pm$ 16.5	87.0 $\pm$ 15.4	91.0 $\pm$ 8.2	98.0 $\pm$ 18.0	98.0 $\pm$ 5.2	95.5 $\pm$ 12.7
	Respiratory frequency (bpm)			Respiratory frequency (bpm)		
Ultrasound	22.0 $\pm$ 0.6	19.0 $\pm$ 2.0	23.0 $\pm$ 2.0	23.5 $\pm$ 11.1	20.0 $\pm$ 3.3	22.0 $\pm$ 4.0
Laparoscopic	24.0 $\pm$ 5.7	23.0 $\pm$ 3.8	25.0 $\pm$ 10.5	29.0 $\pm$ 2.0	18.0 $\pm$ 2.3	21.0 $\pm$ 2.0
	Ruminal frequency (n/3min)			Ruminal frequency (n/3min)		
Ultrasound	2.5 $\pm$ 0.6	2.5 $\pm$ 0.6	2.8 $\pm$ 0.5	2.5 $\pm$ 0.6	2.3 $\pm$ 0.5	2.5 $\pm$ 0.6
Laparoscopic	2.3 $\pm$ 0.5	2.5 $\pm$ 0.6	2.5 $\pm$ 0.6	2.5 $\pm$ 0.5	2.3 $\pm$ 0.5	2.8 $\pm$ 0.5

Figure captions

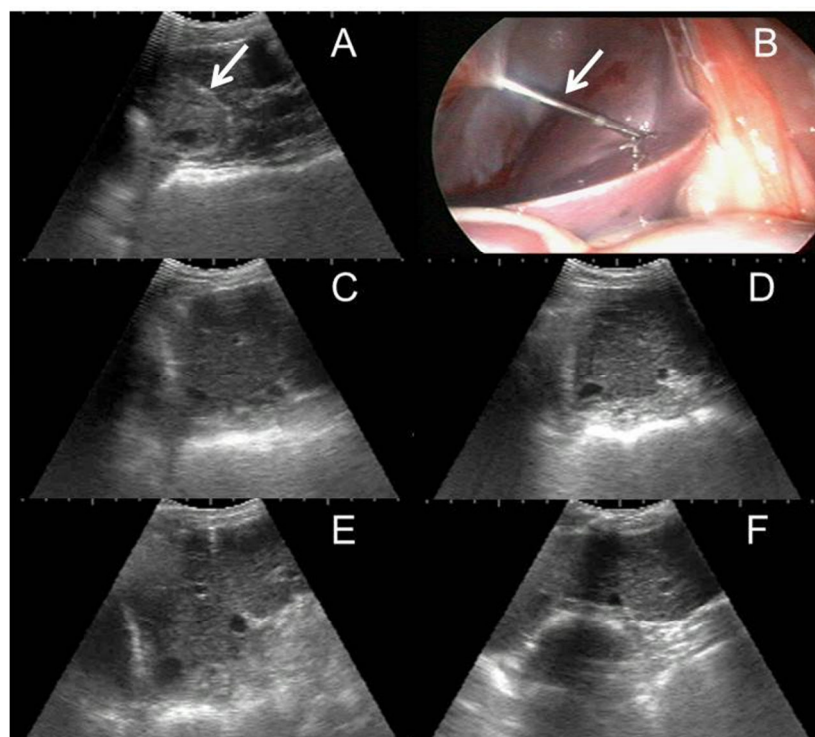
Fig. 1. Methods of liver biopsy in goats: A, C and E – ultrasound-guided and ultrasonographic images of the liver immediately before (T0) and 48 h (T48) after the procedure; B, D and F – by laparoscopy, and ultrasound images of the liver immediately before (T0) and 48 h (T48) after the procedure. The arrow shows the Tru-Cut needle.

Fig. 2. Real-time PCR analysis of BAFF expression in spleen (A) and SP1 expression in liver (B) obtained by different biopsy methods in goats. The fold differences in mRNA expression after normalization to the internal standard (GAPDH) are shown.

Fig. 3. Methods of splenic biopsy in goats: A, C and E – ultrasound-guided and ultrasonographic images of the spleen immediately before (T0) and 48 h (T48) after the procedure; B, D and F – by laparoscopy, and ultrasound images of the spleen immediately before (T0) and 48 h (T48) after the procedure. The arrow shows the Tru-Cut needle.

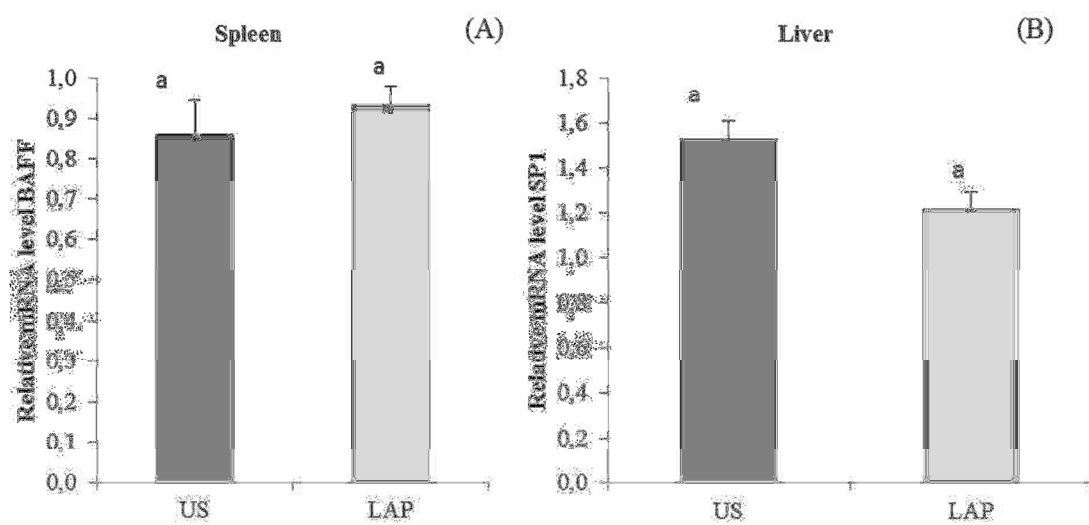
Fig. 4. Transgene expression analysis in liver by real-time PCR. Derivative melting curves of hG-CSF and GAPDH amplicons in non-transgenic (A and B) and transgenic (C and D) goats. Negative controls are mRNA templates without reverse transcriptase. Positive control (E) are reactions with transcripts of human leukocytes. The curve slopes, efficiency and linearity values were calculated. The results for gene expression in the spleen are presented similarly to liver.

578 **Figure 1.**



579

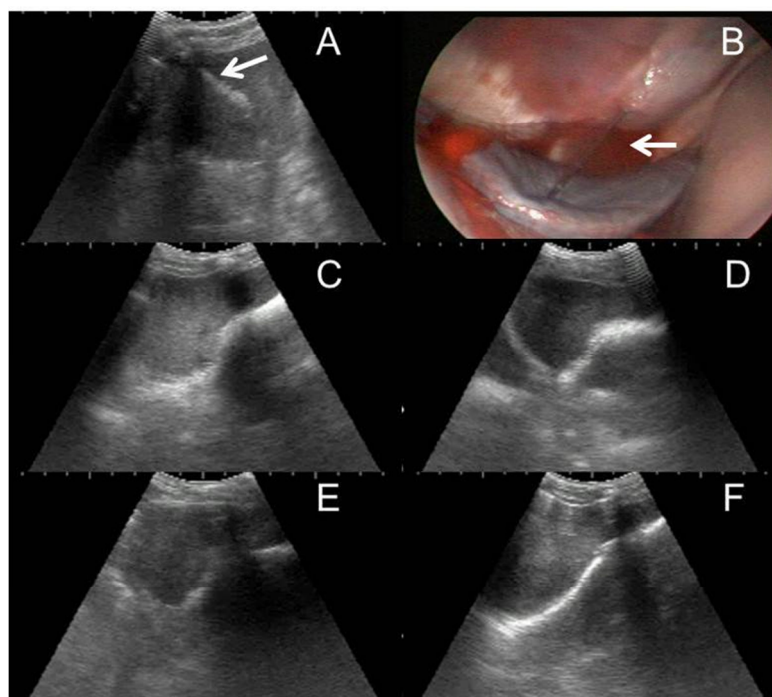
580

581 **Figure 2.**

582

583

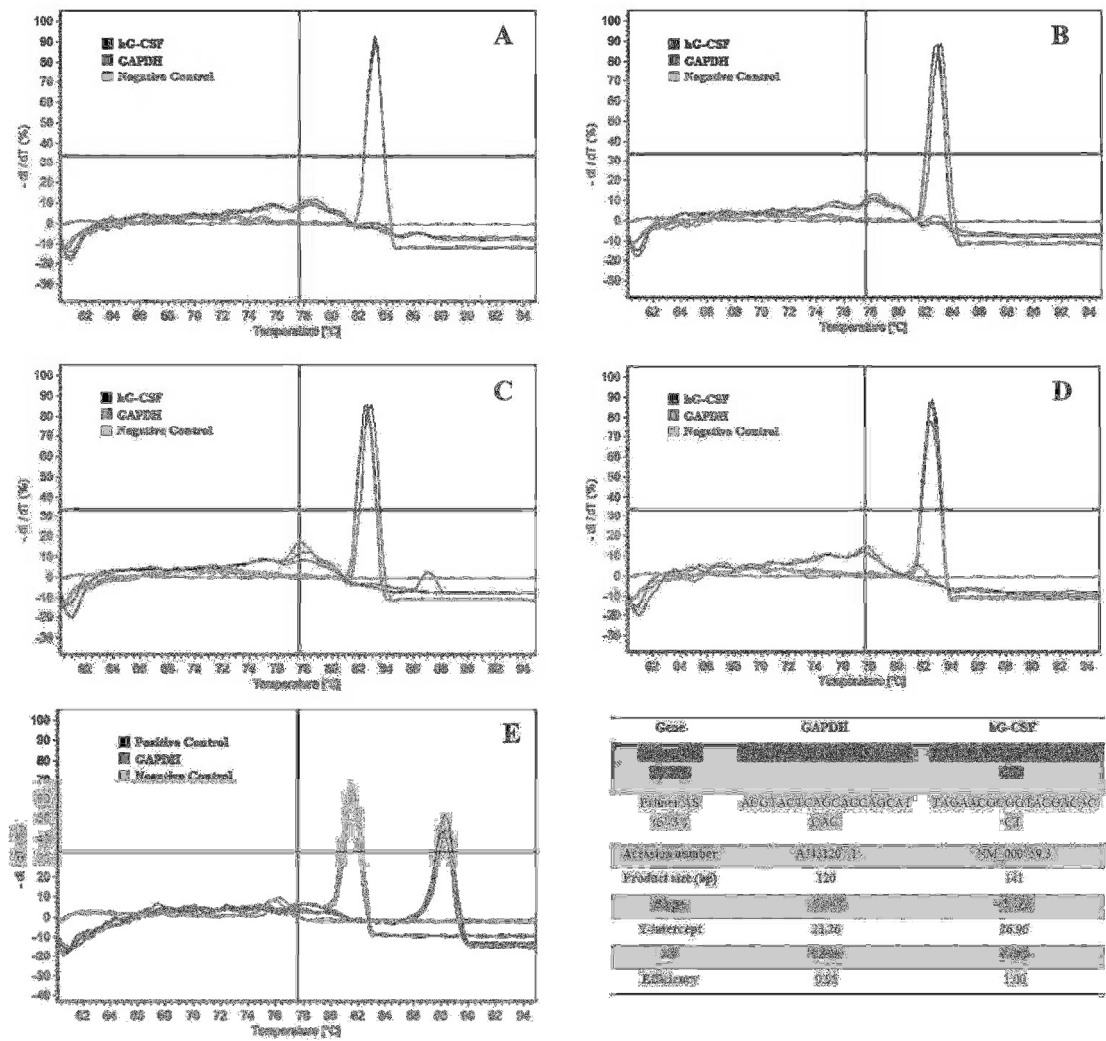
584 **Figure 3.**



585

586

587 **Figure 4.**



Periódico: *Veterinary Record*; Submetido em 15/11/2013.

Testicular biopsy for gene expression analysis in transgenic goats

C.H.S. Melo, F.C. Sousa, R.I.P.T. Batista, D.J.D. Sanchez, J.M.G. Souza-Fabjan, V.J.F.

Freitas, L.M. Melo, D.I.A. Teixeira*

Laboratory of Physiology and Control of Reproduction, Faculty of Veterinary, State
University of Ceará, Av. Dedé Brasil 1700, Fortaleza, 60714-903, Brazil.

*Corresponding author: Dárcio Ítalo Alves Teixeira
Universidade Estadual do Ceará/Faculdade de Veterinária
Av. Dedé Brasil, 1700 – Fortaleza-CE, Brazil 60714-903
Fax: +55 85 31019840
Phone: +55 85 31019861
E-mail: darcioitalo@yahoo.com.br

ABSTRACT

The aim of the current study was to evaluate the reliability of testicular biopsy for transgenic goats for gene expression purposes. For this, testicular tissue samples were collected from hG-CSF-transgenic bucks and submitted to real-time PCR aiming endogenous genes (SP1 and GAPDH) and transgene (hG-CSF) amplifications. Biopsy method allowed to collect fragments compatible to PCR procedures, concerning sample weight (mg) and RNA yield ($\mu\text{g}/\text{mg}$ tissue). Furthermore, the average runtime spent on

surgical procedures was 12.2 ± 1.9 min and the typical number of attempts to obtain a tissue fragment was 1.0 ± 0.0 . Semen qualitative and quantitative analyses were similar between biopsied and control, however small hyperechoic areas were observed, indicating testicular calcification. The SP1 transcript levels were considered similar between T and NT tissue samples. Finally, no transgene transcripts were detected in testicular samples. The use of testicular biopsy method allowed demonstrating that the hG-CSF-transgenic goats do not have ectopic expression in that organ. Furthermore, the biopsy procedure using the Tru-Cut needle in goat did not affect any parameters of testicular function evaluated in this study.

Testicular biopsy is a complementary technique for diagnosis and assessment of reproductive function in males. The biopsy is a promising approach, widely well-established and routinely used procedure which leads to low morbidity and small risks to the patient (Saloura and others, 2010). The aim of the current study was to evaluate the reliability of testicular biopsy in transgenic goats for gene expression purposes. The experimental animals were: two Canindé male goats transgenic (T) for hG-CSF (F1 specimens of the 10M line described by Freitas and others 2012) and four non-transgenic (NT) ones. The bucks were remained in the Laboratory of Physiology and Control of Reproduction (LFCR), located in Fortaleza, Brazil, at 3°47'38" S and 38°33'29" W. All animals were 2-3 years old and showed body weight of 41.2 ± 0.9 kg and body condition score of 3.0 ± 0.6 (1-5 scale). All protocols were approved by the Animal Ethics Committee of the State University of Ceará (CEUA/UECE N° 12237087-2) and Brazil's Biosafety Technical National Committee (CTNBio 228/06). After 24 h of food and hydric fasting, the bucks were subjected to dissociative anesthetic protocol, which consisted in xylazine hydrochloride (0.2 mg/kg b.w.) i.m. associated with ketamine hydrochloride (10 mg/kg b.w.) i.m. followed by 2% lidocaine local infiltration. After an initial incision over the middle third of the posterior surface of the left testicle, the biopsies were made by introduction of a Tru-Cut needle (14 G x 20 cm x 20 mm) into the testicular parenchyma in an oblique position in the caudal-cranial direction. The dermal suture was performed with interrupted over-and-over. Two NT bucks were not subjected to biopsy and were used as control for pain evaluation. Tissue fragments were weighted and stored at -80° C until RNA extraction. Thus, tissue fragments were subjected to real-time qPCR analysis for quantification of both endogenous (SP1 and GAPDH) and transgene (hG-CSF) transcripts. The procedure efficiency was evaluated by the weight of collected tissue fragments, runtime and

number of attempts spent for each biopsy. On post-surgical period, the biopsy effects were evaluated by testicular ultrasonography as well as pain intensity (PI) and clinical parameters of the animals.

During the first 24 h post-surgery, the PI of biopsied and control animals was classified according to Mellor and others (2000). The gonadal parenchyma echogenicity was evaluated by ultrasonography prior to biopsy procedures (T0), at 24 h (T24), at 48 h (T48) and then 60 days after. Measurements of rectal temperature ($^{\circ}$ C), heart and respiratory rates (bpm) and ruminal movements (contraction/3 min) were also recorded. Semen analysis was carried out on day 100 post-surgery according to Mies Filho (1987) and its analyzed parameters were: ejaculate volume, massal motility, percentage of progressively motile spermatozoa, vigor, sperm concentration, percentage of morphologically abnormal spermatozoa.

The testicular biopsy method used in the present work was adequate to perform sample collection with minor difficulties. Additionally, the choose procedure allowed to obtain fragments with average weight (21.2 ± 1.8 mg) suitable for proper RNA yield (1.0 ± 0.1 μ g/mg) and subsequent gene expression analysis by qPCR. SP1 transcript levels (Fig 1(a)) were considered similar between T and NT tissue samples ($P > 0.05$). Transgene expression investigation was also possible and no hG-CSF transcripts were detected in testicular tissue of both T and NT (Fig 1(b, c, d)), suggesting no ectopic expression occurs in this organ.

Furthermore, the average runtime spent on surgical procedures was 12.2 ± 1.9 min and the typical number of attempts to obtain a tissue fragment was 1.0 ± 0.0 . The technique employed provided greater agility to the biopsy procedure, in a less invasive manner and thereby preventing further stress and injury in the animals. Incision through the scrotal skin and tunics allowed the identification of its blood vessels and so it was

possible to avoid them at the biopsy needle insertion. The greatest difficulty detected in the testicular biopsy procedure was the occurrence of slight hemorrhage after needle removal. However, the bleeding was easily controlled by gentle mechanical compression with sterile gauze.

Semen qualitative and quantitative analyses are summarized in Table 1. The biopsy effect on gonadal function is in agreement with other studies (Heath and others 2001; Sartori and others 2002a). Therefore, at the first ultrasound examination no alteration was detected. However, at 60 days after biopsy, small hyperechoic areas were observed, indicating testicular fibrose. Sheep subjected to testicular biopsy also showed areas suggestive of calcification, whereas testicle structural and functional characteristics were not compromised (Sartori and others 2002b). Additionally, 75% (3/4) of the animals were categorized as absent to mild pain and 25% (1/4) were categorized as mild to moderate pain.

The anesthetic protocol employed in this study was considered appropriate since the bucks showed no clinical pain signals during procedures. Furthermore, no alteration of physical parameters was observed and according to Pugh (2005), these data may be considered normal for goats. Biopsied and control groups, respectively, showed similar ($P>0.05$) heart beat rates (95.8 ± 13.5 ; 97.3 ± 11.8 bpm), respiratory rates (20.8 ± 3.4 ; 22.2 ± 2.4 bpm), ruminal movements (2.8 ± 0.6 ; 2.7 ± 0.5 contraction/3min) and rectal temperature (38.8 ± 0.4 ; 38.2 ± 0.7 °C).

The methodological approach shown in the present work allowed to obtain testicle samples without affecting animal welfare and viable for molecular studies. Furthermore, the use of testicular biopsy method allowed to demonstrate that the hG-CSF-transgenic goats do not have ectopic expression in that organ. Thus, the biopsy procedure using the

Tru-Cut needle in goat did not affect any parameters of testicular function evaluated in this study and it was shown to be relatively simple, safe and efficient.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Oleg Serov, Irina Serova (Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk, Russia) and Lyudmila Andreeva (Institute of Molecular Genetics, Moscow, Russia) for significant participation in the experiments for obtaining transgenic animals.

References

- FREITAS, V. J. F., SEROVA, I. A., MOURA, R. R., ANDREEVA, L. E., MELO, L. M., TEIXEIRA, D. I. A., PEREIRA, A. F., LOPES-JR, E. S., DIAS, L. P. B., NUNES-PINHEIRO, D. C. S., SOUSA, F. C., ALCÂNTARA-NETO, A. S., ALBUQUERQUE, E. S., MELO, C. H. S., RODRIGUES, V. H. V., BATISTA, R. I. T. P., DVORYANCHIKOV, G. A. & SEROV, O. L. (2012) The establishment of two transgenic goat lines for mammary gland hG-CSF expression. *Small Ruminant Research* 105, 105–113.
- HEATH, A. M., CARSON, R. L., PUROHIT, R. C., SARTIN, E. M., WENZEL, G. W. & WOLFE, D. E. (2001) Effects of testicular biopsy in clinically normal bulls. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 220, 507–511.
- LOFSTEDT, J., SCHELLING, S., STOWATER, J. & MORRIS, E. (1988) Antemortem diagnosis of hepatic adenocarcinoma in a ewe. *Journal of American Veterinary Medical Association* 193, 1537–1538.
- MELLOR, D. J., COOK, C. J. & STAFFORD, K. J. (2000) Quantifying some responses to pain as a stressor. In *The Biology of Animal Stress – Basic Principles and Implications for Animal Welfare*. Ed M. CABI Publishing. *Academic Press*. pp. 171–198.
- MIES FILHO, A. (1987) *Inseminação Artificial (Artificial Insemination)*, 6th Edition. Ed M. Sulina, Porto Alegre. pp. 700–736.
- PEREIRA, A. F., ALCÂNTARA NETO, A. S., ALBUQUERQUE, E. S., LUCIANO, M. C. S., TEIXEIRA, D. I. A., FREITAS, V. J. F. & MELO, L. M. (2012) Goat oocyte production by standard or one-shot FSH treatments and quantitative analysis of transcripts for EGF ligands and its receptor after in vitro maturation. *Reproduction in Domestic Animals* 47, 244–251.

- 734 PUGH, D. G. (2005) Clínica de ovinos e caprinos. Ed M. Roca, São Paulo, 1-15pp.
- 735 SALOURA, E.A., BIZIMI, V., THEODOROPOULOS, E., MOTOGNA-
- 736 KALOKAIRINO, M., BALANIKA, A.P. & BALTAS, C.S. (2010) Focal hepatic
- 737 lesion ultrasound-guided biopsies. *Medical Ultrasonography* 12, 295–299.
- 738 SARTORI, R., PRESTES, N. C., CANAVESSI, A. M. O., CURI, P. R. & BERGFELT,
- 739 D. R. (2002a) Testicular biopsy with Tru-Cut needle in conjunction with fibrin adhesive
- 740 or nylon suture: assessment of post-biopsy testicular function in rams. *Small Ruminant*
- 741 *Research* 45, 25–31.
- 742 SARTORI, R.; PRESTES, N.C.; CANAVESSI, A.M.O.; KEMPINAS, W.G. & ROSA,
- 743 G.J.M. (2002b) Assessment of ultrasonographic images and gross and microscopic
- 744 lesions of the testicular biopsy in sheep. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e*
- 745 *Zootecnia* v. 54, n. 3, 233-241.
- 746

TABLE 1: Values (Means $\pm$ SEM) of quantitative and qualitative analysis of Canindé goat semen subjected to testicular biopsy with Tru-Cut needle or control bucks which did not undergo surgery.

Parameter	Biopsy	Control
Ejaculate volume (mL)	0.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1
Massal motility (0-5)	3.2 ± 0.4	3.1 ± 0.4
Progressively motile (0-100%)	80.0 ± 2.2	79.0 ± 2.7
Vigor (0-5)	3.3 ± 1.5	3.3 ± 1.0
Sperm concentration ($\times 10^9$ cells./mL)	2.8 ± 0.7	3.2 ± 0.1
Total of abnormalities (%)	4.8 ± 1.0	5.2 ± 0.1
Tail abnormalities (%)	2.2 ± 0.4	2.6 ± 0.3
Retention cytoplasmic drops (%)	1.0 ± 0.4	1.4 ± 0.4
Head abnormalities (%)	1.1 ± 0.2	1.1 ± 0.1
$P > 0.05$		

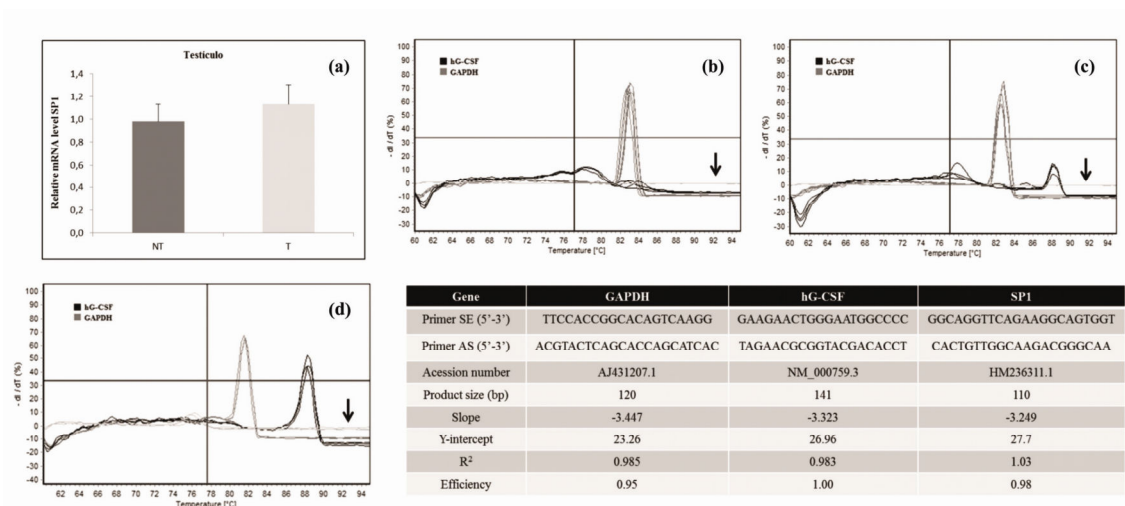


FIG 1: Transgene expression analysis in testicle by real-time PCR. SP1 relative transcript levels in testicle samples of T and NT (a) $P > 0.05$. Derivative melting curves of hG-CSF and GAPDH amplicons in non-transgenic (b) and transgenic goats(c). Positive controls (d) are reactions with transcripts of human leukocytes. Arrows indicate the negative controls are mRNA templates without reverse transcriptase. The curve slopes, efficiency and linearity values were calculated.

6. CONCLUSÕES

- ✓ As biópsias hepática e esplênica, guiadas por ultrassonografia ou laparoscópica, foram eficientes na obtenção de um fragmento tecidual viável para estudos de expressão gênica sem comprometer a saúde e o bem estar em caprinos;
- ✓ O procedimento de biópsia testicular utilizando a agulha Tru-Cut em caprinos não afetou nenhum dos parâmetros avaliados neste estudo. Demonstrando assim não alterar a função testicular.
- ✓ A execução da biópsia hepática, esplênica e testicular com a agulha Tru-Cut permitiu demonstrar que os caprinos transgênicos estudados não têm expressão ectópica nesses órgãos. Além disso, não foi necessária a realização da eutanásia dos animais.
- ✓ As execuções dos métodos de biópsia utilizados nesse estudo permitem a obtenção de amostras teciduais de fígado, baço e testículo se a ocorrência de processos dolorosos intensos nos animais experimentais. Além disso, mostraram-se relativamente simples, seguros e eficientes sem afetar a qualidade de vida e o bem estar animal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMANN, R.P; SCHAMBACHER, B.D. Physiology of male reproduction. **Journal of Animal Science**, v. 57, suppl., p.380-403, 1983.

AMORIM, R. M.; BORGES, A. S.; KUCHEMBUCK, M.R.G.; Kiomi, R.T.; Alencar, N.X. Bioquímica sérica e hemograma de bovinos antes e após a técnica de biópsia hepática. **Ciência Rural**, v. 33, n. 3, p. 519-523, 2003.

ANDERSON, D.E; GAUGHAN. E.M; ST-JEAN, G. Normal laparoscopic anatomy of the bovine abdomen. **American Journal of Veterinary Research**, v. 54, p.1170–1176, 1993.

ATTIA, K.A; ZAKI, A.A; EILTS, B.E; PACCAMONT, D.L; HOSGOOD, G.; DIETRICH, M.A; HOROHOV, D.W; BLOWIN, D.C. Anti-sperm antibodies and seminal characteristics after testicular biopsy or epididymal aspiration in dogs. **Theriogenology**, v. 53, p. 1355-1363, 2000.

BARR, F. Percutaneous biopsy of abdominal organs under ultrasound guidance. **Journal of Small Animal Practice**, v. 36, p. 105-113, 1995.

BISCHOFF, R.; DEGRYSE, E.; PERRAUD, F.; DALEMANS, W.; ALI-HADJI, D.; THÉPOT, D.; DEVINOY, E.; HOUEBINE, L. M.; PAVIRANI, A. A 17.6 kbp region located upstream of the rabbit WAP gene directs high level expression of a functional human protein variant in transgenic mouse milk. **FEBS Letters**, v. 305, n. 3, p. 265-268, 1992.

BLANCHARD, T.L., VARNER, D.D. Evaluating breeding soundness in stallions 4: hormonal assay and testicular biopsy. *Veterinary medicine*, v. 91, p. 358–365, 1996.

BONE, J. F. A technic for aspiration liver biopsy in dairy cattle. **The North American Veterinarian**, v. 35, p. 747, 1954.

BOURÉ, L.; General Principles of Laparoscopy. **Veterinary Clinics Food Animal**, 21, p.227–249, 2005.

BRAGA, M.M.; CASTILHOS, L.M.L.; SANTOS, M. N. Biópsia hepática em bovinos: proposta de nova técnica. **Revista Centro de Ciências Rurais**, v. 15, n. 1, p. 79-88, 1985.

BRAUN, U.; PUSTERLA, N.; WILD, K. Ultrasonographic examination of the liver and gallbladder in cows: abnormal findings. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 18, n. 11, p. 1255-1269, 1996.

BUCLEY, W.T.; EIGENDORF, G.K.; DORWARD, W.J. A liver biopsy instrument for large animals. **The Canadian Journal of Animal Science**, v. 66, p. 1137-1140, 1986.

BUNCH, S. E.; POLAK, D. M.; HORNBuckle, W. E. A modified laparoscopic approach for liver biopsy in dogs. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 187, n.10, p. 1032-1035, 1985.

CAMPANA, G.A.; FARO, L.B.; GONZALEZ, C.P.O. Fatores competitivos de produção em medicina diagnóstica: da área técnica ao mercado. **Journal Brazilian Patology Medicine Laboratory**, v.45, n.4, p. 295-303, 2009.

CARVALHO, F.C. **Ultrassonografia intervencionista**. In: KANAYAMA, L.M. Ultrassonografia em pequenos animais. 1 ed. São Paulo: Roca, 2004 p. 347-356.

CHAPMAN, H.L.; COX, D.H.; HAINES, C.E.; DAVIS, G.K.. Evaluation of the liver biopsy technique for mineral nutrition studies with beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 22, p. 733-737, 1963.

CHOU, Y.H.; CHIOU, H.J.; TIU, C.M.; CHIOU, S.Y.; WANG, H.K. Ultrasonography-guided percutaneous interventions procedures of the spleen. **Journal Medicine Ultrasound**, v. 16, n. 4, p. 249- 255, 2008.

CHRISTOPHER, M. M. Cytology of the spleen. **The Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v. 33, p. 135-52, 2003.

CLARK, A. J.; BURL, S.; DENNING, C.; DICKINSON, P. Gene targeting in livestock: a preview. **Transgenic research**, v. 9, n. 4-5, p. 263-75, 2000.

COHEN, M.S.; FRYE, S.; WARNER, R.S. LEITER, E. Testicular needle biopsy in diagnosis of infertility. **Urology**, v.24, p.439-442, 1984.

COSTA, P.R.S.; LOPES, M.A.F.; COSTA, M.C.; LIMA JÚNIOR, L.O. Biopsia hepática videolaparoscópica em cães. *Revista Ceres*, v. 52, p.763-770, 2005

DICK, A. T. Aspiration biopsy of the liver in sheep. **Australian Veterinary Research**, v. 20, p. 298-303, 1944.

DICKIE, A.M.; DOUST, R.; CROMARTY, L.; JOHNSON, V.S.; SULLIVAN, M.; BOYD, J.S. Comparison of ultrasonography, radiography and a single computed tomography slice for the identification of fluid within the canine tympanic bulla. **Research in Veterinary Science**, v. 75, p. 209–216, 2003.

DIRKSEN, G. Sistema digestivo. In: ROSENBERGER, G. **Exame Clínico dos Bovinos**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. Cap.7, p. 166-225.

DONALD, G.E.; PAULL, D.R.; LANGLANDS, J.P. Liver biopsy as a technique for assessing copper status of sheep. **Australian Veterinary Journal**, v. 61, n. 4, p. 121-122, 1984.

DUARTE, A.L.L., CATTELAN, J.W., BEZERRA, M.B, VICENTE, W.R.R., CORDEIRO, M.F. Videolaparoscopic guided hepatic biopsy with tru-cut needle in goats. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia*, v. 61, p.12–19, 2009.

DUNN, D. A.; PINKERT, C. A.; KOOYMAN, D. L. Foundation Review: Transgenic animals and their impact on the drug discovery industry. **Drug discovery today**, v. 10, n. 11, p. 757-67, 2005.

ESZTERHAS, S. K.; BOUHASSIRA, E. E.; MARTIN, D. I. K.; FIERING, S. Transcriptional interference by independently regulated genes occurs in any relative arrangement of the genes and is influenced by chromosomal integration position. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, p. 469–479, 2002.

FERREIRA, A.V.; VAN DER MERWE, H.J.; SLIPPERS, S.C. A technique for obtaining liver biopsies from mature sheep. **Small Ruminant Research**, v 22, p. 89-92, 1996.

FINCO, D.R. Biopsy of the testicle. **Veterinary Clinics of North America**, v. 4, p. 377-381, 1974.

FINN-BODNER, S.T.; HATHCOCK, J.T. Image-guided percutaneous needle biopsy: ultrasound, computed tomography, nad magnetic resonance imaging. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)**, v. 8, p. 258, 1993.

FRENEAU, G.E.; GUIMARÃES, J.D.; FONSECA, V.O.; VALE FILHO, V.R.; NASCIMENTO, E.F. Características do sêmen e dos túbulos seminíferos, em touros Holandeses-PB, pré-púberes (Characteristics of semen and seminiferous tubules of prepubertal Holstein bulls). *Revista Brasileira Reprodução Animaml*, v. 1 (Suppl.), p. 191, 1989.

FRY, M. M., MCGAVIN, M. D. Medula óssea, células sanguíneas e sistema linfático In: MCGAVIN, M.D., ZACHARY, J.F. **Bases da Patologia em Veterinária**. 4ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.743-832, 2009.

GARNER, R. J. Aspiration biopsy liver for the cattle. **The Veterinary Record**, v. 62, p. 729-730, 1950.

GARRICK, D.; FIERRING, S.; MARTIN, D. I. K.; WHITELAW, E. Repeat-induced gene silencing in mammals. **Nature Genet**, v. 18, p. 56–59, 1998.

GOL'DMAN, I. L.; KADULIN, S. G.; RAZIN, S. V. Transgenic goats in the world's pharmaceutical industry in the XXI century. **Genetika**, v. 38, n. 1, p. 5-21, 2002.

GONZALO-ORDEN, M.; MILLÁN, L.; ÁLVAREZ, M.; Sánchez-Campos, S.; Jiménez, R.; González-Galleno, J.; Tuñón, M. J. Diagnostic imaging in sheep hepatic fascioliasis: ultrasound, computer tomography and magneticresonance findings. **Parasitology Research**, v. 90, p. 359-364, 2003.

GORDON, J. W.; SCANGOS, G. A; PLOTKIN, D. J.; BARBOSA, J. A; RUDDLE, F. H. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, n. 12, p. 7380-4, 1980.

GUIMARÃES, J.D.; FRENEAU, G.E.; VALE FILHO, V.R.; FONSECA, V.O. Biopsia testicular em touros Zebus (*Bos taurus indicus*), Holandeses (*Bos taurus taurus*) e F1 Holandês-Zebu pré-púberes (Testicular biopsy in prepubertal Zebu bulls [*Bos taurus*

indicus], Holstein bulls [*Bos taurus taurus*] and F1 Holstein-Zebu bulls). *Revista Brasileira Reprodução Animal*, v. 1 (Suppl.), p. 199, 1989.

HAGER, D.A.; NYLAND, T.G.; FISHER, P. Ultrasound-guided biopsy of the canine liver, kidney, and prostate. **Radiology**, v. 26, n. 3, p. 82-88, 1985.

HARVEY, R. B., LOVERING, S. L.; BAILEY, E. M.; NORMAN, J.O. The influence of multiple liver biopsies on hematologic and serum biochemical values of sheep. **Cornell Veterinary**, v. 74, p. 322-330, 1984.

HEDGER, M.P. Testicular Leukocytes: what are they doing? **Reviews of Reproduction**, n. 2, p.38-47, 1997.

HERRING, D.S.; BJORNTON, G. Physics, facts and artifacts of diagnostic ultrasound. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 15, p. 1107–1122, 1985.

HIDIROGLOU, M.; IVAN, M. Liver biopsy in sheep. **Veterinary Research**, v. 24, p. 260-265, 1993.

HOGAN, K. G.; MONEY, D. F. L.; WALKER, R. S. The distribution of copper in the liver of pigs and sheep and its effect on the value of chemical analyses made on biopsy samples. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 14, p. 132-141, 1971.

HOUEBINE, L M. Transgenic animal bioreactors. **Transgenic research**, v. 9, n. 4-5, p. 305-20, 2000.

HOUEBINE, L. M. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 32, n. 2, p. 107-21, 2009.

HOUEBINE, L. M. Transgenic animal models in biomedical research. **Methods In Molecular Biology Clifton Nj**, v. 360, p. 163-202, 2007.

HUANG, J.; XIONG, Y.; LI, T.; ZHANG, L.; ZHANG, Z.; ZUO, B.; XU, D.; REN, Z. Ectopic overexpression of swine PPAR γ 2 upregulated adipocyte genes expression and triacylglycerol in skeletal muscle of mice. **Transgenic research**, v.21, p. 1311-1318, 2012.

HUGHES, J. P. A simplified instrument for obtaining liver biopsies in cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 23, p. 1111-1112, 1962.

JONES, B. D.; GROSS, M. E. Introduction to endoscopy. **Veterinary Clinics of North América: Small Animal Practice**, v. 20, n. 5, p. 1199-1208, 1990.

KASSEM, M.M., EL-GENDY, S.A.A., ABDEL-WAHED, R.E., EL-KAMMAR, M. Laparoscopic anatomy of caprine abdomen and laparoscopic liver biopsy. *Research in Veterinary Science*, v. 90, p. 9–15, 2011.

KEARNS, M.; PREIS, J.; MCDONALD, M.; MORRIS, C.; WHITELOW, E. Complex patterns of inheritance of an imprinted murine transgene suggest incomplete germline erasure. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 3301–3309, 2000.

KERWIN, S C. Hepatic aspiration and biopsy techniques. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 25, n. 2, p. 275-303, 1995.

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

KONG, Q.; WU, M.; HUAN, Y.; ZHANG, L.; LIU, H.; BOU, G.; LUO, Y.; MU, Y.; LIU, Z. Transgene expression is associated with copy number and cytomegalovirus promoter methylation in transgenic pigs. **PLoS ONE**, v. 4, p. 1-10, 2009.

LARSEN, R.E. Testicular biopsy in the dog. **Veterinary Clinics of North America**, v. 7, p. 747–755. 1977

LeBLANC, C.; HEAD, L.L.; FRY, M.M. Comparison of aspiration techniques for obtaining cytologic samples from the canine and feline spleen. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 38, n. 2, p. 242-246, 2009.

LECHETENBERG, G.B.; NAGARAJA, T.G.; AVERY, T.B. Ultrasound-guided, percutaneous catheterization of the portal vein in the cattle. **Agricultural Practice**, v. 10, p. 41-42, 1989.

LEONG, A.S.Y., MATTHEWS, C.D. The role of testicular biopsy in the investigation of male infertility. **Pathology**, v. 14, p. 205–210, 1982.

LEVIN, H.S. Testicular biopsy in the study of male infertility: Its current usefulness, histologic techniques, and prospects for the future. **Human Pathology**, v. 10, p. 569-584, 1979.

LOOSMORE, R.M.; ALLCROFT, R. Technique and use of liver biopsy in cattle. **The Veterinary Record**, v. 63, n. 24, p. 414- 416, 1951.

LOPATE, C.; THRELFALL, W.R.; ROSOL, T.J. Histopatologic and gross effects of testicular biopsy in the dog. **Theriogenology**, v.32, p.585-602, 1989.

LUBON, H. Transgenic animal bioreactors in biotechnology and production of blood proteins. **Biotechnology Annual Review**, v. 4, p. 1-54, 1998.

MARTIN, D. I. K. ; WHITLAW, E. Vagaries of variegating transgenes. **BioEssays**, v. 18, p. 919–923, 1996.

MEHTA, A. K.; MAJUMDAR, S. S.; ALAM, P.; GULATI, N.; BRAHMACHARI, V. Epigenetic regulation of cytomegalovirus major immediate-early promoter activity in transgenic mice. **Gene**, v. 428, p. 20–24, 2009.

NÉSPOLI, P. B.; GHELLER, V. A.; PEIXOTO, P. V.; FRANÇA, T. N.; CARVALHO, A. U.; ARAÚJO, D. K. G.; MALM, C. Avaliação de técnicas de biópsia hepática em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, p.29-36, 2010.

NIEMANN, H.; KUES, W. A. Transgenic farm animals: an update. **Reproduction fertility and development**, v. 19, n. 6, p. 762-770, 2007.

NYLAND, T.G.; MATTOON, J.S. (Eds.), 2002. **Small Animal Diagnostic Ultrasound**, second ed. W.B. Saunders, Philadelphia, PA.

NYLAND, T.G.; MATTON, J.S. **Biopsia guiada por ultrassom**. In: NYLAND, T.G.; MATTOON, J.S. Ultrassom diagnóstico em pequenos animais. 2 ed. São Paulo: Roca, 2005, p. 33 - 52.

OLSON, P.N., SCHULTHEISS, P., SEIM, H.B. Clinical and laboratory findings associated with actual or suspected azoospermia in dogs: 18 cases (1979–1990). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 201, p. 478–482, 1992.

PEARSON, E. G.; GRAIG, A. M. The diagnosis of liver disease in equine and food animals. **Modern Veterinary Practice**, v. 63, n. 3, p. 233-238, 1980.

PHILLIPPO, M. A technique for liver biopsy in sheep. **Journal of Agricultural Science**, v. 80, p. 313-314, 1973.

PRESTON, R.C., SHAW, A. Recommended ultrasound field safety classification for medical diagnostic devices, **National Physics Laboratory**, Middlesex, 1–16, 2001.

PROSCH, S.; STEIN, J.; STAAK, K.; LIEBENTHAL, C.; VOLK, H. D.; KÜGER, D. H. Inactivation of the very strong HCMV immediate early promoter by DNA CpG methylation in vitro. **Biological Chemistry Hoppe-Seyler**, v. 377, p. 195–201, 1996.

PURSEL, V. G.; HAMMER, R. E.; BOLT, D. J.; PALMITER, R. D.; BRINSTER, R. L. Integration, expression and germ-line transmission of growth-related genes in pigs. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v. 1, n. 4-5, p. 77-87, 1990.

RADOSTITS, O. M.; MAYHEW, I. G.; HOUSTON, D. M. **Exame Clínico e Diagnóstico em Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 591p.

RIVAL-GERVIER, S.; VIGLIETTA, C.; MAEDER, C.; ATTAL, J.; HOUDEBINE, L. M. Position-independent and tissue-specific expression of porcine whey acidic protein gene from a bacterial artificial chromosome in transgenic mice. **Molecular Reproduction and Development**, v. 63, n. 2, p. 161-167, 2002.

RUDOLPH, N. S. Biopharmaceutical production in transgenic livestock. **Trends in biotechnology**, v. 17, n. 9, p. 367-374, 1999.

RÜLICHE, T.; HÜBSCHER, U. Special Review Series — Gene Manipulation and Integrative Physiology Germ line transformation of mammals by pronuclear microinjection. **Experimental Physiology**, v. 85, n. 6, p. 589-601, 2000.

SARTORI, R.; PRESTES, N.C.; CANAVESSI, A.M.O.; Curi, P.R.; Bergfelt, D.R. Testicular biopsy with Tru-Cut needle in conjunction with fibrin adhesive or nylon suture: assessment of post-biopsy testicular function in rams. **Small Ruminant Research**, v. 45, p. 25–31, 2002 b.

SARTORI, R.; PRESTES, N.C.; CANAVESSI, A.M.O.; KEMPINAS, W.G.; ROSA, G.J.M. Assessment of ultrasonographic images and gross and microscopic lesions of the testicular biopsy in sheep. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 3, 2002a.

SCHERER, P.O.; PILE, E.A.; SERRA FREIRE, N.M.; SCHÄFFER, G.V. Modificação da técnica de punção-biópsia hepática para pequenos ruminantes. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 7, n. 1, p. 55-57, 2000.

SCHERER, P.O.; PILE, E.A.; SERRA FREIRE, N.M.; SCHÄFFER, G.V. Uso da técnica de punção-biópsia para o diagnóstico histopatológico da fasciolose ovina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, n.4, p. 1999.

SCHUMACHER, A.; KOETSIER, P. A.; HERTZ, J.; DOERFLER, W. Epigenetic and genotype-specific effects on the stability of de Novo imposed methylation patterns in transgenic mice. **Biological Chemistry**, v. 275, p. 37915–37921, 2000.

SEGHETTI, L.; MARSH, H. Liver biopsy in cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v. 14, p. 9-11, 1953.

SERIZAWA, I.; AMANO, K.; ISHII, H.; ICHIKAWA, T.; KUSAKA, M.; TAGUCHI, T.; KIYOKAWA, N.; FUJIMOTO, J. Long-term overexpression of human granulocyte colony-stimulating factor in transgenic mice: persistent neutrophilia with no increased mortality for more than one year. **Cytokine**, v. 12, n. 6, p. 630-635, 2000.

SEROVA, IRINA A; DVORYANCHIKOV, G. A; ANDREEVA, L. E.; BURKOV, I. A.; DIAS, L. P. B.; BATTULIN, N. R.; SMIRNOV, A. V.; SEROV, O. L. A 3,387 bp 5'-flanking sequence of the goat alpha-S(1)-casein gene provides correct tissue-specific expression of human granulocyte colony-stimulating factor (hG-CSF) in the mammary gland of transgenic mice. **Transgenic research**, v. 21, n. 3, p. 485-98, 2012.

SILVA, L. C. L. C.; STOPIGLIA, A. J.; FANTONI, D. T. Técnica de biópsia hepática em eqüinos por laparoscopia. **Ciência Rural**, v. 32, n. 3, p. 459-465, 2002.

SODERSTROM, N. **Anatomy and histology of the spleen**. In: Aspiration biopsy cytology. Monographs in clinical cytology of infradiaphragmatic organs, v. 7, part. 2, S Karger, Basel, p. 224-247, 1979.

STARKE, A.; HAUDUM, A.; BUSCHE, R.; BEYERBACH, M.; DÄNICKE, S.; REHAGE, J. Technical note: Analysis of total lipid and triacylglycerol content in small liver biopsy samples in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 88, p.2741-2750, 2010.

STRATHDEE, D.; IBBOTSON, H.; GRANT, S. G. N. Expression of transgene targeted to the Gt(ROSA)26Sor locus is orientation dependent. **PLoS ONE**, v. 1, p. 1-9, e4, 2006.

UDALL, R.H.; WARNER, R.G.; SMITH, S.E. A liver biopsy technique for cattle. **Cornell Veterinary**, v. 42, p. 25-27, 1952.

VALLI, V.E.O. Hematopoietic system. In: JUBB, K.V.F.; KENNEDY, P.C.; PALMER, N.C. **Pathology of domestic animals**. 5 ed. Elsevier, v.3, p. 284, 2007.

VIGNOLI, M; SAUNDERS, J.H. Image-guided interventional procedures in dog and cat. **The Veterinary Journal**, 2010.

WALL, R. J.; KERR, D. E.; BONDIOLI, K. R. Transgenic dairy cattle: genetic engineering on a large scale. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 9, p. 2213-2224, 1997.

WHEELER, M. B.; WALTERS, E. M.; CLARK, S. G. Transgenic animals in biomedicine and agriculture: outlook for the future. **Animal Reproduction Science**, v. 79, p. 265–289, 2003.

WHITEHAIR, C.K.; PETERSON, D.R.; VAN ARSDELL, W.J.; THOMAS, O.O. A liver biopsy technique for cattle. **Journal of America Veterinary Medical Association**, v. 121, p. 285-287, 1952.

WONG, T.W., STRAUS, F.H., WARNER, N.E. Testicular biopsy in the study of male infertility. **Archives of Pathology**, v. 95, p. 151–164, 1973.

YAMAGA, Y., TOO, K. Diagnostic ultrasound imaging in domestic animals: fundamental studies on abdominal organs and fetuses. **Japanese Journal Veterinary Science**, v. 46, n. 2, p. 203-212, 1984.

YIN, Z.; KONG, Q. R.; ZHAO, Z. P.; WU, M. L.; MU, Y. S.; HU, K.; LIU, Z. H. Position effect variegation and epigenetic modification of a transgene in a pig model. **Genetics and Molecular Research**, v. 11, p. 355-369, 2012.

YUN, S.-J.; NAIDANSUREN, P.; SIM, B.-W.; PARK, J.-J.; PARK, C.-W.; NANJIDSUREN, T.; KANG, M.-H.; HWANG, S.-Y.; YOON, J.-T.; MIN, K.-S. Aberrant phenotypes of transgenic mice expressing dimeric human erythropoietin. **Reproductive biology and endocrinology**, v. 10, n. 6, p. 1-12, 2012.

APÊNDICE

RESUMO PUBLICADO: IV Animal Lab. ISCB/UECE 2013

Prêmio de Menção Honrosa para os cinco melhores resumos do IV ANIMAL LAB, Universidade Estadual do Ceará.

Biópsia esplênica guiada por ultrassonografia em caprinos

MELO, C.H.S.; SOUSA, F.C.; BATISTA, R.I.T.P.; FREITAS, V.J.F.; MELO, L.M.;
TEIXEIRA, D.I.A.

A contribuição do exame histopatológico obtido através de biópsias é essencial para o estabelecimento de diagnósticos e prognósticos mais precisos, porém é necessária que estas biópsias possuam pouca invasibilidade, bem como, seja obtida uma amostra adequada para a realização do exame. Assim, o objetivo deste trabalho foi apresentar uma técnica de biópsia esplênica guiada por ultrassonografia que reconhecidamente assegure o bem estar animal. O experimento foi realizado no Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução (LFCR) da Faculdade de Veterinária (FAVET) da Universidade Estadual do Ceará (UECE), em Fortaleza-CE. Este experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA/UECE), sob o protocolo nº 12237087-2. Foram utilizados quatro machos da raça Canindé apresentando duas ou três mudas dentárias, peso corporal de $41,25 \pm 0,87$ Kg (média $\pm$ DP) e escore de condição corporal de $2,97 \pm 0,57$ (média $\pm$ DP). Para a realização de todos os procedimentos os animais foram submetidos a jejum alimentar e hídrico de 24 horas. Posteriormente submetidos a protocolo anestésico dissociativo que consistiu na administração, por via intramuscular, de 0,2 mg/kg de Cloridrato de Xilazina associado a 10 mg/kg de Cloridrato de Cetamina 5% e anestesia local infiltrativa com lidocaína 2% . O procedimento de biópsia foi guiado por ultrassom modo B conectado a transdutor convexo de 3,5 MHz. Os animais foram posicionados em decúbito esquerdo e a identificação do tecido esplênico realizada do 8º ao 12º espaço intercostal do flanco esquerdo. Posteriormente foi introduzido o sistema de biópsia coaxial semiautomático de 13,5 cm x 15 cm acoplado à agulha do tipo Tru-Cut (14 G x 20 cm x 20 mm), que atravessou o músculo intercostal, atingindo o órgão de interesse. Os animais foram avaliados nas primeiras 24 horas para verificar manifestações de dor, levando em consideração a curvatura do dorso, dificuldade de movimentação e redução do apetite (Mellor et al., 2004). Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. O tempo de 24 horas de jejum alimentar e hídrico foi considerado adequado para a execução do procedimento cirúrgico, não sendo observada regurgitação de alimentos durante a realização da biópsia. O tempo operatório médio foi de $9,2 \pm 2,2$ min e o número médio de tentativas para obtenção de um fragmento foi de $1,4 \pm 0,5$. No que se refere ao peso médio do fragmento obtido este foi de $20.1 \pm 4,7$ mg, estando próximo do valor esperado. As avaliações clínicas mantiveram-se dentro

dos valores de referência para a espécie durante todo o período observado. A avaliação da intensidade da dor revelou que 50% dos animais tiveram uma pontuação zero, demonstrando assim ausência de dor. Conclui-se então que a técnica de biópsia empregada mostrou-se eficiente na obtenção de um fragmento esplênico sem comprometer a saúde e o bem estar animal.

Palavras-chave: Ultrassom, Tru-cut, Baço.