

VARIAÇÕES NO QUADRO ESPERMÁTICO DE CARNEIROS SUBMETIDOS A DEGENERAÇÃO TESTICULAR EXPERIMENTAL

Raul Gastão MUCCILO*
Renato Campanarut BARNABE*
Valquiria Hyppolito BARNABE**

RFMV-A/18

MUCCILO, R. G. et al. — *Variações no quadro espermático de carneiros submetidos a degeneração testicular experimental.* Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo, 11:155-77, 1974.

RESUMO: Seis carneiros adultos, da raça Crioula, divididos em dois grupos foram respectivamente submetidos à insulação escrotal por 4 e 8 dias consecutivos. Durante um período de nove meses, cento e oitenta colheitas de sêmen foram efetuadas por eletro ejaculação, pesquisando-se as seguintes características: volume, ondas microscópicas, motilidade inicial, pH seminal, concentração espermática e anormalidades morfológicas dos espermatozoides por intermédio da coloração de Williams e pelo método do formol salino em microscopia de contraste de fase.

Paralelamente, terminados os prazos de insulação de cada grupo, os animais foram submetidos à orquiectomia unilateral esquerda e, no final do experimento, foram retirados os testículos remanescentes para estudos histológicos.

A análise dos resultados obtidos revelou que a frequência da ejaculação não interferiu na qualidade do sêmen, bem como que o volume do ejaculado não foi afetado pela insulação escrotal.

Por outro lado, os consequentes distúrbios da espermatogênese foram caracterizados por aumento do número de anormalidades da cauda, peça intermediária e cabeça dos espermatozoides, desaparecimento das ondas microscópicas, elevação do pH e queda da concentração e motilidade espermáticas. Em períodos variáveis essas características voltaram aos limites normais encontrados na fase pré experimental, bem como as alterações histológicas dos testículos também demonstraram ser reversíveis.

UNITERMOS: Carneiros*; Insulação escrotal*; Degeneração testicular*; Quadro espermático*.

INTRODUÇÃO E LITERATURA

O efeito da temperatura sobre a espermatogênese e sobre os caracteres dos espermatozoides dos animais mamíferos desde

há muito tempo é assunto de interesse dos pesquisadores. Normalmente, para a obtenção de bons resultados na reprodu-

* Professor Assistente Doutor.

** Professor Assistente.

Departamento de Cirurgia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

ção, a temperatura escrotal é sempre alguns graus mais baixa do que a corpórea. A espermatogênese pode sofrer um retardamento, ou ser até completamente reduzida, pelo aumento da temperatura normal dos testículos, como acontece com os animais criptórquios, ou por influência do meio ambiente devido às variações estacionais (PHILLIPS et al.²⁸, 1943; STARK⁴⁰, 1949; HAFEZ¹³, 1959; HAFEZ et al.¹⁴, 1955; MIES F.²³, 1956; CUPPS et al.⁶, 1960; SAHNI & ROY^{34, 35}, 1967 e 1969 e KALEV et al.¹⁸, 1968).

A ação da temperatura testicular artificialmente aumentada foi estudada por MOORE²⁵ (1924) em cobaias, por LAGERLOF¹⁹ (1934), CASADY et al.⁵ (1953), AUSTIN et al.¹ (1961) em bovinos e por HOLST¹⁵ (1949), MAZZARRI et al.²² (1968), MAZZARRI²¹ (1969) e BARNABE² (1970) em suínos.

Esses pesquisadores levando em conta a importância e frequência da degeneração testicular, procuraram reproduzi-la experimentalmente para melhor poder estudar suas causas e possíveis tratamentos, assim como para encontrar maneira mais eficaz e rápida de detectar a afecção e com isso evitar maiores perdas para os criadores.

Na espécie ovina, o aumento da temperatura escrotal por intermédio de aplicação de água aquecida foi utilizado por WAITES & SETCHELL⁴² (1964), WAITES & ORTAVANT⁴¹ (1968), BRADEN & MATTNER³ (1970), SETCHELL³⁷ (1971) e SAND³⁶ (1972).

Os resultados, de um modo geral, evidenciaram diminuição na concentração e motilidade dos espermatozoides, cujas formas anormais apareceram em grande número. WAITES & ORTAVANT⁴¹ (1968), corroborados por SETCHELL³⁷ (1971), observaram parada da divisão metafásica das espermatozônias e destruição total dos

espermátocitos, tendo sido bem menos afetadas as espermatídas. BRADEN & MATTNER³ (1970), contudo, verificaram que o sêmen contido no epidídimo não sofreu alterações pelo aquecimento durante algumas horas, muito embora houvesse considerável dano nos espermatozoides em formação nos testículos.

Outros pesquisadores fizeram suas observações nas chamadas câmaras climáticas. Assim, GUNN et al.¹² (1942) provaram que é possível provocar a chamada esterilidade de verão em carneiros, expondo-os a altas temperaturas na câmara climática, durante qualquer estação do ano.

A influência da maior ou menor cobertura de lã sobre os testículos, ou de todo o velo foi estudada por DUTT & BUSH⁸ (1955), FOOTE et al.¹⁰ (1957), RATHORE³² (1970), apresentando melhores quadros espermáticos, aqueles grupos de animais tosquiados, mesmo quando submetidos a altas temperaturas da câmara climática. Outro aspecto, como a queda da fertilidade, comprovada ou não por exames histológicos do testículo, foi verificado por SIMPSON³⁸ (1960), RATHORE³⁰ (1968), HOWARTH¹⁶ (1969), JOHNSON et al.¹⁷ (1969) e RATHORE³² (1970).

Efeitos sobre a espermatogênese, traduzidos por degeneração testicular seguida de regeneração após o tratamento térmico em câmara climática, e incluindo defeitos morfológicos da cabeça, peça intermediária e cauda dos espermatozoides, foram verificados por DJANUAR⁷ (1965), RATHORE & YEATES³³ (1967), RATHORE³¹ (1969), RATHORE³² (1970) e SMITH³⁹ (1971).

Examinando o sêmen de 12 carneiros da raça Merino, antes e após exposição dos animais em câmara climática, MOULE & WAITES²⁶ (1963) verificaram maior importância da temperatura do tecido subcutâneo do escroto do que aquela da pele

do flanco e a retal. As primeiras formas anormais a surgirem no sêmen foram verificadas 13 a 21 dias após o tratamento. Esses mesmos autores, em outro grupo de animais, fizeram circular ao redor do escroto, água entre 17 a 19°C e assim, apesar da alta temperatura ambiente, conseguiram evitar a degeneração testicular, provando então que o efeito deletério da temperatura sobre os testículos dá-se diretamente e não por via sistêmica. Similarmente, DUTT & SIMPSON⁹ (1957) haviam mantido dentro de câmara climática, carneiros de raça Southdown em temperatura mais baixa do que a do meio ambiente. Assim procedendo, obtiveram motilidade inicial de 70,3% para os tratados e 41,8% para os não tratados e 6,4% e 36,9% respectivamente, de anormalidades morfológicas dos espermatozoides.

A suspensão do mecanismo termo-regulador em carneiros grandes produtores de lã como os da raça Merino, por exemplo, leva a efeitos semelhantes à insulação testicular (GUNN et al.¹², 1942).

A insulação, que sabidamente induz infertilidade temporária em carneiros, sem acarretar qualquer outra perturbação aos animais e cujos efeitos são reversíveis, foi escolhida por GLOVER¹¹ (1955) e MUCCILOLO²⁷ (1972), pela sua simplicidade, facilidade de controle experimental e pelo fato dos carneiros prestarem-se perfeitamente para tal tipo de tratamento por apresentarem os testículos pendulosos.

Na presente investigação, esse método também foi o escolhido mas o interesse primordial, não foi verificar a capacidade de fertilização do sêmen, mas sim a variação que sofre o quadro espermático de carneiros da raça Crioula, quando submetidos à insulação escrotal.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seis carneiros adultos, da raça Crioula, provenientes diretamente de condições de campo, foram estabulados e submetidos a exames clínicos, incluindo o parasitológico, que determinou a necessidade de administração de vermífugo à base de Metil-5-butil-2-benzimidazolcarbamato*.

Em período pré experimental, iniciado em 19/10/1972, cinco amostras de sêmen de cada animal foram colhidas com dois dias de intervalo entre as colheitas, para estudo do quadro espermático normal.

Em 30/10/1972, após as colheitas de sêmen, os carneiros foram divididos ao acaso em dois grupos de três, tendo o primeiro grupo (carneiros A, B e C) sido submetido à insulação escrotal por 4 dias seguidos e o segundo grupo (carneiros D, E e F) por oito dias consecutivos.

Para a insulação escrotal foram preparadas bolsas de filme plástico de paredes duplas, entre as quais foi interposta camada de espuma de látex, medindo, aproximadamente, 22 cm de comprimento por 17 cm de largura. Por meio de um cordel, correndo no interior de uma bainha feita em toda a volta de sua abertura, a bolsa foi fixada ao nível do cordão espermático, mantendo dessa forma, em seu interior a bolsa escrotal. O fechamento foi completado usando-se fita adesiva como reforço de fixação da bolsa plástica.

As colheitas de sêmen foram efetuadas por meio de eletroejaculador, construído e utilizado por CARVALHO⁴ (1968), baseado em trabalho de MASCARENHAS & GOMES²⁰ (1951).

O período experimental abrangeu nove meses (30/10/1972 a 30/7/1973), totalizando 150 colheitas, realizadas em dias alter-

* Curagust — Squibb Indústria Química S.A.

nados até totalizar 16 para cada animal após o tratamento, de acordo como se verifica na tabela abaixo: e posteriormente em janeiro, fevereiro, março e julho, isto é, 3, 4, 5 e 9 meses

TABELA I

Datas e número de colheitas de sêmen de seis carneiros em experimento de insulação escrotal

Mês	Dias das colheitas		N.º de colheitas	
	Fase pré-experimental	Fase experimental	Animal/mês	Total/mês
outubro/72	19, 23, 25, 27 e 30	—	5	30
novembro/72	—	1, 3, 6, 8, 10, 13, 15, 17, 20, 22, 24 e 27	12	72
dezembro/72	—	4, 6 e 8	3	18
janeiro/73	—	15 e 24	2	12
fevereiro/73	—	7, 14 e 23	3	18
março/73	—	16 e 26	2	12
julho/73	—	17, 23 e 30	3	18
Total de colheitas			30	180

O sêmen colhido em tubo graduado, após a verificação do volume, cor e odor, era colocado em banho-maria à temperatura constante de 37°C.

A motilidade inicial dos espermatozoides e as ondas microscópicas do sêmen foram verificadas, no máximo, 30 segundos após a colheita, entre lâmina e laminula.

O pH seminal foi determinado colorimetricamente por meio de papel indicador universal e a concentração espermática por intermédio de câmara de Burker, utilizando o diluidor recomendado por MIES F.^o 24 (1970).

Os estudos relativos à morfologia dos espermatozoides foram realizados pelo exame de esfregaços corados pelo método de Williams (RAO²⁹, 1971) e em microscopia de contraste de fase, com montagens à base de formol salino, sendo contados 200 espermatozoides em cada preparação. Os resultados são dados em porcentagem.

Terminados os prazos de insulação de cada grupo, os animais foram submetidos

à orquiectomia unilateral esquerda e, no final do experimento, foram retirados os testículos remanescentes. Para o exame histológico, esses órgãos foram cortados no sentido longitudinal, retirando-se pequenos blocos imediatamente imersos em líquido de Bouin.

As preparações histológicas foram feitas por cortes dos blocos parafinados, corados pelo método da hematoxilina e eosina e montados entre lâmina e laminula.

Durante todo o experimento os carneiros não foram tosquiados e receberam, como ração, capim e concentrado, fornecidos duas vezes ao dia e água "ad libitum". Como parte integrante do manejo e sempre que as condições atmosféricas permitiram, os animais foram soltos em piquetes.

RESULTADOS

Os resultados do presente experimento estão sumarizados na Tabela II e gráficos

de 1 a 7, proporcionando visão de conjunto que permite melhor interpretação e mais fácil cotejo dos dados registrados.

As colheitas de sêmen numeradas de 1 a 5 na Tabela II referem-se ao período pré experimental, enquanto que do 6 ao 30 à fase experimental propriamente dita.

Todos os dados constantes da Tabela II e que serviram de base para a confecção dos gráficos 1 a 7, refletem invariavelmente a média de 3 animais em cada tratamento, insulados respectivamente por 4 e 8 dias.

O exame histológico dos testículos esquerdos dos animais A, B e C, submetidos à insulação escrotal por 4 dias, revelou que

a maioria dos túbulos seminíferos possuem células de Sertoli e células da linhagem espermatogênica perfeitamente íntegras do ponto de vista morfológico. Alguns túbulos, entretanto, apresentam o epitélio germinativo incompleto, isto é, aparecem apenas as espermatogônias e os espermatócitos, ou, então, além desses, evidenciam-se também algumas espermatídas. Em vários túbulos aparecem células gigantes ao nível da luz dos túbulos seminíferos. Células arredondadas com restos nucleares ou desprovidas de núcleo também são vistas, sendo as primeiras mais frequentes na espessura do epitélio e as últimas na luz dos túbulos seminíferos, em cujo interstício aparecem poucas células de Leydig (Foto n.º 1).

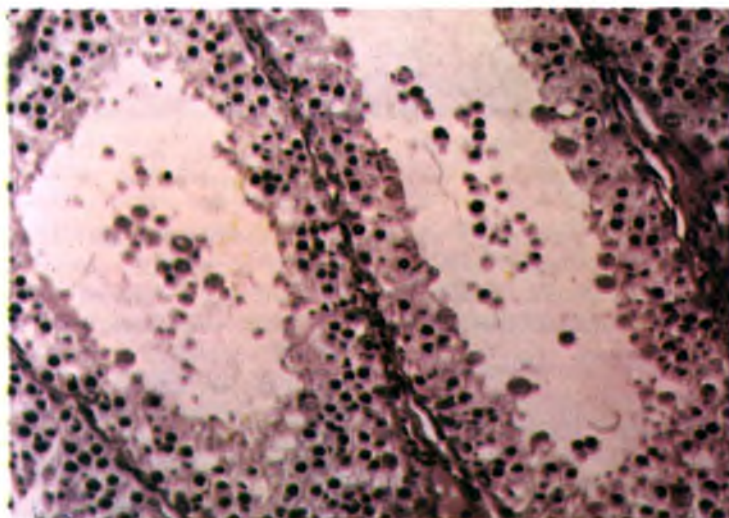


Foto n.º 1 — Corte de testículo submetido à insulação escrotal por 4 dias. Hematoxilina e eosina. Aproximadamente 150x.

Nos cortes histológicos dos testículos esquerdos dos animais D, E e F, tratados por insulação escrotal durante 8 dias, pode-se verificar maior destruição do epitélio germinativo degenerado onde permanece

apenas as células de Sertoli. Entretanto, em alguns túbulos seminíferos, existem ainda algumas espermatogônias e espermatócitos. Na luz dos túbulos seminíferos aparecem células gigantes ao lado

de células em degeneração, às vezes, com restos celulares. O tecido intersticial tem características semelhantes às descritas pa-

ra o lote que sofreu insulação testicular por 4 dias (Foto n.º 2).

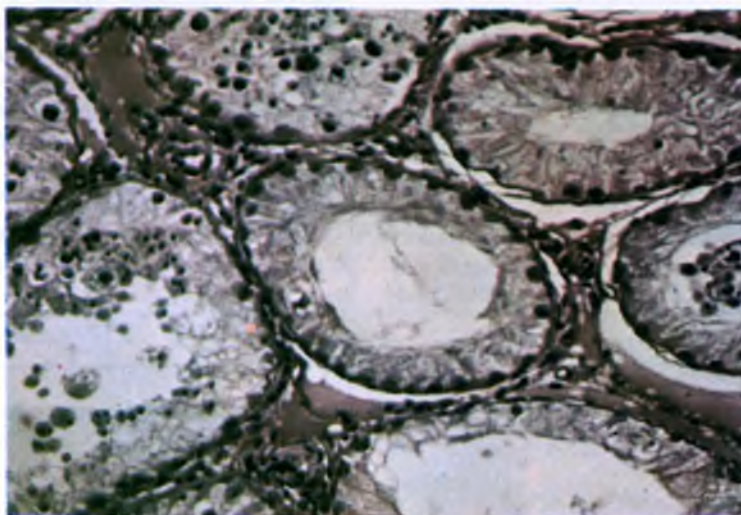


Foto n.º 2 — Corte de testículo submetido à insulação escrotal por 8 dias. Hematoxilina e eosina. Aproximadamente 150 x.

Os testículos direitos, retirados 9 meses após os tratamentos, revelaram histologicamente, em ambos os grupos, constituição normal apresentando todas as camadas da linhagem espermatogênica (Foto n.º 3).

D I S C U S S Ã O

A esterilidade ou a redução da fertilidade nos reprodutores estão relacionadas ao quadro espermático, o qual resulta de modificações que ocorrem no tecido testicular germinativo. Essas modificações podem levar à degeneração testicular que foi registrada por LAGERLOF¹⁹ (1934) traduzindo uma débil constituição sexual que geralmente é de origem hereditária, ou doenças sistêmicas, fatores nutricionais ou ainda degeneração térmica.

As modificações das características seminais, no entanto, quando artificialmente induzidas, requerem bastante cuidado na interpretação de seus resultados. É muito importante reconhecer que essas modificações podem não ocorrer todas simultaneamente e, além disso, convém prevenir-se em relação ao fato de que valores obtidos para determinada característica podem ser influenciados pelos valores de outra, isto é, existe considerável interação entre os resultados de vários testes. Exemplificando, uma correlação positiva entre diminuição da motilidade dos espermatozoides e densidade espermática, que ocorra durante a degeneração, pode primariamente ser devida ao aumento simultâneo na proporção de espermatozoides mortos e anormais. Uma correlação assim

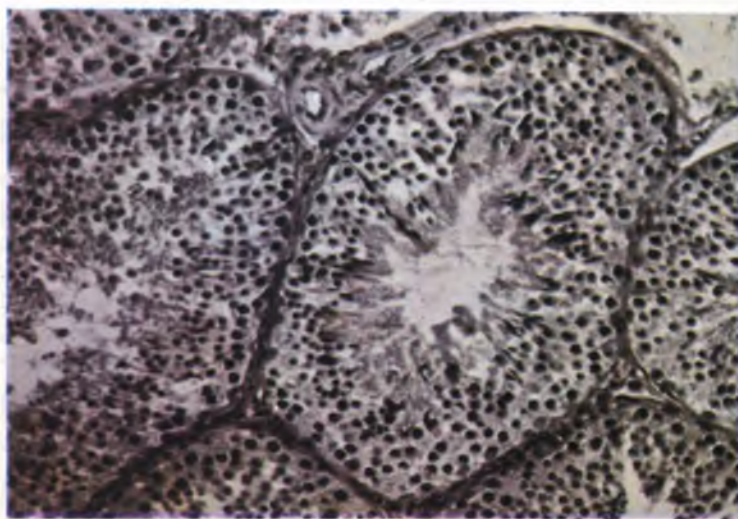


Foto n.º 3 — Corte do testículo regenerado. Aspecto normal. Hematoxilina e eosina. Aproximadamente 150 x.

estreita não se observa durante a regeneração, uma vez que o conteúdo de células mortas e anormais é menor, embora durante esse período exista uma baixa densidade espermática ocasionada pela gradual recuperação. Efeitos similares não ocorrem necessariamente em casos de infertilidade encontrados na prática, onde as condições não são controladas. A época precisa em que as modificações se desenvolvem pode ser uma das mais importantes contribuições ao estudo da degeneração testicular experimentalmente induzida.

No experimento presente foram realizadas 30 colheitas de sêmen de cada animal, totalizando 180 colheitas, em um prazo de 9 meses. Nas primeiras 20 colheitas (Tabela II), foi efetuada em média, uma colheita cada dois dias e meio, por animal. As colheitas seguintes, da 21.ª a 30.ª, realizadas 3, 4, 5 e 9 meses após o tratamento, naturalmente contaram com intervalos maiores entre uma e outra. Na verdade,

pelo cômputo geral da Tabela II, essas variações não interferiram na qualidade do sêmen, o que também foi verificado por RATHORE & YEATES³³ (1967). Do mesmo modo, GLOVER¹¹ (1955) afirma que a frequência de ejaculação exerce pouca influência no aparecimento de espermatozoides anormais no sêmen.

Com referência ao volume do sêmen ejaculado, não foram encontradas diferenças antes e após a insulação escrotal (Tabela II e Gráfico 1), fato já anteriormente verificado por SAND³⁶ (1972) utilizando-se de água aquecida para provocar degeneração testicular. O menor volume obtido foi de 0,2 ml e o maior de 1,9 ml, com média geral de 1,0 ml, valor considerado normal para a espécie ovina (MIES F.^o24, 1970).

No tocante às ondas microscópicas (Tabela II e Gráfico 2), estas refletem um efeito combinado da concentração esper-

TABELA II

Variações no quadro espermático (volume, ondas microscópicas, motilidade, pH, concentração e malformações) de carneiros submetidos à insulação escrotal, respectivamente por 4 e 8 dias (médias de 3 animais por tratamento)

Colheitas n.º	Dias	Volume (ml)		Ondas Microscópicas *		Motilidade (%)		pH		Concentração **		Williams ***		Formol Salino ****	
		4 dias	8 dias	4 dias	8 dias	4 dias	8 dias	4 dias	8 dias	4 dias	8 dias	4 dias	8 dias	4 dias	8 dias
1	1	0,73	0,45	2,0	2,0	70,0	80,0	6,4	6,4	1.933	2.100	5,7	4,0	7,5	6,5
2	4	1,43	0,90	2,0	2,0	70,0	85,0	6,4	6,4	2.033	2.500	4,3	3,0	7,0	5,0
3	6	1,60	0,75	1,3	2,0	66,7	75,0	6,4	6,4	2.638	2.475	6,3	3,8	6,6	6,0
4	8	1,50	1,05	1,7	1,5	80,0	80,0	6,4	6,5	2.177	2.640	2,7	2,7	7,5	3,5
5	11	1,90	0,75	2,0	1,5	86,7	75,0	6,4	6,4	2.783	3.100	7,1	3,0	6,6	6,1
6	13	1,77	0,35	1,7	1,5	80,0	70,0	6,4	6,4	3.375	2.288	6,1	5,1	16,8	9,3
7	15	1,60	0,50	0,7	1,0	56,7	40,0	6,4	6,7	2.387	2.295	8,1	5,0	25,5	8,1
8	18	1,47	0,60	0,7	1,0	36,7	40,0	6,4	6,5	2.585	2.100	6,1	8,7	43,0	17,6
9	20	1,37	0,20	0,0	0,0	28,3	2,5	6,6	6,8	1.067	305	8,3	7,7	32,6	33,6
10	22	1,40	0,60	0,0	0,0	10,0	0,0	6,7	7,0	788	413	12,3	11,3	38,3	37,3
11	25	0,77	0,35	0,0	0,0	3,3	0,0	6,6	6,7	1.017	90	23,7	25,3	54,6	43,3
12	27	0,87	0,50	0,0	0,0	1,7	0,0	6,6	6,7	437	120	26,3	27,3	56,8	42,6
13	29	1,00	0,60	0,0	0,0	1,7	0,0	6,7	6,8	178	140	36,3	40,0	78,0	100,0
14	32	0,87	0,30	0,0	0,0	0,0	0,0	6,9	7,1	69	788	74,6	56,3	85,3	99,0
15	34	0,67	0,20	0,0	0,0	0,0	0,0	7,1	6,8	25	143	96,6	71,4	100,0	100,0
16	36	0,73	0,50	0,0	0,0	0,0	0,0	6,9	7,0	32	43	100,0	100,0	100,0	100,0
17	39	0,83	0,65	0,0	0,0	1,7	0,0	6,8	7,1	87	190	87,0	100,0	69,3	100,0
18	46	0,83	0,40	0,0	0,0	0,0	0,0	6,8	7,0	28	15	75,8	64,8	76,6	100,0
19	48	0,87	0,20	0,0	0,0	0,0	0,0	7,1	7,0	62	10	19,5	3,5	12,3	4,2
20	50	0,93	0,50	0,0	0,0	0,0	0,0	6,9	7,1	40	20	2,0	3,0	10,1	3,0
21	88	1,10	0,65	1,0	3,0	30,0	85,0	6,8	6,7	255	1.410	1,5	4,5	9,6	3,0
22	97	0,73	0,40	1,0	3,0	28,3	40,0	7,0	6,7	842	2.010	3,8	4,0	3,6	2,5
23	111	0,90	0,60	0,7	3,0	31,7	90,0	6,7	6,5	1.073	2.298	3,0	2,5	6,1	1,8
24	118	1,00	0,50	1,0	3,5	33,3	85,0	6,7	6,5	1.670	1.950	1,2	2,0	1,5	3,5
25	127	0,70	0,30	1,3	2,5	50,0	60,0	6,8	6,8	1.860	1.880	1,5	3,0	1,8	2,0
26	148	1,17	1,10	2,3	2,0	66,7	65,0	6,5	7,0	2.793	2.635	1,2	3,0	2,2	1,0
27	158	1,07	0,45	1,7	2,0	50,0	50,0	6,6	6,6	2.200	1.993	2,0	2,5	2,0	2,5
28	261	0,97	0,50	2,3	2,0	66,7	45,0	6,3	6,0	1.852	1.583	2,5	3,5	2,5	3,0
29	267	0,87	0,45	1,7	2,0	66,7	55,0	6,0	6,5	1.845	1.800	2,5	5,0	2,0	3,0
30	274	1,17	0,60	2,0	2,0	56,7	70,0	6,0	6,5	2.175	1.428	2,0	2,5	2,0	2,5

* Escala arbitrária: muito pobre = 0; pobre = 1; regular = 2; bom = 3; muito bom = 4.

** Número de espermatozoides por $\text{mm}^3 \times 10^6$.

*** Porcentagens de malformações verificadas na cabeça dos espermatozoides.

**** Porcentagens de malformações verificadas na peça intermediária e cauda dos espermatozoides.

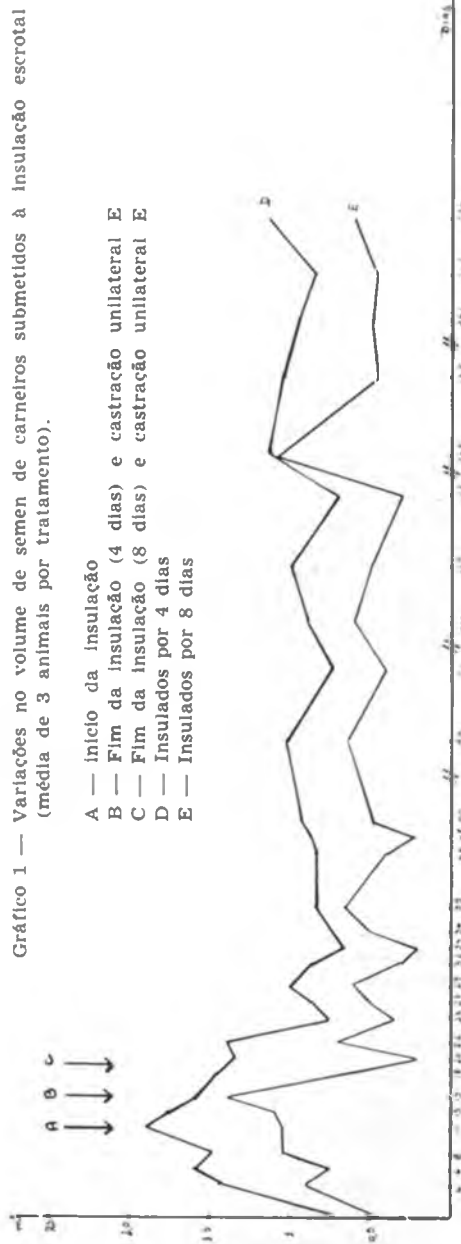
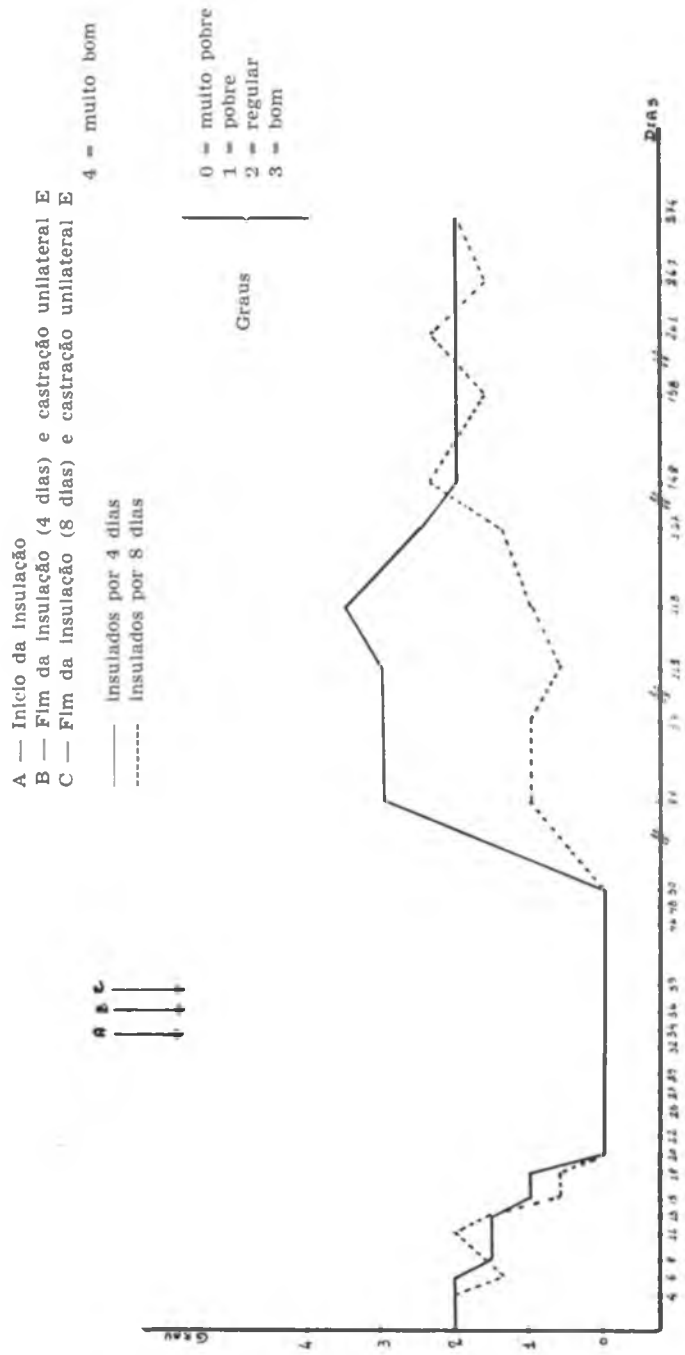


Gráfico 2 — Variações nas ondas microscópicas do semen de carneiros submetidos a insu-
lação escrotal (média de 3 animais por tratamento).



mática e da viabilidade dos espermatozoides. De início, os exames revelaram ondas em movimentos apenas distinguíveis, caracteres esses que são classificados como regulares (2). Coincidindo com a queda de motilidade, isto é, cerca de 4 dias após o início da insulação, as ondas microscópicas foram desaparecendo gradualmente até se tornarem ausentes na 9.^a colheita, o que indica espermatozoides imóveis, revelando sêmen muito pobre (0). O reaparecimento de ondas microscópicas apenas se verificou decorridos 3 meses do tratamento, em janeiro de 1973, retornando então praticamente às mesmas características observadas na fase pré experimental, e que se mantiveram até o final do experimento.

A diminuição da motilidade espermática foi se acentuando e tornou-se nula a partir do 11.^o dia para os animais do 2.^o grupo e depois de vinte e um dias para o 1.^o grupo, evidenciando, portanto, ausência mais precoce de motilidade nos animais que tiveram seus testículos submetidos à elevação da temperatura local por período de tempo mais longo. O início da recuperação dos animais, neste aspecto, também só se evidenciou 3 meses após o tratamento e, surpreendentemente, de um modo geral, o 2.^o grupo apresentou melhores porcentagens de motilidade espermática que o primeiro, o que foi mantido até se completar o 9.^o mês. A diminuição, seguida de ausência de motilidade dos espermatozoides e posterior recuperação também foram verificadas por STARKE⁴⁰ (1949), BRADEN & MATTNER³ (1970), GLOVER¹¹ (1958), WAITES & ORTAVANT⁴¹ (1968), SETCHELL et al.³⁷ (1971), MUCCIOLO²⁷ (1972) e SAND³⁶ (1972), autores que provocaram a degeneração testicular experimental em carneiros.

O exame da Tabela II e do gráfico 4 indica que a concentração hidrogeniônica do sêmen dos animais dos dois grupos tratados mostrou leve tendência à alcalini-

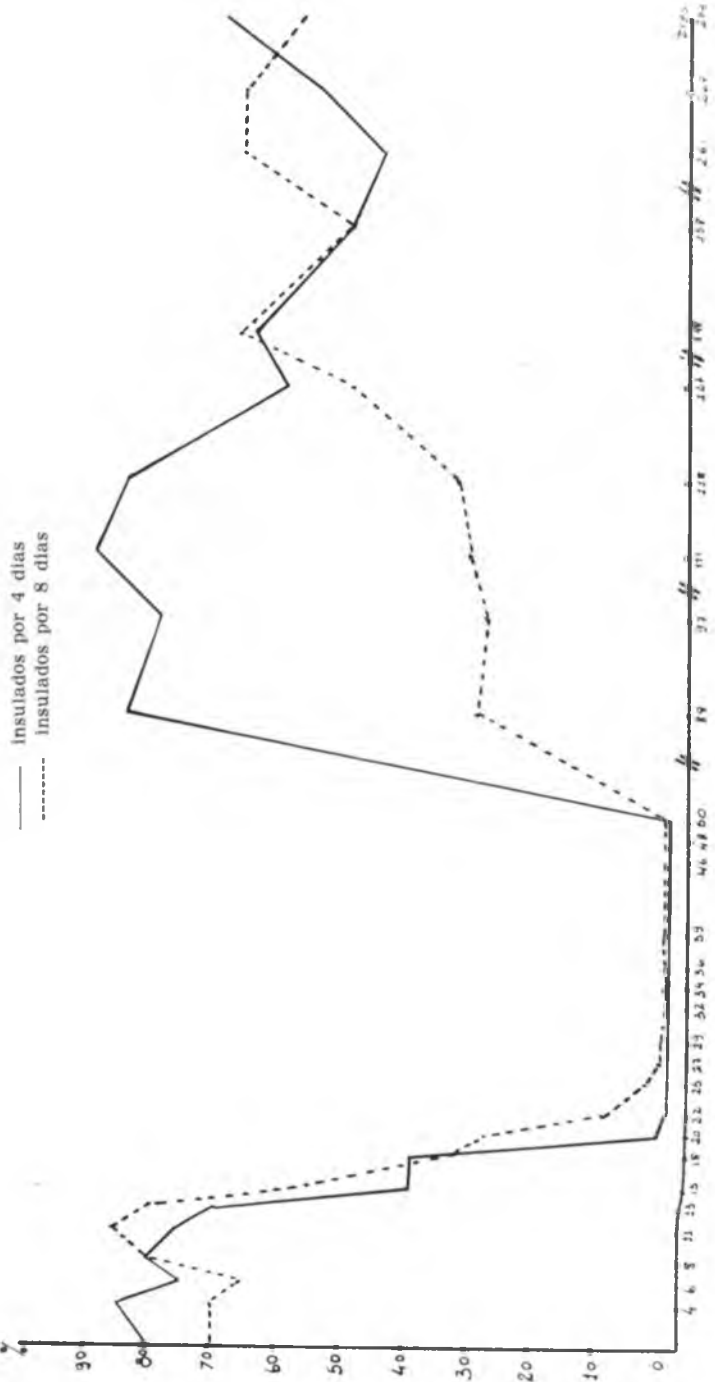
dade a partir da primeira semana após a insulação escrotal. Os dados obtidos estão de acordo com a afirmação feita por MUCCIOLO²⁷ (1972), de que o pH alcalino indica qualidade desfavorável do sêmen. Do confronto da Tabela II e gráfico 4, com os gráficos 3 e 5, verifica-se que quando o pH é mais elevado que o normal (6,2 a 6,8, MIES F.^o²⁴, 1970), tanto a motilidade quanto a concentração espermática tendem a diminuir. Por outro lado, comparando-se os valores de pH do sêmen com os gráficos 6 e 7, constata-se que pequenos aumentos de pH estão associados com muito maior porcentagem de espermatozoides morfológicamente anormais.

A concentração espermática (Tabela II e gráfico 5), que indica o número de espermatozoides por milímetro cúbico, sofreu nítida queda já na primeira semana após o início da insulação, à medida em que aumentaram as porcentagens de cabeças anormais (gráfico 6) e de defeitos da peça intermediária e da cauda (gráfico 7). Essa correlação inversamente proporcional entre concentração espermática e formas anormais de espermatozoides está de acordo com os dados de DJANUAR⁷ (1965), RATHORE & YEATES³³ (1967), RATHORE³¹ (1969), SMITH³⁹ (1971) e MUCCIOLO²⁷ (1972). A recuperação para níveis normais de concentração, assim como a motilidade, foi mais rápida no 2.^o grupo (77 dias) enquanto que o 1.^o grupo, com ascensão mais lenta, levou cerca de 100 dias para ultrapassar um milhão de espermatozoides por milímetro cúbico. A seguir houve uma inversão nessas características e o grupo de animais insulados por 4 dias suplantou a concentração do 2.^o grupo, mantendo-a assim até a última colheita efetuada.

As alterações morfológicas (Tabela II) da cabeça dos espermatozoides estão representadas no gráfico 6, e as da peça intermediária e cauda no gráfico 7, podendo, algumas dessas, ser melhor observadas nas

Gráfico 3 — Variações na motilidade espermática de carneiros submetidos à insulação escrotal (média de 3 animais por tratamento).

A — Início da insulação
 B — Fim da insulação (4 dias) e castração unilateral E
 C — Fim da insulação (8 dias) e castração unilateral E



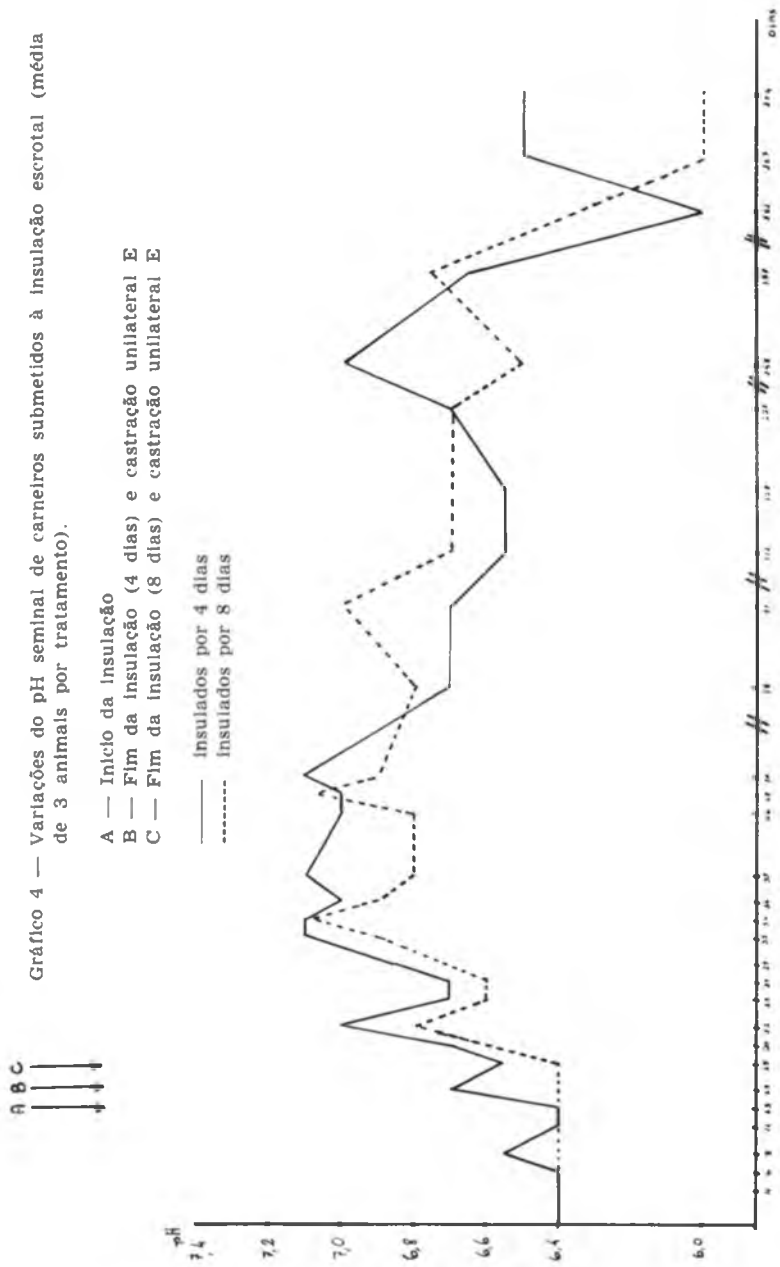
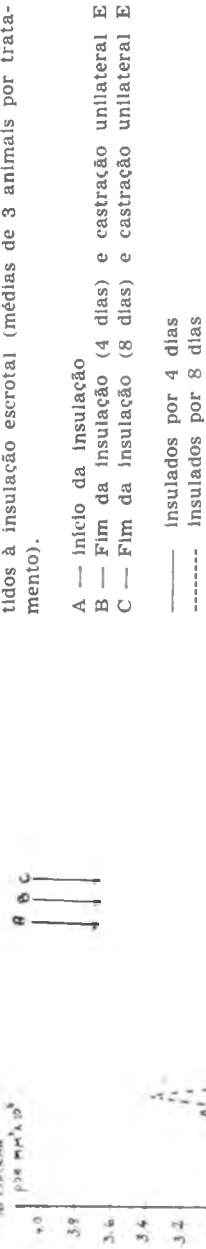
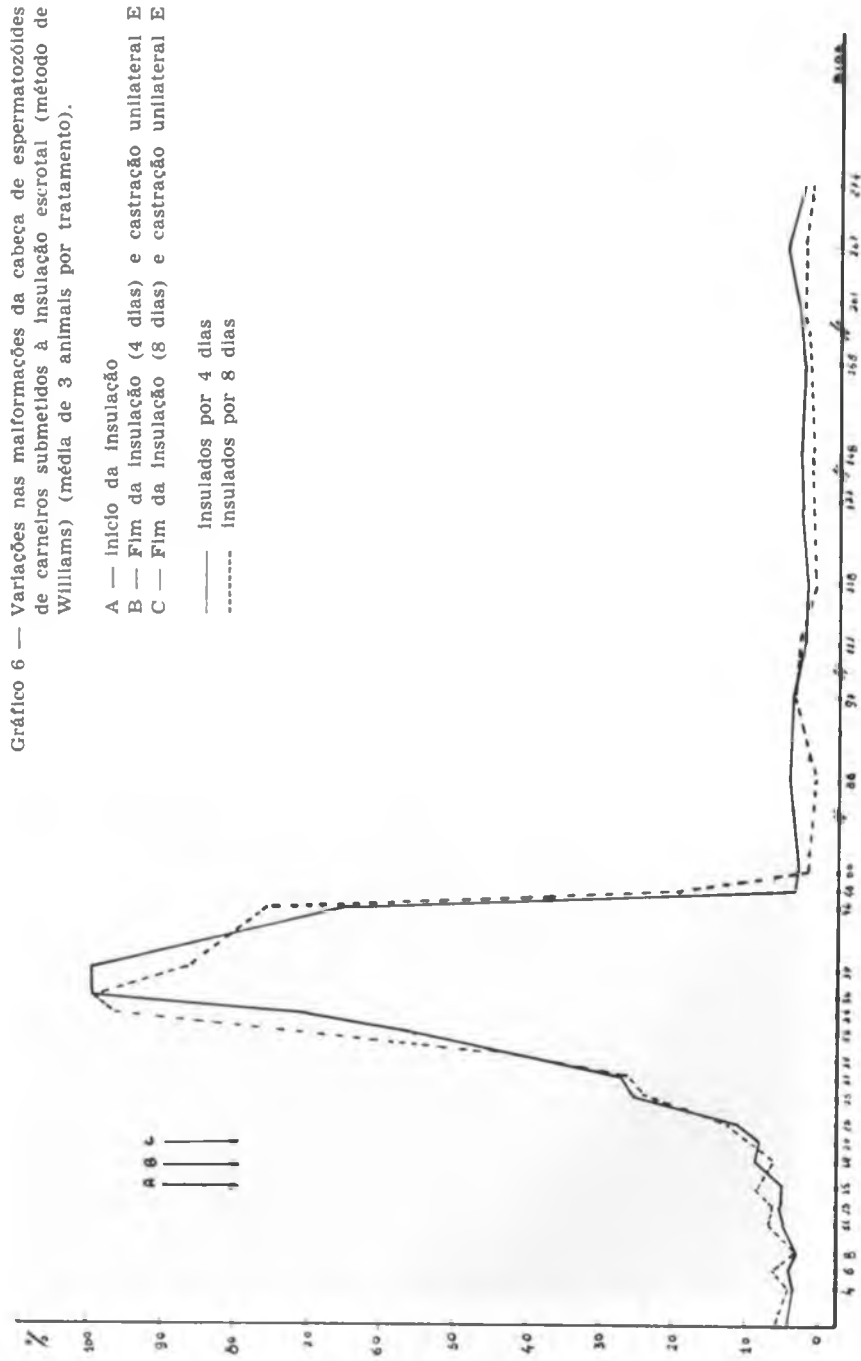
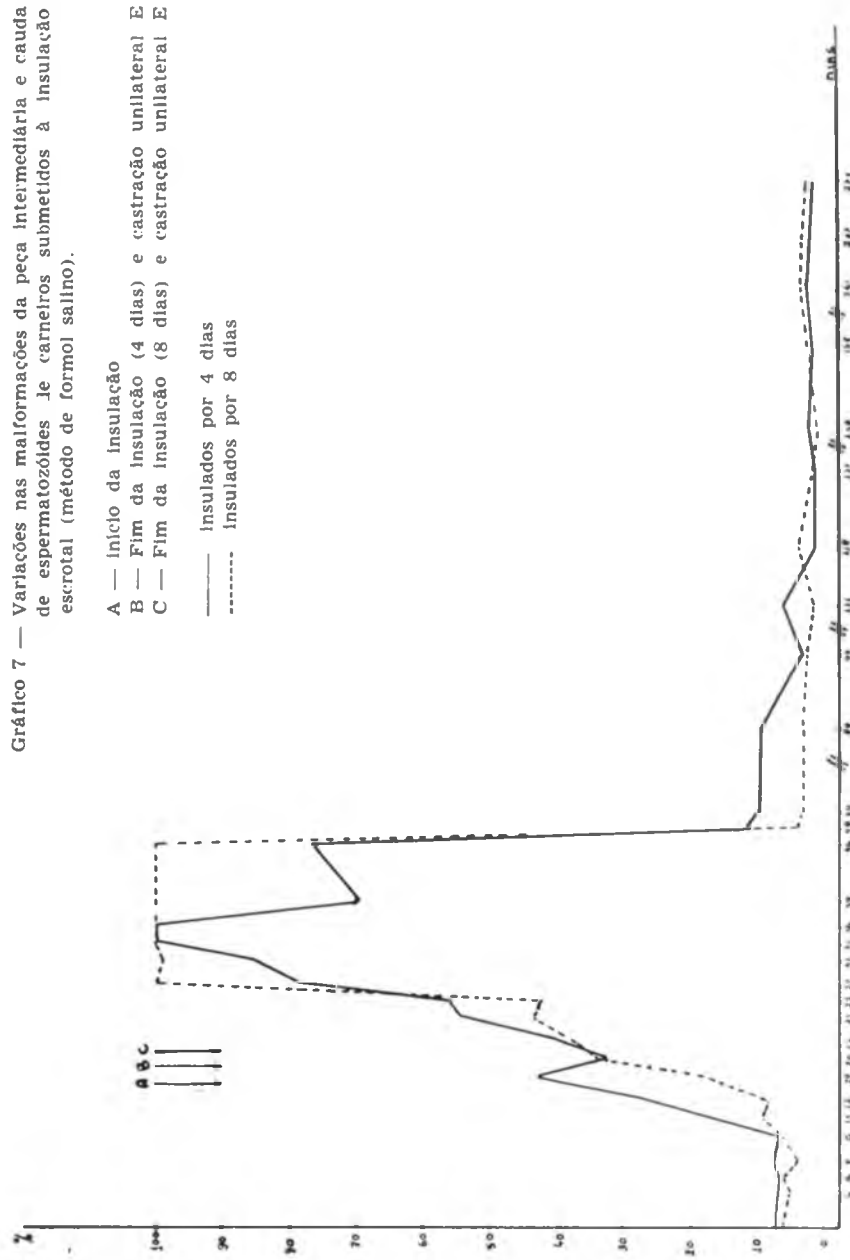


Gráfico 5 — Variações na concentração espermática de carneiros submetidos à insulação escrotal (médias de 3 animais por tratamento).







fotos 4, 5, 6, 7 e 8. Como é óbvio, os defeitos da peça intermediária e cauda ultrapassaram os limites aceitáveis (LAGERLOF¹⁹, 1934) antes que os da cabeça, iniciando-se a partir de dois dias após insulação no primeiro grupo e sete dias no segundo. Esses resultados diferem daqueles obtidos por MOULE & WAITES²⁶ (1963), em que as primeiras formas anormais a surgirem no sêmen foram verificadas de 13 a 21 dias após o tratamento, o que também obtivemos no tocante às alterações morfológicas da cabeça que se acentuaram a partir da segunda semana para os dois grupos simultaneamente.

O grau de anormalidades morfológicas manteve índices elevados, às vezes atingindo 100%, principalmente entre os dias 15 e 35 após o início da insulação, para em seguida sofrer um rápido retorno à normalidade, antes mesmo da recuperação de outras características como concentração, motilidade e ondas microscópicas. Essa tendência progressiva de regeneração iniciou-se em primeiro lugar, em-

bora com pequenas diferenças, no grupo de animais que sofreu insulação escrotal por 4 dias. O processo de degeneração testicular experimental seguido de progressivas regenerações foi também verificado por GLOVER¹¹ (1955), MOULE & WAITES²⁶ (1963), DJANUAR⁷ (1965), RATHORE & YEATES³³ (1967), RATHORE³¹ (1969), HOWARTH¹⁶ (1969) e MUCCILO²⁷ (1972).

Pelo exame dos caracteres histológicos, como era de se esperar, verificou-se maior destruição do epitélio germinativo nos animais tratados durante 8 dias, embora em ambos os grupos, tenham sido encontradas células com degeneração vacuolar e células gigantes multinucleadas. Todavia, o processo de degeneração testicular mostrou sua reversibilidade, porquanto os cortes histológicos dos testículos retirados no final do experimento mostraram aspecto perfeitamente normal (foto n.º 3). Segundo LAGERLOF¹⁹ (1934) todo processo degenerativo testicular é passível de reversibilidade desde que não sejam des-



Foto n.º 4 — Espermatozóide com gota proximal. Microscopia de fase. Aproximadamente 1.000 x.



Foto n.º 5 — Espermatozóide com peça intermediária dupla. Microscopia de fase. Aproximadamente 1.000 ×.



Foto n.º 6 — Espermatozóide com cabeça e peça intermediária duplas e caudas simples. Microscopia de fase. Aproximadamente 1.000 ×.



Foto n.º 7 — Espermatozóide com cabeça e peça intermediária duplas e cauda bifurcada. Microscopia de fase. Aproximadamente 1.000 x.



Foto n.º 8 — Espermatozóide com cauda curva sobre a cabeça. Microscopia de fase. Aproximadamente 1.000 x.

truídas as células de Sertoli. Esses resultados corroboraram as observações feitas por SIMPSON³⁸ (1960), WAITES & ORTAVANT⁴¹ (1968), BRADEN & MATTNER³ (1970), SETCHELL et al.³⁷ (1971) e MUCCIOLO²⁷ (1972).

CONCLUSÕES

A vista dos resultados conseguidos e, dentro dos limites em que se desenvolveu o experimento, pode-se concluir que:

1 — A frequência de ejaculação não interferiu na qualidade do sêmen.

2 — O volume de sêmen ejaculado não foi afetado pela insulação escrotal.

Por outro lado, a insulação escrotal em ovinos, por períodos de 4 ou 8 dias seguidos, provocou distúrbios da espermatogênese evidenciados por:

3 — As ondas microscópicas desapareceram gradualmente a partir do quarto dia de insulação, em ambos os grupos, retornando decorridos três meses do tratamento.

4 — A motilidade dos espermatozoides sofreu diminuição a partir do 11.º dia para o 2.º grupo e 21.º dia para o 1.º grupo, evidenciando valores nulos tanto mais rapidamente quanto mais longo foi o período de insulação. O retorno às condições normais deu-se três meses após o tratamento e, surpreendentemente, o grupo de animais insulados por oito dias apresentou porcentagens de motilidade melhores que o grupo de quatro dias.

5 — A concentração hidrogeniônica do sêmen tendeu a passar da faixa ácida para a alcalina a partir da primeira semana nos dois grupos. Essa elevação do pH foi inversamente proporcional à motilidade e concentração espermáticas e diretamente proporcional à porcentagem de

anormalidades morfológicas dos espermatozoides.

6 — A concentração espermática sofreu nítida queda a partir da primeira semana, praticamente coincidindo com o aumento de anormalidades morfológicas e retornou aos níveis normais 100 dias após para o primeiro grupo e 77 dias depois da insulação para o segundo grupo. No final do experimento, entretanto, o grupo insulado por menor período de tempo, apresentou índices melhores de concentração que o segundo grupo.

7 — As anomalias da peça intermediária e da cauda começaram a aparecer no sêmen, já no segundo dia para o primeiro grupo e no 7.º dia para o segundo grupo, enquanto que as alterações morfológicas da cabeça acentuaram-se a partir da segunda semana para ambos os grupos simultaneamente. Os índices mais elevados mantiveram-se entre o 15.º e 35.º dia após o início da insulação, iniciando-se então a regeneração em primeiro lugar, nos animais submetidos a 4 dias de insulação escrotal.

8 — As alterações histológicas dos testículos foram tanto mais pronunciadas quanto mais longo foi o tempo da insulação escrotal. Todavia, esses processos foram reversíveis em ambos os grupos tratados.

9 — A ordem cronológica para surgimento dos distúrbios da espermatogênese foi a seguinte: 1.º) anormalidades da peça intermediária e cauda dos espermatozoides; 2.º) desaparecimento das ondas microscópicas; 3.º) elevação do pH e diminuição da concentração espermática; 4.º) anormalidades da cabeça dos espermatozoides e 5.º) queda da motilidade espermática.

10 — Similarmente, a regeneração se deu na seguinte ordem: 1.º retorno aos

MUCCILOLO, R. G. et al. — Variações no quadro espermático de carneiros submetidos a degeneração testicular experimental. *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 11:155-77, 1974.

limites normais de anormalidades morfológicas; 2.º) aparecimento de ondas microscópicas e recuperação da motilidade espermática; 3.º) volta da concentração

espermática aos níveis normais e 4.º) recuperação dos limites normais de pH do sêmen.

RFMV-A/18

MUCCILOLO, R. G. et al. — *Semen picture in rams after induced testicular degeneration*. *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 11:155-77, 1974.

SUMMARY: Six rams of the "Crioula" breed were divided, at random, in 2 groups and submitted to scrotal insulation during 4 and 8 days respectively. During 9 months, 180 semen collections were made by electric shocks. Research was conducted on semen volume, semen microscopic waves, motility of spermatozoa, seminal pH, concentration and changes in the morphology of the sperm cells through the Williams stain and formol saline methods, and histologic alterations in the testicles.

Analysis of data revealed that frequency of ejaculations did not interfere in semen quality and semen volume was not affected by scrotal insulation. On the other hand, the semen picture was disturbed in microscopic waves, motility, pH, concentration and by increasing of morphologically abnormal spermatozoa. Histologic alterations in the testicles were the more accentuated the longer was the period of scrotal insulation.

Regeneration of these characteristics took place at different intervals of time up to 3 months after experimental scrotal insulation.

UNITERMS: Rams*; Scrotal insulation*; Testicular degeneration*; Semen picture*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AUSTIN, J. W. et al. — Effect of scrotal insulation on semen of hereford bulls. *J. Anim. Sci.*, 20(2):307-10, 1961.
2. BARNABE, R. C. — Degeneração testicular experimental em reprodutores da espécie suína. *Rev. Fac. Med. vet. (S. Paulo)*, 8(2):499-507, 1970.
3. BRADEN, A. W. H. & MATTNER, P. E. — The effects of scrotal heating in the ram on semen characteristics, fecundity and embryonic mortality. *Aust. J. agric. Res.*, 21:509-18, 1970.
4. CARVALHO, C. T. — Sêmen em grandes felinos. *Rev. Fac. Med. vet. (S. Paulo)*, 4(2):195-201, 1968.
5. CASADY, R. B. et al. — The effect of exposure to high ambient temperature of spermatogenesis in the dairy bull. *J. Dairy Sci.*, 36:14, 1953.
6. CUPPS, P. T. et al. — Seasonal changes in the semen of rams. *J. Anim. Sci.*, 19:208-13, 1960.
7. DJANUAR, R. — Effect of high temperature on spermiogenesis of rams. *Commun. Vet.*, 9(1):13-8, 1965.
8. DUTT, H. & BUSH, L. F. — The effects of low environmental temperature on initiation of the breeding season. *J. Anim. Sci.*, 14(3):885-6, 1955.

MUCCILOLO, R. G. et al. — Variações no quadro espermático de carneiros submetidos a degeneração testicular experimental. *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 11:155-77, 1974.

9. DUTT, R. H. & SIMPSON, F. C. — Environmental temperature and fertility of Southdown ram early in the breeding season. *J. Anim. Sci.*, 16: 136-43, 1957.
10. FOOTE, W. C. et al. — The effect of variations in ambient temperature and humidity on rectale and testis temperature of sheared and unshaded rams. *J. Anim. Sci.*, 16:144, 1957.
11. GLOVER, T. D. — Some effects of scrotal insulation on the semen of rams. *Stud. Fertil.*, 7:66-75, 1955.
12. GUNN, R. M. P. et al. — Studies in infertility in sheep. II. Seminal changes affecting fertility in rams. *Bull. Coun. scient. ind. Res. Melb.*, 148, 1942.
13. HAFEZ, E. S. E. — Reproductive capacity of farm animals in relation to climate and nutrition. *J. Amer. vet. med. Ass.*, 135:606, 1959.
14. HAFEZ, E. S. E. et al. — Seasonal variations in semen characteristics of sheep in the sub-tropics. *J. agric. Sci.*, 45:283-92, 1955.
15. HOLST, S. J. — Sterility in boars. *Nord. Vet.-Med.*, 1:87-120, 1949.
16. HOWARTH, B. (Jr.) — Fertility in the ram following exposure to elevated ambient temperature and humidity. *J. Reprod. Fertil.*, 19:179-83, 1969.
17. JOHNSON, A. D. et al. — Effect of elevated ambient temperature on lipid levels and cholesterol metabolism in the ram testis. *J. Anim. Sci.*, 29:469-75, 1969.
18. KALEV, G. et al. — Intensification of semen production in rams. In: CONGRÈS DE REPRODUCTION ET INSEMINATION ARTIFICIELLE, 6ème, Paris, 1968 — *Résumés*, p. 67.
19. LAGERLOF, N. — Researches concerning morphologic changes in the semen picture and in the testicles of sterile and subfertile bulls. *Acta path. microbiol. scand.* (suppl. 19), 1934.
20. MASCARENHAS, H. & GOMES, W. V. — Contribuição ao estudo da eletro-ejaculação em bovinos, ovinos e caprinos. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE VETERINARIA E ZOOTECNIA, 2º. Madrid, 1951. v. 2, p. 483-92.
21. MAZZARRI, G. — Action de la température et de la lumière sur la spermatogenèse, sur la production de spermatozoïdes et le pouvoir fécondant du sperme, chez le verroat. Paris, 1969. [Tese — Faculdade de Ciências da Universidade de Paris].
22. MAZZARI, G. et al. — Action de la température et de la lumière sur la spermatogénese, la production et le pouvoir fécondant du sperme chez le verroat. In: CONGRÈS INTERNATIONAL DE REPRODUCTION ANIMALE ET INSEMINATION ARTIFICIELLE, 6ème, Paris, 1968 — *Proceedings*. Paris, Institut National de la Recherche Agronomique, 1968. v. 1, p. 305-8.
23. MIES FILHO, A. — Alguns aspectos da esterilidade ovina. *Bol. Soc. paul. Med. vet.*, 9(n.º único):119-38, 1956.
24. MIES FILHO, A. — *Reprodução dos animais e inseminação artificial*. 2. ed. Porto Alegre, Livr. Sulina Ed., 1970. p. 347-68.
25. MOORE, C. R. — Heat application and testicular degeneration: the function of the scrotum. *Amer. J. Anat.*, 34:337-58, 1924.
26. MOULE, G. R. & WAITES, G. M. H. — Seminal degeneration in the ram and its relation to the temperature of the scrotum. *J. Reprod. Fertil.*, 5(3):433-46, 1963.
27. MUCCILOLO, R. G. — Degeneração testicular experimental em ovinos da raça Crioula (*Ovis aries*). São Paulo, 1972. [Tese — Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo].
28. PHILLIPS, R. W. et al. — Seasonal variations in the semen of sheep and goats. *Cornell Vet.*, 33(3):277-35, 1943.

MUCCILOLO, R. G. et al. — Variações no quadro espermático de carneiros submetidos a degeneração testicular experimental. *Rev. Fac. Med. vet. Zootec. Univ. S. Paulo*, 11:155-77, 1974.

29. RAO, A. R. — Changes in the morphology of sperm during their passage through the genital tract in bulls with normal and impaired spermatogenesis. Estocolmo, 1971. [Tese — Colégio Real de Veterinária].
30. RATHORE, A. K. — Effects of high temperature on sperm morphology and subsequent fertility in Merino sheep. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.*, 7:270-4, 1968.
31. RATHORE, A. K. — Mid-piece sperm abnormality due to high temperature exposure of rams. *Brit. vet. J.*, 125:534-7, 1969.
32. RATHORE, A. K. — A note on the relation between scrotal wool cover and fertility in Merino rams. *Anim. Prod.*, 12:165-7, 1970.
33. RATHORE, A. K. & YEATES, N. T. M. — Morphological changes in ram spermatozoa due to heat stress. *Vet. Rec.*, 81:343-4, 1967.
34. SAHNI, K. L. & ROY, A. — Influence on semen quality of rams and effects of dilutors and dilutions on *in vitro* preservation. *Indian J. Anim. Sci.*, 39(1):1-14, 1969.
35. SAHNI, K. L. & ROY, A. — A note on summer sterility in Romney Marsh rams under tropical conditions. *Indian J. vet. Sci.*, 37(4):335-8, 1967.
36. SAND, R. S. — Blood flow changes in the testes of heatstressed South-down rams. *Diss. Abstr. int. B.*, 32, 1937B/1938B apud *Anim. Breed. Abstr.*, 40(2):1997, 1972.
37. SETCHELL, B. P. et al. — The effect of local heating on the flow and composition of rete testis fluid in the conscious rams. *J. Reprod. Fertil.*, 24:87-9, 1971.
38. SIMPSON, E. C. — Semen production and fertility of ram following exposure to controlled ambient temperatures. Nashville, 1960. [Tese — Universidade de Kentucky] apud *Diss. Abstr.*, 26:4143-4, 1966.
39. SMITH, J. F. — The effect of temperature on characteristics of semen of rams. *Aust. J. agric. Res.*, 22:481-90, 1971.
40. STARKE, N. C. — The sperm picture in rams of different breeds as an indication of their fertility. II. The rate of sperm travel in the genital tract of the ewe. *Onderstepoort. J. vet. Sci. Anim. Ind.*, 22(2):415-525, 1949.
41. WAITES, G. M. H. & ORTAVANT, R. — Effects précoces d'une brève élévation de la température testiculaire sur la spermatogenèse du bélier. *Ann. Biol. anim.*, 8(3):323-31, 1968.
42. WAITES, G. M. H. & SETCHELL, B. P. — Effect of local heating on blood flow and metabolism in the testis of the conscious ram. *J. Reprod. Fertil.*, 8:339-49, 1964.

Recebido para publicação em 30-7-74

Aprovado para publicação em 29-8-74