

Jane Vignado



"Efeito do Hipotireoidismo induzido experimentalmente com Methimazole sobre o Testículo de ratos de várias idades"

Campinas, S.P
1995

Jane Vignado

"Efeito do Hipotireoidismo induzido experimentalmente com Methimazole sobre o Testículo de ratos de várias idades."

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas. - Área de Concentração Fisiologia

Orientador: *Prof. Dr. Ernesto José D Ottaviano*

Campinas, S.P
1995

PREÇO 2411,00
DATA 16/01/96
N.º CPD

CM-00082529-6

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

V683e Vignado, Jane
Efeito do hipotireoidismo induzido experimentalmente
com Methimazole sobre o testículo de ratos de várias
idades / Jane Vignado. – Campinas, SP : [s.n.], 1995.

Orientador: Ernesto José D'Ottaviano.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Testículos. 2. Hipotireoidismo. 3. Espermatogênese.
4. *Methimazole. 5. Células de Sertoli. I. D'Ottaviano,
Ernesto José. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

"Efeito do Hipotireoidismo induzido experimentalmente com Methimazole sobre o Testículo de ratos de várias idades".

Jane Vignado

Dissertação submetida ao Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas - Área de concentração Fisiologia.

Dissertação Aprovada em 13.9.1995 por:


Prof. Dr. Ernesto José D. Ottaviano (Orientador)


Profª. Dra. Mary Anne Heidi Dolder


Prof. Dr. Norair Salviano dos Reis

Prof. Dr. Rui Errerias Maciel

Ao *Caio* e a nossa filha *Juliana*

Pela compreensão nas muitas horas de ausência, pela estímulo nos momentos difíceis e por fazerem tudo valer a pena,
com amor, dedico.

Aos meus pais *João e Maria*

Pela coragem, pela determinação e por terem como principal objetivo a educação dos filhos.

AGRADECIMENTOS:

À Fundação Universidade Federal de Mato Grosso, pela permissão de afastamento de minhas atividades docentes nos anos de 1993, 1994 e 1995/1, possibilitando a realização do presente estudo, em nome dos representantes da Coordenação de Pós - Graduação, do Instituto de Biociência e do Departamento de Biologia e Zoologia.

Ao Prof. Dr. Ernesto José D'Ottaviano, pela orientação do presente estudo.

Aos membros da banca examinadora Profa. Dra. Mary Anne Dolder, Prof. Dr. Norair Salviano dos Reis e Prof. Dr. Rui Errerias Maciel, pela importante discussão técnico-científica realizada durante a fase de pré-banca.

Ao Prof. Carlindo Rodrigues do Nascimento, do Departamento de Educação da Universidade do Estado de Mato Grosso, pela valiosa contribuição durante a fase de redação do presente estudo.

Ao corpo docente do mestrado em Ciências Biológicas - Área de concentração Fisiologia da Unicamp, pelos ensinamentos recebidos.

Ao Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Ciências Biológicas da Unicamp em nome:

- da Profa. Dra. Maria do Carmo Alberto Rincon, chefe do departamento de Histologia e Embriologia, pelo apoio e acolhida durante a realização da parte experimental do presente estudo.

- do Prof. Dr. Norair Salviano dos Reis, pelo apoio científico, disponibilidade, dedicação, incentivo e amizade.
- da Profa. Dra. Iara M. S. De-Luca, pela ajuda durante a realização das fotomicrografias e pelas valiosas sugestões apresentada durante a redação final da dissertação.
- dos Professores do departamento de Histologia e Embriologia, pela amizade.
- dos Técnicos Srta. Cleusa, Sr. Marcos, Sra. Marta Beatriz e Sra. Martha Almeida do laboratório de técnicas histológicas, pelo apoio técnico e amizade.
- dos Funcionários Sr. Baltazar, Srta. Helena, Sra. Raquel, Sra. Rita e Sra. Vânia, pelo carinho e amizade.

À Clínica e Centro de Pesquisa em Reprodução Humana Roger Abdelmassih, em nome do Prof. Dr. Roger Abdelmassih pela possibilidade de realizar as dosagens de Testosterona plasmáticas e da Srta. Icléia pelo apoio técnico.

Ao Laboratório de Fisiologia Clínica do Núcleo de Medicina Experimental da Unicamp em nome do Prof. Dr. Gilberto D'Assunção Fernandes, pela possibilidade de realizar as dosagens de Tiroxina plasmáticas e dos funcionários, Sr. Roberto e Sr. Paulo Cesar, pelo apoio técnico.

Ao Laboratório Eli Lilly do Brasil, pelo gentil fornecimento da droga Methimazole.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto da Silva Lima, do Instituto de Física da Unicamp, pela colaboração na realização do Abstract.

Ao Elton Maurício Teixeira Urici, pela colaboração nos cálculos estatísticos.

Ao Laboratório de Digestivo e Nutrição, do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Unicamp em nome:

- do Prof. Dr. Miguel Arcanjo Areas e da Profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes, pelo empréstimo de equipamentos técnicos necessários à realização do presente estudo.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Unicamp, em especial ao Sr. Machado, a Sr. Aparecida, a Sra. Elídia e a Sra. Sônia, que com carinho, amizade e disponibilidade, ajudaram a superar os diversos obstáculos enfrentados, durante o transcorrer do presente estudo.

Às colegas de Mestrado Estela, Fernanda, Patrícia, Suzete e Verônica, pelo carinho e companheirismo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa de estudo nos anos de 1993, 1994, e 1995/1.

Aos meus irmãos Jocy, João, Joceli, ao meu cunhado Lauter e a minha sogra Sra. Edith, pelo apoio e incentivo.

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse estudo.

SUMÁRIO:

RESUMO

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	06
3. MATERIAL E MÉTODOS	07
3.1. Material	07
3.2. Métodos	07
3.2.1. Acasalamento	07
3.2.2. Tratamento.....	08
3.2.3. Procedimentos Básicos em Microscopia de Luz	10
3.2.4. Avaliação do Diâmetro dos Túbulos Seminíferos	11
3.2.5. Avaliação dos Diâmetros e do Volume do Núcleo das Células de Sertoli.....	12
3.2.6. Avaliação da Espermatogênese e do Interstício Testicular.....	13
3.2.7. Avaliação Hormonal.....	14
3.2.8. Avaliação Morfológica do Fígado e da Tireóide	15
3.2.9. Tratamento Estatístico dos Dados	15
4. RESULTADOS.....	17
4.1. Hipotireoidismo Materno.....	17
4.2. Avaliação Biométrica	19
4.2.1. Peso Corporal.....	19

4.2.2. Peso e Comprimento Testicular.....	22
4.3. Histologia do Testículo	28
4.3.1. Grupo experimental fetos com 19 dias de gestação.....	28
4.3.2. Grupo experimental animais com 8 dias de idade.....	30
4.3.3. Grupo experimental animais com 21 dias de idade.....	32
4.3.4. Grupo experimental animais com 35 dias de idade.....	36
4.3.5. Grupo experimental animais com 50 dias de idade.....	41
4.3.6. Grupo experimental animais com 90 dias de idade.....	47
4.3.7. Avaliação dos eixos ortogonais e do volume nuclear das células de Sertoli	52
4.4. Avaliação Hormonal.....	55
4.4.1. Fluorimunoensaio de Testosterona.....	55
4.4.2. Radioimunoensaio de Tiroxina (T ₄).....	58
4.5. Morfologia da glândula da Tireóide e do fígado	61
5. DISCUSSÃO.....	63
6. CONCLUSÃO.....	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

ABSTRACT

RESUMO

Embora seja do conhecimento geral que os hormônios tireoidianos estão envolvidos no desenvolvimento e manutenção de vários órgãos, ainda, existem aspectos contraditórios sobre seu papel na fisiologia testicular.

Com a proposta de melhor compreender a influência dos hormônios tireoidianos na manutenção testicular, este estudo teve como objetivo avaliar parâmetros biométricos, morfológicos e hormonais em ratos de várias idades, que foram induzidos experimentalmente ao hipotireoidismo com doses diárias de 0,05 mg de Methimazole, confirmado pelas dosagens de Tiroxina (T₄).

Neste estudo utilizaram-se 68 ratos brancos (*Rattus norvegicus*, variedade albino), machos e 12 fetos. Estes animais foram sub divididos em 6 grupos experimentais, de acordo com o tempo de tratamento e a data do sacrifício e denominados: *Hipotireoidismo materno-fetal (19º dia de vida fetal), 8 dias de idade, 21 dias de idade, 35 dias de idade, 50 dias de idade e 90 dias de idade.*

Os resultados mostraram que a indução do hipotireoidismo no oitavo dia de prenhez, que corresponde ao início da organogênese do rato, não resulta em aumento da incidência de reabsorção fetal ou de malformações congênitas e também não leva a alterações no comportamento dos animais com hipotireoidismo.

Em todos os grupos experimentais analisados, os animais tratados apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) do peso corporal em relação aos animais controles da mesma idade.

A avaliação biométrica dos testículos mostrou que os animais tratados apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) do peso testicular, do diâmetro dos túbulos seminíferos e do volume nuclear das células de Sertoli. Apenas os fetos com 19 dias de vida intra-uterina não mostraram diferenças nos parâmetros acima citados .

A morfologia dos testículos dos animais tratados mostrou atraso no início do estadiamento do ciclo do epitélio seminífero, com redução da quantidade de células germinativas e aumento do número de células degeneradas. Nos grupos experimentais 50 dias e 90 dias de idade, os animais tratados apresentaram estadiamento completo do epitélio seminífero, mas a frequência dos estádios I, VII/VIII e XIV foi menor do que a dos animais controles da mesma idade.

As dosagens em duplicata da testosterona plasmática, pelo método de fluoroimunoensaio de fase sólida, não mostraram diferenças significativas entre os valores encontrados nos animais controles e tratados.

Conclui-se que o hipotireoidismo prejudica acentuadamente a espermatogênese dos ratos jovens, prejuízo detectável através da redução do peso testicular, da diminuição do diâmetro dos túbulos seminíferos, do aumento de células germinativas degeneradas, do atraso da espermatogênese e da redução do volume nuclear das células de Sertoli.

Nos animais tratados com 90 dias de idade, ocorre ganho consideravelmente maior do peso testicular, do diâmetro dos túbulos seminíferos em relação aos animais controles da mesma idade e aparente estabilização no volume nuclear das células de Sertoli, sugerindo ausência da participação dos hormônios tireoidianos sobre o testículo do rato adulto.

1. INTRODUÇÃO:

Estudos que possibilitam melhor compreensão das causas da infertilidade do homem e de animais de interesse científico e/ou econômico, como também a busca de possíveis estratégias na reversão do quadro de esterilidade e o aumento da produção de espermatozóides viáveis por mm^3 , vêm atualmente despertando interesse nas áreas de fisiologia, biologia molecular, imunologia e outras.

A espermatogênese nos mamíferos adultos acontece no complexo epitélio dos túbulos seminíferos dos testículos, sendo definida, segundo BUSTON-OBREGON *et al.*(1975), como o processo que ocorre entre o surgimento de uma espermatogônia mãe e a liberação de um espermatozóide produzido a partir dela.

As células germinativas organizam-se em estratos distintos nos túbulos seminíferos, ocupando as espermatogônias a região basal, os espermatócitos a região mediana e as espermátides mais próximas a luz e como apresentam grau de desenvolvimento compatível com a espermatogênese são denominados de "**estádios**". O número de estádios varia de acordo com a espécie estudada, mas como estão em constante cinética numa determinada região do túbulo seminífero, são mencionados como "**ciclo do epitélio seminífero**" (LEBLOND & CLERMONT 1952).

Existem inúmeras disfunções orgânicas e drogas que podem comprometer o ciclo do epitélio seminífero e conseqüentemente afetar a

espermatogênese, entre elas, destacam-se as alterações dos níveis dos hormônios da tireóide, cuja influência no desenvolvimento de vários tecidos e órgãos foi relatada por BRASEL & WINICK,(1970), COOKE *et al.*(1984), MEISAMI (1984), mas, a sua participação no crescimento e diferenciação do sistema reprodutor apresenta, ainda, dados conflitantes e aspectos contraditórios na interpretação dos resultados. Um desses aspectos contraditórios está, relacionado à identificação das faixas etárias nas quais as gônadas dos mamíferos são responsivas aos hormônios da tireóide.

FOLLEY (1938), verificou que ratas adultas tireoidectomizadas, não apresentam alterações na taxa de concepção ou manutenção da prenhez, em relação aos animais controles, discordando de ROGERS.(1958) que associou o hipotireoidismo ao comprometimento do ciclo estral das ratas, com diminuição da fertilidade e de JONES *et al.*(1946), ao verificarem que as fêmeas adultas induzidas ao hipotireoidismo com 6-propyl-2-thiouracil (PTU) apresentavam aumento nas taxas de reabsorção fetal.

Nos ratos adultos, o hipotireoidismo induzido com ^{131}I , segundo VILCHEZ-MARTINEZ.(1973), não resultou em alterações testiculares, fato esse constatado através da ausência de diferenças do peso testicular e do diâmetro dos túbulos seminíferos em relação aos animais controles. BORKER & KLITGAARD (1952), KALLAND *et al.*(1978), BRUNI *et al.*(1985), WEISS & BURNS.(1988) e MAIA *et al.*(1990), não encontraram, também, falência testicular nos ratos adultos com hipotireoidismo.

Por outro lado, AMIN & EL-SHEIKL,(1977), encontraram alterações degenerativas no testículo de rato adulto com hipotireoidismo. VALLE *et*

al.(1985), ao induzirem o hipotireoidismo em ratos com o 1-Methyl-2-mercaptoimidazole (Methimazole, MMI) a partir do 40º dia de idade, obtiveram diminuição dos pesos: corporal, dos testículos e das glândulas sexuais acessórias dos animais tratados.

Em ratos imaturos, CHOWDHURY & ARORA (1984), verificaram que após a tireoidectomia, ocorre redução no peso testicular, no diâmetro dos túbulos seminíferos e na população das células de Leydig. FRANCAVILLA *et al.*(1991), induzindo o hipotireoidismo com o MMI, também obtiveram diminuição do peso testicular e atraso na espermatogênese nos animais tratados.

COOKE *et al.*(1991b) e KIRBY *et al.*(1992), induzindo o hipotireoidismo com PTU do nascimento até o 25º e 24º dias respectivamente, verificaram que esse período era aquele em que o testículo fora fortemente influenciado pelos hormônios da tireóide.

MEISAMI *et al.*(1992), estabeleceram as primeiras duas semanas de vida (pós-parto) do rato, como o período crítico de interferência dos hormônios da tireóide sobre o desenvolvimento testicular. COOKE *et al.*(1992), no entanto, restringiram esse período para os primeiros oito dias de vida do rato e FRANCAVILLA *et al.*(1991), por sua vez, não verificaram alteração na estrutura dos testículos de fetos, durante o 18º e 21º dia de gestação, de ratas com hipotireoidismo em relação aos testículos dos fetos das ratas controles.

Os hormônios da hipófise anterior e a testosterona, também atuam no desenvolvimento e maturação dos testículos e a concentração desses hormônios, como se sabe, sobre a influência dos hormônios da tireóide. VILCHEZ-MARTINEZ (1973) e BASKI (1973), mostraram que ratos adultos com hipotireoidismo apresentam redução dos níveis plasmáticos de FSH (hormônio folículo-estimulante) e do LH (Hormônio luteinizante). KALLAND *et al.*(1978) e VALLE *et al.*(1985), além de observarem redução dos níveis de FSH , LH e PRL (prolactina), encontraram, ainda, nos ratos adultos com hipotireoidismo, uma diminuição dos níveis plasmáticos de testosterona, enquanto MAIA *et al.*(1990), após induzirem o hipotireoidismo em ratos adultos não observaram alteração na esteroidogênese.

Os hormônios da tireóide, em ratos, têm influência na transcrição do RNA_m de GH (hormônio do crescimento) e PRL, segundo SAMUELS *et al.*(1989); nos níveis de receptores do GH (AMIT *et al.*,1991); e, no conteúdo do DNA (MEISAMI *et al.*, 1994), retardando o crescimento corporal e comprometendo o desenvolvimento dos testículos de ratos jovens com hipotireoidismo

Os hormônios da tireóide, podem, ainda, participar da manutenção testicular, agindo sobre as células de Sertoli. Estas células são consideradas de grande importância no desenvolvimento e maturação testicular, (HUTSON & STOCCO, 1981; BORLAND *et al.*,1984; FUGASSA *et al.*,1987; PALMERO *et al.*,1989,1990 e 1994; VAN-HAASTER *et al.*,1992 e 1993a; ULISSE *et al.*,1994; BUNICK *et al.*,1994 e PANNO *et al.*,1994). A atuação dos hormônios da tireóide, ocorre sobre as fases de proliferação e diferenciação das células de Sertoli.

Durante o hipotireoidismo em ratos jovens, ocorre redução no volume nuclear das células de Sertoli (CHEMES *et al.*,1979 e VAN-HAASTER *et al.*,1992).

São observados também diminuição da produção de ABP (androgen-binding protein), (PALMERO *et al.*,1989), do IGF1 (insulin-like growth factor-I) (VAN-HAASTER *et al.*,1993a), da inibina (BUNICK *et al.*,1994) e do metabolismo da testosterona (PANNO *et al.*,1994) pelas células de Sertoli, resultando, durante o hipotireoidismo em ratos jovens, na prolongação da fase de proliferação e no possível atraso na diferenciação dessas células. Essas alterações do metabolismo da célula de Sertoli resultam em intensas modificações do testículo dos ratos .

A influência dos hormônios tireoidianos sobre as células de Sertoli, está diretamente relacionada à idade do animal (COOKE *et al.*,1991b).

PALMERO *et al.*(1988, 1991), referem a existência de receptores de T₃ nas células de Sertoli e segundo JANNINI *et al.*(1990), estes receptores encontram-se em sua expressão máxima a partir dos últimos dias de gestação e durante as primeiras duas semanas de vida, tornando-se praticamente ausentes em ratos adultos.

A bibliografia consultada possibilitou verificar, que ainda existem aspectos sobre a participação dos hormônios da tireóide na manutenção do testículo de ratos, que necessitam melhor esclarecimento.

2. OBJETIVO

Este estudo visa, através de avaliações do peso corporal e do testículo, da histologia e da morfometria dos túbulos seminíferos, da biometria das células de Sertoli e das dosagens dos níveis plasmáticos de testosterona, verificar a participação dos hormônios tireoidianos na espermatogênese em ratos de várias idades, que foram induzidos ao hipotireoidismo com doses diárias de Methimazole.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL:

Para a realização do presente estudo foram utilizados 68 ratos machos de várias idades e convencionais (*Rattus norvegicus*, variedade albino), nascidos e criados no biotério do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biologia e 12 fetos. Esses animais representaram as proles do acasalamento de 13 machos e 36 fêmeas, com 3 meses de idade, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Unicamp.

Durante todo o período experimental os animais foram mantidos em ambiente com temperatura média de 23 ± 1 °C, fotoperíodo de 12 horas luz/12horas escuro, água e a ração "ad libitum".

3.2. MÉTODOS:

3.2.1 ACASALAMENTO:

O ciclo estral das fêmeas foi acompanhado por meio de esfregaços vaginais, realizados sempre no final da tarde, e as ratas encontradas na fase de estro eram colocadas para acasalamento. Na manhã seguinte, utilizando-

se novo esfregaço, era pesquisada a presença de espermatozóides na via genital da rata. Sempre que as células reprodutivas masculinas estavam presentes, considerava-se este como **dia zero de prenhez** do animal.

3.2.2 TRATAMENTO:

No oitavo dia de prenhez, todas as fêmeas foram pesadas e distribuídas aleatoriamente em 2 grupos: **controle** e **tratado**, com 18 animais cada um. As fêmeas tratadas passaram então a receber diariamente 0,05mg de 1- Methyl- 2- mercaptoimidazole (Methimazole, MMI) diluídos em água destilada e administrados por sonda gástrica até o desmame dos filhotes. Optou-se por este método de administração da droga, pela garantia de exatidão da quantidade ingerida diariamente, e também, por não provocar peritonite nos animais, o que, geralmente, ocorre durante tratamentos longos, quando se utiliza a via intraperitoneal.

Adotou-se como critério, que os grupos analisados fossem constituídos a partir de 3 mães diferentes. Em função do tempo de administração da droga, aliado à data de sacrifício, os estudos biométricos, morfológicos e hormonais foram realizados em 6 grupos experimentais, a saber:

Grupo experimental hipotireoidismo materno-fetal: Neste grupo o tratamento foi interrompido no décimo nono dia de prenhez, quando 3 fêmeas tratadas e 3 fêmeas controles foram sacrificadas por decapitação e

tiverem coletado seu sangue para dosagens dos níveis plasmáticos de tiroxina. Em seguida, foram laparotomizadas para dissecação dos úteros grávidos e conseqüentemente retirada dos fetos, os quais foram, também decapitados para retirada do sangue e posterior dosagem de T₄.

Os fetos foram contados e pesados e a seguir passaram por cuidadoso exame macroscópico à busca de possíveis malformações congênitas. Escolheu-se aleatoriamente 6 fetos machos de mães controles e 6 fetos machos de mães tratadas para avaliação da morfologia testicular.

Grupo experimental 8 dias: Formado por 6 filhotes controles e por 6 filhotes de mães tratadas com 0,05mg de Methimazole e que foram sacrificados por decapitação no oitavo dia de vida.

Grupo experimental 21 dias: Constituído por 7 filhotes controles e por 7 filhotes de mães tratadas com 0,05mg de Methimazole e que foram sacrificados no dia do desmame, por inalação de éter etílico.

Grupo experimental 35 dias: Formado por 7 animais controles e 7 animais tratados com 0,05mg de Methimazole, os quais foram desmamados no vigésimo primeiro dia de vida. Após essa data, os filhotes tratados continuaram a receber diariamente 0,05mg de Methimazole diluídos em água destilada e administrados por sonda gástrica até o dia do sacrifício. Devido a fragilidade dos filhotes, durante os primeiros 5 dias do tratamento, a sonda foi previamente lubrificada e os animais levemente anestesiados com éter etílico. Após este período não foi adotada nenhuma postura adicional no cuidado do animal durante a administração da droga.

Grupo experimental 50 dias: Constituído por 7 animais controles e por 7 tratados que receberam doses diárias com 0,05mg de Methimazole, durante 50 dias, seguindo a mesma prática utilizada após o desmame do grupo anterior.

Grupo experimental 90 dias: Formado por 7 animais controles e 7 tratados, que também receberam, diariamente, 0,05mg de Methimazole até o sacrifício.

O exame macroscópico das proles, assim como a avaliação numérica e pesagem, aconteceu no nascimento dos filhotes de todas as fêmeas tratadas e controles, e durante todo o período de experimentação, os animais foram pesados 3 vezes por semana.

3.2.3. PROCEDIMENTOS BÁSICOS EM MICROSCOPIA DE LUZ:

No dia do sacrifício os animais foram pesados e procedeu-se à retirada e dissecação dos testículos e dos epidídimos direitos, da tireóide e do fígado, que foram fixados por imersão em Bouin durante 48 horas em temperatura ambiente.

Os testículos direitos, em especial, tiveram as primeiras duas horas do processo de fixação a 4°C, terminado este período foram pesados e com o auxílio de um paquímetro, registrou-se a medida dos eixos longitudinal e

transversal; a albugínea, recebeu, então, pequenas incisões com o auxílio de uma gilete e a partir daí a fixação seguiu em temperatura ambiente.

Concluída a etapa de fixação, todos os órgãos foram lavados em água corrente durante 24 horas para retirada do excesso de ácido pícrico. Seguiu-se à inclusão em parafina segundo método descrito por BEÇAK & PAULETE (1976), obtendo-se ao final do processo, cortes histológicos com 6 μm de espessura em micrótomo American Optical Spencer modelo 820.

3.2.4. AVALIAÇÃO DO DIÂMETRO DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS:

Os diâmetros dos túbulos seminíferos foram avaliados em cortes histológicos corados pela técnica de hematoxilina-eosina (H.E.).

De cada testículo, 20 túbulos seminíferos em corte transversal (quando os diâmetros perpendiculares entre si não diferem mais de 10%) foram medidos com o auxílio de uma ocular de tambor (8X) com filamento deslocável e objetiva de (10X) de um microscópio de luz da marca Carl Zeiss.

Concluída a medição do diâmetro dos túbulos seminíferos, efetuou-se a calibração da ocular de tambor com o uso de uma lâmina especial, contendo divisões de 0,01mm. Essa calibração tem como função transformar

os valores dados em unidades de tambor em micrômetros, obtendo-se os diâmetros dos túbulos seminíferos em valores reais.

3.2.5. AVALIAÇÃO DOS DIÂMETROS E DO VOLUME DO NÚCLEO DAS CÉLULAS DE SERTOLI:

Os diâmetros dos núcleos das células de Sertoli foram avaliados em cortes histológicos corados pela técnica de H.E.

Em cada testículo, mediu-se o eixo ortogonal maior e o eixo ortogonal menor do núcleo de 10 células de Sertoli, medidas estas feitas com o auxílio de uma ocular de tambor (8X) e objetiva de (100X) do microscópio de luz da marca Carl Zeiss.

Adotou-se como critério que as medidas fossem feitas sobre os núcleos inteiros ou apenas seccionados ao nível das calotas polares, para evitar correção de variabilidade (CLERMONT & HERMO, 1975). Como o núcleo destas células podem apresentar variações na forma e na altura, de acordo com a sua localização em relação à membrana basal e também no decorrer da espermatogênese (PERSONA, 1981), mediu-se os eixos ortogonais maior e menor apenas dos núcleos das células de Sertoli localizados próximos a membrana basal, e quando possível, escolhendo os túbulos no mesmo estágio do ciclo do epitélio seminífero.

Concluídas as medições dos núcleos das células de Sertoli, efetuou-se a calibração da ocular de tambor utilizando uma lâmina especial, contendo divisões de 0,01mm., obtendo-se assim o valores dos eixos ortogonal maior e menor dos núcleos das células de Sertoli em micrômetros.

O volume nuclear destas células, foi obtido pelo uso da fórmula abaixo, que fornece o volume do elipsóide (DE LUCA, 1989), e os valores calculados apresentados em micrômetros cúbicos.

$$V = 4/3\pi. (d/2)^2. D/2$$

onde:

$$\pi = 3,1416$$

d = diâmetro menor

D = diâmetro maior

3.2.6. AVALIAÇÃO DA ESPERMATOGÊNESE E DO INTERSTÍCIO TESTICULAR:

As avaliações do ciclo do epitélio seminífero e a observação do epidídimo, foram realizadas em cortes corados pelas técnicas de H.E., tricrômico de Gomori e PAS (Ácido Periódico Schiff).

A identificação dos estádios do ciclo do epitélio seminífero e sua respectiva numeração em algarismos romanos foram feitas segundo os critérios estabelecidos por LEBLOND & CLERMONT (1952).

As avaliações qualitativas das células de Leydig também foram realizadas pelo H.E e através da Reação de PAS (MAC MANUS, 1946) para carboidratos e glicoproteínas.

3.2.7. AVALIAÇÃO HORMONAL

Todas as amostras de sangue utilizadas na avaliação hormonal, foram coletadas em tubos de centrífuga, previamente esterilizados e heparinizados. Após as coletas, o sangue foi centrifugado por 10 minutos à 2000 R.P.M., e o plasma armazenado à -18°C .

As dosagens de T_4 (tiroxina) foram feitas pelo método de radioimunoensaio, técnica descrita por (BERSON & YALLOW, 1959), cujo princípio básico está na competição entre o T_4 marcado com ^{125}I e o T_4 plasmático, por uma quantidade conhecida de Anti- T_4 , obtida a partir da purificação de soros de coelhos imunizados. O Kit utilizado neste ensaio foi o de T_4 total, duplo anticorpo da Trilab e o coeficiente de variação intra ensaio foi de 9%.

As dosagens de testosterona foram feitas pelo método de fluoroimunoensaio de fase sólida (SOINI & KOJOLA, 1983), cujo princípio

básico está na competição entre a testosterona marcada e a testosterona da amostra, por uma quantidade de Anti-Testosterona policlonal de coelho. O Kit utilizado neste ensaio foi o Kit de Testosterona da Delfia e o coeficiente de variação zero.

3.2.8. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DO FÍGADO E DA TIREÓIDE:

Pequenas porções retiradas aleatoriamente do fígado, foram coradas em H.E, buscando avaliar parâmetros morfológicos básicos, que pudessem indicar o efeito do Methimazole sobre esse órgão.

A avaliação histológica da tireóide visando confirmação do quadro de hipotireoidismo foi feita em cortes corados pelas técnicas de H.E e tricrômico de Gomori.

3.2.9. TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS:

Os resultados do peso corporal, do peso e comprimento dos testículos, do diâmetro dos túbulos seminíferos e do volume nuclear das células de Sertoli, dos grupos experimentais 8, 21, 35, 50 e 90 dias de idade, foram analisados pelo Teste "t" de Student. O nível de significância

foi de 5%, sendo consultado (JOHNSON & WICHERN, 1992), para interpretação dos resultados obtidos.

Os resultados das avaliações dos diâmetros dos túbulos semíferos, do volume nuclear das células de Sertoli do grupo experimental 19 dias de vida intra-uterina e da evolução do peso corporal dos animais do grupo experimental 90 dias de idade foram obtidos pela análise de variância (ANOVA), segundo (JOHNSON & WICHERN, 1992).

4. RESULTADOS

4.1. HIPOTIREOIDISMO MATERNO :

Neste estudo não foram observadas diferenças nas proles das fêmeas controles e tratadas, quanto ao número de blastocisto implantados e nos filhotes nascidos, na prevalência de um sexo em relação ao outro, como está demonstrado na tabela

nº 1.

Quanto ao peso corporal, os fetos das fêmeas que receberam doses diárias de Methimazole, apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) em relação aos filhotes das fêmeas controles, como também está demonstrado na tabela nº 1.

Não foram detectados malformações congênitas visíveis nas proles das fêmeas tratadas, embora a indução ao hipotireoidismo, tenha começado no oitavo dia de prenhez, correspondendo ao início da fase de organogênese.

Os filhotes de mães com hipotireoidismo aparentemente não apresentaram indícios de comprometimento neuro-motor, verificados através dos parâmetros de abertura do olho e do início da locomoção, os quais não apresentaram diferenças em relação aos filhotes controles.

A certificação do estado de hipotireoidismo das fêmeas tratadas utilizadas durante o experimento, foi comprovado pela técnica de Radioimunoensaio de T₄ e será mostrada na tabela nº6, durante a apresentação dos valores encontrados nos níveis plasmáticos de tiroxina de todos os animais envolvidos na realização do presente estudo.

TABELA Nº 1:

Avaliação do peso corporal, do tamanho da ninhada e da incidência de machos nas ninhadas das fêmeas controles e das tratadas com Methimazole. Os valores estão em média \pm desvio padrão, sendo apenas verificado diferença significativa ($p < 0,05$) no peso corporal dos animais controles em relação aos tratados.

IDADE	TAMANHO DA NINHADA	FETOS/ NEONATOS MACHOS	PESO CORPORAL (GRAMAS)
19º dia gestação	n=03 ninhadas		
CONTROLE	7,00 \pm 3,60	3,66 \pm 2,30	2,73 \pm 0,19
TRATADO	7,36 \pm 3,51	3,66 \pm 1,52	1,79 \pm 0,17
neonatos	n=15 ninhadas		
CONTROLE	8,86 \pm 2,38	4,00 \pm 1,64	5,75 \pm 0,26
TRATADO	8,86 \pm 2,12	4,13 \pm 1,57	5,00 \pm 0,31

4. 2 AVALIAÇÃO BIOMÉTRICA:

4. 2. 1. PESO CORPORAL:

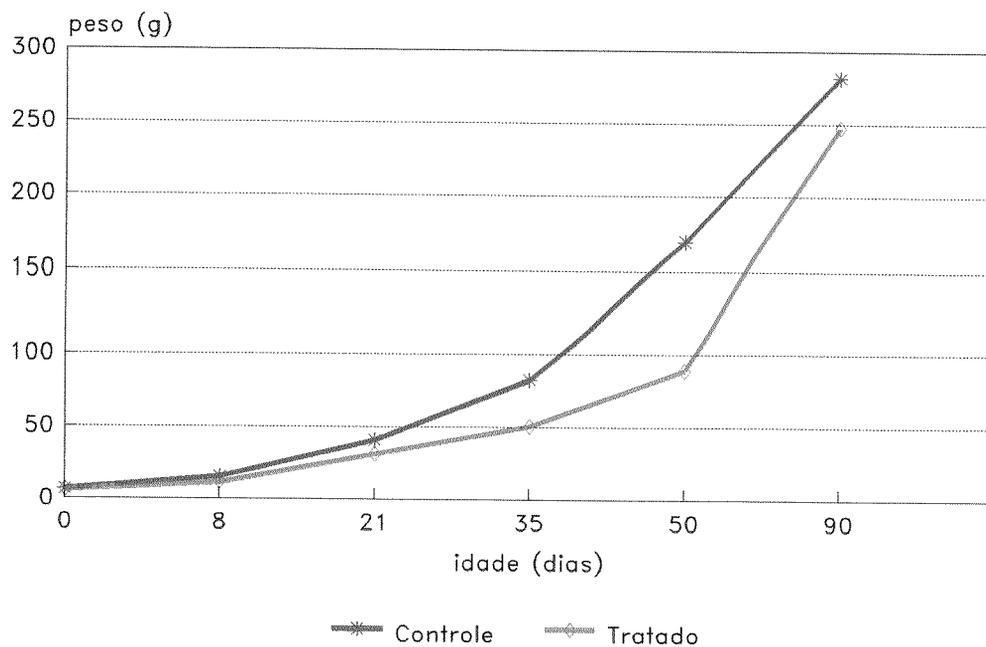
Os machos tratados com 0,05 mg de Methimazole, apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) do peso corporal em todos os grupos experimentais.

O gráfico nº 1 mostra, que o ganho de peso torna-se mais efetivo nos animais controles a partir do 35º dia de idade, enquanto que, nos tratados, o mesmo começa a ocorrer a partir do 50º dia de idade.

A evolução do peso corporal dos animais do grupo experimental 90 dias de idade desde o nascimento até o dia do sacrifício está demonstrado no gráfico nº 2

GRÁFICO N°1

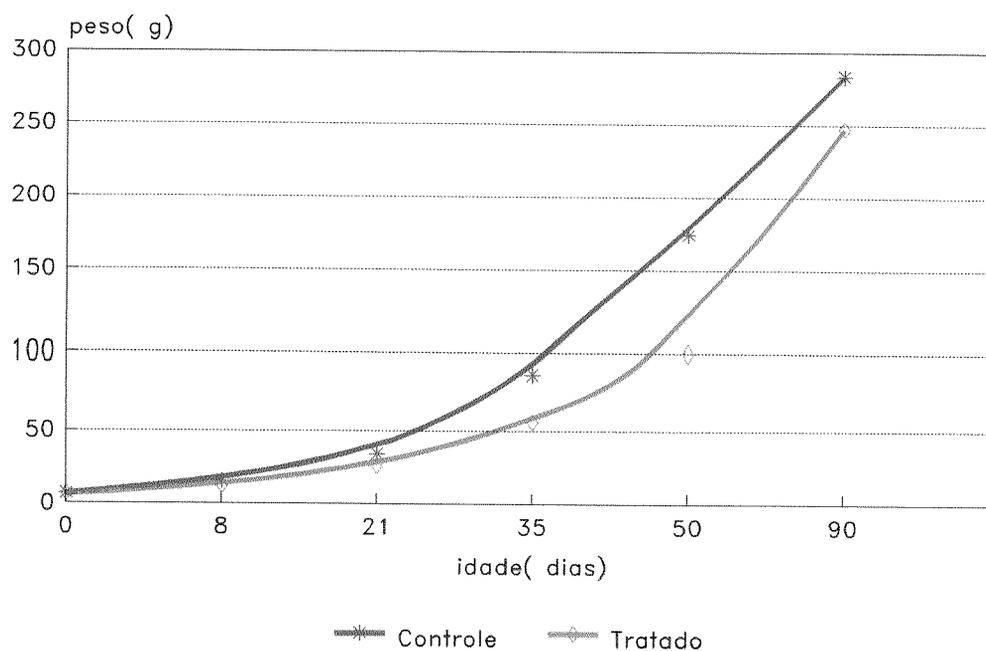
Peso corporal medio dos animais
no dia do sacrificio



Os dados referentes ao peso corporal dos animais controles e tratados, estão expressos em gramas, sendo consideradas ($p < 0,05$) significativas as diferenças do peso corporal entre os animais controles e tratados.

GRÁFICO Nº 2

Evolução do peso corporal medio dos animais



Os valores da evolução do peso corporal dos animais com 90 dias, estão expressos em gramas, sendo consideradas significativas ($p < 0,05$) as diferenças entre os animais controles e os tratados.

4. 2. 2. PESO E COMPRIMENTO TESTICULAR:

A avaliação do peso médio dos testículos direitos, mostrou, que os animais tratados com MMI, apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) no peso testicular, como é verificado na (tabela nº 2)

Adicionalmente o Gráfico nº 3, mostra que após o quinquagésimo dia de idade, ocorre ganho consideravelmente maior do peso testicular dos animais tratados em relação aos animais controles.

Quanto ao critério comprimento testicular não foi observada diferença significativa entre os animais controles e tratados dos grupos experimentais 19 dias de gestação e 08 dias de idade. Já os animais tratados dos grupos experimentais 21, 35, 50 e 90 dias de idade apresentaram diminuição significativa ($p < 0,05$) no comprimento testicular, como estão mostradas nas Figuras nº 1, 2, 3 e 4.

O grafico nº 4, mostra, que aparentemente o aumento do eixo ortogonal maior do testículo direito, se estabiliza por volta do 50º dia de idade nos animais controles, o mesmo não ocorrendo nos animais tratados, que continuam apresentando crescimento considerável, após esta data.

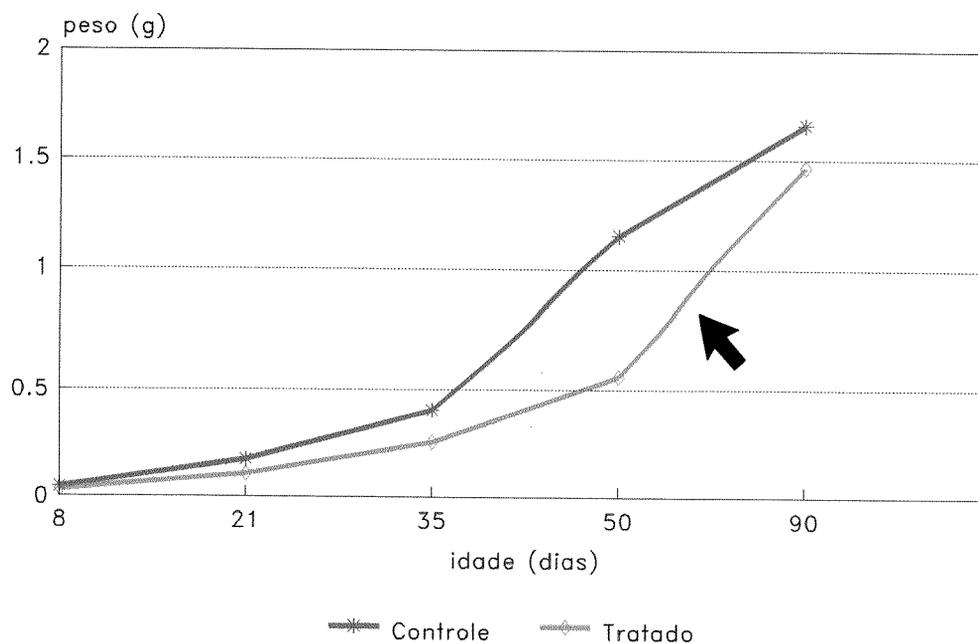
TABELA N° 2

Peso dos testículos e diâmetro dos túbulos seminíferos dos diferentes grupos experimentais. Os valores estão em média \pm desvio padrão, sendo consideradas significativas ($p < 0,05$) as diferenças entre os animais controles e os animais tratados.

IDADE	CONDICÃO FISIOLÓGICA	N	PESO TESTÍCULO GRAMAS	DIÂMETRO TÚBULOS SEMINÍFERO μm
8 DIAS	CONTROLE	6	0,04 \pm 0,008	70,90 \pm 3,33
	TRATADO	6	0,03 \pm 0,004	61,84 \pm 2,71
21 DIAS	CONTROLE	7	0,17 \pm 0,025	120,37 \pm 9,17
	TRATADO	7	0,10 \pm 0,009	84,13 \pm 2,71
35 DIAS	CONTROLE	7	0,40 \pm 0,107	191,56 \pm 19,44
	TRATADO	7	0,25 \pm 0,104	160,09 \pm 5,90
50 DIAS	CONTROLE	7	1,14 \pm 0,097	283,30 \pm 5,63
	TRATADO	7	0,55 \pm 0,107	199,50 \pm 3,97
90 DIAS	CONTROLE	7	1,65 \pm 0,142	300,82 \pm 3,97
	TRATADO	7	1,46 \pm 0,107	258,27 \pm 12,76

GRÁFICO N°3

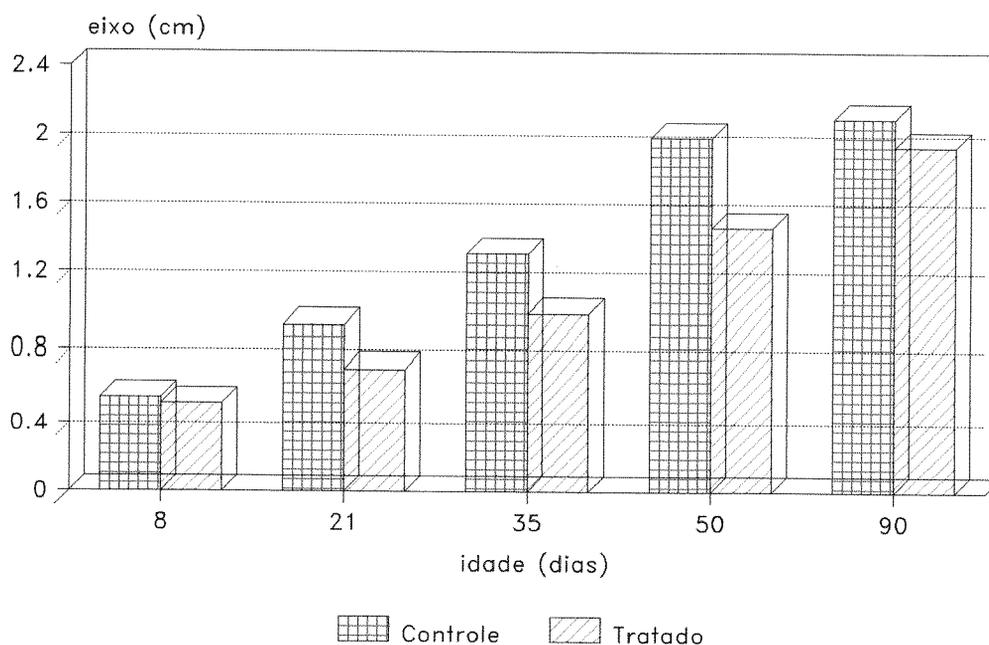
Peso medio do testiculo direito
no dia do sacrificio



O valores do gráfico acima estão expressos em gramas, sendo consideradas significativas ($p < 0,05$) as diferenças entre os animais controles e tratados. A seta destaca o aumento considerável de peso dos animais tratados após o quinquagésimo dia de idade.

GRÁFICO Nº4

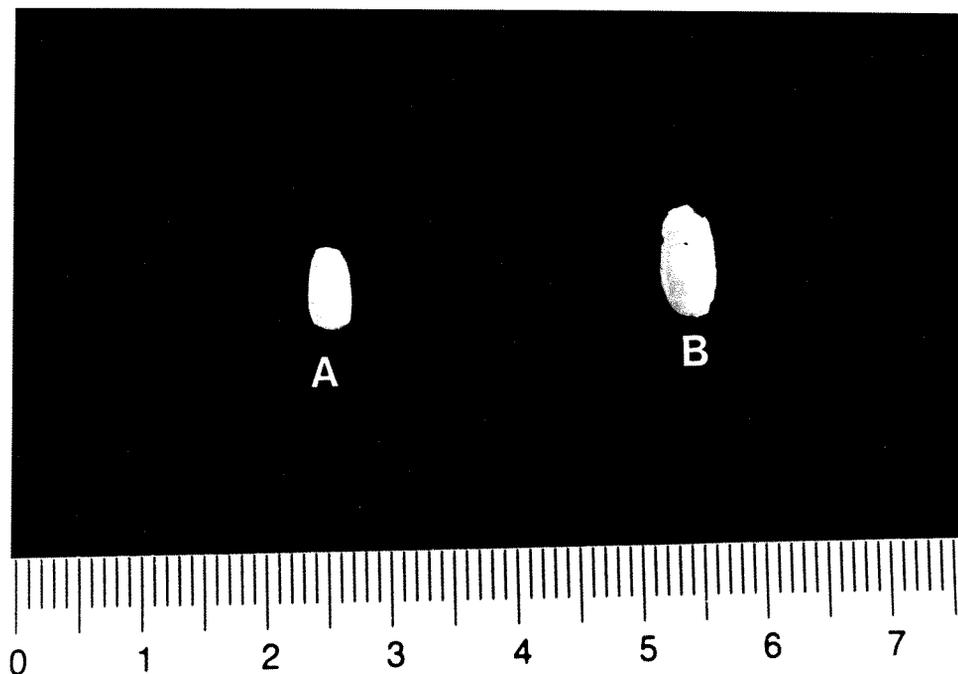
Media do eixo ortogonal maior do testículo direito no dia do sacrificio



O valores do gráfico acima estão expressos em centímetros. Não foi encontrada diferença significativa nos filhotes com 8 dias de idade. Nos demais grupos etários foram considerados significativos ($p < 0,05$) os valores encontrados no tamanho do testículo entre os animais controles e tratados.

FIGURA N° 1

Testículos dos animais com 21 dias de idade. A letra (A) representando o tratado e a (B) o controle. Aumento de 4 vezes.

**FIGURA N° 2**

Testículos dos animais com 35 dias de idade. A letra (A) representando o tratado e a (B) o controle. Aumento de 4 vezes.

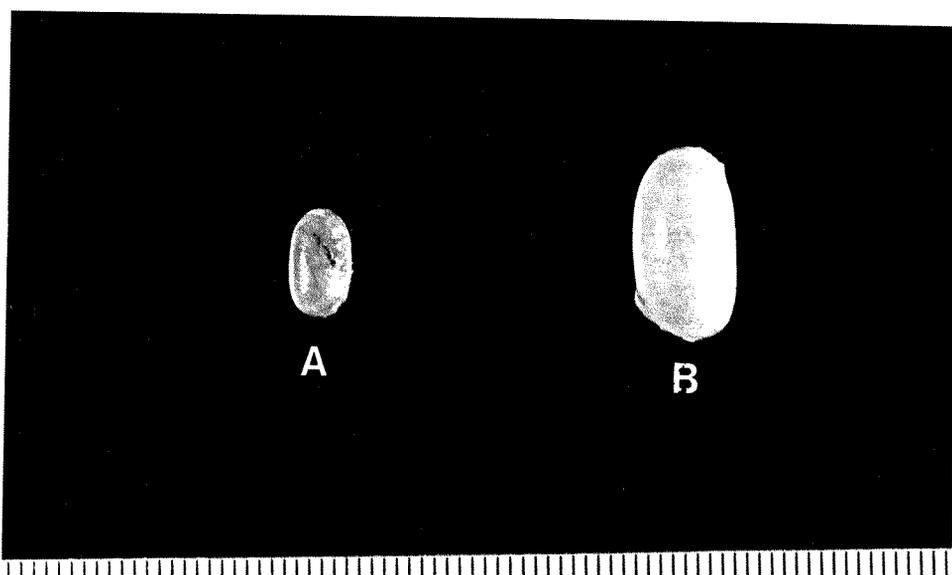


FIGURA N°3

Testículos dos animais com 50 dias de idade. A letra (A) representando o tratado e a (B) o controle. Aumento de 4 vezes.

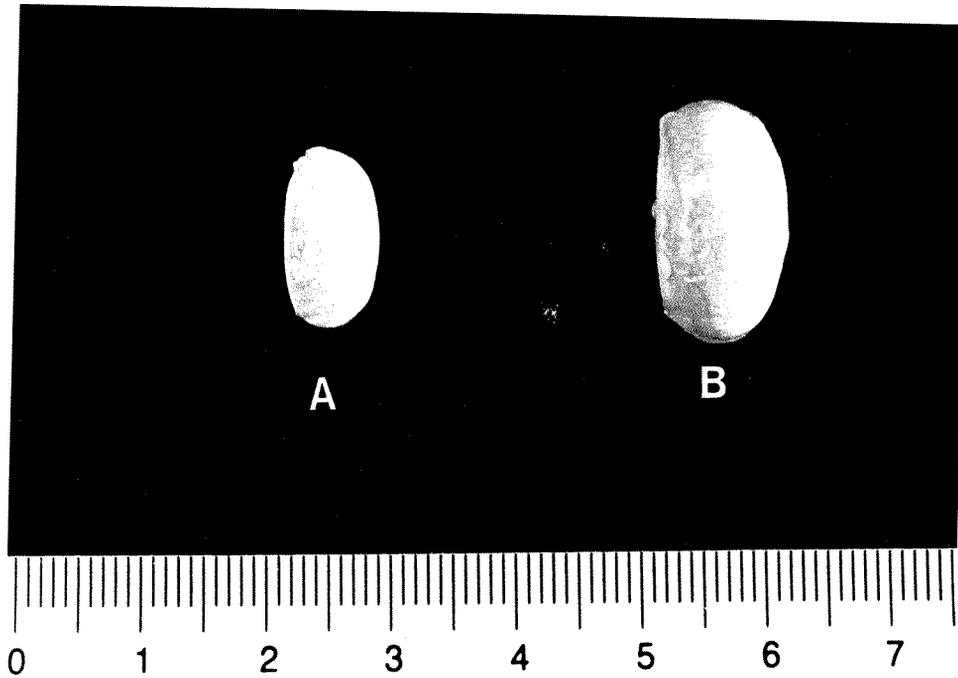
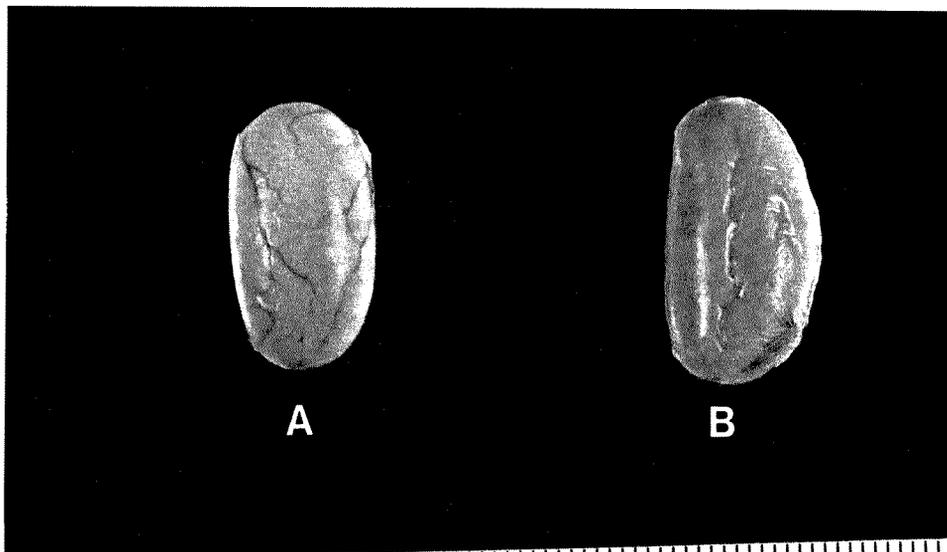


FIGURA N°4:

Testículos dos animais com 90 dias de idade. A letra (A) representando o tratado e a (B) o controle. Aumento de 4 vezes.



4. 3 HISTOLOGIA DO TESTÍCULO:

4. 3. 1 GRUPO EXPERIMENTAL 19 DIAS DE GESTAÇÃO :

As avaliações biométricas do testículo e do diâmetro dos túbulos seminíferos não mostraram diferenças entre os fetos de mães controles e os fetos de mães que receberam 0,05 mg diárias de methimazole, como está mostrada na tabela nº 3

Os cordões seminíferos estão organizados em poucas camadas de células germinativas e células de Sertoli, estando localizados preferencialmente, na região capsular do órgão, como está mostrado na Figura nº 5

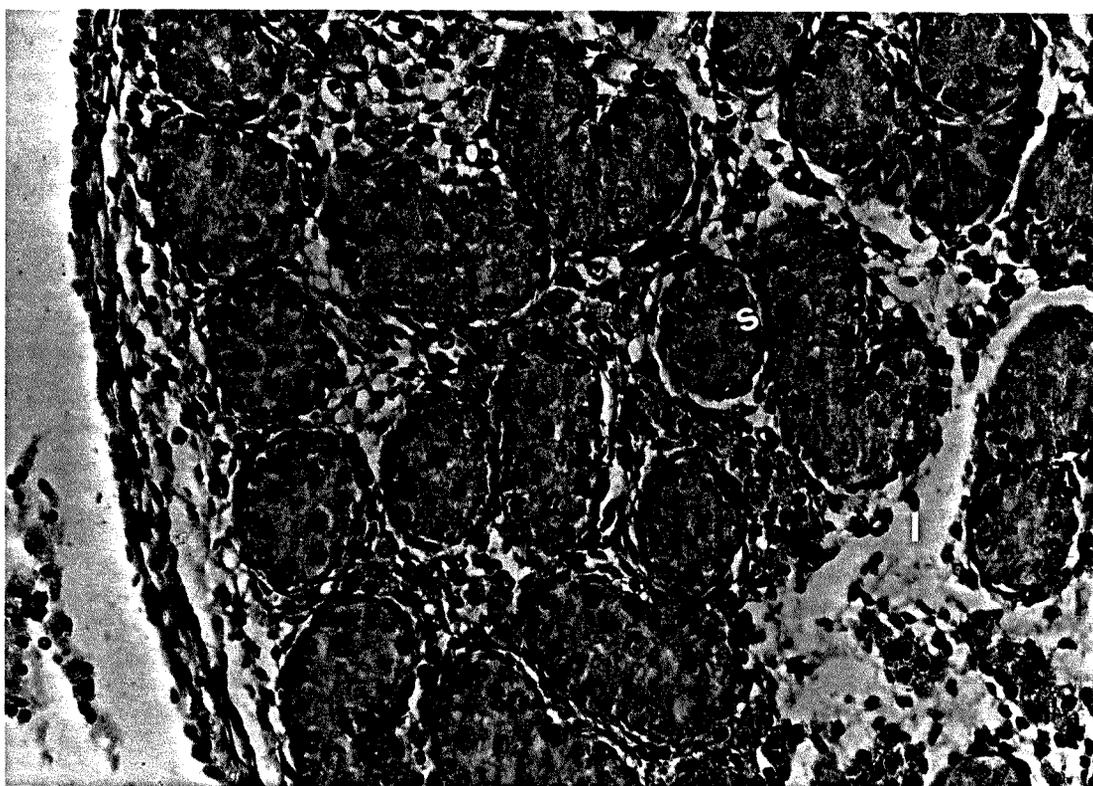
TABELA Nº 3

Avaliação biométrica dos testículos dos fetos controles e dos tratados. estão expressos em média \pm desvio padrão, não sendo encontradas diferenças significativas entre os fetos controles e os tratados

CONDICÃO EXPERIMENTAL	DIÂMETRO DO TESTÍCULO mm	DIÂMETRO DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS μm	VOLUME NUCLEAR DA CÉLULA DE SERTOLI μm^3
FETO CONTROLE	1.062 \pm 0,149	56,13... \pm 3,08	83,25... \pm 7,47
FETO TRATADO	1.063 \pm 0,116	55,65... \pm 4,40	83,59... \pm 6,02

FIGURA N° 5

Organização celular dos cordões seminíferos do testículo do feto tratado no 19° dia vida intra-uterina, destacando a célula de Sertoli em (S) e o intestício em (I). Aumento de 256 vezes



4. 3. 2. GRUPO EXPERIMENTAL ANIMAIS COM 8 DIAS DE IDADE:

A observação microscópica mostra que a grande maioria dos túbulos seminíferos dos animais deste grupo experimental não apresenta lúmen e encontra-se preferencialmente distribuídos em corte transversal, como mostrado nas Figuras nº 6a e 6b. Os animais tratados, apresentaram diminuição no diâmetro dos túbulos seminíferos. (Tabela nº 2)

O epitélio dos túbulos seminíferos dos animais controles e tratados estão organizados em poucas camadas de espermatogônias e células de Sertoli.

O interstício testicular dos filhotes de mães tratadas, aparentemente apresentam maior espaço intersticial em relação aos animais controles, como está mostrado nas Figuras nº 6a e 6b.

FIGURA N°6A

Distribuição dos túbulos seminíferos e do interstício do filhote controle com 8 dias de idade. Aumento de 128 vezes.

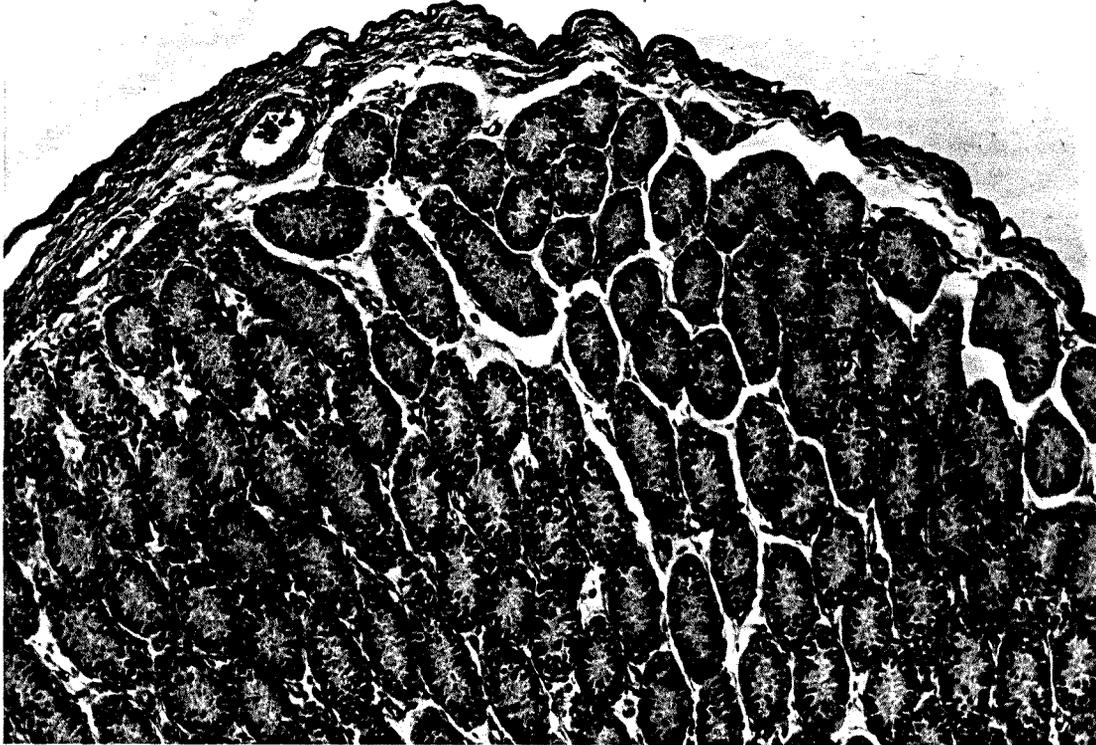
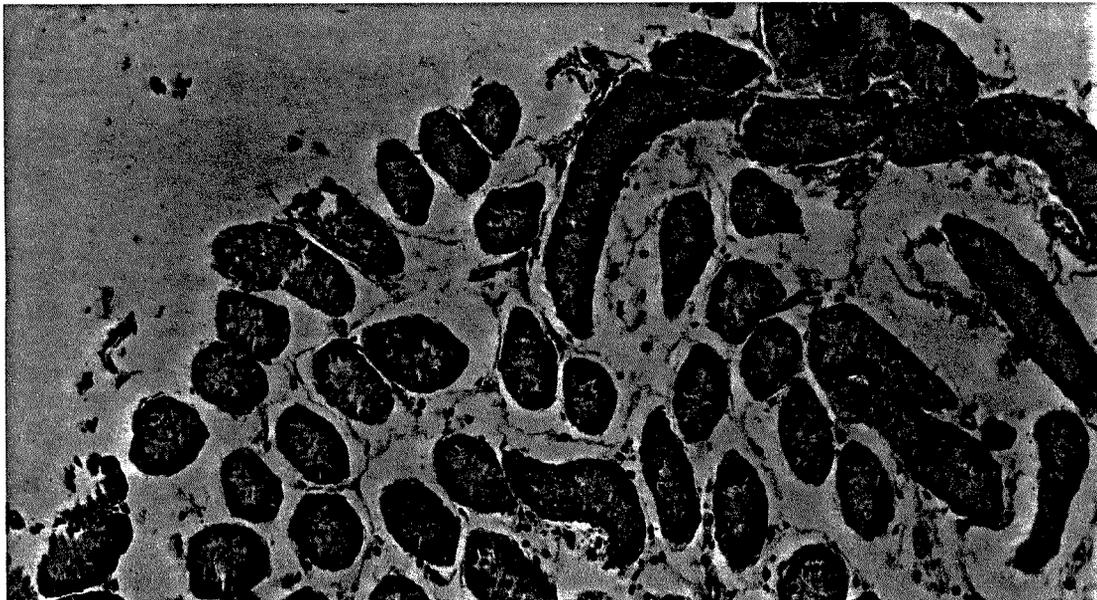


FIGURA N° 6 B

Distribuição dos túbulos seminíferos e do interstício do filhote tratado com 8 dias de idade. Notar aumento do espaço intersticial. Aumento de 128 vezes.



4. 3. 3. GRUPO EXPERIMENTAL ANIMAIS COM 21 DIAS DE IDADE:

O estudo morfométrico do diâmetro dos túbulos seminíferos mostra redução nos valores encontrados nos filhotes lactentes de mães tratadas, como está mostrado na (Tabela nº 2).

A avaliação histológica dos testículos e dos epidídimos direitos dos filhotes controles, mostra o parênquima testicular constituído de túbulos seminíferos de tamanho variado, sendo, os maiores localizados preferencialmente na região sub capsular. A grande maioria dos túbulos apresentam lúmen, exceto alguns túbulos de localização central. Figura nº7a

A organização celular do epitélio seminífero destes túbulos, é formada por camadas de espermatogônias, células de Sertoli e espermátócitos primários, com pequena quantidade de células em degeneração, como está demonstrado na Figura nº 8a.

O interstício testicular destes animais, apresenta-se discreto em relação aos animais tratados, como está mostrado na Figura nº 8a.

Os epidídimos estão organizados em lojas epididimárias completamente vazias, ou apenas, com algumas células germinativas descamadas.

A avaliação histológica dos testículos e dos epidídimos direitos dos filhotes tratados, mostrou que o parênquima testicular, está constituído de túbulos seminíferos apresentando aparente ectasia na região sub capsular e atrofia na região central do órgão, como mostrado na Figura nº 7b

A organização celular do epitélio seminífero destes túbulos, é formada por espermatogônias, células de Sertoli e espermatócitos primários, em quantidades reduzidas em relação às encontradas nos filhotes provenientes de mães controles. As células em degeneração estão presentes em maior números nestes animais, como está demonstrado na Figura nº 8b.

O interstício testicular apresenta-se aparentemente mais abundante, se comparado ao dos filhotes de mães controles, documentado na Figura nº 8b.

O aspecto histológico dos epidídimos é comparável ao dos filhotes controles, ou seja, com lojas epididimárias completamente vazias com apenas células germinativas descamadas.

FIGURA N°7A

Distribuição dos túbulos seminíferos e do interstício testicular do animal controle com 21 dias. Aumento de 128 vezes

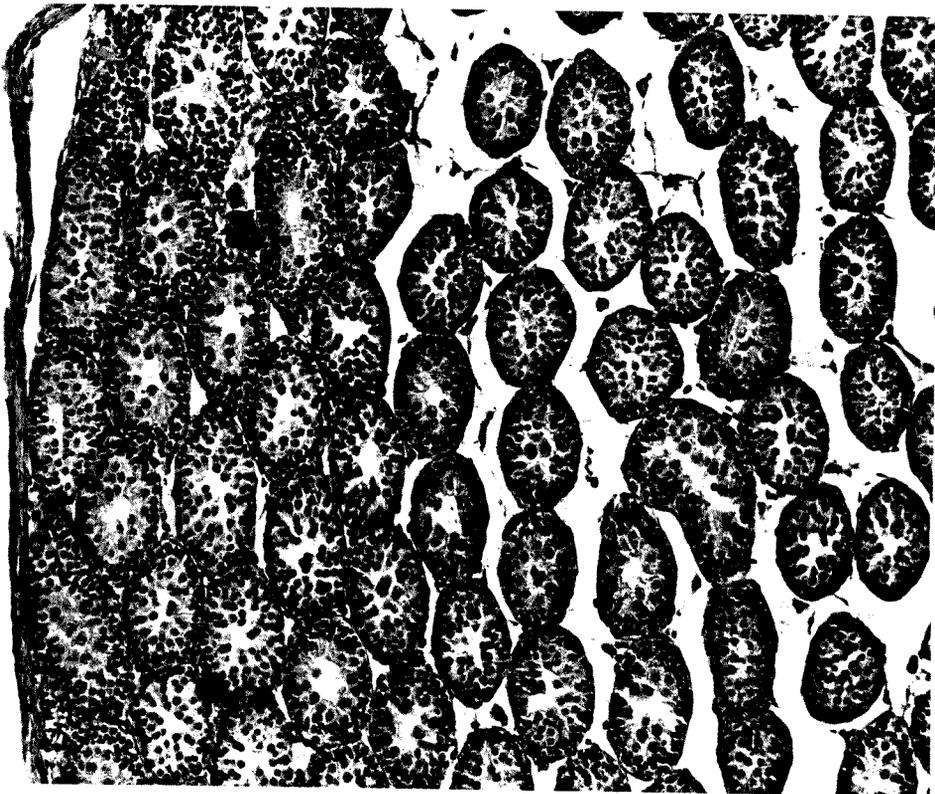


FIGURA N° 7B

Distribuição dos túbulos seminíferos e do interstício testicular do animal tratado com 21 dias. Aumento de 128 vezes.



FIGURA N°8A

Aspecto da celularidade dos túbulos seminíferos e do interstício do animal controle com 21 dias, destacando a célula de Sertoli em (S), a espermatogônia em (G) e o espermatócito I em (C). Aumento de 256 vezes.

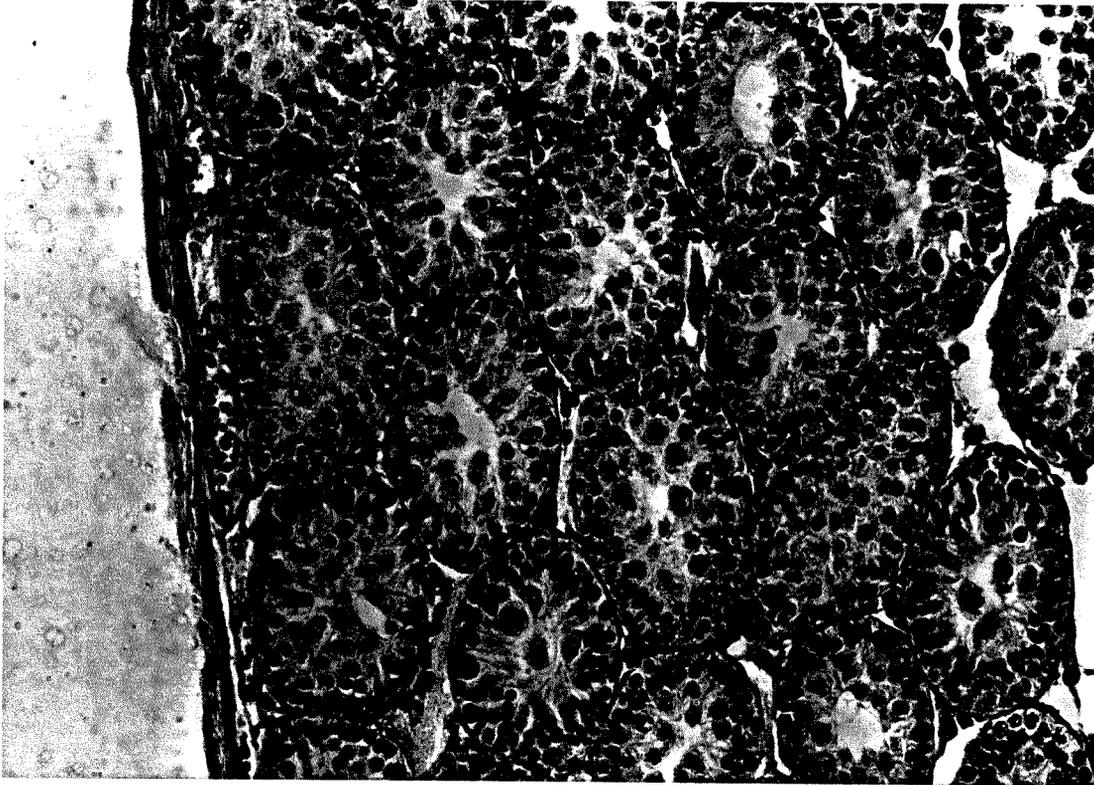
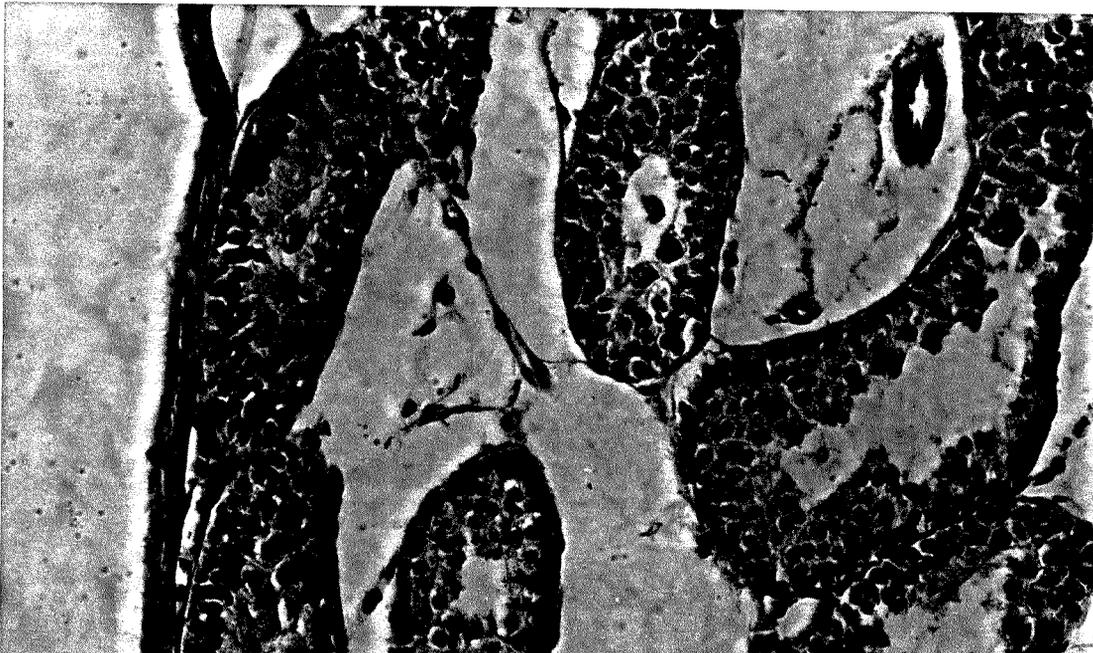


FIGURA N°8B

Aspecto dos núcleos picnóticos localizados nos túbulos seminíferos e do interstício do animal tratado com 21 dias. Aumento de 256 vezes.



4. 3. 4 GRUPO EXPERIMENTAL ANIMAIS COM 35 DIAS DE IDADE.

O estudo histométrico do diâmetro dos túbulos seminíferos dos animais com 35 dias, mostra redução nos valores encontrados nos animais tratados. (Tabela nº 2).

A avaliação histológica dos testículos e dos epidídimos direitos dos animais controles, mostra que os túbulos seminíferos apresentam-se uniformemente distribuídos no parênquima testicular, em sua maioria cortados transversalmente.

A espermatogênese destes animais está progressiva, com vários túbulos exibindo espermátides. (Figura nº 9a). Apenas um animal nesta idade, apresentou estadiamento completo da espermatogênese em alguns túbulos seminíferos, sendo inclusive possível a observação dos estádios característicos da espécie, como está demonstrado na Figura nº 10a. Poucas células degeneradas foram encontrados no epitélio seminífero destes animais.

Os epidídimos estão constituídos de lojas epididimárias completamente vazias, ou com algumas células germinativas descamadas. Apenas o animal, com estadiamento completo da espermatogênese apresentou uma pequena quantidade de espermatozóides no interior das lojas epididimárias. Figura nº 11a

O interstício testicular destes animais mostrou-se discreto em relação aos animais tratados. Figura nº 9a

A avaliação histológica dos animais tratados deste grupo experimental, mostra que o parênquima dos testículos direitos está constituído de túbulos seminíferos exibindo aparente atrofia. Figura nº 9b

O epitélio seminífero está organizado em camadas de espermatogônias do tipo A e do tipo B, células de Sertoli, espermátócitos primários e espermátides com número celular inferior em relação ao encontrado nos animais controles. Também foi observado grande número de células em degeneração, como mostrado na Figura nº 10b.

Em nenhum animal foi observado o estadiamento completo da espermatogênese.

Os epidídimos apresentam-se constituídos de lojas epididimárias vazias, ou com algumas células germinativas descamadas, como está mostrado na Figura nº 11b.

O interstício testicular destes animais apresenta-se maior em relação aos animais controles da mesma idade. Figura nº 9b

FIGURA N°9A

Aspecto dos túbulos seminíferos e do interstício testicular do animal controle com 35 dias. Aumento de 128 vezes.

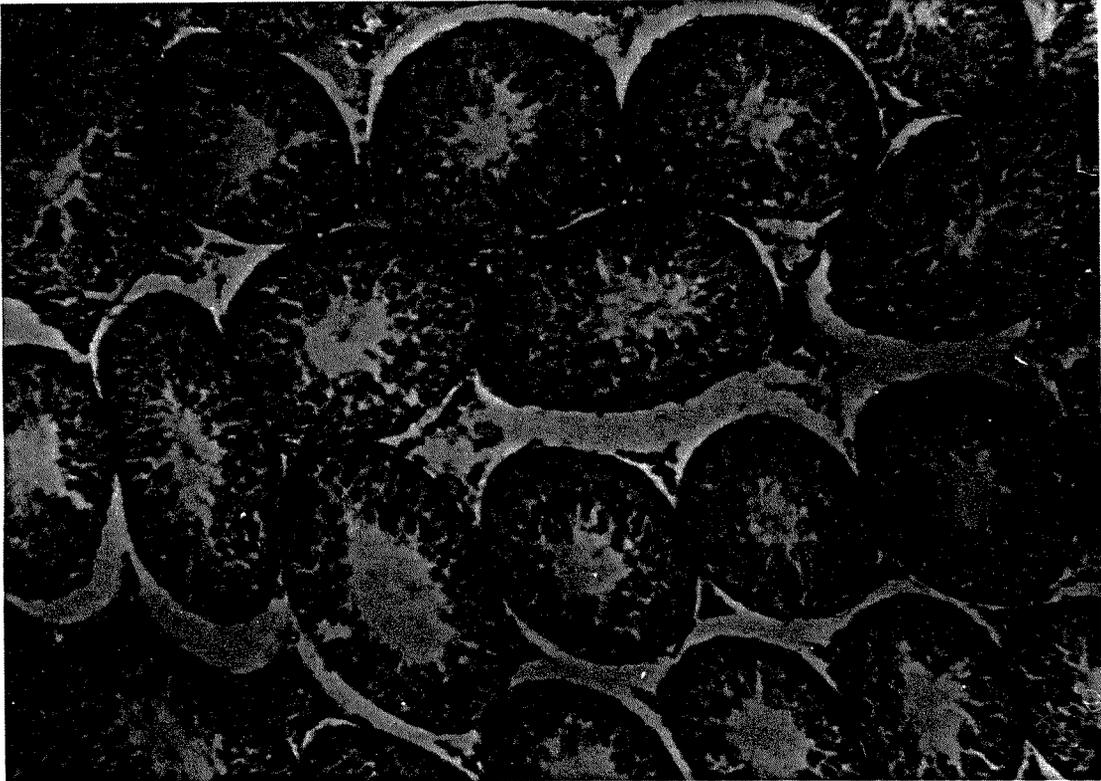


FIGURA N°9B

Aspecto dos túbulos seminíferos e do interstício testicular do animal tratado com 35 dias. Aumento de 128 vezes.

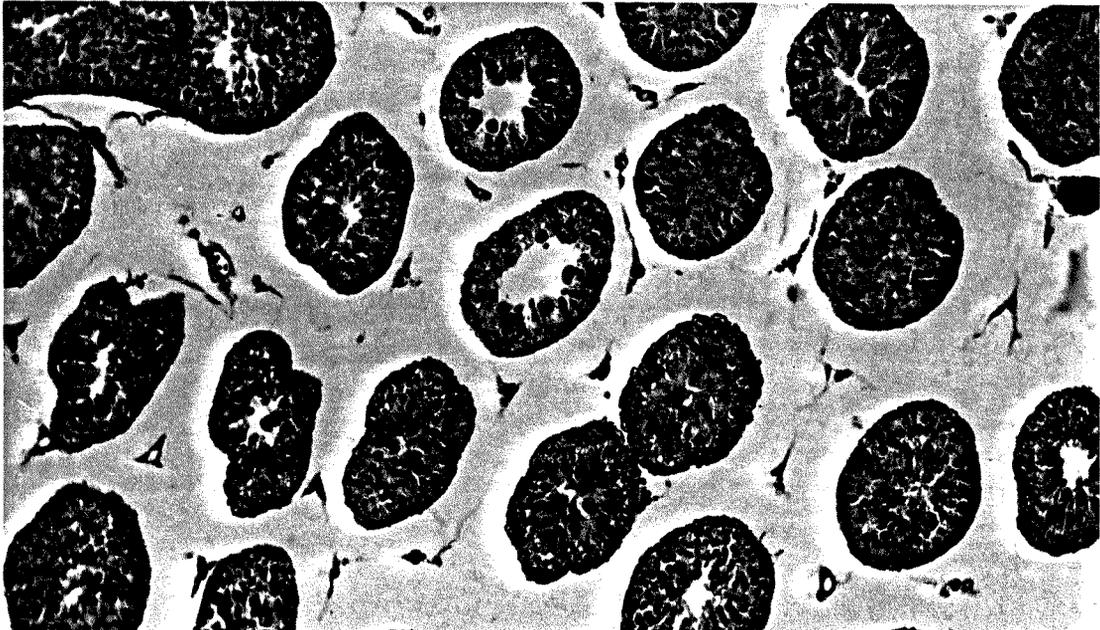


FIGURA N°10A

Túbulo seminífero do animal controle com 35 dias, mostrando início do estadiamento do ciclo do epitélio seminífero, destacando o estágio XIV. Aumento de 256 vezes.

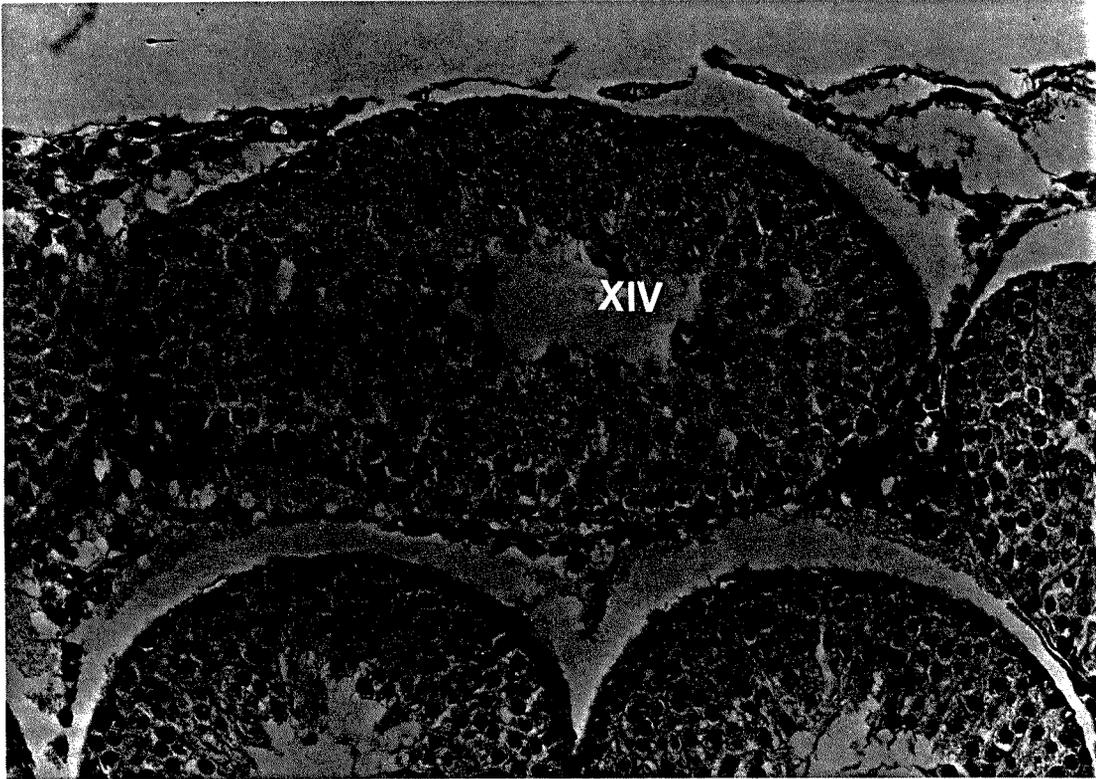


FIGURA N°10B:

Túbulo seminífero do animal tratado com 35 dias, destacando núcleos picnóticos e células hiper Cromáticas. Aumento de 256 vezes.

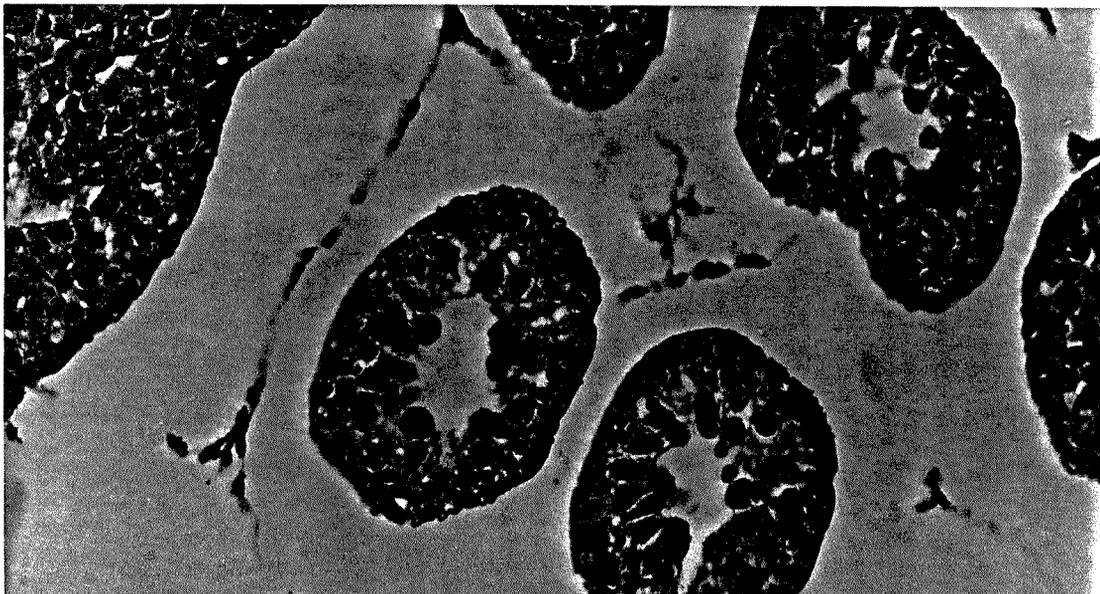
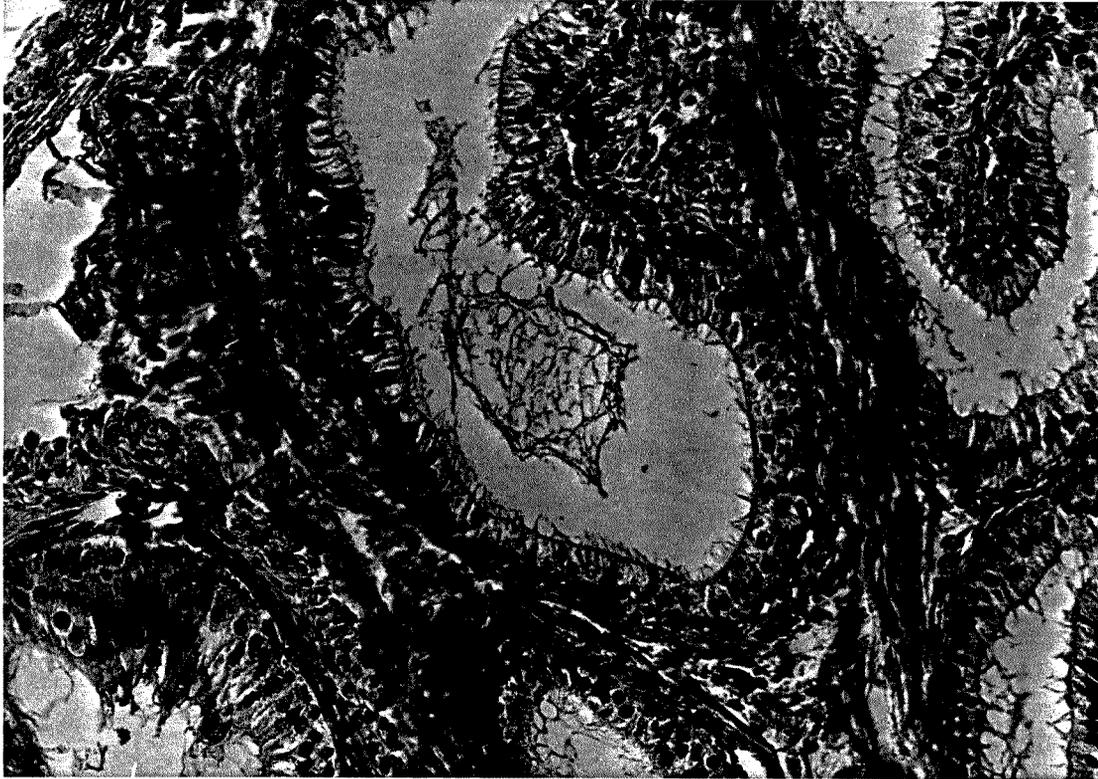


FIGURA N°11A

Aspecto do corpo do epidídimo do animal controle com 35 dias, mostrando espermatozóides no interior das lojas epididimárias. Aumento de 256 vezes.

**FIGURA N°11B**

Aspecto da cauda do epidídimo do animal tratado com 35 dias, mostrando células germinativas descamadas. Aumento de 320 vezes.



4. 3. 5 GRUPO EXPERIMENTAL ANIMAIS COM 50 DIAS DE IDADE.

A avaliação biométrica do diâmetro dos túbulos seminíferos dos animais deste grupo experimental, mostra redução significativa ($p < 0,05$) nos animais tratados em relação aos animais controles, como está mostrado nas Figuras nº 12a e 12b

O gráfico nº 5 mostra, que no grupo controle, o crescimento dos túbulos seminíferos torna-se aparentemente estabilizado após o quinquagésimo dia de idade, enquanto nos animais tratados, foi verificado considerável aumento após esta data.

A avaliação histológica dos testículos e dos epidídimos direitos dos animais controles, mostra o parênquima testicular com túbulos seminíferos uniformemente distribuídos. Estes túbulos apresentam estadiamento completo da espermatogênese, embora em ritmo inicial e lento. É possível a visualização dos estádios mais característicos do processo nesta espécie que são os de números I, VII/VIII e o XIV. (Figura nº13a)

O interstício destes animais, apresenta-se rico com as células de Leydig exibindo núcleo volumoso e cromatina frouxa. O citoplasma destas células é abundante e as vezes muito vacuolizado, dando a impressão de estarem em maior atividade funcional. (Figura nº13 a)

Os epidídimos destes animais são constituídos de lojas epididimárias com conteúdo espermático e algumas células germinativas descamadas. (Figura nº 14a)

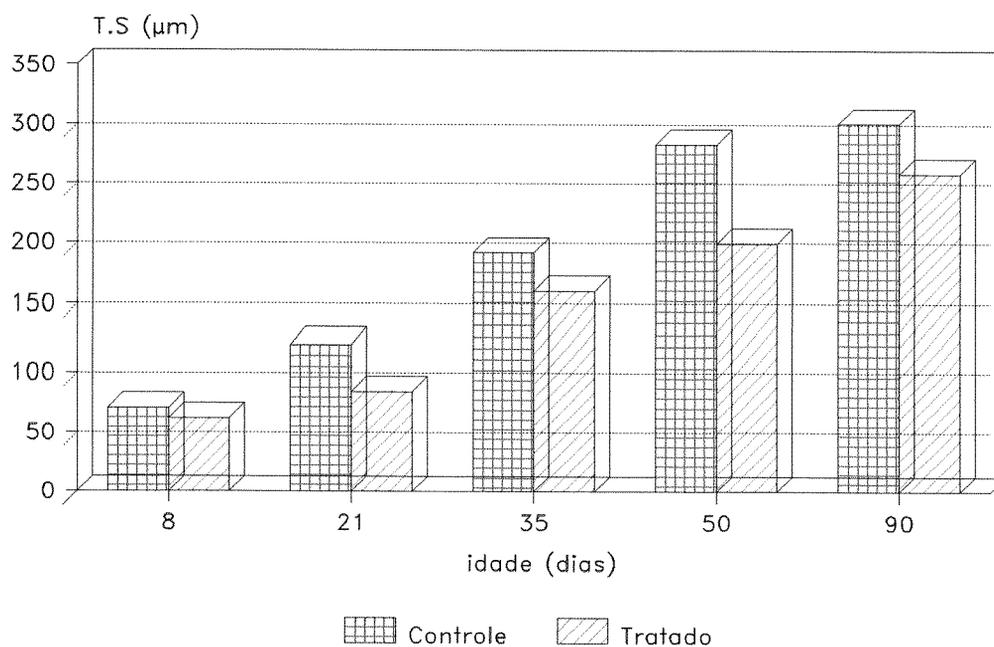
A avaliação histológica dos testículos e dos epidídimos direitos dos animais tratados deste grupo experimental, evidenciou redução na população celular do epitélio seminífero. Na grande maioria do material examinado são encontradas células em degeneração, células hipercromáticas e espermatídes multinucleadas em grandes quantidades. É evidente que a espermatogênese como um todo, está prejudicada e atrasada em relação ao grupo normal. Figura nº 13b.

O interstício testicular apresenta as mesmas características, ao observado nos animais controles. Figura nº 13b.

Os epidídimos estão constituídos de lojas epididimárias completamente vazias, ou com células imaturas em degeneração, ou então com pouca quantidade de espermatozóides e células descamadas em degeneração. (Figura nº 14b)

GRÁFICO Nº5

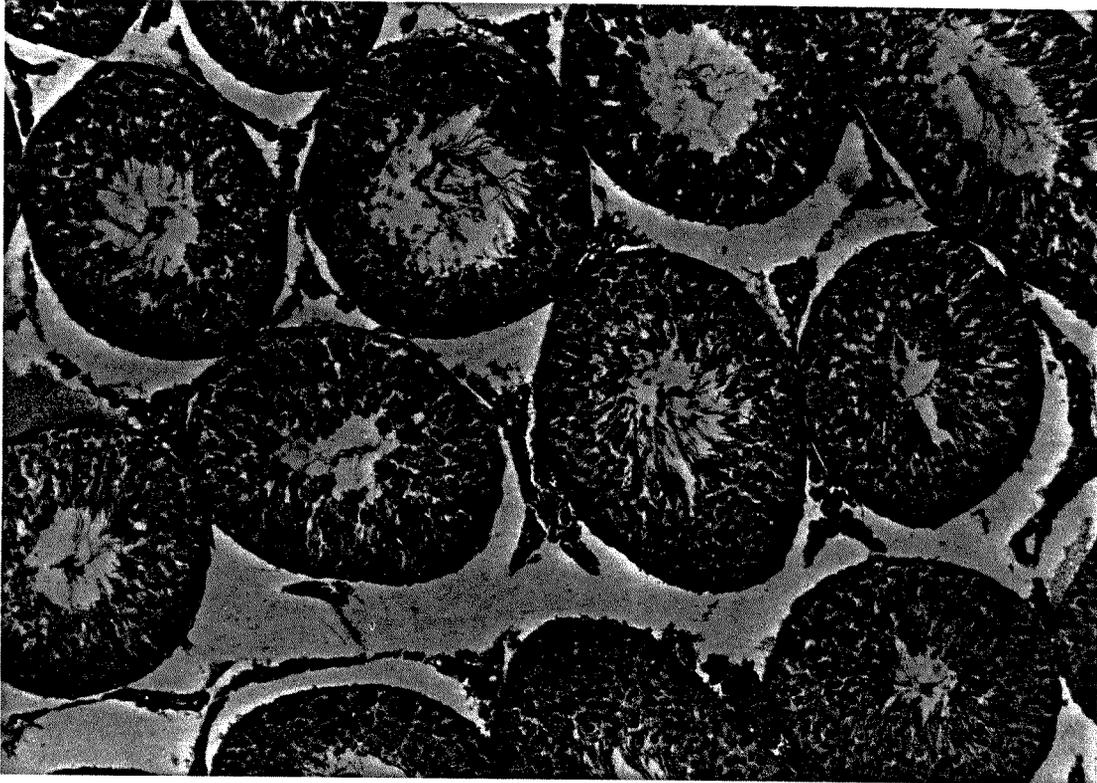
Media dos tubulos seminiferos em
corte transversal do testiculo direito



Os valores do gráfico acima, estão expressos em micrômetros, sendo consideradas significativas ($p < 0,05$) as diferenças entre os animais controles e os tratados.

FIGURA N°12A

Aspecto geral dos túbulos seminíferos e do interstício testicular do animal controle com 50 dias . Aumento de 128 vezes.

**FIGURA N°12B**

Aspecto geral dos túbulos seminíferos e do interstício testicular do animal tratado com 50 dias . Aumento de 128 vezes.

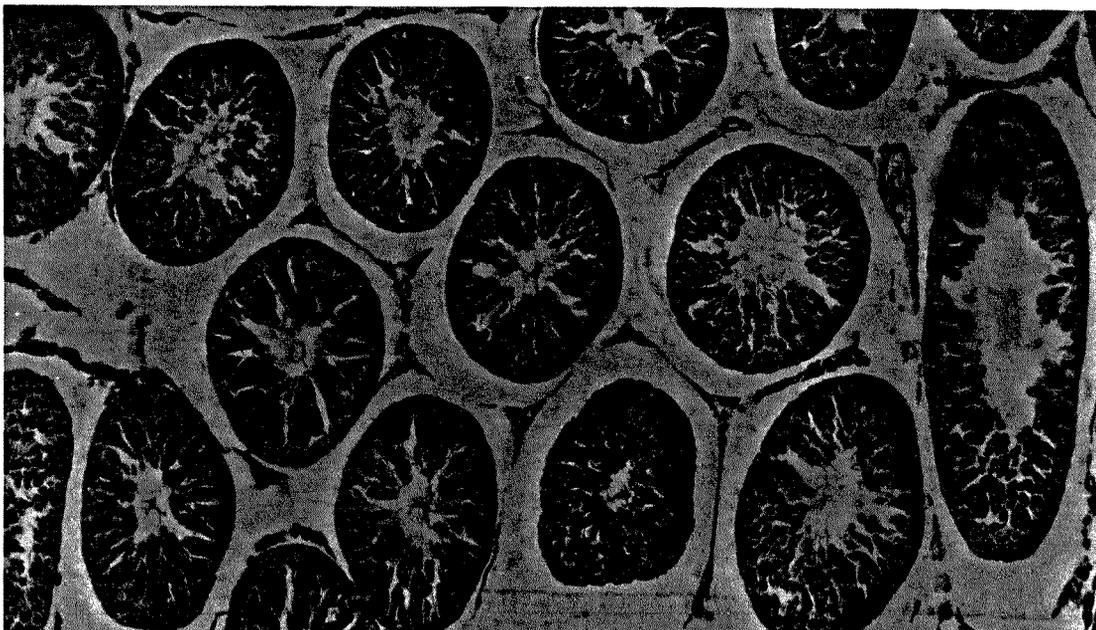
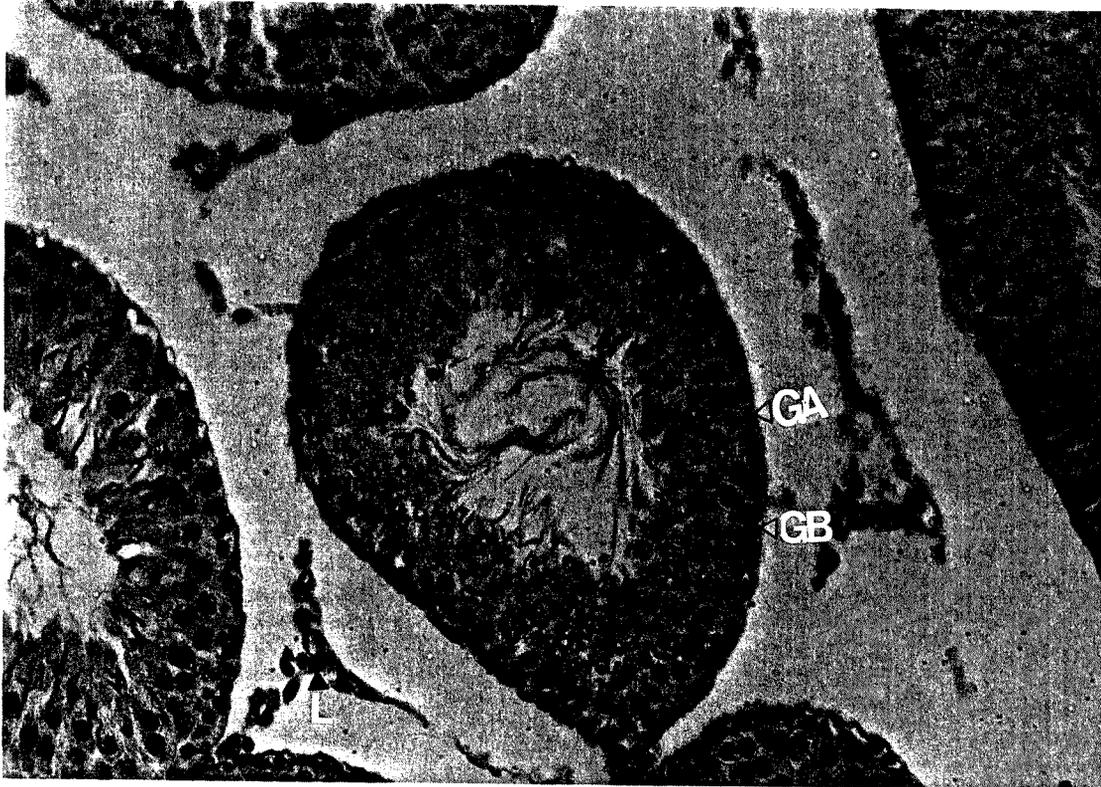


FIGURA N°13A

Túbulo seminífero do animal controle com 50 dias, destacando a espermatogônia do tipo A em (GA), a espermatogônia do tipo B em (GB) e a célula de Leydig em (L). Aumento de 256 vezes.

**FIGURA N°13B**

Túbulo seminífero do animal tratado com 50 dias, destacando a espermátide multinucleada e a célula de Sertoli em (S). Aumento de 320 vezes.

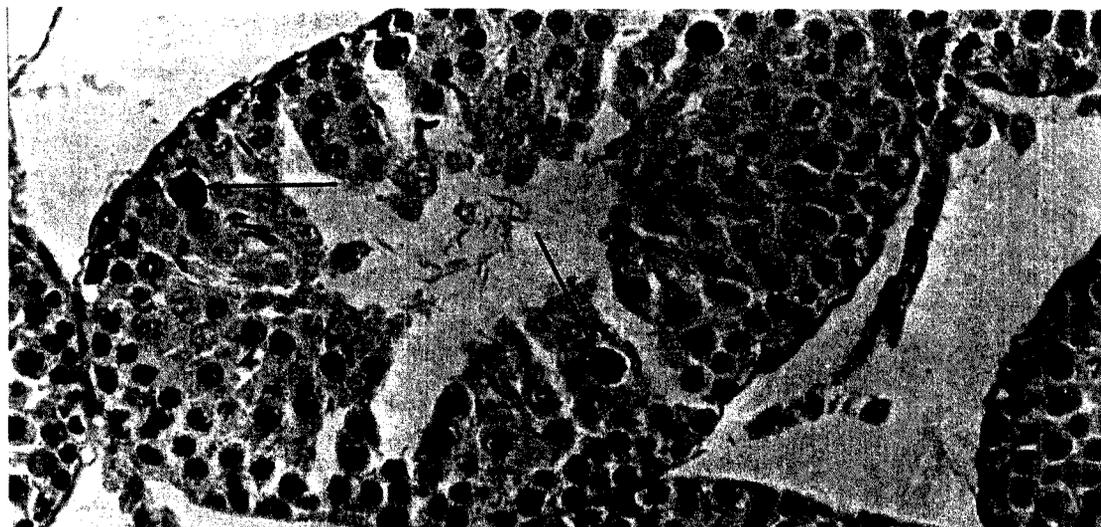
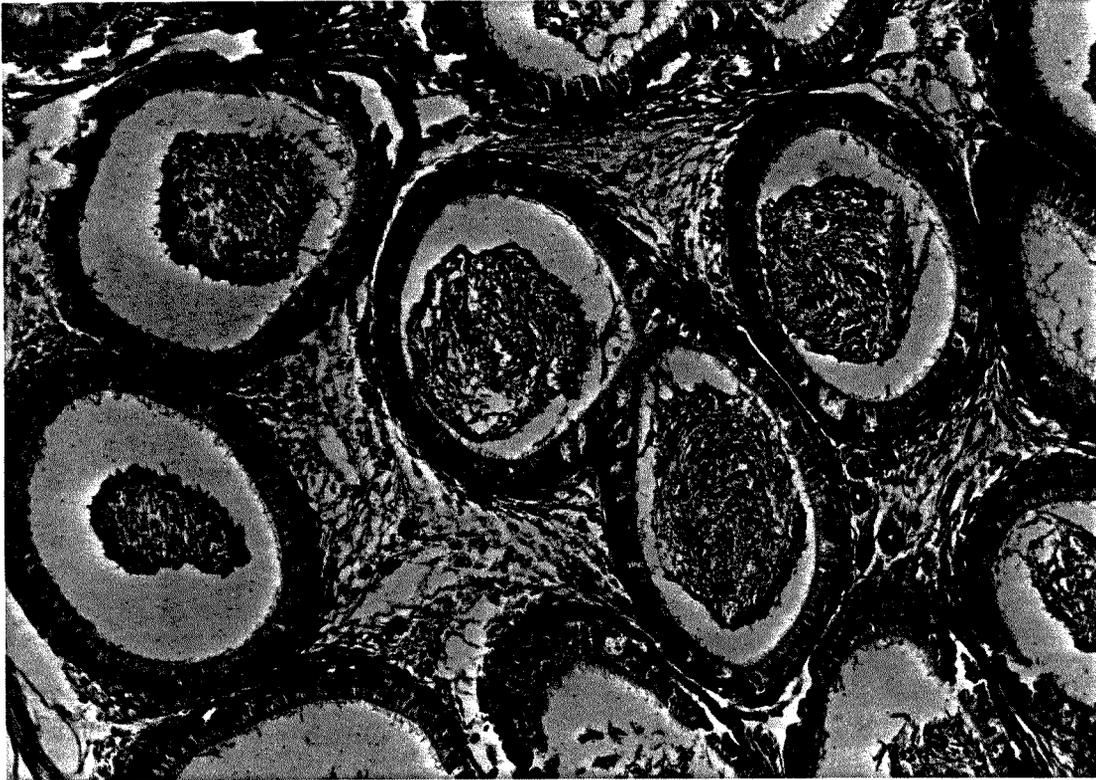


FIGURA N°14A

Região da cauda do Epidídimo do animal controle com 50 dias, mostrando as lojas epididimárias com espermatozóides. Aumento de 128 vezes.

**FIGURA N°14B**

Região da cauda do Epidídimo do animal tratado com 50 dias, mostrando as lojas epididimárias com células germinativas degeneradas. Aumento 128 vezes.



4. 3. 6 GRUPO EXPERIMENTAL ANIMAIS COM 90 DIAS DE IDADE:

O estudo morfométrico do diâmetro dos túbulos seminíferos dos animais com 90 dias, mostra diminuição significativa ($p < 0,05$) nos valores encontrados nos animais tratados. (Tabela nº 2).

A avaliação histológica dos testículos e dos epidídimos direitos dos animais controles, mostrou parênquima testicular com túbulos seminíferos em diferentes planos de corte .

O epitélio seminífero destes túbulos, apresenta celularidade característica da idade e fase funcional do órgão, como está mostrado na Figura nº 15a. Visualizam-se todos os estádios da espermatogênese da espécie, com especial ênfase para o Estádio I, caracterizado pela presença de feixes de espermatozóides imaturos no terço superior do epitélio seminífero, o Estádio VII/VIII caracterizado pela cauda dos espermatozóides formando um vórtice no lúmen tubular, e o Estádio XIV, caracterizado pela presença de figuras de mitose nos espermatócitos primários e presença de espermatócitos secundários Figura nº 16a.

O interstício apresenta-se normal, com as células de Leydig, apresentando citoplasma abundante e acidófilo.

Nos epidídimos o segmento analisado foi a cauda epididimária, caracterizada pela presença de amplas cavidades em diferentes planos de

corte. O epitélio de revestimento destas lojas variam de cilíndrico baixo a cúbico. Na superfície luminal das células de revestimento nota-se a presença de estereocílios. Abaixo da lâmina basal epitelial, as células musculares lisas já formam uma camada concêntrica. O lúmen epididimário está repleto de espermatozóides, formando uma massa de caudas e cabeças. Figura nº17a.

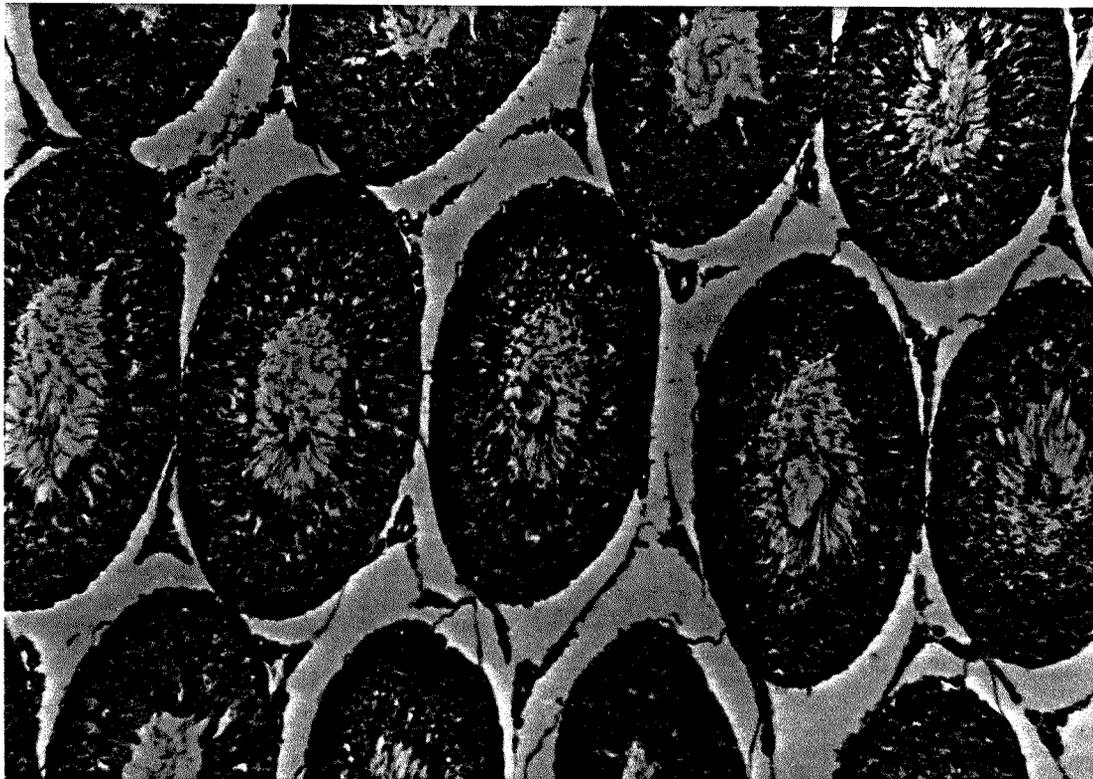
A avaliação histológica dos testículos e dos epidídimos direitos dos animais tratados deste grupo experimental, mostra evidente recuperação no diâmetro dos túbulos seminíferos, como está mostrado na Figura nº 15b. Com relação à espermatogênese, está acontecendo, pois são verificados todos os estádios, como mostrado na Figura nº 16b, mas com discreta redução em relação aos animais controles, além disso, são observados maior incidência de células hipercromáticas e de espermátides multinucleadas.

O interstício testicular, é aparentemente igual ao observado nos animais controles.

Os epidídimos apresentam aspecto semelhante aos dos animais controles, embora, aparentemente, a massa de espermatozóides seja menor. Figura nº 17b.

FIGURA N°15A

Aspecto geral dos túbulos seminíferos e do interstício testicular do animal controle com 90 dias. Aumento de 128 vezes.

**FIGURA N°15B**

Aspecto geral dos túbulos seminíferos e do interstício testicular do animal tratado com 90 dias, destacando os estádios I, VII/VIII e o XIV. Aumento de 128 vezes.

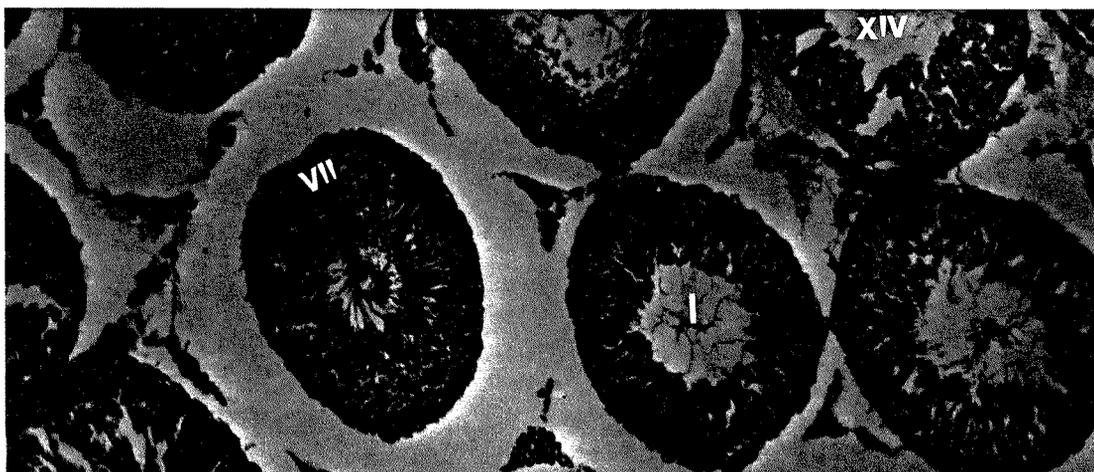


FIGURA N°16A

Túbulo seminífero do animal controle com 90 dias, destacando o estágio VII/VIII. Aumento de 256 vezes.

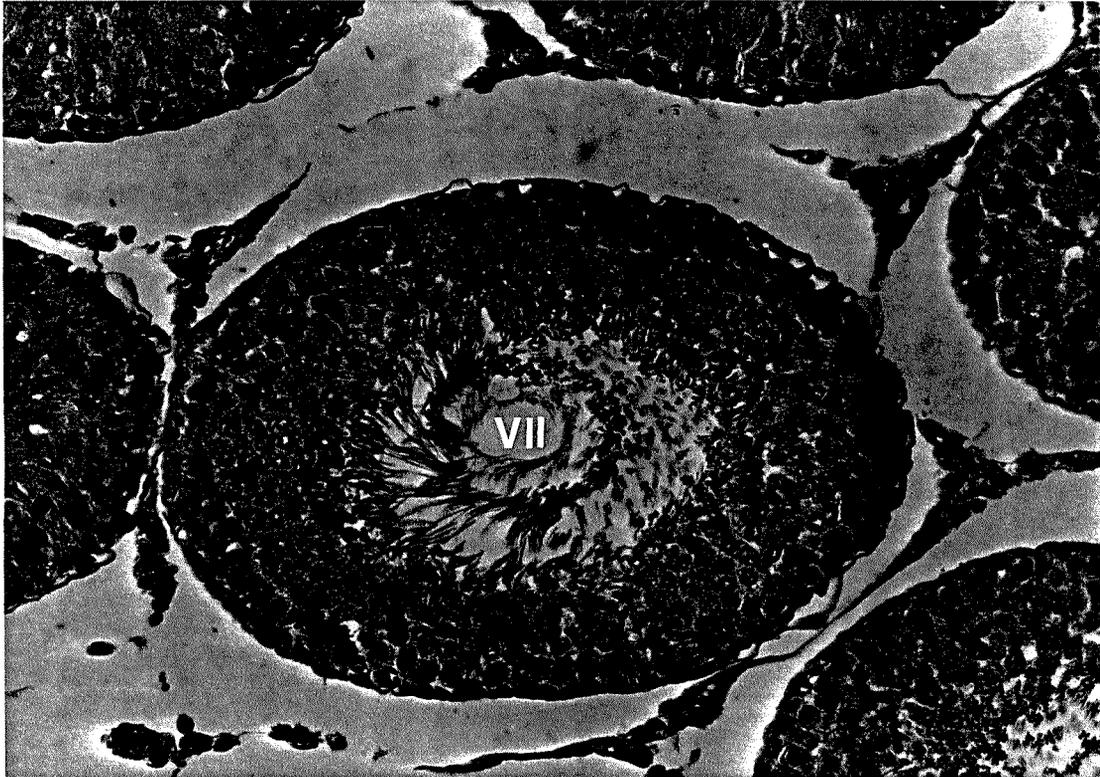


FIGURA N°16B

Túbulo seminífero do animal tratado com 90 dias, destacando no estágio VII/VIII, a espermatogônia A em (GA) , a espermatogônia B em (GB) e a célula de Sertoli em (S). Aumento de 256 vezes.

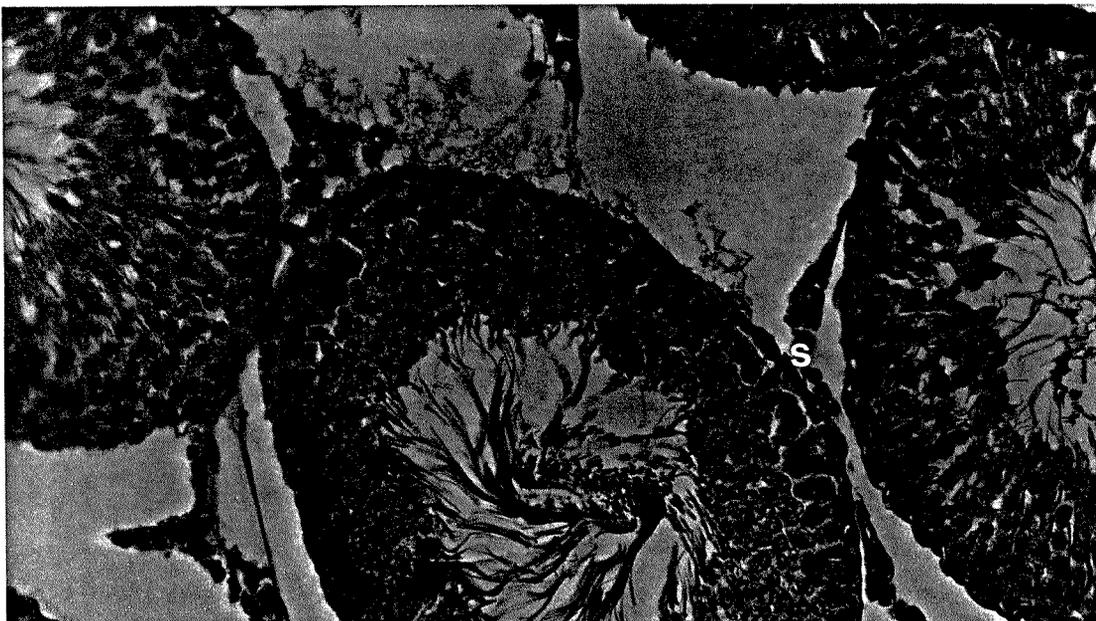


FIGURA N°17A

Segmento da cauda do epidídimo do animal controle com 90 dias, mostrando espermatozóides nas lojas epididimárias. Aumento 128 vezes.

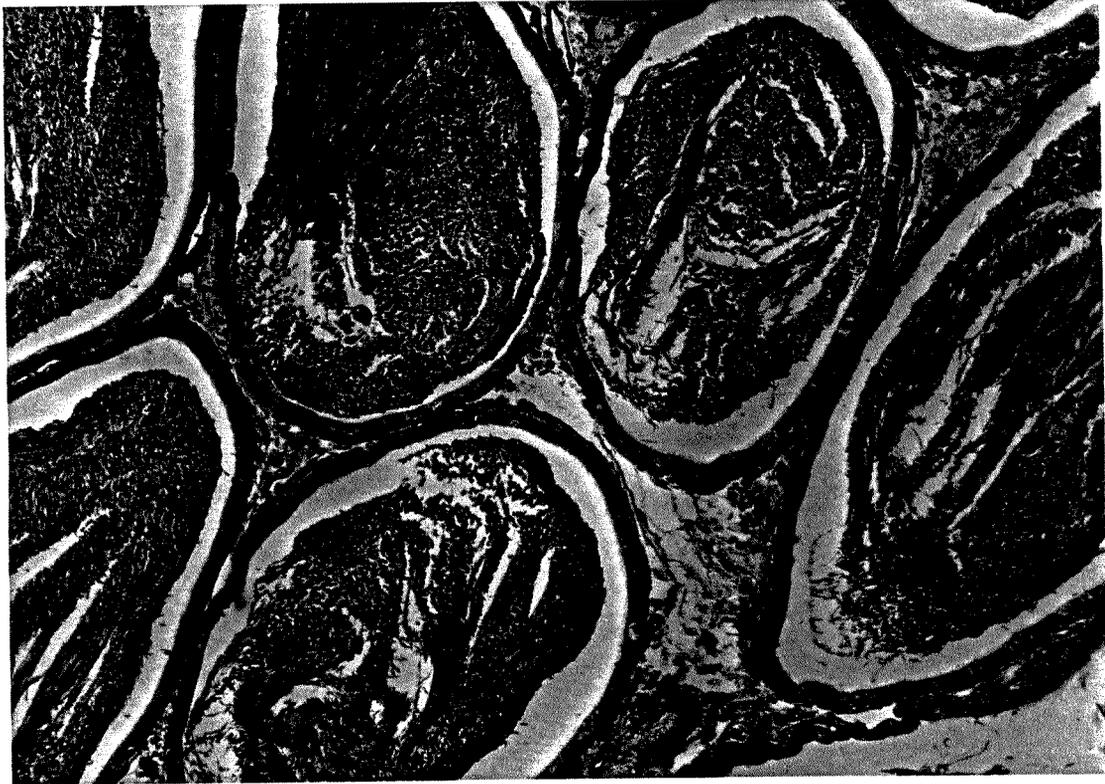


FIGURA N°17B

Segmento da cauda do epidídimo do animal tratado com 90 dias, mostrando espermatozóides nas lojas epididimárias. Aumento de 128 vezes.



4. 3. 7 AVALIAÇÃO DOS EIXOS ORTOGONAIS E DO VOLUME NUCLEAR DAS CÉLULAS DE SERTOLI:

As células de Sertoli observadas nos animais controles e nos tratados, apresentam o núcleo em forma elipsóide ou piriforme, com cromatina frouxa, distribuída uniformemente em finos grânulos, e com nucléolo grande geralmente aderido à carioteca.

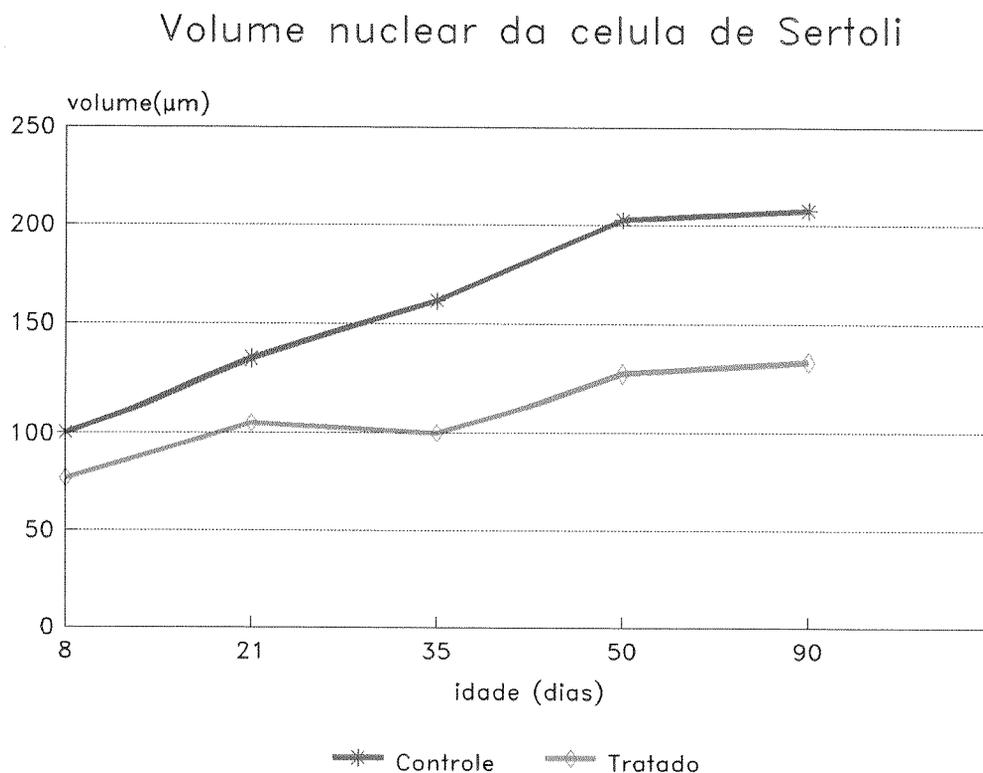
As medidas dos eixos ortogonal maior e menor do núcleo das células de Sertoli, e os cálculos para transformação em volume nuclear, mostraram que os animais tratados dos grupos experimentais 8, 21, 35, 50 e 90 dias de idade apresentaram valores significativamente ($p < 0,05$) inferiores aos encontrados nos animais controles das mesmas idades, como está demonstrada na tabela nº4. Apenas nos fetos controles e tratados, não foram encontradas diferenças significativas no volume nuclear das células de Sertoli, como foi anteriormente mostrado na Tabela nº 3.

Por outro lado, os resultados sugerem, que o processo de crescimento das células de Sertoli finaliza por volta do quinquagésimo dia de vida nos animais controles e tratados, como se pode verificar no gráfico nº6

TABELA N° 4

Volume nuclear das células de Sertoli nos diferentes grupos experimentais. Os valores estão em média \pm desvio padrão, sendo consideradas significativas ($p < 0,05$) as diferenças entre os animais controles e os tratados

IDADE	CONDIÇÃO EXPERIMENTAL	N	VOLUME NUCLEAR DA CÉLULA DE SERTOLI μm^3
8 DIAS	CONTROLE	6	100,13 \pm 16,00
	TRATADO	6	76,63 \pm 20,74
21 DIAS	CONTROLE	7	133,75 \pm 26,57
	TRATADO	7	105,09 \pm 19,51
35 DIAS	CONTROLE	7	161,15 \pm 25,71
	TRATADO	7	99,87 \pm 16,86
50 DIAS	CONTROLE	7	202,64 \pm 34,18
	TRATADO	7	127,36 \pm 21,41
90 DIAS	CONTROLE	7	207,45 \pm 28,83
	TRATADO	7	132,43 \pm 20,84

GRÁFICO N°6

O gráfico acima, está expresso em micrômetros cúbicos, sendo consideradas significativas ($p < 0,05$) as diferenças nos valores dos volumes nucleares entre os animais controles e tratados. Nota-se também, que após o quinquagésimo dia os animais controles e os tratados, apresentam aparente estabilização do aumento no volume nuclear das células de Sertoli.

4. 4 AVALIAÇÃO HORMONAL:

4 4. 1 FLUORIMUNOENSAIO DE TESTOSTERONA:

Foram analisados os animais dos grupos experimentais 21, 35, 50 e 90 dias de idade .

Os resultados encontrados nos grupos experimentais 21 e 35 dias de idade, mostram que, embora tenham sido observadas diferenças no espaço intersticial entre os animais controles e tratados, a avaliação da concentração plasmática de testosterona, não aponta diferença significativa entre os animais controles e tratados.

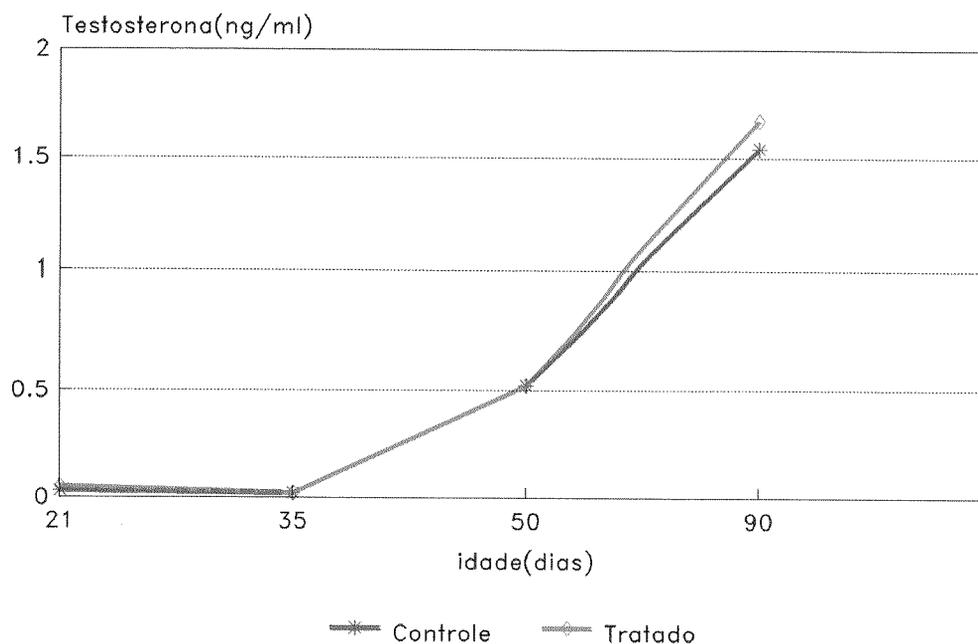
Os grupos experimentais 50 e 90 dias de idade apresentam a histologia do interstício semelhante entre os animais controles e tratados, e a avaliação da concentração plasmática de testosterona também não mostrou diferença significativa entre os animais destes grupos experimentais, como está mostrado na Tabela nº 5.

A concentração plasmática média de testosterona nos grupos experimentais 21 e 35 dias de idade foi consideravelmente baixa, começando a aumentar após o trigésimo quinto dia de idade. Gráfico nº 7

TABELA Nº 05

Valores dos níveis plasmáticos de testosterona nos grupos experimentais. Os valores estão em média \pm desvio padrão, não sendo encontradas diferenças significativas entre os animais controles e os tratados .

IDADE	CONDICÃO EXPERIMENTAL	N	TESTOSTERONA ng/ml	
21 DIAS	CONTROLE	5	0,03	\pm 0,04
	TRATADO	5	0,05	\pm 0,04
35 DIAS	CONTROLE	5	0,02	\pm 0,02
	TRATADO	5	0,02	\pm 0,02
50 DIAS	CONTROLE	5	0,52	\pm 0,22
	TRATADO	5	0,52	\pm 0,29
90 DIAS	CONTROLE	7	1,54	\pm 1,04
	TRATADO	6	1,67	\pm 1,06

GRÁFICO N°7Media da concentracao plasmatica da
Testosterona

Os valores de testosterona, estão expressos em nanograma por mililitro, não sendo observadas diferenças significativas entre os animais controles e os tratados. Verifica-se também aumento considerável nas concentrações de testosterona após o trigésimo quinto dia, tanto nos animais controles como nos tratados.

4.4.2 RADIOIMUNOENSAIO DE TIROXINA (T₄)

O método de radioimunoensaio para dosagens dos níveis plasmáticos de tiroxina dos fetos, não permitiu detectar sensibilidade ao hormônio, como está mostrado na tabela nº6.

Nos demais grupos, foi possível confirmar o quadro de hipotireoidismo nos animais tratados com doses diárias de 0,05mg de Methimazole, como está mostrado no Gráfico nº8.

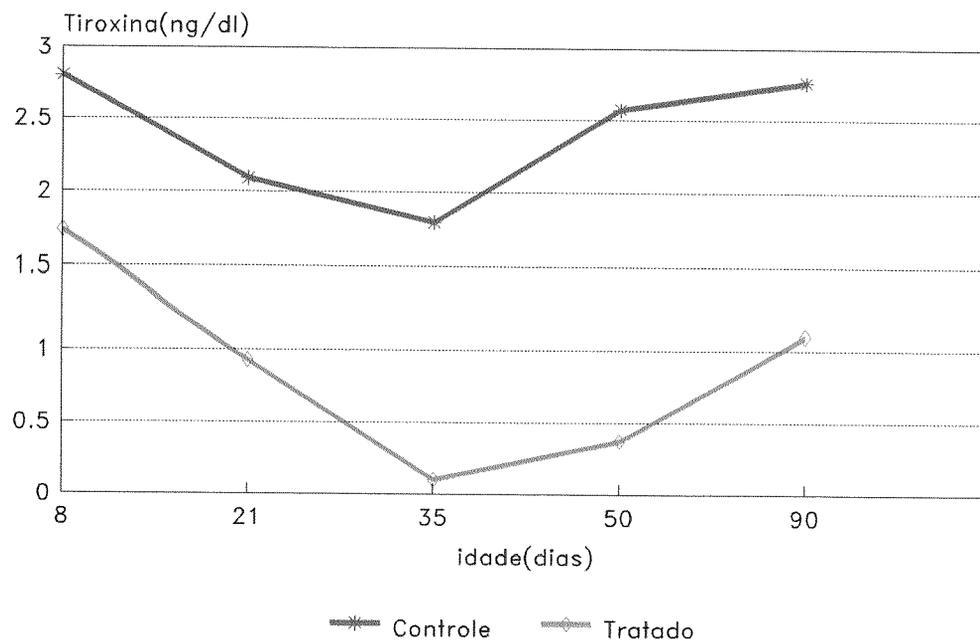
TABELA N° 06

Concentração plasmática de Tiroxina (T₄) das fêmeas grávidas utilizadas e dos machos de todos os grupos experimentais estudados. Os valores estão em média \pm desvio padrão, sendo considerado significativa ($p < 0,05$) as diferenças entre os animais controles e os animais tratados, exceto nos fetos com 19 dias de vida intra-uterina, que não apresentaram diferenças significativas.

IDADE	CONDIÇÃO EXPERIMENTAL	N	T ₄ PLASMÁTICO $\mu\text{g/dl}$	
FÊMEAS (Mães)	CONTROLE	3	2,06	$\pm 0,1$
	TRATADO	3	0,10	± 0
19 DIAS GESTAÇÃO	CONTROLE	3	0,10	± 0
	TRATADO	3	0,10	± 0
08 DIAS	CONTROLE	3	2,80	$\pm 0,17$
	TRATADO	3	1,73	$\pm 0,15$
21 DIAS	CONTROLE	7	2,09	$\pm 0,99$
	TRATADO	6	0,93	$\pm 0,84$
35 DIAS	CONTROLE	7	1,79	$\pm 0,82$
	TRATADO	6	0,10	± 0
50 DIAS	CONTROLE	6	2,57	$\pm 0,57$
	TRATADO	7	0,37	$\pm 0,26$
90 DIAS	CONTROLE	7	2,76	$\pm 0,58$
	TRATADO	5	1,09	$\pm 0,66$

GRÁFICO N°8

Media da concentracao plasmatica de tiroxina



O gráfico acima está expresso em micrograma por decilitro, sendo consideradas significativas ($p < 0,05$) as diferenças entre os animais controles e tratados.

4. 5 MORFOLOGIA DA GLÂNDULA TIREÓIDE E DO FÍGADO:

Foram analisadas a tireóide e o fígado dos animais dos grupos experimentais 21, 35, 50 e 90 dias de idade.

A histologia da tireóide veio confirmar o quadro de hipotireoidismo registrado pelas dosagens de T₄ pelo método de radioimunoensaio nos animais tratados. Nestes animais a glândula tireóide, apresentou os folículos tireoidianos menores e com pouca quantidade de colóide, como mostrado na Figura nº18.

A morfologia do fígado não demonstra indícios da ação da droga Methimazole sobre a estrutura do órgão.

Nos animais controles e tratados é possível verificar-se o lóbulo hepático considerado como a unidade anatômica estrutural do fígado, com seus 2 constituintes básicos: o parênquima epitelial, formado de células hepáticas, com forma poliédrica e núcleo central, dispostas em placas irregulares, denominados cordões hepáticos, e que convergem para veia centro-lobular, e o espaço porta, representado por uma condensação de tecido conjuntivo, no interior do qual são encontrados um ramo da artéria hepática, um ramo da veia porta e um canalículo biliar, além de um vaso linfático nem sempre possível de ser visualizado, nos preparados histológicos de rotina, como mostrado na Figura nº 19

FIGURA N°18

Tireóide do animal adulto tratado com methimazole, destacando região com os folículos de tamanho reduzido. Aumento de 128 vezes.

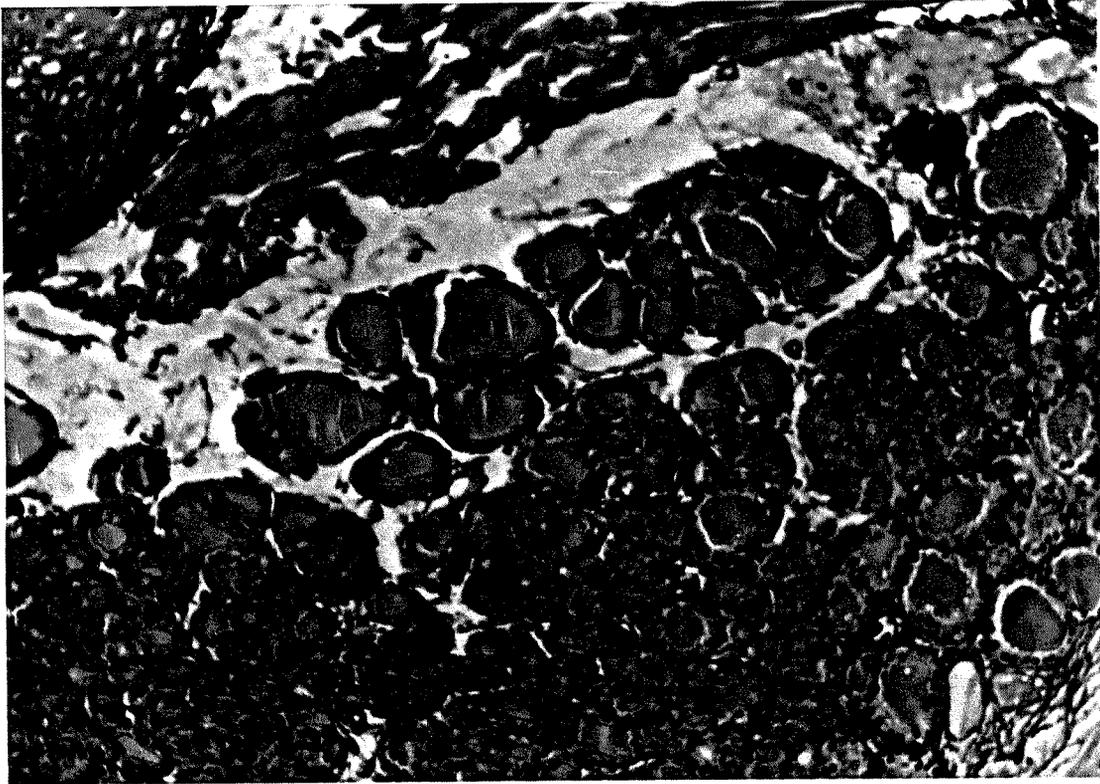


FIGURA N°19

Fígado do animal adulto tratado com methimazole, destacando a veia centro lobular em (CL), o espaço porta em (P), o canalículo em (CA) e a artéria em (A). Aumento de 128 vezes.



5. DISCUSSÃO:

Existem inúmeras substâncias que podem influenciar os níveis plasmáticos dos hormônios tireoidianos como, por exemplo, o ácido acetilsalicílico, o propylthiouracil, as sulfamidas, etc. Neste estudo optou-se pelo uso do Methimazole que bloqueia a síntese de T₄ e T₃ ao atuar sobre o complexo da peroxidase diminuindo as reservas de tiroxina, triiodotironina e de iodeto, baseado nos resultados positivos encontrados por (VALLE *et al.*,1985; PALMERO *et al.*,1989 e 1990; ANDO *et al.*,1990; FRANCAVILLA *et al.*,1991; PANNO *et al.*,1994; VOLPATO & NUNES, 1994).

Não foi considerada a possibilidade da ação direta do MMI sobre o testículo, considerando pertinentes os estudos anteriormente realizados por VALLE *et al.*(1985); PALMERO *et al.*(1989); FRANCAVILLA *et al.*(1991), PANNO *et al.*(1994), que avaliaram a espermatogênese em ratos, que receberam simultaneamente methimazole e doses exógenas de hormônios da tireóide e não encontraram alterações significativas no epitélio dos túbulos seminíferos.

Como o hipotireoidismo materno, no presente estudo, foi induzido no oitavo dia de prenhez que corresponde ao período de organogênese do rato, investigou-se o número total de filhotes por ninhada e a incidência de malformações congênitas visíveis e não foram encontradas alterações entre os fetos de mães tratadas e os de mães controles, coincidindo com os relatos de FOLLEY (1938), que afirma que a tireoidectomia em fêmeas

adultas não tem efeito sobre a concepção e manutenção da gestação e com os achados de JEKAT *et al.* (1993), os quais não encontraram aumento da incidência de malformações congênitas nos fetos das fêmeas com hipotireoidismo.

Por outro lado discordam de JONES *et al.* (1946), que sugeriram a participação dos hormônios da tireóide na elevação dos índices de reabsorção intra-uterina e com os de MORREALE DE ESCOBAR *et al.*(1985), que atribuíram ao hipotireoidismo materno a diminuição do tamanho das ninhadas.

É conveniente destacar-se que segundo FRANCAVILLA *et al.*(1991), são necessários pelo menos 5 dias de tratamento com methimazole para que ocorra uma redução dos níveis dos hormônios da tireóide. Isso provavelmente acontece porque embora o eixo hipotalâmico-hipófise-tireóide possa ser ajustado com precisão, o deslocamento tanto para níveis altos como para os mais baixos, pode levar horas ou dias, (BERNE & LEVI, 1990) e não minutos como ocorre em outros hormônios como, por exemplo, o cortisol.

Assim sendo, existe a possibilidade de que a fase crítica da organogênese do rato, tenha ocorrido antes do estabelecimento do quadro de hipotireoidismo materno, o que justificaria a não ocorrência de diferenças neste estudo nos parâmetros que se referem ao tamanho da ninhada e a incidência de malformações congênitas dos filhotes entre as fêmeas controles e as tratadas .

Além disso, NMADU (1990) e KLEIN *et al.*(1991), relacionaram os hormônios da tireóide com o desenvolvimento neuro-motor dos filhotes, mostrando que o hipotireoidismo materno resulta em atraso no desenvolvimento mental dos filhotes. HEYERDAHL *et al.*(1991), estabeleceram inclusive uma relação direta entre os hormônios da tireóide e o desenvolvimento intelectual de crianças de 2 a 6 anos. FORREST *et al.*(1991), mencionaram a participação dos hormônios tireoidianos no desenvolvimento cerebral e GUEDES & PEREIRA DA SILVA (1993), concluíram que a redução nos níveis dos hormônios da tireóide materna, leva a diminuição do peso cerebral nos filhotes.

As observações deste trabalho, restringiram-se apenas àquelas feitas em relação a abertura dos olhos e o início da locomoção, os quais embora, não apresentassem diferenças em relação aos filhotes de mães controles, não podem ser consideradas como parâmetros exclusivos e/ou determinantes do diagnóstico de retardo mental dos filhotes, embora seja possível, que na existência do atraso no desenvolvimento neuro-motor nos filhotes com hipotireoidismo, possa ocorrer também alterações futuras no comportamento reprodutor nos animais adultos.

O efeito dos hormônios da tireóide sobre os testículos dos fetos, no presente estudo, sugere que o hipotireoidismo materno induzido por methimazole, não influencia diretamente o tamanho dos testículos, o diâmetro dos túbulos seminíferos e no volume nuclear das células de Sertoli, dos fetos de 19 dias de vida intra-uterina tratados em relação aos controles. FRANCAVILLA *et al.*(1991), também encontraram resultados semelhantes aos encontrados nos fetos no presente estudo.

Os cordões seminíferos dos testículos dos fetos controles e dos tratados no presente estudo, apresentaram-se localizados, preferencialmente, na região capsular do órgão o que, pode estar relacionado à embriogênese do testículo.

A reduzida quantidade de células germinativas encontradas nos cordões seminíferos dos fetos controles e tratados neste estudo, pode ser atribuída, segundo CLERMONT & PEREY (1957) às modificações que ocorrem nessa fase, com o tamanho dos cordões seminíferos, o que resulta em aumento da incidência de células germinativas degeneradas.

A igualdade do volume nuclear das células de Sertoli dos fetos controles e tratados, pode estar diretamente relacionado à ontogênese dos receptores dos hormônios da tireóide, pois segundo JANNINI *et al.*(1990), os receptores nucleares de T₃ da célula de Sertoli do rato, são expressos maximamente nos últimos dias da gestação e durante as duas primeiras semanas pós-parto. ORTH (1984), considera o final da gestação como o período crítico de proliferação das células de Sertoli, estando sobre a influência do FSH fetal.

Neste estudo a igualdade do volume nuclear das células de Sertoli entre os fetos das mães controles e das tratadas, pode ser atribuído ao fato da tireóide fetal estar no período de início de atividade funcional, não respondendo, assim, ao TSH materno (DUSSAULT & LABRIE.,1975) e, que aliado a estas baixas concentrações de tiroxina e triiodotironina , nos fetos com 19 dias de vida intra-uterina, o eixo hipófise-gônadas é pouco sensível

as manipulações hormonais, (PAKARIEN *et al.*,1994), possivelmente devido a interferência dos hormônios placentários.

Durante a gestação, a influência dos hormônios da tireóide sobre o crescimento e o peso corporal dos fetos, foi questionada por vários autores. GIL-GARAY *et al.* (1991) e AL-JURAYYAN *et al.* (1991), concluem que o hipotireoidismo prejudica o desenvolvimento ósseo dos fetos. MORREALE DE ESCOBAR *et al.* (1987) e RUIZ-DE-OÑA *et al.*(1991), mencionam que a diminuição dos níveis dos hormônios tireoidianos reduz o peso corporal dos fetos. JEKAT *et al.*(1993), não observaram diferenças do peso corporal dos fetos entre o 17º e 20º dia da gestação das fêmeas com hipotireoidismo em relação as fêmeas controles.

Neste estudo também foi verificado redução no peso corporal dos fetos. Atribui-se este fato, principalmente, à participação dos hormônios maternos, uma vez que, a atividade funcional da tireóide fetal, segundo DUSSAULT & LABRIE (1975); MORREALE DE ESCOBAR *et al.*(1985); PIC.& BOUQUIN (1985); RUIZ-DE-OÑA *et al.*(1991), só tem início entre os 17,5 e 18 dias de gestação. Fato esse confirmado no presente estudo pelos níveis indetectáveis de tiroxina plasmática dos fetos controles e tratados, mensurados pelo método de radioimunoensaio de T₄.

Mesmo ocorrendo aumento significativo dos hormônios da tireóide fetal nos últimos dias da gestação, como é relatado por DUSSAULT & LABRIE.(1975); EGUCHI *et al.*(1980); GIL-GARAY *et al.*(1991) e RUIZ-DE-OÑA *et al.*(1991), esse aumento não seria suficiente para eliminar a diferença de peso corporal em poucos dias.

ILICKI *et al.*(1991) e SCHLIENGER & DREYFUS (1993), embora tenham mencionado o desenvolvimento independente da tireóide fetal, não descartam a possibilidade de transferência placentária, tanto no hipotireoidismo como no hipertireoidismo e segundo DUSSAULT & LABRIE.(1975), a tireóide fetal não responde ao TSH materno, o que justificaria neste estudo, a manutenção da diferença do peso corporal dos filhotes das mães tratadas em relação aos filhotes de mães controles no dia do nascimento.

Nos demais grupos experimentais do presente estudo, foi possível verificar redução dos níveis plasmáticos de T₄, pelo método de radioimunoensaio nos animais tratados, sendo inclusive possível a indução experimental do hipotireoidismo dos filhotes lactentes de mães tratadas, provavelmente, pela transferência dos hormônios maternos mais o methimazole para os filhotes com 8 dias de idade, que alimentam-se, exclusivamente, de leite materno e de apenas o methimazole nos filhotes lactentes com 21 dias, que já abriram os olhos e alimentam-se também de ração.

A redução do peso corporal também foi verificada neste estudo, nos outros grupos experimentais, o que provavelmente pode estar relacionado à diminuição das sínteses de DNA, para BRASEL & WINICK (1970), e de proteínas, para CANAVAN *et al.*(1994).

PORTERFIELD & HENDRICH (1976) e THOMAS *et al.*(1993), sugerem a ação direta dos hormônios da tireóide sobre a concentração do

GH, podendo assim interferir no peso corporal dos animais. VOLPATO & NUNES.(1994), inclusive relacionam o hipotireoidismo com a diminuição da transcrição do gene de GH.

O efeito do hipotireoidismo sobre o comprometimento do crescimento do testículo e no atraso do início da espermatogênese, foi verificado por FRANCAVILLA *et al.*(1991) e KIRBY *et al.*(1992) durante o período pré-puberal e puberal do rato.

A redução nos níveis plasmáticos dos hormônios tireoidianos, no presente trabalho, resultou em acentuado comprometimento do crescimento do testículo e no atraso da espermatogênese, avaliados nos animais com 8, 21, 35 e 50 dias de idade, através da diminuição nos animais tratados, do peso dos testículos, do comprimento testicular, exceto nos animais com 8 dias de idade tratados, na quantidade de camadas de células germinativas, no volume nuclear das células de Sertoli, no aumento da incidência das células germinativas hiper Cromáticas e das espermátides multinucleadas, e no atraso do início do estadiamento do ciclo do epitélio seminífero.

Não foi objetivo deste estudo, avaliar a frequência quantitativa dos estádios do ciclo do epitélio seminífero, em função da variável tempo, uma vez que na sua realização, seriam necessários pelo menos 10 animais por grupo e 200 túbulos seminíferos por animal, se apenas os estádios VII/VIII fossem avaliados (HESS, 1990), por essa razão optou-se por uma avaliação qualitativa dos estádios: I, VII/VIII e do XIV.

O mecanismo exato da atuação dos hormônios tireoidianos no desenvolvimento e diferenciação do testículo do rato jovem, necessita, ainda, de melhor compreensão, mas pode estar relacionado com a sua ação direta sobre a concentração dos hormônios da hipófise anterior como observado por NEGRO-VILLAR *et al.*(1977), que sugeriram a participação da prolactina na regulação da manutenção da função testicular, por SPITERI-GRECH *et al.*(1991), ao considerarem a participação do GH no crescimento testicular e por KIRBY *et al.*(1992), ao verificarem que ratos induzidos ao hipotireoidismo com PTU do nascimento até o vigésimo quarto dia de vida, apresentaram diminuição no crescimento testicular, acompanhado de redução nos níveis plasmáticos de FSH, LH, GH, Prolactina e aumento no TSH.

O efeito dos hormônios tireoidianos sobre os níveis plasmáticos de LH e FSH foi verificado por BASKI, (1973). RAJ & DYM, (1976), atribuíram à participação do LH e do FSH no peso do testículo, no diâmetro dos túbulos seminíferos e na manutenção das células germinativas. WONG *et al.*(1980) e RUIZ *et al.*(1989), verificaram que ratos jovens com hipotireoidismo, apresentam redução dos níveis plasmáticos dos hormônios gonadotróficos e, conseqüentemente atraso da espermatogênese. HECKERT & GRISWOLD (1991), identificaram receptores de FSH no testículo de ratos jovens e VAISHNAV & MOUDGAL.(1991) notaram, que o FSH é necessário no início da espermatogênese.

Outra forma de participação dos hormônios da tireóide no desenvolvimento e diferenciação do testículo de rato jovem, está na sua

ação sobre as células de Sertoli (JANNINI *et al.*, 1990 e COOKE *et al.*, 1991b).

Os dados, do presente estudo, revelaram uma redução significativa do volume nuclear das células de Sertoli dos animais tratados, sendo praticamente, inibido o aumento do volume até o trigésimo quinto dia. Apenas os fetos tratados não apresentaram alterações do volume nuclear dessas células. Nos demais grupos experimentais, os hormônios tireoidianos podem agir diretamente sobre as células de Sertoli, graças à presença de receptores dos hormônios da tireóide ou indiretamente nessas células, através de sua ação sobre os níveis de FSH, LH e TSH.

A participação do FSH, LH e TSH sobre o crescimento e diferenciação das células de Sertoli, foi observada por HANSSON *et al.*(1976), ao verificarem que o FSH e os andrógenos são necessários à produção de ABP pelas células de Sertoli. CHEMES *et al.*(1979), ao concluírem que na ausência do LH, as células de Sertoli dos ratos jovens, apresentam diminuição do tamanho nuclear e alterações citoplasmáticas, enquanto que na ausência de FSH, verifica-se apenas diminuição do volume nuclear e JAKUBOWIAK *et al.*(1990), ao considerarem o FSH, como regulador da secreção de inibina pelas células de Sertoli.

HUANG *et al.*(1991), estudando a participação das células de Sertoli sobre a espermatogênese de ratos imaturos hipofisectomizados, verificaram a importância do FSH, na produção de ABP pelas células de Sertoli, e que a ABP pode desempenhar vários papéis no controle das fases finais da espermatogênese. GHOSH *et al.*(1992), afirmam que as células de Sertoli

estão sobre a influência dos hormônios FSH, LH e testosterona e que os ratos jovens hipofisectomizados, apresentam redução no peso dos testículos, no diâmetro dos túbulos seminíferos e um aumento do número de células germinativas degeneradas.

A participação dos hormônios da tireóide sobre o metabolismo das células de Sertoli, foi observada por FUGASSA *et al.*(1987); PALMERO *et al.*(1989) e BUNICK *et al.*(1994), ao verificarem que durante o hipotireoidismo ocorre redução da produção de ABP pelas células de Sertoli. BORLAND *et al.*(1984), PALMERO *et al.*(1989) e VAN-HAASTER *et al.*(1993a), verificaram que no hipotireoidismo as células de Sertoli produzem menos IGF1.

VAN-HAASTER *et al.*(1992), ao induzirem o hipotireoidismo nos ratos do nascimento até o vigésimo sexto dia, constataram uma redução na área nuclear das células de Sertoli. PANNO *et al.*(1994), verificaram que o hipotireoidismo induzido no rato, do nascimento até a quarta semana pós-parto, resulta em diminuição do metabolismo de dehydrostestosterona (DHT) com aumento na produção de estradiol e ULISSE *et al.*(1994) observaram que o T₃ em ratos diminui a produção de estradiol pelas células de Sertoli.

BUNICK *et al.*(1994), verificaram que o hipotireoidismo prejudica o início da expressão de vários RNA_m e que, nos animais controles não é mais detectável a "Mullerian inhibiting substance" (MIS) entre o décimo quinto e vigésimo dia de idade, enquanto que, nos animais com diminuição dos níveis plasmáticos dos hormônios da tireóide ainda são encontrados no

trigésimo quinto dia de idade, sugerindo que o hipotireoidismo resulta em prolongação da fase de proliferação e no atraso da diferenciação das células de Sertoli. VAN-HAASTER *et al.* (1993a) verificaram, que o T₃ reduz a fase de proliferação das células de Sertoli, estabelecendo inclusive uma relação entre o início da diferenciação dessas células, com o surgimento do lúmen nos túbulos seminíferos, que nos ratos normais acontece por volta do 12º dia de idade, enquanto que nos animais com hipotireoidismo só começa a surgir após o 16º dia de idade, confirmado no presente estudo, pela ausência de lúmen nos túbulos seminíferos dos animais controles e tratados com 8 dias de idade e da elevada incidência de túbulos atróficos e sem lúmen nos animais tratados com 21 dias de idade.

O hipotireoidismo pode comprometer o desenvolvimento e diferenciação das células de Sertoli nos ratos jovens, o que justificaria no presente estudo a redução do volume nuclear dessas células, resultando na diminuição do diâmetro dos túbulos seminíferos, com aumento das células germinativas degeneradas (VAN-HAASTER *et al.*,1992), ou seja, demonstrando a importância dos hormônios da tireóide na modulação das funções do epitélio seminífero (ULISSE *et al.*,1994).

É conveniente lembrar que o efeito dos hormônios tireoidianos sobre as células de Sertoli, está diretamente condicionado à presença de receptores dos hormônios da tireóide, e estes estão, por sua vez, relacionados com a idade do animal (JANNINI *et al.*,1990)

Neste estudo verificou-se, que após o quinquagésimo dia de idade, os animais com hipotireoidismo apresentaram aumento, consideravelmente,

maior em relação aos animais controles, no peso e no comprimento testicular, no diâmetro dos túbulos seminíferos, sugerindo a não interferência dos hormônios tireoidianos sobre o testículo de rato adulto, confirmado também por VILCHEZ-MARTINEZ (1973); BRUNI *et al.*(1985) e por WEISS & BURNS (1988), que não verificaram influência do hipotireoidismo no testículo em ratos adultos.

A discreta diminuição do peso e do comprimento testicular, do diâmetro dos túbulos seminíferos e da abundância dos estádios I, VII/VIII e no XIV observados no presente estudo nos animais com 90 dias tratados em relação aos animais controles da mesma idade, pode ser atribuída ao período de recuperação testicular, uma vez que, segundo VAN-HAASTER *et al.*(1993b), no rato adulto o ciclo do epitélio seminífero dura cerca de 12,8 dias e que, para ROOSEN-RUNGE (1962), são necessários passar 4 ciclos do epitélio seminífero, para poder-se avaliar o efeito sobre a espermatogênese. E, também, segundo MEISAMI *et al.*(1992), o testículo de rato necessita de pelo menos 65 dias para recuperação morfo-funcional.

Neste estudo descartou-se também , a participação dos hormônios tireoidianos sobre as células de Sertoli nos animais com 90 dias, em função da aparente estabilização do crescimento, após o quinquagésimo dia nos animais controles e tratados, o que confirma os achados de JANNINI *et al.*(1990), ao relatarem ausência de receptores dos hormônios da tireóide nas células de Sertoli dos animais adultos.

Finalmente, será discutido o efeito do hipotireoidismo sobre o interstício testicular.

No presente estudo a área intersticial dos animais de 8, 21 e 35 dias de idade com hipotireoidismo, apresentou-se maior e com aparente aumento na população das células de Leydig. SHARPE *et al.*(1991), consideram as células de Sertoli básicas no mecanismo de regulação do fluído intersticial, e que o comprometimento dessas células resultaria no aumento do volume do fluído intersticial.

Por outro lado BILLIS (1982), menciona a tendência de aproximação das células de Leydig, toda vez que há hipotrofia dos túbulos seminíferos, sem que necessariamente ocorra hiperplasia destas células.

Quanto ao nível plasmático de testosterona, no presente estudo, os animais com 21 e 35 dias controles e tratados, apresentaram concentrações reduzidas nos níveis de testosterona, aumentando consideravelmente nos grupos 50 e 90 dias, confirmando os resultados encontrados por MADDOCKS *et al.*(1992), que também encontraram níveis reduzidos nos animais com 35 dias e aumento significativo nos animais adultos e por DOHLER & WUTTKE (1975), ao mencionarem que os níveis de testosterona nos ratos no período pre-puberal são reduzidos, aumentando consideravelmente na puberdade.

A igualdade nas concentrações de testosterona entre os animais controles e os tratados no presente estudo, confirmam os resultados encontrados por CUNNINGHAM *et al.*(1978) e por COOKE & MEISAMI, (1991a) e discordam de CHOWDHURY & ARORA (1984), que verificaram redução nos níveis de testosterona nos animais tireoidectomizados.

Provavelmente a igualdade na concentração plasmática de testosterona, observada no presente estudo, pôde ser atribuída ao método utilizado para dosagem de testosterona, ou então, levando-se em consideração, que, embora LOVELAND *et al.*(1993) mencionem a importância do LH no mecanismo de regulação funcional das células de Leydig, MURAI *et al.*(1992), relatam a existência de "fatores", que seriam proteínas com aproximadamente 13KDa produzidas pelas células de Sertoli que estimulam a produção de testosterona pelas células de Leydig e KHAN *et al.*(1992) observaram que o IGF1 produzido pelas células de Sertoli é também transformado em fator de crescimento (TGF) nesta célula, participando do mecanismo de regulação funcional das células de Leydig, e mencionam que o LH sozinho apresenta menor efeito sobre as células de Leydig, se comparado à ação sinérgica com o TGF.

No presente estudo, as concentrações de testosterona começam a aumentar consideravelmente, após o trigésimo quinto dia nos ratos controles e tratados, coincidindo com o período de diminuição acentuada dos receptores de T₃ sobre as células de Sertoli, (JANNINI *et al.*1990), o que poderia justificar a igualdade nos níveis entre os animais controles e os tratados.

Os dados apresentados sugerem a necessidade de melhor compreensão sobre os mecanismos moleculares das células de Sertoli em ratos de várias idades "in vivo" e "in vitro", induzidos experimentalmente tanto ao hipotireoidismo como ao hipertireoidismo, uma vez que essas células, são consideradas de enorme importância no testículo, podendo

inclusive ser utilizadas segundo HESS *et al.*(1990) no aumento da produção de células do epitélio seminífero.

6 .CONCLUSÕES:

A partir dos objetivos propostos neste estudo, da metodologia empregada e das análises dos resultados biométricos, morfológicos e hormonais, foi possível concluir que o Hipotireoidismo em ratos causa:

1. O hipotireoidismo materno, mesmo que induzido no início da organogênese, não resulta em aumento da incidência de malformações congênitas nos neonatos, no número de blastocistos implantados, no predomínio de um sexo sobre o outro no nascimento e também não leva a alterações no comportamento das fêmeas em relação ao cuidado dos filhotes lactentes.

2. O peso corporal dos animais é significativamente menor em relação aos animais controles. Nos animais controles, verifica-se ganho acentuado do peso corporal após o trigésimo quinto dia de idade, o mesmo só acontecendo nos animais tratados após o quinquagésimo dia de idade.

3. Compromete o crescimento e o ganho de peso dos testículos, embora nos animais tratados dos grupos experimentais 19 dias de gestação e 8 dias de idade não tenham sido observadas diferenças no comprimento testicular e após o quinquagésimo dia de idade, os animais tratados

apresentaram ganho de peso e comprimento testicular consideravelmente maior em relação aos animais controles.

4. Diminui, significativamente, o diâmetro dos túbulos seminíferos dos animais tratados, embora com sensível recuperação dos animais adultos com hipotireoidismo.

5. Diminui, significativamente, o volume nuclear das células de Sertoli, mas tanto nos animais controles como nos animais tratados, os diâmetros nucleares dessas células tornam-se aparentemente estabilizados após o quinquagésimo dia de idade.

6. Prejudica o ciclo da espermatogênese, retardando o início do estadiamento do epitélio seminífero, aumentando significativamente o número de células germinativas degeneradas e diminuindo a quantidade de espermatozóides produzidos e posteriormente armazenados nas lojas epididimárias, principalmente até a puberdade, já nos animais com 90 dias, são discretas as diferenças encontradas entres os animais controles e os animais tratados.

7. Leva a uma redução significativa dos níveis plasmáticos de T₄ (Tiroxina), exceto nos fetos controles e tratados, que através do método de radioimunoensaio não apresentou registro de sensibilidade.

8. Não foram verificadas diferenças nas concentrações plasmáticas de testosterona entre os animais controles e tratados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. AL-JURAYYAN, N. A. M.; AL-NUAIM, A.; EL-DESOUKI, M. Congenital hypothyroidism: Clinical and laboratory characteristic in infants detected by neonatal screening. **Annals of Saudi Medicine** v.12, n.3, p. 385-394, 1991.
2. AMIN, S. O.; EL-SHEIKL, A. S. Pituitary-testicular function in hypothyroid male rats. **Acta AnaT.(Basel)** v. 98 p. 121-129, 1977.
3. AMIT, T. HERTZ, P. ISH-SHALON, S. LOTAN, R. LUBOSHITZKI,R. YODIM, M. B. HOCHBERG,Z. Effects of hypothyroidism or hyperthyroidism on growth hormone-binding protein. **Clinical Endocrinology** v. 35, n. 2, p. 159-162, 1991.
4. ANDO,S. PANNO, M. L. BERALDI, E. TARANTINO,G. SALERNO, M. PALMERO,S. PRAT, M. FUGASSA,E. Influence of hypothyroidism on in vitro testicular steroidogenesis in adult rats. **Experimental and Clinical Endocrinology** v. 96, n. 2, p. 149-156, 1990.
5. BASKI, S. N. Effect of propylthiouracil-induced hypothyroidism on serum levels of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in the rat. **Journal of Endocrinology**. v.59, p. 655-656, 1973.
6. BEÇAK, W. PAULETE, J. **Técnicas de Citologia e Histologia**. Livros Técnicos e Científicos, Ed. S/A. Rio de Janeiro, 1976

7. BERNE, R. M. LEVI, M. N. **Fisiologia**. 2. ed., Rio de Janeiro Guanabara Koogan, 1990.
8. BERSON, S. A. YALLOW, R. S. Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin-binding antibody. **J. Clin. Invest.** v. 38, p. 1996, 1959.
9. BILLIS, A. Biópsia do testículo no estudo da infertilidade masculina: padrões histológicos. **Rev. Ass. Med. Brasil.** v. 28, n. 1, p. 26-28, 1982.
10. BORKER, S. B. KLITGAARD, H.M. Metabolism of tissues excised from thyroxine-injected rats. **Am.J. Physiol.** v. 170, p. 81-86, 1952.
11. BORLAND, K. MITA, M. OPPENHEIMER, C. L. BLENDERMAN, L. A. MASSAGUE, J. HAAL, P. F. CZECH, M. P. The actions of insulin-like growth factors I and II on cultured Sertoli cells. **Endocrinology** v. 114, n. 1, p. 240-246, 1984.
12. BRASEL, J. A. M. D., WINICK, M. M. D. Differential cellular growth in the organs of hypothyroid rats. **Growth**, v. 34 p. 197-207, 1970
13. BRUNI, J. F. MARSHALL, S. DIBLET, J. A. MEITES, J. Effects of hyper- and hypothyroidism on serum LH and FSH levels in intact and gonadectomized male and female rats. **Endocrinology**, v. 97, p. 558- 563, 1985.

14. BUNICK, D. KIRBY, J. HESS, R. A. COOKE, P. S. Developmental expression of testis messenger ribonucleic acids in the rat following propylthiouracil-induced neonatal hypothyroidism. **Biology of Reproduction** v. 51, p. 706-713, 1994.
15. BUSTON-OBREGON, E. COUROT, M. FLECHON, J. E. HOCHEREAU-DE-REVIERS, M. T. HOLSTEIN, A. F. Morphological appraisal of gametogenesis. Spermatogenetic process in mammals with particular reference to man. **Andrologia**, v. 7, p. 141-163, 1975.
16. CANAVAN, J. P. HOLT, J. EASTON, J. SMITH, K. GOLDSPINK, D. F. Thyroid-induced changes in the growth of the liver, kidney, and diaphragm of neonatal rats. **Journal of Cellular Physiology**, v. 161, n. 1, p. 49-54, 1994.
17. CHEMES, H. E. DYM, M. RAJ, H. G. M. Hormonal regulation of Sertoli cell differentiation. **Biology of Reproduction**. v. 21, p. 251-262, 1979.
18. CHOWDHURY, A. R. ARORA, U. Role of thyroid in testicular development of immature rat. **Archives of Andrology** v. 12, p. 49-51, 1984.
19. CLERMONT, Y. PEREY, B. Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. **American Journal of Anatomy** v. 100, p. 241-267, 1957.

20. CLERMONT, Y HERMO, L. Spermatogonial stem cells in the albino rat. **Am. J. Anat.** v. 142, p. 159-176, 1975.
21. COOKE, P. S. YONEMURA, C. V. NICOLE, C. S. Development of thyroid hormone dependence for growth in the rat: a study involving transplanted fetal, neonatal and juvenile tissues. **Endocrinology**, v. 115, p. 2059-2064, 1984.
22. COOKE, P. S. MEISAMI, E. Early hypothyroidism in rats causes increased adult testis and reproductive organ size but does not change testosterone levels. **Endocrinology** v. 129, n. 1, p. 237-243, 1991a
23. COOKE, P. S. HESS, R. A. PORCELLI, J. MEISAMI, E. Increased sperm production in adult rats after transient neonatal hypothyroidism. **Endocrinology**, v. 129, n. 1, p.244-248, p,1991b
24. COOKE, P. S. PORCELLI, J., HESS, R. A. Induction of increased testis growth and sperm production in adult rats by neonatal administration of the goitrogen propylthiouracil (PTU): The critical period. **Biology of Reproduction** v. 46, p. 146-154, 1992.
25. CUNNINGHAM, G. H. TINDALL, D. J. HUCKINGS, C. MEANS, A. R. Mechanisms for the testicular hypertrophy wich follows hemicastration. **Endocrinology** v. 102, n. 1, p. 16-23, 1978.

26. DE-LUCA, I. M. S. Estudo alométrico e radioautográfico da glândula parótida do hamster dourado ao longo do primeiro mês de vida pós-natal. **Ciência e Cultura**, v. 41, n. 2, p. 191-193, 1989.
27. DOHLER, K. D. WUTTKE, W. Changes with age in levels of serum gonadotropins, prolactin, and gonadal steroids in prepubertal male and female rats. **Endocrinology**, v. 97, n. 4, p. 898-907, 1975.
28. DUSSAULT, J. H. LABRIE, F. Development of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in the neonatal rat. **Endocrinology**, v. 97, n. 5, p. 1321-1324, 1975.
29. EGUCHI, Y. FUKUSHI, Y. HASEGAWA, Y. Ontogeny of the pituitary-thyroid system in fetal rats: observations on the fetal thyroid after maternal treatment with goitrogen. **Anat. Rec.** v. 198, p. 637-642, 1980.
30. FOLLEY, S. J. Experiments on the relation between the thyroid gland and lactation in the rat. **J.Physiol.** v. 93, p. 401, 1938 **apud** MAQSOOD, M. Thyroid functions in relation to reproduction of mammals and birds. **Biological Reviews**, p. 281-319, 1952.
31. FORREST, D. HALLBOOK, F. PERSSON, H. VENNSTROM, B. Distinct functions for thyroid hormone receptors alpha and beta in brain development indicated by differential expression of receptor genes. **Embo (European Molecular Biology Organization) Journal** v. 10, n. 2, p. 269-276, 1991.

32. FRANCAVILLA, S. GORDISHI, G. PROPERZI, G. DI-CICCO, L. JANNINI, E. A. PALMERO, S. FUGASSA, E. LORAS, B. D' ARMIENTO, M. Effect of thyroid hormone on the pre-and post-natal development of the rat testis. **Journal of Endocrinology**, v. 129, p. 35-42, 1991.
33. FUGASSA, E. PALMERO, S. GALLO, G. Triiodothyronine decreases the production of androgen binding protein by rat Sertoli cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 143, p. 241-247, 1987.
34. GHOSH, S. BARTKE, A. GRASSO, P. REICHERT, L. E. JR. RUSSEL, L. D. Structural manifestations of the rat Sertoli cell to hypophysectomy: A correlative morphometric and endocrine study. **Endocrinology** v. 131, n. 1, p. 485-497, 1992.
35. GIL-GARAY, R. MIRALLES-FLORES, C. OBREGON, M. J. ESCOBAR-DEL-REY, F. MORREALE-DE-ESCOBAR, G. DELGADO-BAEZA, E. Maternal hypothyroidism and fetal chondro- osseous development in rats. **Biology of the Neonate** v. 60, n. 6, p. 385-394, 1991.
36. GUEDES, R. C. A. PEREIRA DA SILVA, M. S. Effect of pre-and postnatal propylthiouracil administration on the propagation of cortical spreading depression of adult rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v. 26, n. 10, p. 1123-1128, 1993

37. HANSSON, U. DJOSELAND, O. TORGERSEN, O. RITZEN, E. M. FRENCH, F. S. NAYFEH, S. N. Hormones and hormonal target cells in the testes. **Andrologia** v. 8, p. 195-202, 1976.
38. HECKERT, L. L. GRISWOLD, M. D. Expression of FSH receptor messenger RNA in rat testis and Sertoli cells. **Molecular Endocrinology**, v. 5, n. 5, p. 670-677, 1991.
39. HESS, R. A. Quantitative and qualitative characteristics of the stages and transitions in the cycle of the rat seminiferous epithelium: light microscopic observations of perfusion-fixed and plastic-embedded testis. **Biol. of. Reprod.** v. 43, n. 3, p. 525-542, 1990.
40. HEYERDAHL, S. KASE, B. F. LIE, S. O. Intellectual development in children with congenital hypothyroidism in relation to recommended thyroxine treatment. **Journal of Pediatrics**. v. 118, n. 6, p. 850-857, 1991.
41. HUANG, H. F. S. POGACH, L. M. NATHAN, E. GIGLIO, W. SEEBODE, J. J. Synergistic effects of FSH and testosterone on the maintenance of spermiogenesis in hypophysectomized rats: relationship with the androgen-binding protein status. **Endocrinology** v. 128, n. 6, p. 3152-3161, 1991
42. HUSTON, J. C. STOCCO, D. M. Regulation of Sertoli cell function by thyrotropin. **Biology of Reproduction** v. 25, p. 303-306, 1981.

43. ILICKI, A. LARSSON, A. ANDERS-KARLSSON, F. Circulating thyroid antibodies in congenital hypothyroidism. **Acta Paediatrica Scandinavica**. v. 80, n. 8-9, p. 521-527, 1991.
44. JAKUBOWIAK, A. JANECKI, A. STEINBERG, A. Kinetics of inhibin secretion in static and superfused Sertoli cell cultures in response to FSH. **Biology of Reproduction**. v. 43, n. 6, p. 939-945, 1990
45. JANNINI, E. A. OLIVIERI, M. FRANCAVILLA, S. GULINO, A. ZIPARO, E. D' ARMIENTO, M. Ontogenesis of the nuclear 3,5,3'-triiodothyronine receptor in the rat testis. **Endocrinology** v. 126, n. 5, p. 2521-2526, 1990.
46. JEKAT, F. M. SOURGENS, H. KEMPER, F. H. Influence of 3,5 dimethyl 3' isopropyl-l-thyronina on thyroid state and gestational outcome in the wistar rat. **Arzumittel-Forschung**, v. 43, n. 10, p. 1064-1068, 1993
47. JOHNSON, R. A. WICHERN, D. W. **Applied multivariate statistical analysis** 3° edition, Prentice-Hall international, Inc, 1992.
48. JONES, G. E. S. DELFS, E. FOOTE, E. C. The effect of thiouracil hypothyroidism on reproduction in the rat. **Endocrinology**, v. 38, p. 337-340, 1946, **apud** MAQSOOD, M. Thyroid functions in relation to reproduction of mammals and birds. **Biological Reviews**, p. 281-319, 1952.

49. KALLAND, G. A. VERA, A. PETERSON, M. SWERDLOFF, R. S. Reproductive hormonal axis of the male rat in experimental hypothyroidism. **Endocrinology**, v. 102, n. 2, p. 476-484, 1978.
50. KHAN, S. TEERDS, K. DORRINGTON, J. Growth factor requirements for DNA synthesis by Leydig cells from the immature rat. **Biology of Reproduction**, v. 46, n. 3, p. 335-341, 1992.
51. KIRBY, J. D. JETTON, A. E. COOKE, P. S. HESS, R. A. BUNICK, D. ACKLAND, J. F. TURECK, F. W. SCHWARTZ, N. B. Developmental hormonal profiles accompanying the neonatal hypothyroidism-induced increase in adult testicular size and sperm production in the rat. **Endocrinology**, v. 131, n. 2, p. 559-565, 1992.
52. KLEIN, R. Z. HADDOW, J.E. FAIX, J. D. BROWN, R. S. HERMOS, R. J. PULKKINEN, A. MITCHELL, M. L. Prevalence of thyroid deficiency in pregnant women. **Clinical Endocrinology**, v. 35, n. 1, p. 41-46, 1991.
53. LEBLOND, C. P. CLERMONT, Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 55, p. 548-573, 1952.
54. LOVELAND, K. L. HEDGER, M. P. RISHIDGER, G. HERSZEFLD, D. DE-KRETZER, D. M. Identification of receptor tyrosine kinase in the rat testis. **Molecular Reproduction and Development**. v. 36, n. 4, p. 440-447, 1993.

55. MADDOCKS, S. KERR, J. B. ALLENBY, G. SHARPE, R. M. Evaluation of the role of germ cells in regulating the route of secretion of immunoactive inhibin from the rat testis. **Journal of Endocrinology**, v. 132, n. 3, p. 439-448, 1992.
56. MAC MANUS, J. F. A. Histological demonstration of mucin after periodic acid. **Nature**, v. 158, p. 202, 1946.
57. MAIA, A. L. S. FAVARETTO A. L. V. ANTUNES-RODRIGUES, J. IAZIGI, N. LAMANO-CARVALHO, T. L. Spermatogenic and steroidogenic testicular function in hypothyroid pubertal rats. **Brazilian J. Med. Biol. Res.** v. 23, p. 625-628, 1990.
58. MEISAMI, E. Complete recovery of growth deficits after reversal of PTU-induced postnatal hypothyroidism in the female rat: a model for catch-up growth. **Life Sci.**, v. 34, p. 1487-1496, 1984.
59. MEISAMI, E. SENDERA, T. J. CLAY, L. B. Paradoxical hypertrophy and plasticity of testis in rats recovering from early thyroid deficiency: a growth study including effects of age and duration of hypothyroidism. **Journal of Endocrinology**, v. 135, p. 495-505, 1992.
60. MEISAMI, E. NAJAFI, A. TIMIRAS, P. S. Enhancement of seminiferous tubular growth and spermatogenesis in testis of rats recovering from early hypothyroidism: A quantitative study. **Cell and Tissue Research**, v. 275, n. 3, p. 503-511, 1994.

61. MORREALE-DE-ESCOBAR, G. PASTOR, R. OBREGON, M. J. ESCOBAR-DEL-REY, F. Effects of maternal hypothyroidism on the weight and thyroid hormone content of rat embryonic tissues, before and after onset of thyroid function. **Endocrinology**, v. 117, p. 1890-1901, 1985.
62. MORREALE-DE-ESCOBAR, G. OBREGON, M. J. ESCOBAR-DEL-REY, F. Fetal and maternal thyroid hormones. **Hormone Res**, v. 26, p. 12-27, 1987.
63. MURAI, T. NOGUCHI, K. NAGAMOTO, A. HOSAKO, M. A partial characterization of a Sertoli cell-secreted protein stimulating Leydig cell testosterone production. **Endocrinologica Japonica**, v. 39, n. 2, p. 209-215, 1992.
64. NEGRO-VILAR, A. SAAD, W. A. MC-CANN, S. M. Evidence for a role of prolactin in prostate and seminal vesicle growth in immature rat. **Endocrinology**, v. 100, p. 729-737, 1977.
65. NMADU, P. T. Congenital goiter and juvenile hypothyroidism in a nigerina child. **Annals of tropical paediatrics**, v. 10, n. 4, p. 369-372, 1990.
66. ORTH, J. M. The role of follicle-stimulating hormone in controlling Sertoli cell proliferation in testis of fetal rats. **Endocrinology**, v. 114, n. 4, p. 1248-1255, 1984.

67. PAKARIEN, P. PROSHLYAKOVA, E. HUHTANIEMI, I. Pituitary- gonadal interactions in perinatal rats: Relationships of plasma luteinizing hormone and testosterone concentrations, and pituitary levels of LH subunit mRNAs. **Neuroendocrinology**, v. 60, n. 1, p. 42- 49, 1994.
68. PALMERO, S. MAGGIANI, S. FUGASSA, E. Nuclear triiodothyronine receptors in rat Sertoli cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 58, p. 253-256, 1988.
69. PALMERO, S. MARCHIS, M. GALLO, G. FUGASSA, E. Thyroid hormone affects the development of Sertoli cell function in the rat. **Journal of Endocrinology**, v. 123, p. 105-111, 1989.
70. PALMERO, S. PRATI, M. BANECA, A. MINUTO, F. GIORDANO, G. FUGASSA, E. Thyroid hormone stimulates the production of insulin-like growth factor I (IGF-I) by immature rat Sertoli cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 68, p. 61-65, 1990.
71. PALMERO, S. PRATI, M. DE-MARCO, P. TRUCCHI, P. FUGASSA, E. Triiodothyronine nuclear receptors in the testis of the pubertal rat are regulated by thyroid hormone. **Journal of Endocrinology**, v. 131 (suplemento), n. 94, 1991.
72. PALMERO, S. TRUCCHI, P. PRATI, M. FUGASSA, E. LANNI, A. GOGLIA, F. **European Journal of Endocrinology**, v. 130, n. 3, p. 308-312, 1994.

73. PANNO, M. L. NERALD, E. PEZZI, V. SALERNO, M. DE-LUCA, G. LANZINO, M. LE-PERA, M. SISCO, D. PRATI, M. PALMERO, S. BOLLA, E. Influence of thyroid hormone on androgen metabolism in peripubertal rat Sertoli cells. **Journal of Endocrinology**, v. 140, p. 349-355, 1994.
74. PERSONA, L. N. **O ciclo do epitélio seminífero do "Tatu Peludo" *Euphractus sexcinctus flavimanus* (DESMAREST, 1804) (DAYPODIDAE, EDENTATA)**, Tese de Mestrado em Histologia e Embriologia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1981.
75. PIC, P. BOUQUIN, J. P. Thyrotropic hormone and thyroidial function initiation in fetal rat. **J. Dev. Physiol.** v. 7, p. 207-214, 1985.
76. PORTERFIELD, S. P. HENDRICH, C. E. Alterations of serum thyroxine, triiodothyronine and thyrotropin in the progeny of hypothyroid rats. **Endocrinology**, v. 108, p. 1060-1063, 1976.
77. RAJ, H G. DYM, M. The effects of selective withdrawal of FSH or LH on spermatogenesis in the immature rat. **Biology of Reproduction**, v. 14, p. 489-494, 1976.
78. ROGERS, J. Menstruation and systemic disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 259, p. 721-726, 1958.

79. ROOSEN-RUNGE, E. C. The process of spermatogenesis in mammals. **Biol. Rev.**, v. 37, p. 343-377, 1962.
80. RUIZ, M. DIEGO, A. M. REYES, A. ALONSO, A. MORELL, M. Influence of thyroidectomy on serum and pituitary FSH in control and orchidectomized rats. **Research in Experimental Medicine**, v. 189, p. 85-90, 1989.
81. RUIZ-DE-OÑA, C. MORREALE-DE-ESCOBAR, G. CALVO, R. ESCOBAR-DEL-REY, F. OBREGON, M. J. Thyroid hormones and 5'-deiodinase in the rat fetus late in gestation: Effects of maternal hypothyroidism. **Endocrinology**, v. 128, n. 1, p. 422-432, 1991
82. SAMUELS, M. H. WIERMAN, M. E. WANG, C. RIDGWAY, E.C. The effect of altered thyroid status on pituitary hormone messenger ribonucleic acid concentration in the rat. **Endocrinology**, v. 124, n. 5, p. 2277-2282, 1989.
83. SCHLIENGER, J. L. DREYFUS, M. Pregnancy and the thyroid. **Journal de Gynecologie Obstetrique et Biologie de la Reproduction**, v. 22, n. 5, p.521-527, 1993.
84. SHARPE, R. M. BARTLETT, J. M. S. ALLENBY, G. Evidence for the control of testicular interstitial fluid volume in the rat by specific germ cell types. **Journal of Endocrinology**, v. 128, n. 3, p. 395-402, 1991.

85. SOINI E. KOJOLA, H. Time-resolved fluorometer for lanthanide chelates- a new generation of nonisotopic immunoassays. **Clin. Chem**, v. 28, p. 65-68, 1983.
86. SPITERI-GRECH, J. BARTLELL, J. M. S. NIESCHLAG, E. Regulation of testicular insulin-like growth factor-1 in pubertal growth hormone deficient male rats. **Journal of Endocrinology**, v. 131, n. 2, p. 279-286, 1991.
87. THOMAS, M. R. MIELL, J. P. TAYLOR, A. M. ROSS, R. J. M. ARNAO J. R. JEWIT, D. E. MC GREGOR, A. M. Endocrine and cardiac paracrine actions of insulin-like growth factor 1 (IGF-1) during thyroid dysfunction in the rat: Is IGF1 implicated in the mechanism of heart weight change during abnormal thyroid function. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 10, n. 3, p. 313-323, 1993.
88. ULISSE, S. JANNINI, E. A. COROSA, E. PIERSANT, D. GRAZIANO, F. M. D' ARMIENTO, M. Inhibition of aromatase activity in rat Sertoli cells by thyroid hormone. **Journal of Endocrinology**, v. 140, p. 431- 436, 1994.
89. VAISHNAV, M. MOUDGAL, N.R. Effect of specific FSH or LH deprivation on testicular of the adult rat. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 28, n. (5-6), p. 513-520, 1991.

90. VALLE, L. B. S. OLIVEIRA-FILHO, R. M. ROMALDINI, J. H. LARA, P. F. Pituitary-testicular axis abnormalities in immature male hypothyroid rats. **J. Steroid Biochem**, v. 23, n. 3, p. 253-257, 1985.
91. VAN-HAASTER, L. H. DE-JONG, F. H. DOCTER, R. DE-ROOIJ, D. G. The effect of hypothyroidism on Sertoli cell proliferation and differentiation and hormone levels during testicular development in the rat. **Endocrinology**, v. 131, n. 3, p. 1574-1576, 1992.
92. VAN-HAASTER, L. H. DE-JONG, F. H. DOCTER, R. DE-ROOIJ, D. G. High neonatal triiodothyronine levels reduce the period of Sertoli cell proliferation and accelerate tubular lumen formation in the rat testis, and increase serum inhibin levels. **Endocrinology**, v. 133, n. 2, p. 755-760, 1993a
93. VAN-HAASTER, L. H. DE-JONG, F. H. DOCTER, R. DE-ROOIJ, D. G. Spermatogenesis is accelerated in the immature djungarian and chinese hamster and rat. **Biology of Reproduction**, v. 49, n. 6, p. 1229-1235, 1993b
94. VILCHEZ-MARTINEZ, J. A. Study of the pituitary-testicular axis in hypothyroid adult male rats. **J. Reprod. Fert.**, v. 35, p. 123-126, 1973.
95. VOLPATO, C. B. NUNES, M. T. Role of thyroid hormone in the control of growth hormone gene expression. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 27, n. 5, p. 1269-1272, 1994.

96. WEISS, S. R. BURNS, J. M. The effect of acute treatment with two goitrogens on plasma thyroid hormones, testosterone and testicular morphology in adult male rats. **Comp. Biochem. Physiolog.** v. 90, p. 449-452, 1988.
97. WONG, C. C. DOHLER, K. D. MUHLEN, A. V. Z. Effects of triiodothyronine, thyroxine and iso-propyl-di-iodothyronine on thyroid stimulating hormone in serum and pituitary gland and on pituitary concentrations of prolactin, growth hormone, luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in hypothyroid rats. **Journal of Endocrinology**, v. 87, p. 255-264, 1991.

ABSTRACT

Although it is well known that thyroidal hormones are involved in the development and maintenance of many organs, there remain several open questions as to their role in testicular physiology.

The present work proposes to contribute to a better understanding of the role of thyroidal hormones in testicular maintenance. The evaluation was based on the biometric, morphologic and hormonal parameters of groups of data of different ages in which a previous experimental hypothyroidism was induced by treating them with daily 0,05mg Methimazole, and confirmed by measuring thyroxine levels.

Our study involved an experimental of 68 white male rats and 12 fetuses (albino *Rattus norvegicus*). These animals were subdivided into 6 experimental groups according to the period of treatment and their death date and will here be designated as mother-foetal (19° days of intrauterine life), 8 day old, 21 day old, 35 day old, 50 day old and 90 day old hypothyroidism, respectively.

Our results showed that induction to hypothyroidism in the eighth day of pregnancy, which corresponds to the beginning of organogenesis in rats, did not result in any increase in the incidence of either foetal reabsorption nor congenital malformations, as well not causing behavioral alteration of animals with hypothyroidism.

In all of the experimental groups considered, the treated animals have a significant reduction ($p < 0,05$) in body weight as related to the control animals of same age.

Biometric evaluation of testicles has shown that treated animals had significant reduction ($p < 0,05$) in both the testicular weight and the diameter of seminiferous tubules as well as a reduction in the nuclear volume of Sertoli cells. Only the foetuses having 19 days of intrauterine life had no differences in such parameters, while in the treated 90 day old animals testicular recuperation was observed.

As to the morphology, the testicular development of treated animals was delayed in the beginning of the seminiferous epithelium cycle, with a reduction in the quantity of germinative cells and an increase in the number of degenerated cells. In both the 50 and 90 day old experimental groups, the treated animals completed staging of the seminiferous epithelium, but the frequency of stages I, VII/VIII and XIV was reduced as compared to the control animals of the same age.

Duplicated dosages of plasmic testosterone by means of solid phase fluoroimunoassays showed no significant differences in the values found for both treated and control animals.

We conclude that hypothyroidism severely impairs espermatogenesis in young rats as indicated by the reduced testicular weight, the diminished seminiferous tubule diameter, the increased degeneration of germinative

cells, the delayed staging in the seminiferous epithelium cycle and the reduced nuclear volume in Sertoli cell,. This did not occur in adults rats.

In treated animals belonging to the 90 day old experimental group we have observed the occurrence of significantly larger gain in both the testicular weight and the seminiferous tubule diameter, as compared to the control animals of the same age, as well as the occurrence an apparent stabilization of the nuclear volume of Sertoli cells, which thereby suggest that there is no influence of the thyroidal hormones upon adult rats testicles.