



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS E
HISTOMORFOMÉTRICAS TESTICULARES
ASSOCIADAS À CONDIÇÃO REPRODUTIVA EM
TOUROS NELORE**

Kethleen Mesquita da Silva

CAMPO GRANDE, MS 2013



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**Características histopatológicas e histomorfométricas testiculares
associadas à condição reprodutiva em touros Nelore**

Histopathological and histomorphometric testicular characteristics associated
with reproductive condition in Nelore bulls

Kethleen Mesquita da Silva

Orientador: Prof. Dra. Karine Bonucielli Brum

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos Eurico dos Santos Fernandes

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Mato Grosso
do Sul, como requisito à obtenção do
título de Mestre em Ciência Animal.
Área de concentração: Saúde Animal.

CAMPO GRANDE, MS 2013

KETHLEEN MESQUITA DA SILVA

**CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS E HISTOMORFOMÉTRICAS
TESTICULARES ASSOCIADAS À APTIDÃO REPRODUTIVA EM TOUROS
NELORE**

Histopathological and histomorphometric characteristics testicular associated with reproductive condition in Nelore bulls

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Mestra em Ciência Animal.

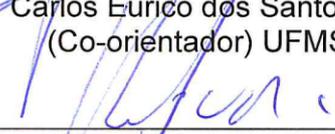
Área de concentração: Saúde Animal

Aprovada em: 24/05/2013

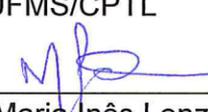
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Carlos Eurico dos Santos Fernandes
(Co-orientador) UFMS



Prof. Dr. Helder Silva e Luna
UFMS/CPTL



Profa. Dra. Maria Inês Lenz Souza
UFMS

AGRADECIMENTOS

Os meus sinceros agradecimentos a Dra. Karine Bonucielli Brum e ao Dr. Carlos Eurico dos Santos Fernandes pelos ensinamentos, paciência e dedicação a mim e ao meu trabalho e também pela amizade construída.

À equipe do laboratório de Patologia pelo conhecimento compartilhado e auxílio durante o experimento.

À minha família, marido e amigos pelo apoio, incentivo e paciência em todos os momentos de dificuldade.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul pelo apoio técnico, administrativo e pessoal.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

Por fim, agradeço a Deus por ter me guiado durante toda essa jornada!

Muito obrigada!

“A persistência é o menor caminho do êxito.”
Charles Chaplin

Resumo

SILVA, K. M. Características histopatológicas e histomorfométricas testiculares associadas à condição reprodutiva em touros Nelore. 2013. 29 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2013.

Resumo: O objetivo desse estudo foi de avaliar aspectos morfológicos, morfométricos e funcionais da espermatogênese com base na condição reprodutiva seminal em touros Nelore. Foram utilizados 25 touros *Bos indicus* (Nelore), os quais foram classificados em aptos (n=10) e inaptos (n=15) à reprodução. Após orquiectomia, fragmentos do testículo direito de cada animal foram processados segundo técnicas de rotina e corados com Hematoxilina e Eosina (HE) e Ácido Periódico de Schiff (PAS). As lâminas foram analisadas em microscopia de campo claro em diferentes aumentos. Os segmentos tubulares foram classificados em quatro níveis (normal, degeneração leve e moderada, degeneração acentuada, e hipoplasia tubular) baseados na organização e arquitetura do tecido tubular. Foi obtida a média da altura do epitélio seminífero, da espessura da túnica própria e do diâmetro tubular dos segmentos e foi registrada a proporção de túbulo seminífero, tecido intersticial, vaso linfático e vaso sanguíneo dos testículos de cada touro. Além disso, quantificou-se a frequência das três classificações do ciclo espermatogênico A, B e C (A=agrupamento dos estágios I,II, e III que compreendem as fases iniciais do ciclo e proliferações mitóticas; B= agrupamento dos estágios V e VI que compreendem as fases intermediárias e intensas mitoses; C= agrupamento dos estágios VI, VII e VIII que compreendem as fases finais e de pós-meioses). Os resultados demonstraram que as alterações de caráter degenerativo nas células germinativas estão associadas a variações nos padrões histomorfométricos incluindo a densidade das estruturas que compõem o parênquima testicular e são mais representativas em touros com baixa qualidade seminal. Além disso, os touros inaptos apresentaram redução no potencial meiótico quando comparados aos touros aptos à reprodução.

Palavras-chave: Bovino. Histopatologia. Morfometria testicular.

Abstract

SILVA, K. M. 2013. Histopathological and histomorphometric testicular characteristics associated with reproductive condition in Nelore bulls. 2013. 29 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2013.

Abstract: The aim of this study was to evaluate morphological, morphometric and functional aspects of spermatogenesis based on seminal reproductive conditions in Nelore bulls. The study used 25 bulls *Bos indicus* (Nelore), which were classified as satisfactory (n=10) and unsatisfactory (n=15) for reproduction. After orchiectomy, fragments of the right testis of each animal were processed according to routine procedures and stained with hematoxylin and eosin (HE) and periodic acid-Schiff (PAS). The slides were analyzed in bright field microscopy at different magnifications. The tubular segments were classified into four levels (normal, mild and moderate degeneration, severe degeneration, tubular hypoplasia) based on the organization and architecture of the tubular tissue. The average height of the seminiferous epithelium, the average thickness of propria tunic and the average tubular diameter were obtained and the proportion of seminiferous tubules, interstitial tissue, lymphatic vessel and blood vessel of each bull testicle were recorded. Furthermore, the frequency of the three classifications of the spermatogenic cycle A, B and C (A = group of stages I, II, and III which comprise the initial phases of the cycle and mitotic proliferation, B = group of stages V and VI, which comprise intermediate phases and intensive mitosis, C = group stages VI, VII and VIII which comprise the final phases and post-meiosis) was quantified. The results showed that the degenerative changes in germ cells are associated with histomorphometric variations, including those in the density of the structures that comprise the testicular parenchyma, and are more representative in bulls with poor semen quality. In addition, the unsatisfactory bulls for reproduction showed reduced meiotic potential compared to that of satisfactory reproductive bulls.

Keywords: Bovine. Histopathology. Testicular morphometry.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	8
1. Estrutura testicular.....	9
2. Espermatogênese.....	10
2.1. Espermiogênese.....	11
2.2. Fatores que controlam a espermatogênese.....	11
3. Alterações testiculares.....	13
3.1. Degeneração testicular.....	14
3.2. Hipoplasia testicular.....	14
4. Histomorfometria testicular.....	15
REFERÊNCIAS.....	16
CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS E HISTOMORFOMÉTRICAS TESTICUARES ASSOCIADAS À CONDIÇÃO REPRODUTIVA EM TOUROS NELORE.....	21
RESUMO.....	21
ABSTRACT.....	21
INTRODUÇÃO.....	22
MATERIAL E MÉTODOS.....	23
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
CONCLUSÃO.....	28
AGRADECIMENTOS.....	28
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
TABELAS E FIGURAS.....	31

INTRODUÇÃO

Na última década o Brasil tornou-se o maior exportador e segundo maior produtor de carne bovina do mundo. No Mato Grosso do Sul, a pecuária de corte foi responsável por aproximadamente 10,0% do produto interno bruto, com perspectivas promissoras para os próximos anos (Mato Grosso do Sul, 2010). Uma parcela importante desses resultados refere-se ao emprego de tecnologias voltadas à eficiência reprodutiva dos rebanhos, incluindo o manejo sanitário, nutricional e, especialmente pelos avanços nos métodos de seleção por aptidão reprodutiva.

Embora a busca por novas tecnologias para maximizar o potencial reprodutivo dos animais esteja em constante avanço, uma importante fonte de prejuízo na pecuária de corte ainda é o descarte de reprodutores por baixa qualidade do sêmen. No Mato Grosso do Sul, esses índices variam entre 15 a 30% em touros Nelore (Nogueira et al., 2006) e podem ser superiores a 35% em animais de genótipo cruzado *Bos indicus* x *Bos taurus* em outras regiões do Brasil (Moraes et al., 1998). Neste sentido, um problema importante ainda é o tempo de permanência desses touros no rebanho assim como a capacidade de recuperação ou reversão do quadro seminal. Estima-se que aproximadamente 43,0% dos touros descartados apresentem grau avançado de lesões degenerativas e hipoplásicas testiculares (Fernandes et al., 2010).

A redução dos padrões qualitativos seminais está diretamente associada às condições da espermatogênese, que por sua vez, responde às variações endócrinas e estruturais do tecido testicular. Além disso, a produção dos espermatozoides depende de uma coordenada divisão celular mitótica das espermatogônias e meiótica dos espermatócitos, originando as espermátides, após sua diferenciação. Erros nas divisões mitóticas ou meióticas durante a espermatogênese ocorrem com frequência nos bovinos como reflexo da degeneração das células germinativas, reduzindo a produção espermática e aumentando o percentual de células anormais (Johnson et al., 2000; Hoflack et al., 2008).

Neste contexto, a avaliação histológica torna-se um instrumento útil que permite quantificar e qualificar a espermatogênese dos animais. A quantificação pode ser estimada por análises morfométricas de diferentes medidas, cujo objetivo é comparar mudanças estruturais em células e tecidos, além da densidade de certas estruturas parenquimatosas (Micklem & Sandersons, 2001). Por outro lado, as análises qualitativas das estruturas testiculares, sistematizadas com base na histopatologia, podem fornecer elementos importantes para o

estudo da função testicular trazendo novos subsídios para a fisiopatologia da subfertilidade em bovinos.

O objetivo desse estudo foi avaliar aspectos morfológicos, morfométricos e funcionais da espermatogênese com base na condição reprodutiva seminal em touros Nelore.

1. Estrutura testicular

Os testículos consistem de duas glândulas (cada qual suspensa dentro da bolsa escrotal por um cordão espermático e pelo músculo cremáster externo) e desenvolvem-se retroperitonealmente na parede dorsal da cavidade abdominal. No desenvolvimento fetal eles migram e alojam-se dentro da bolsa escrotal, ficando suspensos na extremidade do cordão espermático. Durante a migração cada testículo arrasta consigo um saco de membrana serosa, a túnica vaginal, derivada do peritônio. Essa túnica consiste em uma camada parietal exterior e uma camada visceral interna, que recobrem a túnica albugínea nas porções laterais e anterior do testículo (Junqueira & Carneiro, 2008).

O escroto junto com a túnica dartos, os músculos cremasteres e as artérias e veias testiculares tem como função a nutrição e oxigenação celular, além da regulação da temperatura testicular (Polguy et al., 2010) que deve permanecer de 4,0 a 5,0°C mais baixa que a temperatura corpórea (Kastelic et al., 1996).

Em touros adultos Nelore, os testículos medem em média de 10-12 cm de comprimento, 6-8 cm de largura e peso médio de 250-300 g (Constantinescu, 2007). No entanto, há uma grande variação entre indivíduos, especialmente pela idade e peso corporal.

Histologicamente, o tecido testicular pode ser dividido em tubular e intersticial. O tubular é constituído pelo epitélio seminífero que apresenta-se enovelado e comporta as células das linhagens germinativas e células de Sertoli. As células de Sertoli, através de junções de oclusão, dividem o epitélio seminífero em dois ambientes: o ambiente basal, onde localizam-se as espermatogônias e os espermatócitos primários na fase inicial da prófase meiótica (pré-leptótenos), e o ambiente adluminal, no qual se encontram os espermatócitos primários a partir da fase de leptóteno, espermatócitos secundários e espermátides. Desta forma, o ambiente adluminal está totalmente sob o controle das células de Sertoli, propiciando um microambiente isolado e protegido da ação do sistema imune, essencial para o desenvolvimento do processo espermatogênico (Russell et al., 1990; Setchell, 1991; Sharpe, 1994). No interstício tubular, encontram-se as células de Leydig (produtoras de andrógenos),

vasos sanguíneos, vasos linfáticos, fibroblastos e terminações nervosas (Rodrigues & Favaretto, 1999).

Circundando externamente os túbulos seminíferos, encontra-se a túnica própria a qual consiste de uma lâmina basal, revestida por um feixe multilaminar fusiforme interligado às fibras colágenas e elásticas, as células mióides ou peritubulares que estão relacionadas à contração e adaptação tubulares frente às variações do tecido intersticial. A túnica própria compreende a barreira hematotesticular (Russel et al. 1990; Trainer, 2007).

O testículo possui basicamente duas funções, uma exócrina, relativa à espermatogênese e a outra endócrina, relativa à resposta hormonal responsável pela diferenciação sexual e pelas características sexuais secundárias (Varner & Johnson, 2007).

2. Espermatogênese

A espermatogênese é essencial para fertilidade do macho, propiciando a perpetuação e diversidade genética da espécie. Esse processo ocorre nos testículos, começando na periferia e progredindo em direção à luz tubular, e envolve uma série complexa de divisões e diferenciações celulares onde células diplóides (espermatogônias) diferenciam-se em uma célula haplóide (espermatozoide) (Setchel, 1978).

De forma geral, a espermatogênese divide-se em três fases: espermatocitogênese, meiose e espermiogênese (Johnson et al., 2000) e no touro duram em média 21, 23 e 17 dias, respectivamente, totalizando 61 dias (Amann, 1970).

A espermatocitogênese é a fase onde ocorre a multiplicação mitótica das espermatogônias A1, resultando em células mais diferenciadas, denominadas A2, A3, In, B1 e B2 (Berndston & Desjardins, 1974). Posteriormente, as espermatogônias do tipo B2, transformam-se em espermatócitos primários, que sofrem divisões meióticas, gerando os espermatócitos secundários. Estes dividem-se novamente resultando na formação de células chamadas espermátides, as quais sofrem uma série de modificações estruturais e de desenvolvimento dando origem aos espermatozoides, processo esse chamado de espermiogênese (Hafez & Hafez, 2004).

Em touros Nelore, Cardoso & Godinho (1983) analisaram a forma e a posição dos núcleos espermáticos e a presença de divisões meióticas em cortes transversais de túbulos seminíferos e, com base nesses critérios classificaram o ciclo espermatogênico em oito estágios de desenvolvimento. Neste sentido, Russel et al. (1990) salientaram que a divisão do ciclo espermático em muitos estágios, apenas traz benefícios para uma pesquisa de extremo

detalhe e que, em algumas circunstâncias, pode ser prudente agrupar alguns estágios, visando facilitar as análises.

A morfologia espermática expressa a dinâmica das transformações que ocorrem ao longo da espermatogênese e trânsito epididimal. Variações no formato, compactação e estrutura nucleares no espermatozóide decorrem das linhagens celulares afetadas no túbulo seminífero. Espermátocitos secundários e espermátides são particularmente mais sensíveis, enquanto as espermatogônias são mais resistentes à insulação (Setchel, 1978). Portanto, a intensidade e as diferenças esperadas no espermiograma estão na dependência da fase do ciclo espermatogênico afetada.

2.1. Espermio gênese

Embora todas as etapas sejam importantes para a formação da célula espermática, a espermio gênese é a mais complexa, uma vez que envolve o reordenamento das organelas, formação acrossomal, migração mitocondrial e formação da peça intermediária e cauda, além da organização e compactação da cromatina nuclear (Russel et al., 1990). As espermátides caracterizam-se por núcleo esférico coberto por citoplasma, com destaque para o complexo de Golgi, mitocôndrias e centríolo. Pequenos corpúsculos, referenciados por grânulos pró-acrossômicos, fundem-se para formar um simples grânulo maior, o qual torna-se estritamente aderido à superfície nuclear (Fawcet, 1970). Posteriormente, este grânulo expande-se ao longo do núcleo, dando origem ao sistema acrossomal, cuja função primordial é a secreção de material glicoprotéico. Enquanto o sistema acrossomal migra para um pólo do núcleo, os centríolos, intimamente ligados à membrana nuclear, migram em direção oposta dando origem ao flagelo ou cauda espermática. Em seguida, o núcleo gira e o sistema acrossomal orienta-se em direção à membrana limitante do túbulo seminífero. Esta reorientação é acompanhada pelo deslocamento do núcleo para a periferia do citoplasma. Após essa importante etapa, a cromatina nuclear começa a condensar e torna-se mais cromofílica (Fawcet, 1970; Russel et al., 1990).

2.2. Fatores que controlam a espermatogênese

Entre o tecido intersticial e o interior dos túbulos seminíferos, existe uma barreira denominada hematotesticular, formada pelas junções ocludentes das células de Sertoli e a

barreira de células mióides. Assim, o controle de qual substância atravessa o epitélio, da porção basal para a adluminal é realizado por essa barreira (Junqueira & Carneiro, 2008), sendo que, na espécie bovina a camada de células mióides não é bem desenvolvida, o que pouco contribui para permeabilidade vascular (Hafez & Hafez, 2004).

As função testicular normal requer estimulação hormonal pelas gonadotrofinas LH e FSH que por sua vez, são controladas por secreções pulsáteis do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) do hipotálamo. O LH estimula as células de Leydig a produzir andrógenos, principalmente testosterona. Os andrógenos são secretados na corrente sanguínea onde provocam o desenvolvimento das características sexuais secundárias do macho, o desenvolvimento e a manutenção do trato reprodutivo masculino e suprimem a secreção de GnRH, LH e FSH por retroalimentação negativa sobre as hipófise e o hipotálamo. A testosterona também é secretada dentro do túbulo seminífero, onde grande parte é convertida em diidrotestosterona e uma certa quantidade é convertida em estrógeno. Atua principalmente sobre a célula de Sertoli, sendo necessária para manutenção da espermatogênese. (Hafez & Hafez, 2004; Junqueira & Carneiro, 2008).

O FSH, por sua vez, estimula as células de Sertoli a produzir e liberar inibina, ativina e a proteína transportadora de andrógenos (ABP), esta última, forma um complexo com andrógenos e é transportada com os espermatozoides para o epidídimo que necessita de níveis altos de andrógenos para realizar sua função normal. A inibina secretada na corrente sanguínea tem ação de retroalimentação negativa sobre a secreção de FSH (Hall, 1994; Hafez & Hafez, 2004).

No interstício e no epitélio germinativo estão presentes, além da regulação endócrina, outros níveis de interação entre células, mediante comunicação parácrina e autócrina. Mecanismos parácrinos ocorrem no interstício entre células imunes, fibroblastos e Leydig, entre células intersticiais e peritubulares, entre células mióides e de Sertoli, entre células de Sertoli e germinativas e essas últimas entre si. (Gupta, 2005).

Adicionalmente, moléculas de sinalização intercelular denominados fatores de crescimento têm sido verificados em testículos de ratos recém nascidos e pré-púberes e também participam na regulação da puberdade e desenvolvimento da espermatogênese, uma vez que estes fatores são produzidos pela ativação de determinados genes, que estimulam a proliferação celular, meiose e diferenciação, além de atuarem no controle da puberdade e espermatogênese (Levine, 2000).

Dentre o conjunto de moléculas que se expressam ou atuam diretamente no epitélio seminífero destacam-se o TGF (*transforming growth factor*) α e β . O TGF α é um polipeptídeo

membro da família EGF (*epidermal growth factor*) (Gnessi et al., 1997). Uma variedade de membranas basais, proteínas da matriz extracelular, fatores ativadores do plasminogênio e fatores de coagulação possuem domínios para TGF α . No rato, no camundongo e no homem o TGF α tem sido associado ao início da puberdade para suportar o crescimento ativo de células somáticas no testículo (Itman et al., 2006). Na espermatogênese TGF α expressa-se nas células mioídes, de Leydig e de Sertoli, especialmente no período pré-puberal e é um importante fator na regulação do crescimento embrionário do testículo (Gupta, 2005).

Em 2006, Horn et al. realizaram estudos imuno-histoquímicos em testículos de bovinos e demonstraram que as únicas células germinativas do epitélio seminífero que expressam TGF α são as espermatogônias. As células em fase de pré-leptóteno na prófase meiótica não expressaram este fator. Houve expressão de TGF α no citoplasma das células de Sertoli, mais fortemente nos túbulos degenerados, achados que estão em concordância com os de Nakazumi et al. (1996), os quais encontraram em humanos, maior expressão de TGF α no citoplasma das células de Sertoli de pacientes com distúrbios na espermatogênese. Este fato poderia estar relacionado a um efeito compensatório na expressão de TGF α , ou inapropriada inibição deste fator, em virtude de um desajuste local no epitélio seminífero.

3. Alterações testiculares

Diversas alterações clínico-patológicas têm sido identificadas no aparelho reprodutivo do touro e geralmente estão associadas à redução da fertilidade de forma temporária ou definitiva. O impacto maior dessas alterações incide sobre a função testicular, afetando diretamente a espermatogênese e, portanto, modificando os padrões seminais e possivelmente comportamentais. A degeneração e a hipoplasia testicular ainda constituem as principais patologias causadoras de infertilidade ou subfertilidade no touro (Foster, 2007), em contraste com processos como a orquite, a epididimite e as neoplasias que são pouco encontradas em touros de corte (Kennedy et al., 2002)

Fernandes et al. (2010) observaram 18,6% de descarte em touros com, no mínimo, uma alteração no aparelho reprodutivo associada à baixa qualidade seminal. Os resultados mostraram ainda que 89,0% dos touros inaptos apresentavam processo degenerativo testicular, sendo que destes, 41,4% e 35,7% apresentavam grau leve ou moderado, respectivamente, mantendo características seminais insatisfatórias. Além disso, 7,0% dos touros apresentaram evidências histológicas de hipoplasia gonadal.

3.1. Degeneração testicular

Sumariamente, degeneração é caracterizada por aumento da perda de células germinativas com possível acúmulo destas células no lúmen tubular, adelgaçamento do epitélio seminífero e hipoespermatogênese. Conforme o processo degenerativo avança, pode haver perda de todas as células e espessamento da membrana basal. Estas alterações histológicas são acompanhadas por reduções óbvias na qualidade do sêmen, levando ao aumento da proporção de anormalidades morfológicas e diminuição da motilidade, finalmente resultando em azoospermia no caso de degeneração extrema (Siew et al.,1977; Foster & Ladds, 2007).

Em casos muito avançados, há presença de células gigantes e vacúolos podem ser vistos em áreas nas quais houve necrose de células germinativas (McEntee, 1990). Segundo Rao et al. (1986), o processo degenerativo ocorre em diversos pontos do epitélio seminífero, atingindo diferentes segmentos e pode variar desde a ausência de lumen, hiperplasia de células de Leydig, com a presença apenas da membrana basal até a completa calcificação epitelial.

Nos processos degenerativos, macroscopicamente, os testículos diminuem em volume. Na fase inicial do processo, tornam-se macios, flácidos e a superfície de corte mostra-se pálida. Nos processos crônicos, os testículos tornam-se mais firmes à palpação e, frequentemente apresentam focos de calcificação junto ao mediastino (McEntee, 1990). Porém, diversas causas podem ser atribuídas às degenerações testiculares e nem sempre são diagnosticadas ao exame clínico (Foster & Ladds, 2007).

Geralmente esse processo ocorre devido à influência externa ao testículo e pode ser uni ou bilateral. Embora muitas vezes as lesões sejam temporárias (reversíveis), aquelas que afetam as camadas mais profundas do epitélio seminífero tendem a ser irreversíveis, pois afetam diretamente as espermatogônias e, portanto, impedem a reposição continuada das células germinativas (Foster, 2007).

3.2. Hipoplasia testicular

Hipoplasia testicular é o subdesenvolvimento congênito das gônadas, caracterizado por baixo número de células germinativas nos túbulos seminíferos. É uma anomalia

hereditária causada por um par de genes recessivos de penetrância incompleta (Langerlöf, 1934).

A hipoplasia tem caráter irreversível e microscopicamente pode ser dividida em leve, moderada e acentuada, e uni ou bilateral (Pimentel, 2001). Nos casos leves e moderados, as lesões tubulares, como perda das células germinativas e vacuolização são semelhantes às encontradas na degeneração, porém, geralmente não há espessamento da lâmina basal e fibrose intersticial. Nos casos severos ou acentuados, os túbulos apresentam-se com diâmetro menor e delineados por células de Sertoli e às vezes apresentam espermatogônias que não mostram atividade mitótica (McEntee, 1990; Foster & Ladds, 2007). A perda das células germinativas é amplamente variável nessa patologia. A maioria dos espermátócitos primários apresentam núcleos picnóticos em túbulos com a presença de espermátides gigantes desprendidas no lúmen. Podem ser observadas células de Sertoli contendo material eosinofílico citoplasmático. Em alguns casos há notada infiltração linfocitária adjacente aos túbulos com maior degeneração nas células germinativas (Settergren & McEntee, 1992)

4. Histomorfometria testicular

A análise de imagem é utilizada em histopatologia para obter-se dados precisos, mediante mensuração e contagem, sendo que as mensurações de imagens microscópicas são tão antigas quanto o próprio microscópio. Informações importantes com implicações diagnósticas e prognósticas podem ser obtidas por meio da avaliação morfométrica de células e componentes teciduais. A morfometria nuclear estuda alguns parâmetros do núcleo como tamanho, forma e padrão da cromatina. Essas características são importantes na medicina, por exemplo, para diferenciar células malignas das não malignas. Com base nessas diferenças, a morfometria é uma técnica que pode ser utilizada para aprimorar os parâmetros diagnósticos e fornecer fatores prognósticos confiáveis (Andrea et al., 2008).

No tecido testicular, as medidas morfométricas são empregadas com a finalidade de se avaliar a proporção dos elementos que constituem o parênquima testicular, bem como índices quantitativos de produção espermática associados ao desenvolvimento das células que constituem o epitélio seminífero. Mensurações do diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero fornecem dados relevantes para a avaliação da eficiência espermatogênica, embora haja grande variação no número e nas dimensões (diâmetro e comprimento) dos túbulos seminíferos entre diferentes espécies de mamíferos (Berndson, 1977; Russel et al., 1990).

Atualmente, as análises histomorfométricas são empregadas em imagens captadas digitalmente facilitando a criação e o armazenamento de um banco de diferentes categorias de medidas nos tecidos biológicos (Micklethwait & Sandersons, 2001). As imagens digitais são representadas por uma matriz, cujos elementos são agrupados em pixels (*picture elements*). Os pixels representam a unidade fundamental de formação de uma imagem. A partir dele, formam-se grupos distintos de imagens que podem ser processadas por meio de mensurações lineares, contagem da área e volume, determinação da forma, além de mensurações mais complexas e multiparamétricas (Oberholzer et al., 1996; Rashbass, 2000).

As vantagens da mensuração das estruturas biológicas na histopatologia e na citopatologia incluem os seguintes aspectos: diminuição da variabilidade na quantificação dos aspectos celulares e teciduais; promoção de uma escala numérica e reproduzível dos aspectos qualitativos; aumento da sensibilidade na detecção de alterações mínimas; avaliação dos efeitos de diferentes métodos de processamento histológico; emprego no controle de qualidade; determinação da forma e tamanho-padrão para ensino e diagnóstico e maximização como ferramenta de pesquisa (Hamilton & Allen, 1995; True, 1996).

Diversas espécies tem sido usadas como modelo no emprego da histomorfometria testicular, como ratos albinos normais em várias idades (Miraglia et al., 1990), ratos adultos tratados com diferentes doses de ivermectina (Moura et al, 2006), cães e gatos submetidos à castração (Hoshino et al., 2002), Anuras durante o seu ciclo reprodutivo (Santos & Oliveira, 2007), ovinos tratados com fluoreto de sódio (Filappi et al., 2008), camundongos suplementados com geléia real (Morais et al., 2009), cachorros-do-mato (Caldeira et al., 2010), touros Nelore com testículos de diferentes formatos (Ferraz, 2011) e cabritos alimentados com óleo de licuri (Barbosa et al., 2012).

REFERÊNCIAS

- AMANN, R.P. Sperm production rates. In : Johnson, A.D., Gomes, W.R & Vandemark, N.L. (Eds.) **The testis**. New York and London: Academic Press, v.1, p. 433-482, 1970.
- ANDREA, C. E.; TORRES, L.F.B.; ALVES, M.T.S. Análise da morfometria nuclear: descrição da metodologia e o papel dos *softwares* de edição de imagem. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 44, n.1, p. 51-57, 2008.
- BARBOSA, L.P.; OLIVEIRA, R.L.; SILVA, T.M.; JESUS, I.B.; GARCEZ NETO, A.F.; BAGALDO, A.R. Morfometria testicular de caprinos alimentados com óleo de licuri (*Syagrus coronata*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol.64, n.4, 2012.

BERNDSTON, W.E.; DESJARDINS, C. The cycle of the seminiferous epithelium and spermatogenesis in the bovine testis. **American Journal of Anatomy**, v. 140, p. 167-179, 1974.

BERNDSTON, W. Methods for Quantifying Mammalian Spermatogenesis: a Review. **Journal of Animal Science**, v. 44, n. 5, p.818-833. 1977.

CALDEIRA, B.C.; PAULA, T.A.R.; MATTA, S.L.P.; BALARINI M.K.; CAMPOS, P.K.A. Morfometria testicular e de túbulos seminíferos do cachorro-do-mato (*Cercopithecus thomasi*, Linnaeus, 1766) adulto. **Revista Ceres**, v. 57, n.5, p. 569-575, 2010.

CARDOSO, F.M.; GODINHO, H.P. Cycle of the seminiferous epithelium and its duration in the zebu, *Bos indicus*. **Animal Reproduction Science**, v.5, p.231-245, 1983.

CONSTANTINESCU, G.M. **Comparative Reproductive Biology**. 1ªed. Blackwell Publishing., 33p., 2007.

FAWCET, DW. A comparative view of sperm ultrastructure. **Biology of Reproduction**, v. 2, p. 90-127, 1970.

FERNANDES, C.E.; ZART, A.L.; MESQUITA, K. Alterações clínico-genitais e histopatologia testicular em touros de corte no Mato Grosso do Sul. VI Encontro Nacional de Diagnóstico Veterinário – ENDIVET – Campo Grande – MS. *Anais...* Interbio, v.4, n.1, p. 87. 2010.

FERRAZ, H.T. Histomorfometria testicular e sua associação com a qualidade seminal em machos Nelore. Tese de doutorado. Universidade Federal de Goiás, Goiânia- GO, 2011.

FILAPPI, A.; PRESTES, D.; ROCHA, R.; SCHOSLLER, D. R.; BONDAN, C.; BRAGANÇA, J. F.; CECIM, M. Qualidade seminal e histomorfometria dos órgãos reprodutivos de ovinos tratados com fluoreto de sódio. **Ciência Rural**, v. 38, n.9, p.2561-2566, 2008.

FOSTER, R.A.; LADDS, P.W. Male Genital System. In.: MAXIE, M.G. Jubb, Kenndey and Palmer's. **Pathology of Domestic Animals**. Elsevier-USA, 5a ed., v. 3, p. 565-619, 2007.

FOSTER, R.A. Male reproductive system. In.: McGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. **Pathology Basis Veterinary Disease**. 4ª ed., Mosby Elsevier, MI, USA. p. 1317-1348, 2007.

GNESSI, L.; FABBRI, A.; SPERA, G. Gonadal peptides as mediators of development and functional control of the testis: an integrated system with hormones and local environment. **Endocrine Reviews**, v. 18, p. 541-609, 1997.

GUPTA G.S. Non-steroidal signal molecules in spermatogenesis. In.: **Proteomics of spermatogenesis**. Springer Science, USA, p. 47-76, 2005.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. 7ª Ed. São Paulo: Manole, p.33-107, 2004.

HALL, P. F. Testicular steroid synthesis: organization and regulation. In: Knobil E, Neill J, editors. **The physiology of reproduction**. v. 1. New York: Raven Press, p. 1335-1362, 1994.

HAMILTON, P.W., ALLEN, D.C. Morphometry in histopathology. **Journal of Pathology**, v. 175, p. 369-379, 1995.

HOFACK, G., VAN DEN BROECK, W., MAES, D., VAN DAMME, K., OPSOMER, G., L. DUCHATEAU, L., DE KRUIF, L., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., VAN SOOM, A. Testicular dysfunction is responsible for low sperm quality in Belgian Blue bulls. **Theriogenology**, v. 69, p. 323–332, 2008.

HORN, M.M.; MORAES, J.C.F.; EDELWEISS, M.I.A. Análise da expressão de TGF α (Transforming Growth Factor Alpha) nas células germinativas e a frequência de células de Sertoli em touros de raças sintéticas com alteração na qualidade seminal. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 43, n. 4, p. 510-517, 2006.

HOSHINO, P.; NAKAGHI L.S.O.; PACHECO, M.R.; LUI, J.F., MALHEIROS, E.B. Morfometria dos túbulos seminíferos e ductos epididimários de cães e gatos provenientes de cirurgia de castração. **Biotemas**, v. 15, n.1, p.97-112, 2002.

ITMAN, C.; MENDIS, S.; BARAKAT, B.; LOVELAND, K.K. All in the family: TGF-b family action in testis development. **Reproduction**, v. 132, p. 233-246, 2006.

JOHNSON, L.; VARNER, D.D.; ROBERTS, M.E.; SMITH, T.L.; KEILLOR, G.E.; SCRUTCHFIELD, W.L. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p.471–480, 2000.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.414-430, 2008.

KASTELIC J.P., COOK R.B., COULTER G.H. & SAACKE R.G. Insulating the scrotal neck affects semen quality and scrotal/testicular temperatures in the bull. **Theriogenology**, v.45, p.935-942, 1996.

KENNEDY, S.P.; SPITZER, J.C.; HOPKINS, F.M.; HIGDON, H.L.; BRIDGES, W.C. Breeding soundness evaluations of 3648 yearling beef bulls using the 1993 Society for Theriogenology guidelines. **Theriogenology**, v.58, p. 974-961, 2002.

LAGERLÖF, N. Morphological studies on the changes in sperm structure and in the testes of bulls with decreased or abolished fertility. **Acta Pathologic Microbiological Scandinavian**, v. 19, p. 245-66, 1934.

LEVINE, E. et al. Role of transforming growth factor alpha and the epidermal growth factor receptor in embryonic rat testis development. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 477-490, 2000.

MATO GROSSO DO SUL, 2010. Secretaria de Estado de Meio Ambiente, do Planejamento, da Ciência e Tecnologia-SEMACE. Campo Grande, MS: A Secretaria. Disponível em: <http://www.semace.ms.gov.br/control/ShowFile.php>. Acesso em 07 fev. 2012.

MCENTEE, K. **Reproductive pathology of domestic animals**. Academic Press, San Diego, CA. 401 p., 1990.

MICKLEM, K., SANDERSONS, J. Digital imaging in pathology. **Current Diagnostic Pathology**, v. 7, p. 131 -140, 2001.

MIRAGLIA, S.M.; HAYASHI, H.; GOLDFEDER, E. M. Histomorfometria dos testículos de ratos albinos normais em várias idades. **Revista Brasileira de Ciências Morfológicas**, v.7, n.1, p.8-15, 1990.

MORAES, J.C.F.; HORN, M.M.; ROSADO JR., A.G. Exame andrológico em touros: qualidade dos indicadores da aptidão reprodutiva em distintos grupos raciais. **Ciência Rural**, v. 28, n. 4, p. 647-652, 1998.

MORAIS, A.C.T.; BARBOSA, L.P.; NEVES M.M.; MATTA, S.L.P.; MORAIS, D.B.; MELO, B.E.S. Parâmetros morfofisiológicos testiculares de camundongos (*Mus musculus*) suplementados com geleia real. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.1, p.110-118, 2009.

MOURA, C.S.; GUERRA, M.M.P.; SILVA JÚNIOR, V.A.; SILVA, C.G.C.; CAJU, F.M.; ALVES, L.C. Avaliação histomorfométrica do parênquima testicular de ratos adultos tratados com diferentes doses de ivermectina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.5, p.799-808, 2006.

NAKAZUMI, H. et al. Transforming growth factor α , epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in human testis obtained from biopsy and castration: immunohistochemical study. **Tohoku Journal Experimental Medicine**, v. 178, p. 381-388, 1996.

NOGUEIRA, E.; FERNANDES, C.E.; COSTA E SILVA, E.; SILVA, A.S. Comparação do perfil andrológico de 4443 touros Nelore criados extensivamente no planalto e pantanal sul-matogrossense. In.: **43ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**. João Pessoa, PB. *Anais...*p. 1-4. 1 CD Room. 2006.

OBERHOLZER, M., ÖSTREICHER, M., CHRISTEN, H., BRÜHLMANN, M. Methods in quantitative image analysis. **Histochemistry and cell biology**, v. 105, p. 333-355, 1996.

PIMENTEL, C.A. Infertilidade no touro. In: Riet-Correa, F., Schild, A.L., Méndez, M. C, Lemos, R. A.A. **Doenças de ruminantes e equinos**, v.2, Ed. Varela, São Paulo, SP, p. 382-399, 2001.

POLGUJ, M.; SOPIN, M.; JEDRZEJEWSKI, K.; BOLANOWSKI, W.; TOPOL, M. Angioarchitecture of the bovine tunica albuginea vascular complex – A corrosive and histological study. **Research in Veterinary Science**. 2010, doi:10.1016/j.rvsc.2010.12.002. Article in press: www.elsevier.com/locate/rvsc.

RASHBASS, J. The impact of information technology on histopathology **Histopathology**, v. 36, n. 1, p.1-7, 2000.

RAO, V. N. R.; OTT, R.S.T.; HEATH, E.H.; MCENTEE, K.; BOLT, D.J.; HIXON, J.E. Pathophysiology of small testes in beef bulls relationship between scrotal circumference,

histopathologic features of testes and epididymides, seminal characteristics, and endocrine profiles. **American Journal of Veterinary Research**, n. 47, p. 1988-1999, 1986.

RODRIGUES, J.A.; FAVANETTO A.L.V. Sistema Reprodutor In: MM AIRES Fisiologia. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.877-917, 1999.

RUSSEL, L.D.; ETTLIN, R.A.; HIKIM, A.P.S.; CLEGG, E.D. **Histological and histopathological evaluation of the testis**. Cache River Press, St. Louis, USA. 286 p., 1990.

SANTOS, L.R.S., OLIVEIRA, C. Morfometria testicular durante o ciclo reprodutivo de *Dendropsophus minutus* (Anura, Hylidae). **Resvista brasileira de zoologia**, v.1, p.64-70, 2007.

SETCHELL, B.P. The Mammalian Testis. **Ithaca**, Cornel University Press, 1978.

SETCHELL, B.P. Male reproductive organs and semen. In: CUPPS, P.T. **Reproduction in Domestic Animals**. Academic Press, Inc., San Diego, p. 221-250, 1991.

SETTERGREN, I., McENTEE, K. Germ cell weakness as a cause o testicular hypoplasia in bulls. *Acta Veterinary Scandinavian*, v.33, p.273-282. 1992.

SHARPE, R.M. Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **The physiology of reproduction**. Raven Press, New York, p.1363-1434, 1994.

SIEW, S, TROEN, P, NANKIN, H. Ultrastructure of testicular biopsies from infertile men. In: Troen P, Nankin H, eds. **The testis in normal and infertile men**. New York: Raven Press, p.137-152, 1977.

TRAINER, T.D. Testis and Excretory Duct System. In.: MILLS, S.E. **Histology for Pathologists**. Lippincott Williams & Wilkins, 3 ed., PA, USA. p. 943-963, 2007.

TRUE, L.D. Morphometry applications in anatomic pathology. **Human Pathology**, v. 27, p. 450-467, 1996.

VARNER, D. D.; JOHNSON, L. From a Sperm's Eye View—revisiting our perception of this intriguing cell. In: **Proceedings of the American Association of Equine Practitioners**, v. 53, p. 104-177, 2007.

Características histopatológicas e histomorfométricas testiculares associadas à condição reprodutiva em touros Nelore

Histopathological and histomorphometric testicular characteristics associated with reproductive condition in Nelore bulls

Kethleen Mesquita da Silva¹; Carlos Eurico dos Santos Fernandes²

¹Aluna do Mestrado em Ciência Animal, FAMEZ, UFMS, e-mail: kethms@hotmail.com

²Professor adjunto, CCBS, UFMS, e-mail: carlos.fernandes@ufms.br

Resumo: O objetivo desse estudo foi de avaliar aspectos morfológicos, morfométricos e funcionais da espermatogênese com base na condição reprodutiva seminal em touros Nelore. Foram utilizados 25 touros *Bos indicus* (Nelore), os quais foram classificados em aptos (n=10) e inaptos (n=15) à reprodução. Após orquiectomia, fragmentos do testículo direito de cada animal foram processados segundo técnicas de rotina e corados com Hematoxilina e Eosina (HE) e Ácido Periódico de Schiff (PAS). As lâminas foram analisadas em microscopia de campo claro em diferentes aumentos. Os segmentos tubulares foram classificados em quatro níveis (normal, degeneração leve e moderada, degeneração acentuada, e hipoplasia tubular) baseados na organização e arquitetura do tecido tubular. Foi obtida a média da altura do epitélio seminífero, da espessura da túnica própria e do diâmetro tubular dos segmentos e foi registrada a proporção de túbulo seminífero, tecido intersticial, vaso linfático e vaso sanguíneo dos testículos de cada touro. Além disso, quantificou-se a frequência das três classificações do ciclo espermatogênico A, B e C (A=agrupamento dos estágios I,II, e III que compreendem as fases iniciais do ciclo e proliferações mitóticas; B= agrupamento dos estágios V e VI que compreendem as fases intermediárias e intensas mitoses; C= agrupamento dos estágios VI, VII e VIII que compreendem as fases finais e de pós-meioses). Os resultados demonstraram que as alterações de caráter degenerativo nas células germinativas estão associadas a variações nos padrões histomorfométricos incluindo a densidade das estruturas que compõem o parênquima testicular e são mais representativas em touros com baixa qualidade seminal. Além disso, os touros inaptos apresentaram redução no potencial meiótico quando comparados aos touros aptos à reprodução.

Palavras-chave: Bovino, histopatologia, morfometria testicular.

Abstract: The aim of this study was to evaluate morphological, morphometric and functional aspects of spermatogenesis based on seminal reproductive conditions in Nelore bulls. The study used 25 bulls *Bos indicus* (Nelore), which were classified as satisfactory (n=10) and unsatisfactory (n=15) for reproduction. After orchietomy, fragments of the right testis of each animal were processed according to routine procedures and stained with hematoxylin and eosin (HE) and periodic acid-Schiff (PAS). The slides were analyzed in bright field microscopy at different magnifications. The tubular segments were classified into four levels (normal, mild and moderate degeneration, severe degeneration, tubular hypoplasia) based on the organization and architecture of the tubular tissue. The average height of the seminiferous epithelium, the average thickness of propria tunic and the average tubular diameter were obtained and the proportion of seminiferous tubules, interstitial tissue, lymphatic vessel and blood vessel of each bull testicle were recorded. Furthermore, the frequency of the three classifications of the spermatogenic cycle A, B and C (A = group of stages I, II, and III which comprise the initial phases of the cycle and mitotic proliferation, B = group of stages V and VI, which comprise intermediate phases and intensive mitosis, C = group stages VI, VII and VIII which comprise the final phases and post-meiosis) was quantified. The results showed that the degenerative changes in germ cells are associated with histomorphometric variations, including those in the density of the structures that comprise the testicular parenchyma, and are more representative in bulls with poor semen quality. In addition, the unsatisfactory bulls for reproduction showed reduced meiotic potential compared to that of satisfactory reproductive bulls.

Keywords: Bovine, histopathology, testicular morphometry.

Características histopatológicas e histomorfométricas testiculares associadas à condição reprodutiva em touros Nelore

Histopathological and histomorphometric testicular characteristics associated with reproductive condition in Nelore bulls

Kethleen Mesquita da Silva¹; Carlos Eurico dos Santos Fernandes²

¹Aluna do Mestrado em Ciência Animal, FAMEZ, UFMS, e-mail: kethms@hotmail.com

²Professor adjunto, CCBS, UFMS, e-mail: carlos.fernandes@ufms.br

Introdução

Na última década o Brasil tornou-se o maior exportador e segundo maior produtor de carne bovina do mundo. No Mato Grosso do Sul, a pecuária de corte foi responsável por aproximadamente 10,0% do produto interno bruto, com perspectivas promissoras para os próximos anos (MATO GROSSO DO SUL, 2010). Uma parcela importante desses resultados refere-se ao emprego de tecnologias voltadas à eficiência reprodutiva dos rebanhos, incluindo o manejo sanitário, nutricional e, especialmente pelos avanços nos métodos de seleção por aptidão reprodutiva.

Embora a busca por novas tecnologias para maximizar o potencial reprodutivo dos animais esteja em constante avanço, uma importante fonte de prejuízo na pecuária de corte ainda é o descarte de reprodutores por baixa qualidade do sêmen. No Mato Grosso do Sul, esses índices variam entre 15 a 30% em touros Nelore (NOGUEIRA et al., 2006) e podem ser superiores a 35% em animais de genótipo cruzado *Bos indicus* x *Bos taurus* em outras regiões do Brasil (MORAES et al., 1998). Neste sentido, um problema importante ainda é o tempo de permanência desses touros no rebanho, assim como a capacidade de recuperação ou reversão do quadro seminal. Estima-se que aproximadamente 43,0% dos touros descartados apresentem grau avançado de lesões degenerativas e hipoplásicas testiculares (FERNANDES et al., 2010).

A redução dos padrões qualitativos seminais está diretamente associada às condições da espermatogênese, que por sua vez, responde às variações endócrinas e estruturais do tecido testicular. Além disso, a produção dos espermatozoides depende de uma coordenada divisão celular mitótica das espermatogônias e meiótica dos espermatócitos, originando as espermátides, após sua diferenciação. Erros nas divisões mitóticas ou meióticas durante a espermatogênese ocorrem com frequência nos bovinos como reflexo da degeneração das células germinativas, reduzindo a produção espermática e aumentando o percentual de células anormais (JOHNSON et al., 2000; HOFLACK et al., 2008).

Neste contexto, a avaliação histológica torna-se um instrumento útil que permite quantificar e qualificar a espermatogênese dos animais. A quantificação pode ser estimada por análises morfométricas de diferentes medidas, cujo objetivo é comparar mudanças estruturais em células e tecidos, além da densidade de certas estruturas parenquimatosas (MICKLEM & SANDERSONS, 2001). Por outro lado, as análises qualitativas das estruturas testiculares, sistematizadas com base na histopatologia, podem fornecer elementos

importantes para o estudo da função testicular trazendo novos subsídios para a fisiopatologia da subfertilidade em bovinos.

O objetivo desse estudo foi avaliar aspectos morfológicos, morfométricos e funcionais da espermatogênese com base na condição reprodutiva seminal em touros Nelore.

Material e Métodos

1. Animais e grupos experimentais

Foram utilizados 25 touros *Bos indicus* (Nelore) com idades entre 3 e 8 anos, pertencentes a uma propriedade no município de Campo Grande, MS (20°26'34"S, 54°38'47"W). Os animais foram mantidos em regime extensivo, com pastagens predominantes de *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria humidicola*, com suplementação mineral e proteica e água *ad libitum*. Os touros não apresentavam sinais clínicos de doenças infecto-contagiosas e tinham histórico andrológico conhecido.

Após dois exames andrológicos, com intervalo de 30 dias, os animais foram classificados de acordo com os critérios adotados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998) em aptos e inaptos. Após exame clínico do aparelho reprodutivo (interno e externo), os animais foram submetidos a colheita de sêmen por eletroejaculação. Volume, aspecto, turbilhonamento, motilidade e vigor foram avaliados imediatamente após a colheita em microscopia de campo claro. Em seguida, foram preservadas amostras de sêmen em formol-salina tamponada 1% para exame morfológico realizado em microscopia de contraste de fase em 1000x (Olympus BX45). Touros que apresentaram motilidade inferior a 50%, vigor inferior a 3 (em uma escala de 0 a 5), e percentual de anormalidades morfológicas acima de 30% foram considerados como inaptos ou insatisfatórios (n=15) quanto ao potencial reprodutivo. Os animais que apresentaram valores acima dos descritos com exceção do percentual de anormalidade morfológicas (abaixo de 30%) foram classificados como aptos (n=10), porém, foram descartados por aspectos zootécnicos.

Os touros foram submetidos à orquiectomia segundo WOLF (1986) e fragmentos da região média cranial do testículo direito, de aproximadamente 1,0 cm³ foram fixados em solução de Bouin por 24 h e posteriormente lavados em água corrente e embebidos em álcool 70 GL por, no mínimo, três vezes. Em seguida, o material foi submetido ao processamento histotécnico de rotina, embocado em parafina histológica, cortado (5 µm) e corado com Hematoxilina e Eosina (HE) e Ácido Periódico de Schiff (PAS) com fundo de Hematoxilina de Harris (CARSON & HLADIK, 2009).

2. Análise histopatológica

Amostras testiculares foram avaliadas quanto ao grau de alteração histológica baseada na organização e arquitetura do tecido tubular. Em microscopia de campo claro (200x), 100 segmentos de túbulos seminíferos de cada animal foram selecionados aleatoriamente e classificados em NR (normal), DLM (degeneração leve e moderada), DA (degeneração acentuada) e HT (hipoplasia tubular), como segue: NR, segmento tubular normal com contorno simétrico e todas as linhagens de células germinativas presas ao

epitélio seminífero; DLM, segmento apresentando desprendimento ou destacamento de nichos de células germinativas, além de discreta vacuolização dessas células, presença de núcleos picnóticos e preservação do contorno tubular e túnica própria; DA, segmento com desorganização do epitélio germinativo e do contorno tubular, perda de células germinativas, intensa vacuolização, áreas com necrose e, eventualmente, presença de células gigantes multinucleadas, com ou sem espessamento da túnica própria; HT, túbulos apresentavam diâmetro reduzido, pouca ou ausência de células germinativas, prolongamentos citoplasmáticos das células de Sertoli e, ocasionalmente, espermatogônias sem atividade mitótica.

3. *Histomorfometria e estimativa da densidade tecidual*

As análises morfométricas tubulares e da densidade tecidual, foram realizadas com lâminas coradas em HE, com auxílio dos *softwares* Motic 2.0 e Image J, respectivamente. Para a morfometria, foram digitalizados, aleatoriamente, 30 segmentos de túbulos seminíferos de cada animal em aumento de 200x (1024x768 *pixels*), determinando-se a altura média do epitélio seminífero (μm) e a espessura média da túnica própria (μm) em três mensurações distintas. A média de duas medidas transversais em segmentos esféricos foi usada para determinar o diâmetro tubular (μm).

Para análise da densidade tecidual, foram digitalizadas 15 imagens aleatórias de cada animal em aumento de 100x. Em cada imagem, foi introduzida uma grade de 266 pontos, registrando-se a estrutura correspondente (túbulo seminífero, tecido intersticial, vaso linfático e vaso sanguíneo) em cada intersecção. A frequência relativa de cada estrutura foi considerada por imagem.

4. *Classificação do ciclo espermatogênico*

Na classificação do ciclo espermatogênico, foram utilizadas 50 imagens digitalizadas em aumento de 200x (1024x768 *pixels*) de segmentos de túbulos seminíferos previamente corados por PAS. Com base na classificação descrita por Cardoso & Godinho (1983), na qual dividiram o ciclo espermatogênico em oito estágios, cada seguimento tubular foi classificado em A, B e C como segue: A, agrupamento dos estágios I, II, e III que compreendem as fases iniciais do ciclo com a presença de espermatogônias, espermatócitos primários e poucas espermátides alongadas arranjadas em feixes; B, inclui os estágios IV e V que compreendem fases intermediárias do ciclo, caracterizadas pela presença de espermatócitos secundários (segunda divisão meiótica); e C, inclui os estágios VI, VII e VIII relacionados às fases finais, onde observa-se duas gerações de espermátides, arredondadas e alongadas, além da presença de corpos residuais e espermatozoides.

5. *Análise estatística*

O teste não paramétrico de Mann-Whitney U foi usado para verificar o efeito da condição reprodutiva (aptos x inaptos) nas alterações histológicas atribuídas para cada segmento tubular (NR, DLM, DA e HT). Nas medidas lineares histomorfométricas e densidade das estruturas intersticiais e tubulares

aplicou-se análise de variância, modelo linear univariável, ajustado para o peso. O teste do Qui-quadrado (contingência e bipartição) foi usado para comparar as frequências da classificação dos estágios do ciclo espermatogênico entre aptos e inaptos.

Resultados e Discussão

A eficiência da espermatogênese está diretamente associada a capacidade de multiplicação e diferenciação das células germinativas. Uma variedade de fatores físicos, químicos e endócrinos resulta em alterações na estrutura testicular, especialmente na degeneração do epitélio seminífero (FOSTER & LADDS, 2007). A manifestação patológica desse quadro, embora amplamente variável, se dá pela queda na qualidade seminal com perda do potencial reprodutivo. Touros com essa característica são diagnosticados como inaptos à reprodução e representam uma parcela importante das perdas associadas aos sistemas produtivos (BARTH, 2007; NOGUEIRA et al., 2011).

O conjunto das análises empregadas revelou que alterações na organização do parênquima testicular afetam a densidade tubular com efeitos sobre o epitélio germinativo e diferenciação meiótica. Esse perfil, embora variável em intensidade, foi comum no grupo com baixa qualidade seminal. As transformações das estruturas testiculares, tanto tubulares quanto intersticiais, são amplas em touros com diagnóstico de degeneração testicular, no entanto, a etiologia primária nem sempre é reconhecida (NASCIMENTO & SANTOS, 1997). Independente da causa, a literatura clássica reporta a ocorrência desses processos em levantamentos epidemiológicos em animais abatidos ou em casos secundários a doenças generalizadas (McENTEE, 1990; FOSTER, 2007; FOSTER & LADDS, 2007).

No presente estudo, adotou-se uma análise envolvendo a progressão das alterações morfológicas degenerativas desde a simples modificação do padrão organizacional tubular até a perda total das células germinativas, em conjunto com a eventual presença de células multinucleares. Embora tenha caráter descritivo, essa análise possibilitou categorizar as diferentes lesões encontradas agrupando-as em leves e/ou moderadas e severas. Além disso, incluiu-se a hipoplasia das células germinativas como alteração distinta, mesmo que ela, usualmente apareça em conjunto com a degeneração (KRISHNALIGAM et al., 1982; McENTEE, 1990). Esses elementos estão associados a diferentes graus de hipoespermatogênese e têm sido usados na análise sistemática das lesões testiculares em outras espécies (MEISTRICH, 1986; REHM, 2000; MAMINA & ZHIGAL'Skii, 2004; CERELLI et al., 2010).

A frequência das alterações, assim como o grau de degeneração foi diferente entre os grupos experimentais. A figura 1 mostra que touros aptos apresentaram amplitude entre 50,0 e 90,0% de túbulos normais, sendo que apenas um indivíduo apresentou acima de 10% de túbulos com degeneração severa, considerado *outlier* para esse grupo. No entanto, aqueles com baixa qualidade seminal, classificados como inaptos à reprodução, apresentaram percentuais mais elevados de degeneração, além de túbulos com sinais de hipoplasia das células germinativas. Esses resultados demonstram que, aproximadamente 43,0% dos túbulos seminíferos apresentavam, no mínimo, uma alteração de caráter degenerativo; e que a frequência

dessas alterações está associada ao decréscimo da qualidade seminal, possivelmente, de forma irreversível. Esse percentual é semelhante ao reportado por Kumi-Diaka et al. (1983) que encontram entre 40,0 a 69,0% de alterações degenerativas em touros *Bos indicus* em ambiente tropical. Em contraste, nos touros aptos, a perda do epitélio germinativo devido à degeneração foi observada em aproximadamente 28,0% dos segmentos tubulares (Figura 1). Este valor é semelhante ao reportado para touros Angus, entre 2,9 a 24,6% (CARROL & BALL, 1970), e em touros em Belgian Blue, 32,0% (HOFLACK et al., 2008), sugerindo que esse processo é relativamente comum, especialmente em touros que permanecem em condições extensivas (FERNANDES et al., 2010).

Em conjunto com os aspectos qualitativos do epitélio seminífero, determinou-se a densidade de algumas estruturas importantes da organização testicular. Essa análise permitiu um estudo comparativo entre o tecido intersticial e os túbulos seminíferos, interagidos na remodelação e adaptação frente a diferentes fatores envolvidos com a espermatogênese (MEISTRICH, 1986; CREASY, 1997). Nos bovinos, porém, poucos estudos têm relacionado estes aspectos à degeneração do epitélio seminífero. É comum, no entanto, que o avanço do processo degenerativo curse com atrofia tubular e redução da sua densidade no parênquima testicular (FOSTER & LADDS, 2007).

Em touros com alterações histológicas testiculares, o aumento relativo do tecido intersticial relaciona-se à presença de áreas atróficas de células de Leydig e redução do diâmetro e volume tubular (RAO VEERAMACHENENI et al., 1986), o que pode explicar, em parte, a redução da densidade tubular. No presente estudo, embora não tenha sido avaliada a presença de mudanças morfológicas nas células de Leydig, os resultados mostraram que houve redução significativa na densidade dos túbulos seminíferos, em contraste ao maior percentual de tecido intersticial e de capilares linfáticos nos touros inaptos (Tabela 1). A relação inversa entre esses elementos parece estar de acordo com a hipótese de que a proliferação do tecido estromal interlobular é um fator deletério ao epitélio seminífero, por dificultar a irrigação sanguínea peritubular, resultando em hipóxia e alterações na morfologia celular (RAO VEERAMACHANENI et al., 1987; POP et al., 2011).

Além disso, a maior proporção de capilares linfáticos pode ser devido ao aumento do tamanho destes em resposta a transmigração de fluídos no tecido intersticial. Variações nas relações entre os capilares linfáticos e sanguíneos podem ocorrer em função das pressões dos fluídos em toda a microvasculatura testicular modificando os padrões do tecido conectivo (DAMBER & BERGH, 1992; SETCHELL & BREE, 2006). Em touros da raça Belgian Blue, Hoflack et. al. (2008) observaram correlação entre a percentagem de colágeno intersticial com a percentagem de espermatozoides normais ($r=-0,47$) e com o índice de degeneração testicular ($r=0,63$).

Distúrbios na espermatogênese humana têm sido associados ao espessamento da túnica própria, também conhecido como esclerose tubular. Esse fenômeno é causado pelo aumento da matriz extracelular, em decorrência do maior número de fibroblastos, miofibroblastos e deposição protéica na forma de substância hialina e têm sido naturalmente observado em homens senis com alterações degenerativas testiculares (BUSTOS-OBREGON & HOLSTEIN, 1973; PESCE, 1987; FOLEY, 2001).

No touro, essa mesma condição tem sido implicada com a redução da área tubular e espessamento da lâmina basal, interferindo na eficiência da espermatogênese (RAO VEERAMACHANENI et al., 1987). Isso pode explicar o fato de a túnica própria estar mais espessa nos touros inaptos (Tabela 1). De acordo com Saunders (1976), a espessura na túnica própria de touros *Bos indicus* com degeneração pode atingir 5,8 μm demonstrando claramente um quadro de esclerose tubular. Volkmann et al. (2011) observaram que aproximadamente 90,0% dos túbulos seminíferos com espessamento na túnica própria apresentaram defeitos nas células germinativas e sugeriram que essa medida pode ser usada como marcador histopatológico testicular.

Neste experimento, além do aumento na espessura da túnica própria, houve redução na altura do epitélio seminífero, confirmando o maior grau de degeneração das células germinativas no grupo inapto (Tabela1). O diâmetro tubular apresentou uma variação de 210,4 a 254,9 μm , não sendo diferente entre as condições reprodutivas. Estes valores estão de acordo com os encontrados por Kumi-Diaka et al. (1983). Por outro lado, a redução da densidade tubular e não do diâmetro, reitera o quadro histológico onde a maior frequência de alterações foi de grau leve e moderado, sugerindo que essas mudanças morfológicas são compatíveis com subfertilidade, avaliada com base no exame de sêmen.

Na tabela 2, estão apresentados os resultados da quantificação do ciclo espermatogênico de touros aptos e inaptos à reprodução, mostrando diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as classificações de acordo com a condição reprodutiva. A determinação das classificações seguiu o padrão mitótico e meiótico das divisões celulares, considerando grupos de túbulos seminíferos com estágios próximos de desenvolvimento celular (CARDOSO & GODINHO, 1983).

A classificação A agrupou túbulos com estágios iniciais, representados por células com divisões mitóticas ou proliferativas do epitélio seminífero. As classificações B e C representam estágios mais avançados do epitélio, agrupando túbulos com as divisões meióticas até a diferenciação dos espermatozóides pré-espermição (Figura 2). Uma classificação parecida foi proposta por Horn et al. (2003) para touros cruzados *Bos indicus* x *Bos taurus*, com base nos estágios do ciclo espermático descritos por Amann (1962) e os resultados encontrados foram semelhantes. Touros inaptos tiveram frequência superior ($p < 0,05$) da classificação A em relação aos aptos. Isso demonstra que os ciclos iniciais das divisões não acarreta efeito importante sobre a qualidade seminal. Nas classificações B e C a redução foi mais expressiva no grupo inapto, em torno de 5,0% a menos do que nos touros aptos. Esses achados reiteram os resultados obtidos em touros de raças sintéticas (HORN et al., 2003), demonstrando que as fases de diferenciação celular do ciclo espermatogênico são as mais relacionadas à qualidade seminal tanto em raças cruzadas como em touros Nelore.

É importante ressaltar que alterações de caráter degenerativo nas células germinativas estão associadas a variações nos padrões histomorfométricos incluindo a densidade das estruturas que compõem o parênquima testicular e são mais representativas em touros com baixa qualidade seminal, classificados como inaptos à reprodução. Portanto, análises conjuntas de aspectos qualitativos e quantitativos da espermatogênese são críticas para inferir sobre sua eficiência frente às variações da qualidade seminal. Nossos resultados sugerem que o emprego da classificação dos estágios do epitélio seminífero pelo

agrupamento das fases de proliferação, diferenciação e pós-meiose deve ser feito em sincronia com as possíveis mudanças morfológicas do parênquima testicular.

Conclusão

Os touros inaptos apresentaram maior grau de degeneração testicular e presença de túbulos hipoplásicos, além de redução no potencial meiótico quando comparados aos touros aptos à reprodução.

Agradecimentos

À Capes pelo auxílio financeiro e a equipe do Laboratório de Patologia Geral do CCBS, UFMS.

Referências Bibliográficas

AMANN, R.P. Reproductive capacity of dairly bulls. III. The effect of ejaculation frequency, unilateral vasectomy and age on spermatogenesis. **The American Journal of Anatomy**, v.110, p. 49-78, 1962.

BARTH, A. D. Evaluation of Potential Breeding Soundness of the Bull. In: YOUNGQUIST, R. S., THRELFALL, W. R. **Current Therapy in Large Animal Theriogenology**, 2ª Ed. Elsevier. p. 228-240, 2007.

BUSTOS-OBREGON, E.; HOLSTEIN, A.F. On structural patterns of the lamina propria of human seminiferous tubules. **Zellforsch**, v.141, p.413–425, 1973.

CARDOSO, F.M.; GODINHO, H.P. Cycle of the seminiferous epithelium and its duration in the zebu, *Bos indicus*. **Animal Reproduction Science**, v.5, p.231-245, 1983.

CARROLL, E.J., BALL, L. Testicular changes as affected by mating systems in beef cattle. **American Journal of Veterinary Research**, v.31, p.241-254, 1970.

CARSON, F. L., HLADIK, C. **Histotechnology. A Self-Instructional Text**. ASCP Press, 3ª ed. Hong Kong. 399 p., 2009.

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

CERELLI, L. A., KUANG, W., ROGERS, D. A Practical approach to testicular biopsy interpretation for male infertility. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v.134, p.1197-1204. 2010.

CREASY, D. M. Evaluation of Testicular Toxicity in Safety Evaluation Studies: The Appropriate Use of Spermatogenic Staging. **Toxicologic Pathology**, v. 25, p.119-131. 1997.

DAMBER, J. E., BERGH, A. Testicular microcirculation – a forgotten essential in andrology. **International Journal of Andrology**, v.15, p.285-292. 1992.

FERNANDES, C.E.; ZART, A.L.; MESQUITA, K. Alterações clínico-genitais e histopatologia testicular em touros de corte no Mato Grosso do Sul. VI Encontro Nacional de Diagnóstico Veterinário – ENDIVET – Campo Grande – MS. *Anais...* Interbio, v.4, n.1, p. 87., 2010.

- FOLEY, G. L. Overview of male reproductive pathology. **Toxicologic Pathology**, v. 29, n. 1, p. 49-63. 2001.
- FOSTER, R.A.; LADDS, P.W. Male Genital System. In.: MAXIE, M.G. Jubb, Kenndey an Palmer's. **Pathology of Domestic Animals**. Elsevier-USA, 5a ed., v. 3, p. 565-619, 2007.
- FOSTER, R.A. Male reproductive system. In.: McGAVIN, M.D.; ZACHARY, J.F. **Pathology Basis Veterinary Disease**. 4ª ed., Mosby Elsevier, MI, USA. p. 1317-1348, 2007.
- HOFACK, G., W. VAN DEN BROECK, W., MAES, D., VAN DAMME, K., OPSOMER, G., L. DUCHATEAU, L., DE KRUIF, L., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., VAN SOOM, A. Testicular dysfunction is responsible for low sperm quality in Belgian Blue bulls. **Theriogenology**, v. 69, p. 323–332, 2008.
- HORN, M.M.; MORAES, J.C.F.; EDELWEISS, M.I.A. Quantificação dos estádios do ciclo espermatogênico em touros de raças sintéticas com e sem alteração na qualidade seminal. **Ciência Rural**, v.33, n.6, p.1111-1115, 2003.
- JOHNSON, L.; VARNER, D.D.; ROBERTS, M.E.; SMITH, T.L.; KEILLOR, G.E.; SCRUTCHFIELD, W.L. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p.471–480, 2000.
- KRISHNALIGAM, V., LADDS, P. W., ENTWISTLE, K. W., HOLROYD, R. G. Quantitative macroscopic and histological study of testicular hypoplasia in *Bos indicus* strain bulls. **Research in Veterinary Science**, v. 32, p. 131-139. 1982.
- KUMI-DIAKA, J.; OSORI, D.I.K.; NJOKU, C.O.; OGWLI, D. Quantitative estimation of spermatogenesis in bulls (*Bos indicus*) in a tropical environment of Nigeria. **Veterinaru Research communications**, v.6, p.215-226, 1983.
- MAMINA, V. P., ZHIGAL'Skii, O .A. The analysis of destructive changes in the testes of small mammals at different abundance levels. **Doklady Biological Sciences**, v. 394, pp. 55–57. 2004.
- MATO GROSSO DO SUL, 2010. Secretaria de Estado de Meio Ambiente, do Planejamento, da Ciência e Tecnologia-SEMACE. Campo Grande, MS: A Secretaria. Disponível em: <http://www.semace.ms.gov.br/control/ShowFile.php>. Acesso em 07 fev. 2012.
- MCENTEE, K. **Reproductive pathology of domestic animals**. Academic Press, San Diego, CA. 401 p., 1990.
- MEISTRICH, M. L. Critical Components of Testicular Function and Sensitivity to Disruption. **Biology of Reproduction**, v. 34, p. 17-28. 1986.
- MICKLEM, K., SANDERSONS, J. Digital imaging in pathology. **Current Diagnostic Pathology**., v. 7, p. 131 -140, 2001.
- MORAES, J.C.F.; HORN, M.M.; ROSADO JR., A.G. Exame andrológico em touros: qualidade dos indicadores da aptidão reprodutiva em distintos grupos raciais. **Ciência Rural**, v. 28, n. 4, p. 647-652, 1998.
- NASCIMENTO, E. F. & SANTOS, R.L. **Patologia da reprodução dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.108, 1997.
- NOGUEIRA, E.; FERNANDES, C.E.; COSTA E SILVA, E.; SILVA, A.S. Comparação do perfil andrológico de 4443 touros Nelore criados extensivamente no planalto e pantanal sul-matogrossense. In.: **43ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**. João Pessoa, PB. *Anais...*p. 1-4. 1 CD Room. 2006.

NOGUEIRA, E.; COSTA E SILVA, E. V. da; FERNANDES, C. E.; SILVA, A. S.; NOGUEIRA, R. J. BORGES, J. C. **Perfil andrológico de touros nelore criados extensivamente no planalto e no Pantanal sul-mato-grossense**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2011. 4p. (Embrapa Pantanal. Circular Técnica, 100). Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/CT100.pdf>>. Acesso em: 16 dez, 2011.

PESCE, C. M. P. The testicular biopsy in the evaluation of male infertility. **Seminars in Diagnostic Pathology**, v. 4, n. 4, p. 264-274. 1987.

POP, O. T., COTOI, C. G., PLEŞEA, I. E., ENACHE, S. D., POPESCU, F. C., ENACHE, M. A., PLEŞEA, R. M. Correlations between intralobular interstitial morphological changes and epithelial changes in ageing testis. **Romanian Journal of Morphology & Embryology**, v. 52, p. 339–347. 2011.

RAO, V. N. R.; OTT, R.S.T.; HEATH, E.H.; MCENTEE, K.; BOLT, D.J.; HIXON, J.E. Pathophysiology of small testes in beef bulls relationship between scrotal circumference, histopathologic features of testes and epididymides, seminal characteristics, and endocrine profiles. **American Journal of Veterinary Research**, n. 47, p. 1988-1999, 1986.

RAO VEERAMACHANENI, D. N., HEATH, E. H., OTT, R. S., MCENTEE, K., HIXON, J. E. Changes in basal lamina of seminiferous tubules associated with deranged spermatogenesis in the bull. **American Journal of Veterinary Research**, v. 48, n.2, 1987.

REHM, S. Spontaneous testicular lesions in purpose-bred beagle dogs. **Toxicologic Pathology**, v. 26, n.8, p.782-787. 2000.

SAUNDERS, P.J. Genital malformations in bulls in northern Australia: an abattoir study. MSc thesis, James Cook University of North Queensland, Australia, 1976.

SETCHELL, B. P., BREED, W. G. Anatomy, Vasculature, and Innervation of the Male Reproductive Tract. In.: Neill, J. D. **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. 3^a Ed. Elsevier, USA. 206. p.771-825, 2006.

VOLKMANN, J.; MULLER, D.; FEUERSTACKE C.; KLIESCH, S.; BERGMANN, M.; MUHLFELD C.; MIDDENDORFF, R. Disturbed spermatogenesis associated with thickened lamina propria of seminiferous tubules is not caused by dedifferentiation of myofibroblasts. **Human Reproduction**, v.26, n.6, p. 1450–1461, 2011.

WOLF, D. F. Surgical procedures of the reproductive system of the bull. In: Morrow, D. A. Current Therapy in **Theriogenology 2**. W. B. Saunders Company, USA. 1^a Ed., p.353-379, 1986.

Tabelas e Figuras

Tabela 1. Médias (\pm epm) ajustadas para o percentual de estruturas do estroma e parênquima testicular e medidas histomorfométricas dos túbulos seminíferos em touros Nelore de acordo com a condição reprodutiva.

		Aptos (n=10)	Inaptos (n=15)	P*
Estrutura (%)	Túbulo Seminífero	84,63 \pm 0,572 ^a	81,81 \pm 0,46 ^b	0,001
	Tecido Intersticial	13,56 \pm 0,497 ^a	15,15 \pm 0,406 ^b	0,009
	Vaso Linfático	1,35 \pm 0,148 ^a	2,42 \pm 0,121 ^b	0,001
	Vaso Sanguíneo	0,46 \pm 0,073 ^a	0,63 \pm 0,059 ^a	0,058
Medidas (μ m)	Altura epitelial	70,0 \pm 0,54 ^a	60,1 \pm 0,42 ^b	0,001
	Diâmetro tubular	229,8 \pm 1,22 ^a	231,6 \pm 1,18 ^a	0,312
	Túnica própria	3,8 \pm 0,04 ^a	4,4 \pm 0,03 ^b	0,001

^{ab} representam diferença pelo * teste *t* entre colunas, epm= erro padrão da média

Tabela 2. Frequência (%) da classificação dos estágios do ciclo espermatogênico em touros Nelore de acordo com a aptidão reprodutiva.

Aptidão Reprodutiva	Classificação			Total n (%)
	A n (%)	B n (%)	C n (%)	
Aptos (n=10)	168 (33,6) ^a	210 (42,0) ^a	122 (24,4) ^a	500 (40,0)
Inaptos (n=15)	329 (43,9) ^b	276 (36,8) ^b	145 (19,3) ^b	750 (60,0)
Total	497 (39,8)	486 (38,9)	267 (21,4)	1250 (100,0)

^{ab} p=0,001 entre linhas; $\chi^2=13,64$; GL=2; A= agrupamento dos estágios I,II, e III que compreendem as fases iniciais do ciclo; B= agrupamento dos estágios IV e V que compreendem as fases intermediárias do ciclo; C= agrupamento dos estágios VI, VII e VIII que compreendem as fases finais do ciclo

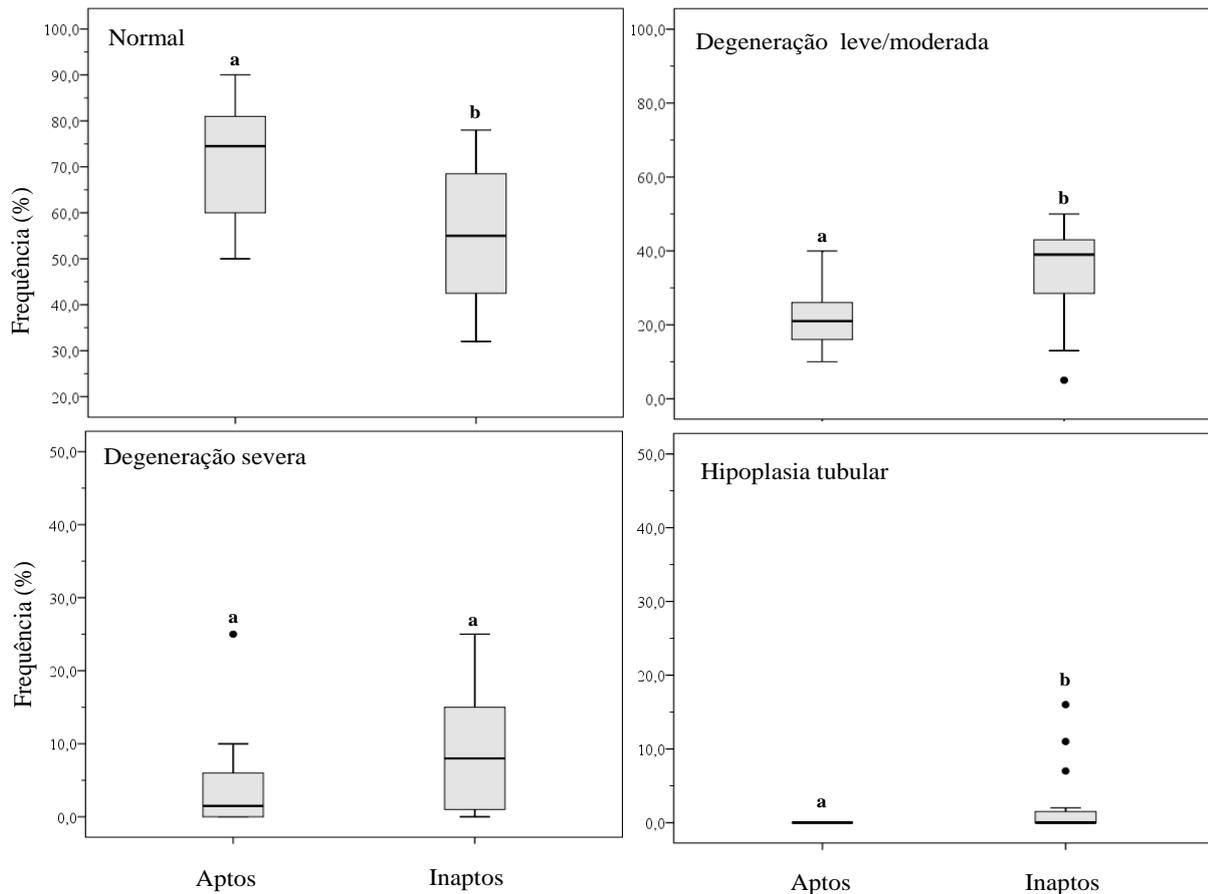


Figura 1. *Box plot* representando a distribuição da frequência (%) de alterações testiculares estimada em 100 túbulos seminíferos de acordo com a condição reprodutiva em touros Nelore. ^{ab}, $P < 0,05$, teste de Mann-Whitney U

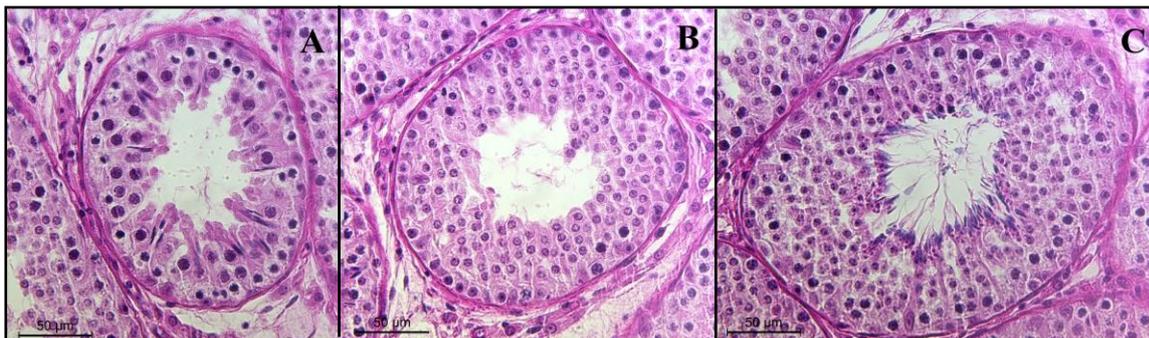


Figura 2. Classificação dos estágios do ciclo espermatogênico. (A), classificação A, notada presença de espermatogônias, espermatócitos primários e algumas espermatídes alongadas arranjadas em feixes. (B), classificação B, caracterizada pela presença da segunda divisão meiótica e espermatócitos secundários. (C), classificação C, são observadas duas gerações de espermatídes: arredondadas e alongadas, presença de corpos residuais e espermatozoides.