

ANDRÉ LUÍS RIOS RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DO TESTÍCULO E DA CAUDA DO
EPIDÍDIMO DE CARNEIROS NA
PRÉ-PUBERDADE, NA MATURIDADE SEXUAL,
NO CRIPTORQUIDISMO E NA INSULAÇÃO
ESCROTAL: CONCENTRAÇÕES DE
TESTOSTERONA PLASMÁTICA E TECIDUAL,
HISTAMINA, FATOR DE NECROSE
TUMORAL-ALFA E ÓXIDO NÍTRICO.**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia,
UNESP, Campus Botucatu, para
obtenção do título de Doutor em
Medicina Veterinária. Área de
Concentração: Reprodução Animal

Botucatu - SP
2004

ANDRÉ LUÍS RIOS RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DO TESTÍCULO E DA CAUDA DO
EPIDÍDIMO DE CARNEIROS NA
PRÉ-PUBERDADE, NA MATURIDADE SEXUAL,
NO CRIPTORQUIDISMO E NA INSULAÇÃO
ESCROTAL: CONCENTRAÇÕES DE
TESTOSTERONA PLASMÁTICA E TECIDUAL,
HISTAMINA, FATOR DE NECROSE
TUMORAL-ALFA E ÓXIDO NÍTRICO.**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia,
UNESP, Campus Botucatu, para
obtenção do título de Doutor em
Medicina Veterinária. Área de
Concentração: Reprodução Animal

Orientador: Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo

Botucatu - SP
2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Rodrigues, André Luís Rios.

Avaliação do testículo e da cauda do epidídimo de carneiros na pré-puberdade, na maturidade sexual, no criptorquidismo e na insulação escrotal: concentrações de testosterona plasmática e tecidual, histamina, fator de necrose tumoral-alfa e óxido nítrico / André Luís Rios Rodrigues. – 2004.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2004.

Orientador: Sony Dimas Bicudo

Assunto CAPES: 50504002

1. Reprodução animal. 2. Ovino – Reprodução.

CDD 636.20824

Palavras-chave: Epidídimo; Histamina; Ovino; Óxido Nítrico; Testículo; Testosterona; TNF-alfa.

À Natureza, imagem da Inteligência
Criadora de Tudo.

*“Na Criação existe uma infinidade de
maravilhas que passam totalmente
inadvertidas a todos.”*

Da Sabedoria Logosófica

*“Tudo o que se acha oculto
será descoberto um dia
e o que o homem ainda
não pode compreender
lhe será sucessivamente
desvendado, em mundos
mais adiantados,
quando se houver
purificado.”*

Allan Kardec

A todos aqueles que mais estimo,
por entenderem minha busca,
também, pelo aperfeiçoamento acadêmico.

*“Estudai a Verdade meus irmãos, mas,
sobretudo, examinai o vosso amor;
não priorizeis o saber,
em detrimento do sentimento ...”*
Carlos A. Bacelli / Inácio Ferreira

Ao mestre Sony Dimas Bicudo

*“Homem algum poderá revelar-nos
senão o que já está meio adormecido na
aurora do vosso conhecimento.
O mestre que caminha à sombra do tempo,
rodeado de discípulos,
não dá de sua sabedoria,
mas sim de sua fé e ternura.
Se ele for verdadeiramente sábio,
não nos convidará a entrar
na mansão do seu saber,
mas vos conduzirá antes ao limiar
de vossa própria mente.”*
Gibran Khalil Gibran

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP- Campus de Botucatu, pela oportunidade de crescimento na vida profissional.

Ao CNPq pela bolsa de doutorado.

A todos os professores, técnicos e colegas que colaboraram diretamente, por terem acreditado na proposta do trabalho.

Ao mestre Sony Dimas Bicudo, pela orientação, liberdade, confiança, incentivo, e amizade durante todos estes anos e a Sara e Luana por compartilharem uma convivência feliz.

À Leira Tutida, pela parceria, companheirismo, espírito de luta e amizade.

Ao criador César Fernandes Pavaneli, pelo empréstimo dos animais pré-púberes.

À EMBRAPA - Tabuleiros Costeiros, Aracaju/SE por compartilhar os animais criptorquídicos possibilitando a realização desta etapa experimental.

Aos amigos Hymerson Azevedo e Marcos Chalhoub por auxiliarem na colheita dos animais criptorquídicos em Aracaju.

Ao prof. José Carlos Gomes pelo acolhimento e ao Departamento de Farmacologia - IB - UNESP - Botucatu, por permitirem as análises de concentração de histamina.

À prof.a. Wilma de Gravas Kempinas pela confiança e estímulo e ao Departamento de Morfologia - IB - UNESP - Botucatu - por oportunizarem as análises das contagens espermáticas por grama de tecido e os processamentos histológicos.

À prof.a. Cláudia Helena Pellizzon - Departamento de Morfologia - IB - UNESP - Botucatu - pela amizade, pelo esforço e pelo aprendizado.

À prof.a. Maria Célia Jamur, à prof.a. Constance Cornier - USP - Ribeirão Preto, à prof.a. Sônia Maria Oliani - UNESP - IBILCE - São José do Rio Preto - por terem colaborado no entendimento das análises histoquímicas.

Aos professores do Departamento Microbiologia e Imunologia, especialmente ao prof. Silvio Luís de Oliveira - IB - UNESP - Botucatu, e a profa. Lisiane de Almeida Martins por possibilitarem a realização do ensaio biológico de TNF alfa.

Ao prof. Raimundo Tostes - Faculdade de Medicina Veterinária - UNOESTE - Presidente Prudente, por auxiliar nas análises histopatológicas.

À prof.a. Sheila Jorge Adad - Laboratório de Patologia Especial - Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro - FMTM - Uberaba, por auxiliar no diagnóstico dos pigmentos melânicos.

Ao prof. Virmondes Rodrigues Jr. - Laboratório de Imunologia - Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro - FMTM - Uberaba, pelo incentivo, pela paciência e por possibilitar a dosagem de Óxido Nítrico.

Ao prof. Cláudio Alvarenga - FMVZ -USP - São Paulo, e aos colegas André Monteiro da Rocha e Érika Cristiane Gutiérrez Felipe por disponibilizarem e auxiliarem nas extrações de testosterona tecidual.

À prof.a Eunice Oba - FMVZ - UNESP - Botucatu, pelo incentivo, entusiasmo e por permitir as dosagens hormonais.

Aos técnicos que colaboraram da melhor forma para a realização deste trabalho, especialmente José Eduardo Bozano (Depto. Morfologia), Luiz Antônio de Oliveira (Depto. Farmacologia), Luiz Alquati (Depto. Microbiologia e Imunologia) (UNESP - Botucatu).

Aos amigos do Departamento de Reprodução Animal - Valter Oswaldo Fabris, Maria Cristina Paganini Listoni Rosa, José Maria Pimentel, Marco Antônio Fumis Pellici e Edilson de Souza Freire - pela saudável convivência durante todos estes anos.

A todos os amigos dos Departamentos de Morfologia, Farmacologia, Microbiologia e Imunologia, e Reprodução Animal por compartilharem as dificuldades e as vitórias na realização deste trabalho e pela saudável convivência durante estes anos.

Aos meus caros amigos da FMVZ - Luciana Batalha, Dorça Lezier, Luciana Takada, Daniel Bartoli, Hymerson Azevedo, Marcos Chalhoub, José Buratini Jr, José Rodrigues Neto, Fabiana Ferreira - pela feliz convivência durante estes anos.

Aos meus caros amigos - Marco Antônio, Luciana, Júnior, José Maria, Dino, Fabrício, Aguinaldo, Fábio, Ketti, Aneli, Rogério, Glauco, Fernando, João, Danilo, Luciano, Daniel, Alexandre, Mário Sérgio, José Roberto, Fábio, Breno, Josafá, Leonardo e Maria das Graças - por acompanharem com interesse e incentivarem meu aperfeiçoamento.

Às famílias que acolheram-me - Montenegro's (Edy, Mário Rubens e Renata); Tebet's (Neusa, Gilberto, Iara, Jassira); Martins' (Isa e Roberto) - minha gratidão.

Aos meus estimados do coração - Lisiane, Jussara, Antônia e Benjamim - meu especial carinho.

Aos meus pais - Virmondes e Isalé - exemplos de luta e perseverança, que sentem mais que todos, as lutas de seus filhos na vida, meu respeito, admiração e eterna gratidão.

Aos meus irmãos - Juninho, Hugo, Vinícius e Patrícia; sobrinhos - Rafael, Bárbara, Pedro e Luíza; Cunhados - Denise, Adriana, e Sérgio, que entenderam minhas ausências e sempre apoiaram e compartilharam minha caminhada, minha gratidão.

A Deus, que transcende minha compreensão, minha busca pelo sentido e pelo valor do Todo que vivemos.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	01
LISTA DE FIGURAS.....	02
ABREVIATURAS.....	05
RESUMO.....	06
1. INTRODUÇÃO.....	07
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	10
2.1. Aspectos relacionados à reprodução.....	10
2.2. Testosterona.....	11
2.3 Insulação escrotal.....	12
2.4- Contagem espermática por grama de testículo.....	15
2.5. Papel dos mastócitos nos processos fisiopatológicos.....	15
2.6. Inter-relação entre mastócitos, histamina e sistema reprodutor.....	18
2.7. Histologia testicular e da cauda do epidídimo.....	20
2.7.1. Pigmentos melânicos no sistema reprodutor.....	21
2.7.2. Identificação histoquímica de mastócitos.....	22
2.8. Relação do fator de necrose tumoral-alfa nos processos fisiopatológicos.....	24
2.8.1. Relação do TNF alfa nos processos fisiopatológicos reprodutivos	25
2.9. Óxido nítrico nos processos fisiopatológicos	26
2.9.1. Relação do óxido nítrico nos processos fisiopatológicos reprodutivos.....	27
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1. Animais e local de experimentação.....	29
3.2. Insulação escrotal (experimento 2).....	31
3.2.1. Temperatura ambiente.....	32
3.2.2 Temperatura corporal e escrotal.....	32
3.3. Biometria testicular e epididimária	32
3.4. Colheita de sêmen	33

3.5. Análise de sêmen	35
3.6. Produção espermática	36
3.7. Histologia testicular e da cauda do epidídimo	36
3.7.1. Histologia.....	36
3.7.2. Pigmentos melânicos.....	36
3.7.3. Histoquímica de mastócitos.....	37
3.7.3.1. Colorações utilizando somente um corante.....	37
3.7.3.2. Colorações utilizando dois corantes simultâneos.....	37
3.7.3.3. Colorações sequenciais.....	37
3.8. Testosterona plasmática e no tecido testicular.....	38
3.8.1. Testosterona plasmática.....	38
3.8.1.1. Método de determinação quantitativa de testosterona plasmática.....	39
3.8.2. Método de quantificação de testosterona no tecido.....	39
3.8.2.1 Preparação de vidraria para extração hormonal.....	39
3.8.2.2. Extração de hormônios esteróides de tecido testicular.....	40
3.8.2.3. Pesagem das amostras.....	40
3.8.2.4. Homogeneização das amostras.....	41
3.8.2.5. Extração em etanol:acetona.....	41
3.8.2.6. Extração em éter etílico.....	41
3.8.2.7. Extração em hexano:acetonitrilo.....	41
3.8.2.8. Finalização da amostra.....	42
3.8.2.9. Determinação de porcentagem de recuperação hormonal.....	42
3.8.2.10. Ressuspensão e diluição de amostras.....	43
3.8.2.11. Procedimentos de Radioimunoensaio (RIA).....	43
3.8.2.12. Transformação das concentrações determinadas por RIA.....	43
3.9. Extração e dosagem automática da histamina do testículo e da cauda do epidídimo.....	44

3.10. TNF-alfa do testículo e da cauda do epidídimo (experimento 2).....	45
3.10.1 - Obtenção dos homogenatos de testículo e epidídimo.....	45
3.10.2- .Ensaio Biológico para determinação de TNF alfa.....	45
3.10.2.1. Preparo da cultura de células L929.....	45
3.10.2.2 Ensaio de citotoxicidade.....	45
3.11. Óxido nítrico do testículo e da cauda do epidídimo.....	46
3.11.1 - Obtenção dos homogenatos de testículo e epidídimo.....	46
3.11.2. Determinação da concentração de óxido nítrico.....	46
3.12. Análise estatística.....	47
4. RESULTADOS	48
4.1. Biometria testicular e epididimária	48
4.2. Parâmetros relacionados ao modelo de insulação escrotal.....	49
4.3. Histologia testicular e da cauda do epidídimo	56
4.4. Dosagens de testosterona plasmática e tecidual	58
4.5. Concentração total de histamina no testículo e cauda do epidídimo.....	59
4.6. Concentração de TNF-alfa do testículo e da cauda do epidídimo.....	61
4.7. Concentração de óxido nítrico do testículo e da cauda do epidídimo.....	62
5. DISCUSSÃO.....	63
5.1- Biometria testicular e epididimária	63
5.2 Parâmetros relacionados ao modelo de insulação escrotal.....	63
5.3. Histologia testicular e da cauda do epidídimo.....	67
5.3.1 Pigmentos melânicos.....	68
5.3.2 Histoquímica dos mastócitos.....	69
5.4. Concentrações de testosterona e histamina.....	69
5.5. Concentrações de TNF-alfa e óxido nítrico (NO).....	75
6.CONCLUSÕES.....	77
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
8. ANEXO.....	101

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Número de animais (n), valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios padrão (DP), da idade e do peso vivo de carneiros da raça Suffolk maduros sexualmente (A) e pré-púberes (B).	31
TABELA 2 – Número de animais (n), valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios padrões (DP), da idade e do peso vivo de carneiros da raça Santa Inês não insulados (IC), insulados (I) e criptorquídicos (P).	31
TABELA 3 – Número de análises (n), valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios padrão (DP), da circunferência escrotal (CE), peso do testículo e do epidídimo de carneiros da raça Suffolk maduros sexualmente (A) e pré-púberes (B).	48
TABELA 4 – Número de análises (n), valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios padrão (DP) do volume testicular e densidade testicular de carneiros da raça Suffolk maduros sexualmente (A) e pré-púberes (B).	48
TABELA 5 – Média e desvio padrão (DP) do volume ejaculado, da motilidade, da concentração espermática, e a mediana do vigor em carneiros Suffolk maduros sexualmente submetidos a um regime de 6 colheitas diárias durante 10 dias.	49
TABELA 6 – Temperaturas ambientais média, mínima e máxima, nos diversos momentos da insulação escrotal.	49
TABELA 7 – Número de análises (n), valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios padrão (DP) do perímetro escrotal (PE), de carneiros da raça Santa Inês com bolsa escrotal não insulada (IC), insulada (I) e criptorquídicos (C).	51
TABELA 8 – Número de análises (n), valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios padrão (DP) do volume testicular e densidade testicular de carneiros da raça Santa Inês com bolsa escrotal não insulada (IC) e insulada (I).	51

TABELA 9 – Número de análises (n), valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios padrão (DP) da produção espermática (Pe) por grama de testículo de carneiros da raça Santa Inês com bolsa escrotal não insulada (IC) e insulada (I) .	52
TABELA 10 – Número de análises, valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios padrão (DP) das concentrações de testosterona (T) no plasma e tecido testicular de carneiros da raça Suffolk maduros sexualmente (A) e pré-púberes (B).	58
TABELA 11 – Número de análises, valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios padrão (DP) das concentrações de testosterona (T) no plasma e tecido testicular de carneiros da raça Santa Inês com bolsa escrotal não insulada (IC) e insulada (I) e criptorquídicos (C).	59
TABELA 12 – Número de análises, valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios padrão (DP) das concentrações totais de histamina (H) no testículo e na cauda do epidídimo de carneiros da raça Suffolk maduros sexualmente (A) e pré-púberes (B)	59
TABELA 13 – Número de análises, valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios padrão (DP) das concentrações totais de histamina (H) no testículo e na cauda do epidídimo de carneiros da raça Santa Inês com bolsa escrotal não insulada (IC) e insulada (I) e criptorquídicos (C).	60
TABELA 14 – Número de análises, valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios padrão (DP) da concentração do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) nos testículos e epidídimos de carneiros da raça Santa Inês com bolsa escrotal não insulada (IC) e insulada (I).	61
TABELA 15 – Número de análises, valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios padrão (DP) da concentração de óxido nítrico (NO) nos testículos e epidídimos de carneiros da raça Santa Inês com bolsa escrotal não insulada (IC) e insulada (I).	62

TABELA 16 – Valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios padrão (DP) das temperaturas corpóreas (retal e escrotal) de carneiros da raça Santa Inês com bolsa escrotal não insulada (IC) e insulada (I).	101
TABELA 17 – Valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios padrões (DP), do volume, motilidade e vigor espermático do ejaculado de carneiros da raça Santa Inês com bolsa escrotal não insulada (IC) e insulada (I).	102
TABELA 18 – Valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios padrões (DP), da porcentagem de defeitos espermáticos do ejaculado de carneiros da raça Santa Inês com bolsa escrotal não insulada (IC) e insulada (I).	103
TABELA 19 – Valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios padrões (DP), da concentração espermática do ejaculado de carneiros da raça Santa Inês com bolsa escrotal não insulada (IC) e insulada (I).	102
TABELA 20 – Valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios padrões (DP) dos níveis plasmáticos de testosterona de carneiros da raça Santa Inês com bolsa escrotal não insulada (IC) e insulada (I).	104

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** – Temperaturas ambientais média, mínima e máxima, nos diversos momentos no período de insulação escrotal. 50
- FIGURA 2** – Médias das temperaturas corpóreas (retal e escrotal) de carneiros da raça Santa Inês não insulados (IC) e insulados (I) nos diversos momentos da insulação escrotal. 50
- FIGURA 3** – Medianas do volume ejaculado e da motilidade espermática e vigor espermáticos de carneiros da raça Santa Inês com bolsa escrotal não insulada (IC) e insulada (I) nos diversos momentos da insulação escrotal. 53
- FIGURA 4** – Medianas dos defeitos espermáticos de ejaculados de carneiros da raça Santa Inês com bolsa escrotal não insulada (IC) e insulada (I) nos diversos momentos da insulação escrotal. 54
- FIGURA 5** – Medianas da concentração espermática por mL e total de carneiros da raça Santa Inês com bolsa escrotal não insulada (IC) e insulada (I) nos diversos momentos da insulação escrotal. 55
- FIGURA 6** – Medianas da concentração plasmática de testosterona de carneiros da raça Santa Inês com bolsa escrotal não insulada (IC) e insulada (I) nos diversos momentos da insulação escrotal. 55
- FIGURA 7** – Microscopia óptica – corte histológico da cauda do epidídimo de carneiro Suffolk pré-púbere - Coloração Fontana-Masson. 57

ABREVIATURAS

cm – centímetros

dL – decilitros

DP – desvio padrão

H – histamina

mL – mililitros

mmol – milimoles

ng – nanogramas

NO – óxido nítrico

NOS – óxido nítrico sintases

PE – perímetro escrotal

Pe – produção espermática

T – testosterona

TNF- α – fator de necrose tumoral-alfa

U – unidades

RODRIGUES, A.L.R. Avaliação do testículo e da cauda do epidídimo de carneiros na pré-puberdade, na maturidade sexual, no criptorquidismo e na insulação escrotal: concentrações de testosterona plasmática e tecidual, histamina, fator de necrose tumoral-alfa e óxido nítrico. Botucatu, 2004. 106p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Foram estudados 77 carneiros, caracterizados como 34 da raça Suffolk pré-púberes e 15 maduros sexualmente, e nos modelos de estresse térmico, 6 da raça Santa Inês submetidos a insulação escrotal por 96 horas, 6 controle não insulados e 16 criptorquídicos bilaterais. Foram avaliadas a histopatologia, as concentrações de histamina, testosterona plasmática e tecidual testicular, fator de necrose tumoral-alfa e óxido nítrico no testículo e na cauda do epidídimo, sendo as duas últimas, realizadas apenas nos grupos sob insulação escrotal e seu controle. A avaliação histológica testicular e da cauda do epidídimo não caracterizou alterações do ponto de vista morfológico. As concentrações de histamina no testículo e na cauda do epidídimo foram dependentes da condição reprodutiva, sendo superiores na pré-puberdade. Para o modelo estresse térmico, as concentrações de histamina no testículo e na cauda do epidídimo foram maiores no criptorquidismo, não sofrendo influência da insulação escrotal. Ao considerar todos os animais estudados, houve uma correlação negativa entre a concentração de testosterona plasmática com as de histamina no testículo; e na cauda do epidídimo, esta correlação ocorreu individualmente nos grupos estudados. O modelo de insulação 96 horas foi suficiente para causar alterações andrológicas na consistência testicular, nos parâmetros motilidade e defeitos espermáticos menores, porém, não evidenciou se a histamina, testosterona plasmática e tecidual, fator de necrose tumoral-alfa e óxido nítrico estão intimamente envolvidos no mecanismo de resposta ao estímulo térmico agressor.

Palavras-chave: epidídimo; fator de necrose tumoral-alfa; histamina; ovino; óxido nítrico; testículo; testosterona.

RODRIGUES, A.L.R. Evaluation of the testis and epididymis tail of rams in pre-puberty, in sexual maturity, with cryptorchidism, and undergone to the scrotal insulation: concentration of histamine, plasma testosterone, testicular tissue testosterone, tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide. Botucatu, 2004. 106p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

It has been used 77 rams, 34 pre-puberty and 15 sexually mature both Suffolk, 16 cryptorchids Santa Inês, 6 undergone to scrotal insulation for 96 hours, and 6 control group without insulation. The testis and the epididymis tail were evaluated by histopatology, concentrations of histamine, plasma and testicular tissue testosterone, tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide, the last two ones just in scrotal insulation group and control group. Histopatology did not show any important change in the testis and epididymis tail in all groups. The concentration of histamine in both testis and epididymis tail were higher in pre-pubescent compared to mature rams. Histamine concentration was significantly higher in the cryptorchidism condition compared to insulation group and its control, which were not different from each other. Analyzing all the rams, there was a negative correlation between plasma testosterone and histamine concentration in the testis; in the epididymis tail this correlation occurred individually in each group. The insulation model for 96 hours was able to cause changes in testicular consistence, seminal motility and minor defects in spermatozoa. Nevertheless it does not cause evidence if the concentration of histamine, testosterone and testicular tissue testosterone, tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide were strongly involved in the response mechanism to the heat stress stimuli over testis and epididymis.

Key words: epididymis, histamine, nitric oxide, rams, testis, testosterone, tumor necrosis factor-alpha.

1. INTRODUÇÃO

As funções reprodutivas nos machos de diferentes espécies animais, podem ser avaliadas utilizando-se diversas técnicas, incluindo exame clínico, avaliação de sêmen, ultra-sonografia, dosagens hormonais, investigações bioquímicas, culturas microbiológicas, testes de libido, entre outros (LEONG & MATTHEWS, 1982; LOPATE et al., 1989).

O perfil endócrino varia amplamente durante o desenvolvimento sexual, com significativas alterações hormonais, tanto quantitativas como qualitativas. Atualmente está bem estabelecido que existem interações complexas entre o sistema endócrino e o sistema imune. Diversos hormônios e secreções neuronais influenciam determinados aspectos da imunidade natural. Estes efeitos incluem modificações do número total de células imunocompetentes e o potencial de resposta imunológica celular a antígenos, da função fagocítica e de eventos da cascata inflamatória (REICHLIN et al., 1993). Em relação a este aspecto, a regulação endócrina de mastócitos, células envolvidas na resposta inflamatória, tem despertado muito interesse.

Os mastócitos podem ser considerados uma unidade secretora exógena, tendo capacidade de responder à interação de receptores situados na membrana celular, com agentes estimuladores específicos. Existe um grande interesse científico no estudo dos mastócitos, porém, falta um consenso sobre sua função biológica. Não há doença, condição biológica, ou modelo animal identificado que exiba a ausência absoluta do envolvimento dessas células. Alterações no número de mastócitos em diversos sítios anatômicos e/ou evidências de desgranulação, têm sido observadas num amplo espectro de respostas imunológicas inatas, adaptativas e patológicas e num grande número de doenças ou de processos relacionados a doenças (METCALFE et al., 1997)

Apesar de ser mais conhecido o seu papel fisiológico na inflamação e em reações alérgicas, a regulação endócrina dos mastócitos e da histamina ainda não foi esclarecida. Observou-se também a influência dos hormônios esteróides sobre a proliferação celular e a atividade secretora, além da relação dos esteróides sexuais com a população de mastócitos em roedores. A inter-relação mastócito-histamina-sistema endócrino demonstra que os mastócitos são significativamente influenciadas pelos hormônios sexuais, particularmente testosterona e estradiol. Além disso, é muito provável que a histamina secretada pelos mastócitos tenha participação na regulação da esteroidogênese testicular, possibilitando estudos da integração entre os sistemas imunológico e endócrino (LIMA, 1999).

O fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e o óxido nítrico (NO) são substâncias que desempenham importantes papéis nas funções das células de Sertoli, Leydig e células germinativas, influenciando a espermatogênese (FUJISAWA, 2000). Um tênue aumento do TNF- α no testículo inflamado e uma relação entre NO e infertilidade em machos causada pela inflamação também foi descrita (WISZNIEWSKA, 1997).

Nas espécies de interesse zootécnico, existe carência de conhecimentos básicos sobre a importância do mastócito, da histamina e suas correlações com o estágio reprodutivo destes animais em diferentes idades. A provável participação destes elementos em processos fisiológicos no testículo e no epidídimo de carneiros na pré-puberdade e na maturidade sexual ainda não havia sido relatada.

Considerando-se o clima quente de grandes extensões do Brasil, caracterizado por elevadas temperaturas durante grande parte do ano, que pode influenciar diretamente os mecanismos de termorregulação testicular e epididimária, e consequentemente, as funções reprodutivas do macho, torna-se importante estudar, através do modelo experimental de estresse térmico, as respostas fisiopatológicas referentes à inter-relação mastócitos-histamina-testosterona, e entre o TNF- α e NO no

testículo e cauda do epidídimo, por estes representarem respectivamente os sítios de produção e armazenamento da célula espermática.

No presente trabalho, considerou-se a hipótese que em carneiros, existem diferenças na densidade de mastócitos e na concentração de histamina no testículo e na cauda do epidídimo ao comparar-se condições reprodutivas e modelos de estresse térmico, como a insulação escrotal e o criptorquidismo, estando estas variáveis correlacionadas às concentrações plasmática e tecidual testicular de testosterona; e que a insulação escrotal tem efeito sobre as concentrações do fator de necrose tumoral-alfa e óxido nítrico no testículo e na cauda do epidídimo.

Desta forma, objetivou-se:

- ◆ quantificar a densidade de mastócitos e as concentrações de histamina no testículo e cauda do epidídimo na pré-puberdade, na maturidade sexual, na insulação escrotal e no criptorquidismo;
- ◆ correlacionar as concentrações de testosteronas plasmática e tecidual testicular, à densidade de mastócitos e às concentrações de histamina do testículo e da cauda do epidídimo na pré-puberdade, na maturidade sexual, na insulação escrotal e no criptorquidismo;
- ◆ verificar os efeitos da insulação escrotal sobre as concentrações do fator de necrose tumoral-alfa e óxido nítrico no testículo e cauda do epidídimo;
- ◆ avaliar o modelo 96 horas de insulação escrotal para estudo das respostas relacionadas ao mastócito, histamina, testosterona plasmática e tecidual, fator de necrose tumoral-alfa e óxido nítrico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos relacionados à reprodução

O perímetro escrotal, o peso corporal e a idade apresentam uma correlação estreita entre si e em animais até um ano de idade, é maior se considerado o peso corporal e o perímetro escrotal (MIES FILHO et al., 1993).

A consistência testicular é um importante parâmetro a ser observado na constatação da normalidade fisiológica, sendo que o testículo em plena capacidade funcional apresenta consistência fibro-elástica (BICUDO, 1999). As características testiculares estão diretamente relacionadas com a produção e características do material seminal, o que depende da qualidade do parênquima testicular (BONINO et al., 1987).

Segundo Colgan et al. (1980) um único túbulo seminífero usualmente não exhibe todas as células da linhagem espermatogênica devido ao ciclo do epitélio seminífero, uma vez que a espermatogênese ocorre em ondas ao longo dos túbulos. Portanto, a espermatogênese deve ser acompanhada através da observação de diversos túbulos em campos distintos (LEONG & MATTHEUS, 1982).

A espermatogênese no carneiro requer aproximadamente 49 dias, necessitando-se de 10 a 14 dias para que os espermatozóides passem pelo epidídimo (FITZGERALD, 1997). Amann & Lambiase (1969) relataram que o trânsito espermático na cabeça e corpo do epidídimo, envolvidos na maturação espermática não se altera com a frequência das ejaculações. O maior estoque espermático encontra-se na cauda do epidídimo, contendo cerca de 70% do número total de espermatozóides do epidídimo (AMANN, 1981).

O criptorquidismo é uma alteração uni ou bilateral do desenvolvimento do testículo, caracterizada por falha no descenso que o impede de alcançar o escroto. O criptorquida bilateral é estéril devido à supressão térmica da espermatogênese (HAFEZ, 1993).

2.2. Testosterona

Os andrógenos exercem um importante papel na manutenção do normal funcionamento dos testículos e do sistema reprodutivo, bem como na expressão das características fenotípicas do macho adulto (FRIENDEN & LIPNE, 1975). A produção de testosterona ocorre nas células de Leydig nos testículos e é controlada pela gonadotrofina produzida na hipófise, o hormônio luteinizante (LH) (STABENFELDT & EDQVIST, 1993). Segundo Veeramachaneni et al. (1986) as células de Leydig são controladas por um fator de manutenção e regulação produzido pelas células de Sertoli. Este fator está relacionado com a retroalimentação local dos túbulos seminíferos e interstício testicular, o que pode modular a sensibilidade das células de Leydig ao LH circulante. Existe uma inter-relação entre as células de Sertoli e as de Leydig no que diz respeito à produção e liberação de testosterona, a qual tem fundamental importância no processo da espermatogênese (PINEDA, 1989).

Em ratos, Odell et al. (1990) relataram que na transição do período juvenil, existe um aumento na capacidade de resposta dos testículos às gonadotrofinas, causados pela diminuição de fatores inibidores e pelo aumento do número de receptores intratesticulares de LH, o que resultaria numa elevação da atividade testicular resultando no aumento da produção de testosterona.

WU & MURONO (1994), utilizando-se de um modelo de criptorquidismo para ratos, descreveram um fator mitogênico produzido pelas células de Sertoli que causou nas células de Leydig diferenças morfológicas, aumento no número de células e índice mitótico, e diminuição da produção de testosterona, e de receptores de LH/hCG. Em co-culturas de células de Sertoli e Leydig, o aumento em 4°C levou ao aumento da responsividade das células de Leydig ao fator mitogênico secretado pelas células de Sertoli, o que causou mudanças na proliferação e diferenciação das células de Leydig, diminuindo a produção de testosterona e os níveis de receptores de LH nas células de Leydig. Estas observações *in vitro* sugerem que este fator explicaria as mudanças que ocorreram no criptorquidismo experimental. (WU & MURONO, 1996).

2.3 Insulação escrotal

A temperatura testicular nos mamíferos mantém-se entre 2 e 6°C abaixo da temperatura corporal (WAITES, 1990; ENTWISTLE, 1992, KASTELIC et al. 1996, MOREIRA, et al.,2001). Vários fatores contribuem para a termorregulação escroto-testicular, incluindo a estrutura peduncular do escroto e a vascularização testicular que, por meio do plexo pampiniforme, reduz a temperatura escrotal pela troca de calor entre o sangue circulante na artéria e veia testicular (COOK et al., 1994). Além disto, a túnica dartos e o músculo cremaster alteram a posição dos testículos em relação ao corpo em função da temperatura do ambiente (SETCHEL, 1998) e as glândulas sudoríparas favorecem a evaporação diminuindo a temperatura escrotal (BLAZQUEZ et al., 1988).

O aumento da temperatura testicular propicia a degeneração seminal (VOGLER et al., 1991) e está correlacionada com a redução na fertilidade do macho, causando alterações na síntese de proteínas e expressão de genes nas células germinativas e células de Sertoli (IKEDA et al. 1999; KUMAGAI et al., 1999). Variações na temperatura ambiente e umidade relativa do ar também estão associadas a alterações na temperatura corporal de carneiros e consequentemente na temperatura testicular (WILDEUS & ENTWISTLE, 1983).

O clima de várias regiões do Brasil é caracterizado por elevadas temperaturas, as quais podem influenciar diretamente os mecanismos de termorregulação testicular, e conseqüentemente, as funções reprodutivas no macho. Carneiros, touros e cachacos apresentam uma queda no *output* de espermatozóides e na eficiência reprodutiva durante os meses quentes do ano e após a transferência de animais para continentes excessivamente mais quentes (VAN DEMARK & FREE, 1970). A queda da concentração espermática é causada pela perda da linhagem espermatogênica, principalmente os espermatócitos e espermátides, sendo as células do epitélio seminífero mais sensíveis aos efeitos do calor (BARTH & BOWMAN,1994). Wildeus & Entwistle (1986), encontraram mudanças quantitativas na reserva espermática

epididimal e na cauda do epidídimo, alterações qualitativas na morfologia dos espermatozóides, sugerindo que o calor testicular teve efeito adverso na estocagem, havendo reabsorção dos espermatozóides defeituosos.

Segundo Setchell et al. (1971), quando os testículos de seis carneiros Merinos foram aquecidos a 40,5°C por três horas, a concentração espermática declinou após 20 dias do insulto térmico. As alterações morfológicas encontradas nos espermatozóides evidenciaram que o calor teve efeito nos espermatócitos primários e espermatogônias B em divisão, e nas espermátides e espermatozóides presentes no epidídimo, ocorrendo também um grande aumento de células multinucleadas no ejaculado.

No epidídimo, logo após a insulação escrotal, vários autores relataram alterações decorrentes do estresse térmico neste órgão, sendo anormalidades de trânsito (BARTH & OKO, 1989; BARTH & BOWMAN; 1994), anomalias espermáticas secundárias (WILDEUS & ENTWISTLE, 1983; BARTH & BOWMAN, 1994; FONSECA & CHOW; 1995) espermatozóides decapitados e defeitos de cauda. Outros trabalhos encontraram patologias no ejaculado após duas semanas do insulto térmico (AUSTIN et al., 1961; ROSS & ENTWISTLE, 1979; BABU RAO & RAO, 1990).

MINTON et al. (1981) submeteram touros à temperatura ambiente de 34°C por 15 dias e observaram que a concentração plasmática de testosterona não se alterou no sexto dia do estresse térmico, tendo apenas uma pequena queda após o 15º dia. Em touros com bolsa escrotal insulada, ocorreu queda na concentração plasmática de testosterona em 48, 72 e 96 horas após o início do insulto térmico (GABALDI, 2000). Em carneiros, os níveis de testosterona diminuíram no plasma quando submetidos a elevadas temperaturas ambientais de 32°C por duas semanas. Gomes et al. (1971) observaram *in vitro* que o calor influenciou significativamente a função das células de Leydig, causando conseqüentemente uma diminuição nas concentrações de testosterona e um aumento nos níveis de gonadotrofinas.

Em uma degeneração testicular leve ocorre descamação de espermátides, núcleos picnóticos e formação de células gigantes. Há alta incidência de anomalias de cabeça, como piriforme, estreita na base, subdesenvolvida, contorno anormal e pequena. As gotas protoplasmáticas também estão presentes em ejaculados de testículos com degeneração. Na degeneração testicular tênue, a incidência de anomalias de cauda espermática não aumenta, pois estão relacionadas com alterações do epidídimo (RAO & BANE, 1985).

Mucciolo et al. (1974) avaliaram histologicamente carneiros insulados por 4 e 8 dias, encontrando no primeiro grupo (4 dias) a maioria dos túbulos seminíferos com linhagem espermatogênica, células de Sertoli e Leydig perfeitamente íntegras do ponto de vista morfológico, sendo que apenas alguns túbulos apresentavam epitélio germinativo incompleto, com células gigantes ou desprovidas de núcleo na luz do túbulo seminífero. Na insulação por 8 dias, foi verificada considerável destruição do epitélio germinativo. Wildeus & Entwistle (1983), Wildeus & Entwistle (1986) e Fonseca & Chow (1995) encontraram alterações histológicas causadas pelo processo de insulação escrotal. A degeneração testicular decorrente aos efeitos da temperatura, altera as células da linhagem espermatogênica, ocorrendo picnoses nucleares e perdas na meiose, levando ao aumento do número de espermátides prematuras no lúmen após o estresse térmico, atribuição dada à falha da função das células de Sertoli (RAO & BANE, 1985; ENTWISTLE; 1992). Segundo Ott (1986), a degeneração testicular induzida por insulação escrotal tem efeito nos túbulos seminíferos, levando à diminuição do perímetro escrotal. Gabaldi (2000) avaliando a biometria testicular, não encontrou alterações entre o grupo de touros insulado e o controle da insulação escrotal.

A degeneração testicular pode ser permanente ou reversível, dependendo da temperatura, da duração do insulto e da idade do animal. Foi observado também que, em muitos casos, é difícil determinar se a degeneração testicular é transitória ou permanente, pois é preciso aguardar o período de um ciclo espermático e da passagem do espermatozóide pelo epidídimo. Aproximadamente duas semanas após o insulto,

patologias poderão aparecer no ejaculado e continuar aumentando até um mês. Se o estresse térmico for por um longo período, a melhoria da qualidade do sêmen e fertilidade é retardada (OTT, 1986).

Entwistle (1992) constatou que a insulação escrotal aumentou a temperatura local, causando a redução do peso testicular e epididimal, e a reserva espermática, embora as glândulas anexas não tenham sido influenciadas. Estas mudanças refletiram-se na baixa qualidade e quantidade do sêmen, mas não houve efeito na libido ou no comportamento sexual.

2.4- Contagem espermática por grama de testículo

O método da estimativa da reserva gonádica através da contagem hemocitométrica de espermatozóides em homogeneizados diluídos do parênquima testicular, baseia-se no fato de que a partir de determinado ponto da espermatogênese, os núcleos das espermátides em alongamento se tornam extremamente resistentes à destruição física pela homogeneização, permanecendo íntegras em suspensão no líquido diluidor, o mesmo acontecendo com as cabeças dos espermatozóides. Esta alta resistência dos núcleos das espermátides alongadas e espermatozóides é atribuída, entre outros fatores, a um aumento da ligação eletrostática entre a histona nuclear e a molécula de DNA (AMANN, 1970 citado por CARDOSO, 1985).

O número de espermátides alongadas resistentes à homogeneização de parênquima testicular é um bom indicador da taxa de produção de espermatozóides, já que o tempo necessário para que essas células se transformem em espermatozóides é constante nas espécies (BERNDTSON, 1977).

2.5. Papel dos mastócitos nos processos fisiopatológicos

Os basófilos e mastócitos representam populações distintas que podem expressar diferenças funcionais, morfológicas e nas respostas a drogas. Tanto os basófilos quanto os mastócitos são descendentes das células hematopoiéticas

pluripotenciais da medula óssea (GLASPY et al., 1996). Contudo, os processos de desenvolvimento dos mastócitos e basófilos são diferentes. Os basófilos completam a sua diferenciação e maturação dentro da medula óssea e vão para a corrente sanguínea. Já os precursores de mastócitos deixam a medula óssea e vão aos tecidos, onde proliferam e diferenciam-se em subtipos. Os mastócitos estão amplamente distribuídos por todo o corpo humano, mas são particularmente encontrados em associação com vasos sanguíneos no tecido conjuntivo subepitelial da pele, trato gastrointestinal, respiratório e genito-urinário (PEARCE, 1982; DVORAK et al., 1983).

Alergistas e estudiosos das reações de hipersensibilidade imediata foram atraídos pelo estudo desses dois tipos celulares por diversas razões: primeiro, pela descoberta de que estas células expressam em sua membrana plasmática receptores aos quais se ligam anticorpos; segundo, pela demonstração de que liberam seus mediadores quando expostas a um antígeno específico, e terceiro por representarem a maior fonte de histamina e de outros potentes mediadores químicos implicados numa diversidade de processos inflamatórios e imunológicos (GALLI et al., 1984; SCHWARTZ & AUSTEM, 1984; GALLI, 1990).

As populações de mastócitos apresentam heterogeneidade com consideráveis diferenças em seu conteúdo (mediadores) e sensibilidade a agentes de ativação. Estas diversidades manifestam-se entre mastócitos de diferentes espécies e também dentro de uma mesma espécie (METCALFE et al., 1997). Os mastócitos apresentam diferentes características histológicas, bioquímicas e funcionais, dependendo da espécie, do tecido estudado e da idade (BARRET et al., 1984; BEFUS et al., 1985; HEAVEY et al., 1988; BARRET & PEARCE, 1993; KITAMURA et al., 1993; LIMA, 1999).

Os mastócitos podem ser classificados em subpopulações fenotipicamente distintas. Em roedores têm-se duas subpopulações, sendo a primeira representada por mastócitos do tecido conjuntivo, que se apresentam espalhados e contém heparina como a maior proteoglicana, assim como uma grande quantidade de histamina

estocada; tais mastócitos não são células dependentes de interleucina-3. A segunda população, representada por mastócitos da mucosa, possuem sulfato de condroitina e pouca quantidade de histamina, sendo dependentes de interleucina-3 (THARP et al., 1987).

Os mastócitos e basófilos podem ter sua secreção induzida tanto por agentes imunológicos como por agentes químicos, sendo estes classificados em dois grupos: os seletivos e os não seletivos. Os agentes não seletivos atuam através da ruptura na membrana plasmática, liberando todo o seu conteúdo intracelular, sendo portanto, citotóxicos. Neste grupo, pode-se citar: os detergentes, os sais biliares, a lisolecitina e os estímulos físicos - energia térmica, mecânica ou radiante (PEARCE, 1982; LAGUNOFF et al., 1983). A atividade dos agentes seletivos, como fragmentos de complemento, citocinas, polications, ionóforos de cálcio, neuropeptídeos, neurotransmissores, venenos e lectinas, assemelham-se à ação das reações anafiláticas (PEARCE, 1982; LAGUNOFF et al., 1983; FERREIRA et al., 1996). Tais agentes atuam de maneira não citotóxica, induzindo a exocitose, e para isso necessitam de um metabolismo celular intacto. Estes agentes são bloqueados por inibidores da glicólise e da fosforilação oxidativa, e por extremos de temperatura e pH (UVNAS & THON, 1961; CHAKRAVARTY, 1978 e 1980). Apesar da diferença no mecanismo, os tipos de ativação assemelham-se por induzirem pequenas elevações de cálcio interno livre no citosol (ARIDOR et al., 1990; LANDRY et al., 1992).

No processo de exocitose são liberados mediadores pré-formados como a histamina, heparina, proteases neutras; mediadores neo-formados como prostaglandinas, leucotrienas e o fator ativador de plaquetas (PAF); citocinas como as interleucinas, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e fator estimulante de colônia granulócito-macrófago (GM-CSF) que podem ser tanto mediadores pré como neo-formados. (SCHWARTZ & AUSTEM, 1984; LONGLEY et al., 1995; MCNEIL, 1996). O processo de liberação pode ser inibido por algumas substâncias como: metilxantinas, agonistas beta-adrenérgicos (como o isoproterenol), cromoglicato

dissódico e nedocromil e bloqueadores de canais de cálcio. Com exceção do cromoglicato dissódico e do nedocromil, a eficácia terapêutica destes agentes nas doenças alérgicas não é decorrente da inibição promovida sobre a ativação de mastócitos, mas pela inibição fisiológica ou funcional (GOMES, 1992).

A concentração de histamina pode ser usada como um índice da densidade de mastócitos (PADILLA et al., 1990; LIMA, 1999). Sendo um dos principais mediadores biológicos sintetizados pelos mastócitos e sendo os mastócitos a principal fonte de histamina nos tecidos, existe uma correlação estreita entre o número de mastócitos e a concentração de histamina nos tecidos (METCALFE et al., 1997).

2.6. Inter-relação entre mastócitos, histamina e sistema reprodutor

Os estrógenos estimulam a atividade secretora dos mastócitos, potencializando os efeitos de agentes indutores da desgranulação, tais como IgE, composto 48/80, EHRF (fator liberador de histamina derivado do embrião) e substância P (VLIAGOFTIS et al., 1992; THEOHARIDES et al., 1993). Similarmente, antagonistas do hormônio liberador do hormônio luteinizante (LHRH) induzem a desgranulação dos mastócitos em ratos, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (MORGAN et al., 1986, NEKOLA et al., 1987; SUNDARAM et al., 1988). Foi demonstrado que a testosterona induz à desgranulação de mastócitos da glândula harderiana de hamsters, diretamente, através de seu próprio receptor, tanto *in vivo* como *in vitro* (MAYO et al., 1997).

Em geral, parece que os estrógenos e a testosterona exercem efeitos opostos sobre a população de mastócitos. Enquanto os estrógenos estimulam a proliferação celular e a desgranulação, os trabalhos realizados em machos indicam a testosterona como agente inibidor da proliferação de mastócitos (PAYNE et al., 1982; SHIRAMA et al., 1988).

Existe uma dinâmica no número de mastócitos testiculares e epididimários dependendo da idade em seres humanos, caracterizado na pré-puberdade e puberdade

por um expressivo aumento destas células no parênquima testicular e epidídimo, com posterior redução na maturidade sexual (NISTAL et al. 1984).

Alguns problemas de infertilidade foram correlacionados ao aumento de mastócitos no testículo quando comparados a indivíduos normais (AGARWAL et al., 1987; NAGAI et al., 1992; JEZEK et al., 1999; MEINEKE et al., 2000; YAMANAKA et al., 2000; APA et al., 2002). O tratamento de homens através do uso de bloqueadores de liberação de grânulos mastocitários melhorou significativamente o quadro espermático destes indivíduos (SCHILL et al., 1986; CAYNET et al., 2001; APA, 2002).

Fatores estressantes alteram a quantidade e a desgranulação dos mastócitos nos testículos, além de mudar a secreção presente nos grânulos desta célula. Algumas substâncias podem diminuir a proliferação e desgranulação mastocitária, envolvendo mecanismos também relacionados com as células de Leydig (TUNÇEL et al., 1996). Em ratos, parecem existir fatores inibidores de mastócitos nas células de Leydig presentes no interstício testicular, o que indicaria um modelo de regulação parácrina. Dependendo da idade, o tratamento com estrógeno foi capaz de aumentar o número de mastócitos presentes, pela inibição da diferenciação das células de Leydig (GAYTAN et al., 1990). Em ratos, conseguiu-se associar direta ou indiretamente os mastócitos com mecanismos regulatórios das células de Leydig (WANG et al, 1994). Em sapos, o aumento do estrógeno levou ao aumento dos mastócitos intratesticulares, contudo, Minucci et al. (1997) consideram a diminuição dos andrógenos como um mecanismo importante relacionado ao aumento do estrógeno e conseqüentemente ao aumento dos mastócitos. Esses fatores indicariam uma regulação comum da célula de Leydig e mastócitos intratesticulares.

A histamina estimula a síntese de progesterona em folículos pré-ovulatórios de ratas (SCHIMIDT et al., 1987). Além disso, também parece estar envolvida na regulação da ovulação em ratas (SCHIMIDT et al., 1986; SCHIMIDT et al., 1988). A histamina, um dos principais mediadores armazenados pelo mastócito, influencia a

esteroidogênese testicular. No macho, foi demonstrado que a histamina estimula a produção de testosterona de maneira dose-dependente em incubações de testículos atrofiados de hamsters, mas não tem efeito estimulador sobre testículos de animais gonadalmente ativos (MAYERHOFER et al., 1989). Lima (1999) mostrou que há uma íntima correlação entre a concentração de histamina intratesticular e a idade do animal em ratos. Altas concentrações de histamina foram observadas no testículo aos 21 dias de idade, ou seja, no rato juvenil. No período compreendido entre 21 dias e 16 meses de idade, a concentração de histamina sofreu uma progressiva e significativa redução. Zieher et al. (1971) também observaram em hamsters uma considerável diminuição da concentração de histamina intratesticular com o aumento da idade, com máximas concentrações no período neonato e concentrações mínimas na vida adulta.

A presença e a função dos mastócitos no trato reprodutivo masculino tem sido discutida por diversos autores. Existe uma forte correlação entre o número de mastócitos no testículo e o desenvolvimento do tecido conjuntivo testicular (NISTAL et al., 1984). Dessa forma, é muito provável que os mastócitos tenham um papel no crescimento e na regeneração do tecido testicular, além da participação nas reações imunológicas locais (BURNET, 1977).

2.7. Histologia testicular e da cauda do epidídimo

Os testículos são envolvidos pela túnica albugínea, composta por tecido conjuntivo denso altamente vascularizado. O parênquima do órgão é formado pelas células de revestimento dos túbulos seminíferos e seus ductos, assim como pelas células de Leydig e de tecido conjuntivo frouxo. Os túbulos são revestidos por epitélio germinativo onde podem ser observadas células em vários estágios de desenvolvimento. Os constituintes celulares dependem da atividade espermatogênica dos túbulos, podendo ser as espermatogônias, os espermátócitos primários, os espermátócitos secundários, as espermátides e os espermatozóides (BANKS, 1992).

A cauda do epidídimo é um túbulo enovelado composto por epitélio pseudo-estratificado prismático com estereocílios, onde células da base contêm gotículas lipídicas, enquanto as células prismáticas são longas e finas, contêm lipídeos e têm especializações apicais com formas de estereocílios. Esse epitélio apoia-se em uma lâmina própria formada por tecido conjuntivo frouxo altamente vascularizado, que é circundada por uma túnica muscular da mucosa do epidídimo, circular e espessa na cauda do epidídimo. A túnica submucosa é constituída por tecido conjuntivo frouxo na região central e por tecido conjuntivo denso na região periférica, o qual é contínuo a albugínea (BANKS, 1992).

Em animais pré-púberes, os túbulos seminíferos possuem células germinativas que começam a serem observadas em diferentes graus de maturação. A maturação morfológica dos túbulos seminíferos culmina com o processo de espermatogênese ativo. A diferença entre púberes e maduros sexualmente é sutil e se relaciona mais com a funcionalidade do que com a morfologia testicular. Ou seja, a espermatogênese nos púberes já é potencialmente ativa, mas é na maturação e nos animais colocados em atividade reprodutiva que vemos uma maior expressão morfológica desta atividade com altura de epitélio, número de espermatozóides e maturação dos ductos e glândulas extra-testiculares (BANKS, 1992).

Em um testículo criptórquio, o aspecto histológico está condicionado à localização do testículo e à idade do animal; geralmente apresenta marcante fibrose intersticial, atrofia acentuada de túbulos seminíferos, concreções intratubulares e graus variáveis de hialinização tubular e vascular (LADDS, 1985).

2.7.1. Pigmentos melânicos no sistema reprodutor

A melanina faz parte de um grupo de pigmento castanho–enegrecidos. Sabe-se que este pigmento é produzido a partir da tirosina pela ação do complexo de enzimas denominado tirosinases (DOPA – oxidase, catecol oxidase). Estas enzimas atuam lentamente na tirosina para produzir a substância conhecida como DOPA (dihidroxifenil

alanina), que rapidamente sofre a ação da mesma enzima para produzir um pigmento intermediário, o qual polimeriza-se para produzir a melanina. A melanina está ligada a proteínas, e o complexo melanina-proteína está localizado no citoplasma das células em estruturas denominadas grânulos de melanina (BANCROFT & STEVENS, 1996).

Vários estudos mostram a presença desses pigmentos nos sistemas reprodutores tanto masculino quanto feminino, em diferentes espécies, onde podem estar relacionadas com a variação no ciclo reprodutivo (HORE et al., 1994) e em tumores humanos (DENADAI et al., 1986)

Aire (1979) relatou a presença de pigmento de melanina nos ductos deferentes de *Coturnix coturnix japonica*, em 40% dos animais estudados. Muroya et al. (2000) também detectaram em aves (Japan Silky fowl) a presença de melanina em diversos tecidos, incluindo o ovário e testículo. Hbre et al. (1994), estudando uma espécie de pássaro (*Dicrurus adsimilis*), constataram uma variação sazonal na coloração dos testículos pela presença melanina.

A melanose pode ser uma anomalia congênita e é encontrada com frequência no epidídimo de carneiros e touros (McENTEE, 1990). Ladds et al. (1973) constataram pigmentos melânicos na cabeça, corpo e cauda do epidídimo de touros. Blom & Christensen (1956) também reportaram a melanose no epidídimo de touros, sendo a incidência da pigmentação maior em bezerros da raça Red Danish comparadas a bezerros da raça Jersey; e que esta característica decresceu com o aumento da idade.

2.7.2. Identificação histoquímica de mastócitos

Os mastócitos são células residentes do tecido conjuntivo com conteúdo químico em grânulos citoplasmáticos, que exibem metacromasia quando corados com uma variedade de produtos catiônicos, incluindo o corante azul de toluidina (BARRET & PEARCE, 1993), podendo haver variação entre as espécies (DVORAK, 1989). Essa variação dificulta a análise morfológica dessas células, existindo uma série de métodos para a análise desse tipo celular.

O azul de alcian 8GS foi introduzido por Steedman (1950) como um corante específico para mucopolissacarídeos, e demonstrou que esta especificidade é aumentada pela maior acidez da solução corante. Foi introduzido o azul de alcian 8GX como sendo superior nas suas propriedades de coloração comparado ao 8GS, sendo então utilizado para detectar glicosaminoglicanas e proteoglicanas (MOWRY, 1960).

Spicer (1960) descreveu algumas técnicas de coloração seqüenciais utilizando os corantes azul de alcian e safranina. Verificou que o método foi capaz de diferenciar mucopolissacarídeos altamente sulfatados daqueles fracamente sulfatados, denominando-os respectivamente azul de alcian negativos e azul de alcian positivos.

Combs et al. (1965) demonstraram o processo de maturação em embriões de ratos fixados em formol a 10%. Sugeriram que durante este processo ocorria a síntese e acúmulo de precursores de heparina nos grânulos, os quais eram inicialmente azul de alcian positivos, seguidos pela síntese e acúmulo de alta quantidade de heparina N-sulfatada, resultando em grânulos vermelhos, safranina positivos. A reação de coloração azul de alcian-safranina foi usada para diferenciar mucopolissacarídeos fortemente sulfatados daqueles não sulfatados ou fracamente sulfatados.

Burton (1964) caracterizou os polissacarídeos presentes nos grânulos de mastócitos em maturação, presentes no tecido conjuntivo em embriões e ratos adultos, usando uma solução contendo azul de astra e safranina O.

Tas (1977) utilizou a técnica seqüencial azul de astra-safranina (SPICER, 1960) e azul de alcian-safranina, reavaliando este método histoquímico. Concluiu que a coloração seqüencial é altamente dependente da quantidade de ligação do azul de alcian na primeira fase da técnica; e que a coloração final das células parecia ser altamente influenciada pela fixação empregada.

Mendonça (1979) verificou que o tempo ótimo para coloração de mastócitos da língua e do mesentério de ratos, variando conforme o fixador utilizado e constatou que a coloração seqüencial de azul de alcian-safranina descrita por Spicer (1960) não constitui um método adequado para distinguir o grau de sulfatação da heparina e nem

para se avaliar a maturação de mastócitos de ratos. O tempo de coloração com o azul de alcian influenciou os resultados, com muita variação no padrão das cores, além de predominar o último corante utilizado, independente do grau de maturação, exceto quando foi usado o fixador Carnoy.

Sasaki (1980) utilizou o método de coloração azul de astra-safranina O, caracterizando os mastócitos corados em azul como células jovens e imaturas, e os corados em vermelho como células maduras. O fixador empregado foi o formol a 10% contendo 1% de cloreto de cetilpiridina.

Gaytan et al. (1990) estudaram a maturação de mastócitos com a coloração seqüencial de azul de alcian-safranina no interstício testicular de ratos.

Tainsh & Pearse (1992), usando formol como fixador, distinguiram dois subtipos de mastócitos: os sensíveis e insensíveis ao formol. Estudaram histoquimicamente quatro tipos de mastócitos de rato (peritoniais, do mesentério, da pele e do pulmão). As células apresentaram repostas diferentes à fixação por formol e à coloração seqüencial pelo azul de alcian-safranina O, sendo que os mastócitos do mesentério e da pele exibiram resistência ao formol, exibindo características intermediárias de coloração.

Niederheitmann (1992) demonstrou que o azul de astra, independente da seqüência com a safranina O e do fixador utilizado, cora os grânulos imaturos em azul. Ao utilizar o ALFAC como fixador em fragmentos de mesentério, obteve uma boa fixação dos mastócitos. Apesar da seqüência da utilização do azul de alcian-safranina O ter influenciado as colorações dependendo dos fixadores, os mastócitos foram corados de qualquer forma. No entanto, a utilização do azul de astra-safranina O não sofreu influência dos fixadores.

2.8. Relação do fator de necrose tumoral-alfa nos processos fisiopatológicos

O fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) foi originalmente identificado como um fator envolvido na inflamação com efeitos potentes na redução do crescimento

tumoral (SUGARMAN et al. 1985). O TNF- α , citocina pró-inflamatória, é produzido principalmente por monócitos e macrófagos em resposta aos diferentes estímulos (TRACEY & CERAMI, 1993).

Foi demonstrada uma função potencial dos mastócitos na regulação da atividade dos macrófagos nos sítios inflamatórios com liberação de TNF- α (DACKIW et al. 1995).

Os efeitos biológicos do TNF- α ocorrem de acordo com a concentração dessa citocina secretada. Quando produzido em pequenas quantidades, atua localmente como regulador parácrino ou autócrino dos leucócitos e células endoteliais, estimulando-os a secretar quimiocinas para o recrutamento leucocitário. Neste caso, também aumenta a atividade fagocitária dos neutrófilos e estimula as células endoteliais a expressar em sua superfície moléculas de adesão leucocitária, contribuindo, desta forma, para o acúmulo de leucócitos no local da inflamação. Produzido em quantidades mais elevadas, o TNF- α entra na corrente sanguínea e age de forma endócrina, provocando manifestações sistêmicas como febre, estimulação da cascata de citocinas, ativação do sistema de coagulação, aumento da síntese de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos, supressão da divisão das células indiferenciadas na medula óssea e alteração do metabolismo lipoprotéico (ABBAS, 2000). O TNF- α quando secretado a níveis acentuados, pode levar a uma síndrome semelhante ao choque, caracterizada pela depressão da contratilidade cardíaca, hipotensão arterial e trombose intravascular, com conseqüente redução da perfusão tecidual e falência de múltiplos órgãos (BEUTLER & GRAU, 1993).

2.8.1. Relação do TNF alfa nos processos fisiopatológicos reprodutivos

Em fêmeas, vários estudos têm demonstrado a presença de TNF- α nas células ovarianas e no fluido folicular de várias espécies, incluindo os roedores, espécies domésticas e nos humanos, relacionando-o a processos fisiológicos reprodutivos (TERRANOVA, 1996; ZHAO et al., 1998; KIEL et al. 2001).

O TNF- α possui funções em alguns processos fisiológicos no macho. De et al. (1993) e Hales et al. (1999) mencionam o TNF- α como um fator parácrino produzido pelas células germinativas e tendo as células de Sertoli receptores de alta afinidade, modulando a espermatogênese. Benahmed (1996) sugere que o TNF- α seria um produto através do qual haveria uma comunicação entre as células germinativas e de Sertoli. Sigillo et al. (1999) relataram a regulação *in vitro* das células de Sertoli pelo TNF- α , para expressão, ao menos transcripcional da transferrina, fato este também relatado por Hoeben et al. (1996).

Numa comparação entre testículos normais e inflamados, Gerdprasert et al. (2001) relataram um tênue aumento do TNF- α no testículo, que foi considerado uma resposta pequena ao estímulo inflamatório submetido. Suescun et al. (2003), analisando um modelo *in vivo* de orquite auto-imune, demonstraram que o TNF- α está envolvido na perpetuação do processo inflamatório, na indução da apoptose das células germinativas, e na regulação da esteroidogênese pelas células de Leydig.

2.9. Óxido nítrico nos processos fisiopatológicos

O óxido nítrico (NO), ou monóxido de nitrogênio permaneceu durante muitas décadas conhecido apenas como gás poluente nocivo, sendo alvo de interesse apenas para químicos e ambientalistas (FUTUKO, 1995), até a sua descoberta como uma molécula gerada de forma endógena por células de mamíferos (PALMER et al., 1988). Desde então, este importante mediador biológico tem recebido grande atenção por parte de pesquisadores no sentido do conhecimento de suas implicações na fisiopatologia de diversas doenças e da sua relevância como mensageiro intra e intercelular liberado durante vários eventos, inclusive imunológicos (MONCADA et al., 1991).

O óxido nítrico (NO) é um radical livre ubíquo, produzido por uma grande variedade de células, através das ações sintetizadoras de uma família de enzimas coletivamente denominadas de óxido nítrico sintases (NOS) (HIBBS et al., 1987).

Essas enzimas desaminam a L-arginina para liberar NO, havendo co-produção de L-citrulina (KRONCHE et al., 1998). Tem-se descrito três isoformas de NOS que são codificadas por genes separados e que requerem induções distintas. Uma forma encontrada nas células neuronais (nNOS ou NOS-1), a segunda nas células endoteliais (eNOS ou NOS-3), sendo que estas duas formas produzem constitutivamente baixas quantidades de NO que agem em processos fisiológicos incluindo a neurotransmissão e a vasodilatação (PALMER et al., 1988; MONCADA et al., 1991). A terceira isoforma é a NOS induzível (iNOS ou NOS-2), que pode ser encontrada em quase todos os tipos celulares após estimulação (FORSTERMANN et al., 1995). Os principais estimuladores das NOS que levam à produção de NO são as citocinas pró-inflamatórias como o $\text{interferon-}\gamma$ (IFN- γ), TNF- α e a interleucina-1 β (IL-1 β) e/ou produtos microbianos (LPS) (XIE et al., 1992; TAKEICHI et al., 1998).

O NO é uma das menores moléculas mensageiras biologicamente ativas biossintetizadas por células de mamíferos com peso molecular de 30 Da (KIECHLE & MALINSKI, 1996). É um gás com número ímpar de elétrons, reage com átomos e outros radicais livres, possui propriedades lipofílicas, sendo praticamente apolar, o que lhe confere especial capacidade de difusão pelas membranas (MILLER & GRISHAM, 1995). Sendo uma molécula instável (vida média de 3 a 10 segundos), o NO reage rapidamente com o oxigênio formando NO₂ (dióxido de nitrogênio) originando em seguida NO₂⁻ (nitrito) e NO₃⁻ (nitrato). Além disso, combina-se com a hemoglobina, sabidamente um consumidor natural de NO, para formar metahemoglobina (KEILIN & HARTRE, 1937). Numerosos estudos têm mostrado que o NO é um importante modulador em vários processos patológicos (KHAM et al. 1997). A ampla expressão de iNOS que ocorre em inflamações tem sido bem caracterizada e aceita como um componente vital da resposta adaptativa do hospedeiro aos estímulos nocivos. No entanto, há evidências de que a indução de iNOS, em algumas condições fisiopatológicas, seja parte de uma ativação imune descontrolada e deletéria, já que a

inibição de iNOS pode exercer efeitos protetores nessas condições (LIEW & COX, 1991).

2.9.1. Relação do óxido nítrico nos processos fisiopatológicos reprodutivos

O NO foi encontrado no fluido folicular de vacas e a enzima NO sintase demonstrada nas células da granulosa *in vitro*. Dependendo do tamanho do folículo, o NO desempenha um papel na apoptose das células da granulosa, podendo ser considerado um modulador local destas células (BASINI et al. 1998). O NO também faz parte de um sistema envolvido na maturação do oócito (YASUHIKO, 2002).

O NO, produzido pelas Sertoli e Leydig possui relação com as células germinativas, demonstrada através da expressão de iNOS em meios de cultivo. A função deste NO produzido por estas células, ainda não está entendida, no entanto, este deve ter uma influência na esteroidogênese e na espermatogênese pois este alcança as células germinativas em todos os seus estágios (FUJISAWA, 2000). O NO também pode estar relacionado à função do epidídimo na estocagem, trânsito e maturação espermática. Sua produção excessiva poderia ter um papel importante na infertilidade em machos causada pela inflamação (WISZNIEWSKA, 1997).

A atividade de NOS foi detectada no testículo e epidídimo de ratos, sendo que no epidídimo em níveis sete vezes superiores aos valores expressos no testículo (BURNETT et al. 1995). Houve a localização de eNOS no testículo, epidídimo e ducto deferente. Nos testículos, eNOS foi localizado nas células de Sertoli, Leydig e células germinativas anormais, sugerindo uma relação com espermatogênese e degeneração celular (ZINI et al. 1996). O'Bryan et al. (2000) identificaram uma função regulatória de iNOS no testículo normal, além de sugerir que iNOS mediará danos na inflamação do testículo, apesar dos mecanismos e da importância isolada ainda não estarem bem definidos, sendo necessários mais estudos.

Foi demonstrado que NO poderia reduzir a motilidade espermática, ou em concentrações inferiores, promover, *in vitro*, a capacitação espermática (ZINI et al,

1995). No entanto, outro trabalho mostrou que a concentração de nitrito no plasma seminal de homens não teve correlação com a motilidade espermática (REVELLI et al., 2001).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais e local de experimentação

O experimento foi realizado no Laboratório de Estudos em Biotecnologia Aplicada à Reprodução de Ovinos e Caprinos e no Laboratório de dosagens Hormonais do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP de Botucatu / SP, nos Departamentos de Morfologia de Farmacologia e no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu / SP; no Departamento de Reprodução Animal – Laboratório de Dosagens Hormonais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP de São Paulo / SP; no Departamento de Patologia e no Laboratório de Imunologia da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro – FMTM – Uberaba / MG; e na EMBRAPA, Tabuleiros Costeiros, Aracaju / SE.

Foram utilizados 77 ovinos machos distribuídos em dois ensaios experimentais. Carneiros da raça Suffolk (grupos A e B – experimento 1) e carneiros da raça Santa Inês (grupos IC, I e C - experimento 02), distinção feita aos ensaios de acordo com as raças e as idade dos animais (experimento 01), e modelo de estresse térmico (insulação escrotal e criptorquidismo - experimento 02).

A manutenção dos animais dos grupos A, B, IC e I foram feitas em Botucatu/SP (Lat.22° 53'S e Long. 48° 29'W) no aprisco do Laboratório de Estudos em Biotecnologia Aplicada à Reprodução de Ovinos e Caprinos. Os animais do grupo C, estavam alocados na EMBRAPA - Tabuleiros Costeiros, Aracaju / SE, Campo Experimental de Queimadas, Município de Frei Paulo (Lat. 10° 33'S e Long. 37° 32'W).

Podem-se descrever os grupos detalhadamente da seguinte forma:

- Grupo A – 15 carneiros Suffolk adultos contemporâneos de rebanho. Participaram do experimento em junho de 2000, sendo então orquiectomizados. Os animais

sexualmente maturos (A) estavam sendo submetidos a uma frequência de 6 colheitas de sêmen diárias, por 10 dias consecutivos, com avaliações das características do sêmen; sendo constatado um quadro espermático dentro dos padrões de normalidade para a idade e para a espécie. Foram consideradas, para efeitos de apresentação de resultados, as 6 últimas análises anteriores à orquiectomia. Os animais foram mantidos em regime de confinamento, recebendo uma ração contendo concentrado com 14% de Proteína Bruta (PB), feno de *Coast Cross* e água *ad libitum*.

- O grupo B – 34 carneiros Suffolk pré-púberes contemporâneos de rebanho que foram orquiectomizados no mês de outubro de 2000. Durante o período experimental foram alimentados com ração total com 60% de rolão de milho, 40% de farelo de algodão, mais 1% de calcário na mistura, feno de *Coast Cross*, sal mineral e água *ad libitum*.

- O grupo IC – 6 carneiros Santa Inês controle da insulação escrotal - e o grupo I - 6 carneiros Santa Inês submetidos à insulação escrotal, sendo todos contemporâneos de rebanho. Os animais foram mantidos em regime de confinamento, recebendo uma ração concentrada com 14% de Proteína Bruta (PB), feno de *Coast Cross*, sal mineral e água *ad libitum*. O abate destes ocorreu em junho de 2001, no final do período de insulação escrotal do grupo I.

- O grupo C – 16 carneiros Santa Inês criptorquídicos bilaterais pertencentes a EMBRAPA – Tabuleiros Costeiros - Campo Experimental de Queimadas – Estes carneiros eram criados em sistema semi-confinado; mantidos em pastagem cultivada durante o dia, e à noite em confinamentos. Na época de escassez de forragem, os animais foram suplementados ao cocho com silagem de milho (planta inteira) ao retornarem do campo para pernoitar. Os animais criptorquídicos foram acumulados durante anos no rebanho experimental da EMBRAPA e representavam uma população num universo de aproximadamente 1000 animais, onde eram utilizados como rufiões nas estações de monta com eficiência. De um modo geral apresentavam libido igual aos demais carneiros do rebanho. Estes animais foram abatidos em agosto de 2000.

Todos os animais do experimento estavam em boas condições corporais e sanitárias. As idades foram obtidas a partir da escrituração zootécnica dos mesmos, e peso vivo dos animais foi mensurado no dia anterior à orquiectomia ou ao abate (Tabelas 1 e 2).

TABELA 1 – Número de animais (n), valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios padrão (DP), da idade e do peso vivo de carneiros da raça Suffolk maduros sexualmente (A) e pré-púberes (B).

		n	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
Idade	A	15	18,0	22,0	21,0	20,1	1,3
(meses)	B	34	2,3	3,5	2,5	2,7	0,3
Peso	A	15	59,25	90,75	71,10	71,42	8,64
(kg)	B	34	8,25	22,10	15,70	16,02	3,16

TABELA 2 – Número de animais (n), valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios padrões (DP), da idade e do peso vivo de carneiros da raça Santa Inês não insulados (IC), insulados (I) e criptorquídicos (C).

		n	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
Idade	IC	6	8,8	13,0	9,9	10,2	1,4
(meses)	I	6	9,0	11,3	9,8	10,0	0,8
	C	16	6,0	42,0	20,5	20,8	10,5
Peso	IC	6	32,00	35,00	34,00	36,50	6,48
(kg)	I	6	29,00	54,00	33,50	37,75	8,98
	C	16	31,00	79,00	55,85	54,62	14,40

3.2. Insulação escrotal (experimento 2)

O escroto foi envolvido por uma bolsa insuladora de material isolante térmico de tamanho de 26 x 21 cm, constituída de parede dupla plástica e entre estas, uma

camada de lã de carneiro com 1,5 cm de espessura. A porção interna, em contato com a pele escrotal, foi forrada por um tecido fino de algodão para evitar reações dermatológicas.

As bolsas foram fixadas na região do funículo espermático com cordas finas de algodão. Sobre o saco insulador, foi colocada uma bolsa de tecido como proteção e melhor sustentação, presa à região do funículo espermático e também a um grampo metálico afixado numa dobra de pele dos animais na região inguinal. A insulação escrotal teve duração de 96 horas (GABALDI, 2000). Adotou-se como nomenclatura para o momento inicial da insulação 0h e o último momento, 96h.

3.2.1. Temperatura ambiente

Para o controle da variação climática, foram registradas durante todo o período experimental as temperaturas mínima, máxima no aprisco a cada 24 horas decorridas a partir do dia anterior a insulação (0h), e a temperatura do ambiente no aprisco no momento em que se media as temperaturas retal e da superfície do escroto. Os dados foram medidos por termômetro digital localizado no corredor central dentro do aprisco a uma altura de 1,5 metro do piso das baias dos animais.

3.2.2 Temperatura corporal e escrotal

A temperatura retal foi obtida com um termômetro de máxima de bulbo de vidro (Becton Dickinson®). Foi mensurada a temperatura da superfície escrotal por um termômetro digital de contato (Menotemp-TFA®). O sensor do termômetro foi colocado no interior do saco insulador, de forma que ficasse em contato com a pele, na região média do pólo caudal da bolsa escrotal. No grupo controle, a mensuração foi realizada no mesmo local, através de uma dobra de pele envolvendo o sensor. Esta mensuração foi efetuada entre 7h30 e 8h da manhã.

3.3. Biometria testicular e epididimária (experimentos 1 e 2)

O perímetro escrotal (PE) em centímetros foi avaliado através de fita métrica posicionada na porção medial abrangendo ambos testículos e seus envoltórios. Esta avaliação foi realizada em um momento anteriormente à castração dos animais do grupo A. Nos animais do grupo B, tal procedimento não foi realizado devido à imprecisão causada pela proporção de lã no escroto. Para os animais do grupo IC e I, este procedimento foi feito antes e após a insulação escrotal (experimento 2).

A consistência (1 a 4) e a mobilidade testicular, e o epidídimo foram avaliados por palpação externa nos animais dos grupos A e B (experimento 1). Pela palpação da bolsa escrotal e testículos, comprimindo-se com o polegar o testículo imobilizado, determinou-se sua consistência, convencionando-se: fibro-elástico (4); flacidez leve (3); flacidez moderada (2); flacidez severa (1). Estes procedimentos também foram efetuados antes e após o período de insulação escrotal.

Os testículos foram obtidos por orquiectomia ou após abate, retirando-se o tecido conjuntivo. Separou-se o testículo do epidídimo, aferindo-se o peso individual do testículo e do epidídimo em balança de precisão centesimal. Em seguida, avaliou-se o volume real do testículo através do método de deslocamento de líquido.

Para avaliar o volume por meio do deslocamento de líquido, num recipiente contendo um canal lateral, colocou-se água à temperatura ambiente até o nível do canal lateral, em seguida submergiu-se o testículo no recipiente. No momento em que o testículo era imerso, a água deslocada era armazenada numa proveta graduada, onde se obtinha o volume de água deslocado pelo testículo que correspondia ao volume do testículo. Este procedimento não foi realizado para o grupo C, devido impossibilidades técnicas no momento do abate destes animais. A densidade testicular foi calculada a partir da relação do peso e volume do órgão e expressa em $\text{g} \cdot (\text{cm}^3)^{-1}$.

3.4. Colheita de sêmen (experimentos 1 e 2)

Os carneiros do grupo A foram treinados para colheita de sêmen com vagina artificial, modelo curto, usando como manequim uma ovelha (Mies Filho, 1987).

Entretanto, três carneiros condicionaram-se à colheita de sêmen com a utilização de outro macho como manequim.

Durante a fase experimental os animais foram submetidos a regime de seis colheitas de sêmen por dia, com intervalo aproximado de uma hora entre cada colheita, durante um período de 10 dias, até que as reservas extragonadais de espermatozóides, representadas pela soma das seis colheitas diárias, se estabilizasse (BLANCHARD & VARNER, 1996), situação necessária para realização simultânea com os mesmos carneiros de outro experimento (TUTIDA, 2003)

Os animais dos grupos IC e I tiveram o sêmen colhido diariamente através de eletroejaculador (DuBoi[®]), nos três dias anteriores ao início da insulação, servindo a média destas como controle do momento anterior à insulação (0h). Durante a insulação, os animais tiveram uma colheita às 24, 48, 72 e 96 horas do início da insulação escrotal (momentos 24h; 48h; 72h e 96h).

Os animais dos demais grupos pré-púberes e criptorquídicos bilaterais não tiveram sêmen analisados.

3.5. Análise de sêmen (experimentos 1 e 2)

Após a colheita de sêmen, foram avaliadas as características macroscópicas (cor e volume), sendo o frasco coletor colocado em banho-maria a 37°C. Retirava-se uma alíquota de sêmen e diluía-se em 1,0 mL de PBS; desta diluição colhia-se uma amostra e avaliava-se em microscópio óptico com contraste de fase a motilidade progressiva e o vigor (CBRA, 1998).

Do sêmen colhido do grupo A, retirava-se uma amostra de 40 µL de sêmen e diluía-se em 8 mL de água destilada na proporção de 1:200, após a diluição avaliava-se a concentração em mm³, com o auxílio do espectrofotômetro. Para os animais do grupo IC e I, a concentração espermática foi estimada após diluição em formol-salina (1:400) e contagem em câmara de Neubauer.

A morfologia espermática foi analisada em esfregaços do ejaculado corado pelo método de Karras, modificado por Papa et al. (1988). Em seguida foi feita a contagem de 200 células em microscópio óptico (aumento de 1000X), sendo as alterações morfológicas classificadas conforme Blom (1973).

3.6. Produção espermática (experimento 2)

Com o objetivo de se comparar a produção espermática na insulação (experimento 2 - grupos IC e I), foi realizada técnica de contagem de espermatozóides por grama de tecido testicular (Pe.g^{-1}). Para isso, foram colhidos três fragmentos do parênquima testicular de aproximadamente um grama cada, das porções proximal, medial e distal dos testículos direito e esquerdo, sendo identificados e armazenados sob congelação a -20°C . No momento da contagem, esses fragmentos foram descongelados e o peso confirmado em balança centesimal. Pesou-se o tubo vazio e após a adição de 5 mL de Triton X-100 e o fragmento de aproximadamente um grama, pesava-se novamente e a diferença entre os pesos correspondia à primeira diluição. Estes fragmentos foram homogeneizados em triturador com 5 mL de Solução de Triton X-100 (AMANN & LAMBIASE, 1969; BLANCHARD & JOHNSON, 1997), e submetidos a sonicação por 30 segundos com o intuito de separar a cabeça e cauda dos espermatozóides resistentes à trituração e para limpar o campo dos restos celulares. Deste homogeneizado retirava-se uma alíquota de 100 μL , novamente diluía-se em 900 μL de Triton X-100 (segunda diluição, 1:10), e com o auxílio de uma pipeta plástica, preenchia-se a câmara de Neubauer, deixando-se em repouso para que as células sedimentassem e, em seguida, procedia-se a contagem das cabeças dos espermatozóides com o auxílio do microscópio de contraste de fase, fazendo-se quatro repetições, com diferença entre as leituras não superior a 10%.

Após a contagem, fazia-se uma média das quatro contagens e aplicava-se o número de células obtido por grama de tecido na equação:

$$N \times 0,05 \times 1^{\text{a}} \text{ diluição} \times 2^{\text{a}} \text{ diluição} = \text{n}^{\circ} \text{ espermatozoides} \times 10^6 \cdot \text{g}^{-1} \text{ testículo}$$

Para se chegar na produção espermática diária por grama de testículo, dividiu-se o valor obtido na equação anterior pelo fator 3,65 dias.

Posteriormente, foi calculada a média das porções proximal, medial e distal por testículo, e os resultados foram apresentados através da média encontrada dos testículos direito e esquerdo por carneiro.

3.7. Histologia testicular e da cauda do epidídimo (experimentos 1 e 2)

3.7.1- Histologia

Após orquiectomia (experimento 1 – grupos A e B) ou abate (experimento 2 – grupos IC, I, e C) amostras do parênquima testicular e da cauda do epidídimo foram fixados em ALFAC (85 partes de álcool etílico 80%, 10 partes de formaldeído 40% e 5 partes de ácido acético glacial) durante um período de 24 horas. As peças fixadas foram desidratadas em série sequencial de álcool de 80 a 100%, posteriormente diafanizadas em xilol e incluídas em Paraplast® (Oxoid). Os blocos foram cortados em micrótomo com espessura de 7 μ . As lâminas obtidas foram coradas em hematoxilina e eosina para a análise histopatológica do testículo e da cauda do epidídimo com avaliação panorâmica do aspecto morfológico.

As alterações testiculares foram avaliadas de acordo com os seguintes critérios: presença de vacuolização intracitoplasmática, descamação das células germinativas, presença de células gigantes intratubulares, picnose de espermatócitos, presença de fibrose intersticial, mineralização tubular, hiperplasia celular intersticial e caracterização do infiltrado inflamatório presente. Com relação a este último critério, foi avaliada a sua natureza (mononuclear, polimorfonuclear ou misto) e a sua intensidade (leve, marcante ou severo).

3.7.2. Pigmentos melânicos

Após análise histopatológica, foram identificados grânulos citoplasmáticos em células peritubulares, presentes na cauda do epidídimo de animais pré-púberes, sendo então empregadas técnicas especiais de coloração para identificação dos grânulos presentes. Utilizou-se a técnica de Perls para hemossiderina e ácido periódico de Schiff (PAS) com diastase para lipofuscina. Empregou-se ainda técnica para retirada de pigmento de formol para excluir esta possibilidade. Realizou-se também a técnica de Fontana-Masson para pigmento melânico, e em outro corte histológico retirou-se a melanina pelo emprego de ácido oxálico e coloração de HE (BANCROFT & STEVENS, 1996; PROPHET, 1992).

3.7.3. Histoquímica de mastócitos

As lâminas histológicas foram submetidas a diferentes colorações com o objetivo de identificar histologicamente os mastócitos (NIEDERHEITMANN, 1992).

3.7.3.1. Colorações utilizando somente um corante:

- ◆ azul de toluidina a 1% em 20mL de álcool a 95% e 80mL de água destilada, pH 1,0 por 5 minutos;
- ◆ azul de toluidina a 1% em ácido acético a 1%, pH 2,8, por 5 minutos.
- ◆ safranina O a 0,5%, pH 2,3 por 5 minutos
- ◆ azul de alcian 8GX a 1% HCl 0,1N, pH 1,0 por 30 minutos.

3.7.3.2. Colorações utilizando dois corantes simultâneos:

- ◆ azul de astra a 0,5% e safranina O a 0,5% em ácido acético a 20%, pH 2,3, por 15 minutos;
- ◆ azul de alcian a 0,5% e safranina O a 0,5% em ácido acético a 20%, pH 2,3, por 15 minutos.

3.7.3.3. Colorações seqüenciais:

- ◆ azul de alcian 8GX a 1%, em HCl 0,7N , pH 1,0 por 30 minutos; lavar em água destilada; 10 minutos em HCl 0,7N ; sem lavar; colocar em safranina O a 0,5% em HCL 0,125N, pH 2,3, por 5 minutos;
- ◆ azul de alcian 8GX a 1%, em ácido acético a 3%, pH 2,4 por 30 minutos, seguido safranina O 0,5% pH 2,3 por 5 minutos.

Todas as lâminas após o processo de coloração foram montadas com lamínulas para análise ao microscópio de luz.

3.8. Testosterona plasmática e no tecido testicular (experimentos 1 e 2)

As dosagens de testosterona foram feitas no Laboratório de Endocrinologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP / Botucatu. As extrações de hormônios esteróides de tecido testicular foram realizadas no Laboratório de Dosagem Hormonal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP / São Paulo.

3.8.1. Testosterona plasmática

Neste experimento, foi realizada uma colheita de sangue por dia, por três dias consecutivos no horário entre 8:00 e 8:30 horas da manhã, no período anterior à orquiectomia ou abate dos animais, visando a dosagem e avaliação hormonal dos níveis de testosterona. Na insulação, os animais de ambos os grupos (IC e I), estas colheitas foram consideradas como o momento inicial (0h), sendo realizadas outras 4 durante a insulação escrotal (24h; 48h; 72h; 96h).

As colheitas de sangue foram feitas em tubo de 10 mL heparinizado (Labnew® Indústria e Comércio Ltda – VacuumII), através da punção da veia jugular. O sangue foi centrifugado a 2000xg por 15 minutos (Fanem – Centrífuga Exelsa Baby – mod. 206-R), e o plasma separado em alíquotas e estocado a -20°C para posterior dosagem hormonal.

As dosagens de testosterona foram realizadas por meio de radioimunoensaio (RIA) em fase sólida (Diagnostic Products Corporation (DPC), 5700 West 96th street, Los Angeles, C.A. 90045-5597) utilizando-se o ^{125}I e contador de cintilações gama (Gamma Count Mod. 5500 BECKMAN). O conjunto de reagentes foi armazenado entre 2 e 8°C a partir do seu recebimento até sua utilização.

3.8.1.1. Método de determinação quantitativa de testosterona plasmática

Cada conjunto de reagentes para dosagens possuía seis (6) padrões de testosterona contendo 0; 20; 100; 400; 800 e 1600 ng/100 mL. As ligações inespecíficas foram detectadas através do *plain tube* (*uncoated*) em duplicata.

As amostras de plasma avaliadas foram retiradas do *freezer* (temperatura de – 20°C), ordenadas e descongeladas à temperatura ambiente.

Todos os reagentes e amostras de plasma, após atingirem o equilíbrio térmico com o ambiente, foram levemente agitados antes do uso. No desenvolvimento do método, para os padrões e amostras desconhecidas foram usados os tubos de ensaio 12 X 75 mm (*coated tubes*), previamente identificados.

1. Foram depositados 50 μL dos padrões e dos plasmas nos respectivos tubos.
2. Em seguida, acrescentou-se 1,0 mL do reagente T ^{125}I a todos os tubos.
3. Após leve agitação, os tubos foram colocados em banho-maria a 37°C durante 3 horas.
4. Decorrido este período, o conteúdo dos tubos foi aspirado até a completa remoção do iodo.
5. Foram efetuadas as contagens da radioatividade do conteúdo de cada tubo em um sistema de medida gamma, por um minuto. As contagens obtidas de cada amostra e padrões sofreram interpolação pelo próprio programa do aparelho, obtendo-se assim os valores da concentração de testosterona de cada uma delas em ng.dL^{-1} .

3.8.2. Método de quantificação de testosterona no tecido

3.8.2.1 Preparação de vidraria para extração hormonal

Toda a vidraria utilizada no processo de extração de hormônios do tecido testicular foi submetida ao processo de siliconização para que não houvesse adesão dos hormônios esteróides às paredes internas dos vidros.

Esse processo tinha início com a preparação da solução de siliconização. A obtenção de 100 mL dessa solução dava-se pela evaporação por ebulição de 120 mL de tolueno até que este atingisse um volume de 99 mL, e após o seu resfriamento, fosse adicionado 1mL de dimetildiclorosilano ($C_2H_5Cl_2Si$, Sigma). A vidraria foi enxaguada com a solução de siliconização, secada em temperatura ambiente, lavada duas vezes com metanol, colocada para secar em temperatura ambiente, estando pronta para utilização no processo de extração hormonal quando desaparecidas as gotículas de metanol de sua superfície.

3.8.2.2. Extração de hormônios esteróides de tecido testicular

As amostras de testículo foram inicialmente congeladas em nitrogênio líquido ($-196^{\circ}C$) no momento posterior à orquiectomia ou ao abate. Posteriormente, foram mantidos em freezer ($-80^{\circ}C$) até o momento da análise quando foram transferidos para freezer comum ($-20^{\circ}C$). Todas as amostras do tecido testicular foram submetidas ao processo de extração (MANSOUR et al., 2002) em duplicata para que fossem posteriormente ressuspensas em metanol e solução tampão para RIA.

3.8.2.3. Pesagem das amostras

As amostras do tecido testicular foram descongeladas, fracionadas e pesadas em balança digital (AL500, Marte balanças e equipamentos de precisão Ltda, BR) diretamente dentro de um tubo de 50 mL siliconizado. Seus pesos variaram de 0,42 g a

1,09 g de tecido, conforme a disponibilidade de tecido em cada amostra e tiveram seus valores individuais anotados para correção de suas concentrações para ng/g de testículo.

3.8.2.4. Homogeneização das amostras

A homogeneização das amostras foi feita utilizando-se um dispersor de tecidos (Polytron, Kinematica™ GmbH). Cada fragmento do tecido testicular foi homogeneizado em 15 mL de uma solução de etanol:acetona (4:1) e a adição desse volume foi realizada três vezes.

3.8.2.5. Extração em etanol:acetona

Os tubos de ensaio contendo os homogenatos foram misturados vigorosamente e centrifugados por 15 minutos a 500xg. Os sobrenadantes foram relocados para tubos de 15 mL de capacidade, e os sedimentos foram ressuspensos em 5 mL da solução de etanol:acetona, recentrifugados por 15 minutos a 500xg e adicionados aos respectivos tubos de 15 mL. Esses tubos foram destinados a evaporação em banho-maria sob fluxo de ar comprimido, até que os conteúdos remanescentes apresentassem aspecto oleoso.

3.8.2.6. Extração em éter etílico

Os extratos oleosos receberam 5 mL de éter etílico, foram agitados vigorosamente por 3 minutos e centrifugados por 15 minutos a 500xg. Os sobrenadantes foram transferidos para outros tubos de 15 mL e os sedimentos desprezados. Esses tubos tiveram seus conteúdos destinados à evaporação sob fluxo de ar comprimido até que novamente se obtivesse uma substância oleosa em seus interiores.

3.8.2.7. Extração em hexano:acetonitrilo

Os extratos oleosos obtidos da evaporação dos extratos etéreos foram adicionados de 3 mL de acetonitrilo, agitados vigorosamente por 1 minuto, adicionados de 3 mL de hexano, novamente agitados por 1 minuto, centrifugados a 500xg por 15 minutos e colocados em repouso em freezer (-20°C) por 15 minutos.

Como os dois solventes são imiscíveis, cada camada foi recolhida separadamente (as camadas brancas que por vezes se formavam nas interfaces foram recolhidas juntamente com o hexano) e re-extraídas mais duas vezes pela adição de hexano e acetonitrilo (cada um no volume de 2mL).

3.8.2.8. Finalização da amostra

Os tubos com hexano e acetonitrilo ficavam no freezer por um período mínimo de 1 hora antes do descarte do hexano, colocação do acetonitrilo em novos tubos de 15 mL e sua evaporação sob fluxo de ar comprimido em banho-maria até sua redução máxima. Depois dessa redução os tubos eram fechados e estocados a -20°C até sua ressuspensão e diluição.

3.8.2.9. Determinação de porcentagem de recuperação hormonal

As porcentagens de recuperação hormonal foram obtidas sem a utilização de hormônio marcado por radioisótopo devido ao menor potencial de risco aos manipuladores das substâncias utilizadas no processo e ao ambiente. A determinação das porcentagens de recuperação feita com hormônios não marcados foi realizada pela adição de quantidades conhecidas de testosterona em extratos do tecido testicular obtidos pela homogeneização de aproximadamente 1 grama do tecido testicular em álcool e acetona (4:1) após a depleção hormonal desses extratos.

A depleção hormonal realizou-se pela adição de 2 mL de solução de carvão e dextran ao extrato e agitação por um período de 2 horas. Essa mistura foi centrifugada,

transferida para outro tubo siliconizado, novamente depletada pelo procedimento acima descrito, e centrifugada (DARBRE et al., 1983; REDDEL et al., 1984.). O sobrenadante obtido recebeu alíquotas de 70 μL de testosterona (10^3ng.mL^{-1}) para que após todos os passos da extração e ressuspensão das amostras se obtivesse uma concentração de $3,5\text{ ng.mL}^{-1}$ de testosterona (diluição de 1:40). Esses extratos foram submetidos ao procedimento de RIA e as concentrações determinadas foram comparadas com os valores considerados de 100% do hormônio adicionado para que pudessem ser encontrados os valores das porcentagens de recuperação de cada amostra.

3.8.2.10. Ressuspensão e diluição de amostras

As amostras destinadas à quantificação de testosterona foram ressuspendidas em 1 mL de metanol e depois diluídas em tampão fosfato salino com 0,1% de gelatina (21,85 g de fosfato de sódio dibásico dodeca-hidratado, 5,4 g de fosfato de sódio mono-hidratado, 1 g de azida de sódio, 9 g de cloreto de sódio e 1 g de gelatina em 1L de água destilada, pH = 7) receita do tampão na proporção de 1:2.

Os RIAs para determinação das porcentagens de recuperação de testosterona foram realizados com amostras ressuspendidas em 1 mL de metanol e diluídas nas proporções de 1:20 para testosterona em tampão fosfato salino com 0,1% de gelatina.

3.8.2.11. Procedimentos de Radioimunoensaio (RIA)

Os RIAs foram realizados conforme recomendações do fabricante Diagnostic Products Corporation (DPC) para os seus kits de RIA para testosterona (Diagnostic Products Corporation (DPC), 5700 West 96th street, Los Angeles, C.A. 90045-5597).

3.8.2.12. Transformação das concentrações determinadas por RIA

As concentrações determinadas primariamente por RIA para testosterona foram expressas em ng.dL^{-1} . Para melhor adequação dos resultados ao substrato do qual ele foi obtido foi necessária a sua conversão para ng.g^{-1} do tecido testicular, e para tal, os resultados obtidos foram inseridos na seguinte equação: $CT = \{(CP/P).2/(REC/100)\}$, onde: CT é a concentração tecidual, CP é a concentração primária, P é o peso da amostra, 2 é a constante de diluição e REC é a porcentagem de recuperação. O resultado dessa equação é expresso em ng.g^{-1} .

3.9. Extração e dosagem automática da histamina do testículo e da cauda do epidídimo (experimentos 1 e 2)

Para a dosagem do conteúdo total de histamina no testículo e na cauda do epidídimo, um fragmento foi retirado da região média dos testículos, e outro da cauda dos epidídimos sendo pesados e posteriormente adicionados separadamente em 10 mL de ácido perclórico 0,4N, e mantidos em geladeira por 2 horas. Após este tempo, a amostra foi triturada e mantida em geladeira a 4°C por 12 horas. Ao final da incubação, o material foi centrifugado por 20 minutos a 2500xg e o sobrenadante separado e congelado (-20°C) para posterior determinação do conteúdo total de histamina.

Foi utilizado o método fluorométrico de Shore et al. (1959), com as extrações e dosagens da histamina feitas pelo método automático, utilizando-se o aparelho Technicon Auto Analyser II.

As amostras contendo histamina foram submetidas à extração butanólica após adição de NaOH 2N saturado com NaCl, o que facilita a passagem da histamina para o butanol. A fase aquosa foi desprezada e à fase orgânica era adicionado NaOH 0,1 N saturado com NaCl para remover resíduos orgânicos. A fase aquosa foi desprezada e então, sendo adicionado HCl 0,1 N para acidificar o meio, e heptano, que facilita a passagem de histamina para a fase aquosa. A fase orgânica era desprezada, ficando a

histamina extraída na fase aquosa ácida. Após a extração, a histamina foi condensada com oftaldialdeído (OPT) em solução fortemente alcalina. O resultado é um produto fluorescente, estabilizado por acidificação com HCl 3N. Os picos de intensidade de fluorescência foram posteriormente mensurados para cálculo das concentrações totais de histamina por grama de tecido testicular e da cauda do epidídimo (SHORE et al., 1959).

3.10. TNF-alfa do testículo e da cauda do epidídimo (experimento 2)

3.10.1 - Obtenção dos homogenatos de testículo e epidídimo:

Os sobrenadantes dos testículos e epidídimos dos animais avaliados (grupos IC e I) foram obtidos macerando-se os respectivos tecidos em 1 mL de solução salina estéril sob fluxo laminar. Aproximadamente 0,8 mL foi recolhido em microtubos de 1,5 mL e centrifugado à temperatura de 20°C a 2500xg por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi colhido e armazenado a - 80°C para posterior dosagem de TNF- α .

3.10.2- Ensaio Biológico para determinação de TNF alfa

3.10.2.1. Preparo da cultura de células L929

A linhagem tumoral de fibroblasto murinos denominada L929, sensível ao TNF, foi utilizada para o ensaio de dosagem dessa citocina. As células foram cultivadas em meio RPMI completo (MCCC) e mantidas por repiques semanais, em frascos de plástico em estufa a 37°C com atmosfera enriquecida com 5% de CO₂. O meio de cultura de manutenção das células foi desprezado e substituído por uma solução de ATV (tripsina 0,2% e verseno 0,02%) para promover o descolamento das células da parede do frasco. Em seguida, o ATV foi desprezado, as células lavadas e ressuspensas em meio RPMI completo (MCCC). Após a contagem de células em câmara de Neubauer, a suspensão foi ajustada para uma concentração de 5×10^5 células/mL. Volumes de 100 μ L dessa suspensão foram distribuídos em placas de microcultura de 96 orifícios e fundo plano para cultura de células. Após incubação por 24 horas a 37°C em atmosfera constante de 5% de CO₂, o meio contido nos orifícios

foi desprezado e substituído por 100µL de meio RPMI completo (MCCC) contendo Actinomicina D na concentração de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

3.10.2.2 Ensaio de citotoxicidade:

Os sobrenadantes dos testículos e epidídimos obtidos conforme descrito, foram adicionados em volumes de 100 µL de células L929 tratadas com Actinomicina por 3 horas. Em três orifícios, foi adicionado apenas RPMI completo (cultura controle). Após incubação a 37°C em atmosfera constante de CO₂ por 18 horas, os sobrenadantes foram desprezados e 100µL de uma suspensão de cristal de violeta (0,2% em 20% de etanol) foram adicionados aos orifícios por 15 minutos para fixação e coloração das células. Em seguida, a placa foi lavada em água por imersão, para remoção do excesso do corante. Posteriormente, 100 µL de lauril sulfato de sódio (SDS) a 1% em água destilada, foram colocados em cada orifício para solubilização das células. A leitura das absorbâncias de cada orifício foi realizada com filtro de 490 nm em espectrofotômetro automático de microplaca, modelo Multiskan. A quantidade de TNF-alfa nos sobrenadantes de testículos e epidídimos foi calculada sobre a curva padrão realizada com TNF-alfa recombinante murino (Genzyme), empregado nas concentrações de 40 a 4000U mL⁻¹.

3.11. Óxido nítrico do testículo e da cauda do epidídimo (experimento 2)

3.11.1 - Obtenção dos homogenatos de testículo e epidídimo:

Os sobrenadantes dos testículos e epidídimos dos animais avaliados foram obtidos de forma semelhante ao descrito no item 3.10.1.

3.11.2. Determinação da concentração de óxido nítrico

Para que fosse possível a detecção do nitrito nas amostras de tecidos testicular e epididimário, foi acrescentada (88 µL do homogenato + 22 µL de TCA 50%), ácido tricloro acético (TCA) a 10% com posterior centrifugação a 2500xg por 20 minutos

para remoção do precipitado protéico para a realização do teste de Griess. A concentração de nitrito/nitrato foi determinada pela reação de Griess, (GREEN *et al.*, 1982), após a redução enzimática do nitrato a nitrito com a enzima nitrato redutase (Sigma N-7265) em solução de redução. A redução do nitrato nas amostras de homogenatos testiculares e epididimários foram feitas a 37°C (*over night* = 18 horas), com a subsequente detecção do nitrito. Para tal, 50µL do sobrenadante foram adicionados a 50 µL de reagente de Griess (preparado pela mistura de volumes iguais de sulfanilamida a 1% em H₃PO₄ a 2,5% e 0,1% de naftiletilenodiamida em H₂O), incubando-se à temperatura ambiente por dez minutos. A absorbância foi medida com filtro de 540 nm usando um leitor automático de micro placas (Biorad 2550 reader eia, USA). As concentrações de nitrito foram calculadas por extrapolação para uma curva padrão de NaNO₂ e os dados expressos em nmoles de nitrito e nitrato. A reação foi realizada em placas de 96 poços de fundo chato (Nunc-Maxsorp, Rochester, NY, USA) com cada amostra em duplicata.

3.12. Análise estatística

Os dados foram apresentados por meio de estatística descritiva apontando as medidas de tendência central e de dispersão de variáveis.

Estes dados foram avaliados quanto a sua distribuição, e apresentaram distribuição não-normal para as variáveis estudadas.

As variáveis foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis para comparação entre 2 grupos ou 3 ou mais grupos respectivamente.

O teste de correlação de Spearman ou Friedman foi usado para análise de duas ou três ou mais variáveis contínuas de distribuição não-normal.

Utilizou-se o programa estatístico *Stat View*TM para realização das análises.

Consideraram-se como verdadeiras as diferenças de médias cuja probabilidade de erro foram menores do que 5% (ZAR, 1984).

4. RESULTADOS

Os resultados do experimento 1 e 2 foram apresentados a seguir. Desta forma, os dados dos animais maturos sexualmente (grupo A) e pré-púberes (grupo B) foram colocados agrupados no experimento 1 (comparação entre períodos reprodutivos), e os dados dos animais controle da insulação escrotal (IC), insulados (I) e criptorquídicos (grupo C) foram agrupados no experimento 2 (estresse térmico).

4.1. Biometria testicular e epididimária (experimento 1)

A biometria testicular e epididimária dos animais do grupo A e B estão apresentadas nas Tabelas 3 e 4. Estas mensurações tiveram o objetivo de caracterizar os dois grupos frente estas variáveis, não sendo, portanto, objeto de comparação entre estas.

TABELA 3 – Número de análises (n), valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios padrão (DP), do perímetro escrotal (PE), peso do testículo e do epidídimo de carneiros da raça Suffolk maturos sexualmente (A) e pré-púberes (B).

	Grupo	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
PE* (cm)	A	15	29,00	40,00	33,50	33,97	2,43
Peso testículo (g)	A	30	141,40	304,10	219,05	226,62	45,29
	B	68	1,28	10,78	4,06	4,75	2,35
Peso** epidídimo (g)	B	68	0,77	5,41	2,08	2,39	1,15

Obs:* grupo B– não avaliado; ** grupo A - indisponível para análise

TABELA 4 – Número de análises (n), valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios padrão (DP) do volume testicular e densidade testicular de carneiros da raça Suffolk maturos sexualmente (A) e pré-púberes (B).

	Grupo	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
Volume testicular (cm³)	A	30	140,0	295,0	215,0	219,8	43,7
	B	68	2,3	12,2	6,0	6,6	2,3
Densidade testicular g.(cm³)⁻¹	A	30	0,999	1,067	1,029	1,031	0,015
	B	68	0,250	1,135	0,716	0,703	0,191

As características médias das últimas 6 colheitas de sêmen dos animais do grupo A, nos dias anteriores à orquiectomia foram apresentadas na tabela 5.

TABELA 5 - Média e desvio padrão (DP) do volume ejaculado, da motilidade, da concentração espermática, e a mediana do vigor em carneiros Suffolk maduros sexualmente submetidos a um regime de 6 colheitas diárias durante 10 dias.

Volume (mL)		Motilidade (%)		Vigor (0-5)	Concentração (x 10 ⁶ .mL ⁻¹)		Concentração Total (x 10 ⁹)	
média	DP	média	DP	mediana	média	DP	média	DP
0,76	0,19	72,44	5,15	4	2,43	0,92	1,82	0,80

4.2. Parâmetros relacionados ao modelo de insulação escrotal (experimento 2)

As variáveis medidas nos animais durante a insulação escrotal foram descritas a seguir para verificação dos resultados desta metodologia empregada em outros parâmetros biológicos objeto do estudo do experimento 2.

A temperatura média local ambiental no aprisco durante o período experimental foi de 15,5°C, com a mínima de 4,7°C e a máxima de 18,6°C (TAB. 6; FIG. 1). Houve diferença estatística entre as temperaturas no aprisco no decorrer da insulação (Friedman; $p < 0,0001$) com aumento significativo desta de 24 até 96 horas.

TABELA 6 – Temperaturas ambientais média, mínima e máxima, nos diversos momentos da insulação escrotal.

	Momento / Temperatura (°C)				
	0h	24h	48h	72h	96h
Média	13,5	12,5	14,6	17,0	19,7
Mínima	9,0	4,7	10,7	10,2	10,0
Máxima	13,6	14,0	15,2	18,6	20,1

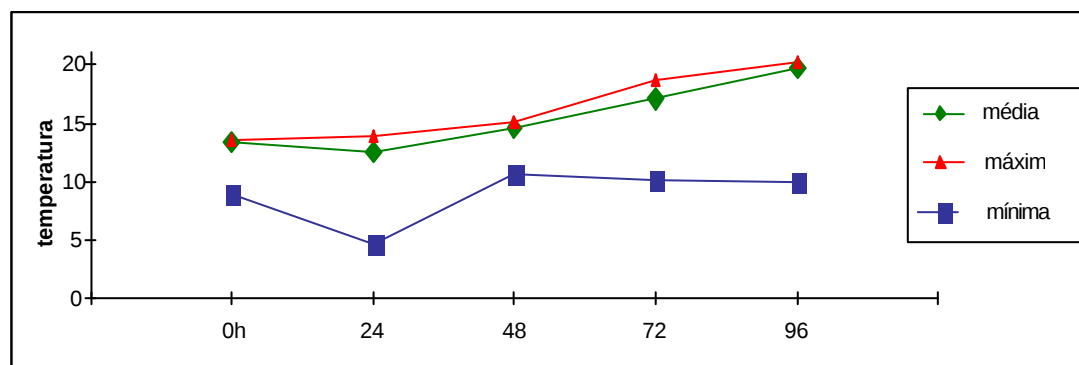
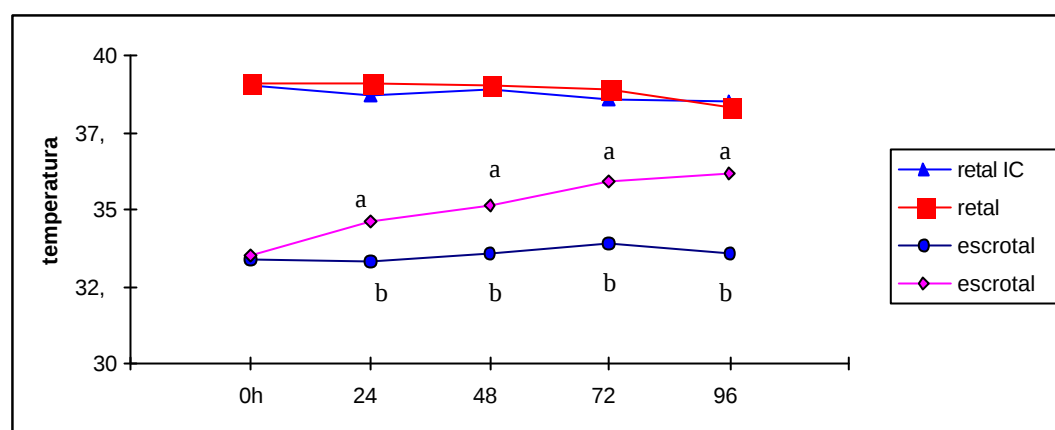


FIGURA 1 – Temperaturas ambientais média, mínima e máxima, nos diversos momentos no período de insulação escrotal.

As médias da temperatura retal não diferiram estatisticamente quando foram comparados os vários momentos dos grupos controle (IC) e do grupo submetido à insulação escrotal (I) (Mann-Whitney; $p>0,40$), e também durante os momentos em cada grupo separadamente (Friedman; $p=0,30$) (Anexo: TAB. 16) (FIG. 2).

Houve diferença significativa (Mann-Whitney; $p<0,01$) entre os grupos com relação às médias de temperatura escrotal a partir de 24h até o final da insulação escrotal (96h) (Anexo: TAB.16) (FIG. 2). Observou-se também que para o grupo com a bolsa escrotal insulada (I), o aumento da temperatura do escroto no decorrer dos dias foi significativo (Friedman; $p<0,001$), sendo que não ocorreu este efeito para



o grupo controle (IC).

FIGURA 2 – Médias das temperaturas corpóreas (retal e escrotal) de carneiros da raça Santa Inês não insulados (IC) e insulados (I) nos diversos momentos da insulação escrotal. (letras diferentes expressam diferença estatisticamente significativa para o momento; Mann-Whitney; $p<0,01$; temperatura escrotal)

Não foram detectadas alterações na biometria testicular (perímetro escrotal, pesos, volume e densidade) e no peso do epidídimo (TABs. 7 e 8) comparativamente entre os animais insulados e controle.

TABELA 7 – Número de análises (n), valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios padrão (DP) do perímetro escrotal (PE), de carneiros da raça Santa Inês com bolsa escrotal não insulada (IC), insulada (I) e criptorquídeos (C).

	Grupo	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
PE inicial	IC	6	26,00	31,00	27,50	27,83	1,78
	I	6	25,50	28,50	26,75	27,00	1,09
PE final	IC	6	25,00	29,70	26,80	27,05	1,56
	I	6	25,50	28,30	27,40	27,18	0,98
Peso testículo (g)	IC	12	89,80	196,00	132,95	138,06	35,58
	I	12	101,40	152,40	126,35	124,90	17,21
	C	27	7,20	52,32	30,37	26,64	12,41
Peso epidídimo (g)	IC	12	20,00	28,00	24,00	24,22	2,52
	I	12	17,10	29,50	21,85	22,11	3,87
	C	27	3,25	12,23	7,10	6,97	2,36

TABELA 8 – Número de análises (n), valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios padrão (DP) do volume testicular e densidade testicular de carneiros da raça Santa Inês com bolsa escrotal não insulada (IC) e insulada (I).

	Grupo	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
Volume testicular (cm³)	IC	12	81,0	194,0	132,5	137,0	35,9
	I	12	102,0	152,0	122,0	124,8	16,9
Densidade testicular g.(cm³)⁻¹	IC	12	0,97	1,11	1,00	1,01	0,04
	I	12	0,95	1,06	1,00	1,00	0,03

No momento da retirada das bolsas insuladoras, houve uma diminuição de um valor inicial de grau 4 na consistência do parênquima testicular, para grau 2 representando uma flacidez moderada em todos os 6 carneiros insulados.

Os resultados dos parâmetros espermáticos de volume, concentrações espermática por mL e total, motilidade, vigor, defeitos maiores, menores e totais, as concentrações plasmáticas de testosterona (Anexo: TABs. 17, 18, 19 e 20) (FIGs. 2, 3, 4 e 5) e a produção espermática por grama de testículo (TAB. 9) dos carneiros do grupo controle (IC) e submetidos a insulação escrotal (I) foram apresentados.

Não existiram diferenças significativas entre os grupos com relação ao volume ejaculado, o vigor, os defeitos maiores, as concentrações espermáticas e as concentrações plasmáticas de testosterona em cada momento em separado (efeito tratamento - Mann-Whitney; $p>0,10$), bem como na comparação do período total (interação tempo x tratamento; Friedman; $p>0,10$) (Anexo: TABs. 17, 18 e 19) (FIGs. 3, 4, 5 e 6).

Houve uma redução na motilidade espermática nos animais insulados (I) apresentando uma diferença significativa no momento 96h (Mann-Whitney; $p=0,005$) (Anexo: TAB. 17) (FIG. 3).

Os defeitos menores (Mann-Whitney; $p=0,02$) e totais (Mann-Whitney; $p=0,004$) aumentaram no grupo insulado, apresentando uma diferença estatisticamente significativa no momento 96h, com predominância de cabeça isolada normal (Anexo: TAB. 18) (FIG. 4).

TABELA 9 – Número de análises (n), valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios padrão (DP) da produção espermática (Pe) por grama de testículo de carneiros da raça Santa Inês com bolsa escrotal não insulada (IC) e insulada (I).

	Grupo	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
Pe.g ⁻¹	IC	12	26,43	39,23	35,31	33,86	4,55
testículo	I	12	26,64	39,76	34,27	33,69	4,02

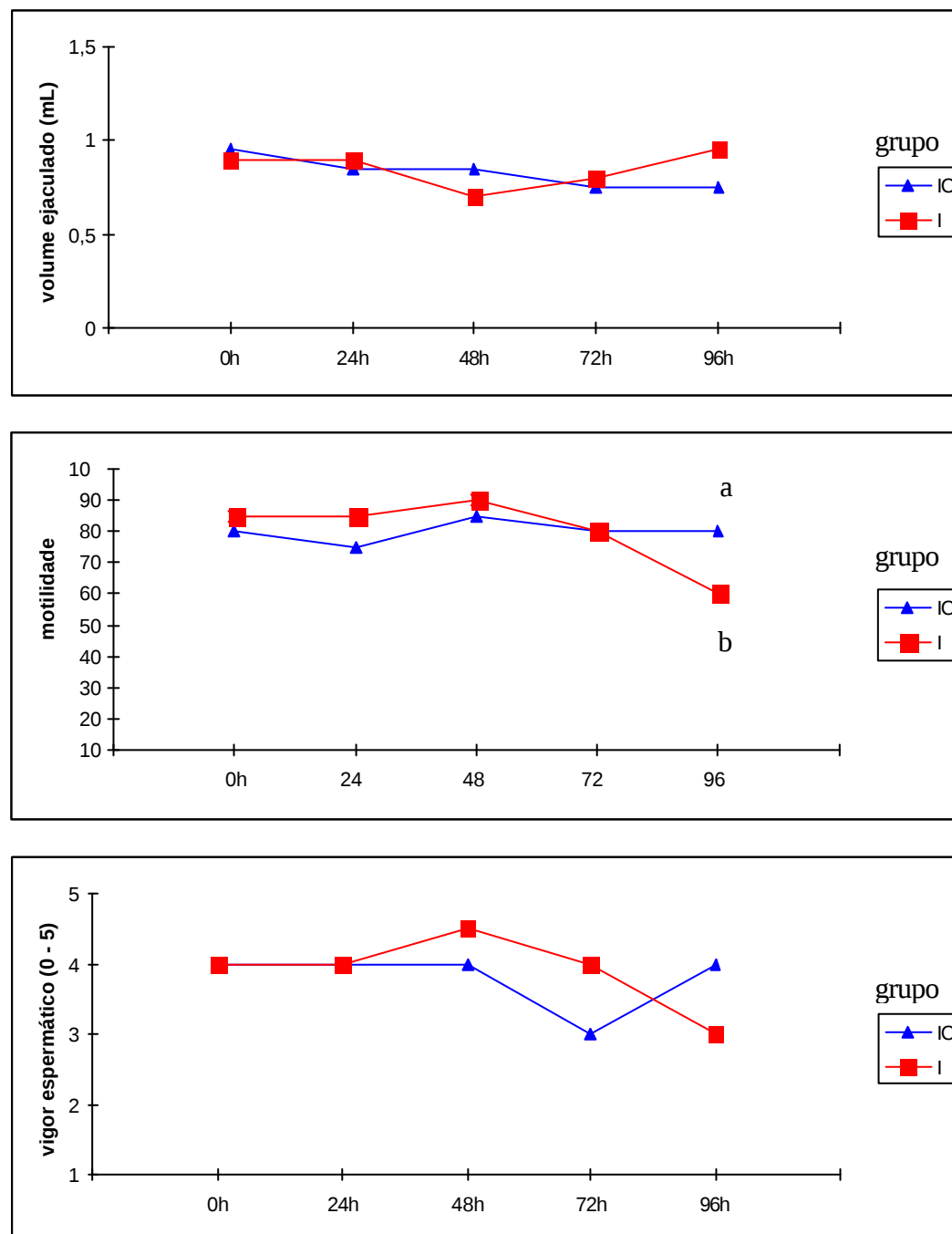


FIGURA 3 - Medianas do volume ejaculado e da motilidade espermática e vigor espermáticos de carneiros da raça Santa Inês com bolsa escrotal não insulada (IC) e insulada (I) nos diversos momentos da insulação escrotal. (letras diferentes expressam diferença estatisticamente significativa para o momento; Mann-Whitney; $p=0,005$; motilidade espermática)

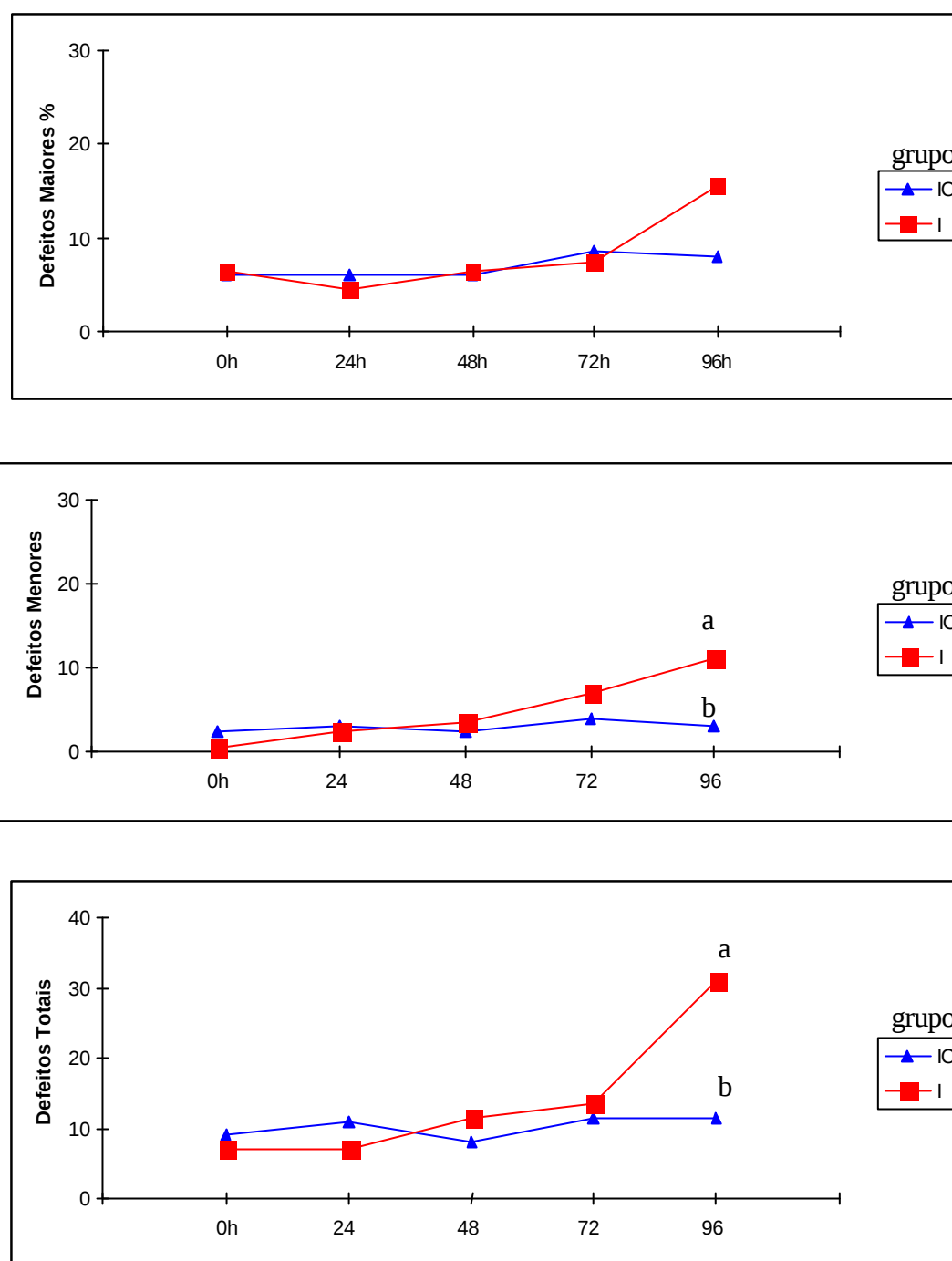


FIGURA 4 - Medianas dos defeitos espermáticos de ejaculados de carneiros da raça Santa Inês com bolsa escrotal não insulada (IC) e insulada (I) nos diversos momentos da insulação escrotal. (letras diferentes expressam diferença estatisticamente significativa para o momento; Mann-Whitney; $p=0,02$, defeitos menores; $p=0,004$, defeitos totais)

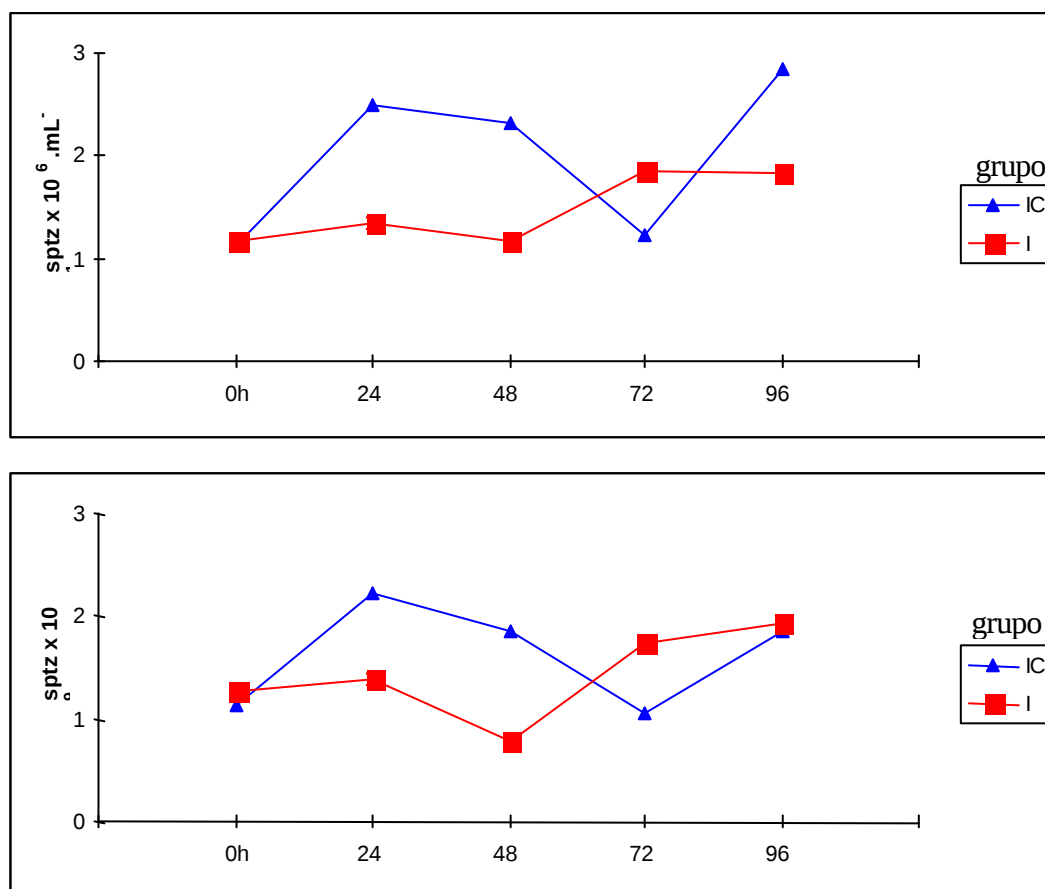


FIGURA 5 - Medianas da concentração espermática por mL e total de carneiros da raça Santa Inês com bolsa escrotal não insulada (IC) e insulada (I) nos diversos momentos da insulação escrotal.

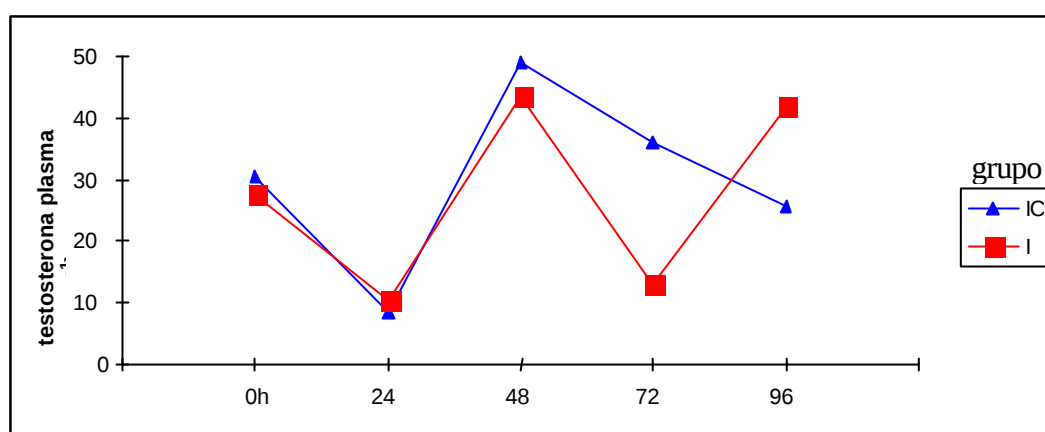


FIGURA 6 - Medianas da concentração plasmática de testosterona de carneiros da raça Santa Inês com bolsa escrotal não insulada (IC) e insulada (I) nos diversos momentos da insulação escrotal.

4.3. Histologia testicular e da cauda do epidídimo (experimentos 1 e 2)

A avaliação histológica testicular não caracterizou alterações marcantes do ponto de vista morfológico em todos os grupos experimentais estudados. No grupo criptorquida, o aspecto histológico foi compatível com a condição.

4.3.1. Pigmentos melânicos

Analisou-se histologicamente 137 testículos e 107 caudas de epidídimos oriundos de 77 carneiros. Foram identificadas células com grânulos citoplasmáticos de pigmento negro em meio a células musculares que circundavam o epitélio dos túbulos e no tecido conjuntivo entre os túbulos da cauda do epidídimo em 38 (55,9%) dos 68 epidídimos dos carneiros Suffolk pré-púberes, correspondendo a 23 (60,5%) animais pré-púberes. Destes 23 animais, 14 tiveram pigmento negro bilateral; 9 unilaterais, sendo 3 na cauda do epidídimo do lado direito e 6 no lado esquerdo (FIG. 7).

Estas células apresentavam-se freqüentemente alongadas, por vezes com prolongamentos, e ocasionalmente arredondadas. Estes grânulos não se coraram pelas técnicas de Perls e PAS com diastase, não se tratando, portanto de grânulos de hemossiderina ou lipofuscina, respectivamente. Com o emprego da técnica para remoção de pigmento de formol, houve persistência do pigmento nas células. A seguir, confirmou-se pela técnica de Fontana-Masson tratar-se de pigmento melânico (FIG. 7) e com o uso de ácido oxálico e coloração de HE promoveu-se a descoloração do pigmento anteriormente.

4.3.2. Histoquímica dos mastócitos

Apesar de todos os corantes utilizados para detecção de mastócitos imaturos (azul de alcian e azul de astra) e maduros (safranina e azul de toluidina), não foi possível demonstrá-los da maneira descrita pela literatura em sua forma e características usuais.

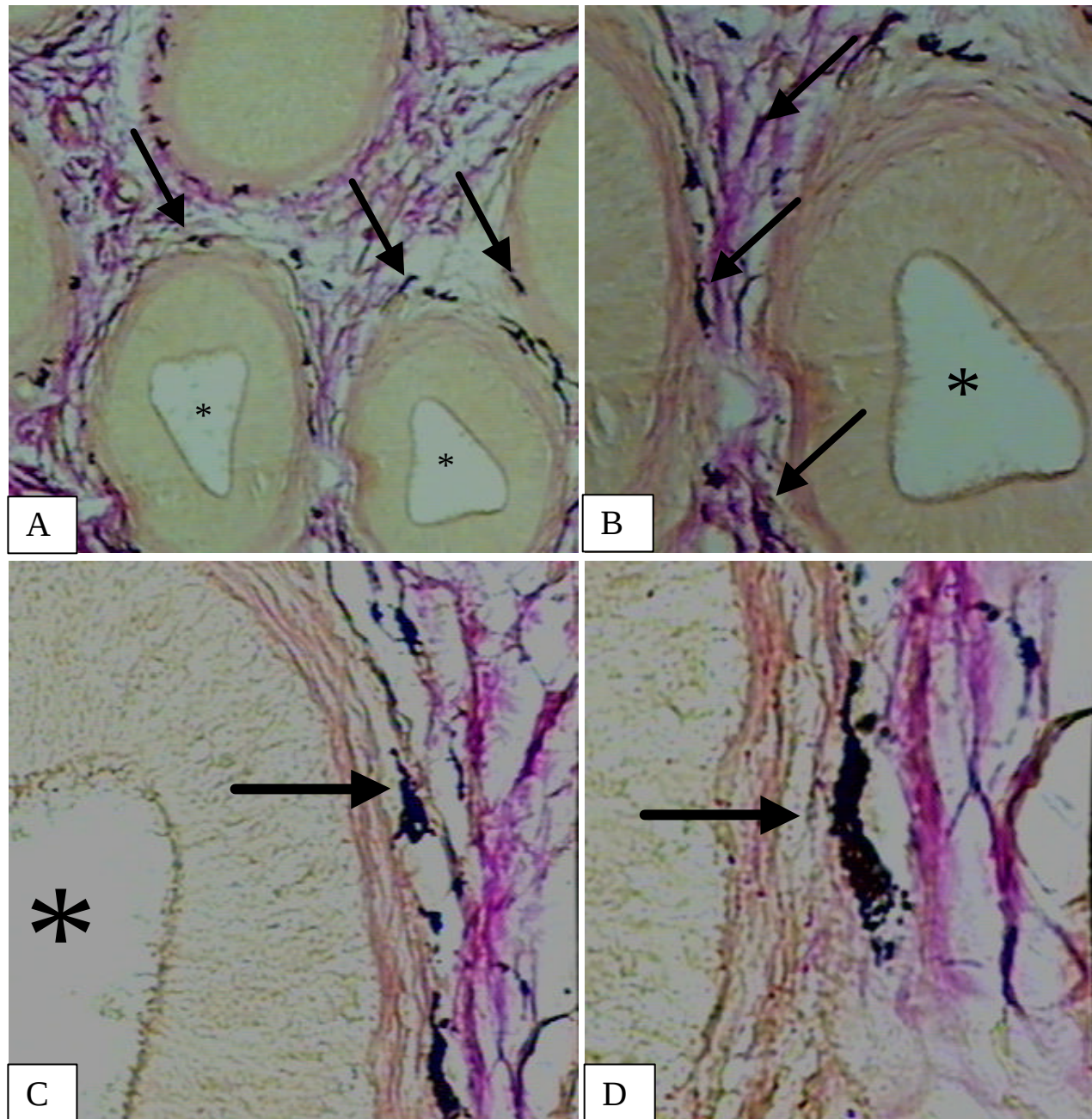


FIGURA 7: microscopia óptica – corte histológico da cauda do epidídimo de carneiro Suffolk pré-púbere - Coloração Fontana-Masson; setas -grânulos de melanina; * luz do túbulo epididimário; (A 160x; B 320x; C 640x; D 1.280x)

4.4. Dosagens de testosterona plasmática e tecidual (experimentos 1 e 2)

Os resultados das concentrações de testosterona plasmática e do testículo foram apresentados a seguir. A taxa de recuperação da testosterona tecidual através da metodologia utilizada foi de 87,8%.

Existe uma diferença significativa nas concentrações de testosterona plasmática nos animais Suffolk maduros sexualmente (grupo A) comparados aos pré-púberes (grupo B) (Mann-Whitney; $p < 0,0001$). Ocorreu um comportamento semelhante na concentração de testosterona tecidual (Mann-Whitney; $p = 0,012$), nas quais os animais maduros sexualmente apresentaram valores superiores aos pré-púberes (TAB. 10).

TABELA 10 - Número de análises, valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios padrão (DP) das concentrações de testosterona (T) no plasma e tecido testicular de carneiros da raça Suffolk maduros sexualmente (A) e pré-púberes (B).

T	Grupo	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
Plasma* ng.dL⁻¹	A	15	14,43	946,13	155,55 a	281,93	284,51
	B	25	0,09	99,75	7,75 b	18,51	23,63
Tecido** ng.g⁻¹	A	30	3087,21	88115,27	9212,38 a	17656,63	22403,97
	B	27	573,51	241794,70	3588,63 b	29558,69	57312,85

“ letras diferentes na mesma coluna expressam diferença significativa (Mann-Whitney * $p < 0,0001$; ** $p = 0,012$)

Não houve efeito significativo da insulação (grupos IC e I), tanto sobre as concentrações de testosterona plasmática quanto as concentrações tecidual (Mann-Whitney; $p > 0,10$) (TAB. 11).

Os animais criptorquídeos (grupo C) diferiram significativamente dos animais submetidos a insulação escrotal (I) e dos não insulados (IC) em ambos comportamentos em que a testosterona foi avaliada (Kruskal-Wallis; $p < 0,0001$), sendo inferior nas concentrações plasmáticas, e superior nas concentrações teciduais (TAB. 11).

TABELA 11 – Número de análises, valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios padrão (DP) das concentrações de testosterona (T) no plasma e tecido testicular de carneiros da raça Santa Inês com bolsa escrotal não insulada (IC) e insulada (I) e criptorquídicos (C).

T	Grupo	n	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
Plasma ng.dL ⁻¹	IC	6	22,34	604,50	337,67 a	331,97	238,87
	I	6	112,21	372,27	318,78 a	277,67	93,48
	C	14	66,34	400,81	147,95 b	170,83	98,75
Tecido ng.g ⁻¹	IC	12	1721,75	6368,78	4043,43 a	3844,11	1210,43
	I	12	1252,25	14667,25	3769,33 a	4218,68	3474,79
	C	19	5432,47	222994,80	20527,81 b	70327,88	81041,24

.. letras diferentes na mesma coluna expressam diferença significativa (Kruskal-Wallis; p<0,0001)

4.5. Concentração total de histamina no testículo e cauda do epidídimo (experimentos 1 e 2)

Os resultados das concentrações totais de histamina no testículo e epidídimo foram apresentados nas Tabelas 12 e 13.

Existe diferença significativa nas concentrações de histamina nos testículos entre os animais Sufflok maduros sexualmente (grupo A) comparados aos pré-púberes (grupo B) (Mann-Whitney; p<0,0001), sendo superiores nos animais pré-púberes em relação aos adultos (TAB. 12). Os animais do grupo A não tiveram o epidídimo avaliado.

TABELA 12 – Número de análises, valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios padrão (DP) das concentrações totais de histamina (H) no testículo e na cauda do epidídimo de carneiros da raça Sufflok maduros sexualmente (A) e pré-púberes (B).

	Grupo	n	H (ng.g ⁻¹)				DP
			Mínimo	Máximo	Mediana	Média	
Testículo	A	30	108,17	187,50	139,64 a	140,52	17,51
	B	68	159,84	425,09	240,61 b	255,50	57,23
Epidídimo	B	68	334,23	2992,48	1052,17	1154,51	563,67

.. letras diferentes na mesma coluna expressam diferença significativa (Mann-Whitney p<0,0001)

Não houve diferença significativa nas concentrações de histamina na insulação (grupos IC e I) (Mann-Whitney; $p < 0,0001$) tanto nos testículos, quanto nos epidídimos. No entanto, nos carneiros criptorquídicos (grupo C) foram detectadas concentrações superiores no testículo e epidídimo, diferindo significativamente dos animais insulados (I) e normais (IC) (Kruskal-Wallis; $p < 0,001$) (TAB. 13).

TABELA 13 – Número de análises, valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios padrão (DP) das concentrações totais de histamina (H) no testículo e na cauda do epidídimo de carneiros da raça Santa Inês com bolsa escrotal não insulada (IC) e insulada (I) e criptorquídicos (C).

	Grupo	n	H (ng.g ⁻¹)				
			Mínimo	Máximo	Mediana ^{..}	Média	DP
Testículo	IC	12	127,22	257,05	179,29a	182,32	30,26
	I	12	151,82	220,69	175,21a	177,88	21,44
	C	27	226,67	770,83	280,70b	333,19	138,35
Epidídimo	IC	12	306,12	1260,13	591,28a	652,61	242,77
	I	12	295,35	922,42	510,44a	554,77	206,01
	C	27	1893,94	6027,67	3116,88b	3516,03	1285,71

^{..} letras diferentes na mesma coluna e mesmo órgão expressam uma diferença significativa

(Kruskal-Wallis; $p < 0,0001$)

Correlacionando-se as concentrações de histamina do testículo com as do epidídimo em todos os grupos deste experimento, encontrou-se correlação positiva (Spearman; $r = 0,56$; $p < 0,001$).

Na análise das concentrações de histamina do testículo dos carneiros com as concentrações de testosterona plasmática, não se encontrou uma correlação estatisticamente significativa por grupos individualmente. No entanto, a análise total de todos os animais (experimento 1 - A, B; experimento 2- IC, I, C) mostrou uma correlação negativa (Spearman; $r = -0,34$; $p < 0,001$).

Considerando-se todos os animais, na análise das concentrações de histamina da cauda do epidídimo com as concentrações de testosterona plasmática, não se encontrou correlação estatisticamente significativa. Contudo, a análise por grupo mostrou uma correlação negativa nos animais pré-púberes (B) (Spearman; $r=-0,38$; $p=0,006$), nos animais submetidos a insulação escrotal (I) (Spearman; $r=-0,63$; $p<0,05$) e nos criptorquídeos (C) (Spearman; $r=-0,37$; $p<0,05$).

Na análise das concentrações de histamina do testículo com as concentrações de testosterona tecidual, ficou demonstrada uma correlação positiva (Spearman; $r=0,60$; $p=0,01$) apenas nos animais criptorquídeos (C).

4.6. Concentração de TNF-alfa do testículo e da cauda do epidídimo (experimento 2)

Os resultados das concentrações de TNF- α estão apresentados na Tabela 14.

Não houve diferença significativa entre o grupo controle (IC) e o grupo de carneiros submetidos a insulação escrotal (I), tanto nos testículos, como nos epidídimos.

TABELA 14 – Número de análises, valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios padrão (DP) da concentração do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) nos testículos e epidídimos de carneiros da raça Santa Inês com bolsa escrotal não insulada (IC) e insulada (I).

	Grupo	n	TNF-a (U.g ⁻¹)				
			Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
Testículo	IC	12	0,00	82,00	66,50	61,25	23,18
	I	11	0,00	214,00	50,00	59,73	60,17
Epidídimo	IC	12	19,00	96,00	75,50	70,42	21,27
	I	12	0,00	137,00	49,50	51,42	42,46

4.7. Concentração de óxido nítrico do testículo e da cauda do epidídimo (experimento 2)

Os resultados das concentrações de NO estão apresentados na Tabela 15. Não houve diferença significativa nas concentrações de NO nos testículos e nos epidídimos dos carneiros submetidos a insulação escrotal (I) e controle (IC).

TABELA 15 – Número de análises, valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios padrão (DP) da concentração de óxido nítrico (NO) nos testículos e epidídimos de carneiros da raça Santa Inês com bolsa escrotal não insulada (IC) e insulada (I).

	Grupo	n	NO (mmol.g ⁻¹)				
			Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
Testículo	IC	12	4,52	15,45	9,03	9,39	3,49
	I	11	5,61	34,68	12,17	12,88	8,05
Epidídimo	IC	12	3,41	14,02	8,59	8,79	3,87
	I	12	6,04	27,93	11,09	12,38	6,15

Nos testículos dos animais com bolsa escrotal insulada (I), foi demonstrada uma correlação positiva entre os níveis de TNF- α e NO ($r=0,68$; $p=0,03$).

Houve uma correlação negativa (Spearman; $r=-0,67$; $p=0,02$) entre a motilidade espermática às 96 horas e a concentração total de NO no epidídimo dos animais controle da insulação escrotal (IC).

5. DISCUSSÃO

5.1- Biometria testicular e epididimária (experimento 1)

A biometria testicular e epididimária dos animais sexualmente maduros e pré-púberes estavam dentro dos padrões de normalidade para os dois grupos, com superioridade em todos os aspectos para do grupo maturo sexualmente (Tabelas 3 e 4). As características seminais dos carneiros do grupo maturo sexualmente possuíam padrões de normalidade para a espécie ovina e idade dos animais (Tabela 5) (CBRA, 1998).

5.2 Parâmetros relacionados ao modelo de insulação escrotal

Mesmo com as baixas temperaturas ambientais durante o experimento (Tabela 6 e Figura 1), e um menor aumento na temperatura escrotal, foi significativa a diferença da temperatura escrotal entre os grupos insulado e controle (Anexo: Tabela 16) (Figura 2). As médias da temperatura ambiental apresentaram ascendência durante os dias até 96 horas do início da insulação. No presente trabalho, os animais submetidos à insulação escrotal, tiveram aumento crescente na temperatura da superfície escrotal de 1,3°C às 24 horas, 1,5°C às 48 horas, 2,0°C às 72 horas e 2,6°C às 96 horas do início da insulação.

A temperatura corporal média do grupo com os escroto insulado neste experimento manteve-se dentro dos parâmetros normais fisiológicos para a raça Santa Inês (38,8°C) considerando-se a idade, não diferindo do grupo controle (38,7°C) (Anexo: Tabela 16, Figura 2), efeito semelhante também encontrado por Moreira et al. (2001) ao utilizar a mesma raça e metodologia, permitindo evidenciar que o estresse térmico imposto às gônadas não teve reflexo sobre a temperatura retal.

Gabaldi (2000) não encontrou alterações na biometria testicular de touros após a insulação. Ott (1986) e Entwistle (1992) constataram a diminuição no perímetro escrotal, peso e tamanho testicular, com degeneração provocada por altas temperaturas. Em carneiros da raça Santa Inês, Moreira, et al. (2001) encontraram uma

redução no perímetro escrotal a partir do oitavo dia após a insulação escrotal. No presente experimento, não foram detectadas alterações na biometria testicular após o insulto térmico (Tabelas 7 e 8), através das avaliações do perímetro escrotal (inicial - 0h; final - 96h), e dos pesos dos testículos e epidídimos no momento da obtenção dos mesmos após abate comparando-se os animais com bolsa escrotal insulada e grupo controle.

Em touros Nelore (GABALDI, 2000) e carneiros Santa Inês (MOREIRA, et al., 2001) foram relatadas a diminuição no grau de consistência do parênquima testicular (1 a 4) constatada após a retirada das bolsas insuladoras, semelhante aos dados do presente experimento, visto que todos os carneiros com bolsa escrotal insulada apresentaram um decréscimo no grau de consistência 4, para 2, após a retirada das bolsas de insulação em relação ao momento 0h. A diminuição da consistência testicular não alterou, às 96 horas de insulação escrotal, o perímetro escrotal, o volume, o peso e a densidade testiculares destes animais ao comparar-se com os carneiros do grupo controle (Tabelas 7 e 8).

A colheita de sêmen dária foi necessária visto que todos os animais seriam abatidos ao final da insulação. As mudanças encontradas nas características seminais durante a insulação escrotal, indicaram que houve a elevação na temperatura epididimária suficiente para causar alterações (Anexo: Tabelas 17, 18, 19) (Figuras 3, 4 e 5). Houve diferença significativa somente às 96 horas após o início da insulação, ocorrendo uma redução na motilidade espermática (Anexo: Tabela 17) (Figura 3), e um aumento nos defeitos menores e totais (Anexo: Tabela 18) (Figura 4) devido ao aumento significativo de espermatozóides com cabeça normal decapitados, não ocorrendo aumento de outros tipos de patologias espermáticas. Moreira, et al. (2001) relatam um decréscimo na motilidade espermática logo na primeira colheita realizada no primeiro dia após a insulação de carneiros Santa Inês, evidenciando efeito direto da temperatura, e mais rápido sobre o epidídimo associado ao aumento estatisticamente significativo nos defeitos menores e totais. Estes achados corroboram com Barth &

Oko (1989) e Barth & Bowman (1994) sugerindo que as anormalidades originaram-se no trânsito do epidídimo. O efeito da temperatura induzindo mudanças no epidídimo e/ou espermatozóides presentes neste órgão são conflitantes, pois nos estudos realizados por Wildeus & Entwistle (1983) Barth & Bowman (1994) e Fonseca & Chow (1995) ocorreram aumento de anomalias espermáticas secundárias, particularmente espermatozóides decapitados e defeitos de cauda, logo após a insulação escrotal. Contudo, Austin et al. (1961), Ross & Entwistle (1979) e Babu Rao & Rao (1990) encontraram patologias no ejaculado após duas semanas do insulto térmico. A intensidade da injúria e fatores diversos como os ambientais podem justificar as diferenças, pois quanto maior e mais prolongado o insulto térmico, mais intenso serão as alterações do quadro espermático a ser observado.

No presente estudo, não houve alteração nas concentrações espermáticas por mL e total ao comparar os grupos de carneiros controle e insulado (Anexo: Tabela 19) (Figura 5). Levando-se em conta o tempo necessário para o transporte espermático pelo epidídimo, não houve tempo para que alterações na espermatogênese refletissem nas células do ejaculado. Também não deve ter ocorrido nos carneiros estudados neste experimento um aumento da fagocitose no epidídimo, pois em alguns relatos, a diminuição da concentração espermática pode ser resultado da diminuição da reserva no epidídimo, pelo aumento na reabsorção dos espermatozóides anormais através de uma fagocitose seletiva. Wildeus & Entwistle (1986), encontraram mudanças quantitativas na reserva espermática epididimal e na cauda do epidídimo, alterações qualitativas na morfologia dos espermatozóides, sugerindo que o calor testicular teve efeito adverso na estocagem, havendo reabsorção dos espermatozóides defeituosos.

A queda da concentração espermática foi causada pela perda da linhagem espermatogênica, principalmente os espermatócitos e espermátides, sendo as células do epitélio seminífero mais sensíveis aos efeitos do calor (BARTH & BOWMAN,1994). No presente experimento, a medida da produção espermática por grama de testículo (Pe) não diferiu significativamente nos animais insulados (Tabela 9). O uso desta técnica

deu-se com a intenção de aferir alteração súbita na produção espermática, que poderia ser detectada *in situ* no momento posterior a insulação.

No presente experimento, não houve diferença significativa da insulação dos carneiros tanto na concentração plasmática, quanto de testosterona testicular, mesmo correlacionando-se ao fator tratamento tempo (Anexo: Tabela 20) (Figura 6). Diferentemente de Gabaldi (2000) que em touros Nelore com bolsa escrotal insulada, ocorreu queda na concentração plasmática de testosterona em 48, 72 e 96 horas após o início do insulto térmico.

MINTON et al. (1981) submetendo touros à temperatura ambiente de 34°C por 15 dias, observaram que a concentração plasmática de testosterona não se alterou no sexto dia do estresse térmico, tendo apenas uma pequena queda após o 15º dia. Apesar das condições experimentais diferentes, Gomes et al. (1971), submetendo carneiros mestiços à temperatura de 32°C por um período de 14 dias, verificaram *in vitro* uma diminuição significativa de aproximadamente 4 vezes no nível de testosterona em relação ao controle. Devido à metodologia empregada no presente experimento, com abate dos animais após a insulação, não seria possível prever se concentração plasmática ou tecidual de testosterona decairia no decorrer dos dias após a insulação conforme relatados por Gomes et al. (1971) e Minton et al. (1981).

No presente estudo, os ejaculados revelaram que alguns parâmetros andrológicos (consistência testicular, motilidade e defeitos espermáticos menores) indicaram a eficácia do modelo de insulação escrotal nas condições realizadas. Não foi objetivo do trabalho acompanhar diminuição da qualidade e retorno à normalidade do quadro espermático dos carneiros avaliados.

5.3. Histologia testicular e da cauda do epidídimo

A avaliação histológica testicular não caracterizou alterações marcantes do ponto de vista morfológico (LADDS, 1985; BANKS, 1992). Não foi possível observar alterações degenerativas características no epitélio seminífero e/ou interstício

tais como vacuolização intra-citoplasmática, diminuição do tamanho dos túbulos ou acentuada variação na estratificação de camadas, descamação das células germinativas, presença de células gigantes intratubulares, geralmente formadas a partir da excessiva descamação do epitélio tubular, e picnose de espermatócitos. Algumas alterações degenerativas que predominam no interstício, tais como fibrose, mineralização peritubular ou mesmo tubular, hiperplasia celular intersticial e atividade inflamatória (leve, marcante ou severa) também não foram observadas de modo a caracterizar a preservação do parênquima testicular nos grupos de animais maduros sexualmente, pré-púberes, com bolsa escrotal insulada e não insulada.

No grupo criptorquida, o aspecto histológico apresentou atrofia acentuada de túbulos seminíferos, concreções intratubulares e graus variáveis de hialinização tubular e vascular, compatíveis com a condição, também descrita por Ladds (1985).

Wildeus & Entwistle (1983), Wildeus & Entwistle (1986) e Fonseca & Chow (1995) encontraram alterações histológicas causadas pelo processo de insulação escrotal. A degeneração testicular alterou as células da linhagem espermatogênica, ocorrendo picnoses nucleares e perdas na meiose, levando ao aumento do número de espermátides prematuras no lúmen após o estresse térmico (RAO & BANE, 1985; ENTWISTLE; 1992). Entretanto, os carneiros submetidos à insulação escrotal neste experimento, não apresentaram alteração inflamatória, ou de outra natureza tanto no testículo, quanto na cauda do epidídimo. Mucciolo et al. (1974) avaliaram histologicamente carneiros insulados por 4 dias, encontrando a maioria dos túbulos seminíferos com linhagem espermatogênica, células de Sertoli e Leydig perfeitamente íntegras do ponto de vista morfológico, sendo que apenas alguns túbulos apresentavam epitélio germinativo incompleto, com células gigantes ou desprovidas de núcleo na luz do túbulo seminífero. Pode-se supor que as diferenças entre os vários experimentos sejam devido às diferenças no tempo de insulação escrotal e nas temperaturas alcançadas no escroto dos animais insulados, o que explicaria os diferentes graus de lesão do ponto de vista histológico.

5.3.1. Pigmentos melânicos

Blom e Christensen (1956) reportaram a melanose no epidídimo de touros. A incidência da pigmentação foi maior em bezerros da raça Red Danish comparadas a bezerros da raça Jersey, e aparentemente decresceu com a idade. Ladds et al. (1973) encontraram uma incidência de 21 animais em 550 touros abatidos na Austrália. A pigmentação era unilateral em 17 animais e bilateral em 4 touros, envolvendo o corpo do epidídimo em 13 touros, a cauda em 7 animais, e a cabeça em 1 destes touros. Nos carneiros Suffolk pré-púberes do presente experimento, foi encontrada uma alta frequência (55,9%) desta pigmentação na cauda do epidídimo (Figura 7), o que correspondeu a 60,5% dos animais pré-púberes.

O significado biológico destes achados ainda não está claro. Por hipótese, pode estar relacionado ao período do desenvolvimento reprodutivo, semelhante ao observado em aves onde no período pós-reprodutivo, o pigmento de melanina e lipídios caem para níveis próximos do zero. No retorno da fase reprodutiva, a quantidade de pigmento de melanina, lipídios e colesterol no tecido elevam-se rapidamente atingindo novamente os valores iniciais da fase de reprodução (HORE et al., 1994)

A incidência da pigmentação aparentemente decresceu com o avanço da idade em bovinos (BLOM & CHRISTENSEN, 1956), o que também pode ser sugerido pela ausência de melanose na cauda do epidídimo em animais maduros sexualmente, observada ao analisar-se no estudo com os carneiros do presente experimento.

5.3.2. Histoquímica dos mastócitos

Utilizaram-se vários corantes e protocolos para detecção de mastócitos, contudo, não foi possível identificá-los. Pode ser parte desta explicação, uma desestruturação destas células por alguma interferência desde o momento da colheita

dos testículos e epidídimos até o seu processamento final nas técnicas de preparo das lâminas para análise histológica com perda das proteoglicanas.

Com o uso das técnicas empregadas neste experimento, não foi possível determinar a razão e o momento exato no qual algum mecanismo tenha prejudicado a coloração para análise desta proteoglicana nos mastócitos nas amostras destes animais. As alterações na composição química dos grânulos citoplasmáticos dos mastócitos em diferentes espécies (DVORAK, 1989) pode ser um dos motivos da negativa dos resultados morfológicos. Desta forma, estudos para análise morfológica específica dessas células em ovinos devem ser mantidos para que se tenha um entendimento da resposta biológica no sistema reprodutor masculino desses animais. No entanto, a dosagem de histamina, que será apresentada a frente, assegura a presença do mastócito, ficando as análises posteriores relacionadas somente à concentração deste mediador biológico presente nestas células.

5.4. Concentrações de testosterona e histamina

As dosagens de testosterona plasmática e tecidual tiveram por objetivo principal neste experimento permitir o estabelecimento de correlação com níveis teciduais de histamina no testículo e na cauda do epidídimo.

Ao compararmos os animais Suffolk dos grupos pré-púberes e maduros sexualmente, avaliou-se dois momentos reprodutivos distintos. Houve uma maior concentração de testosterona plasmática e testicular nos animais maduros sexualmente comparada aos pré-púberes (Tabela 10). Entretanto, pode-se observar uma grande variação na concentração de testosterona testicular nos animais pré-púberes. A dispersão destes dados pode estar relacionada às mudanças no padrão de secreção de testosterona do período pré-púbere, uma vez que a histologia testicular permitiu inseri-los na categoria de carneiros pré-púberes. Odell et al. (1990) comentam que na transição do período juvenil em ratos, existe um aumento na capacidade de resposta dos testículos às gonadotrofinas, causados pela diminuição de fatores inibidores e pelo

aumento do número de receptores intratesticulares de LH. Por hipótese, alguns carneiros pré-púberes poderiam estar num momento mais avançado, num início de transição hormonal para a puberdade, ainda não detectada histologicamente.

Sendo a histamina um dos principais mediadores biológicos sintetizados pelos mastócitos e sendo os mastócitos a principal fonte de histamina nos tecidos, existe uma correlação estreita entre o número de mastócitos e a concentração de histamina nos tecidos. Em ratos, mastócitos peritoniais contêm 10 a 30 pg de histamina por célula, enquanto mastócitos de mucosa costumam conter 1 a 3 pg por célula. Mastócitos intrapulmonares e de tecidos linfóides em humanos possuem aproximadamente 3 a 8 pg de histamina por célula (METCALFE et al., 1997). Deste modo, a concentração de histamina pode ser usada como um índice da densidade de mastócitos (PADILLA et al., 1990; LIMA, 1999). Tendo em vista a impossibilidade das contagens fidedignas dos mastócitos, este critério foi usado nas análises deste experimento.

A concentração de histamina no testículo foi inferior comparativamente à da cauda do epidídimo individualmente por grupo (Tabelas 12 e 13). O epidídimo apresentou valor superior ao testículo, com fator de diferença aproximado de 4,3 vezes para os animais Suffolk pré-púberes, 3,3 vezes para os animais Santa Inês controle, 2,9 para os submetidos a insulação escrotal, e 11 vezes para os Santa Inês criptorquídicos. Levando-se em consideração a localização de mastócitos no tecido conjuntivo (THARP et al., 1987), a maior concentração de histamina nos epidídimos pode estar relacionada à maior quantidade de tecido conjuntivo neste tecido, em relação ao testículo, semelhantemente a Nistal et al. (1984) que encontraram maior quantidade de mastócitos no epidídimo, comparado ao testículo.

Correlacionando-se as concentrações de histamina do testículo com as do epidídimo em todos os grupos deste experimento, encontrou-se correlação positiva, ou seja, o aumento da concentração testicular também coincide com o aumento na concentração de histamina na cauda do epidídimo. Nistal et al. (1984) encontraram uma correlação forte entre o número de mastócitos no testículo e no epidídimo,

sugerindo uma evolução paralela do tecido conjuntivo dos dois tecidos.

Nos animais pré-púberes existe uma maior concentração de histamina no testículo comparados aos carneiros maduros sexualmente (Tabela 12), confirmando os dados obtidos através das contagens de mastócitos (NISTAL et al., 1984; SHIRAMA et al., 1988) e concentração de histamina (LIMA, 1999) em diferentes idades ou estágios reprodutivos. Zieher et al. (1971) observaram em hamsters uma considerável diminuição da concentração de histamina intratesticular com o aumento da idade, com máximas concentrações no período neonato e concentrações mínimas na vida adulta.

Lima (1999) verificou no interstício testicular de ratos que os primeiros mastócitos identificáveis aparecem aos 17 a 20 dias de idade, como células imaturas com capacidade proliferativa. A densidade de mastócitos aumentou aos 45 dias de idade, apresentando uma leve redução aos noventa dias de idade. O aumento do número de mastócitos no início da puberdade, bem como a sua redução após a vida adulta também já foram observados no testículo e no epidídimo em humanos (NISTAL et al., 1984), de forma semelhante aos resultados dos carneiros deste experimento quando se utiliza do critério da análise pela concentração de histamina.

Rodrigues et al. (2001)*, utilizando-se da mesma metodologia deste trabalho, encontrou concentrações de histamina testicular, em dois carneiros senis, 10 vezes superiores aos animais maduros sexualmente, com bolsa escrotal insulada e não insulada, e 5 vezes comparados aos pré-púberes e criptorquídicos. Na concentração de histamina na cauda do epidídimo, encontrou-se superioridade aproximada em 1,5 vezes comparados aos pré-púberes, 3 vezes aos com bolsa escrotal insulada e não insulada, e a metade da concentração comparados aos criptorquídicos, sugerindo que ocorre novo aumento de histamina na senilidade, possivelmente relacionado ao quadro degenerativo observados nestes animais senis. Nistal et al. (1997) também relataram uma tendência dos mastócitos aumentarem na cauda do epidídimo em homens acima de 50 anos de idade.

* RODRIGUES, A.L.R. et al. (2001) FMVZ – UNESP - Botucatu – dados não publicados

Existe a tendência da população de mastócitos aumentar durante o desenvolvimento sexual e diminuir após a vida adulta ou durante a senescência, em diversos tecidos. Contudo, as causas dessas variações ainda são desconhecidas. A inter-relação entre o número de mastócitos e o perfil hormonal tem sido freqüentemente citada na literatura. É possível que a testosterona influencie a população de mastócitos em concentrações fisiológicas, não apenas em determinadas situações experimentais, o que justificaria a variação do número de mastócitos em diversos tecidos, uma vez que o perfil de secreção da testosterona varia significativamente durante o desenvolvimento. A variação do número de mastócitos nos órgãos, assim como a variação da concentração de histamina, podem resultar da interação entre fatores estimuladores e inibidores, incluindo os hormônios hipofisários e gonadais (LIMA, 1999).

Na análise das concentrações de histamina do testículo dos carneiros do grupo pré-púbere e maturo sexualmente frente às concentrações de testosterona plasmática, não se encontrou correlação estatisticamente significativa por grupos individualmente. No entanto, ao considerar o conjunto todos os animais ($n=77$), existiu correlação negativa e significativa. Este comportamento também foi encontrado em vários trabalhos, nos quais relataram uma correlação negativa entre a concentração de histamina (LIMA, 1999) ou densidade de mastócitos no tecido testicular e epididimário com a concentração de testosterona no plasma sanguíneo (GAYTAN et al., 1990; WANG et al., 1994).

Ao analisar-se, individualmente ou todos os grupos conjuntamente, as concentrações de histamina do testículo dos carneiros com as concentrações de testosterona tecidual, não se encontrou correlação estatisticamente significativa.

Ao confrontar as concentrações de histamina da cauda do epidídimo (indisponível no grupo maturo sexualmente) com as concentrações de testosterona plasmática, observou-se correlação negativa nos animais pré-púberes, nos criptorquídicos e nos animais insulados, obtendo-se uma maior intensidade nestes

últimos, indicativo de que o aumento da testosterona plasmática esteve correlacionada à diminuição de histamina na cauda do epidídimo.

A concentração de histamina não diferiu entre os grupos com bolsa escrotal insulada e controle (Tabela 13). Uma possível diferença na concentração de histamina poderia estar acontecendo em um momento distinto de 96 horas, somente percebida ao utilizar-se de estudo de cinética da presença de histamina nos diversos momentos. Por outro lado, é possível que no modelo agudo de insulação escrotal, os mastócitos não tomem parte de modo marcante, como acontece em alterações crônicas de fertilidade relatadas (AGARWAL et al., 1987; NAGAI et al., 1992; JEZEK et al., 1999; MEINEKE et al., 2000; YAMANAKA et al., 2000; APA et al., 2002). Neste aspecto, no presente experimento, os criptorquídicos, considerados modelos crônicos e estáveis de degeneração testicular, apresentaram diferença significativa em relação a ambos os grupos controle e sob insulação escrotal, apresentando níveis superiores de concentração de histamina tanto nos testículos quanto na cauda do epidídimo (Tabela 13), indicando uma maior densidade de mastócitos.

No presente experimento, não houve diferença significativa na insulação dos carneiros tanto na concentração plasmática, quanto de testosterona testicular, mesmo correlacionando-se ao fator tratamento tempo. No entanto, nos criptorquídicos, as concentrações de testosterona foram inferiores para a plasmática e superior à tecidual testicular comparadas aos grupos submetido à insulação e não insulado (Tabela 11). WU & MURONO (1994), utilizando-se de um modelo de criptorquidismo para ratos, descreveram um fator mitogênico produzido pelas células de Sertoli que causou nas células de Leydig diferenças morfológicas, aumento no número de células e índice mitótico, e diminuição da produção de testosterona, e de receptores de LH/hCG. *In vitro*, em co-culturas de células de Sertoli e Leydig, o aumento em 4°C levou ao aumento da resposta das células de Leydig ao fator mitogênico secretado pelas células de Sertoli, o que causou mudanças na proliferação e diferenciação das células de Leydig, diminuindo a produção de testosterona e os níveis de receptores de LH nestas

células. Estas observações *in vitro* sugerem que este fator explicaria as mudanças que ocorreram no criptorquidismo experimental *in vivo* (WU & MURONO, 1996). Estes estudos poderiam explicar a menor concentração plasmática dos animais criptorquídeos; todavia, para as teciduais, pode-se supor que devido a uma maior densidade de células de Leydig no tecido comparado ao indivíduo não criptorquida, visto que não existiam células germinativas nestes animais, a quantidade destas células por grama de tecido seria maior (Tabela 11).

Na comparação das concentrações de histamina do testículo com as concentrações de testosterona tecidual ficou evidenciada uma correlação positiva apenas nos animais criptorquídeos, não sendo constatada qualquer correlação nos grupos controle e com bolsa escrotal insulada. Numa condição também patológica em hamsters, relatada por Mayerhofer et al. (1989), na qual a histamina estimulou a produção de testosterona de maneira dose-dependente somente em incubações de testículos atrofiados, porém este efeito estimulador não se manifestou sobre testículos de animais normais gonadalmente ativos.

Diferenças entre os dados deste experimento com a literatura podem ser devido a diferenças na espécie e idade dos animais utilizados, visto que os mastócitos apresentam diferentes características histológicas, bioquímicas e funcionais, dependendo da espécie e do tecido estudado (BARRET et al., 1984; BEFUS et al., 1985; HEAVEY et al., 1988; BARRET & PEARCE, 1993, LIMA, 1999). A heterogeneidade funcional desta célula implica em variações entre as subpopulações na suscetibilidade aos fatores moduladores da atividade celular (BARRET & PEARCE, 1993; KITAMURA et al., 1993). Pode-se supor que populações de mastócitos de espécies diferentes ou de diferentes tecidos na mesma espécie respondam de modo diferente frente ao mesmo estímulo, em razão da heterogeneidade dos mastócitos relatada por vários autores, sendo portanto necessário a continuidade de estudos sobre este tema.

5.5. Concentrações de TNF-alfa e óxido nítrico (NO)

Está bem estabelecido que a função testicular envolve a integração celular de diferentes estímulos, com participação de hormônios, vitaminas, fatores de crescimento secretados localmente ou citocinas, moléculas de adesão célula-célula entre outros (SKINNER, 1991; BENAHMED, 1996).

No presente experimento não foi caracterizada a origem celular do TNF- α e do NO, entretanto, sabe-se que estas substâncias desempenham um importante papel nas funções das células de Sertoli, Leydig e células germinativas, influenciando a espermatogênese (DE et al.,1993; HALES et al.,1999; BENAHMED, 1996; SIGILLO et al.,1999; HOEBEN et al., 1996 FUJISAWA, 2000;).

Um tênue aumento do TNF- α no testículo inflamado e uma relação entre NO e infertilidade em machos causada pela inflamação também foi descrita (WISZNIEWSKA, 1997). Nas concentrações de TNF- α e NO, os resultados do presente experimento não apontam para diferenças significativas entre os grupos com bolsa escrotal insulada e controle (Tabelas 14 e 15), coerentes com as análises histopatológicas, cujos resultados não revelaram qualquer alteração inflamatória nos animais dos dois grupos. Estes achados tanto nos testículos quanto nos epidídimos, foram semelhantes a Gerdprasert et al. (2001).

Nas condições experimentais empregadas, não foi possível evidenciar-se que a insulação tenha promovido qualquer efeito inflamatório nos testículos e epidídimos através das análises comparativas das concentrações de TNF- α e NO

Os valores expressos nas Tabelas 14 e 15 são próximos numericamente ao testículo e epidídimo, contudo, Burnett et al. (1995) relataram que em ratos, a atividade de NOS detectada no testículo é sete vezes maior que a encontrada no epidídimo.

Levando-se em consideração que o maior estoque espermático encontra-se na cauda do epidídimo (AMANN, 1981), houve correlação negativa entre a motilidade espermática às 96 horas e a concentração total de NO na cauda do epidídimo dos animais controle da insulação, dados semelhantes a Zini et al (1995) que relataram que

o NO poderia reduzir a motilidade espermática. No entanto, Revelli et al., (2001) afirmaram que a concentração de nitrito no plasma seminal de homens não teve correlação com a motilidade espermática.

O'Bryan et al. (2000) identificaram uma função regulatória de iNOS no testículo normal, além de sugerir que iNOS mediará danos na inflamação do testículo, apesar dos mecanismos e da importância deste fato ainda não estarem bem definidos, sendo necessário mais estudos. O TNF- α é uma citocina estimuladora da iNOS, que levam à produção de NO (XIE et al., 1992; TAKEICHI et al., 1998). Nos testículos dos animais com bolsa escrotal insulada, foi encontrada uma correlação positiva entre os níveis de TNF- α e NO, sugerindo uma papel importante destes mediadores nos testículos submetidos a condição de estresse térmico pelo calor.

6. CONCLUSÕES:

Conclusões específicas:

- ◆ as técnicas histológicas empregadas não foram capazes de identificar os mastócitos do testículo e cauda do epidídimo;
- ◆ houve inter-relação da melanose no tecido epididimário com período reprodutivo pré-puberdade;
- ◆ houve correlação positiva entre as concentrações de histamina testicular e da cauda do epidídimo, sendo observado nesta, maiores concentrações;
- ◆ na maturidade sexual, existem menores concentrações de histamina no testículo e na cauda epidídimo comparativamente a condição pré-púbere, não ocorrendo correlação das concentrações de histamina com as de testosterona plasmática e tecidual testicular;
- ◆ para o modelo estresse térmico, as concentrações de histamina no testículo e na cauda do epidídimo não foram influenciadas pela insulação escrotal, porém o foram pelo criptorquidismo;

- ◆ ao considerar-se todos os animais estudados, houve correlação negativa entre as concentrações de histamina no testículo e a da testosterona plasmática;
- ◆ a concentração histamina na cauda do epidídimo teve uma correlação negativa com a concentração plasmática de testosterona nos animais pré-púberes, sob insulação escrotal e criptorquídicos;
- ◆ no criptorquidismo, a concentração de histamina no testículo foi correlacionada positivamente com a da testosterona tecidual testicular, sendo que nos grupos maduro sexualmente, pré-púberes, submetido à insulação escrotal e seu controle, nenhuma correlação existiu;
- ◆ a insulação escrotal não influenciou as concentrações totais de fator de necrose tumoral-alfa e óxido nítrico nos testículos e na cauda do epidídimo;
- ◆ nos testículos dos animais insulados, a concentração do fator de necrose tumoral-alfa teve correlação positiva com a de óxido nítrico;
- ◆ nos carneiros adultos, a concentração de óxido nítrico na cauda do epidídimo foi correlacionada negativamente a motilidade espermática.

Conclusão geral:

Pelo fato da concentração de histamina refletir a população de mastócitos no tecido, e diversas técnicas de coloração histoquímica específicas terem sido empregadas sem caracterização destas células, assumiu-se que os mastócitos efetivamente estavam presentes nos tecidos estudados. As concentrações de histamina no testículo e na cauda do epidídimo foram dependentes da condição reprodutiva, sendo superiores na pré-puberdade. Para o modelo estresse térmico, as concentrações de histamina no testículo e na cauda do epidídimo foram maiores no criptorquidismo, não sofrendo influência da insulação escrotal. Ao considerar todos os animais estudados, houve uma correlação negativa entre a concentração de testosterona plasmática com as de histamina no testículo, entretanto, não se constatou individualmente em cada grupo experimental, indicando que além da testosterona, outros fatores podem estar influenciando a concentração de histamina no testículo; e no epidídimo, esta correlação ocorreu individualmente nos grupos estudados. O modelo de insulação 96 horas foi suficiente para causar alterações andrológicas na consistência testicular, nos parâmetros motilidade e defeitos espermáticos menores, porém, não evidenciou se a histamina, testosterona plasmática e tecidual, fator de necrose tumoral-alfa e óxido nítrico estão intimamente envolvidos no mecanismo de resposta ao estímulo térmico agressor.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABBAS AK, LICHTMAN AH & POBER JS. Cytokines. In:_____ **Celular and molecular immunology**. Philadelphia: Sauders, 2000; p.235-269.

AIRE, T.A. The Epididymal region of the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). **Acta Anat.**, v 103, n.3, p. 305-312, 1979.

AMANN, R.P.; LAMBIASE JR, J.T. The male rabbit. Determination of daily sperm production by means of testicular homogenates. **J. Anim. Sci.**, v.28, p.369-374, 1969.

AMANN, R.P. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. **J. Andr.**, v.2, p.37-58, 1981.

APA, D.D., et al. Mast cell and fibrosis on testicular biopsies in male infertility. **Arch. Androl.**, v.48, p.337-344, 2002.

ARIDOR, M.; TRAUB, L.M.; SAGI-EISENBERG, R. Exocytosis in mast cells by basic secretagogues: evidence for direct activation of GTP-binding proteins. **J. Cell Biol.**, v.111, p. 909-917, 1990.

AUSTIN, J.W.; HUPP, E.W.; MURPHREE, R.L. Effect of scrotal insulation on sêmen of Hereford bulls. **J. An. Sc.**, v.20, p.307-310.

*ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação. Referências – Elaboração. Rio de Janeiro, 2002.24p.

BIOSIS. **Serial sources for the BIOSIS previews database**. Philadelphia, 1996. 468p.

BABU RAO, K.; RAO, A. R. Effect of scrotal insulation on ejaculate characteristics in Ongole and crossbred bulls. **Indian Vet. J.**, v.67, p. 627-30, 1990.

BANCROFT, J.D., STEVENS, A. *Theory and Practice of Histological Techniques*. 4ed London. Churchill Livingstone, 1996. 412p.

BANKS, W.J. Sistema reprodutor masculino. In:_____. **Histologia veterinária aplicada**. 2. ed. São Paulo: Manole, 1992. p.546-570.

BARRET, K.E.; METCALF, D.D. Mast cell heterogeneity: evidence and implications. **J. Clin. Immunoll.**, v.4, p.253-261, 1984.

BARRET, K.E.; PEARCE, F.L. Mast cell heterogeneity. In: Foreman, J.C. *Immunopharmacology of Mast Cells and Basophils*. London, Academic Press, 1993. p.29-39.

BARTH, A. D.; BOWMAN, P. A. The sequential appearance of sperm abnormalities after scrotal insulation or dexametasone treatment in bulls. **Can. Vet. J.**, v. 35, p. 93-102, 1994.

BARTH, A.D. Insights to the pathogenesis of sperm abnormalities in bulls. **Rev. Bras. Rep. An.**, v.4 (suplemento), p.1-15, 1993.

BARTH, A.D.; OKO, R.J. *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*. 1ed. Iowa State University Press, 1989. 285p.

BASINI, G. et al. Is nitric oxide an autocrine modulator of bovine granulosa cell function. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.10, p.471-478, 1998.

BEFUS, D.; GOODACRE, R.; BIENENSTOCK, J. Mast cell heterogeneity in man. I- Histologic studies of the intestine rat. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, v.76, p.232-236, 1985.

BENAHMED, M. Male Infertility. - Growth factors and cytokines in the testis. London: Chapman and Hall, 1996, p.55-96.

BERNDTSON, W.E. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. **J. Anim. Sci.**, v.44, p.819-833, 1977.

BEUTLER, B., GRAU, G.E. Tumor necrosis factor in the pathogenesis of infectious diseases. **Crit Care Med.**, v.21, suppl, p. S423-S435, 1993.

BICUDO, S.D. **Estudo da estacionalidade reprodutiva em carneiros Ideal: níveis séricos de testosterona, androstenediona, triiodotironina, tiroxina; biometria testicular; avaliação das características do sêmen e de parâmetros indicativos de adaptação ao clima.** 1999. Tese (Livre-Docência), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

BLANCHARD, T.L. et al. The causes and pathologic changes of testicular degeneration in large animals. **Vet. Med.**, v. 86, p. 531-6, 1992.

BLANCHARD, T.L.; JOHNSON, L. Determination of daily sperm production in stallion testes by enumeration of germ cells in homogenates. **Theriogenology**, v.47, p.655-64, 1997.

BLANCHARD, T.L., VARNER, D.D. Evaluating breeding soundness in stallions. **Equine Pract.**, p.54-63, 1996.

BLAZQUEZ, N.B.; MALLARD, G.J.; WEDD, S.R. Sweat glands of the scrotum of the bull. **J. Rep. Fert.**, v.83, p.673-677, 1988.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defect and a proposal for a new classification. **Nord. Vet. Med**, v.25, p.383-391, 1973.

BLOM, E.; CHRISTENSEN, N.O. Hyppigheden af misdannelser i kØnsorganerne hos tyren belyst ved undersØgelse af i kØnsorganerne hos slagtede tyrekalve. UndersØgelser over patologiske tilstande i testis, epididymis og de accessoriske kØnsorganer hos tyren. III. **Medlemsbl. Dan. Dyrlaegeforen**, v.39, p.635-651, 1956.

BRITO, L.F.C. **Efeito de características morfológicas do escroto, funículos espermáticos e testículos sobre a termorregulação testicular e a produção e qualidade espermática em touros.** 2000. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

BURNETT, A.L.; RICKER, D.D.; CHAMNESS, S.L. Localization of nitric oxide synthase in the reproductive organs of the male rat. **Biol. Reprod.**, v.52, p.1-7, 1995.

BURNETT, F.M. The probable relationship of some or all mast cells to the T-Cell system. **Cell Immunol.**, v.30, p. 358-360, 1977.

BURTON, A.L. Histological studies on developing mas cells. **Anat. Rec.**, v.150, p.265-269, 1964.

CARDOSO, F.M. Capacidade espermatogênica de bovinos. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 6, 1985, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, 1985.

CAYAN, S. et al. Human testicular mast cells and fibrosis in infertile man. **Fertil. Steril.**, v.76, n.3, p.258, 2001.

CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2ed. Belo Horizonte. 49p. 1998.

CHAKRAVARTY, N. Metabolic changes in mast cell associated with histamine release. In: ROCHA E SILVA, M. (Ed.). **Handbook of Experimental Pharmacology**: Histamine II and anti-histaminics: Chemistry, metabolism and physiological and pharmacological actions. New York: Springer Verlag, 1978. v.18, p.93-108.

CHAKRAVARTY, N. The role of plasma membrane Ca^{++} - Mg^{++} activated adenosine triphosphatase of rat mast cells on histamine release. **Acta Pharmacol. Toxicol.**, v.47, p.223-35, 1980.

COLGAN, T. J. et al. Reappraisal of the value of testicular biopsy in the investigation of infertility. **Fertil. Steril.**, v.33, p.56-60, 1980.

COMBS, J.W.; LAGUNOFF, D.; BENDITT, E.F. Differentiation and proliferation of embryonic mast cells of the rat. **J. Cell Biol.** V.25, p.577-592, 1965.

COOK, R.B.; COULTER, G.H.; KASTELIC, J.P. The testicular vascular cone, scrotal thermoregulation and their relationship to sperm production and seminal quality in beef bulls. **Theriogenology**, v.41, p.653-671, 1994.

DACKIW, A.P.B. et al. Mast cell modulation of macrophage procoagulant activity and TNF production. **J. Surg. Res.**, v.59, p. 1-5, 1995.

DARBRE, P. et al. Effect of Estradiol on Human Breast Cancer Cells in Culture. **Cancer Res.**, v. 43, p. 349-354, 1983.

DE, S.K., et al. Expression of tumor necrosis factor alfa in mouse spermatogenic cells. **Endocrinology**, v.133, p.389-396, 1993.

DENADAI, E.R., et al. Tumor of the testicle: a case of melanotic neuroectodermal tumor of infancy. **J. Urol.**, v.136, n.1, p. 117-118, 1986.

DVORAK, A.M. Human Mast Cells. In: _____. Advances in Anatomy, embryology and cell biology. Belfast: s.n., 1989.v.114, p.107.

DVORAK,A.; DVORAK, H.F.; GALLI, S.J. Ultraestructural criteria for identification of mast cells and basophils in human, guinea pigs and mice. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 128, p.S49-52. 1983.

ENTWISTLE, K. Effects of heat stress on reproductive function in bulls. **Bull Fertil.**, Proccedings..., p. 57-63, 1992.

FERREIRA, R. R. et al. Characteristics of the histamine release from hamster cheek pouch mast cells stimulated by Iectins from Brazilian beans and Concanavalin A. **Inflamm. Res.**,

v.45, p.442-7, 1996.

FITZGERALD, J. Applied Reproductive Physiology of the Ram. In: YOUNGQUIST, R.S. Current therapy in large animal theriogenology. Philadelphia: Saunders, 1997. p. 571-574.

FONSECA, V. O.; CHOW, L. A. Características seminais de touros zebus com degeneração testicular transitória. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 47, p. 707-16, 1995.

FORSTERMANN, U. et al. Expression and expressional control of nitric oxide synthases in various cell types. **Adv. Pharmacol.**, v.34, p.171-185, 1995.

FUJISAWA, M. et al. Nitric oxide production of rat Leydig and Sertoli cells is stimulated by round spermatid factor (s). **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.160, p.99-105, 2000.

FRIENDEN, E. LIPNE, H. Endocrinologia bioquímica dos vertebrados. São Paulo: Edgard Blüner, 1975. p.132.

FUTUKO, J.M. Chemistry of nitrit oxide: biologically relevant aspects. In: ____ . Advances in Pharmacology. New York: Academic Press, 1995. v.34, chap.1, p.1-15.

GABALDI, S.H. **Alterações espermáticas e dos níveis plasmáticos de testosterona e cortisol em touros da raça Nelore, submetidos à insulação escrotal.** 2000. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

GALLI, S.J. New insights into “Tlte riddle of the mast cells”: microenvironmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. **Lab. Invest.**, v.62,p.5-T7, 1990.

GALLI, S.J.; DVORAK, A.M.; DVORAK, H.F. Basophils and Mast cells: morphologic insights into their biology, secretory patterns and function. **Prog. Allergy**, v.34, p. 1-141, 1984.

GAYTAN, F. et al. Leydig cell involvement in the paracrine regulation of mast cells in the testicular interstitium of the rat. **Biol. Reprod.**, v.43, p.665-671, 1990.

GERDPRASERT, O. et al. Expression of pro-inflammatory cytokines in the normal and inflamed adult rat testis. **J. Reprod. Immunol.**, v.51, p.65, 2001.

GLASPY, J. et al. Biology and clinical potential of stem-cell factor. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v.38, p.S53-7, 1996.

GOMES, J.C. Agents that inhibit histamine release a review. **Agents Actions**, v.36. p.87-95, 1992.

GOMES, W.R., BUTLER, W.R., JOHNSON, A.D. Effect of elevated ambient temperature on testis and blood levels and in vitro biosynthesis of testosterone in the ram. **J. Anim. Sci.**, v.33, p.804-7, 1971.

GREEN, L.C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [N] nitrate in biological fluids. **Ann. Biochem.**, v.126, p.131-138, 1982.

HALES, D.B.; DIEMER, T.; HALES, K.H. Role of cytokines in testicular function. **Endocrine**, v.10, p.201-217, 1999.

HAFEZ, E.S.E. Reproductive failure in males. In:_____. **Reproduction in farm animals**. 6ed. Philadelphia: Lea & Fediger, 1993 p.287-288.

HEAVEY, D.J. et al. Generation of leukotriene C4, leukotriene B4, and prostaglandin D2 by immunologically activated rat intestinal mucosa mast cells. **J. Immunol.**, v.140, p.1953-1957, 1988.

HIBBS, J.J.; TANTON, R.; VAVRIN, Z. Macrophage cytotoxicity : role for L-arginine deaminase activity and imuno nitrogen oxidation to nitrite. **Science**, v. 235, p. 473-476, 1987.

HOEBEN, E. et al. Cytokines dirived from activated human mononuclear cells markedly stimulate transferrin secretion by cultured Sertoli cells. **Endocrinology**, v.137, p.514-521, 1996.

HORE, B.B., MEHROTRA, P.N., HORE, A. Testicular melanin pigments and the gonadal cycle in a tropical wild passerine bird, *Dicrurus adsimilis*. **Func. Develop. Morph.**, v.4, n.1, p.21-4, 1994.

IKEDA, M. et al. Role of radical oxygen species in rat testicular germ cells apoptosis induced by heat stress. **Biol. Reprod.**, v.61, p.393-399, 1999.

JEZEK D. et al., Mast cells in testicular biopsies of infertile men with ‘mixed atrophy’ of seminiferous tubules. **Androl**. V.31, p. 203-210, 1999.

KASTELIC, J.P.; COOK, R.B.; COULTER, G.H. Contribution of the scrotum and testes to scrotal and testicular thermoregulation in bulls and rams. **J. Rep. Fert.**, v.108, p.81-85, 1996.

- KASTELIC, J. P., COULTER, G. H. Scrotal and testicular thermoregulation in the bull and ram. In: Society for Theriogenology. Florida. 1993. p. 67-72, Proceeding ...
- KEILIN, D.; HARTRE, E.F. Reaction of nitric oxide with haemoglobin and methaemoglobin. **Nature**, v. 548, p. 1937-1945, 1937.
- KHAM, I.A. et al. A dichotomous role for nitric/oxide during acute *Toxoplasma gondii* infection im mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p.1395-1396, 1997.
- KIECHLE F.L.; MALINSKI T. Indirect detection of nitric oxide effects: a review. **Ann. Clin. Lab. Sci.**, v.26, p. 505-11, 1996.
- KIEL, J.P. et al. Role of tumor necrosis factor in preovulatory follicles of swine. **Biol. of Reprod.** v.65, n.3, p.928-935, 2001.
- KITAMURA, Y. et al. Development of Mast Cells and Basophils. In: Foreman, J.C. Immunopharmacology of Mast Cells and Basophils. London, Academic Press, 1993. p.5-12.
- KRONCHE, K.D.; FEHSEL, K.; KOLB-BACHOFEN, V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. **Clin. Exp. Immunol.**, v.113, p.147-156, 1998.
- KUMAGAI, J. et al. Germ cell-specific shock protein 105 binds to p53 in a temperature-sensitive manner in rats testis. **Eur. J. Biochem.**, v.267, p.3073-3078, 2000.
- LADDS, P.W.; PLENNETT, D.; GLAZEBROOK, J.S. A survey of the genitalia of bulls in the Northern Australia. **Aust. Vet. J.**, v.49, p.335-340, 1973.

LADDS, P.W. The Male Genital System. In: JUBB et al. (Eds.): Pathology of Domestic Animals 3rd ed. California: Academic Press, 1985, v.3, p.409-459.

LAGUNOFF, D.; MARTIN, T.W.; READ, G. Agents that release histamine from mast cells. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v.23, p.331 -51, 1983.

LANDRY, Y. et al. The activation of mast cells: molecular targets and transducing processes for antigenic and non-antigenic stimuli. **Bull. Inst. Pasteur**, v.90, p.83-98, 1992.

LEONG, A. S. Y.; MATTHEWS, C. D. The role of testicular biopsy in the investigation of male infertility. **Pathology**, v.14, p.205-10, 1982.

LIEW, F.Y.; COX, F.E.G. Nonspecific defense mechanisms: the role of nitric oxide. **Immunol. Today**, v.12, p.17-211, 1991.

LIMA, A.P. **Mastócitos e histamina associados a esteroidogênese gonadal durante o desenvolvimento sexual e senilidade em ratos machos: efeitos da castração e reposição com testosterona**. 1999. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo.

LONGLEY, J.; DUFFY, T.P.; KOHN, S. The mast cell and mast cell disease. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.32, p.545-61, 1995.

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

MANSOUR, A. A. H. et al. Determination of pregnancy status from blubber samples in minke whales (*Balaenoptera acutorostrata*). **Mar. Mammal. Sci.**, v.18, p.112-120, 2002.

MAYERHOFER, A. et al. Histamine affects testicular steroid production in the golden hamster. **Endocrinology**, v.125, n.4, p.2212-2214, 1989.

MAYO, J.C. et al. Androgen-dependent mast cell degranulation in the Harderian gland of female Syrian hamster: *in vivo* and organ culture evidence. **Anat. Embryol.**, v.196, p.133-140, 1997.

McENTEE, K. **Reproduction pathology of domestic mammals**, California: Academic Press, 1990. p. 224-70.

MCNEIL, H.P. The mast cell and inflammation. **Aust. N.Z. J. Med.**, v.26, p.216-25, 1996.

MEIJER, J.C.; FENTENER VAN VLISSINGEN, J.M. Gross structure and development of reproductive organs. In: KING, G.J. Reproduction in domesticated animals, Wold Animal Science - B9, Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 1993. p. 9-26.

MEINEKE, V. et al. Human testicular mast cells contain tryptase: increased mast cell number and altered distribution in the testes of infertile men. **Fertil. Steril.** v.74, n.2, p. 239-244, 2000.

MENDONÇA, V.O. **Estudo histoquímico da coloração sequencial azul de alcian-safranina em mastócitos de rato**. 1979. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

METCALF, D.D.; BARAM, B.; MEKORI, Y.A. Mast cells. **Physiological Reviews**, v.77, n.4, p.1033-1079, 1997.

MIES FILHO, A. et al. Variação estacional da produção espermática e do perímetro escrotal de ovinos da raça Hampshire Down. **A hora Vet.**, n.73, p.53-57, 1993.

MIES FILHO, A. Reprodução dos animais domésticos e inseminação artificial. 6 ed. v. I e II, Porto Alegre:Editora Sulina S/A, 1987. 2v, 645p.

MILLER, M.J.S.; GRISHAM, M.B. Nitric oxide as a mediator of inflammation? You had better believe it. **Med. Inflamm.**, v.4, p.387-396, 1995.

MINTON, J. E., WETTEMANN, R.P., MEYERHOEFFER, D.C., HINTZ, R.L., TURMAN, E.J. Serum luteinizing hormone and testosterone in bulls during exposure to elevated ambient temperature. **J. Anim. Sci.**, v.53, p. 1551-8, 1981.

MINUCCI, S. et al. 17 β -Estradiol effects on mast cell number and spermatogonial mitotic index in the testis of the frog, *Rana esculenta*. **J. Exp. Biology**, n.278, p.93-100, 1997.

MONCADA, S.; PALMER, R.; HIGGS, E. Nitric oxide physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v.43, p.109-113, 1991.

MOREIRA, E.M.; MOURA, A.A.A.; ARAÚJO, A.A. Efeitos da insulação escrotal sobre a biometria testicular e parâmetros seminais em carneiros da raça Santa Inês criados no estado do Ceará. **Rev. Bras. Zootec**, v.30, n.6, p. 1704-1711, 2001.

MORGAN, J.E. et al. Antagonistic analogs of luteinizing hormone-releasing hormone are mast cell secretagogues. *Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.*, v.80, p.70-75, 1986.

MOWRY, R.W. Revised method producing improved coloration of acidic polysaccharides with Alcian blue 8GX supplied currently. **J. Histochem. Cytochem.**, v.8, p.323-334.

MUCIOLO, R.G., BARNABE, R.C., BARNABE, V.H. Variações no quadro espermático de carneiros submetidos a degeneração testicular experimental. **Rev. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. S. Paulo**, v.11, p.155-177, 1974.

MUROYA, S. et al. Molecular characteristics and site specific distribution of the pigment of the silky flowl. **J. Vet. Med. Sc.**, v.64, n.4, p.391-95, 2000.

NAGAI, T. et al. Testicular mast cell heterogeneity in idiopathic male infertility. **Fertil. Steril.**, v.57, n.6, p.1331-1336, 1992.

NEKOLA, M.V. et al. Use of the cutaneous anaphylactoid test to detect differences in mast cell mediator-releasing activity among LHRH peptides. **Int. Archs Allergy Appl. Immunol.**, v.84, p.316-320, 1987.

NIEDERHEITMANN, C. B. H. **Identificação histoquímica de mastócitos de mesentério de rato durante o processo de maturação.** 1992. Dissertação (Mestrado) da Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

NISTAL, M.; SANTAMARIA, L.; PANIAGUA, R. Mast cells in the human testis and epididymus from birth to adulthood. **Acta. Anat.**, v.119, p.155-169, 1984.

O'BRYAN, M.K. et al. Inducible nitric oxide synthase in the rat testis: evidence for potential roles in both normal function and inflammation-mediated infertility. **Biol. Reprod.**, v.63, p. 1285-1293, 2000.

ODELL, W.D. Sexual maturation in the rat. In: Control of the onset of puberty. Williams & Wilkins, Baltimore, 1990, p.183-210.

OTT, R. S. Breeding soundness examination of bulls. In: MORROW, D.A. **Current therapy in theriogenology: diagnosis, treatment and prevention of reproductive diseases in small and large animals**. 2 ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1986. p. 125-35.

PADILLA, L. et al. Histamine content and mast cells distribution in mouse uterus: the effect of sexual hormones, gestation and labor. **Cell Mol. Biol.**, v.36, n.1, p.93-100, 1990.

PALMER, R.; ASHTON, D.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthetise nitric oxide from L-arginine. **Nature**, v.333, p.664-68, 1988.

PAPA, F.O. et al. Coloração segundo Karras modificada pelo emprego do barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*). **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.40, p.115-123, 1988.

PAYNE, A.P. et al. Mast cells in the hamster Harderian gland: sex differences, hormonal control and relationship to porphyrin. **J. Anat.**, v.135, p.451-461, 1982.

PEARCE, F.L. Calcium and histamine secretion from the mast cell. **Prog. Med. Chem.**, v.19, p.59-109, 1982.

PINEDA, M. H. Male reproduction. In: MC DONALD, L. E. **Veterinary endocrinology and reproduction**. 4.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1989. chap.8, p.261-302.

PROPHET, E.D. et al. Métodos Histotecnológicos. Instituto de Patologia de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP), Washington, 1992.

RAO, A. R., BANE, A. Incidence of sperm abnormalities in infertile bulls with testicular degeneration. **Indian Vet. J.**, v.62, p. 46-9, 1985.

REDDEL, R. R., MURPHY; L. C.; SUTHERLAND, R. L. Factors affecting the sensitivity of T-47 human breast cancer cell to Tamoxifen. **Cancer Res.**, v. 44, p. 2398-2405, 1984.

REICHLIN, S. Neuroendocrine-immune interactions. **N. Engl. J. Med.**, v.329, p.1246-1253, 1993.

REVELLI, A. et al. The concentration of nitrite in seminal plasma does not correlate with sperm concentration, sperm motility, leukocytospermia, or sperm culture. **Fertil. Steril.** v.76, n.3, p.496-500, 2001.

ROSS, A. D.; ENTWISTLE, K. W. The effect of scrotal insulation on spermatozoal morphology and the rates of spermatogenesis and epididymal passage of spermatozoa in the bull. **Theriogenology**, v. 11, p. 111-29, 1979.

SASAKI, T. Light and electron microscopic studies on tissue mast cells in the tongue. **Okajimas Folin Anat. Jpn.**, v. 57, p.129-144, 1980.

SCHIMIDT, G. et al. Histamine stimulates progesterone synthesis and cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate accumulation in isolated preovulatory rat follicles. **Neuroendocrinology**, v.46, p.69, 1987.

SCHIMIDT, G.; OWMAN, C.H.; SJOBERT, N.O. Cellular localization of ovarian histamine, its cyclic variations and histaminergic effects on ovulation in the rat ovary perfused in vitro. **J. Reprod. Fert.**, v.82, p.409, 1988.

SCHIMIDT, G.; OWMAN, C.H.; SJOBERT, N.O. Histamine reduces ovulation in the isolated perfused rat ovary. **J. Reprod. Fert.**, v.78, p.159, 1986.

SCHWARTZ, L.B.; AUSTEN, K.F. Structure and function of the chemical mediators of mast cells. **Prog. Allergy**, v.34, p.271-321, 1984.

SETCHELL, B. P. The mammalian testis.: Cornell Univ. Press, 1978. 450 p.

SETCHELL, B. P. The parkes lecture heat and the testis. **J. Reprod. Fertil.** v.114, p. 179-94, 1998.

SETCHELL, B. P.; VOGLMAYR, J. K.; HINKS, N. T. The effect of local heating on the flow and composition of rete testis fluid in the conscious ram. **J. Reprod. Fertil.**, v. 24, p. 81-9, 1971.

SCHILL, W.B.; SCHINEIDER, J.; RING, J. The use of ketotifen, a mast cell blocker, for treatment of oligo-and asthenozoospermia. **Andrologia**, v.6, n.18, p.570-571, 1986.

SHIRAMA, K.; KOHDA, M.; KOHANO, M. Effects of endocrine glands and hormone replacement on mast cell count of the harderian gland of mice. **Acta Anat.** (Basel), v.131, n.4, p.327-331, 1988.

SHORE, P.A.; BURKHALTER, A.; COHN, J.H. A method for the fluorimetric assay of histamine in tissue. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 127, p. 182-190, 1959.

SIGILLO, F. et al. In vitro regulation of Sertoli cell transferrin expression by tumor necrosis factor- α and retinoic acid. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.148, p. 163-170, 1999.

SKINNER, M.K. Cell-cell interactions in the testis. **Endocrinol. Rev.** v.12, p. 45-77, 1991.

SPICER, S.S. A correlative study of the histochemical properties of rodent acid mucopolysaccharides. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 8, p.8-33, 1960.

STABENFFLDT, G. H.; EDQVIST, L. E. Male reproductive processes. In: SWENSON, M. J.; REECE, W. O. **Dukes' physiology of domestic animais**. Ithaca: Cornell University Press, 1993. chap. 35, p.665-77.

STEEDMAN, H.F. Alcian Blue 8GS: a new stain for mucin. **Quart. J. Micr. Sci.**, v.91, p.477-479, 1950.

SUESCUN, M.O. et al. Involvement of tumor necrosis factor- α in the pathogenesis of autoimmune orchitis in rats. **Biol. Reprod.**, v.68, p.2114-2121, 2003.

SUGARMAN, B.J. et al. Recombinant human tumor necrosis factor- α : Effects on proliferation of normal and transformed cells in vitro. **Science**, v.230, p. 943-945, 1985.

SUNDARAM, K. et al. Antagonists of luteinizing hormone releasing hormone bind to rat mast cells and induce histamine release. **Agents and Actions**, v.25 (3/4), p.307-313, 1988.

TAINSH, K.R.; PEARCE, F.L. Mast cell heterogeneity: evidence that mast cell isolated from various connective tissue locations in the rat display markedly graded phenotypes. **Arch. Allergy Immunol**, v.98, p.26-34, 1992.

TAKEICHI, O. et al. Cytokine regulation on the synthesis of nitric oxide "in vivo" by chorionically infected human polymorphonuclear leucocytes. **Immunology**, v.93, n.2, p.275-280, 1998.

TAS, J. The alcian blue and combined alcian blue-safranina O staining of glycosaminoglycans studied in a model system and in mast cells. **Histochem.**, v.9, p.205-230, 1977.

TERRANOVA, P.F. Potential roles of tumor necrosis factor- α in follicular development, ovulation, and the life span of the corpus luteum. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v.14, n.1, p. 1-15, 1996.

THARP, M.D. et al. Functional heterogeneity of human mast cells from different anatomic sites: in vitro responses to morphine sulfate. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v.79, p.646-653, 1987.

THEOHARIDES, T.C. et al. Synergistic action of estradiol and myelin basic protein on mast cell secretion and brain myelin changes resembling early stages of demyelination. **Neuroscience**, v.57, p.861-871, 1993.

TRACEY, K.J.; CERAMI, A. Tumor necrosis factor: an update review of its biology. **Crit. Care Med.**, v.21, suppl., p.S415-S422, 1993.

TUNÇEL, N. et al. The effect of vasoactive peptide (VIP) on mast cell invasion/degranulation in testicular interstitium of immobilized-cold stressed and B-endorfin-treated rats. **Peptides**, v.17, n.5, p.817-824, 1996.

TUTIDA, L. **Avaliação dos parâmetros de biometria testicular e a produção espermática em carneiros**. 2003. Tese (Doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

UVNAS, B.; THON, I-L. Evidence for enzymatic histamine release from isolated rat mast cells. **Exp. Cell. Res.**, v.23, p.45-57, 1961.

VAN DEMARK, N.L., FREE, M.J. Temperature effects. In: JOHNSON, A. D., GOMES, O.R., WANDEMARK, N.L. **The testis**. New York: Academic Press, 1970. v. 3, p. 233-312.

VEERAMACHANENI, D. N. R. et al. Pathophysiology of small testes in beef bulls: relationship between scrotal circumference, histopathologic features of testes and epididymes, seminal characteristics, and endocrine profiles. **Am. J. Vet. Res.**, v.47, p.1988-1999, 1986.

VLIAGOFTIS, H. et al. Estradiol augments while tamoxifen inhibits rat mast cells

secretion. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, v.98, p.398-409, 1992.

VOGLER, C.J. et al. Effects of scrotal insulation on viability characteristics of cryopreserved bovine semen. **J. Dairy Sci.**, v. 74, p. 3827-35, 1991.

WAITES, G.M.H.; SETCHELL, B.P. Physiology of the mammalian testis. 4ed. Edinburg: Churchill Livingstone, 1990. v.2, p.1-105.

WANG, J. et al. Leukocyte populations of the adult rat testis following removal of the Leydig cells by treatment with ethane dimethane sulfonate and subcutaneous testosterone implants. **Biol. Reprod.**, n.51, p.551-561, 1994.

WILDEUS, S.; ENTWISTLE, K. W. Effects of scrotal insulation and unilateral vasoligation on ejaculate characteristics and sperm reserves in the bull. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 10, p. 11-21, 1986.

WILDEUS, S., ENTWISTLE, K. W. Spermogram and sperm reserves in hybrid Bos indicus X Bos Taurus bulls after scrotal insulation. **J. Reprod. Fertil.**, v. 69, p. 711-6, 1983.

WISZNIEWSKA, B. et al. Inducible nitric oxide synthase in the epithelia epididymal cells of the rat. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.9, p.789-794, 1997.

WU N., MURONO, E.P. A Sertoli cell-secreted paracrine factor(s) stimulates proliferation and inhibits steroidogenesis of rat Leydig cells. **Mol. Cell. Endocrinol.**, n.106, p.99-109, 1994.

WU N., MURONO, E.P. Temperature and germ cell regulation of Leydig cell proliferation stimulated by Sertoli cell-secreted mitogenic factor: a possible role in cryptorchidism.

Androl., v.28, p.247-257, 1996.

XIE, Q. et al. Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. **Science**, v.256, p.225-29, 1992.

YAMANAKA, K. et al. Significance of human testicular mast cell and their subtypes in male infertility. **Human Reprod.** V.15, n.7, p.1543-1547, 2000.

YASUHIKO, N. et al. Nitric oxide oocyte meiotic maturation. **Biol. Reprod.**, v.67, p. 1588-1592, 2002.

ZAR, J. H. Biostatistical Analysis. 2. ed. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1984. 718p.

ZHAO, Y. et al. Macrophages are the major source of tumor necrosis factor- α in the porcine corpus luteum. **Biol. Reprod.**, v.59, n.6, p.1385-1391, 1998.

ZIEHER, L.M. et al. Biogenic amine concentration in testes of rats at different ages. **Endocrinology**, v.88, p.351-354, 1971.

ZINI, A. et al. Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in human testis, epididymis, and vas deferens: a possible role for nitric oxide in spermatogenesis, maturação espermática e programa de morte celular. **Biol. Reprod.**, v.55, p.935-941, 1996.

ZINI, A.; LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Low levels of nitric oxide promote human sperm capacitation *in vitro*. **J. Androl.**, v.16, p.424-431, 1995.

TABELA 16 – Valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios padrão (DP) das temperaturas corpóreas (retal e escrotal) de carneiros da raça Santa Inês com bolsa escrotal não insulada (IC) e insulada (I)

Temperatura (°C)	Momento	Grupo*	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
Retal	0h	IC	38,70	40,20	39,05	39,23	0,54
		I	38,70	39,80	39,15	39,20	0,36
	24h	IC	38,40	39,50	38,70	38,80	0,39
		I	38,30	39,40	39,15	38,98	0,41
	48h	IC	38,30	39,80	38,90	38,95	0,50
		I	38,50	39,40	39,00	38,92	0,33
	72h	IC	38,40	39,80	38,60	38,85	0,55
		I	38,10	39,00	38,90	38,77	0,33
	96h	IC	38,00	40,30	38,50	38,70	0,84
		I	37,90	39,10	38,35	38,37	0,41
Escrotal	0h	IC	34,00	35,00	34,45	34,45	0,41
		I	33,00	34,00	33,50	33,42	0,38
	24h	IC	33,10	34,10	33,35 a	33,47	0,35
		I	34,00	35,20	34,60 b	34,65	0,40
	48h	IC	32,80	34,30	33,60 a	33,57	0,50
		I	34,60	35,80	35,05 b	35,17	0,45
	72h	IC	32,70	34,40	33,95 a	33,77	0,65
		I	35,40	36,20	35,90 b	35,87	0,27
	96h	IC	33,30	35,50	33,65 a	34,00	0,83
		I	35,60	36,70	36,20 b	36,17	0,39

* n = 6/grupo

♦ letras diferentes na mesma coluna expressam diferença significativa para o momento; (Mann-Whitney; p<0,01; temperatura escrotal)

TABELA 17 – Valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios padrões (DP), do volume, motilidade e vigor espermático do ejaculado de carneiros da raça Santa Inês com bolsa escrotal não insulada (IC) e insulada (I).

Parâmetro	Momento	Grupo*	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
Volume (mL)	0h	IC	0,80	1,10	0,95	0,93	0,12
		I	0,50	1,10	0,90	0,88	0,22
	24h	IC	0,60	1,00	0,85	0,85	0,15
		I	0,70	1,60	0,90	0,98	0,34
	48h	IC	0,70	1,00	0,85	0,87	0,12
		I	0,60	1,10	0,70	0,75	0,18
	72h	IC	0,70	1,00	0,75	0,80	0,13
		I	0,50	1,50	0,80	0,93	0,46
	96h	IC	0,50	1,00	0,75	0,75	0,23
		I	0,50	1,70	0,95	1,00	0,48
Motilidade (%)	0h	IC	80,00	90,00	80,00	83,33	5,16
		I	80,00	90,00	85,00	85,00	5,48
	24h	IC	70,00	90,00	75,00	76,67	8,17
		I	80,00	90,00	85,00	85,00	5,48
	48h	IC	80,00	90,00	85,00	85,00	5,48
		I	70,00	90,00	90,00	86,67	8,17
	72h	IC	70,00	90,00	80,00	81,67	7,53
		I	60,00	90,00	80,00	76,67	13,66
	96h	IC	70,00	90,00	80,00 a	81,67	7,52
		I	50,00	70,00	60,00 b	60,00	8,94
Vigor (0-5)	0h	IC	4,0	5,0	4,0	4,2	0,4
		I	4,0	4,0	4,0	4,0	0,0
	24h	IC	3,0	5,0	4,0	3,8	0,8
		I	3,0	4,0	4,0	3,8	0,4
	48h	IC	3,0	5,0	4,0	4,0	0,6
		I	3,0	5,0	4,5	4,3	0,8
	72h	IC	3,0	4,0	3,0	3,3	0,5
		I	2,0	5,0	4,0	3,8	1,0
	96h	IC	3,0	4,0	4,0	3,8	0,4
		I	3,0	4,0	3,0	3,3	0,5

* n = 6/grupo

◆ letras diferentes na mesma coluna expressam diferença significativa para o momento;
(Mann-Whitney; $p=0,005$; motilidade espermática)

TABELA 18 – Valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios padrões (DP), da porcentagem de defeitos espermáticos do ejaculado de carneiros da raça Santa Inês com bolsa escrotal não insulada (IC) e insulada (I).

% Defeitos	Momento	Grupo*	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
Maiores	0h	IC	3,00	13,00	6,00	6,67	3,39
		I	5,00	8,00	6,50	6,33	1,21
	24h	IC	4,00	15,00	6,00	7,33	4,18
		I	4,00	6,00	4,50	4,83	0,98
	48h	IC	4,00	9,00	6,00	6,50	1,76
		I	2,00	19,00	6,50	7,83	6,24
	72h	IC	3,00	12,00	8,50	8,17	3,43
		I	2,00	19,00	7,50	9,83	7,57
	96h	IC	6,00	16,00	8,00	9,33	3,93
		I	3,00	32,00	15,50	16,50	10,67
Menores	0h	IC	0,00	10,00	2,50	3,33	3,67
		I	0,00	7,00	0,50	1,83	2,79
	24h	IC	0,00	9,00	3,00	3,33	3,45
		I	0,00	13,00	2,50	3,50	4,85
	48h	IC	1,00	6,00	2,50	2,83	2,83
		I	0,00	10,00	3,50	4,33	4,33
	72h	IC	2,00	7,00	4,00	4,17	4,17
		I	1,00	16,00	7,00	8,00	8,00
	96h	IC	2,00	6,00	3,00 a	3,50	3,50
		I	3,00	39,00	11,00 b	14,83	14,83
Totais	0h	IC	5,00	16,00	9,00	10,00	4,24
		I	5,00	15,00	7,00	8,17	3,49
	24h	IC	4,00	15,00	11,00	10,67	3,72
		I	6,00	17,00	7,00	8,33	4,27
	48h	IC	7,00	15,00	8,00	9,33	3,14
		I	6,00	19,00	11,50	12,17	4,71
	72h	IC	7,00	18,00	11,50	12,33	4,63
		I	8,00	35,00	13,50	17,83	11,16
	96h	IC	9,00	22,00	11,50 a	12,83	4,88
		I	22,00	42,00	31,00 b	31,33	7,29

* n = 6/grupo

♦ letras diferentes na mesma coluna expressam diferença significativa para o momento;
(Mann-Whitney; $p=0,02$, defeitos menores; $p=0,004$, defeitos totais)

TABELA 19 – Valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios padrões (DP), da concentração espermática do ejaculado de carneiros da raça Santa Inês com bolsa escrotal não insulada (IC) e insulada (I)

Concentração	Momento	Grupo*	Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
sptz totais (x 10 ⁹)	0h	IC	0,42	1,87	1,13	1,13	0,61
		I	0,47	1,50	1,27	1,10	0,42
	24h	IC	0,38	2,85	2,23	1,83	1,02
		I	0,25	4,85	1,39	1,73	1,71
	48h	IC	0,48	3,91	1,85	1,97	1,97
		I	0,21	1,95	0,77	0,93	0,93
	72h	IC	0,16	2,34	1,02	1,08	1,08
		I	0,22	3,18	1,75	1,72	1,72
sptz.mL ⁻¹ (x 10 ⁶)	0h	IC	0,31	3,41	1,86	1,75	1,03
		I	0,33	32,01	1,93	7,74	12,33
	24h	IC	0,46	2,17	1,13	1,22	0,67
		I	0,57	1,75	1,16	1,16	0,42
	48h	IC	0,63	2,85	2,49	2,04	1,00
		I	0,31	3,03	1,36	1,60	1,21
	72h	IC	0,53	3,91	2,32	2,20	1,23
		I	0,30	1,81	1,16	1,17	0,58
	96h	IC	0,23	2,34	1,23	1,25	0,87
		I	0,44	2,39	1,87	1,68	0,69
		IC	0,39	3,41	2,29	2,21	0,95
		I	0,65	5,47	1,84	2,24	1,66

* n = 6/grupo

TABELA 20 –Valores mínimos e máximos, medianas, médias e desvios padrões (DP) dos níveis plasmáticos de testosterona de carneiros da raça Santa Inês com bolsa escrotal não insulada (IC) e insulada (I)

Momento	Grupo*	Testosterona ng.dL ⁻¹				
		Mínimo	Máximo	Mediana	Média	DP
0h	IC	39,41	656,14	306,36	337,11	214,63
	I	150,79	432,64	276,59	278,78	116,91
24h	IC	51,03	391,46	102,72	146,40	125,94
	I	26,30	855,31	85,71	210,01	321,74
48h	IC	14,74	607,22	435,20	332,79	247,19
	I	10,56	739,26	490,04	423,71	260,34
72h	IC	32,30	449,85	128,83	200,59	169,73
	I	101,31	1108,47	361,97	467,79	389,95
96h	IC	51,89	769,67	418,47	435,34	239,04
	I	19,46	432,86	258,03	246,94	163,02

* n = 6/grupo