

5. DISCUSSÃO

5.1 - Ganho de peso corporal

Durante o período da lactação, a prole dos grupos Controle e Tratamento aumentaram seu peso gradativamente, mas o ganho de peso dos filhotes provenientes de mães do grupo Tratamento foi significativamente inferior em relação aos filhotes de mães Controle. Essa redução da massa corpórea indica que a dieta deficiente em proteína foi eficaz em induzir o estado de desnutrição, sugerindo ainda, que a depleção nutricional durante a lactação foi mais prejudicial do que na gestação e esta depleção interferiu de forma negativa no crescimento da prole. Riul et al. (1999) observaram que em animais desnutridos houve modificação na interação mãe-filhote durante o período da lactação. Verificaram que embora o tempo de permanência materna no ninho tivesse sido maior em animais desnutridos, houve uma redução na frequência da amamentação. Em nosso trabalho foi observado nos animais subnutridos uma hiperatividade materna e assistência reduzida à prole. Levitisky e Barnes (1972) mostraram em seu estudo um aumento da atividade locomotora materna durante este período, o que corrobora com o observado em nosso trabalho. Além disso, a dieta hipoprotéica durante a gestação e a lactação reduz a concentração de proteínas e lactose com conseqüências sobre a osmolaridade do leite e seu volume (Grimble et al., 1987; Passos et al., 2000), comprometendo assim, o crescimento adequado dos animais.

Aos 70 dias de idade, os animais do grupo CC apresentaram o peso corporal de $284,52 \pm 8,47$ g, encontrando-se dentro do padrão biométrico esperado para a espécie, segundo Pullen (1976). Assim, ficou constatado que a dieta controle utilizada em nosso experimento garantiu um crescimento ponderal adequado aos animais. Por outro lado, a recuperação nutricional promovida pela administração da dieta normoprotéica aos animais do grupo TC foi parcial, visto que foi ineficaz em restaurar o peso corporal aos valores compatíveis aos do grupo Controle-Controle (CC). Estes dados estão de acordo com Passos et al. (2000), que relataram que mães submetidas à dieta hipoprotéica (8% de PB) influenciaram o peso corporal dos filhotes, mesmo sendo realizada a reposição alimentar com dieta normoprotéica (20% de PB) ao término da lactação. Naquele experimento, o peso corporal da prole desnutrida, medido do nascimento até os 180 dias de idade, apresentou-se mais baixo do que no grupo controle (normoprotéico), semelhante ao resultado observado no presente estudo, embora no nosso trabalho o peso corporal tenha sido aferido apenas até o 70º dia de idade. Para Rabelo et al. (1997), a restrição alimentar durante o

desenvolvimento do animal pode provocar efeitos irreversíveis, dependendo do período e do órgão em desenvolvimento. Se esta restrição se der durante a fase inicial do crescimento do animal, onde há predominância da hiperplasia celular, os animais não alcançarão níveis normais no peso corporal, mesmo após a recuperação nutricional, devido ao decréscimo no número celular.

A dieta hipoprotéica utilizada neste trabalho afetou diretamente o ganho de peso dos animais nas diferentes fases de desenvolvimento. Os animais do grupo CT e TT mostraram, respectivamente, uma massa corporal final 61% e 80% menor que a dos animais do grupo CC. Além da hipoplasia celular (Rabelo et al., 1997), ratos em restrição alimentar mostram redução adaptativa no gasto energético, por mecanismos tais como redução de atividade motora, peso corporal, metabolismo basal, termogênese da gordura marrom e aumento da eficiência energética (Valle et al., 2005).

5.2 - Peso testicular e índice gonadossomático (IGS)

O peso médio dos testículos orquídeos obtido para os animais do grupo CC neste trabalho foi de $1,203 \pm 0,05\text{g}$. Valores semelhantes foram encontrados por Dündar et al. (2005) ao avaliar a expressão de moléculas apoptóticas em testículos de animais com criptorquidismo unilateral. Entretanto, ratos que apresentam ambos os testículos no escroto mostraram o peso testicular mais elevado, sendo de aproximadamente 1,79g (Moura et al., 2006). Segundo Dündar et al. (2005), o número de apoptose das células germinativas no testículo contralateral de um animal criptorquídico é significativamente maior quando comparado com animais que apresentam ambos os testículos no escroto, o que justificaria a redução do peso dos testículos orquídeos deste experimento. No testículo orquídeo, não houve variação do índice gonadossomático entre os tratamentos. Desta forma, conforme será discutido, era de se esperar que o número de células de Sertoli também não se alterasse entre os grupos, pois este parâmetro está altamente correlacionado com o tamanho e peso testicular (Berndtson & Pickett, 1987).

Os resultados encontrados no presente trabalho mostraram que o aumento da temperatura testicular, obtido através do criptorquidismo experimental, reduziu o peso dos testículos em todos os grupos avaliados. Este efeito foi potencializado quando associado à desnutrição protéica, uma vez que os animais que receberam uma dieta deficiente em proteína após o desmame (CT) ou desde a fase pré-natal (TT) apresentaram uma redução ainda mais significativa em seus pesos testiculares aos 70

dias de idade. Para Souza (2003), o peso testicular apresenta alta correlação com o número de células germinativas e concentração espermática e o aumento no peso dos testículos acompanha o crescimento ponderal do animal. Como citado anteriormente, os animais do grupo CT e TT apresentaram um desenvolvimento corporal reduzido, o que poderia justificar os resultados encontrados para os pesos dos testículos orquídeos e criptorquídeos neste trabalho. Além disso, segundo Yin et al. (1999) e Young et al. (2000) a restrição alimentar e a exposição do testículos de ratos e camundongos a temperaturas elevadas causa degeneração do epitélio germinativo, promovendo um aumento da apoptose em espermatócitos e espermátides reduzindo assim o peso testicular desses animais.

Existe uma grande variação para o índice gonadossômico (IGS) em mamíferos e este determina o percentual de massa corpórea alocada no testículo. O trabalho de revisão mais completo neste aspecto, envolvendo mais de 130 diferentes espécies de mamíferos relata que o IGS pode variar de 0,01% em baleias a 8,4% no roedor *Tatera afra* (Kenagy e Trombaluk, 1986). No presente trabalho, o IGS dos animais do grupo TT no testículo criptorquídeo mostrou-se elevado em relação aos demais grupos experimentais. Embora os animais do grupo CT tenham mostrado um peso reduzido, seu índice gonadossômico mostrou-se normalizado em relação ao grupo CC. No entanto, todos os grupos mostraram valores inferiores ao esperado para rato Wistar que é de 0,76 (Rocha et al., 1999). Resultados semelhantes foram encontrados por Genovese et al. (2010) ao avaliar o impacto da desnutrição no desenvolvimento testicular. Estes autores demonstraram que a restrição alimentar comprometeu mais o crescimento corporal que o desenvolvimento dos testículos, o que foi demonstrado por eles por um IGS aumentado. Além disso, como citado anteriormente, o tamanho testicular é proporcional ao número de células de Sertoli presentes nos testículos (Berndtson & Pickett, 1987). Assim atribui-se o IGS aumentado do grupo TT ao maior número de células de Sertoli encontrado neste grupo.

5.3 - Parâmetros testiculares

O diâmetro médio dos túbulos seminíferos do testículo orquídeo no grupo CC foi de aproximadamente 340µm. Este resultado foi semelhante ao observado por Moraes et al. (2009) ao analisar parâmetros testiculares de ratos Wistar adultos. Nos grupos CT e TT, percebeu-se que a deficiência protéica comprometeu o desenvolvimento testicular, mostrando diâmetros tubulares reduzidos. Segundo França e Russell (1998), o diâmetro tubular possui correlação positiva com a atividade

espermatogênica, não sofrendo alterações significativas após o estabelecimento da maturidade sexual, permanecendo aparentemente constante ao longo dos estádios do ciclo do epitélio seminífero. De acordo com Nistal e Paniagua (1996), existem três graus de gravidade relacionados à diminuição do diâmetro tubular: (a) leve, quando essa redução é de até 10% em relação ao diâmetro tubular médio normal para a espécie/idade; (b) marcante, quando a redução está entre 10 e 30%; (c) e grave, quando essa redução for maior que 30%. No presente trabalho, os testículos orquídeos dos animais do grupo CT e TT apresentaram gravidade marcante, uma vez que os diâmetros tubulares médios foram reduzidos em aproximadamente 13% e 22%, respectivamente, quando comparados ao grupo CC.

Da mesma forma, a desnutrição protéica reduziu o diâmetro luminal nos testículos orquídeos nos animais dos grupos CT e TT. Segundo Russell et al. (1989), a produção de fluido testicular, que determina o surgimento do lúmen tubular, ocorre com o encerramento da fase mitótica das células de Sertoli e diferenciação e maturação das mesmas. O estudo realizado por Bansal-Rajbanshi e Mathur (1984) mostrou que a desnutrição protéica durante o período da lactação promoveu alterações morfológicas nas células de Sertoli da prole, compatíveis com a imaturidade funcional destas células neste período. Segundo Bansal-Rajbanshi e Mathur (1984) essas alterações são devido a um atraso no processo de proliferação e maturação dessas células, caracterizadas por uma prolongada fase S da divisão mitótica.

Embora o diâmetro tubular e luminal tenham se mostrado reduzidos nos testículos orquídeos dos animais do grupo CT e TT, não se verificou alteração em relação à altura do epitélio germinativo entre os grupos estudados. Entretanto, no estudo de Ramos et al. (2006) observou-se que os animais que receberam uma dieta hipoprotéica apresentaram alterações histológicas nos túbulos seminíferos, mostrando redução na espessura do epitélio germinativo. A altura do epitélio seminífero, na maioria das espécies domésticas, apresenta pequenas variações relacionadas à composição das associações celulares ou a possíveis alterações no volume das células de Sertoli, variações estas que estão relacionadas aos diferentes estágios do ciclo do epitélio seminífero (França e Russell, 1998).

Ao contrário do observado no testículo orquídeo, não houve diferença no diâmetro tubular, luminal e altura do epitélio seminífero no testículo criptorquídeo entre os grupos experimentais. Este achado nos permite inferir que a desnutrição não influenciou estes parâmetros morfométricos, sugerindo que a elevação da temperatura testicular foi a responsável pela redução dos mesmos. Os dados de Cattelan et al. (2004) corroboram com os resultados deste trabalho, já que em seu estudo os animais

criptorquídicos apresentaram uma redução no diâmetro dos túbulos seminíferos e no número de células espermatogênicas.

5.4 - Morfologia Tubular

A análise histológica dos testículos orquídeos dos animais dos grupos CC, CT e TC, aos 70 dias pós-natal, demonstrou que neles foi possível identificar todos os XIV estádios do ciclo do epitélio seminífero, pelo sistema acrossômico, visto que todas as células germinativas, até as espermátides alongadas da etapa 19, estavam presentes. Entretanto, nos animais do grupo TT, foram caracterizados até o estágio XII uma vez que a célula germinativa mais avançada foi a espermátide alongada da etapa 12. Segundo Russel et al. (1990), a identificação dos diferentes estágios do ciclo do epitélio seminífero é essencial para a realização de estudos quantitativos da espermatogênese. Isto é, a capacidade de identificar os estádios é importante para a compreensão da espermatogênese normal bem como para a determinação de fases específicas do processo que possam ser afetadas por um determinado tratamento ou droga.

Não foram observadas alterações morfológicas evidentes nas células germinativas e somáticas do epitélio seminífero em nenhum dos grupos experimentais avaliados, inclusive no grupo TT onde a eficiência protéica afetou quantitativamente a espermatogênese. Entretanto, Said et al. (1976) e Karaca et al. (2003) observaram que a desnutrição protéica pode causar um efeito muito mais drástico no epitélio seminífero. Através de exame histológico de testículo de ratos, estes autores observaram que a espermatogênese foi interrompida no estágio de espermatogônia em ratos nutridos com dieta sem proteínas (Said et al., 1976), e no estágio de espermátócitos primários e secundários em ratos com dieta com 3% de proteína (Karaca et al., 2003). Segundo esses autores, a desnutrição protéica afetou adversamente a função testicular, e ainda que a natureza e a severidade desses efeitos dependem da duração do estado de deficiência nutricional. Com os nossos resultados podemos deduzir que o protocolo de desnutrição empregado no grupo TT afetou quantitativamente a espermatogênese, interferindo na diferenciação e progressão das células germinativas.

A análise morfológica dos túbulos seminíferos dos testículos criptorquídicos foi semelhante em todos os grupos estudados. A técnica cirúrgica utilizada neste experimento garantiu que os testículos criptorquídicos apresentassem as mesmas alterações histológicas obtidos por Lima et al. (2003) ao induzir o criptorquidismo pela secção do gubernáculo. No experimento desenvolvido por Lima et al. (2003),

observou-se uma diminuição significativa do diâmetro tubular, redução no número de células germinativas no epitélio seminífero e ausência de espermatozóides no lúmen tubular. No presente trabalho, os túbulos seminíferos dos animais criptorquídicos de todos os grupos experimentais mostraram como células germinativas mais avançadas espermatócitos em paquíteno. O trabalho desenvolvido por Dündar et al. (2005) mostrou que a elevação da temperatura testicular promoveu um aumento das apoptoses, principalmente na linhagem de células spermatocitárias, uma vez que a expressão de moléculas apoptóticas foram identificadas principalmente nestes tipos celulares e desta forma também exibiram túbulos seminíferos com espermatócitos em paquíteno como células germinativas mais diferenciadas. Além disso, é descrito que o criptorquidismo pode diminuir a expressão das moléculas p34^{cdc2} e ciclina B1, envolvidas na progressão do ciclo celular meiótico e mitótico das células germinativas, estando entre elas, os espermatócitos primários em paquíteno e diplóteno (Kong et al., 2000).

Os resultados obtidos demonstram que no testículo orquídeo a desnutrição afetou a progressão das células germinativas, que alcançaram até a fase de espermátide alongada 12, mas que a elevação da temperatura agravou este efeito visto que, nesta situação, as células germinativas alcançaram apenas a fase de espermatócitos primários em paquíteno, em todos os grupos independente da dieta.

5.5 – Células germinativas

Espermatogônias

No testículo orquídeo, a dieta hipoprotéica reduziu o número espermatogonial nos animais do grupo CT, TT e TC. Esta redução foi mais acentuada nos animais do grupo TT que mostraram aproximadamente 73% menos espermatogônias que o grupo CC. Dados da literatura mostram que vários fatores participam do processo de proliferação e diferenciação espermatogonial e dentre eles está a testosterona, que atua provavelmente via células de Sertoli, uma vez que as células germinativas não apresentam receptores para andrógenos (Bremner et al. 1994). McLachlan et al. (1994) demonstraram em seu trabalho que a supressão da síntese de testosterona promoveu uma redução do epitélio germinativo, diminuindo em 60% o número de espermatogônias e espermatócitos. Segundo Zambrano et al. (2005) a desnutrição protéica nos diferentes estágios do desenvolvimento reduziu a síntese de testosterona em ratos aos 70 dias de idade, mesmo quando ocorreu a reabilitação nutricional no

animal. No presente trabalho, os resultados referentes às células de Leydig mostraram que este tipo celular mostrou-se reduzidos nos animais do grupo CT, TT e TC, o que pode ter diminuído a síntese de andrógenos e redução no número espermatogonial.

Já no testículo criptorquídico, a desnutrição protéica não interferiu na proliferação das células espermatogoniais, uma vez que o número destas células foi semelhante em todos os grupos experimentais. Entretanto, este número mostrou-se reduzido quando comparado com o testículo orquídico em todos os grupos experimentais, mostrando que a temperatura influenciou no número final deste tipo celular. Exceção apenas aos animais do grupo TT que exibiram valores próximos em ambos os testículos estudados. Resultados semelhantes foram encontrados por Zhang et al. (2002) ao avaliar o efeito do criptorquidismo experimental e subsequente orquidopexia sobre o desenvolvimento do epitélio germinativo. Estes autores observaram que o número espermatogonial reduziu em 84% em comparação com o testículo presente no escroto. Em nosso experimento essa redução foi de 73% nos animais do grupo CC. Segundo Dündar et al. (2005) esta redução está associada a um aumento na expressão de moléculas pro-apoptóticas como a Bax, logo após a indução do criptorquidismo unilateral. Camundongos transgênicos, que não expressam o gene envolvido com a síntese da Bax mostraram hiperplasia espermatogonial, sugerindo que esta é uma das principais vias envolvidas na apoptose das células espermatogoniais (Knudson et al., 1995, Russell et al., 2002) Além disso, segundo (Kong et al., 2000) o aumento da temperatura testicular impede a tradução das proteínas p34^{cdc2} e ciclina B1 envolvidas no ciclo celular mitótico espermatogonial.

Espermatócitos e espermátides

Pelos resultados obtidos neste trabalho, observamos que a depleção dos espermatócitos no testículo orquídico está relacionada com o período em que ocorreu a deficiência nutricional. Nos animais do grupo TT, houve uma redução mais expressiva, seguida pelos animais do grupo CT. Já os animais do grupo TC, embora tenham apresentado um número maior de espermatócitos, estes não conseguiram alcançar valores semelhantes ao grupo CC. Segundo Young et al. (2000) animais submetidos à privação alimentar apresentaram uma regressão do epitélio seminífero e expressaram uma maior fragmentação do DNA nas células germinativas, uma alteração relacionada ao processo apoptótico. Além disso, segundo Sharpe et al. (1994), a ocorrência de apoptose pode ser também um mecanismo induzido pelas células de Sertoli para limitar o número de células germinativas a uma quantidade que pode ser suportada por elas. Bansal-Rajbanshi e Mathur (1984) mostraram que a

desnutrição protéica durante o período da lactação atrasa o processo de maturação da célula de Sertoli e dados do presente trabalho mostraram que a capacidade de suporte destas células foi reduzida nos animais que receberam uma dieta hipoprotéica, desde o período pré-natal (grupo TT).

Sabendo que o número de espermátides está correlacionado com o número de espermatócito presente no epitélio germinativo e que estes últimos mostraram-se reduzidos pela restrição protéica nos animais do grupo CT, TT e TC constatamos, como era esperado, que o número de espermátides foi reduzido nos grupos experimentais avaliados, principalmente no TT. Dados obtidos no presente experimento mostraram uma perda celular de 41% durante o processo meiótico dos animais TT, acima do que é normalmente esperado para a maioria dos animais, que é de 25% (França e Russell, 1998).

O número de espermatócitos presentes no epitélio germinativo foi reduzido em todos os grupos experimentais no testículo criptorquídico, sendo mais acentuado nos animais TC. Esta redução acentuada poderia ser atribuída a uma maior expressão de moléculas apoptóticas como a P53 e Bax nestas células germinativas em decorrência do aumento da temperatura testicular (Yin et al., 1997; Dündar et al., 2005). A ausência de espermátides arredondadas no testículo criptorquídico deve-se à redução na síntese de proteínas envolvidas na progressão do ciclo celular mitótico e meiótico como a p34^{cdc2} e ciclina B1. A ausência destas proteínas impediu a proliferação e diferenciação das espermatogônias e de espermatócitos primários em estágio de paquíteno/diplóteno (Kong et al., 2000).

5.6 – Células Somáticas

Células de Sertoli

Pode-se perceber que a restrição protéica desde o período pré-natal (TT), após o desmame (CT) ou somente pré-natal (TC) não influenciou no número final das células de Sertoli nos ratos adultos, uma vez que estes apresentaram valores numéricos semelhantes ao grupo controle (CC), que recebeu a ração normoprotéica durante toda a sua vida. O número de células de Sertoli nos testículos orquídico obtidos no presente trabalho para o todos os grupos experimentais foi semelhante àquele encontrado por Sharpe et al. (2000) que avaliaram o efeito neonatal de gonadotrofinas sobre o desenvolvimento testicular e no número final de células de Sertoli. Genovese et al. (2010) obtiveram resultados diferentes ao avaliar o

desenvolvimento testicular em animais desnutridos desde a fase pré-natal. Aos 100 dias de idade, os animais desnutridos apresentaram uma redução significativa no número de células de Sertoli quando comparado com o grupo controle. Essa diferença pode ser atribuída ao protocolo utilizado por Genovese et al. (2010), onde os animais do grupo tratado receberam somente 33,5% da quantidade de ração distribuída ao grupo controle, caracterizando assim, uma deficiência nutricional generalizada e não específica, como em nosso experimento. Estudos mostram que a deficiência protéica durante a gestação e lactação promove uma redução nos níveis dos hormônios tireoidianos no período neonatal, retarda o ciclo mitótico das células de Sertoli e atrasa a maturação sexual em machos (Bansal-Rajbanshi e Mathur, 1984; Ramos et al., 1997; Zambrano et al., 2005). Desta forma, podemos atribuir a essas alterações a normalidade no número de células de Sertoli nos animais do grupo TT. Embora o hipotireoidismo prolongue a fase mitogênica destas células (França et al., 1995), a desnutrição protéica reduz a taxa de proliferação das células de Sertoli (Bansal-Rajbanshi e Mathur, 1984) atrasando o início da puberdade e a maturação sexual da prole, uma vez que o período de encerramento da fase mitótica das células de Sertoli coincide com o início de proliferação dos espermatoócitos primários (Russell et al., 1989).

Nos testículos criptorquídicos, os animais do grupo (CC, CT e TC) apresentaram números reduzidos de células de Sertoli em comparação com os testículos orquídeos. Dados semelhantes foram obtidos por Monet-Kuntz et al (1987) ao avaliar o efeito do criptorquidismo experimental sobre a funcionalidade dos túbulos seminíferos. Naquele experimento, Monet-Kuntz et al. (1987) observaram que o aumento da temperatura testicular reduziu a concentração de receptores para FSH nas células de Sertoli nos animais criptorquídicos. O FSH é uma glicoproteína que se liga a receptores específicos localizados na membrana plasmática das células de Sertoli, sendo considerado como o principal fator mitogênico para estas células (França e Chiarini-Garcia, 2005). No presente estudo, resultados que podem ser considerados surpreendentes foram encontrados para os animais do grupo TT, que mostraram um número elevado de célula de Sertoli aos 70 dias de idade em comparação com os demais grupos estudados. Como citado anteriormente, a prole proveniente de mães desnutridas desde o período pré-natal apresentaram um hipotireoidismo neonatal, o que pode aumentar a fase proliferativa das células de Sertoli (França et al., 1995). Embora os animais desnutridos mostrem um atraso na progressão do ciclo mitótico das células de Sertoli, estudos sugerem que em situações onde há um aumento da temperatura tecidual, há uma aceleração no ciclo mitótico devido a uma maior expressão de ciclinas D₁, proteínas envolvidas na progressão da

fase G₁ do ciclo celular (Bansal-Rajbanshi e Mathur, 1984; Han et al., 2002). Estes fatores podem ter contribuído para os achados nos animais TT do presente trabalho. Da mesma forma, era de se esperar que os animais do grupo TC também apresentassem um número maior de células de Sertoli, no entanto, mostrou valores semelhantes ao grupo CC. Hess et al. (1993) e Ramos et al. (1997) observaram que após o desmame, a reabilitação nutricional garantiu níveis normais dos hormônios tireoideanos nos animais previamente desnutridos, o que pode ter cessado o período mitogênico das células de Sertoli nos animais TC. Já nos animais CT, a introdução da dieta hipoprotéica após o desmame (21 dias) coincidiu com o encerramento da fase mitótica das células de Sertoli, uma vez que em ratos e camundongos, a proliferação destas células ocorre principalmente na fase final do período fetal e se entende por duas a três semanas após o nascimento (Vergouwen et al., 1991).

Células de Leydig

Os dados apresentados no presente estudo mostraram que a dieta hipoprotéica teve influência nas células de Leydig no testículo orquídeo, mostrando que seu número estava reduzido nos animais do grupo CT, TT e TC, sendo que a redução foi mais acentuada nos ratos que foram expostos à ração hipoprotéica durante toda a sua vida (TT). O número de células de Leydig obtido para o grupo CC foi semelhante ao encontrado por Gomes (2007) ao avaliar a função testicular de ratos tratados com infusão aquosa de catuaba. Tem sido demonstrado que a dieta hipoprotéica durante a gestação e lactação, ou após o desmame, reduz a concentração de hormônios hipofisários na prole aos 70 dias de idade mesmo quando há a reabilitação nutricional após o desmame (Zambrano et al., 2005). O trabalho desenvolvido por Zambrano et al. (2005) também mostrou que as concentrações séricas de LH, em ratos adultos, foram diferentes dependendo do tipo de exposição que ele tiveram à dieta hipoprotéica em relação aos períodos pré-natal, pós-natal e desmame. Eles constataram que a concentração de LH mais baixa foi encontrada naqueles animais que foram submetidos à desnutrição protéica desde o período pré-natal e até a idade adulta. No presente trabalho observamos que os ratos submetidos ao mesmo tratamento, no mesmo período, foram justamente aqueles que apresentaram o menor número de células de Leydig por testículo. De fato, é sabido que no desenvolvimento gonadal o LH atua na proliferação das células de Leydig e que vai interferir no seu número na vida adulta (Nistal et al., 1986).

O número de células de Leydig no testículo criptorquídico mostrou-se semelhante em todos os grupos avaliados, mas reduzido quando comparado com o

testículo orquídeo. Exceção somente os animais do grupo TT que apresentaram valores próximos em ambos os testículos estudados. Deste modo, acreditamos que o menor número de células de Leydig deve ser atribuído essencialmente à elevação da temperatura testicular, uma vez que os animais que receberam dietas hipoprotéicas apresentaram número de células de Leydig semelhante ao do grupo controle (CC). Estes dados estão de acordo com os resultados encontrados por Lunstra et al. (1988) que mostraram que a elevação da temperatura testicular reduziu o número das células de Leydig em animais criptorquídicos. Segundo Shikone et al. (1986) a expressão de receptores para LH é significativamente reduzida nas células de Leydig em animais submetidos ao criptorquidismo experimental e como citado anteriormente, o LH participa do processo de proliferação deste tipo celular. Além disso, fatores de crescimento secretados por macrófagos presentes no espaço peritubular estão envolvidos no desenvolvimento e proliferação das células de Leydig (Mendis-Handagama e Ariyaratne, 2001) e estes mostraram-se reduzidos em todos os grupos experimentais no testículo criptorquídico, sendo mais acentuado nos animais CT e TT. Bergh (1985) mostrou que o tamanho e o número de células de Leydig e macrófagos alteram de forma similar em animais criptorquídicos, o que foi encontrado no presente trabalho.

5.7 - Razões Celulares

As razões numéricas entre espermatogônias A e os demais tipos celulares por secção transversal de túbulos constituem uma forma bastante acurada de se estimar o coeficiente de eficiência do processo espermatogênico. Isto permite comparações entre diferentes espécies, uma vez que é possível localizar as fases onde ocorrem perdas celulares e, inclusive, quantificá-las em termos percentuais (França e Russell, 1998). Neste estudo, a deficiência protéica não interferiu no coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais, uma vez que o número de pré-leptótenos originados a partir de uma espermatogônia A₁ foi semelhante nos diferentes grupos experimentais. Ao avaliar a morfologia e a cinética da degeneração espermatogonial, Huckins (1978) demonstrou que em ratos há uma redução de 75% do número de espermatócitos em pré-leptótenos provenientes da divisão da espermatogônia A₁. Em nosso trabalho, a perda média em tal condição foi de apenas 42%, mostrando que a desnutrição não interferiu no processo mitótico das células espermatogoniais.

Para França e Russell (1998), a maior perda celular, na maioria dos mamíferos, ocorre durante a fase de divisões meióticas como um mecanismo de eliminação de

células com cromossomos anormais ou aberrações. O rendimento meiótico dos animais do grupo TT (razão entre espermátides arredondada e espermatócitos em paquíteno) foi de 2,35:1, equivalendo a uma perda de 41% de espermátides arredondadas quando se compara com a razão teórica esperada (4:1). Segundo França e Russell (1998), normalmente essa perda é da ordem de 25% na maioria dos animais, o que corrobora com os achados deste estudo para os animais do grupo CC, CT e TC que apresentaram em média uma perda de 23%. A ocorrência de apoptose pode ser também um mecanismo para limitar o número de células germinativas a uma quantidade que pode ser suportada pelas células de Sertoli disponíveis (Sharpe, 1994).

No presente trabalho determinou-se que o número de espermátides arredondadas para cada célula de Sertoli no grupo CC foi de $9,29 \pm 0,80$, semelhante ao observado por Moura et al (2006). Os resultados por nós obtidos mostraram que a desnutrição protéica comprometeu a capacidade de suporte das células de Sertoli, principalmente nos animais do grupo TT, estando diminuída em 63% quando comparada com o grupo CC. Segundo França e Russell (1998), o índice de células de Sertoli é o melhor reflexo da eficiência funcional deste tipo celular. Estudo realizado por Herbert e Weaker (1983) mostrou que em animais submetidos à desnutrição, a maturidade funcional das células de Sertoli mostrou-se prejudicada aos 50 dias pós-natal. Sabe-se que essas alterações são devidas a um atraso no processo de proliferação e maturação dessas células, caracterizado por uma prolongada fase S da divisão mitótica em animais desnutridos (Bansal-Rajbanshi e Mathur, 1984). O índice de células de Sertoli varia consideravelmente entre as espécies e, normalmente, quando a relação células de Sertoli/espermátides arredondadas é alta, a produção espermática diária também é alta, pois a habilidade das células de Sertoli em suportar espermátides é altamente correlacionada com a produção espermática diária (França & Russell, 1998). Nos animais do grupo CT e TC, embora a capacidade de suporte tenha mostrado ligeiramente diminuída, a célula de Sertoli garantiu a eficiência de produção espermática nestes animais, uma vez que o rendimento geral da espermatogênese foi semelhante ao grupo CC.

Caso o rendimento geral da espermatogênese fosse 100%, ou seja, se não houvesse perdas celulares durante todo o processo espermatogênico, uma espermatogônia A₁ através de divisões mitóticas e divisões da meiose deveria gerar 256 espermátides, que iriam se diferenciar em igual número de espermatozóides (Costa e Paula, 2006). Nossos resultados mostram que a dieta hipoprotéica no período pré-natal ou após o desmame não comprometeu a fertilidade dos animais do grupo CT e TC, já que o rendimento geral da espermatogênese em média 95,62

espermátides arredondada foram originadas a partir de uma espermatogônia, semelhante ao encontrado para o grupo CC. A perda celular nos grupos CC, CT e TC foi de aproximadamente 63%. Já os animais do grupo TT apresentaram uma produção espermática baixa (48,16) o que representa uma depleção de aproximadamente 81% das células germinativas durante o processo espermatogênico. A literatura disponível para mamíferos cita que, de maneira geral, somente em torno de 15 a 50% dos espermatozoides teoricamente esperados são produzidos, mas que em ratos essa produção é de 35% (Huckins, 1978; Castro et al., 1997; França e Russell, 1998; Swerdloff et al., 1998).