



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIEŒNCIA ANIMAL

ANNA KELLY DE LIMA PONTES VENÂNCIO

AVALIAÇÃO DOS DIFERENTES NÍVEIS DE FENO DE ALFAFA  
SOBRE PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS E QUALITATIVOS DO  
PARÊNQUIMA TESTICULAR E NIVEIS SÉRICOS DE  
TESTOSTERONA EM OVINOS (*Ovis aries*) SEM RAÇA DEFINIDA

RECIFE - PE

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCIEŒNCIA ANIMAL

ANNA KELLY DE LIMA PONTES VENÂNCIO

AVALIAÇÃO DOS DIFERENTES NIVEIS DE FENO DE ALFAFA  
SOBRE PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS E QUALITATIVOS DO  
PARÊNQUIMA TESTICULAR E NIVEIS SÉRICOS DE  
TESTOSTERONA EM OVINOS (*Ovis aries*) SEM RAÇA DEFINIDA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior**

**CO-ORIENTADORA: Dra. Cristiane Scavuzzi Moura**

**RECIFE - PE**

**2015**

Ficha catalográfica

V448a Venâncio, Anna Kelly de Lima Pontes  
Avaliação dos diferentes níveis de feno de alfafa sobre parâmetros morfométricos e qualitativos do parênquima testicular e níveis séricos de testosterona em ovinos (*ovis aries*) sem raça definida / Anna Kelly de Lima Pontes Venâncio. – Recife, 2015.

57 f. : il.

Orientador: Valdemiro Amaro da Silva Júnior.  
Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) –  
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2015.

Inclui referências, anexo(s) e apêndice(s).

1. Nutrição 2. Reprodução, 3. Testículo 4. Carneiros  
I. Silva Júnior, Valdemiro Amaro da, orientador II. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

AVALIAÇÃO DOS DIFERENTES NIVEIS DE FENO DE ALFAFA SOBRE  
PARÂMETROS MORFOMÉTRICOS E QUALITATIVOS DO PARÊNQUIMA  
TESTICULAR E NIVEIS SÉRICOS DE TESTOSTERONA EM OVINOS (*Ovis*  
*aries*)SEM RAÇA DEFINIDA

Dissertação elaborada por

ANNA KELLY DE LIMA PONTES VENÂNCIO

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Júnior (Orientador)  
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal - UFRPE

---

Dra. Cristiane Scavuzzi Moura (Co-orientadora)  
Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE

---

Pof<sup>a</sup> Dra. Maria Madalena Pessoa Guerra  
Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE

---

Prof. Dr. Frederico Celso Lyra Maia  
Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE

## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a Deus, Ser supremo que me deu a graça da vida, por todo amor e cuidado e por tudo o que tem me proporcionado.

A minha mãe, Gilda Maria que SEMPRE está disposta a me escutar, amparar e apoiar em tudo o que faço, é minha verdadeira amiga pra todas as horas, a que sempre lutou com todas as forças mesmo muitas vezes renunciando a si mesma para que eu alcançasse voos altos, ela é a pessoa que mais admiro e a quem sou grata, sem ela nada disso faria sentido e sinceramente tenho plena certeza de que eu não estaria aqui.

Ao meu marido, Breno Venâncio, fiel companheiro, amigo e pai da minha filha que ainda está por vir, não poderia ter feito melhor escolha para meu par. Você me deu força muitas vezes pra seguir em frente em vários aspectos da minha vida, te amo!

A minha filha Bruna da qual fiquei sabendo da chegada agora nessa reta final do meu trabalho de dissertação, que ainda está em meu ventre, mas, que já me dá uma imensa garra para ir à busca de meus objetivos pelo amor incomensurável que já sinto por ela. Deus me abençoou grandemente.

AGiovanna, minha filha do coração, que com seu jeitinho me impulsionou a desenvolver os primeiros instintos maternos e que torce bastante por mim.

Ao meu irmão Decius Pontes Junior que sempre foi um grande incentivador e motivador para que eu sempre quisesse um pouco mais da vida que não me conformasse em conseguir pouco, mas, que lutasse com todas as forças para ter o melhor de Deus na minha vida.

Ao meu pai (*in memoriam*) de quem nunca esquecerei e sempre vou me lembrar do quanto acreditava em mim quando erguia os olhos e a mão direita pro céu e dizia: eu tenho fé em Deus que você vai conseguir minha filha.

Ao meu orientador Valdemiro Júnior, pela oportunidade, confiança, credibilidade, respeito e paciência, que, mesmo sendo tão atarefado perdeu tardes sentado ao meu lado me ajudando em minhas dificuldades, e por sempre estar disponível quando

precisei, mesmo sem ser com palavras você me ensinou muitas coisas sobre ser profissional.

A minha co-orientadora e amiga Cristiane Scavuzzi que me ajudou imensamente e me ensinou com toda a paciência perdendo finais de semana com sua família para que eu terminasse meus trabalhos, nossa relação é mais do que só profissional, Muito obrigada!

A Dr. Carlos, que muito me ajudou, me dando conselhos e me orientando qual o melhor caminho a seguir, muito obrigada por tudo!

À minha amiga Fabiana Felix que me impulsiona desde que nos conhecemos a procurar minhas melhoras, e que não mede esforços para me ajudar, que me escuta sempre que preciso e é dona de uma linda índole.

Aos meus amigos Alluanan Nascimento a quem recorri várias vezes mesmo nos fins de semana pra me auxiliar nas minhas dúvidas e que sempre me atendeu com toda a paciência e carinho. A Jéssica Santana que me auxiliou bastante tirando minhas dúvidas e me ensinando a fazer vários procedimentos. A Ana Katharyne que me ajudou sempre que pode e de quem tenho certeza da torcida. Obrigada pela amizade de vocês!

A Sandra Torres, pela paciência em me ensinar tantas coisas e pela amizade sincera. A Vinícius Vasconcelos, que torce por mim e me impulsiona a buscar melhoras, a Simone Barros, pela amizade, ajuda e companhia, A André Lima pela amizade, A Jacilene Lourenço e Márcio Pedrosa, por dividir comigo esses momentos e a todos que compõem o laboratório de patologia, muito obrigada. A Prof<sup>a</sup> Dra. Antônia Sherlânea e Ricardo Coelho pela disponibilidade dos animais para que meu estudo fosse realizado. Ao Prof. Pierre Castro, por realizar a estatística. A Yanik Araújo e Ebla Lorena pela dedicação na coleta das amostras e pela amizade.

Aos animais, por terem cedido suas vidas em prol da ciência, todo o meu respeito.

A Capes, pela concessão da bolsa de mestrado.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco, pela oportunidade.

## RESUMO

Objetivando-se avaliar os diferentes níveis de feno de alfafa sobre os parâmetros morfométricos e qualitativos do parênquima testicular e níveis séricos de testosterona em ovinos (*ovis aries*) sem raça definida, foram utilizados 40 carneiros em crescimento, com peso corporal médio inicial de  $26 \pm 1,85$  kg e oito meses de idade aproximadamente. Os animais foram submetidos ao confinamento de 100 dias (sendo 44 dias para adaptação ao manejo e 56 dias para a administração das dietas experimentais). Os tratamentos foram compostos por quatro níveis de feno alfafa: 0%, 20%, 40% e 60%, de modo que foi mantida proporção de 60% de volumoso para todas as rações. Ao final do confinamento, foi realizada a coleta de sangue para dosagem de testosterona sérica e pesagem dos animais. Após o abate, os complexos testículo-epidídimo foram removidos e pesados individualmente, logo após foi calculado o índice gonadossomático. Foram obtidos cortes histológicos (4  $\mu$ m) do testículo, os quais foram corados em Hematoxilina-Floxina e Azul de Toluidina, montados com Entelan e analisados morfológica e morfometricamente em microscópio Óptico. O peso corporal, biometria testicular e IGS não apresentaram diferença estatística nem efeito de regressão. Dentre os parâmetros tubulares, a altura e área de epitélio sofreram efeito linear decrescente. Na proporção volumétrica, a túnica própria, os volumes total e individual das células de Leydig, assim como os vasos sanguíneos sofreram efeito de regressão linear crescente. Na produção espermática também houve tanto efeito de regressão quanto diferença estatística, além da regressão sofrida pelo número de espermátides arredondadas por secção. Desta forma, foi possível concluir que a inclusão de alfafa numa proporção acima de 20% não é recomendada para ovinos reprodutores, pois compromete o parênquima testicular.

Palavras-chave: Nutrição, Reprodução, Testículo, Carneiros.

## ABSTRACT

Aiming to evaluate the different levels of alfalfa hay on morphometric and qualitative parameters of the testicular parenchyma and serum testosterone levels in sheep (Ovisaries) of mixed breeds, 40 sheep were used in growth, with average body weight of  $26 \pm 1.85$  kg to approximately eight months of age. The animals were subjected to 100 days confinement (with 44 days for adaptation to management and 56 days for the administration of the experimental diets). The treatments consisted of four levels of alfalfa hay: 0%, 20%, 40% and 60%, so was maintained proportion of 60% forage for all diets. At the end of the experiment, blood collection was performed for serum testosterone measurement and weighing of animals. After slaughter, the complex testicle-epididymis were removed and individually weighed, after we calculated the GSI. Histological sections were obtained (4 mm) of testicle, which were stained with hematoxylin-Phloxine and Toluidine Blue, mounted with entelan and analyzed morphologically and morphometrically in optical microscope. The body weight, scrotal circumference and IGS showed no statistical difference neither regression effect. Among the tubular parameters, height and epithelium area suffered decreasing linear effect. The volumetric ratio, the tunic, the individual volumes and the total Leydig cells as well as blood vessels suffered increasing linear regression effect. In sperm production there was also much effect regression as statistical difference, besides the regression suffered by the rounded number of spermatids per section. Thus, it was concluded that the inclusion of alfalfa a ratio above 20% is not recommended for breeding sheep because it compromises the testicular parenchyma.

Key Words: Nutrition, Reproduction, Testis, Ram.



## LISTA DE FIGURAS

Pág.

**Figura 1.** Fotomicrografias da secção transversal do testículo de carneiros SRD (*Ovis aries*) submetidos a dietas de diferentes níveis de alfafa. 0% de alfafa (A), 20% de alfafa (B), 40% de alfafa (C) e 60% de alfafa (D). Observar descamação de epitélio (seta vermelha), vacuolização das células de Sertoli (seta preta) e redução da altura do epitélio germinativo (Asterisco). aumento de 100x. Barra de 200  $\mu\text{m}$ ..... 40

**Figura 2.** Fotomicrografias da secção transversal do testículo de carneiros SRD (*Ovis aries*) submetidos a dietas de diferentes níveis de alfafa. 0% de alfafa (A), 20% de alfafa (B), 40% de alfafa (C) e 60% de alfafa (D). Observar descamação de epitélio (seta vermelha), vacuolização das células de Sertoli (seta preta) e redução da altura do epitélio germinativo (Asterisco). aumento de 400x. Barra de 50  $\mu\text{m}$ ..... 41

**Figura 3.** Fotomicrografias da secção transversal do testículo de carneiros SRD (*Ovis aries*) submetidos a dietas de diferentes níveis de alfafa. 0% de alfafa (A), 20% de alfafa (B), 40% de alfafa (C) e 60% de alfafa (D). Observar descamação de epitélio (seta vermelha), vacuolização das células de Sertoli (seta preta) e redução da altura do epitélio germinativo (Asterisco). Paquíteno em necrose celular (seta amarela). aumento de 1000x. Barra de 4  $\mu\text{m}$ ..... 42

## LISTA DE TABELAS

Pág.

<b>Tabela 1.</b> Composição percentual e química das dietas experimentais de carneiros SRD ( <i>Ovis aries</i> ) submetidos a dietas com diferentes níveis de alfafa.....	28
<b>Tabela 2.</b> Biometria Testicular e IGS de carneiros SRD ( <i>Ovis aries</i> ) submetidos a dietas com diferentes níveis de alfafa.....	34
<b>Tabela 3.</b> Parâmetros tubulares, proporção volumétrica, população de células de Sertoli, PED/T e PED/g/T de testículos de carneiros SRD ( <i>Ovis aries</i> ) submetidos a dietas com diferentes níveis de alfafa.....	36
<b>Tabela 4.</b> Proporção volumétrica em porcentagem (%) de testículos de carneiros SRD ( <i>Ovis aries</i> ) submetidos a dietas com diferentes níveis de alfafa.....	37
<b>Tabela 5.</b> População, diâmetro e volume individual da célula de Leydig e níveis séricos de testosterona de carneiros SRD ( <i>Ovis aries</i> ) submetidos a dietas com diferentes níveis de alfafa.....	38
<b>Tabela 6.</b> População celular por secção de testículos de carneiros SRD ( <i>Ovis aries</i> ) submetidos a dietas com diferentes níveis de alfafa.....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS

RE- Receptor de estrógeno

RE $\alpha$ - Receptor de estrógeno alfa

RE $\beta$ - Receptor de estrógeno alfa

MS-Matéria Seca

MN- Matéria natural

PCF-Peso Corporal Final

CTE- Complexo Testículo-Epidídimo

CTTS- Comprimento Total dos Túbulos Seminíferos

VTS- Volume Total dos Túbulos Seminíferos

DM- Diâmetro Nucleolar Médio

ICS- Índice de Células de Sertoli

PED- Produção Espermática Diária

PED/g/T- Produção Espermática Diária por grama de testículo

NaCl- Cloreto de Sódio

STM- Salina + Triton X-100 + Mertiolate

ppm- Partes por Milhão

HI- Homogeneizado Inicial

HD- Homogeneizado Diluído

ANOVA- Análise de Variância

PC- Peso Corporal

PE- Peso Epididimário

AT- Altura Testicular

PT- Peso Testicular

LT- Largura Testicular

IGS- Índice Gonadossomático

SRD- Sem Raça Definida

L- Linear

Q- Quadrática

C- Cúbica

g- Grama

Kg Quilograma

mL- Mililitro

m- Metro

$\mu\text{m}$ - Micrômetro

$\mu\text{m}^2$ - Micrômetro Quadrado

$\mu\text{m}^3$ - Micrômetro Cúbico

ng/mL- Nanogramas por mililitro

	<b>SUMÁRIO</b>	<b>Pág.</b>
1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DE ITERATURA.....	15
2.1	<b>Ovinos: efetivo, distribuição geográfica e importância econômica.....</b>	15
2.2	<b>Nutrição de ovinos.....</b>	16
2.2.1	<b><i>Medicago sativa</i> (ALFAFA).....</b>	16
2.3	<b>Reprodução de ovinos.....</b>	17
2.3.1	<b>Espermatogênese.....</b>	18
2.4	<b>Fitoestrógenos.....</b>	19
2.5	<b>Mecanismo de ação dos estrógenos.....</b>	21
2.6	<b>Papel dos estrógenos no sistema reprodutor masculino.....</b>	21
2.7	<b>Os fitoestrógenos e suas ações no sistema reprodutivo.....</b>	23
2.8	<b>Metabolismo dos fitoestrógenos nos ruminantes.....</b>	24
3	OBJETIVOS.....	26
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
5	RESULTADOS.....	33
6	DISCUSSÃO.....	43
7	CONCLUSÃO.....	47
8	REFERÊNCIAS.....	48

## 1 INTRODUÇÃO

O Nordeste brasileiro tem se destacado como área de vocação para a exploração de ruminantes domésticos, notadamente caprinos e ovinos, pelo potencial da vegetação natural para a manutenção e sobrevivência dos animais destas espécies (MAIA et al., 2011). Um dos fatores que mais influencia o ciclo-reprodutivo de ovinos é o fotoperíodo, no caso das regiões tropicais como o Nordeste do Brasil, esse fator varia pouco, logo, a espécie não exibe estacionalidade reprodutiva, podendo se reproduzir ao longo de todo o ano. Sendo assim, a nutrição é o fator que mais influencia o ciclo-reprodutivo dos carneiros (MAIA et al., 2011). Os efeitos da nutrição sobre o desenvolvimento testicular envolvem resposta a curto ou longo prazo (BLACHE et al., 2000). Os efeitos em curto prazo agem principalmente no sistema neuro-endócrino que controla a atividade testicular (MARTIN et al., 1994). Enquanto aqueles a longo prazo agem sobre o desenvolvimento testicular propriamente dito e a produção espermática (OLDHAM et al., 1978).

A nutrição pode influenciar tanto a quantidade de tecido testicular quanto a eficiência com que os gametas são produzidos por ele (MARTIN & WALKDEN-BROWN, 1995). Dentre os alimentos indicados para a nutrição de ovinos estão o *Tifton* (*Cynodon spp*), que é uma espécie de forrageira recomendada por possuir bom valor nutritivo (ATAÍDE JÚNIOR et al., 2000) e a alfafa que para alimentação de ruminantes pode ser considerada como forrageira que reúne um grande número de características desejáveis (WALDO & JORGENSEN, 1981) assumindo importante papel no desempenho e características de carcaça de cordeiros, (MCCLURE et al., 1994).

Como outras leguminosas, a alfafa é conhecida por ser fonte de fitoestrógenos (CLAPAUCH et al. 2002), compostos derivados de plantas que imitam a ação de estrógenos (ADLERCREUTZ, 2002; KRONENBERG & FUGH-BERMAN, 2002). Dentre outras funções, os estrógenos influenciam o crescimento e funcionalidade dos tecidos reprodutivos feminino e masculino (GRUBER et al., 2002; RUGGIERO & LIKIS, 2002).

Na alfafa, o fitoestrógeno predominante é o coumestrol (HONG et al. 2011). Na pecuária, a sua presença em culturas forrageiras tem sido associada com interrupções reprodutivas (ADAMS, 1995). Em bovinos, a ingestão de altas

quantidades de coumestrol causa metaplasia na próstata e na glândula bulbo-uretral (LENIS et al., 2010). Alterações ultra-estruturais em testículo de morcego foram observadas por Serrano et al. (2007).

Segundo Costa & Paula (2003) o método da morfologia tubular é eficaz para análise do ciclo do epitélio seminífero, sendo possível verificar que as células espermatogênicas encontram-se organizadas dentro dos túbulos seminíferos em associações celulares denominadas de estádios do ciclo do epitélio seminífero.

Para entendimento do processo espermatogênico e determinação do rendimento geral da espermatogênese, faz-se necessário o estudo quantitativo das células que compõem o epitélio seminífero, pois permite um conhecimento mais completo desse processo e de como a estrutura testicular se comporta frente a diferentes condições (FRANÇA & RUSSELL, 1998).

Também estão presentes no testículo as células de Leydig, responsáveis pela produção de testosterona (CUNNINGHAM, 1999). Pela ação deste hormônio ocorre a diferenciação do sistema reprodutor masculino, aparecimento dos caracteres sexuais secundários e manutenção quantitativa da espermatogênese a partir da puberdade (SHARPE, 1994; PELLINIEMI ET AL., 1996). Há relatos na literatura indicando que diversas dietas não influenciam nos níveis de testosterona, porém quando a perda de massa corpórea e testicular são pronunciadas e prolongadas, o nível de testosterona é reduzido (MARTIN & WALKDEN-BROWN, 1995). Sendo assim, esse trabalho objetivou avaliar a os diferentes níveis de alfafa sobre parâmetros morfométricos e qualitativos do parênquima testicular e níveis séricos de testosterona em carneiros SRD (*Ovis aries*).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Ovinos: efetivo, distribuição geográfica e importância para a economia

A ovinocultura é uma atividade difundida pelo mundo, os ovinos são versáteis às adversidades climáticas, pelo próprio processo de adaptação, seleção natural e também por influência do homem. Os animais estão difundidos mesmo nas regiões mais inóspitas para animais domésticos de produção, corroborando tal afirmação tem-se o fato de 54,51% dos ovinos do mundo estarem distribuídos em lugares com baixa renda e déficit de alimento, como a Ásia e a África, provendo alimento de alto valor nutricional a baixo custo (BANCO DO NORDESTE, 2012).

O aumento das populações e crescente afluência e urbanizações estão fazendo crescer a demanda de produtos de origem animal, principalmente em países em desenvolvimento. Em 2050, estima-se que a demanda global cresça em torno de 70% em virtude do aumento da população que deverá chegar aos 9,6 bilhões (FAO, 2014).

Segundo a FAOSTAT (2013) o efetivo mundial de ovinos é de 1.172.833.190, sendo 66.942.906 na América do Sul e só no Brasil concentra-se 17.022.000. Segundo o Banco do Nordeste (2012), 56,72% do efetivo nacional de ovinos está concentrado na região Nordeste.

A ovinocultura é uma atividade promissora no agronegócio brasileiro, em virtude do Brasil possuir baixa oferta para o consumo interno da carne ovina e dispor de características adequadas para ser um exportador de carne, tais como: extensão territorial, mão-de-obra de baixo custo e rebanho expressivo (MADRUGA et al. 2005). Além de contribuir com a oferta de proteína animal (PARENTE et al. 2009).

No entanto, a região semi-árida nordestina apresenta sazonalidade alternando entre período chuvoso e secas periódicas que impõem severas restrições ao suprimento de forragens, conseqüentemente, à produção de pequenos ruminantes (ARAÚJO FILHO & SILVA, 2000). Em resposta a isso algumas raças passaram a desenvolver características adaptadas às condições climáticas, por meio de seleção natural, assegurando-lhes a reprodução e sobrevivência nesses ambientes (SILVA et al., 2007).



## 2.2 Nutrição de ovinos

Diferentes requerimentos nutricionais entre as raças de ovinos podem ser devido à presença ou não de lã. Os principais sistemas de requerimentos nutricionais são baseados em ovelhas que possuem lã. Os ovinos da raça Santa Inês que são deslanados e originários de regiões semi-áridas do Brasil são usados como raça terminal, constitui a principal raça brasileira para corte e está localizada principalmente na região Nordeste apresentando quando maduro um peso entre 40 e 50kg. A ausência de recomendações específicas dos comitês internacionais no que diz respeito aos ovinos deslanados tem levado a uma incerteza nas respostas produtivas (RESENDE et al., 2008). Entretanto, Regadas Filho et al (2013) realizaram trabalho com ovino da raça supracitada e constataram que não há indicação de um valor reduzido na quantidade de energia exigida para a raça Santa Inês quando comparada com os valores recomendados pelos principais sistemas de exigências nutricionais.

Segundo Hoffman (1988) os ovinos são animais utilizadores de volumosos, pois, em virtude da mais lenta velocidade de passagem do alimento pelo trato digestivo, são aptos a uma melhor utilização dos constituintes fibrosos da parede celular das forragens. Estes pequenos ruminantes são adaptados para consumir uma grande variedade de plantas, apresentando um comportamento alimentar oportunístico, facilmente modificando suas preferências alimentares de acordo com a disponibilidade de forragem e a estação do ano.

### 2.2.1 *Medicago sativa*(alfafa)

A alfafa é originária do sudoeste da Ásia, de onde se difundiu para Europa e para as Américas, no Brasil, a sua introdução ocorreu no Rio Grande do Sul, por intermédio do Uruguai e da Argentina. Há também evidências de que imigrantes italianos e alemães tenham trazido sementes diretamente da Europa para o Brasil, cultivando-as nos vales de rios e regiões coloniais, nos quais a fertilidade natural do solo permitiu sua expansão (NUERNBERG, 1986).

Botanicamente, trata-se de herbácea perene, que apresenta folhas trifolioladas dispostas de forma alternada nas hastes, essas folhas tem forma

ovalada ou arredondada, com bordas serrilhadas (TEUBER & BRICK, 1988) . O sistema radical é pivotante, com raiz principal e coroa profundas. Tais estruturas são de extrema importância na fisiologia do crescimento da alfafa, uma vez que armazenam reservas orgânicas (MONTEIRO, 1999).

Bastante utilizada na alimentação de ruminantes, por reunir um grande número de características desejáveis. Se comparada às gramíneas, ressaltam-se o seu conteúdo de carboidratos solúveis, de parede celular e alto conteúdo de proteína verdadeira digestível. Pode ser cultivada em regiões temperadas, tropicais e subtropicais graças à sua característica cosmopolita. (WALDO & JORGENSEN, 1981; BALL et al., 2007). Por ser uma leguminosa, apresenta uma menor digestibilidade potencial apresentada pelas leguminosas devido ao maior teor de lignina, que, segundo Detmann et al. (2012), é o principal componente indigestível da planta.

### **2.3 Reprodução de ovinos**

O testículo dos mamíferos é subdividido em dois compartimentos, baseados em suas características morfológicas e funcionais (MURTA, 2013), uma é o compartimento tubular, que ocupa de 85 a 86% do volume testicular ovino (Queiroz & Cardoso, 1989; Wroble et al., 1995) sendo constituído por estruturas enoveladas contendo em seu interior, o epitélio germinativo (MURTA, 2013) o outro compartimento é o espaço intertubular, formado por tecido conjuntivo, onde se localizam os vasos sanguíneos, linfáticos, nervos e as células de Leydig (SETCHELL, 1991).

Para os ovinos, nas fases pré-púbere e púbere, a circunferência escrotal aumenta rapidamente (HOCHEREAU-DE-REVIERS et al., 1990) praticamente ao mesmo passo do aumento do peso do animal, já na fase de pós puberdade esse crescimento é lento (SOUZA et al. 2000). A puberdade ocorre muito cedo, nas raças deslanadas, por volta do quarto ao sexto mês de idade e tem maior relação com o peso do animal do que com a idade. Segundo McManus (2010) a detecção da puberdade se dá pela análise dos espermatozoides, para serem considerados em puberdade os carneiros precisam possuir espermatozoides com taxa de motilidade acima de 10% e concentração de no mínimo  $50 \times 10^6$  espermatozóides  $\text{ml}^{-1}$ .

Os ovinos apresentam algumas características externas que muito informam sobre a condição reprodutiva do animal, se torna, pois, importante a seleção de reprodutores, uma vez que carneiros que apresentem alto desempenho reprodutivo muito provavelmente servirão a um maior número de ovelhas em um breve período de tempo, aumentando a disseminação de material genético desejável. As medidas testiculares, especialmente o perímetro escrotal é bastante avaliado, pois, é de fácil realização e um ótimo indicativo de características reprodutivas e produtivas (SNOWDER et al., 2002). Frequentemente analisa-se também a qualidade seminal e comportamento reprodutivo (PACHECO & QUIRINO, 2010)

Quanto às características pertinentes ao sêmen, tem a cor pérola e o volume do ejaculado é considerado pequeno variando de 0,5 a 2,0 ml. Já a concentração espermática varia de dois a cinco bilhões de espermatozoides/mL. Se o animal estiver saudável e bem nutrido, é bem comum encontrar ejaculados com 90% ou mais de motilidade e concentração espermática acima de três bilhões (MAIA et al. 2011).

### **2.3.1 Espermatogênese**

Segundo Hess (1999) a espermatogênese é um processo biológico pelo qual células germinativas se transformam em espermatozoides ao longo de um determinado período de tempo, este processo ocorre dentro dos limites do túbulo seminífero presente nos testículos e é regulado através de uma rede de interação endócrina, parácrina e autócrina que ocorre entre os diversos tipos celulares existentes (ROSER, 2008). Envolve mitose celular, duplicação de cromossomos, recombinação genética, divisão meiótica reducional para produzir espermátides haploides e por fim a diferenciação delas em espermatozoides (ROSER, 2008). Todo este processo tem duração entre 30 e 75 dias nos mamíferos (FRANÇA et al., 1998) e de 42,28 dias no carneiro (CARDOSO & QUEIROZ, 1988).

As células germinativas se organizam no interior dos túbulos seminíferos em associações distintas que podem ser classificadas através do método de morfologia tubular (estádios) (FRANÇA & RUSSELL, 1998) para o carneiro esses estádios são em número de 8 (CARDOSO & QUEIROZ, 1988). Além das células germinativas, as células de Sertoli e Leydig tem papel indispensável na espermatogênese (FRANÇA

& RUSSEL, 1998). Uma das principais funções da célula de Sertoli é a de gerar um ambiente adequado para a proliferação e a maturação das células germinativas (RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2012), além de participar da formação do testículo, as células de Sertoli fornecem fatores indispensáveis para a transformação das células germinativas em espermatozoides, esses fatores podem ser: suporte físico, constituindo a barreira hemato-testicular, ou na estimulação bioquímica na forma de fatores de crescimento ou nutrientes (GRISWOLD, 1998).

A barreira hemato-testicular divide o túbulo seminífero em dois compartimentos; basal e apical (adluminal), no primeiro ocorrem a renovação espermatogonial e progressão das espermatogônias em pre-leptóteno, já no compartimento apical ocorrem meiose I e II, espermiogênese e espermição. Tal barreira é muito importante uma vez que regula a entrada de substâncias para o compartimento apical, tanto nutritivas, quanto aquelas que podem ser tóxicas (CHENG & MRUK, 2012).

No interstício, as células de Leydig são o tipo celular mais abundante, sua população é de aproximadamente 22 milhões de células por grama de testículo, podendo variar de acordo com a idade e a espécie, formando grupos irregulares entre os túbulos seminíferos (RUSSELL & FRANÇA, 1995). O citoplasma das células de Leydig é rico em retículo endoplasmático liso, mitocôndrias e peroxissomos, organelas envolvidas na biossíntese de hormônios esteroides, e o principal hormônio secretado pelas células de Leydig é a testosterona (Mendis-Handagama, 1988; Mendis-Handagama, 1998a), de grande importância na espermatogênese, pois há estádios do ciclo que dependem dele para serem completados (SHARPE, 1994; O'DONNELL et al., 2001).

## 2.4 Fitoestrógenos

Os fitoestrógenos são substâncias estrogênicas que algumas plantas apresentam em sua composição, similares ao  $17\beta$ -estradiol e devido a presença de anéis fenólicos em sua estrutura são capazes de se ligar a receptores de estrógeno ( $RE\alpha$  e  $RE\beta$ ) (KUIPER et al. 1998) e desempenhar efeitos estrogênicos (CHERDSHEWASART & SRIWATCHARAKUL 2008). Fazendo uma analogia entre as afinidades do  $17\beta$ -estradiol e do fitoestrógeno coumestrol com receptor de

estrógeno ( $RE\alpha$ ) e ( $RE\beta$ ), tem-se que, o coumestrol apresenta a mesma afinidade que o  $17\beta$ -estradiol com  $RE\beta$  e três vezes menos afinidade com o  $RE\alpha$  (KUIPER et al. 1998).

Os fitoestrógenos podem ser classificados em três principais classes: Isoflavonas, Lignanós e Coumestanos (ZIEGLER, 2004). Dentre os coumestanos o principal é o coumestrol (CLAPAUCH et al., 2002) que tem potencial estrogênico *in vitro* similar ao estradiol e é o mais potente fitoestrógeno conhecido (WHITTEN & PATISAUL, 2001). Uma característica química importante para a atividade estrogênica é a posição do grupo hidroxila (ADAMS, 1995). Em comparação com a atividade do  $17\beta$ -estradiol, os coumestanos tem uma estrogenicidade 1/1000 enquanto que as isoflavonas 1/10000 (ADAMS, 1995). Os fitoestrógenos podem atuar como agonistas ou antagonistas estrogênicos (WHITTEN et al., 2002)

Em humanos uma alta ingestão de fitoestrógeno é associada com redução da incidência de câncer de mama e de próstata em populações cuja dieta é rica em soja (ADLERCREUTZ et al., 1991), neste caso sugere-se que o fitoestrógeno estimule a atividade anti-estrogênica, já em ovinos, sugere-se que os fitoestrógenos desempenhem ação estrogênica (ADAMS, 1995), uma vez que os níveis do esteróide estrógeno são altos na circulação sanguínea em humanos, aumentando essa concentração por fonte exógena, ocorre o um feedback negativo e os níveis de estrógeno diminuem (ADLERCREUTZ et al., 1991) no caso dos ovinos, já que os níveis de estrógeno circulante são relativamente baixos, sugere-se portanto que efeito final seja estrogênico (ADAMS, 1995).

Segundo Moravcová et al. (2004) os níveis de coumestrol presentes na alfafa podem aumentar por alguns fatores incluindo idade da planta, condições climáticas, ataque de patógenos e a forma como a ensilagem foi processada. Ataques por patógenos estimulam a planta produzir fitoalexinas coumestran estrogênicas, incluindo o coumestrol e o coumestrol 4'-metoxy, um metabólito do coumestrol. Efeitos ambientais como umidade, idade da planta, quantidade de fertilizante ou temperatura, afetam a concentração de coumestanos para que a planta se torne mais resistente à esses patógenos. Da mesma forma plantas com resistência genética ao ataque de patógenos sofrem menos dano e, por conseguinte, possuem

menos atividade estrogênica (LOPER et al., 1967). As plantas que tem maiores níveis de fitoestrógenos são alfafa, soja e o trevo (SHORE et al., 1995).

## **2.5 Mecanismo de ação dos estrógenos**

Dentre muitas outras funções, os estrógenos favorecem a diferenciação celular e crescimento dos testículos, epidídimo e próstata (ROSSELLI et al. 2000). Os receptores de estrógenos (RE) pertencem à superfamília de receptores nucleares, apresentam-se sob duas formas (RE $\alpha$  e RE $\beta$ ) que se diferenciam apenas pela sequência de aminoácidos que os compõem, exibindo 96% de semelhança (WEIHUA et al., 2003).

Os estrógenos circulantes penetram nas células-alvo de diversos tecidos, como útero, glândula mamária, sistema nervoso central, dentre outros, tais tecidos apresentam em sua composição muitos receptores de estrógeno do tipo  $\alpha$ . (MOSELMAN et al., 1996; WEIHUA et al., 2003). Muitos outros tecidos apresentam menos RE $\alpha$ , porém maior quantidade de RE $\beta$ , a exemplo tem-se os testículos, próstata e vários outros (JACOB et al., 2001).

Os RE são receptores nucleares que modulam a transcrição ligando-se a uma sequência específica do genoma. Uma vez ligado ao estrógeno, o RE sofre modificações conformacionais que lhe permite se dissociar do co-repressor e se ligar a um complexo co-ativador simultaneamente, tal evento permite a atividade de transcrição dos genes que contém elementos de resposta ao estrógeno, seguindo o mesmo raciocínio, na ausência de estrógeno, os co-repressores permanecem associados aos RE e a atividade de transcrição fica inibida (MANIATIS & REED, 2002; HEWITT & KORACH, 2003).

## **2.6 Papel dos estrógenos no sistema reprodutor masculino**

Wotiz et al. em (1955) e Rabinowitz (1956) realizaram estudos que se complementaram em provar que os testículos são capazes de produzir estrógeno. Estes estudos sugeriram existir um elo comum na biossíntese de andrógenos e estrógenos. Pouco tempo depois Baggett et al. (1959) num estudos com testículo de

cavalos, descobriu uma evidência direta para a conversão de testosterona em estradiol.

A aromatase é uma enzima responsável pela transformação de andrógeno em estrógeno, e é produto de um único gene denominado CYP19, o qual pertence a família de genes citocromo P450 (SIMPSON et al. 1994). Em 1993, Nitta et al. demonstraram pela primeira vez que células germinativas de ratos adultos expressam uma aromatase funcional. Tal enzima foi encontrada na células de Sertoli e Leydig em trabalho escrito por Simpson et al (1994). Corroborando tais trabalhos Roselli e colaboradores (1997), relataram que pelo menos três células do sistema reprodutor masculino sintetizam estrógenos: Células de Sertoli, células de Leydig e células germinativas.

Fisher et al. (1998) realizaram experimento utilizando ratos deficientes para aromatase e verificaram que a anatomia interna dos animais era aparentemente normal, porém numa análise mais cuidadosa foi verificado um aumento do peso das vesículas seminais, bexiga e próstata, que parece ser devido ao acúmulo das secreções. Segundo Levallet et al. (1998), as células germinativas de ratos adultos são importante fonte estrógenos, pois a atividade da aromatase nelas presente responde pela metade do total. Gist et al. (2006), num experimento em que se realizou imunohistoquímica para detecção de aromatase, em tartarugas macho, comprovou a presença da enzima no testículo e epidídimo, mais precisamente na região perinuclear das células de Sertoli, no citoplasma das células de Leydig e proximidades das células germinativas.

Estudos mostram que mais de 90% dos fluidos secretados pelo epitélio seminífero são reabsorvidos nos ductos eferentes Crabo (1965). Os estrógenos estão presentes em abundância nos ductos eferentes de várias espécies estudadas, tais túbulos são ductos bem finos que se ramificam da rete testis, e vão até o epidídimo (ILIO & HESS, 1994) tem a função de reabsorver fluidos luminiais (CLULOW et al., 1998; ILIO & HESS, 1994). Para corroborar tal afirmação, tem-se o estudo realizado por Hesse et al. (1997a), no qual foi observado que ratos deficientes para receptor de estrógeno apresentaram um aumento no peso testicular, seguido por uma redução neste, sugerindo que a longo prazo ocorra uma atrofia em resposta ao acúmulo de fluido gerando pressão negativa contra o epitélio germinativo. Ductos eferentes e segmento inicial do epidídimo foram dilatados em ratos deficientes para

o receptor de estrógeno, além da redução em 48% das alturas das células epiteliais dos ductos eferentes (HESS et al., 2000). Tais trabalhos levaram à conclusão de que os estrógenos estão envolvidos na regulação de transporte de fluido no sistema reprodutor masculino (HESS, et al., 2001).

Como já escrito, tanto estrógenos quanto seus receptores são produzidos no testículo (O'DONNELL et al., 2001; PIERANTONI et al., 2003) e a exposição a estas substâncias, tem sido responsabilizada pela diminuição na quantidade de espermatozoides em humanos, ao longo dos últimos 50 anos (SHARPE & SKAKKEBAEK, 1993; AUGER et al., 1995; TOPPARI et al., 1996). A administração de estrógenos prejudica a produção e maturação de espermatozóide em ratos (STEINBERGER&DUCKETT, 1965; MEISTRICHTH et al., 1975).

Os receptores de estrógenos são cruciais para regulação da fertilidade masculina, já que, uma vez destruído o gene que codifica tais receptores, o camundongo macho teve sua fertilidade significativamente reduzida (LUBAHNet al.,1993). Em tartarugas macho a expressão de RE $\beta$  foi observada em todo o sistema reprodutivo, de forma intensa nos ductos eferentes, epidídimo, espermatozônias e nas células de Leydig ao passo que nas células de Sertoli a expressão foi mais branda (GIST et al., 2006).

## **2.7 Os fitoestrógenos e suas ações no sistema reprodutivo**

Diversos estudos conduzidos em humanos e animais relataram vários efeitos dos fitoestrógenos sobre o desenvolvimento de anormalidades e até mesmo infertilidade nos tratos reprodutivos femininos e masculinos (BURTON & WELLS, 2002). Ao administrar o coumestrol via oral uma vez por semana durante um mês em cães, Pérez-Rivero et al. (2009) observaram que, comparados ao grupo controle, os animais que receberam o coumestrol apresentaram redução do epitélio germinativo, aumento do número de espermatozoides anormais no ejaculado e menor concentração espermática.

Achados clínicos confirmam um negativo impacto do coumestrol na reprodução de éguas, assim como ocorreu em numerosas espécies, os altos níveis plasmáticos de coumestrol e seu metabólito, o methoxycoumestrol, foram associados com a infertilidade temporária nesses animais (FERREIRA-DIAS, 2013).



Segundo Woclawek-Potocka et al (2005), os fitoestrógenos podem competir com os estrógenos endógenos podendo assim desregular vários mecanismos endócrinos durante o ciclo estral. Ferreira-Dias (2013) realizaram trabalho com éguas que receberam quantidades crescentes de alfafa, e verificaram que as quantidades plasmáticas de coumestrol aumentaram após a ingestão do feno quando comparadas com o grupo controle, atingiu seu maior nível no intervalo entre 1.5 e 4 horas. Shemesh et al, (1972) também verificaram que no experimento realizado em cabras nutridas com dieta contendo alfafa, foram encontrados níveis de coumestrol no sangue.

Diversas patologias reprodutivas têm sido citadas em carneiros e ovelhas alimentados com dieta contendo principalmente alfafa (CANTERO et al., 1996). Nestes animais o efeito dos fitoestrógenos na reprodução depende do estágio da estação de monta, idade do animal e tempo de exposição. Taxas de ovulação e concepção foram reduzidas em ovelhas mantidas em pastagem estrogênica na época do acasalamento, enquanto que a exposição prolongada pode causar infertilidade permanente (ADAMS, 1995).

Em rato Wistar, Atanassova et al. (2000), concluíram que a exposição neonatal de ratos à baixos níveis de estrógenos pode antecipar a primeira onda de espermatogênese na puberdade, porém ainda não estão muito claros se tais efeitos estão ligados diretamente aos níveis de estrógeno. Estes mesmos autores concluíram também, que a presença ou ausência de soja ou genisteína na dieta tem efeitos nos machos tanto a curto quanto a longo prazo, no primeiro caso com relação à antecipação da espermatogênese e no segundo caso, acerca do peso corporal, tamanho dos testículos, níveis de FSH.

## **2.8 Metabolismo dos fitoestrógenos nos ruminantes**

Os fitoestrógenos podem ser metabolizados no rúmen, de modo que os compostos estrogênicos em plantas forrageiras dependem do seu destino metabólico (COX E BRADEN, 1974). O coumestrol é ingerido em sua forma inativa, o 4'-methoxy-coumestrol (WANG et al., 1990; FRANKE et al., 1994) e só depois de sofrer a desmetilação, que ocorre no rúmen, libera o coumestrol, que é mais potente quanto a estrogenicidade. Tal potencialização ocorre porque depois da

desmetilação, o grupo hidroxila se torna capaz de se ligar ao receptor de estrógeno, ao contrário do que acontece com as isoflavonas que podem ser quebradas no rúmen em substâncias sem atividade estrogênica (COX & BRADEN, 1974).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

- Avaliaros diferentes níveis de feno de alfafa sobre parâmetros morfométricos e qualitativos do parênquima testicular e níveis séricos de testosterona em ovinos (*ovis aries*)sem raça definida

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o pesoepididimário, biometria testicular e calcular o índice gonadossomático (IGS) dos ovinos;
- Medir altura e área do epitélio seminífero, diâmetro tubular, e comprimento total dos túbulos seminíferos;
- Determinar o volume de cada componente dos testículos;
- Realizar a contagem da população celular dos epitélios seminíferos;
- Calcular a população das células de Sertoli;
- Calcular a produção espermática diária por testículo e por grama de testículo;
- Calcular o volume celular, o número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo;
- Dosar a concentração de testosterona sérica.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local do Experimento

O experimento foi realizado no Galpão de Confinamento do Setor de Caprinos e Ovinos do Departamento de Zootecnia (DZ), no Laboratório de Histopatologia e imuno-histoquímica do Departamento de Medicina Veterinária (DMV) e no laboratório de Central Analítica do Cenapesq, todos pertencentes à UFRPE (Universidade Federal Rural de Pernambuco).

### 4.2 Animais

Foram utilizados 40 carneiros sem padrão racial definido com oito meses de idade. Os animais foram alojados em baias individuais (1,0 m x 1,8 m), providas de comedouro e bebedouro e distribuídos em delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro tratamentos e dez repetições. As tratamentos consistiram em rações com relação volumoso-concentrado 60:40, com inclusão do feno de alfafa em até 60% (0%; 20%; 40% e 60%) (Tabela 1). As rações foram formuladas para atender ganhos de peso de 200 g/dia (NRC, 2007).

Os animais foram tratados previamente com anti-helmíntico e receberam complexo vitamínico ADE. Após período adaptativo, os animais foram alocados aos seus respectivos tratamentos, cujas rações foram ofertadas duas vezes ao dia (8 e 15 horas), na forma de mistura completa, sendo ajustadas a cada três dias, mas, quando necessário, diariamente, em função do consumo do dia anterior, permitindo sobras de 10,0%.

**Tabela 1.** Composição percentual e química das dietas experimentais de carneiros SRD (*Ovis aries*) submetidos a dietas com diferentes níveis de alfafa

	Níveis de Feno de Alfafa (%)			
	0	20	40	60
<b>Ingredientes (g/kg de MS)</b>				
Feno de Tifton	600	400	200	0
Feno de alfafa	0	200	400	600
Farelo de milho	220	252	291	328
Farelo de soja	165	133	95	58
Núcleo mineral	6	8	10	12
Calcário calcítico	4	2	0	0
Fosfato bicálcico	5	5	4	2
<b>Composição química (g/kg de MS)</b>				
Matéria Seca (g/kg de MN)	858	855	851	847
Matéria orgânica <sup>1</sup>	920	917	915	905
Matéria mineral <sup>1</sup>	80	83	85	88
Proteína bruta <sup>1</sup>	143	149	152	157
Extrato etéreo <sup>1</sup>	23	23	24	24
Fibra detergente neutro <sup>1</sup>	478	405	332	260
Carboidratos não fibrosos <sup>1</sup>	271	332	397	460
Carboidratos totais <sup>1</sup>	748	736	729	719
Nutrientes digestíveis totais <sup>1</sup>	603	604	581	584

MS = matéria seca; MN = matéria natural; <sup>1</sup>= g/kg de MS.

Após pesagem, identificação, tratamento contra ecto e endoparasitas e vacinação contra clostridiose, os animais foram alojados no Galpão de Confinamento do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Passaram por um período de adaptação, sendo alimentados duas vezes ao dia (oito e dezesseis horas) e o fornecimento de água foi à vontade.

#### 4.3 Eutanásia dos animais

Ao final do confinamento (60 dias), os animais foram submetidos a jejum de sólidos por 16 horas e, em seguida, pesados para obtenção do peso corporal final (PCF), o abate foi realizado por concussão cerebral por meio de pistola pneumática, seguido de exsanguinação, através de corte da carótida e jugular, o complexo testículo-epidídimo (CTE) foi removido dois minutos após o início da exsanguinação (Diretrizes da prática de eutanásia da CONCEA, 2013).

#### 4.4 Peso testicular, epididimário e biometria testicular

Após a eutanásia, o complexo testículo-epidídimo (CTE) foi removido. O testículo e o epidídimo foram pesados individualmente em balança digital (modelo Kern 410) com precisão de quatro casas decimais e o testículo foi mensurado (altura e largura) com auxílio de paquímetro.

#### 4.5 Índice Gonadosomático

O índice gonadosomático foi calculado através da soma do peso de ambos os testículos, dividida pelo peso corporal do animal, sendo referenciado em porcentagem (BARBOSA et al. 2012).

#### 4.6 Processamento histológico dos testículos

Após as mensurações, os testículos e epidídimos foram seccionados em fragmentos de até 2 mm de espessura os quais foram submetidos à fixação em solução de glutaraldeído a 4% em tampão fosfato de sódio, 0,01 M e pH 7,2 .

Para os estudos ao microscópio de luz, os fragmentos permaneceram imersos em tampão fosfato por 2 horas, sendo posteriormente desidratados em série crescente de álcool 70°GL; 80°GL; 90°GL e 100°GL, (2 vezescada) com trocas a cada 15 minutos, após a desidratação, os fragmentos foram incluídos em resina plástica à base de glicol metacrilato (GMA, Leica). Foram obtidos cortes histológicos de 4 µm de espessura, em micrótomo automático com navalhas de vidro para historresina (marca Reichert-Jung). Os cortes foram corados em Hematoxilina-Floxina e Azul de Toluidina, montados com Entelan (Merck) e analisados morfológicamente e morfometricamente em microscópio Zeiss binocular (modelo axiostar), na área de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da UFRPE.

#### 4.7 Histomorfometria testicular

O diâmetro tubular médio por animal foi obtido a partir da mensuração ao acaso de 15 secções transversais de túbulos seminíferos que apresentaram contorno o mais circular possível. Estas medidas não levaram em consideração o estágio do ciclo e foram realizadas com auxílio do programa Image J, as fotos obtidas para mensuração com o programa citado foram na objetiva de 10x.

As mesmas secções utilizadas para medir o diâmetro tubular foram utilizadas para mensurar a altura e área do epitélio seminífero, o valor encontrado para o diâmetro de cada túbulo representou a média de duas retas tomadas de forma diametralmente opostas, para a altura do epitélio, traçou-se uma reta partindo da túnica própria até o lúmen tubular, já a área de epitélio foi mensurada através de ferramenta que circunda o corte transversal por completo na linha da túnica própria, e logo depois seu lúmen, a área foi determinada subtraindo a segunda medida da primeira.

O comprimento total dos túbulos seminíferos (CTTS) por testículo exposto em metros foi calculado pela divisão do volume total dos túbulos seminíferos (VTS) no testículo por  $R^2$  ( $R = \text{diâmetro} / 2$ ) e o valor de  $\pi$ :  $CTTS = VTS / \pi R^2$ .

Os volumes dos diferentes componentes do parênquima testicular foram calculados utilizando-se um retículo com 21 linhas e 21 colunas cruzando-se em 441 interseções (pontos) associado a ocular em aumento de 400x. Para cada animal foram analisados 15 campos, escolhidos ao acaso, resultando em um total de 6.615 pontos por animal.

Foram escolhidos 5 túbulos com perfil mais redondo possível no estágio I do ciclo do epitélio seminífero, e contabilizados, espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno e paquíteno, espermátides arredondas e nucléolos de células de células de Sertoli, a população dessas últimas foi obtida através da contagem daquelas com o nucléolo visível. Após isso, foi realizada a correção do número obtido utilizando a fórmula de Abercrombie (1946), modificada por Amann (1962), conforme segue:

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

O diâmetro nucleolar médio (DM) representa a média dos diâmetros de 05 nucléolos de células de Sertoli para cada animal dos grupos. A população foi calculada através do resultado da multiplicação do número corrigido pelo comprimento total dos túbulos seminíferos em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ) e dividido pela espessura do corte.

O índice de células de Sertoli (ICS) foi calculado a partir da divisão do número corrigido de espermatídes arredondadas pelo número também corrigido de células de Sertoli.

O cálculo da produção espermática diária (PED) por testículo e por grama de testículo foi realizado de acordo com Silva Júnior et al. (2006):  $\text{PED} = \text{N}^\circ \text{ total de células de Sertoli por testículo} \times \text{a proporção de espermatídes arredondadas no estágio I} \times \text{estádio I com frequência relativa} / \text{duração do estágio (dias)}$ . A duração do estágio 1 utilizada foi aquela obtida por Cardoso & Queiroz (1988).

O volume nuclear das células de Leydig foi obtido através da medição do diâmetro nuclear de 30 células por animal e da utilização da fórmula do volume da esfera,  $4/3\pi R^3$ . A proporção volumétrica núcleo/citoplasma de tais células foi obtida através da contagem de 1000 pontos sobre o citoplasma e núcleo, utilizando-se um retículo com 441 intersecções sob o aumento de 1000x. A partir dessa proporção foi calculado o volume citoplasmático e o volume celular:

$$\text{Volume citoplasmático} = \% \text{ citoplasma} \times \text{volume nuclear} / \% \text{ núcleo}$$



Volume celular = volume nuclear + volume citoplasmático

Com os resultados do volume de uma célula de Leydig e do volume total de células de Leydig por testículo, obteve-se o número total destas células por testículo. A divisão desse valor pelo peso líquido do testículo forneceu o número de células de Leydig por grama de testículo.

#### 4.8 Níveis séricos de testosterona

A dosagem sérica de testosterona foi realizada por eletroquimioluminescência, utilizando-se analisador automatizado Access 2 (BeckmanCoulter, Califórnia, USA), com uso do kit para dosagem de testosterona de acordo com o fabricante supracitado.

#### 4.9 Análise Estatística

O delineamento utilizado foi bloco casualizado, sendo quatro tratamentos com 10 repetições. Os dados foram interpretados, fazendo uso de análises de variância e regressão por meio do pacote estatístico SAS (1999), e o critério para a escolha do modelo foi o coeficiente de determinação, calculado pela relação entre a soma do quadrado da regressão e soma de quadrado de tratamento e a significância obtida por meio do teste F em nível de 5% de probabilidade.

Os resultados obtidos foram também analisados com o auxílio do programa *SIGMASTAT for Windows* versão 2.0. Foram realizados os testes ANOVA e Kruskal-Wallis e os dados representados como média e desvio padrão. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes.

## 5 RESULTADOS

Os pesos corporais (PC) e epididimários (PE), assim como as alturas testiculares (AT) dos animais alimentados com os diferentes níveis de alfafa não apresentam efeito de regressão. Já os pesos testiculares (PT) e larguras testiculares (LT) revelaram efeito quadrático para os animais que receberam 20% de alfafa na dieta. Os níveis de alfafa oferecidos aos ovinos não causou efeito de regressão nos valores do IGS (0,95%). Não houve diferença estatística entre os grupos para o peso corporal, biometria testicular e IGS (Tabela 2).

**Tabela 2.** Biometria Testicular e IGS de carneiros SRD (*Ovis aries*) submetidos a dietas com diferentes níveis de alfafa.

Paramêtros	Níveis de Feno de Alfafa (%)				Tipo de Efeito de Regressão		
	0	20	40	60	L	Q	C
PC (kg)	39,10 ± 2,66	39,18 ± 2,05	39,22 ± 2,89	39,70 ± 3,74	ns	ns	ns
PT (g)	351,47 ± 60,54	401,10 ± 59,89	386,89 ± 71,35	353,88 ± 52,88	ns	0,0461	ns
AT (cm)	9,32 ± 0,74	9,33 ± 0,51	9,34 ± 0,87	9,14 ± 0,66	ns	ns	ns
LT (cm)	6,21 ± 0,51	6,59 ± 0,31	6,51 ± 0,42	6,31 ± 0,37	ns	0,0379	ns
PE (g)	48,56 ± 6,83	51,59 ± 5,08	47,07 ± 6,42	46,73 ± 8,29	ns	ns	ns
IGS (%)	0,90 ± 0,16	1,03 ± 0,17	0,99 ± 0,19	0,90 ± 0,16	ns	ns	ns

PC = Peso Corporal; PT = Peso Testicular Total; AT = Altura do Testículo; LT = Largura do Testículo; PE = Peso Epididimário Total; IGS=Índice Gonadossomático.

Na análise de regressão dos parâmetros tubulares dos testículos dos ovinos não houve efeito de regressão entre os grupos experimentais parâmetro tubular e comprimento total do túbulo seminífero, porém houve um efeito linear decrescente sobre a altura de epitélio seminífero ( $P = 0,0180$ ), assim como sua área ( $P = 0,0442$ ) de modo que, quanto maior a proporção de alfafa nas dietas menor a altura e área do epitélio. Não houve diferença estatística entre os parâmetros descritos acima (tabela 3).

Para os dados de proporção volumétrica, apenas o volume das células do conjuntivo apresentou diferença estatística entre os grupos experimentais ( $P = 0,044$ ). A respeito da análise de regressão, no compartimento tubular do parênquima testicular não foi observado efeito de regressão entre os volumes tubulares totais dos grupos, assim como nos volumes do lúmen tubular e epitélio seminífero. Constatou-se um efeito de regressão linear crescente no volume da túnica própria. No espaço intertubular não foi observado efeito e regressão entre os volumes intersticiais totais, no volume do espaço linfático, nem no volume das células do conjuntivo, porém, notou-se um efeito de regressão linear crescente no volume total das células de Leydig no volume dos vasos sanguíneos, ou seja, uma relação diretamente proporcional ao aumento dos níveis de alfafa nas dietas. Já a produção espermática diária por grama de testículo (PED/g/T) houve efeito de regressão linear decrescente com o aumento dos níveis de alfafa (Tabela 3).

**Tabela 3.** Parâmetros tubulares, proporção volumétrica, população de células de Sertoli, PED/T e PED/g/T de testículos de carneiros SRD (*Ovis aries*) submetidos a dietas com diferentes níveis de alfafa.

Parâmetros	Níveis de Feno de Alfafa (%)				Tipo de Efeito de regressão		
	0	20	40	60	L	Q	C
Diâmetro tubular(µm)	297,51±25,17	297,96±25,47	303,68±0,78	288,97±17,46	ns	ns	ns
Altura do epitélio (µm)	81,85±11,57	77,32±10,71	74,87±5,97	70,35±8,17	0,0180	ns	ns
Área de epitélio x10 <sup>6</sup> (µm <sup>2</sup> )	62,84±10,68	60,27±10,76	59,37±7,47	53,87±6,91	0,0442	ns	ns
Comp. Total Túbulo Seminífero X 10 <sup>2</sup> (m)	21,55 ± 3,58	24,25 ± 4,74	21,44 ± 2,68	22,72 ± 4,79	ns	ns	ns
Peso líquido testículo (g)	165,32±29,11	186,64±30,43	179,30±36,50	167,57±26,10	ns	ns	ns
Volume tubular total (mL)	148,54±24,75	166,78±26,78	156,17±28,88	147,04±22,93	ns	ns	ns
Túnica Própria tubular (mL)	4,31±0,94	5,28±0,98	5,64±1,16	5,38±1,62	0,0443	ns	ns
Lúmen Tubular (mL)	33,25±9,92	37,57±4,79	39,61±11,40	34,49±7,81	ns	ns	ns
Epitélio Seminífero tubular (mL)	110,97±23,33	123,94±25,03	110,92±19,79	107,17±21,41	ns	ns	ns
Volume intersticial total (mL)	16,78±6,01	19,93±4,96	23,15±8,65	20,53±5,40	ns	ns	ns
Céls de Leydig (mL)	3,95±1,29	4,14±1,23	5,79±2,56	5,29±1,93	0,0427	ns	ns
Céls do Conjuntivo (mL)	0,28±0,17 <sup>a</sup>	0,29±0,15 <sup>a</sup>	0,51±0,32 <sup>b</sup>	0,24±0,16 <sup>a</sup>	ns	ns	ns
Vasos Sanguíneos (mL)	0,80±0,43	1,13±0,50	1,59±0,89	1,40±0,80	0,0255	ns	ns
População de Célula de Sertoli /T (x10 <sup>8</sup> )	28,53 ± 5,62	35,05 ± 12,33	28,28 ± 7,12	29,34 ± 8,83	ns	ns	ns
PED/T (x10 <sup>8</sup> )	32,56 ± 8,23	34,80 ± 10,88	30,88 ± 7,29	28,25 ± 6,78	ns	ns	ns
PED/g/T (x10 <sup>6</sup> )	19,76 ± 3,65	18,33 ± 3,23	17,42 ± 3,13	16,78 ± 2,87	0,0424	ns	ns

Letras distintas na mesma linha indicam diferença estatística (p<0,05).

**Tabela 4.** Proporção volumétrica em porcentagem (%) de testículos de carneiros SRD (*Ovis aries*) submetidos a dietas com diferentes níveis de alfafa.

Parâmetros	Níveis de Feno de Alfafa (%)			
	0	20	40	60
Peso Líquido Testículo (g)	165,32±29,11	186,64±30,43	179,30±36,50	167,57±26,10
<b>Volume Tubular Total (%)</b>	90,00	89,47	87,16	87,67
Túnica Própria (%)	2,62±0,00	2,89±1,00	3,21±0,00	3,26±1,00
Lúmen Tubular (%)	20,35±5,00	20,45±3,00	21,58±4,00	21,18±6,00
Epitélio Seminífero (%)	67,03±5,00	66,06±4,00	62,36±4,00	63,23 ± 5,00
<b>Volume Intersticial Total (%)</b>	10,00	10,63	12,84	12,32
Células de Leydig (%)	2,38±0,00	2,21±0,00	3,24±1,00	3,08±1,00
Células do Conjuntivo (%)	0,17±0,00	0,16±0,00	0,24±0,00	0,15±0,00
Vasos Sanguíneos (%)	0,47±0,00	0,58±0,00	0,85±0,00	0,84±0,00
Espaço Linfático (%)	6,99±2,00	7,68±2,00	8,50±2,00	8,26±2,00

Segundo os dados descritos na tabela 5, a população de célula de Leydig por grama de testículo diferiu estatisticamente entre os grupos estudados ( $P = 0,007$ ). Quanto à análise de regressão, o volume individual das células de Leydig, apresentou efeito linear positivo com o aumento dos níveis de alfafa, enquanto a população das células de Leydig por testículo e por grama de testículo assim como o diâmetro dessas células e os níveis séricos de testosterona dos grupos estudados não apresentaram efeito de regressão.

**Tabela 5.** População, diâmetro e volume individual da célula de Leydig e níveis séricos de testosterona de carneiros SRD (*Ovis aries*) submetidos a dietas com diferentes níveis de alfafa.

Parâmetros	Níveis de Feno de Alfafa (%)				Tipo de Efeito de regressão		
	0	20	40	60	L	Q	C
População de Célula de Leydig /T (x10 <sup>9</sup> )	10,78 ± 2,21	8,53 ± 2,91	13,29 ± 5,62	10,92 ± 3,72	ns	ns	ns
População de Célula de Leydig /g/T (x10 <sup>6</sup> )	66,43 ± 15,49 <sup>a</sup>	45,17 ± 11,23 <sup>b</sup>	71,68 ± 18,33 <sup>a</sup>	63,66 ± 14,04 <sup>a</sup>	ns	ns	ns
Volume Individual da Célula de Leydig (µm <sup>3</sup> )	362,58 ± 76,43	499,42 ± 71,74	448,68 ± 81,43	495,27 ± 95,09	0,0074	ns	ns
Diâmetro Célula de Leydig (µm)	6,38 ± 0,49	6,41 ± 0,36	6,44 ± 0,51	6,75 ± 0,52	ns	ns	ns
Testosterona (ng/mL)	4,70 ± 2,85	6,37 ± 2,50	7,46 ± 2,37	6,52 ± 2,48	ns	ns	ns

Letras distintas na mesma linha indicam diferença estatística (p<0,05).

**Tabela 6.** População celular por secção de testículos de carneiros SRD (*Ovis aries*) submetidos a dietas com diferentes níveis de alfafa.

Parâmetros	Níveis de Feno de Alfafa (%)				Tipo de Efeito de Regressão		
	0	20	40	60	L	Q	C
Célula Sertoli por Secção	5,43 ± 1,49	5,69 ± 1,61	5,27 ± 1,05	5,23 ± 1,31	ns	ns	ns
Célula espermátide Arredondada por Secção	81,57 ± 18,21	77,52 ± 15,75	77,45 ± 16,16	66,4 ± 8,38	0,0453	ns	ns
Célula em Pré-Leptóteno por Secção	12,36 ± 3,75	11,16 ± 2,26	11,04 ± 1,72	10,73 ± 3,13	ns	ns	ns
Célula em Paquíteno Secção	27,49 ± 7,67	27,11 ± 5,19	31,06 ± 5,48	26,66 ± 3,79	ns	ns	ns

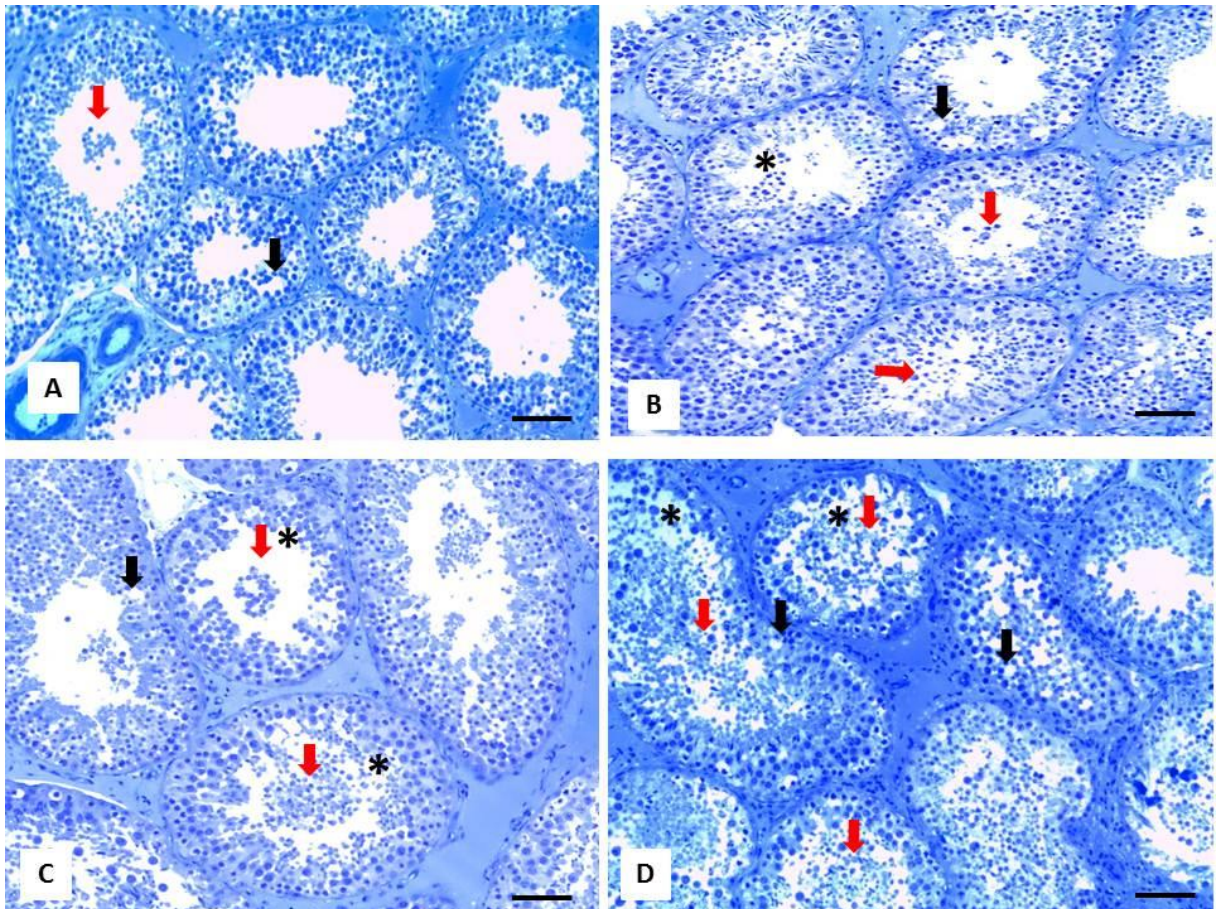
A histologia quantitativa para determinar a população celular por secção transversal revelou que a célula espermátide arredondada por secção sofreu efeito de regressão linear negativo com o aumento dos níveis de alfafa, ou seja, quanto maiores os níveis de alfafa oferecidos aos animais, menos espermátides arredondadas por secção foram contabilizadas, as demais células (Sertoli, espermatócito em pré-leptóteno e paquíteno) não apresentaram efeito de regressão (Tabela 6).

Na análise qualitativa do parênquima testicular foi possível observar que os grupos apresentaram alterações comuns, o que mudou foi a intensidade com que elas ocorreram ficando mais intensas à medida que os níveis de alfafa foram aumentados, as alterações foram: descamação do epitélio seminífero, vacuolização das células de Sertoli e redução da altura do epitélio germinativo (Figuras 1, 2 e 3).

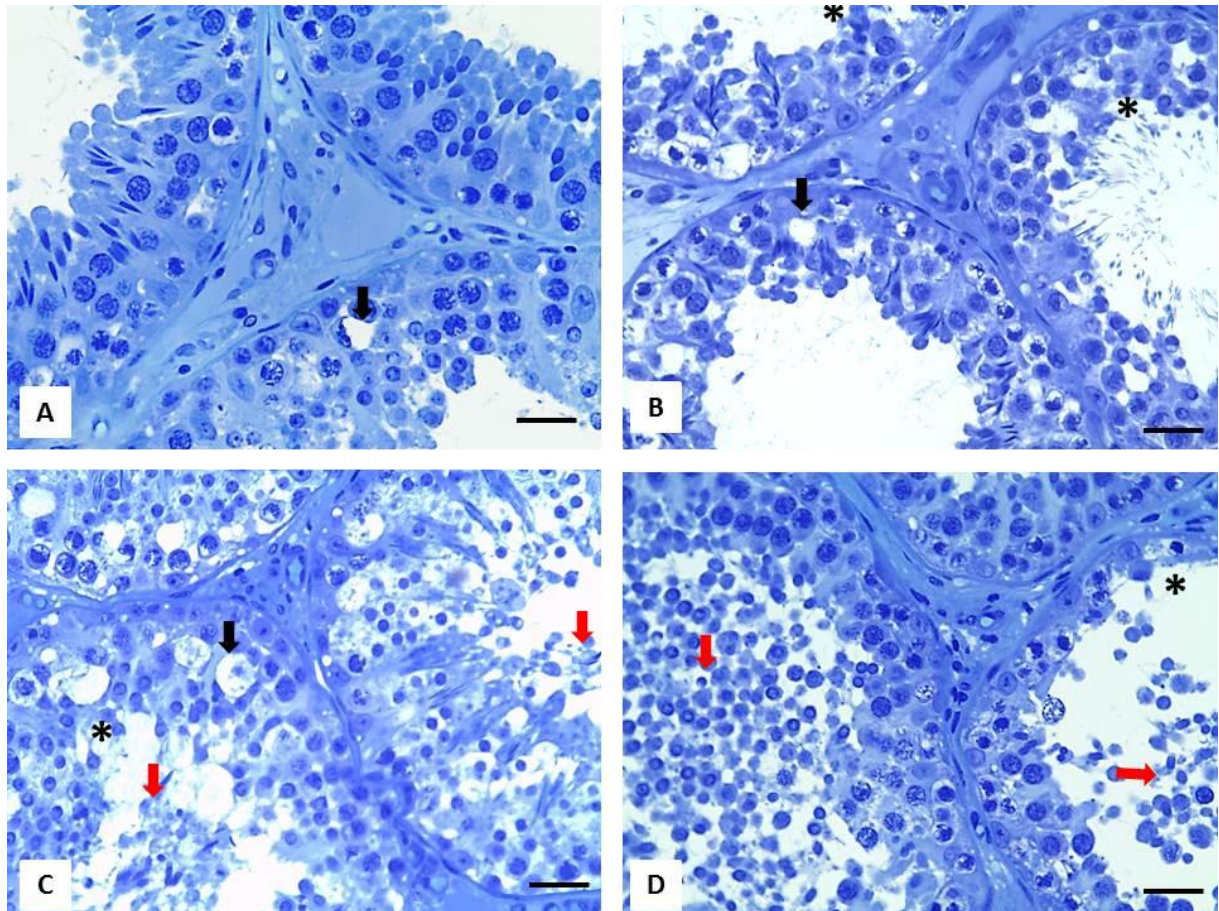
O grupo que não recebeu acréscimo de alfafa em sua dieta (0% alfafa) apresentou as lesões acima descritas de forma bastante discreta (Figuras 1 A, 2 A e 3 A). No grupo que recebeu 20% de alfafa na dieta (Figuras 1 B, 2 B e 3 B), houve alterações comuns aos grupos de forma mais intensa do que as observadas no grupo anterior, com espermátocitos em paquíteno sofrendo processo de necrose celular (Figura 3 B).

Para o grupo que recebeu 40% de alfafa na dieta (Figuras 1 C, 2 C e 3 C), as alterações foram ainda mais severas, apresentando alguns espermátocitos em paquíteno sofrendo processo de necrose celular (Figura 3 C). O grupo nutrido com 60% de alfafa exibiu todas as alterações acima descritas para os demais grupos de forma ainda mais acentuada, com estado de degeneração testicular altamente avançado (Figuras 1 D, 2 D e 3 D) além de presença de inúmeros espermátocitos em paquíteno em processo de necrose celular (Figura 3 D).



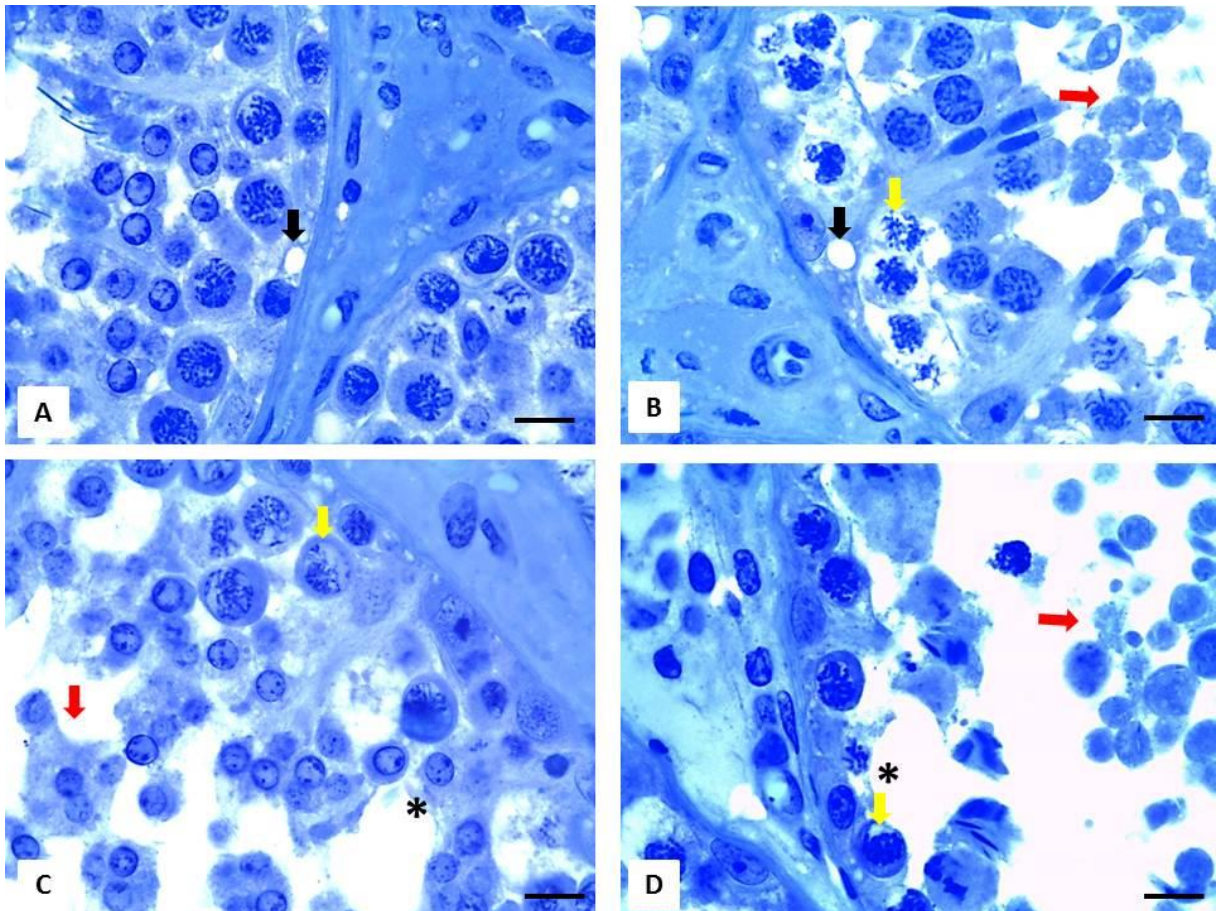


**Figura 1.** Fotomicrografias da secção transversal do testículo de carneiros SRD (*Ovis aries*) submetidos a dietas de diferentes níveis de alfafa. 0% de alfafa (A), 20% de alfafa (B), 40% de alfafa (C) e 60% de alfafa (D). Observar descamação de epitélio (seta vermelha), vacuolização das células de Sertoli (seta preta) e redução da altura do epitélio germinativo (Asterisco). aumento de 100x. Barra de 200  $\mu$ m.



**Figura 2.** Fotomicrografias da secção transversal do testículo de carneiros SRD (*Ovis aries*) submetidos a dietas de diferentes níveis de alfafa. 0% de alfafa (A), 20% de alfafa (B), 40% de alfafa (C) e 60% de alfafa (D). Observar descamação de epitélio (seta vermelha), vacuolização das células de Sertoli (seta preta) e redução da altura do epitélio germinativo (Asterisco). aumento de 400x. Barra de 50 µm.





**Figura 3.** Fotomicrografias da secção transversal do testículo de carneiros SRD (*Ovis aries*) submetidos a dietas de diferentes níveis de alfafa. 0% de alfafa (A), 20% de alfafa (B), 40% de alfafa (C) e 60% de alfafa (D). Observar descamação de epitélio (seta vermelha), vacuolização das células de Sertoli (seta preta) e redução da altura do epitélio germinativo (Asterisco). Paquíteno em necrose celular (seta amarela). aumento de 1000x. Barra de 4 µm.

## 6 DISCUSSÃO

De acordo com a Tabela 2, os pesos corporal e epididimário, além do IGS e altura testicular não apresentaram efeito de regressão entre os grupos. O peso testicular (PT) assim como a largura testicular (LT) apresentaram efeito de regressão quadrático para os animais que receberam 20% de alfafa em suas dietas. Portanto quanto maior o peso testicular maior será sua biometria.

Conforme os dados inseridos na Tabela 3, a substituição de Tifton-85 por alfafa na dieta dos ovinos não provocou efeito de regressão nos valores de diâmetro tubular e comprimento total dos túbulos seminíferos ( $P>0,05$ ), no entanto na altura e área de epitélio, nota-se um efeito de regressão linear negativo entre os grupos. Tal resultado pode ser explicado pela descamação observada no epitélio germinativo que se tornou mais pronunciada à medida que os níveis de alfafa foram aumentando.

A diminuição na altura do epitélio do parênquima testicular de ovinos foi descrito por Bezerra et al (2008) como um indicativo de degeneração testicular e segundo Cavalcante et al. (2014) dentre as lesões típicas de degeneração testicular estão perdas de epitélio germinativo. A presença de vacúolos e infiltrado inflamatório intersticial também são comuns nas células epiteliais de túbulos seminíferos alterados (SILVA et al 2013). É importante ressaltar que todos os grupos sofreram lesões e que estas, não atingiram o testículo como um todo, no entanto tais lesões se tornaram mais pronunciadas à medida que os níveis de alfafa foram aumentados principalmente com relação à perda de epitélio germinativo.

Provavelmente a causa deste efeito decrescente na altura e área de epitélio esteja relacionada ao fitoestrógeno encontrado na Alfafa, o coumestrol, que por ter estrutura química semelhante ao  $17\beta$ -estradiol, é capaz de se ligar aos receptores de estrógeno (KUIPER et al. 1998). Kulaet al. (2001) observaram que a administração de estradiol exógeno em ratos diminuiu notavelmente o número de células germinativas em estágio mais avançado do túbulo seminífero, com cerca de 40% de decréscimo em relação ao grupo controle, sugerindo que os estrógenos desempenham papel regulatório na maturação testicular e seu excesso impeça que as células germinativas amadureçam em seu curso normal. Tais resultados são semelhantes aos de nosso estudo, uma vez que os animais que receberam maiores

níveis de alfafa em suas dietas apresentaram uma significativa redução da altura do epitélio germinativo, tal redução ocorreu justamente porque as células não amadureciam no epitélio uma vez que eram destacadas deste, antes que progredisse de estágio.

A administração do coumestrol em cães, uma vez por semana durante um mês provocou redução do epitélio germinativo, aumento do número de espermatozoides anormais no ejaculado e menor concentração espermática (PÉREZ-RIVERO et al. 2009). Nossos resultados são semelhantes aos encontrados pelo autor, uma vez que quanto maiores os níveis de alfafa oferecidos aos animais, menor foi a altura e área de epitélio germinativo. Já que no presente estudo não se avaliou o sêmen, não podemos comparar alterações sobre este parâmetro, porém é válido ressaltar que em nosso estudo houve um efeito linear decrescente na produção espermática diária por grama de testículo (PED/g/T), à medida que os níveis de alfafa aumentaram.

Leniset al. (2010), concluíram que a ingestão de altas quantidades de coumestrol causa metaplasia na próstata e na glândula bulbo-uretral em bovinos. Alterações ultra-estruturais em testículo de morcego observadas por Serrano et al. (2007). Portanto, a reprodução dos animais descritos neste parágrafo foi prejudicada em vários aspectos com a administração do coumestrol. Nossos dados somam os ovinos ao grupo de animais passíveis de sofrer alterações com a administração de coumestrol.

Faz-se importante salientar que os níveis de coumestrol na alfafa podem aumentar por fatores como: idade da planta, condições climáticas, ataque de patógenos e a forma como a ensilagem foi processada. O ataque de patógenos estimula a planta a produzir coumestrol para que assim se torne mais resistente (MORAVCOVÁ et al., 2004).

Dentre os componentes tubulares, os únicos que apresentaram efeito de regressão, que no caso foi linear crescente, foram os valores de túnica própria. Esse aumento pode dever-se a um espessamento da túnica própria dos animais à medida que os níveis de alfafa aumentaram. Segundo Bustos-Obregon&Holstein (1973) o espessamento da túnica própria é típico de distúrbios na espermatogênese em humanos, fenômeno também conhecido como esclerose tubular e tem sido observado em homens com alterações degenerativas testiculares. Esse espessamento provavelmente ocorreu por haver uma possível degeneração nos

testículos dos animais alimentados com maiores níveis de feno de alfafa provocada pelos maiores níveis de coumestrol ingeridos pelos animais.

No espaço intertubular, os dados para volume de células de Leydig registrados pelo atual estudo sofreram um efeito linear crescente revelando que quanto maior a proporção de alfafa nas dietas, maior o volume ocupado por essas células no interstício. Nossos valores são semelhantes àqueles encontrados por Lunstra e Schanbacher (1988) que estudaram testículos normais e criptorquídicos de ovinos adultos, no trabalho citado, pôde-se observar que os testículos criptorquídicos apresentaram degeneração nos túbulos seminíferos acompanhada de aumento no volume ocupado pelas células de Leydig, situação semelhante a encontrada em nosso trabalho, uma vez que quanto maior o nível de alfafa, maior o volume ocupado pelas células de Leydig e mais intensas as lesões observadas nos túbulos seminíferos.

Outros dados que apresentaram efeito de regressão linear crescente dentre os componentes do espaço intersticial foi o volume dos vasos sanguíneos. Os valores para este dado registrados por Bielliet al (2001) e Sousa (2010) são próximos, porém inferiores aos do presente experimento, que por sua vez expressaram efeito linear crescente, diretamente proporcional ao aumento dos níveis de alfafa na dieta, no caso do primeiro autor citado, a diferença pode estar no fato dos ovinos por ele utilizados serem bem mais jovens. Pisselet al (1984) encontrou 13,5ml para a soma dos vasos sanguíneos com o espaço linfático, somados tais dados de nosso estudo, tem-se valor equivalente, no entanto, Lunstra e Schanbacher (1988) desprezaram valores superiores. Para o volume ocupado pelo espaço linfático não houve disparidade entre os grupos analisados.

O volume ocupado pelas células do conjuntivo apresentou diferença estatística no grupo que recebeu 40% de alfafa na dieta. A diferença estatística pode ser explicada por uma tentativa do tecido em compensar a perda de epitélio germinativo.

Segundo os dados descritos na tabela 5, a população de célula de Leydig por grama de testículo apresentou diferença estatística no grupo que recebeu 20% de alfafa. Outro dado que se deve destacar é o volume individual das células de Leydig, que por sua vez, apresentou efeito de regressão linear crescente com o aumento

dos níveis de alfafa. Ao comparar a população de células de Leydig por grama de testículo e o volume individual dessas células, percebe-se que o grupo que apresentou diferença estatística por ter o menor valor de população, foi o mesmo que apresentou o maior volume individual de célula de Leydig. Tal fato é completamente compreensível, pois à medida que a população da célula diminui, seu volume aumenta num sistema de compensação. Ao mesmo passo que, embora não tenha apresentando diferença estatística, o grupo que apresentou maiores níveis séricos de testosterona foi o que revelou maior população de célula de Leydig e um volume individual dessas células um pouco menor do que o observado no grupo de 20%.

Conforme os dados inseridos na tabela 6 o número de espermátide arredondada sofreu um efeito linear decrescente à medida que os níveis de alfafa aumentaram, simultaneamente foi observado a acentuada degeneração testicular comprovados pelo grau de descamação das células germinativas, o número de espermátides foi reduzido nos grupos que receberam maiores níveis de alfafa provavelmente porque as células antes mesmo de sofrer o processo de diferenciação eram destacadas do epitélio.

A análise qualitativa da histologia dos testículos dos ovinos revelou que apesar de os grupos terem apresentado algumas lesões comuns, um fator diferencial foi a intensidade com que tais alterações ocorreram, se tornando mais intensas quanto maiores os níveis de feno de alfafa inclusos nas dietas. Tendo os altos níveis de alfafa, portanto, um papel decisivo para determinação de degeneração do parênquima testicular.

## **7 CONCLUSÃO**

Concluiu-se que a inclusão a partir de 20% de feno de alfafa na dieta de ovinos reprodutores não é recomendada, pois compromete o parênquima testicular consequentemente na produção espermática dos animais.



## 8 REFERÊNCIAS

- ABERCROMBIE, M. Estimation of nuclear populations from microtome sections. **The Anatomical Record**, v. 94, p. 238-248, 1946.
- ADAMS, N.R. Detection of the effects of phytoestrogens on sheep and cattle. **J Anim Sci.** v. n. 73, p. 1509–1515, 1995.
- ADLERCREUTZ H. Phyto-oestrogens and cancer. **Lancet Oncol.**, n. 3, p.364–373, 2002.
- ADLERCREUTZ, H.; HONJO, H.; HIGASHI, A.; FOTSIS, T.; HAMALAINEN, E.; HASEGAWA, T.; OKADA, H. Urinary excretion of lignans and isoflavonoid phytoestrogens in Japanese men and women consuming a traditional Japanese diet. **Am J. Clin. Nutr.** v. 54, p. 1093, 1991.
- AMANN, R. P.; ALMQUIST, J. O. Reproductive capacity of dairy bulls. VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. **Journal of Dairy Science Home**, v. 45, p. 774-781, 1962.
- ARAÚJO FILHO, J. A.; SILVA, N. L. Impacto do pastoreio de ovinos e caprinos sobre os recursos forrageiros semi-árido. In: **IV Seminário Nordestino de Pecuária**, Fortaleza, p.11-18, 2000.
- ATAÍDE JÚNIOR, J.R.; PEREIRA, O.G.; GARCIA, R.; VALADARES FILHO, S.C.; CECON, M P.R.; FREITAS, E.V.V. Valor nutritivo do feno de capim-Tifton 85 (*Cynodon spp.*) em diferentes idades de rebrota, em ovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.6, p. 2193-2199, 2000.
- ATANASSOVA, N.; MCKINNELL, C.; TURNER, K.J.; WALKER, M.; FISHER, J.S.; MORLEY, M.; MILIAR, M.R.; GROOME, N.P.; SHARPE, R.M. Comparative effects of neonatal exposure of male rats to potent and weak (environmental) estrogens on spermatogenesis at puberty and the relationship to adult testis size and fertility: evidence for stimulatory effects of low estrogen levels. **Endocrinology**.v.141, p.3898-3907.2000.
- AUGER, J., KUNSTMANN, J.M., CZYGLIK, F., JOUANNET, P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. **N. Engl. J. Med.** 332, 281–285. 1995.
- BAGGETT, B., ENGEL, L. L, BALDERAS, L., LANMAN, G., SAVARD, K. & DORFMAN, R. 1. Conversion of C<sup>14</sup>-testosterone to C<sup>14</sup>-estrogenic steroids by endocrine tissues. **Endocrinology** v.64, p. 600-608.1959.
- BALL, D. M.; HOVELAND, C. S.; LACEFIELD, G. D. Southern forages. 4th. (ed.). **Lawrenceville, Georgia: International Plant Nutrition Institute**, p. 322, 2007.

BANCO DO NORDESTE, **Informe Rural Etene**, n 1, 2012.

BARBOSA, L.P.; OLIVEIRA R.L.; SILVA T.M.; JESUSI.B.; GARCEZ NETO, A.F.; BAGALDO, A.R. Morfometria testicular de cabritos alimentados com óleo de licuri (*Syagrus coronata*) **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.64, n.4, 2012.

BEZERRA F.S.B.; GARCÍA H.A.; ALVES H.M.; OLIVEIRA I.R.S.; SILVA A.E.; TEIXEIRA M.M.G.; BATISTA, J.S. Trypanosoma vivax nos tecidos testicular e epididimário de ovinos experimentalmente infectados. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n.12, p.575-582, 2008.

BIELLI, A.; KATZ, H.; PEDRANA, G.; GASTEL, M.T.; MORÑA, A.; CASTRILLEJO, A.; LUNDEHEIM, N.; FORSBERG, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Nutritional management during fetal and postnatal life, and the influence on testicular stereology and Sertoli cell numbers in Corriedale ram lambs. **Small Ruminant Research**, v.40, p.63-71, 2001.

BLACHE, D.; CHAGAS, L.M.; BLACKBERRY, M.A.; VERCOE, P.E.; MARTIN, G.B. Metabolic factors affecting the reproductive axis in male sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 120, p.1-11, 2000.

BURTON JL, WELLS M. The effect of phytoestrogens on the female genital tract. **J ClinPathol** v.55, p.401-7. 2002.

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

CANTERO, A.; SANCHA, J.L.; FLORES, J.M.; RUSSELL, A.; GONZALEZ, T. Histopathological changes in the reproductive organs of manchego ewes grazing on lucerne. **Zentralbl Veterinarmed A**; v.43, p. 325-30. 1996.

CARDOSO, F.M.; QUEIROZ, G.F. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium and daily sperm production of Brazilian hairy rams. **Animal Reproduction Science**, v. 17, p. 77-88, 1988.

CAVALCANTE, J. M. M.; BRASIL, O. O.; OLIVEIRA, R. V.; PESSOA, A, W. P.; ARAÚJO, A. A., NUNES, J. F. Ultrassonografia testicular em caprino com degeneração testicular associado a lesões escrotais: Relato de caso. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 08, n. 1, p. 54 - 72, 2014.

CHENG, C.Y. & MRUK, D.D. The Blood-Testis Barrier and Its Implications for Male Contraception. **Pharmacological Reviews**. v.64. p. 16 - 64. 2012.

CHERDSHEWASART W, SRIWATCHARAKUL S. Metabolic activation promotes estrogenic activity of the phytoestrogen-rich plant. **Maturitas**. v. 59128-36. 2008.

CLAPAUCH, R.; MEIRELLES, R.M.R.; JULIÃO, M.A.S.G.; LOUREIRO, C.K.C.; GIARODOLI, P.B.; PINHEIRO, S.A.; HARRIGAN, A. R.; SPRITZER, P.M.; PARDINI, D.P.; WEISS, R.V.; ATHAYDE, A.; RUSSO, L.A.; PÓVOA, L.C. Fitoestrogênios:

Posicionamento do Departamento de Endocrinologia Feminina da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM). **Arq Bras EndocrinolMetab** v. 46 n 6.p. 679. 2002.

CLULOW, J., JONES, R.C., HANSEN, L.A., MAN, S.Y. Fluid and electrolyte reabsorption in the ductuliefferentes testis. **J. Reprod. Fertil. Suppl.** v. 53, p.1–14. 1998.

CONCEA, DIRETRIZES DA PRÁTICA DE EUTANÁSIA DO CONCEA, 2013, [http://www.comissao.ufra.edu.br/ceua/attachments/article/76/Diretrizes%20CONCEA%202013%20\(1\).pdf](http://www.comissao.ufra.edu.br/ceua/attachments/article/76/Diretrizes%20CONCEA%202013%20(1).pdf). acessado em 15 de agosto de 2014.

COSTA, D.S.; PAULA, T.A.R. Espermatogênese em mamíferos. **Scientia**, v.4, n. 1/2, p. 53-72, 2003.

COX, R. I.; & BRADEN.A.W.H.The metabolism and physiological effects of phytoestrogens in livestock.**Proc. Aust. Soc. Anim.** v. 10, p. 122. 1974.

CRABO, B. Studies on the composition of epididymal content in bulls and boars.**Acta Vet. Scand.** v. 6, n 8–94. 1965.

CUNNINGHAM, J.G. Tratado de fisiologia veterinária. 2.ed. Rio de Janeiro: **Ed. Guanabara**, p.528, 1999.

DETMANN, E.; SOUSA, M.A.; VALADARES FILHO, S.C.; QUEIROZ, A.C.; BERCHIELLI, T.T.; SALIBA, E.O.S.; CABRAL, L.S.; PINA, D.S.; LADEIRA, M.M. **Métodos para análises de alimentos**. 1ª ed. Visconde do Rio Branco: editora Suprema, p.214, 2012.

FERREIRA- DIAS, G.; BOTELHO, M.; ZAGRAJCZUK, A.; REBORDÃO, M.R.; GALVÃO, A.M.; PINTO BRAVO, P.; PIOTROWSKA-TOMALA, K.; SZÓSTEK, A.Z.; WICZKOWSKI, W.; PISKULA M.; FRADINHO M.J.; SKARZYNSKI D.J. Coumestrol and its metabolite in mares' plasma after ingestion of phytoestrogen-rich plants: Potent endocrine disruptors inducing infertility. **Theriogenology**.v.80, p. 684–692. 2013.

FISHER, C. R.; GRAVES, K. H.; PARLOW, A. F.; SIMPSON, E. R. Characterization of mice deficient in aromatase (ArKO) because of targeted disruption of the cyp19 gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. Medical Sciences. Vol. 95, pp. 6965–6970. 1998.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Acesso em 07.07.2015. **STATISTICS DIVISION**, 2013. Disponível em <http://faostat3.fao.org>.

FRANÇA, L.R.; RUSSELL, L.D.The testis of domestic animals.In: MARTÍNEZ-GARCÍA, F. & REGADERA, J. (ed.). **Male reproduction: a Multidisciplinary Overview**. España: Churchill Communications Europe España, 197-219, 1998.

FRANÇA, L.R.; RUSSELL, L.D.The testis of domestic animals.In: Regadera, J.; Martinez-Garcia, R. (Eds.) **Male reproduction: A multidisciplinary overview**. Madrid: **Churchill Livingstone**, p.197-219. 1998.

FRANKE, A.A., L.J. CUSTER., C.M. CERNA AND K.K. NARALA. Quantification of phytoestrogens in legumes by HPLC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v.42, n.9, p. 1905-1913, 1994.

GIST, D. H.; BRADSHAW, S.; MORROW, C. M.K.; CONGDON J.D.; HESS, R. A. Estrogen response system in the reproductive tract of the male turtle: An immunocytochemical study. **General and Comparative Endocrinology**.v.151, n.1, 2006.

GRISWOLD, M.D. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. **Cell & Developmental Biology**.v.9. p.411-416. 1998.

GRUBER C.J.; TSCHUGGUEL W.; SCHNEEBERGER C.; HUBER, J.C. Production and actions of estrogens.**N. Engl. J. Med.**, v. 346, p. 340–352, 2002.

HESS, R.A., BUNICK, D., LEE, K.H., BAHR, J., TAYLOR, J.A., KORACH, K.S..A role for oestrogens in the male reproductive system.**Nature** v. 390, p. 509–512. 1997a.

HESS, R.A., SPERMATOGENESIS, overview. In: Knobil, E., Neill (**Eds.**), **The Physiology of Reproduction, Raven Press Ltd.**, New York, n. 4, pp. 39–545, 1999.

HESS, R.A., BUNICK, D., LUBAHN, D.B., ZHOU, Q., BOUMA, J., Morphologic changes in efferent ductules and epididymis in estrogen receptor-alpha knockout mice. **J. Androl.** v. 21, p.107–121. 2000.

HESS, R.A., BUNICK, D., BAHR, J. Oestrogen, its receptors and function in the male reproductive tract — a review.**Molecular and Cellular Endocrinology**. 2001.

HEWITT, S.C. &KORACH, K.S. Oestrogen receptor knockout mice: roles for estrogen receptors alpha and beta in reproductive tissues. **Reproduction** n.125, p. 143-149. 2003.

HOCHEREAU-de-REVIERS, M.T. et al.Comparisons of endocrinological and testis parameters in 18-month-old Ile-de-France and Romanov rams.**Domestic Animal Endocrinology**, v.7, n.1, p.63-73, 1990.

HOFFMAN, R.R. Anatomy of the gastro-intestinal tract. In: CHURCH, D.C.(Ed.). **The ruminant animal: digestive physiology and nutrition**. Portland, O&B Books, Inc.,p.14-43, 1988.

HONG, Y.; WANG, S.; HSU, C.; LIN, B.; KUO, Y.;HUANG, C. Phytoestrogenic Compounds in Alfalfa Sprout (*Medicago sativa*) beyond Coumestrol.**J. Agric. Food Chem.** v. 59, n 1.P131-137, 2011.

ILIO, K.Y., HESS, R.A., Structure and function of the ductuliefferentes: a review. **Microsc. Res. Technol.** v. 29, p. 432–467. 1994.

JACOB, D.A.; TEMPLE, J.L.; PATISAUL, H.B.; YOUNG, L.J.; RISSMAN., E.F. Coumestrol antagonizes neuroendocrine actions of estrogen via the estrogen receptor  $\alpha$ . **Exp. Biol. Med.** n. 226, p. 301-306. 2001.

KULA, K.; Walczak-Jędrzejowska, R.; Słowikowska-Hilczer, J.; Oszukowska, E. Estradiol enhances the stimulatory effect of FSH on testicular maturation and contributes to precocious initiation of spermatogenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**.v.178p.89–97.2001.

KRONENBERG, F.; FUGH-BERMAN, A. Complementary and alternative medicine for menopausal symptoms: a review of randomized, controlled trials. **Ann. Intern. Med.**, v. 137, p. 805–813, 2002.

KUIPER G.G.J.M.; LEMMEN, J.G.; CARLSSON, Bo.; CORTON, J.C.; SAFE, S.H.; VAN DER SAAG, P.T.; BURG, B.V.D.; GUSTAFSSON, J.A. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor  $\beta$ . **Endocrinology**, v.139, p.4252–63. 1998.

LENIS, Y.Y.; GUTIÉRREZ, M.T.; TARAZONA, A.M. Efectos de los fitoestrógenos en la reproducción animal. **Revista Facultad Nacional de Agronomía**, v. 63, p.5555-5565, 2010.

LEVALLET, J.; MITTRE, H.; DELARUE, B.; CARREAU, S. Alternative splicing events in the coding region of the cytochrome P450 aromatase gene in male rat germ cells. **J Mol Endocrinol**. V.20. n. 3, p. 305-12. 1998.

LOPER, G.M.; HANSON, C. H. ; GRAHAM, J. H. Coumestrol content of alfalfa as affected by selection for resistance to foliar diseases. **Crop Sci**. v. 7, p.189. 1967.

LUBAHN, D.B., MOYER, J.S., GOLDING, T.S., COUSE, J.F., KORACH, K.S., SMITHIES, O. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. **Proc. Natl. Acad. Sci**. v.90, p.11162–11166. 1993.

LUNSTRA, D.D.; SCHANBACHER, B.D. Testicular function and Leydig Cell ultrastructure in long-term bilaterally cryptorchid rams. **Biology of Reproduction**, v.38, p.211-220, 1988.

MADRUGA, M.S.; SOUSA, W. H.; ROSALES, M. D.; CUNHA, M. D. G.; RAMOS, J. L. F. Qualidade da carne de cordeiros Santa Inês terminados em diferentes dietas. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 344, n.1, p. 309-315, 2005.

MAIA, M.S.; MEDEIROS, I.M.; LIMA, C.A.C. Características reprodutivas de carneiros no Nordeste do Brasil: parâmetros seminais. **Rev. Bras. Reprod. Anim**. v.35, n.2, p.175-179, 2011.

MANIATIS, T.; REED, R. An extensive network of coupling among gene expression machines. **Nature**. n.416, p. 499-506. 2002.

MARTIN G.B; WALKDENBROWN, S. Nutritional influences on reproduction in mature male sheep and goat. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, n. 49, p.437-449, 1995.

MARTIN, G.B.; TJONDRONEGORO, S.; BLACKBERRY, M.A. Effects of nutrition on testicular size and the concentrations of gonadotropins, testosterone and inhibin in plasma of mature male sheep. **Journal Reprod. Fert.**, v.101, n.1, p.121-128, 1994.

MCCLURE, K.E.; VAN KEUREN, R.W.; ALTHOUSE, P.G. Performance and carcass characteristics of weaned lambs either grazed on orchardgrass, ryegrass, or alfalfa or fed all-concentrate diets in drylot. **J. Anim. Sci.**, v. 72, p.3230-3237, 1994.

MCMANUS, C.; SASAKI, L.C.B.; LOUVANDINI, H.; DIAS, L.T.; TEIXEIRA, R.A.; ALVES, J.M.; LUCCI, C.M.; MARSIAJ, P.H.P.; MURATA, L.S. Avaliação histológica dos testículos de ovinos da raça Santa Inês nascidos em diferentes estações do ano. **Ciência Rural**, v.40, n.2, p. 396-402, 2010.

MEISTRICHTH, M.L., HUGHES, T.J., BRUCE, W.R., Alteration of epididymal sperm transport and maturation by oestrogen and testosterone. **Nature** v.258, 145–147. 1975.

MENDIS-HANDAGAMA S.L.M.C.; WATKINS, P.A.; GELBER, S. J & SCALLEN, T.J. The effect of chronic luteinizing hormone treatment on adult rat Leydig cells, **Tissue Cell**, v.30. 1998a.

MENDIS-HANDAGAMA S.L.M.C.; ZIRKIN, B.R.; EWING, L.L.; Comparasion of the testis interstitium with testosterone secretion in hamster, rat and guinea pig testes perfused *in vitro*, **Am j anat**,v.18, p.1 1988.

MONTEIRO, A. L. G.; CORSI, M.; CARVALHO, D. D. Frequências de corte e intensidade de desfolha em duas cultivares de alfafa (*Medicago sativa* L.) peso, número, produção estacional e dinâmica de aparecimento das brotações basilares. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 28, n.3, p.446-452, 1999.

MORAVCOVÁ, J.; KLEINOVÁ, T.; LOUCKA, R.; TYROLOVÁ, I.; KVASNICKA, F.; DUŠEK, M.; CEROVSKÝ, M.; MATUCHA, P. Coumestrol content of alfalfa following ensilage. **Animal Feed Science and Technology**. v. 115, p. 159–167, 2004.

MOSELNAN J.; POLMAN, R.; DIJKEMA, R. ER  $\beta$ : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. **FEBS Lett.** 392:49-53. 1996.

MURTA, D.V.F. A Organização Celular dos Testículos de Mamíferos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. n. 20, 2013.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. Nutrient requirements of small ruminants. Washington, D.C.: **National Academy Press**, 362p. 2007.

NITTA, H.; BUNICK, D.; HESS, R.A.; JANULIS, L.; NEWTON, S.C.; MILLETTE, C.F.; OSAWA, Y.; SHIZUTA, Y.; TODA, K.; BAHR, J.M. Germ cells of the mouse testis express P450 aromatase. **Endocrinology**.v.132, n.3, p. 1396-401. 1993.

NUERNBERG, N. J. Técnicas de produção de alfafa. In: PEIXOTO, A. M.; MOURA, J. C.; FARIA, V. P. (Eds.). **CONGRESSO BRASILEIRO DE PASTAGEM, Anais...** FEALQ, p. 145-160. 1986.

O'DONNELL, L.; ROBERTSON, K.M.; JONES, M.E.; SIMPSON, E.R. Estrogen and spermatogenesis. **Endocrine Rev.** 22, 289–318. 2001.

PACHECO, A.; QUIRINO, C.R. Comportamento sexual em ovinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v.34, n.2, p.87-97, 2010.

PARENTE, H.N.; MACHADO, T.M.M.; CARVALHO, F.C.; GARCIA, R.; ROGÉRIO, M.C.P.; BARROS, N.N.N.; ZANINE, A.M.; Desempenho produtivo de ovinos em confinamento alimentados com diferentes dietas. **arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, n.2, p.460-466, 2009.

PELLINIEMI, L.J.; KUOPIO, T.; FROJDMAN, K. The cell biology and function of the fetal Leydig cell. In: PAYNE, A.H.; HARDY, M.P.; RUSSEL, L.D. (Ed.). *The Leydig Cell*. Viena: **Cache River Press**, p. 143-157. 1996.

PÉREZ-RIVERO, J.J.; MARTINEZ-MAYA, J.J.; PÉREZ- MARTINEZ, M.; AGUILAR-SETIEN, A.; GARCIA-SUAREZ, M.D.; SERRANO, H. Phytoestrogen treatment induces testis alterations in dogs. Potential use in population control. **Vet Res Commun.** v. 33. p. 87-95. 2009.

PISSELET C.; PERREAU, C.; HOCHEREAU de REVIERS, M.T. Relationship between rete testis fluid secretion and testicular structure in the ram. **Reprod. Nutr. Dévelop.**, v. 24, n. 4, p. 483-486. 1984.

QUEIROZ, G.C.; CARDOSO, F.M. Avaliação histológica do rendimento da espermatogênese de carneiros deslançados adultos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.13, n.2, p.99-108, 1989.

RABINOWITZ, J. L. The biosynthesis of radioactive  $17\beta$ -estradiol. II. Synthesis by testicular and ovarian homogenates, **Arch. Biochem. Biophys.** v. 64, p. 285-290, 1956.

REGADAS FILHO, J.G.L.; PEREIRA, E.S.; PIMENTEL, P.G.; VILLARROEL, A.B.S.; MEDEIROS, A.N.; FONTENELE, R.M. Body composition and net energy requirements for Santa Ines lambs. **Small Ruminant Research.** v. 109, p. 107– 112, 2013.

RESENDE, K.T., SILVA, H.G.O., LIMA, L.D., TEIXEIRA, I.A.M.A. Avaliação das exigências nutricionais de pequenos ruminantes pelos sistemas de alimentação recentemente publicados. **Rev. Bras. Zootec.** v. 37, 161–177, 2008.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, G. L.; VIGUERAS-VILLASEÑOR, R. M.; MILLÁN, S.; MORAN, N.; TREJO, R.; NATHANIELSZ, P. W.; LARREA, F.; ZAMBRANO, E. Maternal protein restriction in pregnancy and/or lactation affects seminiferous tubule organization in male rat offspring. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v.3, n.5, p. 1-6, 2012.

ROSELLI, C.E., ABDELGADIR, S.E., RESKO, J.A. Regulation of aromatase gene expression in the adult rat brain. **Brain. Res. Bull.** v. 44, p. 351–357. 1997.

ROSER, J.F. Regulation of testicular function in the stallion: An intricate network of endocrine, paracrine and autocrine systems. **Animal Reproduction Science**. n. 107, p. 179-196, 2008.

ROSSELLI, M., K. REINHART, B. IMTHURN, P.J. KELLER, AND R.K. DUBEY. Cellular and biochemical mechanisms by which environmental oestrogens influence reproductive function. **Hum. Reprod.** v.6. p. 332-350. 2000.

RUGGIERO, R.J.; LIKIS, F.E. Estrogen: physiology, pharmacology, and formulations for replacement therapy. **J. Midwifery Womens Health**, v. 47, p. 130–138, 2002.

RUSSEL, L.D.; FRANÇA, L.R. Building a testis. **Tissue Cell**, v.27, n.2, p. 129-147, 1995.

SERRANO, H.; PEREZ-RIVERO, J.J.; AGUILAR-SETIEN, A.; DE PAZ, O.; AND VILLA-GODOY, A. Vampire bat reproductive control by a naturally occurring phytoestrogen. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, p. 470–472, 2007.

SETCHELL, B.P. Male reproductive organs and semen. In: CUPPS, P.T. (Ed) **Reproduction in Domestic Animals**. New York: Academic Press, p. 221-249. 1991.

SHARPE, R.M. Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. (eds.). **The physiology of reproduction**, 2 ed. New York: Raven Press, p.1363-1434, 1994.

SHARPE, R.M., SKAKKEBAEK, N.E. Are estrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract. **Lancet**.n.341, p. 1392–1395. 1993.

SHEMESH M, LINDNER HR, AYALON N. Affinity of rabbit uterine oestradiol receptor for phyto-oestrogens and its use in a competitive protein binding radioassay for plasma coumestrol. **J ReprodFertil**, v.29, p. 1–9. 1972.

SHORE L.S.; KAPULNIK, Y.; GUREVICH, M.; WININGER, S.; BADAMY, H.; SHEMESH, M. Induction of Phytoestrogen Production in *Medicago Sativa* Leaves by Irrigation with Sewage Water. **Environmental and Experimental Botany**, v. 35, n. 3, pp. 363- 369, 1995.

SILVA JUNIOR, V. A. et al. Neonatal treatment with naloxone increases the population of Sertoli cells and sperm production in adult rats. **Reproduction, Nutrition, Development**, v. 46, n. 2, p. 157-166, 2006.

SILVA, D.R.; MOURA, M.I.; MIGUEL, M.P.; SILVA, L.A.F.; MATOS, M.P.C.; MOURA, V.M.B.D. Avaliações Histológica e Histomorfométrica de Testículos de Bovinos com Dermatite Digital. **Ciênc. anim. bras.** v.14, n.3, p. 391-398, 2013.

SILVA, N.V.; FRAGA, A.B.; FILHO, J.T.A.; NETO, C.C.C.; SILVA, F.L.; COSTA, P.P.S.; JÚNIOR, W.B.L. Caracterização Morfométrica de Ovinos Deslanados Cabugi e Morada Nova. **Rev. Cient. Prod. Anim.** v. 9, n.1, 2007.

SIMPSON, E.R.; MAHENDROO, M.S.; MEANS, G.D.; KILGORE, M.W.; HINSHELWOOD, M.M.; GRAHAM-LORENCE, S.; AMARNEH, B.; ITO, Y.; FISHER, C.R.; MICHAEL, M.D.; MENDELSON, C.R.; BULUN, S.E. Aromatase cytochrome



P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis, **Endocr.Rev.** v.15, p.342–355. 1994.

SNOWDER GD, STELLFLUG JN, VAN VLECK LD. Heritability and repeatability of sexual performance scores of rams. **J AnimSci**, v.80, p.1508-1511, 2002.

SOUSA, F.M.L. Estudo das Características do Aparelho Reprodutivo, Epitélio Seminífero e Mapas Eletroforéticos Bidimensionais do Plasma Seminal de Carneiros Morada Nova. Fortaleza: UFC, 2010. **Dissertação (Mestrado em zootecnia)**. Centro de Ciências Agrárias. 2010.

SOUZA, C.E.A.; MOURA, A.A.A.; LIMA, A.C.B.; CIRÍACO, A.L.T. Desenvolvimento testicular, idade à puberdade e características seminais em carneiros da raça Santa Inês no estado do Ceará. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, **Anais**. SBZ, v. 37, p. 160. 2000.

**STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS**. User's guide: statistics. versão 8.1.4. ed., v. 2, Cary: SAS Institute, 1999.

TEUBER, L. R.; BRICK, M. A. Morphology and anatomy. In: HANSON, A. A.; BARNES, D. F. HILL JUNIOR, R. R. Alfalfa and alfalfa improvement. Madison: American Society of Agronomy, **Agronomy Monograph**, v. 29, p. 125-158. 1998.

TOPPARI, J.; LARSEN, J.C.; CHRISTIANSEN, P.; GIWERCMAN, A.; GRANDJEAN, P.; GUILLETTE JR.; JEGOU, B.; JENSEN, T.K.; JOUANNET, P.; KEIDING, N.; LEFFERS, H.; MCLACHLAN, J.A., MEYER, O., MULLER, J., RAJPERT-DE MEYTS, E., SCHEIKE, T., SHARPE, R.; SUMPTER, J.; SKAKKEBAEK, N.E. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. **Environ. Health Perspect.**v.104, p. 741–803. 1996.

WALDO, D.R.; JORGENSEN, N.A. Forages for high animal production: nutritional factors and effects of conservation. **J. Dairy Sci.**, v.64, n.8, p.1207, 1981.

WANG, G.S., S. KUAN., O.J. FRANCIS., G.M. WARE AND A.S. CARMAN. A simplified HPLC method for determination of phytoestrogens in soybean and its processed products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 38. n. 1, p. 185-190. 1990.

WEIHUA, Z.; ANDERSSON, S.; CHENG, E.R.; SIMPSON, M.; WARNER, J.A. GUSTAFSSON. Update on estrogen signaling. **FEBS Lett.**n.546, p. 17-24. 2003.

WHITTEN PL, PATISAUL HB. Cross-species and interassay comparisons of phytoestrogen action. **Environ Health Perspect.** v.109, p.5–20, 2001.

WHITTEN, P.L.; PATISAULL, H.B.; YOUNG, J. Neurobehavioral actions of coumestrol and related isoflavonoids in rodents. **Neurotoxicol. Teratol.** v. 24. p. 47-54. 2002.

WOCLAWEK-POTOCKA I, OKUDA K, ACOSTA TJ, KORZEKWA A, PILAWSKI W, SKARZYNSKI DJ. Phytoestrogen metabolites are much more active than phytoestrogens themselves in increasing prostaglandin F2 synthesis via prostaglanin

F2 synthase-like 2 stimulation in bovine endometrium. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**; v.78, p. 202–17. 2005.

WOTIZ, H. H., DAVIS, J. W. AND LEMAN, H. M. Steroid biosynthesis by surviving testicular tumor tissue. **J. Biol. Chem.** n.216, p. 677-687, 1955.

WROBEL, K.H.; REICHOLD, J.; SCHIMMEL, M. Quantitative morphology of the ovine seminiferous epithelium. **Annals of Anatomy**, v.177, p.1-14, 1995.

ZIEGLER, R.G. Phytoestrogens and breast cancer. **Am J ClinNutr**; v. 79, p. 183–4 2004.