UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA

EFEITO DA DESNUTRIÇÃO PROTÉICA PRÉ E PÓS-NATAL NA ESPERMATOGÊNESE DE RATOS ADULTOS

Mestrando: Michelle Carolina de Melo

Orientador: Hélio Chiarini-Gracia

Belo Horizonte - MG
2010

MICHELLE CAROLINA DE MELO

EFEITO DA DESNUTRIÇÃO PROTÉICA PRÉ E PÓS-NATAL NA ESPERMATOGÊNESE DE RATOS ADULTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Biologia Celular Orientador: Dr. Hélio Chiarini-Garcia.

Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas – UFMG
2010

Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE

Michelle Carolina de Melo

195/2010/05
entrada
1°/2008
2008679106

Às **dez horas** do dia **23 de abril de 2010** reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: **"Efeito da desnutrição protéica pré e pós-natal na espermatogênese de ratos adultos"**, requisito final para obtenção do Grau de Mestre em Biologia Celular, área de concentração: **Biologia Celular.** Abrindo a sessão, o(a) Presidente da Comissão, **Dr. Hélio Chiarini-Garcia**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao(a) candidato(a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Hélio Chiarini-Garcia	UFMG	aprovada
Dra. Adelina Martha dos Reis	UFMG	aprovada
Dr. Nilo Bazzoli	PUC/MG	aprovado
Dra. Fernanda R. C. L. de Almeida	UFMG	aprovada

Pelas indicações, o(a) candidato(a) foi considerado(a): Aprovada
O resultado final foi comunicado publicamente o(a) candidato(a) pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 23 de abril de 2010.**

Dr. Hélio Chiarini Garcia _____
(Orientador)

Dra. Adelina Martha dos Reis _____

Dr. Nilo Bazzoli _____

Dra. Fernanda R. C. L. de Almeida _____
(Co-orientadora)

Profa. Denise Carmona Cara Machado
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, ICB/UFMG

TABELIONATO TRONCHELLI
3º Ofício de Notas

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Dedico este trabalho ao meu pai,
que sempre senti ao meu lado durante todos os
momentos de minha vida. Sei que onde estiver,
está orgulhoso de ver mais esta etapa vencida.
Afinal você fez, faz e sempre fará parte de
minha história.
Saudades!

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre se fez presente em todos os momentos da minha caminhada e me possibilitou mais esta etapa importante da minha vida;

Ao Prof. Hélio Chiarini-Garcia e Fernanda Almeida pela compreensão, dedicação, ética profissional e, sobretudo pela orientação e oportunidade de trabalhar em seu laboratório, proporcionando um crescimento científico e cultural;

À minha mãe, pelo grande exemplo de mulher, por todos momentos dedicado a mim, pelas palavras, pelos conselhos, pelo amor, pela honestidade, pelo afeto e pela amizade;

Ao meu namorado Igor e sua família, pelo amor, cuidado, força e compreensão nesta caminhada;

Aos meus irmãos: Marco, Camila, Tiago e Dudu, com os quais sei que sempre poderei contar;

À minha sobrinha, Maria Eduarda, por me fazer sentir um amor jamais sentido antes;

A todos meus amigos, principalmente à Joyce, pelo apoio e confiança constante;

À minha querida amiga Aninha da Vet., que sempre fez meus dias na faculdade melhores, por aguentar tantas bobagens ditas e pela amizade sincera;

Aos meus amigos do Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução: Chico, Amanda, Felipe, Carol, Paulinha, Letícia, Débora, Lú e Ana Luiza pelo acolhimento, sabedoria e por fazerem os dias de trabalho menos exaustivos;

Aos amigos da disciplina de Biologia Celular e de todas as disciplinas cursadas, pela amizade e conhecimento;

A todos os professores da Biologia Celular, pelo aprendizado;

Um agradecimento extensivo a todos que participaram direta e indiretamente deste trabalho e acreditaram em mim.

Obrigada a todos!

“É melhor lançar-se à luta em busca de triunfo, mesmo expondo-se ao insucesso, do que fazer fila com os pobres de espírito, que por viverem nessa penumbra cinzenta, nem sofrem muito nem gozam muito e, não conhecem vitória nem derrota.”

Franklin Delano Roosevelt.

Esta dissertação foi realizada no Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação do prof. Hélio Chiarini-Garcia e com o auxílio parcial das seguintes instituições:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig)

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo investigar os efeitos da deficiência protéica no processo espermatogênico de ratos adultos submetidos à desnutrição protéica em diferentes fases do seu desenvolvimento, associada ou não à elevação da temperatura testicular. Desde cinco semanas antes do acasalamento, ratas Wistar receberam ração normoprotéica (20% PB, grupo C) ou hipoprotéica (8%PB, grupo T) até o desmame dos seus filhotes. Ao desmame (21 dias pp), todos os filhotes foram submetidos à laparotomia para fixação do testículo direito à parede abdominal, evitando assim o descenso do mesmo para o escroto. Em seguida, os filhotes das mães C e T foram divididos em quatro grupos e alimentados da seguinte maneira: filhotes das mães C passaram a receber dieta normoprotéica (CC) e outros a receber dieta hipoprotéica (CT) e filhotes das mães T passaram a receber dieta hipoprotéica (TT) e outros a receber dieta normoprotéica (TC). Os animais foram pesados semanalmente e seu consumo alimentar registrado até a eutanásia, aos 70 dias de idade, quando foram pesados, anestesiados, e os testículos fixados em glutaraldeído a 5% em tampão fosfato (0,1M - pH 7,4) por perfusão intravascular. Posteriormente, os testículos foram retirados e pequenos fragmentos incluídos em resina plástica para avaliação sob microscopia de luz. Verificou-se que a deficiência protéica, independente do período em que ocorreu, promoveu uma redução na ingestão alimentar dos animais, o que refletiu na redução do peso corporal. O índice gonadossomático do grupo TT foi significativamente maior no testículo criptorquídico quando comparado com os demais grupos, mostrando que a desnutrição desde o período pré-natal comprometeu mais o peso corporal que o testicular. Apenas nos animais do grupo TT, a espermatogênese no testículo orquídico foi interrompida nas espermátides da etapa 12. Já no testículo criptorquídico, as células germinativas mais avançadas encontravam-se na fase de paquíteno, em todos os grupos experimentais. Observou-se redução no número de espermatogônias, espermatócitos e espermátides nos grupos que em algum momento receberam a dieta hipoprotéica sendo mais acentuada nos animais desnutridos desde o período pré-natal. Além disso, de forma inesperada, o aumento da temperatura testicular aumentou o número de células de Sertoli neste grupo. Ao avaliar o rendimento geral da espermatogênese, verificou-se que no grupo TT a capacidade de suporte das células de Sertoli foi reduzida, que houve aumento da perda de células germinativas durante a meiose e uma redução no número de espermátides produzidas a partir de uma espermatogônia do tipo A_1. Os resultados por nós obtidos mostraram que a desnutrição protéica não agrava os efeitos ocasionados pelo aumento da temperatura testicular. No entanto, no testículo presente no escroto a desnutrição provoca modificações significativas em vários parâmetros testiculares de ratos adultos, principalmente naqueles animais que foram expostos à ração hipoprotéica nos períodos pré- e pós-natal, acarretando uma redução significativa na produção espermática diária.

ABSTRACT

This study investigated the effects of pre- and postnatal protein deficiency on the spermatogenic process in adult rats, associated or not with the increase in testicular temperature. Female Wistar rats received a normoproteic (20% CP, group C) or a hipoproteic (8% CP, group T) diet from five weeks before mating until weaning their pups (three weeks after farrowing). After weaning , all pups were subjected to unilateral cryptorchidic surgery to tie the right testis to the abdominal wall, and were divided into four groups, as follows: a) Group CC: pups from group C mothers that received the normoproteic diet; b) Group CT: pups from group C mothers that received the hipoproteic diet ; c) Group TT: pups from group T mothers that received the hipoproteic diet; and d) Group TC: pups from group T mothers that received the normoproteic diet . The animals were weighed weekly and their feed consumption registered until euthanasia, at 70 days of age, when they were weighed, anesthetized and their testes fixed with a 5% glutaraldehyde in phosphate buffer (0, 1 m-pH 7.4) solution by intravascular perfusion. Testes were removed and fragments included in plastic resin for evaluation under light microscopy. It was verified that protein deficiency, independent of the period in which it occurred, led to a reduction in feed intake which reflected on their body weight gain. The gonadossomatic index was significantly greater in the criptorchidic testicle of the TT group when compared to the other groups showing that pre-natal malnutrition affected more body weight than the testicular weight. The spermatogenesis in the orchidic testicle was interrupted in the spermatids at step 12 only in the animals of the TT group. However, the more advanced germ cells in the criptorchidic testicle were found in the pachytene phase, in all experimental groups. A reduction in the number of spermatogonia, spermatocytes and spermatids was observed in the groups that, at some stage, received the hipoproteic diet and this reduction was more pronounced in the TT group. Moreover, unexpectedly, the raise in the testicular temperature increased the number of Sertoli cells on that group. When assessing the overall efficiency of spermatogenesis, it was found that the capacity to support Sertoli cells was reduced, the loss of germ cells during meiosis was increased and the number of spermatids produced from a spermatogonia type A_1 was also reduced in the TT group. These results show that protein malnutrition does not aggravate the effect caused by increase of the testicular temperature. However, in the testis present into the scrotum undernourishment provokes significant changes in several testicular parameters of adult rats, specially in those animals subjected to this deficiency in the pre- and post-natal periods, which resulted in a significant reduction in the daily spermatic production.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ilustração mostrando a localização ectópica do testículo em indivíduos criptorquídicos.....7

Figura 2 - Fotomicrografias de esfregaços vaginais mostrando as diversas fases do ciclo estral de ratas.....13

Figura 3 - Fotomicrografia de esfregaço vaginal mostrando a presença de espermatozóides.....15

Figura 4 - Diagrama mostrando o delineamento dos grupos experimentais.....16

Figura 5 - Gráfico mostrando a curva de ganho ponderal dos filhotes machos durante o período da lactação em ambos os grupos experimentais.....24

Figura 6 - Gráfico mostrando a curva de ganho ponderal dos filhotes após o desmame nos diferentes grupos experimentais.....25

Figura 7 - Fotomicrografia de secções transversais de túbulos seminíferos mostrando as alterações histológicas encontradas nos diferentes grupos experimentais.....27

Figura 8 - Gráfico mostrando as diferenças nos parâmetros testiculares avaliados aos 70 dias de idade nos diferentes grupos experimentais.....28

Figura 9 - Fotomicrografia de secções transversais de túbulos seminíferos mostrando as alterações encontradas nos testículos orquídicos e criptorquídicos nos diferentes grupos experimentais.....29

Figura 10 - Gráfico mostrando o número espermatogonial nos diferentes grupos experimentais.....32

Figura 11 - Gráfico mostrando o número de espermatócitos nos diferentes grupos experimentais.....33

LISTA DE TABELAS

1- Características citológicas das diferentes fases do ciclo estral em roedores.....12

2- Informações nutricionais da ração AIN-93G utilizada no experimento.....14

3- Contagem de diferentes números de campos (10, 15 e 20) e a (%) porcentagem ocupada pelas células avaliadas no testículo.....20

4- Diâmetros nucleares de células germinativas nos estágios de I a V pelo sistema acrossômico.....20

5- Peso testicular (em gramas) e índice gonadossomático (IGS) dos animais dos grupos experimentais aos 70 dias de idade.....26

6 - Proporção volumétrica dos componentes do parênquima testicular.....30

7- Número de células de Sertoli e Leydig em milhões do parênquima testicular dos diferentes grupos experimentais.....31

8 - Número de espermátides arredondadas em milhões presente no epitélio seminífero dos diferentes grupos experimentais.....33

9 - Rendimento geral da espermatogênese nos diferentes grupos experimentais.....34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C – Controle

CC – Controle-Controle

CEBIO– Centro de Bioterismo

CES – Ciclo do Epitélio Seminífero

CETEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal

CGRP – Peptídeo relacionado ao Gene da Calcitonina

CRIPTO – Criptorquídico

CT– Controle-Tratamento

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

EPM – Erro padrão da média

EA – Espermátide Arredondada

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

GFN – Nervo Genitofemoral

GnRH – hormônio liberador de gonadotrofina

ICB – Intistuto de Ciências Biológicas

IGS – Índice gonadossomático

INSL3 – insulin-like factor 3

LH – hormônio luteinizante

MIH – Hormônio anti-Mulleriano

NC – Número Absoluto de cada tipo celular/testículo

OMS – Organização Mundial da Saúde

ORQUI – Orquídico

PB – Proteína Bruta

PQT - Paquíteno

PT – Peso Testicular

R – Radical

RNA – Ácido Ribonucléico

SRL – Snout-Rump Length

T – Tratamento

TC – Tratamento-Controle

TT – Tratamento-Tratamento

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

Vn – Volume Nuclear médio de cada tipo celular

VT – Volume do Parênquima Testicular

Vvc – Proporção Volumétrica dos diferentes tipos celulares

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....1
1.2. Objetivo.....3
1.2.1. Objetivo geral.....3
1.2.2. Objetivos específicos.....3

2. REVISÃO DE LITERATURA.....4
2.1. Organização testicular e espermatogênese.....4
2.2. Quantificação da espermatogênese.....5
2.3. Criptorquidismo.....6
2.4. Efeitos do aumento da temperatura testicular.....8
2.5. Nutrição e Programação Fetal na Reprodução.....8
2.6. Nutrição e Reprodução.....10

3. METODOLOGIA.....12
3.1. Fase Pré-Experimental.....12
3.2. Preparação dos grupos experimentais e gestação.....13
3.3. Lactação e criptorquidismo experimental.....15
3.4. Grupos experimentais e eutanásia.....16
3.5. Preparação dos testículos para análises histológicas.....17
3.6. Análise morfométrica.....18
3.6.1. Avaliação do diâmetro tubular e luminal e altura do epitélio seminífero.....18
3.6.2. Número absoluto de células de Sertoli, espermatogônias, espermatócitos, espermátides, células de Leydig e macrófago.....18
3.6.3. Razões entre números celulares do epitélio seminífero.....22
3.7. Análise Estatística.....23

4. RESULTADOS.....24
4.1. Crescimento dos filhotes durante a lactação.....24
4.2. Crescimento corporal dos machos após o desmame.....24
4.3. Peso testicular e índice gonadossomático (IGS).....25
4.4. Morfologia Tubular.....26
4.5. Diâmetro tubular, diâmetro do lume e altura de epitélio.....28
4.6. Proporção Volumétrica dos componentes testiculares.....30
4.7. População de células somáticas do parênquima testicular.....30
4.8. Número de células espermatogênicas.....31
4.9. Razões Celulares.....34

5. DISCUSSÃO.....35
5.1. Crescimento ponderal.....35
5.2. Peso testicular e índice gonadossomático (IGS).....36
5.3. Parâmetros testiculares.....37
5.4. Morfologia Tubular.....39
5.5.Células Germinativas.....40
5.6 Células Somáticas.....42
5.7. Razões Celulares.....45

6. CONCLUSÃO.....48

7. REFERÊNCIAS.....49

8. ANEXOS:
8.1. Aprovação do Comitê de Ética.....58
8.2. Crescimento ponderal das mães e consumo de ração no período pré-gestacional, na gestação e lactação.....59

1. INTRODUÇÃO

A desnutrição é definida como um desequilíbrio entre o suprimento de nutrientes e energia e a demanda corporal e do inadequado aproveitamento biológico dos alimentos ingeridos, devido à má absorção ou por infestação de parasitas (Martins et al., 2008). Embora ela possa atingir grupos de todas as idades, a desnutrição afeta principalmente crianças, gestantes e lactantes e está envolvida em mais de 50 % de todas as mortes de crianças menores de 5 anos em países subdesenvolvidos (WHO, 2004). As conseqüências da desnutrição para o organismo são variadas, entretanto, desde as formas leves às mais severas, é constante o comprometimento do crescimento (Douglas, 2002).

No transcorrer do crescimento animal (fases pré e pós- natal), os níveis de RNA, DNA e proteínas variam de acordo com os diferentes órgãos, nas diversas etapas do seu desenvolvimento. 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 multiplicação celular, os animais não alcançarão níveis normais no peso de alguns órgãos, mesmo após a recuperação nutricional, devido ao decréscimo no número de células (Rabelo, 1997).

Nos estados carenciais, sobretudo crônicos, a ausência de determinados substratos repercutem sobre o equilíbrio dinâmico normal, demonstrando com isso, uma hierarquia bioquímica que é imperceptível quando o organismo se mantém em homeostase. Dentro dessa hierarquia, destacam-se as proteínas, devido à sua importante participação nas estruturas de órgãos e tecidos, de sua atuação na síntese enzimática e na síntese de hormônios protéicos, estando, portanto, presente na quase totalidade das reações metabólicas (Trindade et al., 1986).

Durante a gestação, a disponibilidade protéica representa um fator crítico à boa saúde e à sobrevivência fetais. Os aminoácidos provenientes da dieta são, em parte, direcionados à síntese protéica fetal e em situações de privação alimentar crônica, ocorre uma mobilização das proteínas maternas com o objetivo de manter constante o suprimento desses aminoácidos para o feto (Remesar et al., 1987).

Observações epidemiológicas das associações entre a nutrição nos estágios embriológicos iniciais e o risco do desenvolvimento de doenças na fase adulta têm estimulado as investigações sobre as bases biológicas da chamada programação pré-natal (acontecimentos na vida intra-uterina que afetam o desempenho do animal na fase adulta) (Langley-Evans et al., 2005). Apesar do crescimento e desenvolvimento fetais serem guiados pelo genoma, a regulação genética do crescimento fetal é

influenciada pelo ambiente intra-uterino no qual o feto cresce (Martin-Gronert & Ozanne, 2006). Assim, a desnutrição fetal pode induzir alterações genéticas, que incluem risco aumentado de doença cardiovascular, envelhecimento prematuro e comprometimento da capacidade reprodutiva em indivíduos adultos (Nilsson, 2001).

A ingestão inadequada de nutrientes durante a gestação é uma causa comum de baixo peso ao nascimento e retardo no crescimento intra-uterino (Pena e Bacallao, 2002). Dados da literatura mostram que em humanos, essas condições estão associadas ao criptorquidismo, uma anomalia congênita de machos que compromete sua capacidade reprodutiva (Klonish et al., 2004). Durante o desenvolvimento do animal, em situações de desequilíbrio nutricional, a reprodução é uma das primeiras e principais funções afetadas tanto pelos animais em reprodução como por aqueles que irão iniciar sua vida reprodutiva. Em ratos alimentados com dieta deficiente em proteína, além do peso testicular reduzido, a análise histológica evidencia que os túbulos seminíferos são severamente afetados, mostrando o diâmetro tubular reduzido e nenhum espermatozóide no lúmen do túbulo (Karaca et al.,2003).

Dados preliminares obtidos em nosso laboratório mostraram que a deficiência protéica pré e pós-natal podem apresentar um papel importante no desenvolvimento testicular. Neste experimento, aos 70 dias de idade, o processo de descenso testicular não havia ocorrido e a análise histológica dos túbulos seminíferos mostrou que as células de Sertoli apresentavam-se imaturas e as células germinativas mais avançadas eram espermatócitos em paquíteno (Melo et al., 2008). Dados da literatura mostram que a elevação da temperatura testicular altera o ritmo de progressão celular, como também a sobrevivência das células germinativas mais avançadas (Vilela et al., 2003). Desta forma, não sabemos se as alterações histológicas encontradas nos túbulos seminíferos nos animais deste projeto piloto podem ser atribuídas à deficiência protéica ou à elevação da temperatura testicular. Portanto, torna-se pertinente estudar o efeito da desnutrição protéica pré e pós-natal associada ou não ao aumento da temperatura testicular em ratos, visando melhor entender os efeitos destes fatores, ou da associação deles, no processo espermatogênico.

1.2 - Objetivos

1.2.1 - Objetivo Geral

Investigar o efeito da desnutrição protéica pré e pós-natal, associado ou não à elevação da temperatura testicular sobre o processo espermatogênico em ratos adultos.

1.2.2 - Objetivos específicos

Comparar entre os grupos experimentais os seguintes parâmetros:

- Dados biométricos: peso corporal, peso testicular e índice gonadossomático (IGS);
- Morfologia do epitélio seminífero;
- Parâmetros morfométricos do testículo tais como diâmetro tubular, diâmetro do lume e altura do epitélio;
- Número de células somáticas (Sertoli e Leydig) e germinativas (espermatogônias, espermatócitos e espermátides);
- Eficiência da espermatogênese através do calculo das razões celulares.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Organização testicular e espermatogênese

A organização estrutural do testículo é altamente conservada entre os mamíferos e nela são encontrados dois compartimentos principais: o tubular que é avascular, sem inervações e constituído pela túnica própria (células mióides, fibras colágenas e a membrana basal), epitélio seminífero e lúmen; e o intersticial ou intertubular em que se localizam as células de Leydig produtoras de esteróides, vasos sangüíneos e linfáticos, nervos, fibroblastos, fibras do tecido conjuntivo, macrófagos, linfócitos e, ocasionalmente, mastócitos (Pelletier et al., 2003).

O epitélio seminífero compõe-se de quatro camadas de gerações distintas de células germinativas, sustentadas morfofisiologicamente por uma célula somática denominada célula de Sertoli (Russell et al., 1990). Na camada basal do epitélio seminífero observam-se espermatogônias e espermatócitos primários iniciais; nas camadas intermediárias observam-se gerações de espermatócitos primários mais desenvolvidos e espermatócitos secundários; e na camada adluminal, espermátides (Yan et al., 2008).

A espermatogênese é um processo cíclico altamente organizado e complexo que ocorre nos túbulos seminíferos e passa por três fases essenciais: a primeira, a proliferativa, em que as células sofrem sucessivas e rápidas divisões mitóticas; a segunda, a meiótica ou espermatocitária, na qual o material genético dos espermatócitos é duplicado, recombinado e segregado; por fim, a espermiogênica, em que células haplóides (espermátides) se diferenciam em espermatozóides – célula altamente especializada e estruturalmente equipada para alcançar e fertilizar o oócito (Pelletier et al., 2003).

As células espermatogênicas encontram-se arranjadas nos túbulos seminíferos, de forma organizada e bem definida, constituindo associações celulares que caracterizam estádios do ciclo do epitélio seminífero. Na maioria dos mamíferos, o arranjo dos estágios desse ciclo é segmentado, e normalmente existe apenas um estágio por corte transversal do túbulo (Russell et al., 1990). Dentre os sistemas utilizados para se estudar os estádios do ciclo do epitélio seminífero, o mais empregado é aquele baseado na forma e na localização dos núcleos das espermátides e na presença de figuras de divisões meióticas. Este sistema, designado por (Berndtson, 1977) como método da morfologia tubular, permite a padronização do ciclo em oito estádios para todos os mamíferos. Outra classificação, designada como método do sistema acrossômico, é baseado nas características das espermátides, em

particular no desenvolvimento do acrossoma, método no qual o número de estádios para cada espécie é variado. Os estádios se sucedem numa determinada área do epitélio seminífero, com o decorrer do tempo. Esta seqüência, assim ordenada, constitui o processo denominado ciclo do epitélio seminífero (Russell et al., 1990).

A identificação dos diferentes estágios do ciclo do epitélio seminífero (CES) é essencial para a realização de estudos quantitativos da espermatogênese. 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 (Berndtson, 1977). A duração do ciclo do epitélio seminífero é geralmente constante para uma determinada espécie, entretanto varia entre espécies diferentes; por exemplo, em ratos são 14 estágios (Russell et al., 1990).

2.2. Quantificação da Espermatogênese

A apoptose de células germinativas é parte integral da espermatogênese, ocorrendo normalmente em várias fases deste processo (Roosen-Runge, 1977). Estas apoptoses representam papel importante na homeostase da espermatogênese, refletindo diretamente na produção espermática diária característica de cada espécie (Clermont, 1972; Sharpe, 1994). Embora as apoptoses sejam comumente observadas durante a fase de divisões meióticas, principalmente devido a danos cromossomais (Roosen-Runge, 1977; Selva et al., 2001; Xu et al., 2003), a regulação do número de células germinativas ocorre usualmente durante a fase espermatogonial (De Rooij, 1987), fazendo com que um número apropriado de células germinativas por células de Sertoli seja propiciado (França & Russell, 1998).

O estudo quantitativo das células que compõem o epitélio seminífero, em secções transversais de túbulos seminíferos, é importante para entendimento do processo espermatogênico (Roosen-Runge & Giesel Jr.,1950; Wing & Christensen, 1982; França, 1991; França & Russell, 1998). Este estudo permite, ainda, um entendimento mais completo da espermatogênese e também de como a estrutura testicular se comporta em condições experimentais e patológicas (França & Russell, 1998). Também neste aspecto, a obtenção da proporção volumétrica (%) entre os diversos componentes do testículo e do epitélio seminífero, bem como a estimativa do tamanho e número de células de Leydig do testículo, fornecem importantes dados para se avaliar a função testicular (França, 1991; Silva Jr., 2000).

Estudos recentes mostram que o número de células de Sertoli por testículo é o principal fator na determinação da produção espermática e do tamanho do testículo

(Orth et al., 1988; Hess et al., 1993; França et al., 1995; Rocha et al., 1999; Silva Jr., 2000; Miranda, 2002). Tal pressuposto baseia-se no fato de que as células de Sertoli têm uma capacidade de suporte de células germinativas relativamente fixa para cada espécie, e que a população deste tipo celular mantém-se estável após a puberdade (Orth, 1982; Orth et al., 1988; França & Russell, 1998), não havendo alteração no seu número ao longo dos estádios do ciclo do epitélio seminífero (Roosen-Runge & Giesel Jr.,1950; Wing & Christensen, 1982; França, 1991; Neves, 2001). Desta forma, o número de células germinativas suportadas por uma única célula de sertoli é a melhor indicação da eficiência funcional da célula de Sertoli e da produção espermática (Russell & Peterson, 1984; Sinha-Hikim et al., 1989; França & Russell, 1998). Em termos de eficiência da produção espermática por unidade de área de túbulo seminífero o índice mais importante é o número de espermátides por célula de Sertoli (Russell & Peterson, 1984; França & Russell, 1998).

2.3. Criptorquidismo

O testículo tem por funções básicas sintetizar hormônios e realizar a espermatogênese. Esta última é um processo longo e sensível que exige manutenção de temperatura testicular entre 2 a 6°C abaixo da temperatura corporal para que sejam produzidos espermatozóides férteis, necessitando para isso numerosos mecanismos locais. Com a elevação da temperatura normal dos testículos, a espermatogênese sofre um efeito deletério, podendo ficar completamente reduzida, como é observado em animais criptorquídicos ou em indução experimental (Gabaldi & Wolf, 2002).

O criptorquidismo é uma anomalia reprodutiva de machos onde um ou ambos os testículos possuem localização ectópica, permanecendo no tecido subcutâneo, no abdome ou na área do anel inguinal (Moretti et al.,2007). A etiopatogenia do criptorquidismo ainda não está bem esclarecida. Em humanos, condições como prematuridade, baixo peso e baixa estatura ao nascimento, gemelaridade e exposição da mãe a estrógenos durante o primeiro trimestre da gestação estão associados ao criptorquidismo (Klonish et al., 2004). Entretanto, esta afecção não é uniforme e provavelmente alterações endócrinas, genéticas, anatômicas ou mecânicas podem ser notificadas como responsáveis por casos específicos da descida inadequada dos testículos (Khatwa & Menon, 2000).

A passagem do testículo pelo orifício inguinal interno até o escroto é um processo ativo, envolvendo vários fatores anatômicos e hormonais. Embora haja informações limitadas sobre o processo de descenso testicular, algumas etapas e estruturas envolvidas já foram definidas:

1. Translocação abdominal: resulta no posicionamento do testículo próximo ao anel inguinal interno. A porção extra-abdominal do gubernáculo começa a se estender e alargar, mas há pouca mudança na distância entre o testículo e a área inguinal.
2. Migração transiguinal: na maioria das espécies, requer a redução do tamanho absoluto dos testículos e distensão do canal inguinal, de forma que possibilite a entrada dos testículos no escroto.
3. Migração Inguinoscrotal: consiste na alocação dos testículos no fundo do escroto e requer o encurtamento do gubernáculo e alinhamento do processo vaginal junto ao testículo (Amann & Veeramachaneni, 2007).

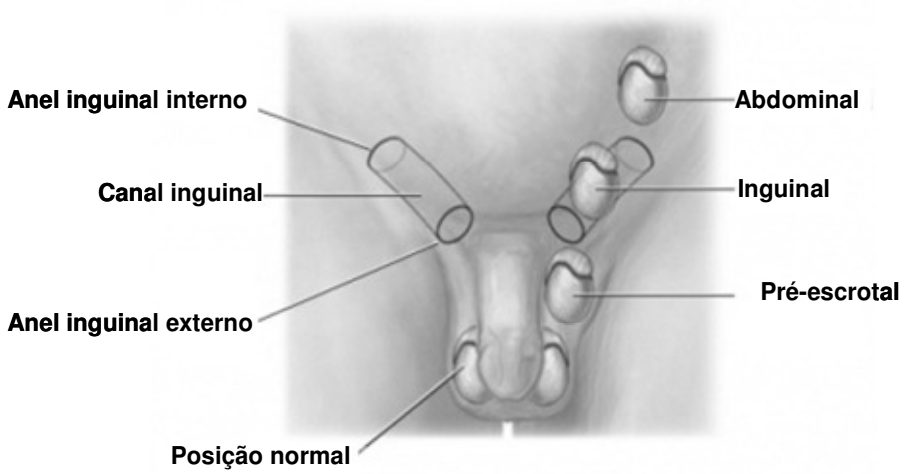


Figura 1 – Localização ectópica do testículo. Adaptado de © 2008 Nucleus Medical Art, Inc.

Como já bem definido, o gubernáculo é uma das principais estruturas envolvidas no processo de descenso testicular que, sobre complexa influência hormonal, altera sua forma, possibilitando a passagem do testículo para o escroto. Durante a fase de translocação adbominal, o INSL3 (*insulin-like factor 3),* é o fator primário envolvido na expansão do gubernáculo. É um gene membro da super família dos hormônios *inulin-like* e é especificamente expresso na célula de Leydig fetal e adulta. Além do INSL3, neste mesmo período, o hormônio anti-Mulleriano (MIH), uma glicoproteína secretado pelas células de Sertoli, parece atuar na fase de crescimento do gubernáculo (Zimmerman et al., 1999).

Já a fase final de descida testicular, a fase inguinoescrotal, é controlada pelos andrógenos. O gubernáculo é rico em receptores androgênicos e a ausência dessa fase final de descida testicular nos indivíduos hipogonádicos e em pacientes com insensibilidade androgênica corrobora com essa afirmação (Bernstein et al., 1988).

Além disso, testosterona parece atuar também indiretamente na migração gubernacular através da estimulação do nervo genitofemoral (GNF). O GFN contêm o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), que atua principalmente como um quimioatrativo, direcionando o crescimento do gubernáculo para o escroto (Hutson et al., 2004).

2.4. Efeitos do aumento da temperatura testicular

A situação de criptorquidismo unilateral é a mais comum entre os animais e a sua fertilidade, embora afetada na sua eficiência, é mais próxima do normal já que um dos testículos é funcional. Entretanto, a criptorquidia bilateral resulta em esterilidade, pois os testículos ectópicos são hipoplásicos e afuncionais quanto à produção de espermatozóides (Amann & Veeramachaneni, 2007). A temperatura não só altera o ritmo de progressão celular, como também a sobrevivência das células germinativas em fases específicas do processo espermatogênico (Vilela et al., 2003). Segundo Lue et al.(1999), a apoptose das células germinativas induzida pelo aumento da temperatura testicular ocorre predominantemente nos estádio iniciais (I-IV) e tardios (XII-XIV) do processo espermatogênico. Espermatócitos em paquítenos e espermátides arredondadas nos estádios de I a IV e paquítenos, diplótenos e espermatócitos em divisão nos estádios XII – XIV foram os tipos celulares mais susceptíveis à temperatura.

As modificações histopatológicas observadas no parênquima testicular de animais criptorquídicos incluem alterações numéricas e funcionais das células de Sertoli, redução do diâmetro dos túbulos seminíferos, ausência de espermatozóides na luz tubular, diminuição da proporção das espermatogônias por túbulos além de atrofia das células de Leydig (Wallen & Shortliffe, 2000; Lima & Martins ,2003).

2.5. Nutrição e Programação Fetal na Reprodução

A alimentação, reconhecidamente, tem papel relevante para a saúde dos indivíduos, principalmente nas etapas da vida caracterizadas pelo aumento da demanda de energia e de nutrientes, como a gestação e o puerpério. Na gestação ocorre intenso e peculiar processo de formação de tecidos, bem como grandes transformações orgânicas durante um curto espaço de tempo (Lucyk & Furumoto, 2008). Assim, a gestação é reconhecida como um período de vulnerabilidade biológica, onde o estado nutricional da gestante pode influenciar diretamente na saúde, crescimento e desenvolvimento adequado dos fetos, seus pesos ao nascerem,

nas chances de prematuridade, mortalidade e morbidade neonatal (Coelho et al., 2002).

A má nutrição do feto em diversos estágios da gestação pode trazer conseqüências não apenas no desenvolvimento infantil, mas também pode levar a predisposição de enfermidades crônicas não transmissíveis, como diabetes, hipercolesterolemia, obesidade, doenças cardiovasculares, hipertensão e alguns tipos de câncer durante a vida adulta (Murakami et al., 2005). A hipótese da origem fetal dessas patologias se baseia na permanência das adaptações que o sistema endócrino sofre durante a vida fetal em decorrência da má nutrição materna. Portanto, o adequado suporte nutricional durante o período pré-natal, evita conseqüências que podem perdurar por toda a vida (Wu et al., 2004).

Pesquisas multidisciplinares têm mostrado que o desempenho reprodutivo de animais na vida adulta é determinado, em parte, por uma variedade de influências extrínsecas desde a concepção até após o nascimento. Como a ontogenia gonadal e seu controle hormonal acontecem em períodos distintos no desenvolvimento, o estado nutricional materno nos diferentes estágios da vida fetal e neonatal pode comprometer a capacidade reprodutiva destes animais. As alterações estruturais no desenvolvimento gonadal pode ser resultado dos efeitos diretos da nutrição sobre as células progenitoras gonadais ou por meio da alteração da função do eixo hipotálamo-pituitária (Rhind et al., 2001).

A célula de Sertoli é uma forte candidata a sofrer efeito da programação fetal e afetando a performance reprodutiva, uma vez que o seu número está altamente correlacionado com o tamanho testicular e a taxa de produção de espermatozóide no animal adulto. Léonhardt et al. (2003) mostraram que a restrição alimentar no período da gestação promoveu redução no peso testicular, assim como redução no diâmetro tubular e luminal dos túbulos seminíferos dos machos da prole. Além disso, também provocou uma redução no número das células de Sertoli e um aumento na concentração do hormônio folículo estimulante (FSH) após administração de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) exógeno. Entretanto, a desnutrição não afetou o início da puberdade da prole, definido como o primeiro aumento da concentração sérica de testoterona (Kotsampasi et al., 2008).

Já em fêmeas, na maioria dos animais, as oogônias proliferam por mitose e iniciam o processo meiótico durante a vida fetal. Estudos mostraram que a desnutrição materna durante a gestação retarda o crescimento ovariano e aumenta o número de folículos menores (folículos vesiculares; Léonhardt et al., 2003). Além disso, prolonga a fase meiótica nas oogônias fetais da prole, apresentando maiores lesões no ácido desoxirribonucléico (DNA, Rae et al., 2001). Devido a isso, com o objetivo de manter a

integridade genômica e estabilidade da população da linha germinativa, esses animais mostraram maior expressão da proteína supressora de tumor p53, do fator anti-apoptótico Bcl-2 e da enzima polimerase β (Murdoch et al., 2003).

2.6. Nutrição e Reprodução

Interrelações entre macronutrientes, vitaminas, minerais e função reprodutiva são conhecidas há bastante tempo. Em geral, todos esses nutrientes são necessários para a reprodução, devido às suas funções no metabolismo, manutenção e crescimento. Contudo, eles podem também ter funções e exigências específicas no trato reprodutivo, que podem variar de acordo com o estágio fisiológico deste tecido durante o ciclo reprodutivo (Maggioni et al., 2008).

As vitaminas e os minerais estão envolvidos em quase todas as vias metabólicas do organismo animal, com funções importantes na reprodução, no crescimento, no metabolismo energético entre outras tantas funções fisiológicas vitais. Quando a deficiência mineral é suficientemente prolongada e severa, ela pode manifestar-se por sinais clínicos bastante evidentes, como perdas acentuadas de peso e problemas reprodutivos. Dentre as vitaminas, o ácido retinóico, uma forma oxidada da vitamina A, desempenha papel fundamental na espermatogênese. Sua presença induz a expressão de um fator citoplasmático específico de vertebrado, o *Stra8,* necessário para início da meiose e que está envolvido diretamente no processo de recombinação gênica. As células germinativas dos animais que não expressam o gene para o Stra8 tem o desenvolvimento mitótico inicial inalterado. Entretanto, essas células não sofrem mudanças morfológicas que definem a prófase meiótica e não expressam proteínas envolvidas na coesão e condensação dos cromossomos, interferindo no progresso e diferenciação das células germinativas (Anderson et al., 2008). Além do ácido retinóico, a vitamina E apresenta um papel importante na manutenção da viabilidade da população espermática em ratos. Ela funciona como um antioxidante intracelular lipossolúvel, convertendo os radicais livres de oxigênio e os hidroperóxidos lipídicos em formas não reativas. Sua deficiência na dieta promove degeneração de espermatócitos, mostrando alterações nucleares e nos acrossomos e citoplasma com organelas dismórficas (Bensoussan et al., 1998).

Entre os minerais, o selênio é um micronutriente necessário para os tecidos de mamíferos e tem papel essencial na manutenção da espermatogênese normal e fertilidade em machos. Este mineral faz parte de uma enzima antioxidante (glutationa peroxidase) que atua no interior da célula convertendo compostos tóxicos em atóxicos (peróxido de hidrogênio) resultando na redução de radicais livres (Hatfield et al., 2002).

Além disso, o selênio está presente na seleproteína P, uma glicoproteína extracelular que contém de 10 a 17 selenocisteínas em sua estrutura primária. Animais mutantes para essa proteína, assim como aqueles alimentados com uma dieta deficiente em selênio apresentaram alterações morfológicas nos espermatozóides e motilidade comprometida (Olson et al., 2005). Da mesma forma, a deficiência de manganês afeta a produção espermática, diminuindo a produção e a motilidade dos espermatozóides. Isso ocorre porque este mineral atua como cofator em sistemas enzimáticos, como constituinte de várias metaloenzimas e na síntese de hormônios da reprodução (Hurley e Doane, 1989).

Além dos micronutrientes, a disponibilidade energética e protéica representam fatores limitantes para o sucesso reprodutivo do animal. Segundo Fourie et al. (2004) o desenvolvimento sexual está intimamente relacionado com a taxa de crescimento do animal, sendo o peso corporal um dos melhores indicadores do início da puberdade. Animais que receberam um aporte nutricional aumentado durante o desenvolvimento, entraram na puberdade precocemente quando comparado com animais que receberam uma alimentação normal nesta fase. Entretanto, embora a dieta hipercalórica acelere o desenvolvimento testicular, a qualidade do semên fica comprometida, uma vez que há uma deposição excessiva de gordura no escroto, interferindo nos mecanismos termorregulatórios essenciais para o sucesso da espermatogênese. Em contrapartida, (Coulter et al. 1997) mostrou que um balanço energético negativo pode causar uma redução na secreção de andrógenos e na qualidade do semêm. Mas tais efeitos podem ser temporários, com a restauração da função reprodutiva após um aporte calórico adequado.

Da mesma forma, a disponibilidade protéica influencia a capacidade reprodutiva dos animais. Em ratos alimentados com dietas deficientes em proteínas, além do peso testicular reduzido, a análise histológica dos testículos mostra que os túbulos seminíferos são severamente afetados, mostrando o diâmetro tubular reduzido e nenhum espermatozóide no lúmen do ducto (Karaca et al.,2003). Ainda, alterações evidentes foram encontradas na morfologia das células de Sertoli e células de Leydig. Essas alterações são devidas a um atraso no processo de proliferação e maturação dessas células, caracterizado por uma prolongada fase S da divisão mitótica, indicando uma depressão na síntese de DNA (Bansal-Rajbanshi & Mathur, 1984). Embora não houvesse nenhuma alteração nos níveis de FSH no plasma sanguíneo de ratos submetidos à desnutrição, LH e testosterona mostraram-se reduzidos, comprometendo o processo espermatogênico desses animais. (Zambrano et al., 2005).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Fase Pré-Experimental

Na fase pré-experimental, foram utilizadas 20 ratas Wistar (*Rattus norvegicus*) de aproximadamente 25 dias de idade provenientes do Centro de Bioterismo do ICB/UFMG (CEBIO). As fêmeas foram alojadas em caixas coletivas, em grupos de 4-5 animais, e permaneceram no Biotério de Ratos do Departamento de Morfologia do ICB, em ambiente com temperatura (25°C) e fotoperíodo (12 horas de luz) controlados. As ratas receberam suprimento de ração Labina (23% PB – proteína bruta) produzida pela empresa Purina (http://www.nutrimentospurina.com.br) e água à vontade. Neste período, as ratas foram observadas diariamente para registro de abertura vaginal, indicativa do início da maturidade sexual desses roedores. Após a abertura vaginal (~40 dias), os animais foram identificados e a regularidade do ciclo estral foi verificada por esfregaço vaginal durante 15 dias consecutivos. Para isso, um pequeno volume de solução salina 0,9% era colocado no canal vaginal por meio de pipeta Pasteur e em seguida removido. O material coletado era analisado ao microscópio óptico para identificação dos tipos celulares do epitélio vaginal e determinação das diferentes fases do ciclo estral: diestro, proestro, estro, metaestro, (Tabela 1, Figura 2), segundo Marcondes et al. (2002).

Tabela 1 – Características citológicas das diferentes fases do ciclo estral em roedores.

Diestro	Esfregaços vaginais com predomínio de leucócitos e algumas células epiteliais queratinizada em permeio; esta fase é considerada como pré-ovulatória;
Proestro	Há um predomínio de células epiteliais nucleadas, dispersadas ou em grumos; esta é a fase em que ocorre a ovulação;
Estro	Predomínio de células queratinizadas anucleadas; esta é a fase pós-ovulatória.
Metaestro	Há uma mesma proporção entre leucócitos, células epiteliais nucleadas e células queratinizadas.

Fonte: Marcondes et al. (2002).

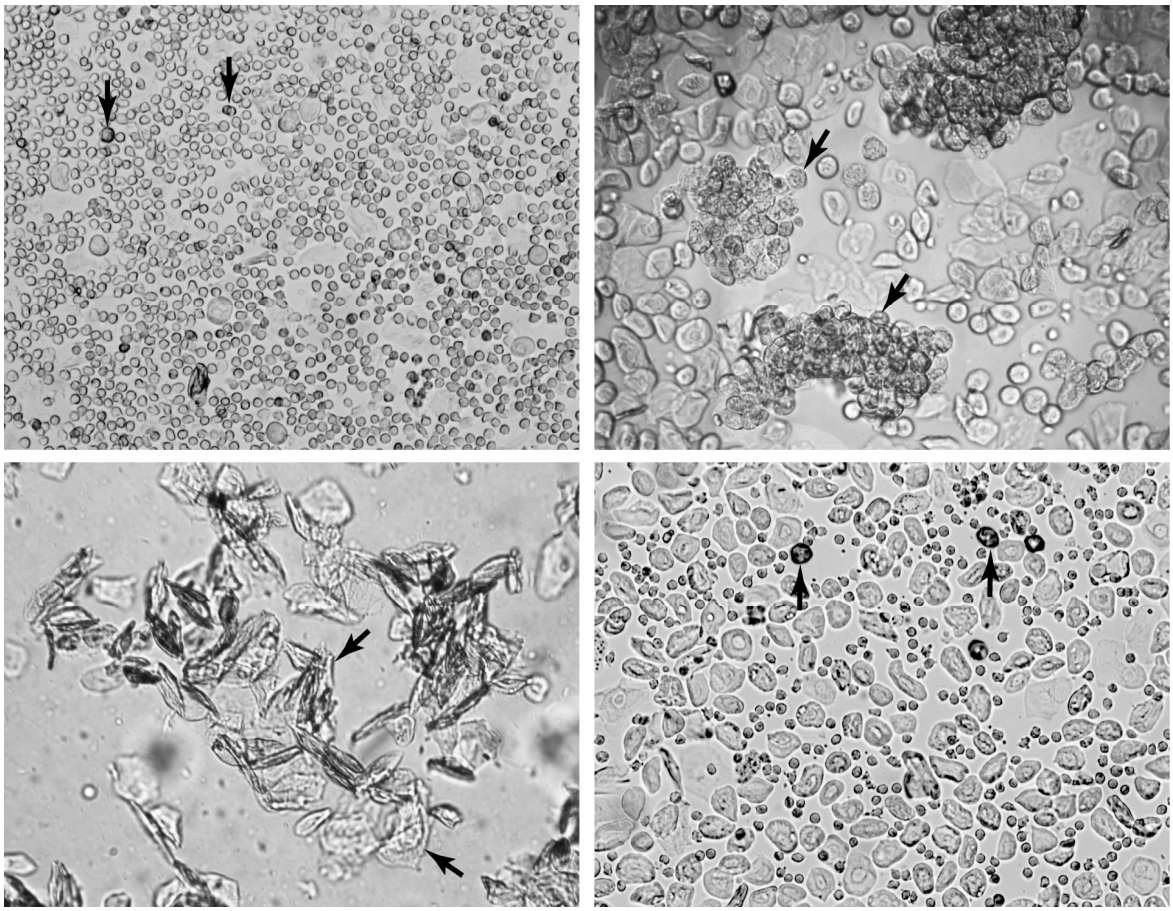


Figura 2 –_Fotomicrografias de esfregaços vaginais onde podem ser observadas as diversas fases do ciclo estral de ratas. Em A, diestro com grande infiltração leucocitária (seta). Em B, proestro com a presença de células epiteliais dispersas e em grumos (setas). Em C, estro com grande concentração de células queratinizadas anucleadas (seta). Em D, metaestro com infiltração leucocitária (seta) entre as células epiteliais e queratinizadas.

Em seguida, as fêmeas que apresentaram regularidade do ciclo estral foram selecionadas e divididas nos seguintes grupos experimentais: Controle (C; n=8) e Deficiente (T; n=10). Os procedimentos de manuseio dos animais estavam de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG), que foram aprovados sob protocolo de nº 141/2009.

3.2. Preparação dos grupos experimentais e gestação

Uma vez estabelecidos os grupos experimentais, as ratas Controle passaram a receber a dieta controle (20% proteína bruta - PB) e as ratas do grupo Tratamento a dieta deficiente em proteína (8% PB), sendo esta distribuída de forma *ad libitum* e

água à vontade. As dietas controle e deficiente foram produzidas pela empresa Rhoster Indústria e Comércio LTDA (http://www.rhoster.com.br). Ambas eram peletizadas, isocalóricas e seguiam os padrões AIN-93G, formuladas para as fases de crescimento, prenhez e lactação de roedores de laboratório (Reeves et al., 1993). Entretanto, apresentavam concentrações diferentes de proteínas (normal – 20% PB e deficiente – 8% PB; Tabela 2).

Tabela 2 – Informações nutricionais da ração AIN-93G formulada para ratos em fase de crescimento, prenhez e lactação (g /Kg dieta).

Ingredientes	20 % de proteína	8% de proteína
Amido de milho	397,5	517,5
Caseína (≥85%)	200,0	80,0
Amido dextrinizado	132,0	132,0
Sacarose	100,0	100,0
Óleo de soja	70,0	70,0
Celulose	50,0	50,0
L-cistina	3,0	3,0
Bitartrato de colina	2,5	2,5
T-butil-hydroquinona	0,014	0,014
Mistura mineral [A]	35,0	35,0
Mistura vitamínica [B]	10,0	10,0

A: Composição em mg. Minerais essenciais: ferro, 35; cálcio, 5000; fósforo, 1561; potássio, 3600; enxofre, 300; sódio, 1019; cloro, 1571; magnésio, 507; zinco, 30; manganês, 10; cobre, 6; iodo, 0,2; molibdênio, 0,15; selênio, 0,15. Minerais potencialmente benéficos: silício, 5; cromo, 1; níquel, 0,5; bório, 0,5; vanádio, 0,1.
B: Composição em mg: ácido nicotínico, 30; pentotenato, 15; piridoxina, 6; tiamina, 5; riboflavina, 6; ácido fólico, 2; composição em g: vitamina k, 750; D-biotina, 200; vitamina B12, 25; vitamina A, 4000; vitamina D3, 1000; vitamina E, 75.

Ao completar as cinco semanas de tratamento, a fase do ciclo estral das fêmeas foi avaliada por meio de esfregaço vaginal, conforme anteriormente descrito e, quando em proestro, cada rata foi mantida por uma noite com um macho normal. A confirmação da prenhez foi feita através da presença de espermatozóide no esfregaço (Figura 3) e as ratas continuaram sob o mesmo regime alimentar durante toda a gestação (21 a 22 dias).

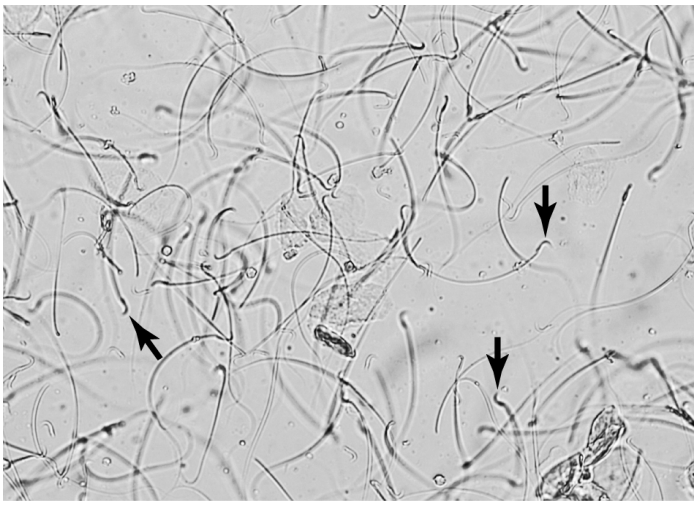


Figura 3 - Fotomicrografia de esfregaço vaginal mostrando a presença de espermatozóides. Na seta, acrossoma dos espermatozóides.

Durante este período, cada fêmea foi avaliada quanto ao seu desenvolvimento corporal, sendo registrados, semanalmente, o peso corporal correspondente (em g) e o consumo alimentar diário médio dos animais.

3.3. Lactação e criptorquidismo experimental

Próximo à data do parto, as ratas foram alojadas em gaiolas individuais. Após o nascimento das ninhadas, foi feita a determinação do sexo dos filhotes e foram obtidos os seguintes dados biométricos: o peso e o comprimento corporal (Snout-Rump Lenght, SRL). A medida SRL é realizada com o animal deitado em decúbito ventral sobre uma régua, medindo-se desde o ponto onde a ponta do focinho faz uma projeção perpendicular na régua até a raiz da cauda do animal.

Durante a lactação, cada filhote foi avaliado semanalmente quanto ao seu desenvolvimento por meio de registro de peso corporal. Todos os filhotes permaneceram com as mães desde o nascimento até os 21 a 23 dias de idade, quando ocorreu o desmame. Neste período, a perda de peso materna e seu consumo alimentar foram registrados.

Ao desmame, as mães foram sacrificadas por deslocamento cervical e os filhotes machos foram submetidos à laparotomia para fixação do testículo direito à parede abdominal, evitando assim o descenso do mesmo para o escroto. Para isso, foram anestesiados via intramuscular com uma combinação de anestésico de Vetanarcol (Cloridrato de Ketamina a 5% - König) com Calmium (Cloridrato de Xilazina a 2% – Agener União) em uma relação de 2:1, respectivamente, na dose de 0,2

mL/100g de peso corporal. Depois de anestesiados, foi feita uma pequena incisão abdominal e o testículo direito foi fixado pela túnica albugínea aos músculos da parede abdominal. Para a fixação do testículo e sutura da parede abdominal foi utilizado fio de seda 4-0 (Brasature, 75 cm) e para a sutura da pele, fio de nylon 6-0 (Brasature, 45 cm).

3.4. Grupos experimentais e eutanásia

Após o procedimento cirúrgico, os filhotes foram divididos nos seguintes subgrupos:

1) Grupo CC (controle-controle; n=5): filhotes que receberam a dieta controle (20% PB) e cujas mães seguiram o mesmo regime alimentar;
2) Grupo CT (controle-tratamento; n=6): filhotes que receberam a dieta deficiente (8% PB) e cujas mães receberam a dieta controle (20% PB);
3) Grupo TT (tratamento-tratamento; n=12): filhotes que receberam a dieta deficiente (8% PB) e cujas mães seguiram o mesmo regime alimentar;
4) Grupo TC (tratamento-controle; n= 10): filhotes que receberam a dieta controle (20% PB) e cujas mães receberam a dieta deficiente (8%PB). Fig. 4

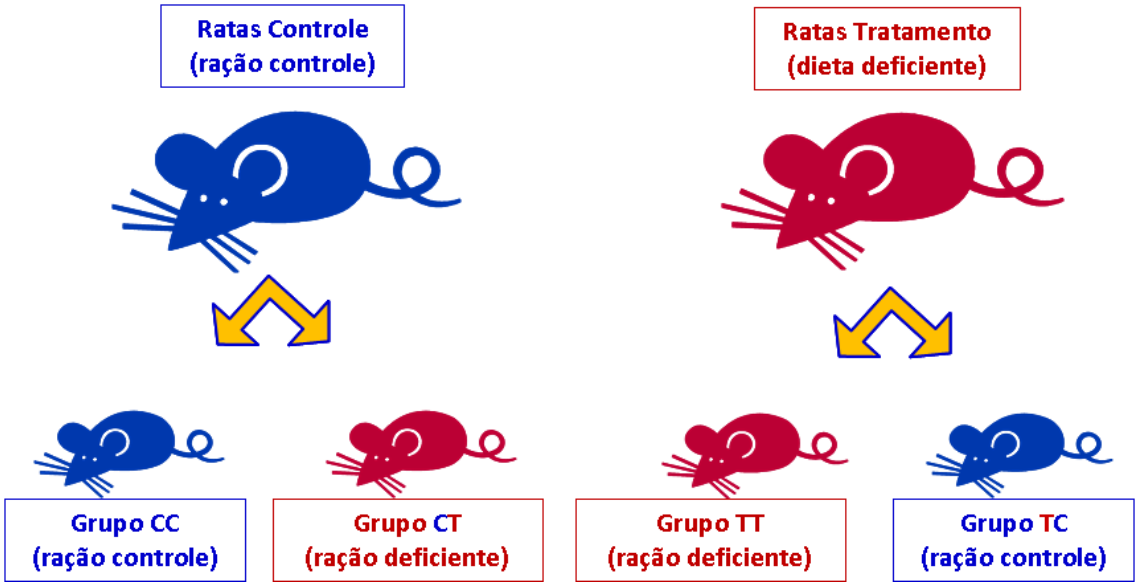


Figura 4 – Diagrama mostrando o delineamento dos grupos experimentais. A primeira letra dos grupos experimentais corresponde à dieta oferecida às mães durante o período da gestação e lactação e a segunda letra está relacionada à dieta dos animais após o desmame.

Todos os grupos receberam as respectivas dietas até o dia do sacrifício (70 dias de idade), sendo o consumo alimentar médio e a curva de crescimento ponderal registrada semanalmente. Alguns dos animais morreram durante a execução do experimento, sendo o número final em cada grupo experimental conforme mencionado a seguir: CC, 4; CT, 6; TT, 7 e TC, 11.

Os animais foram sacrificados e fixados por perfusão intravascular. Para isso, foram anestesiados com uma mistura de Vetanarcol (Cloridrato de Ketamina a 5%-König) e Calmiun (Cloridrato de Xilazina – Agener União) na dose de 0,2 mg/100g de peso corporal, via intramuscular e os testículos fixados por perfusão intravascular. Aproximadamente 15 minutos antes do procedimento de perfusão, foi injetado por via intraperitoneal, Liquemine (Heparina Sódica, Roche) na dosagem de 125 UI/kg de peso corporal para evitar coagulação intravascular durante o procedimento de perfusão. Após este período, procedeu-se a abertura da cavidade torácica com o objetivo de expor o coração. Um cateter 18G x 1,0 (2,5mm x 1,1mm) foi introduzido no ventrículo esquerdo e o leito vascular lavado com solução salina 0,9%, a uma pressão de aproximadamente 80 mmHg. Após a retirada do sangue com a solução salina, procedimento que dura de 5 a 10 minutos, iniciou-se o procedimento de fixação através da perfusão com 5% de glutaraldeído em tampão fosfato 0.1M pH 7.4 por um período de aproximadamente 25 minutos (Chiarini-Garcia & Meistrich ,2008).

3.5. Preparação dos testículos para análises histológicas

Após a perfusão intravascular, procedeu-se a laparotomia para a remoção e pesagem dos testículos. Do peso testicular aferido, foi calculado o índice gonadossomático, que é definido pela relação percentual do peso da gônada dividido pelo peso corporal (**IGS** = Wg/Wt x100). Em seguida, os testículos foram cortados em secções transversais de 1 a 2 mm de espessura e fixados por imersão no fixador glutaraldeído 5% por mais 24 horas, a 4^{o}C. No dia seguinte, houve a remoção do fixador e substituição por tampão fosfato 0,05 M pH 7.4. Este procedimento baseia-se em método já descrito por Sprando (1990) e Chiarini-Garcia & Meistrich (2008).

Com o auxílio de uma lupa, foram selecionadas as melhores áreas de fixação no testículo e a secção de pequenos fragmentos realizados. Estes fragmentos foram desidratados em séries crescentes de álcool (70, 80, 90, 95 e 100%) e incluídos em glicol metacrilato (Leica Historesina, Embeedding Kit).

Dos blocos, seções transversais com espessura de 3 e 5µm foram obtidas com o auxílio de um micrótomo rotativo automático e distendidas em lâminas de vidro. Em seguida, as lâminas contendo as seções foram coradas com azul de toluidina por 30

segundos. O excesso do corante foi retirado com água, sendo, depois, utilizada resina (Entellan®) para montar as lâminas permanentes.

3.6. *Análise morfométrica*

Os estudos morfométricos consistiram (1) na medida de diferentes parâmetros testiculares (diâmetro do túbulo e altura de epitélio seminífero e diâmetro do lume), (2) na avaliação quantitativa de diferentes tipos celulares presentes no epitélio seminífero e no espaço intersticial (células de Sertoli, células de Leydig, macrófago, espermatogônias, espermatócitos e espermátides arrendodadas) e (3) no cálculo das razões entre números celulares do epitélio seminífero, nos quatro grupos experimentais. Para todas as análises morfométricas foram selecionados quatro animais de cada grupo experimental.

3.6.1. Avaliação do diâmetro tubular e luminal e altura do epitélio seminífero

O diâmetro tubular e luminal médio foi obtido a partir da mensuração ao acaso de 50 secções transversais de túbulos seminíferos que apresentaram contorno o mais circular possível. Nas mesmas secções, foi mensurada a altura do epitélio seminífero, o qual foi tomada da membrana basal até a borda luminal. Para isso, foram utilizadas imagens fotográficas digitais, obtidas com o auxílio de uma câmera fotográfica digital Q-Color 3 acoplada a um microscópio Olympus BX-51. Para mensuração das estruturas avaliadas utilizou-se o programa de análise de imagens Image-Pro Express (Media Cybernetics). Os diâmetros tubular e luminal correspondem à razão entre a soma do diâmetro maior com o menor dividido por 2.

3.6.2. Número absoluto de células de Sertoli, espermatogônias, espermatócitos, espermátides, células de Leydig e macrófago

Para se determinar o número absoluto de cada tipo celular presente nos testículos, os seguintes parâmetros morfométricos foram obtidos:

a) volume do parênquima testicular - **V_T (μm^3)**
b) proporção volumétrica dos diferentes tipos celulares – **Vv_c (%)**
c) volume nuclear médio de cada tipo celular - **Vn (μm^3)**
d) número absoluto de cada tipo celular/testículo - **NC (10^6 - milhões)**

a. Volume do parênquima testicular - **V_T (μm^3)**

O peso testicular (**P_T**) obtido durante a coleta do material corresponde ao peso do parênquima testicular acrescido do peso da túnica albugínea (quando essa não tiver sido retirada). Sendo assim, o primeiro passo para se calcular o volume do parênquima testicular consiste em subtrair o correspondente ao peso da túnica albugínea, ou seja, ~3,5% do valor obtido (Sinha Hikim et al., 1988). Utilizando como exemplo um animal adulto de **P_T** = 100mg, o peso do parênquima testicular desse animal seria:

100 (– 3,5%) = 96,5 mg

A partir do valor do peso do parênquima testicular é necessário realizar uma série de transformações de unidades de medidas com o objetivo de se obter o volume desse parênquima. Como o valor que temos está expresso em miligramas (mg) e desejamos que ele seja expresso em gramas (g), é necessário transformá-lo multiplicando o valor por 10^{-3}. O nosso exemplo ficaria:

$96,5 \times 10^{-3}$ g = 0,0965g

A partir da literatura temos que a densidade do testículo é muito próxima de 1g/mL (1,03 a 1,04; Sinha Hikim et al., 1988), então para cada grama de testículo teremos o volume correspondente a 10^{12} μm^3. Para o nosso exemplo o volume do parênquima testicular seria:

$V_T = 0,0965 \times 10^{12}$ μm^3

b. Proporção volumétrica dos diferentes tipos celulares - **Vv_e (%)**

A proporção volumétrica dos tipos celulares avaliados no testículo foi estimada utilizando-se retículo com 441 intersecções (pontos) acoplado à ocular de um microscópio Olympus BX-51. Para obtenção desta proporção volumétrica foram contados, com aumento final de 600X, os pontos coincidentes com os tipos celulares avaliados. O número de campos a ser contado foi determinado previamente em um estudo (Tabela 3) no qual testou-se, dentre os grupos de 10, 15, e 20 campos contados, qual seria a quantidade mais representativa. Considerando não haver diferença significativa entre os resultados, optou-se por contar o menor número de campos (10 campos) por animal, escolhidos ao acaso, perfazendo-se um total de 4.410 pontos.

Tabela 3 – Contagem de diferentes números de campos (10, 15 e 20) com objetivo de determinar o número mínimo estatisticamente adequado de campos para se fazer a análise morfométrica da proporção volumétrica dos diferentes tipos celulares no testículo. **Vv_c** (%), porcentagem ocupada pelas células avaliadas no testículo. Valores calculados para um animal com peso testicular médio de 107,4 mg.

Número de campos	**20**	**15**	**10**
Pontos Totais Contados	8820	6615	4410
Pontos nas Células de Sertoli	183	138	84
Pontos nas espermatogônias	38	30	26
Pontos nos espermatócitos	573	436	251
Pontos nas espermátides	662	488	336
Pontos nas Células de Leydig	41	31	21
Pontos nos macrófagos	18	12	6
Proporção volumétrica (Vv_c %)	**17,2**	**17,2**	**16,4**

Como há uma variação no diâmetro nuclear dos espermatócitos e espermátides ao longo da espermatogênese, o estágio de diferenciação escolhido para se obter a proporção volumétrica destes tipos celulares foi determinado após a medição de 5 núcleos de paquíteno e espermátide arredondada de 4 animais dos diferentes estágios de I a V do sistema acrossômico. Verificou-se que não existe diferença significativa entre os resultados e assim consideraram-se os pontos coincidentes nas células nos estádios avaliados, de I a V (Tabela 4)

Tabela 4 – Diâmetros nucleares de células germinativas nos estágios de I a V pelo sistema acrossômico. Valores expressos em média **±** erro padrão. (PQT, paquíteno, EA, espermátide arrendonda).

Células	**PQT**	**EA**
Estágio I	8,03 ± 0,14	7,63 ± 0,20
Estágio II - III	8,18 ± 0,19	7,62 ± 0,17
Estágio IV	8,32 ± 0,30	7,68 ± 0,24
Estágio V	8,44 ± 0,20	7,71 ± 0,22

Em seguida, foi estimado o volume dos diferentes tipos celulares (**Vt_c**) a partir do conhecimento do percentual ocupado pelo mesmo no volume total do testículo (**V_T**), conforme a fórmula:

$$Vt_c = \frac{V_T . Vv_c}{100}$$

onde: Vt_c = volume dos tipos celulares (μm^3)

V_T = volume do parênquima testicular (μm^3)
Vv_c = proporção volumétrica dos tipos celulares no testículo (%)

c. Volume nuclear médio de cada tipo celular - **Vn (μm^3)**

Um dos parâmetros necessários para o cálculo do número das células é a mensuração do volume nuclear de cada tipo celular avaliado, que foi calculado aplicando a seguinte fórmula:

$$Vn = \frac{4}{3}\pi R^3$$

onde: Vn = volume nuclear (μm^3)
π = 3,1416
R = raio nuclear (diâmetro nuclear dividido por 2)

O diâmetro nuclear médio (razão entre a soma do diâmetro maior com o menor dividido por 2) representa a média das medidas dos diâmetros de 10 núcleos para cada tipo celular por animal, segundo o padrão de distribuição dos mesmos. Estes diâmetros foram medidos com o auxílio do programa Image Pro-Express de imagens capturadas com sistema fotográfico digital citado acima.

Tendo em vista que há pouca variação entre o diâmetro nuclear, optou-se por medir o diâmetro do menor número de células, isto é, 10 núcleos de cada tipo celular.

d. Número absoluto de cada tipo celular/testículo – **NC (10^6)**

Com os dados obtidos anteriormente, foi possível calcular o número de cada tipo celular por testículo, dividindo o volume total ocupado pelos núcleos de cada tipo celular (**Vt_n**) presente no parênquima testicular pelo volume nuclear do mesmo tipo celular (**Vn**), conforme a fórmula a seguir. O número obtido está expresso em milhões ($x10^6$).

$$NC = \frac{Vt_n}{Vn}$$

onde: NC = número de determinado tipo celular no testículo (milhões)
Vt_n = volume total do mesmo tipo celular no testículo (μm^3)
Vn = volume nuclear do mesmo tipo celular (μm^3)

3.6.3. Razões entre números celulares do epitélio seminífero

Com o objetivo de estimar a eficiência do processo espermatogênico e da célula de Sertoli foram calculadas as razões entre os números corrigidos de células espermatogênicas e entre estas últimas e as células de Sertoli. As seguintes razões baseadas nas contagens celulares foram obtidas:

- Espermatogônia do tipo A / espermatócito em pré-leptoteno (coeficiente de eficiência de mitose espermatogonial)
- Espermatogônia do tipo A / espermátide arredondada (rendimento geral da espermatogênese)
- Espermatócito primário em paquíteno / espermátide arredondada (índice meiótico)
- Espermátide arredondada / nucléolo de célula de Sertoli (eficiência da célula de Sertoli)

Os números de espermatócitos em estágio de pré-leptóteno e paquíteno, de espermátides arredondadas, espermatogônias e de nucléolos das células de Sertoli foram contados nos túbulos seminíferos arredondados, em corte transversal, no estágio VII do sistema acrossômico apenas nos testículos orquídicos, onde foi possível encontrar todas diferentes células da linhagem espermatogênica. A população celular obtida por secção transversal de 10 túbulos seminíferos no estágio VII foi corrigida pela espessura do corte histológico (3 µm) e pelo diâmetro nuclear, utilizando-se a fórmula de Abercrombie (1946), modificado por Amann e Almquist (1962). Os nucléolos das células de Sertoli foram utilizados para obtenção dos números corrigidos desse tipo celular por secção transversal de túbulo seminífero devido à forma irregular do núcleo dessa célula. A seguinte fórmula foi utilizada para obtenção do número corrigido:

$$\text{Número corrigido} = \text{contagem obtida} \times \frac{\text{Espessura do corte}}{\text{Espessura do corte} + \sqrt{\left(\frac{DM}{2}\right)^2 - \left(\frac{DM}{4}\right)^2}}$$

Os diâmetros nucleares foram obtidos pela média das mensurações de 30 núcleos dos tipos celulares estudados no estádio VII do sistema acrossômico para cada animal com o auxílio do programa Image-Pro Express. Devido à sua forma irregular e baixa frequência, o diâmetro médio do núcleo das espermatogônias foi

calculado através de uma régua micrométrica acoplada à ocular de um microscópio Olympus BX-51, com aumento final de 200X.

3.7. Análise Estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso. Os dados morfométricos e dos componentes do parênquima testicular foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). As médias entre os grupos estudados foram comparadas através do teste Tukey, LSD, e Test T, quando apropriado e a variabilidade foi analisada por meio de análise de variância (ANOVA). Estes testes estatísticos foram realizados utilizando-se o programa *SPSS 12.0 for Windows*. O nível de significância considerado foi de $P<0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 - *Crescimento dos filhotes durante a lactação*

O peso inicial dos filhotes foi semelhante em ambos os grupos estudados e a curva de crescimento linear foi ascendente neste período. A variação do peso coporal no grupo Tratamento que se observa na figura 5 determinou-se pela dieta hipoprotéica oferecidas às mães durante a gestação e lactação. Estes resultados mostram que os filhotes do grupo Tratamento tiveram peso corporal 11,68 gramas (P<0,05) menor ao desmame quando comparados ao grupo Controle. Os dados referentes ao peso corporal das mães e consumo de ração no período pré-gestacional, na gestação e lactação estão no anexo 2.

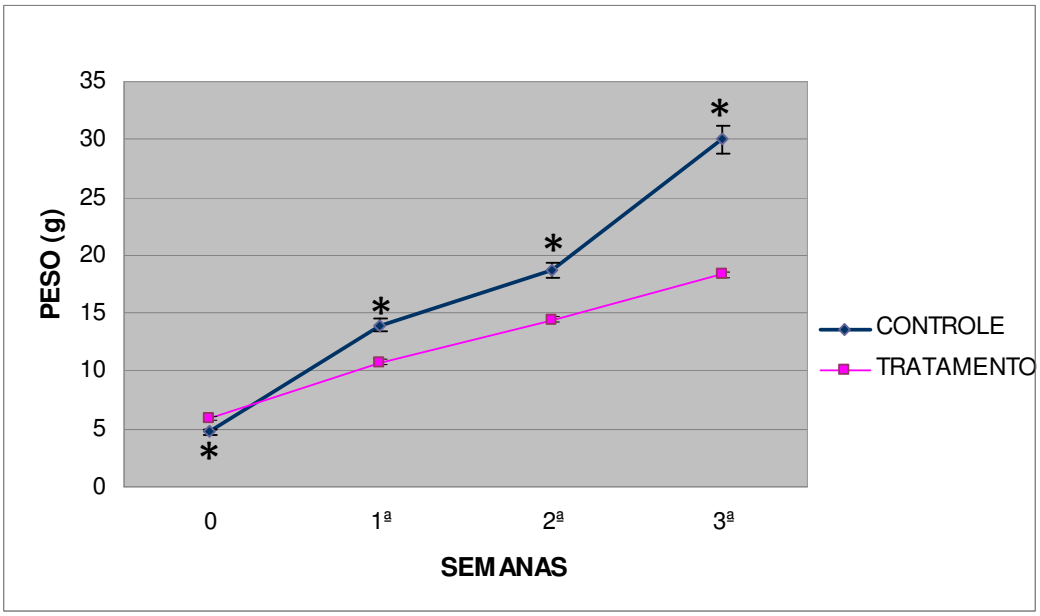


Figura 5 - Curva do peso corporal (média ± erro padrão) dos filhotes machos durante o período da lactação em ambos os grupos experimentais (0, peso ao nascimento; 3ª, peso ao desmame) * Médias diferem-se pelo Teste t (P< 0,05).

4.2 – Crescimento corporal após o desmame

As curvas dos pesos corporais dos ratos submetidos aos vários tratamentos (Fig. 6) demonstram que a partir do 35º dia após o desmame, iniciou-se um aumento diferenciado do peso corporal em todos os grupos, de tal forma que os valores para os grupos que receberam uma dieta hipoprotéica (CT, TT) permaneceram significativamente (p<0,05) inferiores até o 70º dia de vida, quando pesavam aproximadamente, 111 gramas e 58 gramas, respectivamente. Já os animais do grupo CC aos 70º dias de vida pesavam, aproximadamente, 285 gramas. Embora o grupo

TC tenha apresentado um aumento do peso corporal superior ao grupo CT e TT (P<0,05), a reabilitação nutricional após o desmame não garantiu um crescimento adequado aos animais, apresentando uma massa corporal final 32% menor que a dos animais do grupo CC.

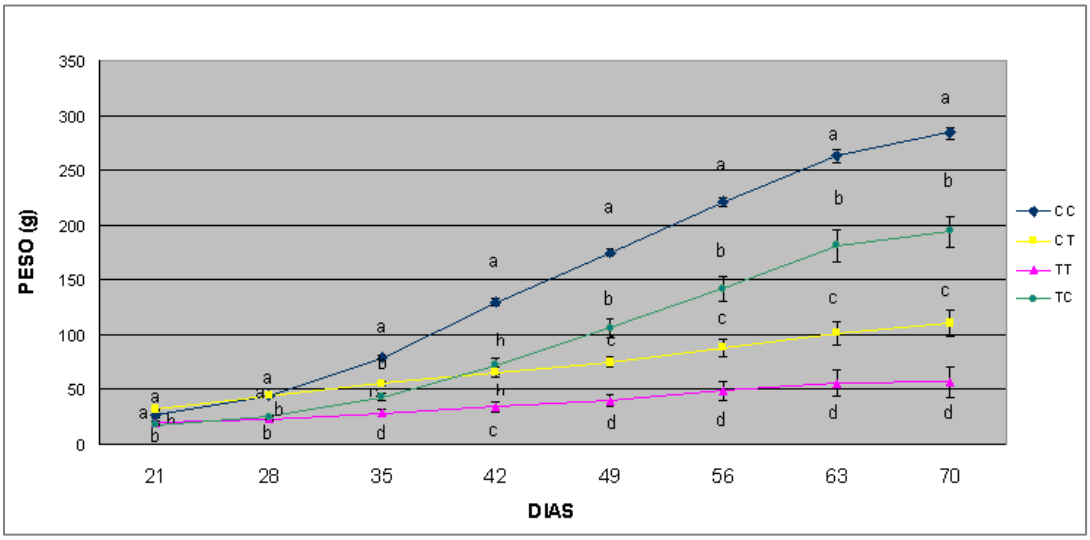


Figura 6 - Curva de ganho do peso corporal dos filhotes em gramas (g)(média ± erro padrão) desde o desmame (21-23 dias) até os 70 dias de idade. CC, Controle-Controle; CT, Controle-Tratamento; TT, Tratamento-Tratamento; TC, Tratamento-Controle. [a,b,c,d] Médias com letras distintas na mesma semana diferem-se pelo teste de Tukey (P< 0,05).

4.3 - Peso testicular e índice gonadossomático (IGS)

A Tabela 5 mostra que o criptorquidismo experimental (testículo direito) provocou redução significativa (P<0,05) dos pesos testiculares e do IGS em todos os grupos avaliados: CC, CT, TT e TC quando comparados com os testículos orquídico (testículo esquerdo). Exceção seria apenas quanto aos pesos dos testículos dos animais TT que independente da temperatura apresentaram pesos testiculares semelhantes.

Nos testículos orquídicos, onde foi observado apenas o efeito da desnutrição sobre o testículo, constatou-se que os grupos CT e TT apresentaram redução testicular significativa quando comparado com o peso testicular dos animais CC e TC. Verificou-se ainda que os testículos dos animais TT apresentaram peso muito reduzido (P=0,001), diferente mesmo do grupo CT. Mas quando se calculou a relação entre o peso do testículo com o peso corporal, conhecido como índice gonadossomático, constatou-se que não houve diferença significativa entre os animais de nenhum dos diferentes grupos experimentais (Tab. 5).

Ao avaliar o efeito da desnutrição associado ao aumento da temperatura corporal sobre o peso do testículo criptorquídico, verificou-se novamente que os testículos dos animais dos grupos CT e TT foram significativamente menores que

aqueles dos grupos CC e TC. Quando se calculou o IGS, constatou-se que os testículos criptoquídicos do grupo TT foram proporcionalmente maiores em relação ao peso corporal quando comparados com os outros grupos avaliados.

Tabela 5 – Peso testicular (em gramas) e índice gonadossomático (IGS) dos animais dos grupos experimentais aos 70 dias de idade. CC, Controle-Controle; CT, Controle-Tratamento; TT, Tratamento-Tratamento; TC, Tratamento-Controle. Valores expressos em média ± erro padrão. [£]

Grupos	Peso testículo Orquídico	Peso testículo Criptorquídico	IGS Orquídico	IGS Criptorquídico
CC	1,203 ± 0,05 $^{a\,*}$	0,229 ± 0,02 $^{a\,**}$	0,471 ±0,04 $^{a\,*}$	0,089 ± 0,01 $^{a\,**}$
CT	0,751 ± 0,06 $^{b\,*}$	0,141 ± 0,01 $^{b\,**}$	0,692 ± 0,04 $^{a\,*}$	0,134 ± 0,02 $^{a\,**}$
TT	0,377 ± 0,11 $^{c\,*}$	0,138 ± 0,02 $^{b\,*}$	0,568 ± 0,06 $^{a\,*}$	0,245 ± 0,04 $^{b\,**}$
TC	1,053 ± 0,06 $^{a\,*}$	0,217 ± 0,01 $^{a\,**}$	0,587 ± 0,05 $^{a\,*}$	0,122 ± 0,01 $^{a\,**}$

£Letras distintas $^{(a,b,c)}$ na mesma coluna e asteriscos distintos (*, **) na mesma linha indicam que os valores diferem-se pelo teste de Tukey e pelo teste LSD, quando apropriado (P< 0,05).

4.4 - Morfologia Tubular

Testículo Orquídico

Avaliando a histologia do testículo dos ratos controle (CC), observou-se que apresentavam as mesmas características morfológicas daquelas descritas na literatura (Russell et al., 1990). No epitélio seminífero dos grupos CT e TC as células das linhagens espermatogonial e espermatocitária apresentaram morfologia e distribuição semelhantes àquelas observadas nos animais controle (CC) e nestes animais foi possível caracterizar os estádios do ciclo do epitélio seminífero. Entretanto, no grupo TT, constatou-se que as espermatogônias, espermatócitos e espermátides arredondadas apresentavam-se aparentemente normais, mas quanto às espermátides alongadas, estas foram vistas no epitélio seminífero somente até as espermátides da etapa 12, no estádio XII.

Testículo Criptorquídico

Nos ratos criptorquídicos foram encontradas alterações histológicas no parênquima testicular de todos os grupos estudados. Dentre elas foram observadas redução do diâmetro tubular (Figs. 8 e 9), aglomerados de células de Sertoli e espermatócitos em paquíteno no centro de alguns túbulos seminíferos, número reduzido de células germinativas no epitélio seminífero sendo que as células mais

avançadas foram os espermatócitos em paquíteno e, desta forma, ausência de espermátides arredondadas e alongadas (Fig. 7). Em alguns túbulos seminíferos foram observadas, no epitélio germinativo, apenas a presença de células de Sertoli (*Sertoli-cell-only*). Nos animais do grupo TC, os túbulos seminíferos foram mais afetados, apresentando uma maior depleção das células germinativas com uma quantidade maior de túbulos seminíferos com morfologia de *Sertoli-cell-only*. Entretanto, quando neste grupo TC mediu-se a altura do epitélio seminífero, constatou-se que não houve diferença significativa quando comparada com os outros grupos avaliados.

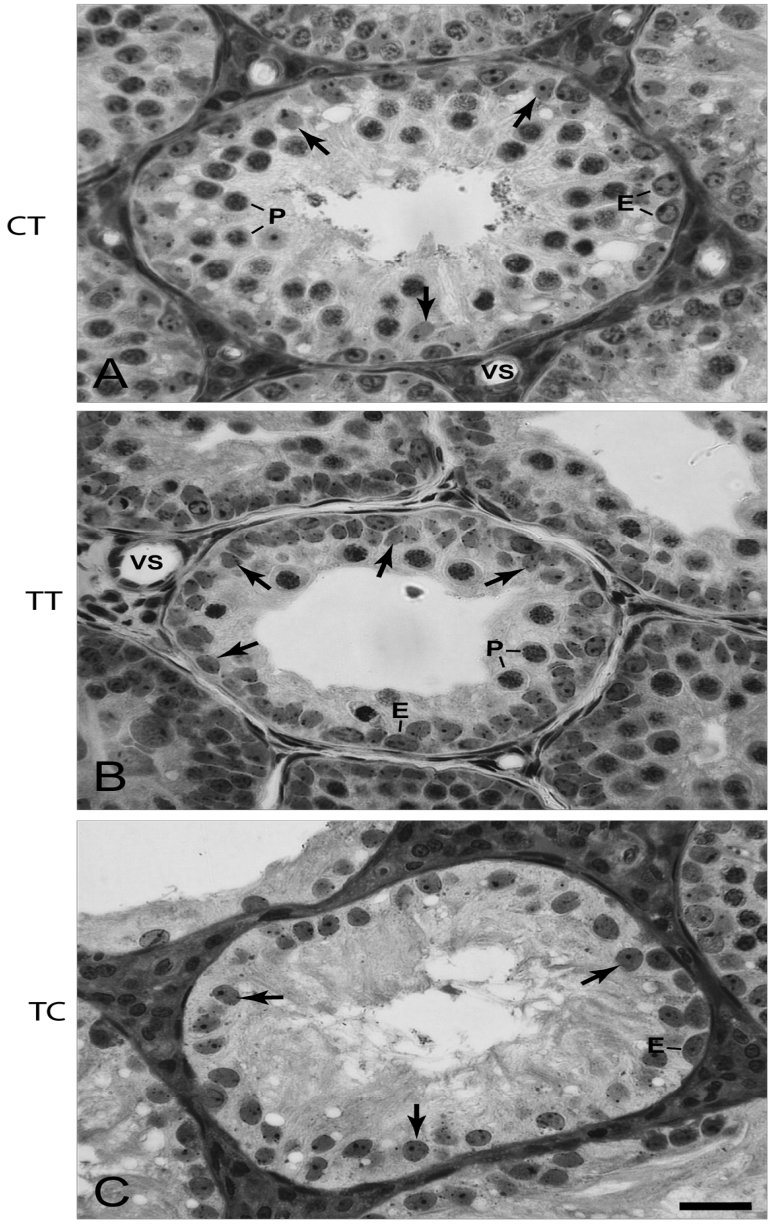


Figura 7 - Fotomicrografias de túbulos seminíferos mostrando em B que o número de célula de Sertoli (setas) está maior no testículo criptorquídico e estas se mostram distribuídas na forma de paliçada nos animais do grupo TT (Tratamento- Tratamento). Notar que as células germinativas mais avançadas são espermatócitos em paquíteno. Em A (CT, Controle-Tratamento) e em C (TC, Tratamento-Controle) as células estão dispostas dispersa no túbulo seminífero E, espermatognia; P, paquíteno; VS, vaso sanguíneo. Barra equivale a 32 µm.

4.5 - Diâmetro tubular, diâmetro do lume e altura de epitélio

Os efeitos da desnutrição protéica e/ou aumento da temperatura sobre o parênquima testicular foram avaliados através da medida da altura do epitélio seminífero e das medidas dos diâmetros tubular e luminal. Observou-se nos testículos orquídicos que os diâmetros tubulares e luminais foram menores no grupo TT, animais estes que foram submetidos a deficiência protéica desde o período pré-natal (Fig. 8 e 9). Os animais do grupo CT, que receberam a dieta hipoprotéica somente após o desmame, apresentaram redução dos diâmetros tubulares e luminais, mas não tão evidente quanto no grupo TT. Nos testículos orquídicos não houve diferença entre a medida da altura do epitélio seminífero nos diferentes grupos avaliados. Em relação aos efeitos da deficiência protéica associada ao aumento da temperatura, nos testículos criptorquídicos, constatou-se que não houve diferença em nenhum dos parâmetros avaliados (Fig. 8 e 9).

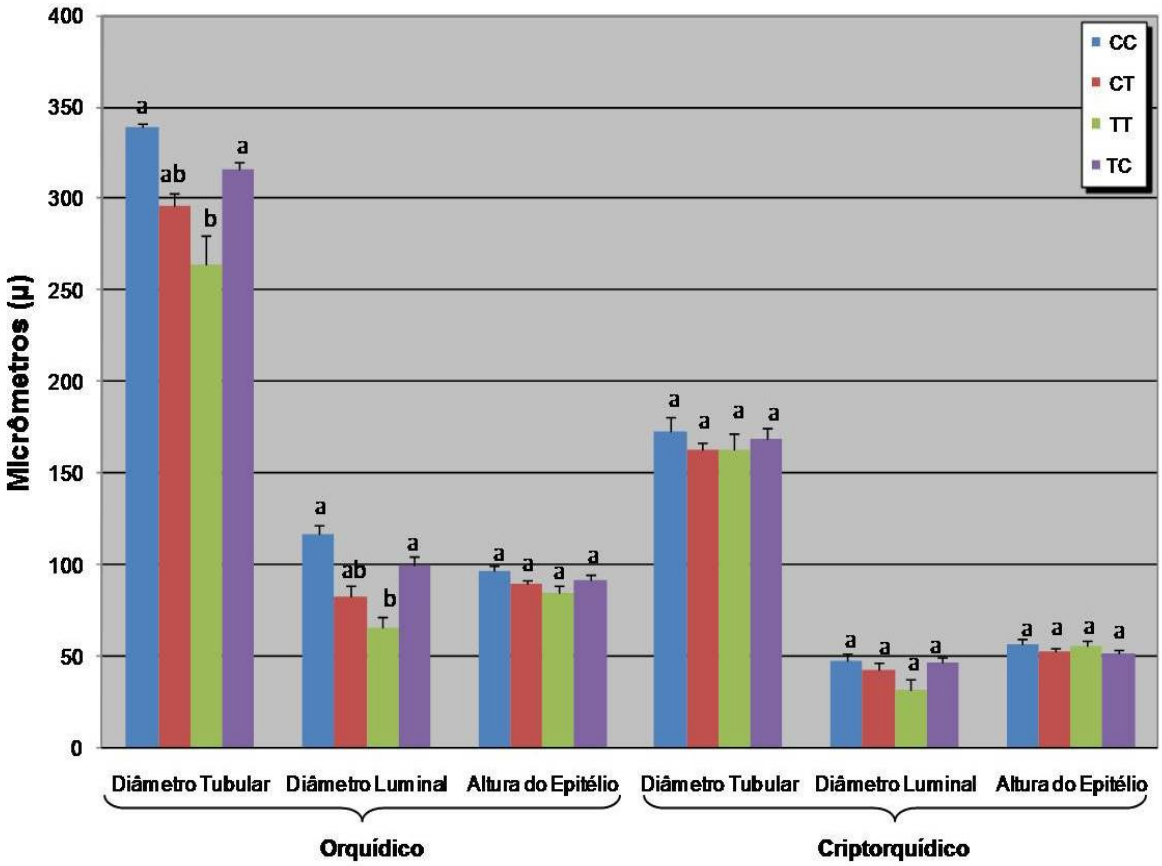


Figura 8 – Parâmetros testiculares avaliados aos 70 dias de idade nos diferentes grupos experimentais (média ± erro padrão). [a,b] Letras distintas para cada parâmetro avaliado indicam que os valores diferem-se pelo teste de Tukey e pelo teste de LSD, quando apropriado (P< 0,05).

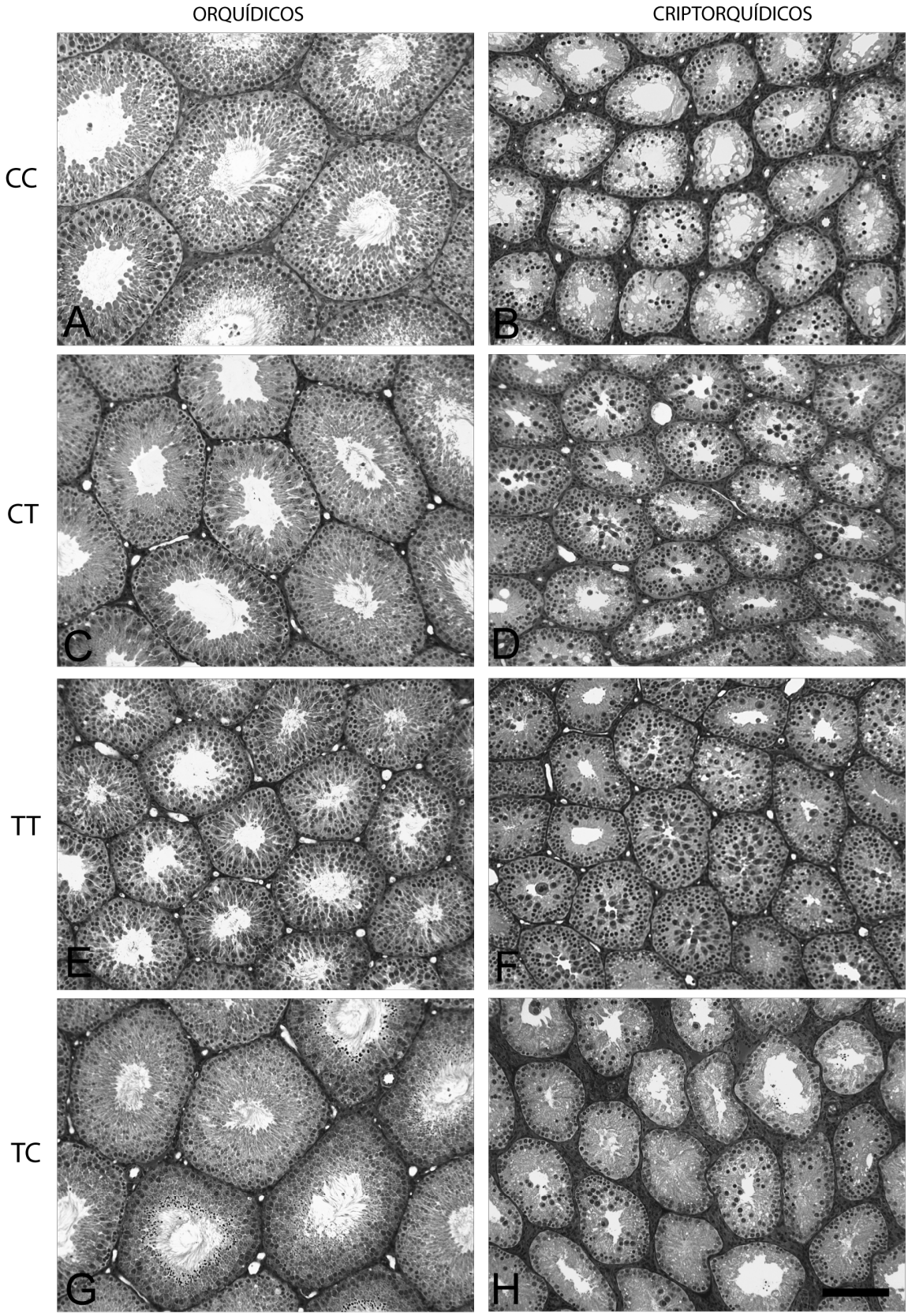


Figura 9. Fotomicrografias do testículo de ratos orquídicos e criptorquídicos após diferentes dietas hipoprotéicas mostrando evidentes alterações no diâmetro dos túbulos seminiferos. CC, controle-controle; CT, controle-tratamento; TT, tratamento-tratamento; TC, tratamento-controle. Todas as imagens foram obtida no mesmo aumento. Barra equivale a 150 µm.

4.6 - Proporção volumétrica dos componentes testiculares (%)

A proporção volumétrica dos compartimentos intertubular e tubular do parênquima testicular dos testículos orquídicos e criptorquídicos estão apresentadas na Tabela 6. A somatória dos valores correspondentes às células de Sertoli e germinativas correspondem a ~15 a 20% dos totais dos componentes testiculares. Os 80% restantes, não apresentados na Tabela 6, correspondem aos outros componentes tais como células peritubulares mióides, macrófagos, fibroblastos, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e lúmen. Os valores apresentados nesta tabela foram utilizados no cálculo do número total de células no testículo, apresentados nas tabelas 7 e 8 e figuras 10 e 11.

Tabela 6 – Proporção volumétrica das células somáticas e germinativas (%) do parênquima testicular dos diferentes grupos experimentais. CC, Controle-Controle; CT, Controle-Tratamento; TT, Tratamento-Tratamento; TC, Tratamento-Controle; ORQUI, orquídico; CRIPTO, criptorquídico**.** Valores expressos em média ± erro padrão.

Grupos	% volumétrica de alguns dos componentes testiculares									
	SERTOLI		ESPERMATOGôNIA		CITO		TIDE		LEYDIG	
	ORQUI	CRIPTO	ORQUI	CRIPTO	ORQUI	CRIPTO	ORQUI	CRIPTO	ORQUI	CRIPTO
CC	2,3 ±0,1	6,9±0,1	0,6 ±0,1	0,9 ±0,1	6,9±0,4	5,9 ±0,7	9,6 ±0,5	-	0,4 ±0,04	0,5 ±0,1
CT	3,2 ±0,1	8,4 ±0,3	0,4 ±0,03	1,2 ±0,2	8,5 ±0,2	5,6 ±0,3	7,4 ±0,3	-	0,4 ±0,05	0,5 ±0,1
TT	4,1 ±0,6	10,9 ±1,6	0,5 ±0,1	1,5 ±0,4	8,9 ±0,5	9,9 ±0,8	7,0 ±0,2	-	0,2 ±0,01	0,4 ±0,1
TC	2,6 ±0,1	7,6 ±0,5	0,3 ±0,1	0,7 ±0,1	6,5 ±0,9	3,0 ±1,0	8,3 ±0,3	-	0,5 ±0,05	0,9 ±0,1

4.7 - População de células somáticas do parênquima testicular (10^6)

Pelos resultados mostrados na Tabela 7, pode-se perceber que a restrição protéica não influenciou no número final das células de Sertoli, uma vez que todos os grupos experimentais apresentaram valores numéricos semelhantes no testículo orquídico. Entretanto, a elevação da temperatura testicular interferiu na proliferação deste tipo celular, estando reduzido em quase todos os grupos experimentais no testículo criptorquídico (CC, CT e TC), exceção nos animais do grupo TT, que exibiram números aumentados de células de Sertoli.

Já as células de Leydig, sofreram, no testículo orquídico, influência da dieta hipoprotéica mostrando número reduzido nos animais do grupo CT, TT e TC, com redução mais acentuada nos animais TT. No testículo criptorquídico, estas células apresentaram números semelhantes em todos os grupos avaliados. Quando se

compara o número de células de Leydig entre os testículos orquídicos e criptorquídicos num mesmo tratamento observou-se que em todos eles o número deste tipo celular foi reduzido nos testículos cirptorquídicos (P<0,05). O grupo TT apresentou valores semelhantes em ambos os testículos estudados.

O número de macrófagos foi o mesmo em todos os grupos estudados no testículo orquídico (P>0,05). Entretanto, houve uma variação deste tipo celular no testículo criptorquídico dos animais do grupo CC e TC, apresentando valores aumentados quando comparados com os animais dos grupos CT e TT.

Tabela 7 - Número de células somáticas (10^6) do parênquima testicular dos diferentes grupos experimentais. CC, Controle-Controle; CT, Controle-Tratamento; TT, Tratamento-Tratamento; TC, Tratamento-Controle; ORQUI, orquídico; CRIPTO, criptorquídico**.** Valores expressos em média ± erro padrão. £

Grupos	C. Sertoli ORQUI	C. Sertoli CRIPTO	C. Leydig ORQUI	C. Leydig CRIPTO
CC	55,19 ± 8,08 ^{a} *	34,40 ± 3,36 ^{a} **	39,82 ± 3,32 ^{a} *	10,26 ± 1,46 ^{a} **
CT	50,64 ± 6,18 ^{a} *	32,91 ± 3,76 ^{a} **	17,43 ± 2,21 ^{bc} *	6,24 ± 1,3 ^{a} **
TT	33,94 ± 5,99 ^{a} *	50,93 ± 3,57 ^{b} **	9,42 ± 3,65 ^{c} *	5,53 ± 1,67^{a} *
TC	50,09 ± 6,82 ^{a} *	33,89 ± 3,85 ^{a} **	26,41 ± 5,83 ^{ab} *	11,73 ± 2,02 ^{a} **

£Letras distintas $^{(a,b,c)}$ na mesma coluna e asteriscos distintos (*, **) na mesma linha indicam que os valores diferem-se pelo teste de Tukey e pelo teste LSD, quando apropriado (P< 0,05).

4.8 – Número de células espermatogênicas

Espermatogônias

Na figura 10 acham-se discriminados os números de espermatogônias, espermatócitos e espermáticas por testículo nos diferentes grupos experimentais. Observou-se que o número de espermatogônias presente no testículo orquídico foi menor nos grupos que receberam uma ração hipoprotéica durante seu desenvolvimento (CT, TT, TC; P<0,05) quando comparado com o grupo controle. Entretanto, a deficiência protéica não interferiu no número espermatogonial no testículo criptorquídico, uma vez este tipo celular não sofreu variação entre os grupos avaliados em relação ao controle. Ao se comparar os testículos orquídicos com os testículos criptorquídicos, verificou-se que o número de espermatogônias foi semelhante naqueles animais que foram submetidos à deficiência protéica desde a fase pré-natal. Já nos animais do grupo CT, provenientes de mães que receberam dieta normoprotéica, o número de espermatogônias diferiu entre os testículos

orquídicos e criportquídicos (Fig. 10). No entanto, quando se compara o número de espermatogônias dos grupos CT e CC verificou-se que a desnutrição após o desmame no grupo CT, independente da fase pré-natal, reduziu o número espermatogonial.

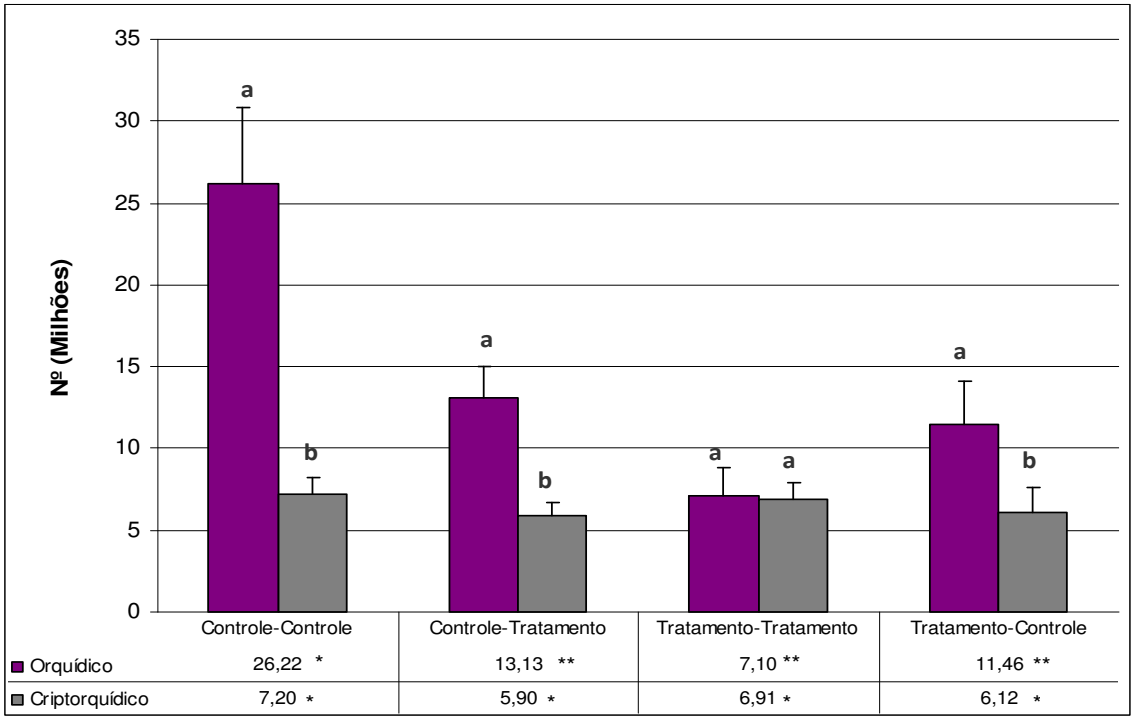


Figura 10 – Número espermatogonial nos diferentes grupos experimentais. Letras distintas [a, b] dentro do mesmo grupo experimental indicam diferença significativa. Asteriscos distintos (*, **) na mesma linha indicam diferença estatística entre os diferentes grupos experimentais. (P< 0,05).

*Espermatócito*s

Ao se avaliar o número de espermatócito primário em paquíteno, pode-se perceber que a dieta hipoprotéica interferiu no processo espermatogênico dos animais, uma vez que os valores numéricos de paquítenos mostraram-se semelhantes entre os grupos CT, TT e TC no testículo orquídico, estando mais elevado nos animais do grupo CC (P<0,05). Já no testículo criptorquídico, todos os grupos mostraram número celular semelhante, exceção do grupo TC que apresentou uma depleção maior destas células no epitélio germinativo. Em todos os grupos experimentais o número de paquíteno foi significativamente menor nos testículos criptorquídicos quando comparados com o dos testículos orquídicos (Fig. 11).

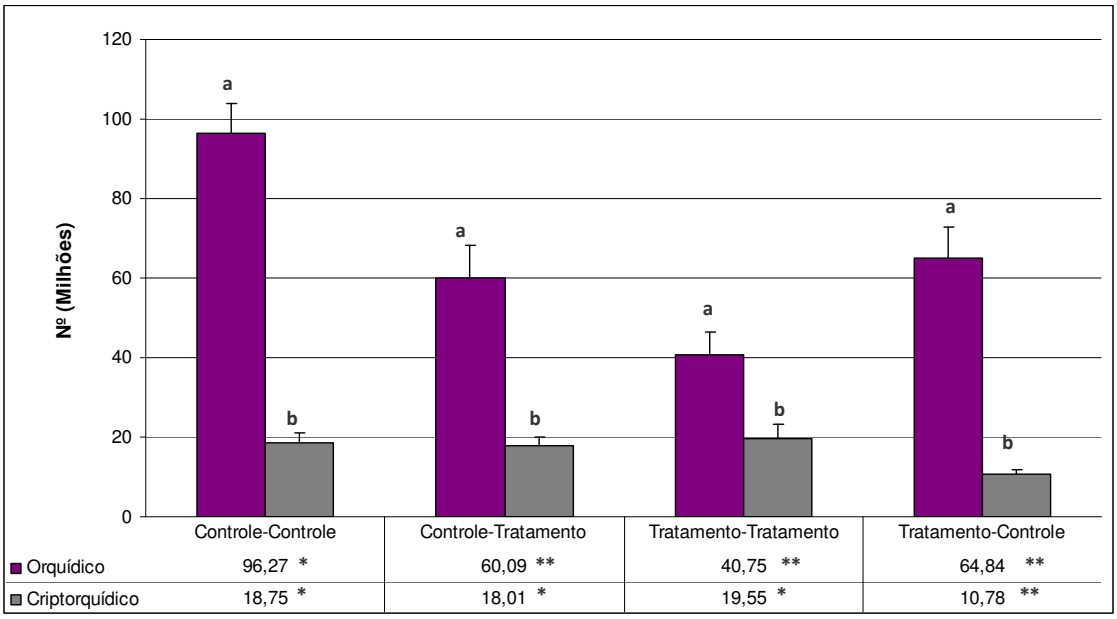


Figura 11 – Número de espermatócitos nos diferentes grupos experimentais (média ± erro padrão). Letras distintas [(a, b)] dentro do mesmo grupo experimental indicam diferença significativa. Asteriscos distintos (*, **) na mesma linha indicam diferença estatística entre os diferentes grupos experimentais. (P< 0,05).

Espermátides

No testículo criptorquídico, as células germinativas mais diferenciadas encontradas foram na forma de paquíteno. Desta forma, não foi possível verificar o número de espermátides arredondas presentes no epitélio seminífero neste testículo. Ao se calcular o número de espermátides nos testículos orquídicos, pode-se perceber que a desnutrição comprometeu a fertilidade dos animais que em alguma fase receberam a dieta hipoprotéica, ou via mãe subnutrida e/ou ração após o desmame (Tab. 8).

Tabela 8 - Número de espermátides arredodadas (10^6) do epitélio seminífero dos diferentes grupos experimentais. CC, Controle-Controle; CT, Controle-Tratamento; TT, Tratamento-Tratamento; TC, Tratamento-Controle; ORQUI, orquídico; CRIPTO, criptorquídico**.** Valores expressos em média ± erro padrão. £

Grupos	**Espermátide ORQUI**
CC	219,49 ± 10,97 [a]
CT	130,43 ± 22,23 [b]
TT	58,55 ± 16,05 [c]
TC	154,19 ± 18,61 [b]

£ Letras distintas [(a,b,c)] na mesma coluna indicam que os valores diferem-se pelo teste de Tukey e pelo teste LSD, quando apropriado (P< 0,05).

4.9 - Razões Celulares

O rendimento intrínseco da espermatogênese foi determinado baseando-se nas razões encontradas entre números celulares obtidos no estádio VII do sistema acrossômico e os valores encontrados são apresentados na Tabela 9. As razões celulares foram determinadas apenas nos testículos orquídicos uma vez que para os cálculos seria necessário determinar o número de espermátides arredondadas, que não estavam presentes nos testículos criptorquídicos. O rendimento da espermatogênese está dividido em eficiência da célula de Sertoli, rendimento mitótico, rendimento meiótico e rendimento geral da espermatogênese.

A eficiência da célula de Sertoli, calculado a partir da razão entre o número desta e o número das espermátides arredondadas mostrou-se comprometida pela restrição protéica, pois os animais que receberam uma dieta deficiente em alguma fase do seu desenvolvimento mostraram capacidade de suporte das células de Sertoli diminuída. Esta redução foi mais acentuada nos animais do grupo TT, que apresentavam células de Sertoli com capacidade de suportar apenas 3,38 ± 0,85 espermátides enquanto os animais CC tinham capacidade de suporte de 9,29 ± 0,80 (Tab. 9).

No rendimento mitótico observou-se que a deficiência protéica não interferiu no processo mitótico espermatogonial uma vez que o número de pré-leptótenos originados à partir de uma espermatogônia foi semelhante nos diferentes grupos estudados (Tab. 9). Já o rendimento meiótico, o qual foi representado pela razão entre espermátides arredondadas e espermatócitos em paquíteno, foi mais reduzido nos animais do grupo TT, apresentando uma perda de 41% enquanto nos outros grupos a perda foi de aproximadamente 23% (Tab. 9). Da mesma forma, o rendimento geral da espermatogênese foi comprometido pela deficiência protéica. O número de espermátides arredondadas originado a partir de uma única espermatogônia no grupo TT mostrou-se 50% inferior àquele dos grupos CC, CT e TC (Tab. 9).

Tabela 9 – Rendimento geral da espermatogênese. CC, Controle-Controle; CT, Controle-Tratamento; TT, Tratamento-Tratamento; TC, Tratamento-Controle**.** Valores expressos em média ± erro padrão.£

Grupos	CC	CT	TT	TC
Eficiência de Sertoli	9,29 ± 0,80 ^{a}	6,65 ± 0,43 ^{ab}	3,38 ± 0,85 ^{b}	7,74 ± 0,53 ^{ab}
Rendimento mitótico	36,39 ± 2,78 ^{a}	42,27 ± 4,16 ^{a}	33,93 ± 4,67 ^{a}	35,18 ±2,32 ^{a}
Rendimento meiótico	3,10 ± 0,07 ^{a}	3,11 ± 0,12 ^{a}	2,35 ± 0,32 ^{b}	3,07 ± 0,12 ^{a}
Rendimento geral	94,70 ± 5,83 ^{a}	101,17± 9,23 ^{a}	48,16 ± 12,16 ^{b}	91,00± 6,85 ^{a}

£ Letras distintas $^{(a,b,)}$ na mesma linha diferem-se pelo teste de Tukey e LSD, quando apropriado (P< 0,05)

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 ± 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 orquídicos obtido para os animais do grupo CC neste trabalho foi de 1,203 ± 0,05g. 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 significantemente maior quando comparado com animais que apresentam ambos os testículos no escroto, o que justificaria a redução do peso dos testículos orquídicos deste experimento. No testículo orquídico, 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 & Picket, 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 orquídicos e criptorquídicos 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 gonadossómatico (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 criptorquídico mostrou-se elevado em relação aos demais grupos experimentais. Embora os animais do grupo CT tenham mostrado um peso reduzido, seu índice gonadossomático 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 & Picket, 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 orquídico 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 orquídicos 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 orquídicos 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 orquídicos 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 orquídico, não houve diferença no diâmetro tubular, luminal e altura do epitélio seminífero no testículo criptorquídico 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 orquídicos 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 estádio 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 estádio de espermatócitos 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 espermatocitárias, 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 diminui 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 orquídico 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 orquídico, 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 espermatócitos 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 orquídicos. 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 D_1, proteínas envolvidas na progressão da

fase G_1 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 orquídico, 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 orquídico. Exceção somente os animais do grupo TT que apresentaram valores próximos em ambos os testículos estudados. Deste modo, acreditamos que a 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 significantemente 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 A_1 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 A_1. 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 ± 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 A_1 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 no 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 espermatozóides 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).

6. CONCLUSÕES

- A dieta hipoprotéica compromete de forma mais acentuada o desenvolvimento testicular quando os ratos são submetidos a este regime desde o período pré-natal.

- Apenas a desnutrição protéica desde o período pré-natal é reponsável pela redução da produção espermática diária em ratos adultos.

- Os efeitos da desnutrição protéica sobre o processo espermatogênico são parcialmente revertidos após a reabilitação nutricional.

- As alterações morfológicas encontradas no parênquima testicular de animais criptorquídicos são provenientes da elevação da temperatura testicular e não da desnutrição protéica.

- A elevação da temperatura testicular associada à desnutrição protéica crônica aumenta o número das células de Sertoli nos animais adultos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERCROMBIE, M Estimation of nuclear populations from microtome sections. The Anatomycal Record 94:238-248.1946.

AMANN RP, ALQUIMIST JO Reproductive capacity of dairy bulls. VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. Journal of Dairy Science 45:774-7841. 1962.

AMANN RP, VEERAMACHANEMI DNR Cryptorchidism in common eutherian mammals. Reproduction Review 133: 541–561. 2007.

ANDERSON EL, BALTUS AE, GAIADIEN HLR, HASSOLD TJ, ROOIJ DG, VAN PELT AMM, PAGE DC Stra8 and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice. Proceedings of the National Academy of Sciences 105:14976 – 14980. 2008.

BANSAL-RAJBANSHI M, MATHUR M Testicular morphology and cell proliferation kinetics of immature germ cells and Sertoli cells in suckling undernourished rats. Cell Tissue Kinetic 18:183-189. 1985.

BENSOUSSAN K, MORALES CR, HERMO L Vitamin E deficiency causes incomplete spermatogenesis and affects the structural differentiation of epithelial cells of the epididymis in the rat. Journal of Andrology 19:266-288. 1998.

BERGH A Effect of cryptorchidism on the morphology of testicular macrophages: evidence for a Leydig cell-macrophage interaction in the rat testis. Journal of Andrology 8:86-96. 1985.

BERNDTSON WE Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. Journal of Animal Science 44:818-83. 1977.

BERNDTSON WE, PICKET BW Relationship of absolute number of Sertoli cells to testicular size and spermatogenesis in young beef bulls. Journal of Animal Science, Chaimpaingn 64:241-246. 1987.

BERNSTEIN L, PIKE MC, DEPUE RH. Maternal hormone levels in early gestation of cryptorchid males: a case control study. British Journal of Cancer 58:379-81. 1988.

BREMNER WJ, MILLAR MR, SHARPE RM, SAUNDERS PT Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens. Endocrinology 135:1227-1234. 1994.

CASTRO ACS, BERNDTSON WE, CARDOSO FM Cinética e quantificação da espermatogênese: bases morfológicas e suas aplicações em estudos da reprodução de mamíferos. Revista Brasileira de Reprodução Animal 21:25-34. 1997.

CATTELAN JW Aspectos de casuística, morfométricos, morfológicos e de testosterona sérica no criptorquidismo em cavalos.Tese (Livre – Docência) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, 64 p. 2002.

CHIARINI-GARCIA H, MEISTRICH ML High resolution light microscopic characterization of spermatogonia. In: Hou SX, Singh SR Germline Stem Cells, Totowa NJ, USA: Humana Press. From Methods in Molecular Biology Series 2008, 450, Cap. 6, 95-107.

CLERMONT, Y Kinetics of spermatogenesis in mammals seminiferous epithelium cycle and spermatogonial reviews. Physiological Reviews 52:198 – 236. 1972.

COELHO KS, SOUZA AI, BATISTA FM Avaliação antropométrica do estado nutricional da gestante: visão retrospectiva e prospectiva. Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil 2: 57-61. 2002.

COSTA DS, DE PAULA TAR Cinética da espermatogênese de catetos (Tayassu Tajacu) Revista Ceres 53: 619-626. 2007.

COULTER GH, COOK RB, KASTELIC JP Effects of dietary energy on scrotal surface temperature, seminal quality and sperm production in young beef bulls. Journal of Animal Science 75:1048-1052. 1997.

DE ROOIJ DG, LOK D Regulation of density of spermatogonia in the seminiferous epithelium of the Chinese hamster: II. Differentiating spermatogonia. Anatomical Record 217:131-136. 1987.

DOUGLAS CR Controle da ingestão alimentar. Tratado de Fisiologia Aplicada à Nutrição. São Paulo: Robe Editorial; 473-84, 2002.

DÜNDAR M, KOCAK I, CULHACI N, EROL H Determination of apoptosis through bax expression in cryptorchid testis: an experimental study. Pathology Oncology Research. 11:170–173. 2005.

FOURIE PJ, SCHWALBACH LMJ, NESER FWC, VAN DER WESTHUIZEN C Scrotal, testicular and semen characteristics of young Dorper rams managed under intensive and extensive conditions. Small Ruminant Research 54:53-59. 2004.

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

FRANÇA LR, CHIARINI-GARCIA H Célula de Sertoli. In: Carvalho HF, Collares-Buzato CB (Ed.) A Célula: Uma abordagem multidisciplinar. São Paulo: Ed. Manole, 2005,01, 302-324p.

FRANÇA LR, HESS RA, COOKE PS Neonatal hypothyroidism causes delayed Sertoli cell maturation in rats treated with propylthiouracil: evidence that the Sertoli cell controls testis growth. Anatomical Record 242:57-69. 1995.

FRANÇA LR, RUSSELL LD The testis of domestic mammals. In: Martinez-Garcia F, Regadera J (Eds). Male reproduction: a multidisciplinary overview. Madrid: Churchill Comunications, 1998. 198-219 p.

GABALDI SH , WOLF A A importância da termorregulação testicular na qualidade do sêmen em touros. Ciências Agrárias e da Saúde 2:66 – 70. 2002.

GENOVESE P, NÚÑEZ ME, POMBO C AND BIELLI A Undernutrition During Foetal and Post-Natal Life Affects Testicular Structure and Reduces the Number of Sertoli Cells in the Adult Rat. Reproduction in Domestic Animal 45: 233-236. 2010.

GOMES MLM (2007) Morfometria testicular de ratos Wistar adultos tratados com infusão aquosa de catuaba (Trichilia catigua A. Juss. Meliaceae) Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) Universidade Federal de VIÇOSA, 49 p.

GRIMBLE RF, MANSARAY YK Effects in rats of dietary protein inadequacy on lactose production, milk volume and components of the lactose synthetase complex (EC 2.4.1.22). Annals of Nutrition and Metabolism 31:179 -184. 1987.

HAN SY, OH SY, JEON WJ, KIM JM, LEE JH, CHUNG HY, CHOI YH, YOO MA, KIM HD, KANG HS Mild heat shock induces cyclin D1 synthesis through multiple Ras signal pathways. FEBS Letters 515:141-145. 2002.

HATFIELD DL, GLADYSHEV VN How selenium has altered our understanding of the genetic code. Molecular and Cellular Biology 22: 3565-3576. 2002.

HERBERT DC, WEAKER FJ (1983) Ultrastructure of the Sertoli and Leydig cells in the testes of normal versus protein-calorie malnourished rats. Nutrition Research 3:61-68. 1983.

HESS RA, COOKE PS, BUNICK D Adult testicular enlargement induced by neonatal hypothyroidism is accompanied by increased Sertoli and germ cell numbers. Endocrinology 132:2607-2613. 1993.

HUCKINS C The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. Anatomical Record 190:905-26. 1978.

HURLEY WL, DOANE, RM Recent developments in the roles of vitamins and minerals in reproduction. Journal of Dairy Science 72:784-804. 1989.

HUTSON JM, SASAKI Y,HUYNH J, YONG E, TING A The gubernaculum in testicular descent and cryptorchidism. The Turkish Journal of Pediatrics 46:1-6. 2004.

KARACA F, DÖNMEZ HH, KARSLI MA Effects of protein deficiency on testosterone levels, semen quality and testicular histology in the developing male rat. Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science 30:7-13. 2003.

KENAGY GJ, TROMBULAK SC Size and function of mammalian testes in relation to body size. Journal of Mammals 67:1 - 22. 1986.

KHATWA UA, MENON, PS Management of undescended testis. Indian Journal of Pediatrics 67:449 – 454.2000.

KLONISH T, FOWLER PA, HOMBACH-KLONISH S Molecular and genetic regulation of testis descent and external genitalia development. Developmental Biology 270:1-18. 2004.

KNUDSON CM, TUNG KSK, TOURTELLOTTE WG, BROWN GAJ, KORSMEYER SJ Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. Science 270:96–99. 1995.

KONG WH, ZHENG G, LU JN, TSO JK Temperature dependent expression of cdc2 and cyclin B1 spermatogenic cells during spermatogenesis. Cell Research 10:289-302. 2000.

KOTSAMPASI B, BALAKAS C, PAPADOMICHELAKIS G, CHADIO SE Reduced Sertoli cell number and altered pituitary responsiveness in male lambs undernourished in utero. Animal Reproduction Science, 1-12. 2008.

LANGLEY-EVANS SC, BELLINGER L, MCMULLEN S Animal models of programming: early life influences on appetite and feeding behavior. Maternal & Child Nutrition 1:142-148. 2005.

LÉONHARDT M, LESAGE J, CROIX D, DUTRIEZ CI, BEAUVILLAIN,JC, DUPOUY JP Effects of perinatal maternal food restriction on pituitary-gonadal axis and plasma leptin level in rat pup at birth and weaning and on timing of puberty. Biology of Reproduction 68: 390 - 400. 2003.

LEVITSKY DA, BARNES RH Nutritional and environmental interactions in behavioral development of the rat: long-term effects. Science, 176: 68-71. 1972.

LIMA JRR, MARTINS JL Avaliação macro e microscópica dos testículos em modelo experimental de criptorquidia pela secção do gubernaculun testis em ratos. Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões 30:114 -121.2003.

LUCYK JM, FURUMOTO RV Necessidades nutricionais e consumo alimentar na gestação: uma revisão. Comunicação em Ciências da Saúde 19:353-363. 2008.

LUE YH, SINHA HIKIM AP, SWERDLOFF RS, IM P, TAING KS, BUI T, LEUNG A, WANG C Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: role of intratesticular testosterone on stage specificity. Endocrinology 140:1709–1717. 1999.

LUNSTRA DD, SCHANBACHER BD Testicular function and Leydig cell ultrastructure in long-term bilaterally cryptorchid rams. Biology of Reproduction 38: 211-220. 1988.

MAGGIONI D, ROTTA PP, MARQUES JA, ZAWADZKI F, PRADO RM, PRADO IN Influência da proteína sobre reprodução animal: Uma revisão. Campo Digital 1:105-110. 2008.

MARCONDES FK, BIANCHI FJ, TANNO AP Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. Brazilian Journal of Biology 62: 609–614. 2002.

MARTIN-GRONERT MS, OZANNE SE Maternal nutrition during pregnancy and health of the offspring. Biochemical Society Transactions 34: 779-782. 2006.

MARTINS VJB, MARTINS PA, NEVES J, SAWAYA AL Children recovered from malnutrition exhibit normal insulin production and sensitivity. British Journal of Nutrition 99:297-302. 2008.

MCLACHLAN RI, WREFORD NG, DE KRETSER DM, ROBERTSON DM The effects of testosterone on spermatogenic cell populations in the adult rat. Biology of Reproduction 51:945–955. 1994.

MELO MC, CÉSAR FA, CHIANCA JR DA, CHIARINI-GRACIA H, ALMEIDA FRCL (2008) Histomorphometry of rats testis after chronic maternal protein deficiency. Animal Reproduction Abstract Series. 359-359.

MENDIS-HANDAGAMA SM, ARIYARATNE HB Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. Biology of Reproduction 65:660-671. 2001.

MIRANDA JR Efeitos do tratamento neonatal com 6-n-propil-2-tiouracil (PTU) e FSH na proliferação das células de Sertoli e função testicular em ratos Wistar adultos (2002). Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 47p.

MONET-KUNTZ C, BARENTON B, LOCATELLI A, FONTAINE I, PERREAU C, HOCHEREAU-DE REVIERS MT Effects of experimental cryptorchidism and subsequent orchidopexy on seminiferous tubule functions in the lamb. Journal of Andrology 8:148 -54. 1987.

MORAES TAP JASSET PF, TORRES SM, MORAES AV, SILVA JÚNIOR VA, GUERRA MMP Efeito do uso de pentoxifilina no período neonatal sobre a produção espermática em ratos Wistar adultos. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia 61:80-87. 2009.

MORETTI E, DI CAIRANO G, CAPITANI S, SCAPIGLIATI G, BACCETTI B, COLLODEL G Cryptorchidism and semen quality: a TEM and molecular study. Journal of Andrology 28:194 -199. 2006.

MOURA CS, GUERRA, MPP, SILVA JÚNIOR VA Avaliação histomorfométrica do parênquima testicular de ratos adultos tratados com diferentes doses de ivermectina. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 58: 799 - 808. 2006.

MURAKAMI M, MASSAHIDE O, TAKAHASHI T, SHIBATA A, FUKAO A, MORISAKI N, KURACHI H Prepregnancy body mass index as an important predictor of perinatal outcomes in Japanese. Archive of Gynecology and Obstetrics 271: 311- 315. 2005.

MURDOCH WJ, VAN KIRK EA, VONNAHME KA, FORD SP Ovarian responses to undernutrition in pregnant ewes, USA. Reproductive Biology and Endocrinology 1:1-8. 2003.

NEVES ES, Estudo comparativo da estrutura do testículo e do processo espermatogênico em jumentos (Equus asinus) e burros (Equus mulus mulus) (2001) Tese(Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 135p.

NILSSON, P The biological triangle of life. Interaction between nutrition, reproduction and longevity. Lakartidningen 98:1797 - 1800. 2001.

NISTAL M, PANIAGUA R Non-neoplastic diseases of the testis. In: Bostwick DG, Eble JN (Eds). Urologic Surgical Pathology. St. Louis: Mosby; 1996. p.468 - 565.

NISTAL, M.; PANIAGUA R, REGADERA J, SANTAMARIA L, AMAT P A quantitative morphologic study of human Leydig cells from birth to adulthood. Cell and Tissue Research 246: 229 - 236. 1986.

OLSON GE, WINFREY VP, NAGDAS SK, HILL KE, BURK RF Selenoprotein P is Required for Mouse Sperm Development. Biology of Reproduction 73: 201 - 211. 2005.

ORTH JM Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: quantitative autoradiographic study. Anatomical Record 203: 485 – 492. 1982.

ORTH JM, GUNSALUS GL, LAMPERTI AA Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. Endocrinology 122: 787 – 794. 1988.

PASSOS MCF, RAMOS CF, MOURA EG Short and long term effects of malnutrition in rats during lactation on body weight of offspring. Nutrition Research 20: 1603 -1612. 2000.

PELLETIER MR, VITALE LM Las uniones oclusivas de las barreras hematotisulares del testículo, epidídimo y conducto deferente. Sociedad Agentina de Andrologia 12: 53-72. 2003.

PENA M, BACALLAO J Malnutrition and Poverty. Annual Review of Nutrition 22: 241-253. 2002.

PULLEN AH A parametric analysis of the growing CFHB (Wistar) rat. Journal of Anatomy 121:371 - 383. 1976.

RABELO R, SILVA JE Regulation of the uncoupling protein gene expression. European Journal of Endocrinology 136:251 - 264. 1997.

RAE MT, PALASSIO S, KYLE CE, BROOKS AN, LEA RG, MILLER DW, RHIND SM Effect of maternal undernutrition during pregnancy on ealy ovarian development and subsequent follicular development in sheep fetuses. Reproduction 122:915 - 922. 2001.

RAMOS CF, LIMA APS, TEIXEIRA CV, BRITO PD, MOURA EG Thyroid function in post-weaning rats, which dams were fed a low protein diet during suckling. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 30:133 - 137. 1997.

RAMOS CF, SILVA AM, COSTA WS, SAMPAIO FJB Stereological evaluation of the seminiferous tubules of rats after maternal undernutrition during the lactation period. Urologia Internationalis 76: 63 - 66. 2006.

REEVES PG, NIELSEN FH, JR FAHEY GC AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodent Diet. The Journal of Nutrition 123:1939 – 1951. 1993.

REMESAR X, LOPEX-TEJERO D, PASTOR-ANGLADA M Some aspects of amino acid metabolism in the rat fetus. Comparative Biochemistry and Physiology 88:719 - 725. 1987.

RHIND SM, RAE MT, BROOKS AN Effects of nutrition and environmental factors on the fetal programming of the reproductive axis. Reproduction 122:205 - 214. 2001.

RIUL TR, ALMEIDA PS, DE-OLIVEIRA LM, ALMEIDA SS Ethological analysis of mother-pup interactions and other behavioral reactions in rats: effect of malnutrition and tactile stimulation of the pups. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 32: 975 - 83. 1999.

ROCHA DCM, DEBELJUK L, FRANÇA LR Exposure to constant light during testis development increases daily sperm production in adult Wistar rats. Tissue and Cell 31: 372 – 379. 1999.

ROSSEN-RUNGE EC The process of spermatogenesis in mammals. Cambridge: University Press. 1977, 214p.

ROSSEN-RUNGE EC, GIESEL JR. LO Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rats. American Journal of Anatomy 87: 1 – 30. 1950.

RUSSELL LD, BARTKE A, GOH JC Postnatal development of the Sertoli cell barrier, tubular lumen, and cytoskeleton of Sertoli and myoid cells in the rat, and their relationship to tubular fluid secretion and flow. American Journal of Anatomy 184:179 - 189. 1989.

RUSSELL LD, CHIARINI-GARCIA H, KORSMEYER SJ, KNUDSON M Bax-dependent spermatogonial apoptosis is required for testicular development and spermatogenesis. Biol Reprod 66:950–958. 2002.

RUSSELL LD, ETTLIN RA, SINHA HIKIM EP, CLEGG ED (1990) Histological and histopathological evaluation of the testis, Cache River Press, 119 – 161p.

RUSSELL LD, PETERSON RN Determination of the elongate spermatid-Sertoli cell ratio I various mammals. Journal of Reproduction and Fertility 70: 635 – 664. 1984.

SAID A, SAKR R, NOSEIN MB, EL-SHOBAKI FA, BOULOS SY Effect of protein energy malnutrition (PEM) on spermatogenesis in the rat testis. Gazette of the Egyptian Paediatric 24: 51 - 58. 1976.

SELVA DM, TIRADO OM, TORAN N, SUAREZ QUIAN CA, REVENTOS J, MUNELL F Meiotic arrest and germ cell apoptosis in androgen binding protein transgenic mice. Endocrinology 141:1168 - 1177. 2001.

SHARPE RM Regulation of spermatogenesis. In. Knobil E, Neil JD (Eds.). The physiology of reproduction. 2.ed. New York: Raven Press 1994, 1363 – 1434p.

SHARPE RM, WALKER, M, MILLAR MR Effect of neonatal gonadotrop in releasing hormone antagonist administration on Sertoli cell number and testicular development in the marmoset: comparison with the rat. Biology of Reproduction 62:1685 -1693. 2000.

SHIKONE T, BILLING H, HSUEH AJW Experimentally induced cryptorchidism increases apoptosis in rat testis. Biology of Reproduction 51:865 - 872.1994.

SILVA JR VA Efeito hormonal do hipotireoidismo e hipertireoidismo pós-natal na proliferação das células de Sertoli e na função testicular em suíno (2000) Tese

(Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 191p.

SINHA HIKIM AP, AMADOR AG, KLEMCKE HG, BARTKE A, RUSSELL, LD Correlative morphology and endocrinology of Sertoli cells in hamster testis in active and inactive states of spermatogenesis. Endocrinology 125:1829 – 1843. 1989.

SINHA HIKIM AP, BARTKE A, RUSSELL, LD Morphometric studies on hamster testes in gonadally active and inactive states: light microscope findings. Biology of Reproduction 39:1225 -1237. 1988.

SOUZA CEA (2003) Avaliação da função reprodutiva de carneiros santa Inês durante o primeiro ano de vida: estudo do desenvolvimento testicular, produção espermática e caracterização das proteínas do plasma seminal. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) Universidade Federal do Ceará, 160 p.

SPRANDO RL Perfusion of the rat testis through the heart using heparin. In: Russell L.D, Histological Histopathological Evaluation of the Testis, Clearwater, USA: Cache River Press, 277-280 p, 1990.

SWERDLOFF RS, LUE Y, WANG C, RAJAVASHISTH T, SINHA-HIKIN A (1998) Hormonal regulation of germ cell apoptosis. In: Zirkin BR (Ed). Germ cell development, division, disruption and death. Springer-Verlag, New York. Inc.,1998.

TRINDADE CEP, NÓBREGA FJ, TONETE SSQ Repercussões metabólicas da desnutrição protéico-calórica. Desnutrição: intra-uterina e pós-natal. São Paulo: Panamed Editorial, 1986.

VALLE A, CATALÀ-NIELL A, COLOM B, GARCIA-PALMER FJ, OLIVER J, ROCA P Sex-related differences in energy balance in response to caloric restriction. American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism 289:15 - 22. 2005.

VERGOUWEN RP, JACOBS SG,HUISKAMP R Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. Journal of Reproduction and Fertility 93: 233 - 243. 1991.

WALLEN EM, SHORTLIFFE L. Undescended testis and testicular tumors. In: Ashcraft KW, Ed. Pediatric Surgery, 3rd Edn. London: W.B. Saunders Company; 2000. p. 663.

WING TY, CHRISTENSEN AK Morphometric studies on rat seminiferous tubules. American Journal of Anatomy 165:13 – 25. 1982.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Serious childhood problems in countries with limited resources. Geneva: WHO, 2004.

WU G, BAZER FW, CUDD TA, MEININGER CJ, SPENCER ET Maternal Nutrition and Fetal Development. The Journal of Nutrition 134:2169 - 2172. 2004.

XU X, APRELIKOVA O, MOENS P, DENG CX, FURTH PA Impaired meiotica DNA-damage repair and lack of crossing-over during spermatogenesis in BRCA1 full-length isoform deficient mice. Development 130: 2001 – 2012. 2003.

YAN HH, MRUK DD, CHENG CY Junction restructuring and spermatogenesis: the biology, regulation, and implication in male contraceptive development. Current Topics in Developmental Biology 80: 57 - 92. 2008.

YIN YZ, HAWKINS KL, DEWOLF WC Heat stress causes testicular germ cell apoptosis in adult mice. Journal of Andrology 18:159 -165. 1997.

YOUNG KA, ZIRKIN BR, NELSON RJ Testicular regression in response to food restriction and short photoperiod in white-footed mice (Peromyscus leucopus) is mediated by apoptosis. Biology of Reproduction 62:347 - 354. 2000.

ZAMBRANO E, GONZÁLES-RODRIGUES GL, GUZMÁN C, BECERRA-GARCÍA R, BOECK L, DÍAZ L, MENJIVAR M, LARREA F, NATHANIELSZ PW A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rats impairs male reproductive development. Journal of Physiology 563.1: 275-284. 2005.

ZHANG RD, WEN XH, KONG LS, DENG XZ, PENG B, HUANG AP A quantitative (stereological) study of the effects of experimental unilateral cryptorchidism and subsequent orchio-pexy on spermatogenesis in adult rabbit testis. Reproduction 124:95 - 105. 2002.

ZIMMERMANN S, STEDING G, EMMEN JM, BRINKMANN AO, NAYERNIA K, HOLSTEIN AF, ENGEL W, ADHAM IM Targeted disruption of the Insl3 gene causes bilateral cryptorchidism. Molecular Endocrinology 13: 681- 91. 1999.VILELA DAR, SILVA SGB, PEIXOTO MTD, GODINHO HP, FRANÇA LR Spermatogenesis in teleost: insights from the nile tilapia (Oreochromis niloticus) model. Fish Physiology And Biochemistry 28:187-190. 2003.

8- ANEXOS

8.1- Aprovação do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 141/2009,** relativo ao projeto intitulado "***Efeito da desnutrição protéica crônica na ontogenia, descenso testicular e desenvolvimento do processo espermatogênico em ratos***", que tem como responsável(is) **Hélio Chiarini-Garcia** , está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo ***Comitê de Ética em Experimentação Animal*** **(CETEA/UFMG),** tendo sido aprovado na reunião de **23/ 09/2009.**

Este certificado expira-se em **23/ 09/ 2014.**

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 141/2009,** related to the project entitled "***Effects of chronic proteic malnutrition on ontogeny, testicular descent and development of the spermatogenic process in rats***", under the supervisiors of **Hélio Chiarini-Garcia,** is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the ***Ethics Committee in Animal Experimentation*** **(CETEA/UFMG),** and was approved in **September 23, 2009.**

This certificate expires in **September 23, 2014.**

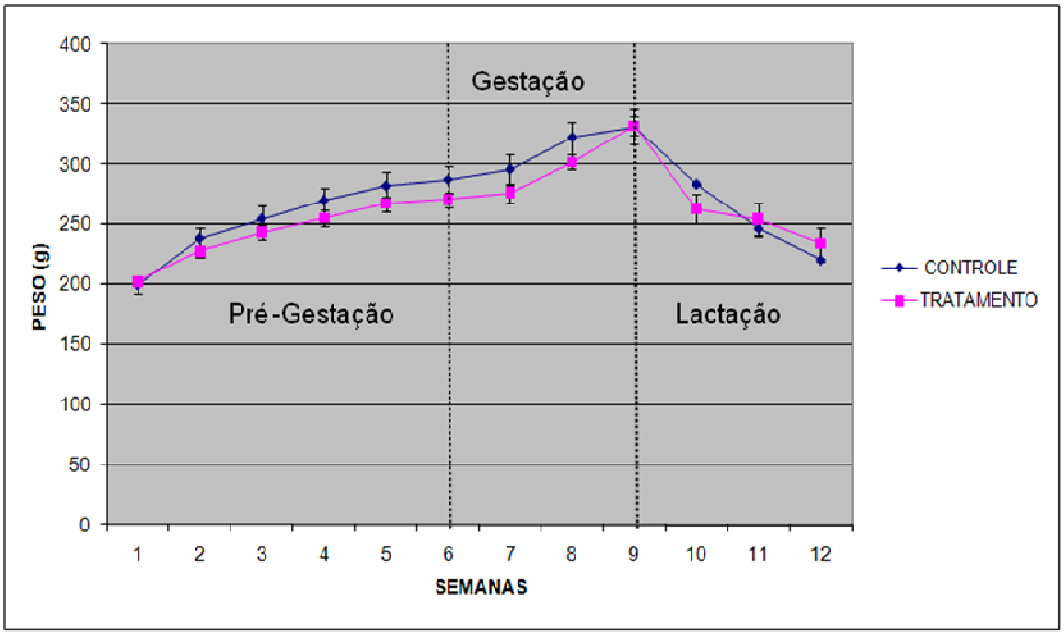
Belo Horizonte, 24 de Setembro de 2009.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)

8.2- Crescimento ponderal das mães e consumo de ração no período pré-gestacional, na gestação e lactação.



Curva de crescimento ponderal nas cinco semanas antecedentes à gestação, prenhez e lactação em ambos os grupos experimentais.

Consumo alimentar médio(g) das mães dos grupos Controle e Tratamento nos períodos pré-gestacional, gestação e lactação. P>0,05

Consumo Alimentar (g)	Controle	Tratamento
Pré-Gestacional	17,4 ± 0,6	16,4 ± 0,7
Gestacional	17,5 ± 0,8	17,4 ± 0,6
Lactação	23,11 ± 2,44	18,70 ± 1,99