

Análise histomorfométrica e estereológica de testículos em ratos pré-púberes submetidos ao estresse induzido por imobilização

Flávia Luciana Beltrame¹, Suzana de Fatima Paccola Mesquita¹ & Isabel Cristina Cherici Camargo²

¹ Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Geral. Campus Universitário-Rodovia Celso Garcia Cid, Pr 445, Km 380, CEP 86051-990, Caixa Postal 6001. Londrina-PR, Brasil. mesquita@uel.br

² Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências e Letras, Departamento de Ciências Biológicas, Campus de Assis-São Paulo, Brasil. camargo@assis.unesp.br

Abstract. Histomorphometric and stereological analysis of testis in prepubertal rats submitted to immobilization-induced stress. The fundamental purpose of this work was to investigate, through morphometrical and stereological analysis, the testis structure and the spermatogenesis process of sexually immature male rats, submitted to stress from the 15^o to the 45^o day of life. The animals (n=18) were randomly distributed in 2 groups: 1) control group, with animals without immobilization-induced stress; 2) experimental group, with animals submitted to immobilization-induced stress, for 45 minutes/day, inside a zinc tube. Following treatment, the testis were removed, weighed and submitted to the usual histological routine for the analysis in light microscopy. Histological and histomorphometric analysis were performed. The results demonstrated alterations in the morphometric and stereological analysis of the animals from the experimental group, with the reduction of body and testis weight, total testicular and parenchymal volume, volume occupied by the Leydig cells and reduction in the average of the diameters of the seminiferous tubules. The control group showed the presence of sperm in the totality of the tubular sections analyzed, while in the experimental group it was observed a low frequency or total absence of sperm on the lumen of the seminiferous tubules.

Key words: stress, immobilization, rats, testis, spermatogenesis.

Resumo: A principal proposta deste estudo foi investigar, através de análises morfológicas e estereológicas, a estrutura dos testículos e o processo de espermatogênese de ratos machos imaturos, submetidos a estresse entre o 15^o e 45^o dias de vida. Os animais (n=18) foram aleatoriamente distribuídos em dois grupos: 1) grupo controle, com animais não submetidos à indução de estresse por imobilização; 2) grupo experimental, com animais submetidos à indução de estresse por imobilização, por 45min/dia, dentro de um tubo de zinco. Em seguida ao tratamento, os testículos foram removidos, pesados e submetidos à usual rotina histológica para análises em microscopia de luz. Análises histológicas e histomorfométricas foram realizadas. Os resultados demonstraram alterações nas análises morfológica e estereológica nos animais do grupo experimental, com redução dos pesos do corpo e dos testículos, do volume testicular total e do parênquima, volume ocupado pelas células de Leydig e redução no diâmetro médio dos túbulos seminíferos. No grupo controle, observou-se presença de esperma na totalidade das seções tubulares analisadas, enquanto que no grupo experimental registrou-se uma baixa frequência ou total ausência de esperma no lúmen dos túbulos seminíferos.

Palavras-chave: stress, imobilização, ratos, testículos, espermatogênese.

INTRODUÇÃO

O estresse é um distúrbio decorrente das pressões do dia-a-dia e atinge um grande número de pessoas cuja qualidade de vida vem sendo prejudicada. O estresse é considerado como uma reação do organismo, com componentes físicos e/ou psicológicos, causada pelas alterações psicofisiológicas que ocorrem quando a pessoa se confronta com uma situação que, de um modo ou de outro, a irrite, amedronte, excite, confunda ou mesmo que a faça imensamente feliz (LIPP, 2003).

A reação inadequada do indivíduo às exigências no seu ambiente de vida desenvolve um desgaste anormal no seu organismo o qual passa a apresentar uma incapacidade crônica de tolerar, superar ou se adaptar, com lesões desde intranqüilidade até esgotamento mental (VIEIRA & SCHÜLLER SOBRINHO, 1995).

O termo "estresse" foi introduzido por SELYE (1936) para designar uma síndrome produzida por vários agentes nocivos, vinculada ao processo de adaptação. O autor concluiu que um organismo estaria tão bem adaptado quanto melhor enfrentasse e suportasse o estresse.

A resposta do organismo ao estresse envolve interações complexas entre o sistema nervoso central, endócrino, imune e comportamental que respondem com ajustes em importantes funções com o objetivo de restabelecer a homeostasia.

Uma diversidade de estímulos (exposição ao éter e procedimentos cirúrgicos, choques elétricos, nadar em águas frias, captura de animais selvagens, exposição a um comportamento desconhecido, barulho e imobilização forçada) aplicados em modelos animais, por curtos ou longos períodos, vem sendo utilizada para investigar a resposta dos eixos hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e/ou hipotálamo-pituitária-gônada ao estresse (ALMEIDA *et al.*, 1998a; BHARIHOKE *et al.*, 2000; ALMEIDA *et al.*, 2000a; GUYTON & HALL, 2002; RAI *et al.*, 2003).

Sabe-se que a atuação dos vários hormônios reguladores da adaptação do organismo ao estresse, incluindo as beta-endorfinas e corticosteróides adrenais modula direta ou indiretamente as funções reprodutivas (WASSER *et al.*, 1993; URDAMPILLETA & FERNANDEZ, 1999). Vários estudos em animais têm

demonstrado que a inibição dos hormônios gonadotróficos pode causar problemas de infertilidade ou baixa eficiência reprodutiva (HENNESSY & WILLIAMSON, 1983; TSUMA *et al.*, 1996, 1998); anestro, ciclo estral irregular, cistos ovarianos, puberdade tardia, mortalidade embrionária e baixa taxa de ovulação (SCHOELTEN & LIPTRAP, 1978; BARD *et al.*, 1982; HENNESSY & WILLIAMSON, 1983; LOPEZ-CALDERON *et al.*, 1990; VARLEY, 1991; TSUMA *et al.*, 1998).

A imobilização é uma das técnicas usadas para induzir estresse em ratos e foi utilizada por BAJKOVA (1988), BHARIHOKE *et al.* (2000) ALMEIDA *et al.* (2000b) e RAI *et al.* (2003). Os autores observaram alterações nas funções reprodutivas causadas pelo estresse, especialmente em animais púberes com conseqüente efeito na maturidade sexual. MAZARO & LAMANO-CARVALHO (2001) evidenciaram o atraso na maturação testicular e epididimária durante a instalação da puberdade, em ratos expostos ao estresse neonatal (manipulação neonatal e privação materna).

Assim sendo, é de muito interesse o conhecimento dos efeitos adversos provocados pelo estresse, especialmente em relação à reprodução. O presente estudo visa avaliar através da morfometria e estereologia, os testículos de ratos submetidos experimentalmente ao estresse por imobilização, do 15^o ao 45^o dia de idade.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 18 ratos machos albinos (*Rattus norvegicus albinus*), pertencentes à linhagem *Wistar*, resultantes do acasalamento de ratos machos e fêmeas (1:2) oriundos do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Londrina. Os filhotes machos, aos 15 dias de vida, constituíram os grupos controle (C) e experimental (Ex), cada um composto por 9 animais.

Os animais do grupo controle (C) foram mantidos em suas gaiolas em ambiente adequado (22° C e 12 horas de ciclo claro/escuro), recebendo água e ração *ad libitum*.

Os animais do grupo experimental (Ex) foram imobilizados diariamente, do 15^o ao 45^o dia de vida, no período da manhã, individualmente, durante 45 minutos, dentro de um tubo de folha de zinco com

4 ou 5 cm de diâmetro e comprimento regulável de acordo com o comprimento do animal (Fig.1).



Figura 1. Tubos confeccionados com folha de zinco para imobilização dos animais do grupo experimental (Ex).

Os animais foram pesados e sacrificados no 46º dia de vida (n= 9 ratos/grupo). Todos os procedimentos realizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de ética em experimentação animal /UEL (Reg. nº 33/05). Os testículos e epidídimos foram coletados, pesados e fixados em solução alcoólica de Bouin. Posteriormente, procedeu-se às etapas de desidratação, diafanização e inclusão em resina plástica (Paraplast; Oxford-Labware, St. Louis– MO, USA). Secções histológicas de 5mm de espessura foram coradas através da técnica de Hematoxilina e Eosina (HE).

Análise morfométrica

A análise morfométrica dos testículos consistiu na determinação dos pesos testiculares absolutos e relativos, na determinação dos diâmetros médios dos túbulos seminíferos e no cálculo do volume testicular total.

Para o cálculo do diâmetro tubular, em micrômetros, foram medidas 30 secções transversais de túbulos seminíferos, por testículo, com auxílio de micrômetro ocular acoplado ao microscópio de luz binocular, em aumento final de 100 X. Os cortes foram rastreados, e as secções de túbulos seminíferos foram medidas de forma seqüencial, evitando-se a análise repetida dos

campos. O volume testicular total foi calculado subtraindo-se o peso da albugínea e do mediastino testicular do peso bruto do testículo, ou seja, o equivalente a 6,5% do peso do testículo (FRANÇA, 1991).

Análise estereológica

Os volumes testiculares, do parênquima e do tecido intersticial foram obtidos a partir das densidades (porcentagens) no volume destes componentes nos testículos. As densidades dos volumes foram calculadas com a utilização de ocular integradora de 100 pontos, num aumento final de 100 vezes, totalizando a contagem de 3000 pontos para cada testículo. Os valores, em termos percentuais, do parênquima e do tecido intersticial, foram assim estabelecidos.

Além disso, foi calculado o volume testicular ocupado pelas células de Leydig, com o auxílio de ocular integradora de 25 pontos acoplada ao microscópio de luz, num aumento final de 1000 vezes, totalizando 1000 pontos por testículo.

Análise histológica

Para a análise histológica as secções histológicas dos testículos dos animais de ambos os grupos foram analisadas em microscópio óptico e foram computadas as freqüências dos tipos básicos de células da linhagem germinativa em 50 secções tubulares por testículo examinado de acordo com LEBLOND & CLERMONT (1952) e DYM & CLERMONT (1970).

Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o programa computacional S.A.S (Statistical Analysis System) GraphPad InStat. Os dados foram submetidos ao teste não-paramétrico de Mann-Whitney, com nível de significância igual a 5%, com o objetivo de comparar as alterações morfométricas e estereológicas entre os animais dos grupos controle e experimental.

As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*), de significância moderada quando $p < 0,01$ (**), e altamente significativas quando $p < 0,001$ (***)

RESULTADOS

A Figura 2 apresenta a variação da média de peso corporal, expresso em gramas (g), durante o tratamento (15^o ao 45^o dia de vida), dos grupos controle (C) e experimental (Ex). A análise dos dados permitiu verificar que houve uma diminuição de peso corpóreo estatisticamente significativa do grupo experimental (Ex) em relação ao grupo controle (C) ao final do tratamento. Constatou-se uma redução de 18% no peso corporal dos animais estressados por imobilização.

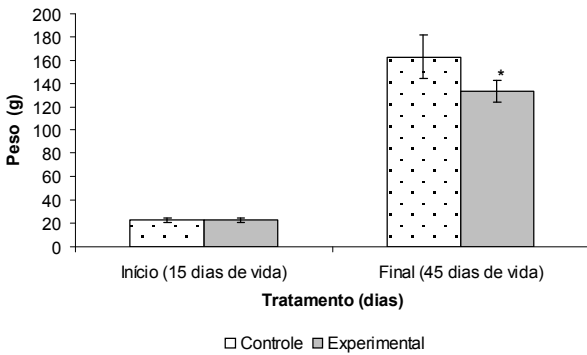


Figura 2. Variação de peso corporal, dos grupos controle (C) e experimental (Ex), durante o tratamento.

A análise dos dados morfométricos dos túbulos seminíferos testiculares permitiu verificar que houve uma redução significativa do peso testicular dos animais do grupo experimental (Ex) em relação ao grupo controle (C) (Tab. 1). Foi observada uma redução de 23% no peso testicular dos animais estressados por imobilização. Quanto ao diâmetro tubular, os animais estressados também apresentaram valor significativamente menor que os do grupo controle (Tab. 1).

A análise dos dados estereológicos dos túbulos seminíferos testiculares mostrou que houve uma redução significativa nos valores médios do volume testicular total e volume do parênquima nos ratos submetidos ao estresse por imobilização em relação aos animais do grupo controle (Tab. 1). Quanto ao volume testicular ocupado pelas células de Leydig, o grupo estressado por imobilização apresentou valor significativamente menor que o grupo controle (Tab. 1).

Tabela 1. Médias relativas aos parâmetros estereológicos e morfométricos dos grupos controle (C) e experimental (Ex), (n = 9 ratos/grupo; Média ± Desvio padrão).

PARÂMETROS	GRUPO CONTROLE	GRUPO EXPERIMENTAL
Peso testicular (g)	0,87 ± 0,08	0,67 ± 0,05 ***
Volume testicular total (mL)	0,81 ± 0,08	0,62 ± 0,04 ***
Volume túbulos seminíferos (mL)	0,4647 ± 0,0674	0,3194 ± 0,0336 ***
Volume tecido intersticial (mL)	0,3446 ± 0,0473	0,3037 ± 0,0420
Volume Células de Leydig (mL)	0,0258 ± 0,0040	0,0154 ± 0,0027 ***
Diâmetro médio (µm)	203,78 ± 7,51	192,19 ± 5,34 ***

Análise Histológica

O epitélio seminífero dos testículos dos animais do grupo experimental (Ex) mostrou-se organizado e exibiu, ao microscópio de luz, características peculiares ao epitélio padrão de testículo de ratos normais de idade correspondente (C).

A freqüência dos tipos básicos de células da linhagem germinativa computada em 450 secções tubulares examinadas não apresentou diferença significativa em relação à do grupo controle (Tab.2).

Tabela 2 - Freqüência dos tipos básicos de células da linhagem germinativa, em termos percentuais, por 450 secções tubulares examinadas em ratos dos grupos controle (C) e experimental (Ex), (n = 9 ratos/grupo; Média ± Desvio padrão).

TIPOS CELULARES	GRUPOS	
	C	Ex
Espermatogônias	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
Espermatócitos	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
Espermátides jovens	73,20 ± 6,42	70,67 ± 8,94
Espermátides tardias	42,00 ± 9,27	45,78 ± 9,56
Espermatozoides	99,6 ± 0,45	89,1 ± 10,19
Binucleares	0,00 ± 0,00	4,67 ± 5,00
Multinucleares	0,00 ± 0,00	0,89 ± 1,45
Células de Sertoli	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00

Ambos os grupos apresentaram, na totalidade das secções analisadas, espermatogônias, espermatócitos primários nas fases de pré-leptóteno/leptóteno e paquíteno e células de Sertoli. As espermátides encontravam-se próximas à luz do túbulo seminífero. Nos testículos dos animais do grupo experimental constatou-se a presença de formações binucleadas e multinucleadas de espermátides em fases precoces da espermiogênese (Fig. 3).

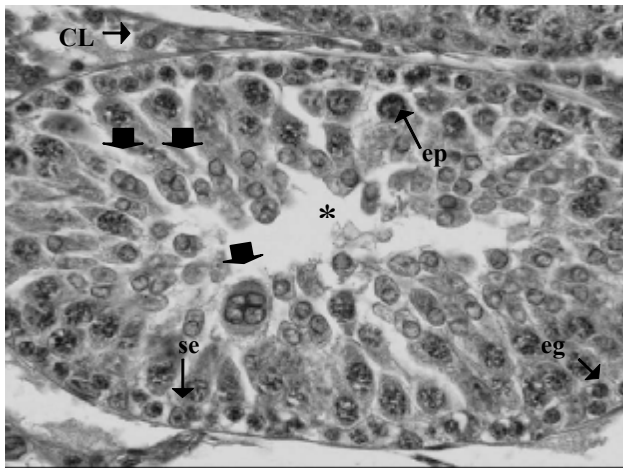


Figura 3. Fotomicrografia de secção tubular de rato do grupo Experimental. Formações binucleares e multinucleares de espermátides são constantes nesse grupo (setas largas). Espermatogônias (eg); espermatócito primário (ep); célula de Sertoli (se); célula de Leydig (CL). Observar ausência de espermatozoides no lúmen tubular (*). Coloração HE. 400X.

Na região central de alguns túbulos (lúmen) puderam ser observados os espermatozoides, produto final do processo de espermiogênese. O grupo controle (C) apresentou espermatozoides na totalidade das secções analisadas, as quais se assemelhavam às de um animal púbere (Fig. 4). Ainda que os animais do grupo experimental (Ex) apresentassem alguns túbulos contendo espermatozoides, estes se apresentaram em quantidade reduzida (Fig. 5).

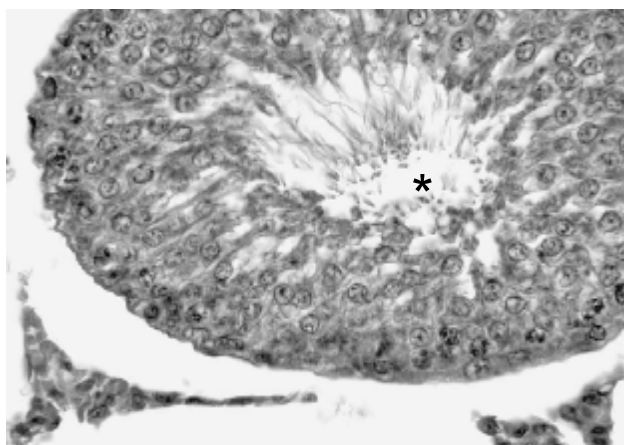


Figura 4. Fotomicrografia de secção tubular de rato do grupo Controle (C). Lúmen tubular com espermatozoides (*). Coloração HE. 450X.

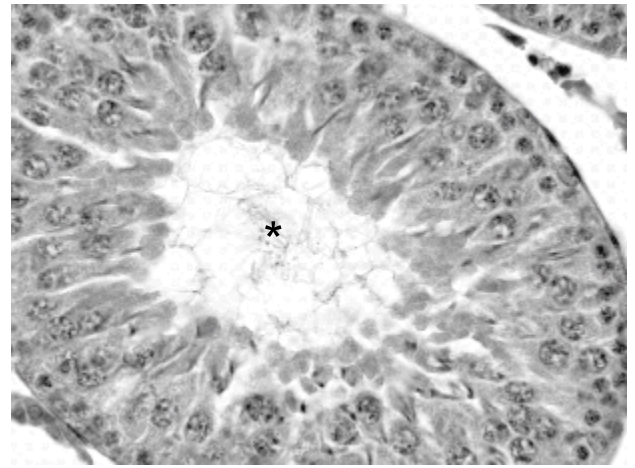


Figura 5. Fotomicrografia de secção tubular de rato do grupo Experimental. Lúmen tubular com quantidade escassa de espermatozoides (*). Coloração HE. 400X.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Muitas formas de estresse podem afetar a fertilidade masculina e a reprodução. Há evidências de que fatores ambientais, quer sejam químicos, físicos ou emocionais, podem adversamente afetar as funções testiculares em humanos (STEINBERGER, 1978).

A literatura mostra que em ratos adultos ocorre um déficit na performance sexual em resposta a estímulos estressores aplicados durante as duas primeiras semanas de vida (BREIGEIRON *et al.*, 2003). Segundo os autores, nesta fase, o eixo HPA e as vias neuronais cerebrais não estão amadurecidos, e acredita-se que alterações ocorridas neste período possam se refletir na vida adulta. MAZARO & LAMANO-CARVALHO (2001) evidenciaram o atraso na maturação testicular e epididimária durante a instalação da puberdade em ratos expostos ao estresse neonatal (manipulação neonatal e privação materna). ALMEIDA *et al.* (2000b) observaram em seus estudos que, após prolongado estresse por imobilização desde a pré-puberdade (40 dias de idade) até a puberdade (55 dias de idade), ratos machos apresentaram aumento da performance sexual mas redução da fertilidade quando atingiram a maturidade sexual.

Não há dúvidas, atualmente, que o estresse pode interferir nas funções reprodutoras uma vez que a atuação dos hormônios reguladores da adaptação do organismo ao estresse modula direta ou indire-

tamente as funções reprodutoras. Dessa forma, as possíveis alterações causadas pelo estresse se instalarão quanto mais cedo ocorrer a estimulação aversiva.

ALMEIDA *et al.* (1998b), imobilizando ratos machos pré-púberes (40 dias de idade) por 6h/dia durante 60 dias, observaram redução no peso corporal, mas nenhuma alteração significativa no peso testicular. Em contrapartida, BAJKOVA (1988) observou redução no peso dos órgãos reprodutivos (testículos, epidídimos e vesículas seminais) em ratos machos imobilizados por 7 dias (2,5 h/dia). RAI *et al.* (2003) também observaram redução no peso dos testículos de ratos machos estressados por imobilização durante 60 dias (4h/dia). No presente estudo, diferenças significativas foram observadas entre os valores médios dos pesos corporal e testicular dos ratos submetidos ao estresse por imobilização em relação aos animais do grupo controle. Estas variações refletem o efeito causado pelo estresse em animais pré-púberes pois os pesos corporal e testicular dos animais estressados foram reduzidos em 18% e 23%, respectivamente.

O grupo submetido ao estresse por imobilização também demonstrou menor relação do volume do parênquima testicular, o que pode justificar a redução no seu volume testicular total em comparação aos ratos do grupo controle (ROCHA & HAYASHI, 1984). Estas variações refletem o comprometimento dos testículos dos animais estressados.

É relatado na literatura (McGRADY, 1984; ALMEIDA *et al.*, 1998b; RAI *et al.*, 2003) que o estresse pode promover atrofia tubular seminífera em roedores de laboratório. O presente estudo concorda com estes resultados sob o ponto de vista estereológico e morfométrico. A redução nos diâmetros tubulares foi verificada nos testículos dos animais submetidos ao estresse por imobilização em relação aos animais do grupo controle. Embora a análise morfométrica aponte para uma possível atrofia tubular nos testículos destes animais, a morfologia tubular seminífera manteve-se íntegra (PONTES *et al.*, 2004) assim como a frequência dos tipos básicos de células da linhagem germinativa.

ALMEIDA *et al.* (1998a) demonstraram significativa diminuição tanto de LH como de testosterona

plasmática e uma diminuição significativa na produção de espermátides maduras e de concentração de espermatozoides na cauda do epidídimo em ratos estressados por imobilização. Estas observações levaram os autores a concluir que a diminuição do estado androgênico de ratos estressados pode ser responsável, pelo menos em parte, por deprimir a espermatogênese, visto que a ação estimulatória do FSH e da testosterona são necessários para iniciar e manter o processo. No entanto, quando aplicado sobre ratos machos desde a pré-puberdade (40 dias de idade) até o começo da puberdade (55 dias de idade) o estresse crônico por imobilização aumentou significativamente a testosterona plasmática, mas atrasou a maturação testicular (ALMEIDA *et al.*, 2000a). RAI *et al.* (2003) observaram redução na população de espermátides estudando os efeitos do estresse por imobilização na espermatogênese de ratos albinos. Estes resultados indicam que o estímulo estressor provavelmente tem uma ação diferente no eixo gonadal durante as diferentes fases do desenvolvimento sexual (ALMEIDA *et al.*, 1988b). Além disso, estas discrepâncias nos resultados sobre a frequência dos tipos de células germinativas nos vários estudos que utilizaram agentes estressores se devem às diferenças entre o tempo no qual o animal foi submetido ao estímulo estressor e idade do animal à época do experimento.

O estado morfofuncional da gônada masculina, após o estresse repetido (1h/dia de imobilização durante sete dias consecutivos), pode ser verificado através de métodos morfohistoquímicos e testes plasmáticos (PELLEGRINI *et al.*, 1998). Os autores observaram diminuição no nível plasmático de testosterona demonstrando que estresse repetido, mesmo por duração temporária, é capaz de influenciar diretamente ou indiretamente o estado morfofuncional das referidas glândulas. Em nosso estudo não fizemos dosagem hormonal, porém calculamos o volume testicular ocupado pelas células de Leydig, produtoras de testosterona, e observamos redução significativa no grupo experimental em relação ao grupo controle, estando de acordo com BAJKOVA (1988), cujas análises revelaram uma diminuição no número de células de Leydig.

Apesar de não significativas, constatamos nos testículos dos animais estressados, a presença de formações binucleadas e multinucleadas de espermatídes em fases precoces da espermiogênese. A presença de tais formações no grupo estressado comprova relatos anteriores (BAJKOVA, 1988) de que o estresse por imobilização pode causar degenerações no epitélio seminífero. Estas formações são conseqüências de defeitos nas pontes intercelulares que normalmente existem entre as células, acarretando a incapacidade das mesmas de se separarem durante a espermiogênese. Sendo assim, elas acabam coalescendo ou sofrendo cariocinese sem citocinese (MIRAGLIA *et al.*, 1990; MIRAGLIA & HAYASHI, 1993).

Como descrito por SAKSENA *et al.* (1979), aos 45 dias já é possível encontrar espermatozoides na luz dos túbulos seminíferos, uma vez que a quantidade de espermatozoides vai aumentando com a idade. Nosso grupo controle comprova tais achados. Porém, a redução na quantidade, ou a total ausência, de espermatozoides no lúmen tubular dos testículos dos animais do grupo experimental estão de acordo com os relatos de ALMEIDA *et al.* (1998b) e BAJKOVA (1988) que observaram uma redução na concentração de espermatozoides armazenados na cauda do epidídimo de ratos machos após tratamento pelo estresse por imobilização na fase pré-púbere sugerindo um possível atraso na instalação da puberdade nestes animais.

Dos resultados obtidos em nossas condições experimentais, podemos concluir que a imobilização atua como agente estressor e, conseqüentemente, afeta as funções testiculares em ratos.

As alterações morfométricas e estereológicas nos testículos dos animais submetidos a imobilização, associadas à baixa freqüência ou a total ausência de espermatozoides no lúmen dos túbulos seminíferos dos animais estressados sugerem um possível atraso na maturação testicular nos animais submetidos ao estresse durante 30 dias antes da instalação da puberdade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, A.S.; ANSELMO-FRANCI, J.A.; ROSA-E-SILVA, A.A.M & LAMANO-CARVALHO, T.L. 1998a. Chronic intermittent immobilization of male rats throughout sexual development a stress protocol. **Experimental Physiology** **83**: 701-704.
- ALMEIDA, A.S.; PETENUSCI, S.O.; ANSELMO-FRANCI, J.A.; ROSA-E-SILVA, A.A.M. & LAMANO-CARVALHO T.L. 1998b. Decreased spermatogenic and androgenic testicular functions in adult rats submitted to immobilization-induced stress from prepuberty. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** **31**: 1443-1448.
- ALMEIDA, A.S.; PETENUSCI, S.O.; ANSELMO-FRANCI, J.A.; ROSA-E-SILVA, A.A.M. & LAMANO-CARVALHO, T.L. 2000a. Chronic immobilization-induced stress increases plasma testosterone and delays testicular maturation in pubertal rats. **Andrologia** **32**: 7-11.
- ALMEIDA, A.S.; KEMPINAS, W.G. & LAMANO-CARVALHO, T.L. 2000b. Sexual and fertility of male rats submitted to prolonged immobilization-induced stress. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** **33** (90): 1105-1109.
- BAJKOVA, O.V. 1988. Cyto-Physiologic indicators of the status of the reproductive organs of male rats after 7-days of immobilization stress and 7-days of hypokinesia. **Kosmicheskaia Biologiia i Aviaakosmicheskaia Meditsina** **22** (5): 55-59.
- BARD, C.R.; KRAELING, R.R.; RAMPACEK, G.B.; FONDA, E.S. & KISER, T.E. 1982. Inhibition of ovulation and LH secretion in the gilt after treatment with ACTH or hycortisone. **Journal of Reproduction and Fertility** **62**: 85-92.
- BHARIHOKE, V.; GUPTA, M. & GOHIL, H. 2000. Bronchopulmonary changes after repeated exposure to cold & restraint stress. **Journal of the Anatomical Society of Índia** **49** (1): 49-51.
- BREIGEIRON, M.K.; MAZARO, R.; LAMANO-CARVALHO, T.L. & SANAVITTO, G.L. 2003. Efeitos da estimulação neonatal sobre o sistema reprodutor masculino de ratos adultos. *In*: Congresso de Integração em Biologia da Reprodução, Ribeirão Preto. Resumos, CD-ROM.
- DYM, M. & CLERMONT, Y. 1970. Role of spermatogonia in the repair of the seminiferous epithelium following x-irradiation of the rat testis. **The American Journal of Anatomy** **128**: 265-282.
- FRANÇA, L.R. 1991. **Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau**. Tese (doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais. 180p.
- GUYTON, A.C. & HALL, J.E. 2002. **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.857-868.
- HENNESSY, D.P. & WILLIAMSON, P. 1983. The effects of stress and of ACTH administration in hormone profiles, oestrus and ovulation. **Theriogenology** **20**: 13-26.
- LEBLOND, C.P. & CLERMONT, Y. 1952. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. **Annals of the New York Academy of Sciences** **55**: 548-573.
- LIPP, M.E.N. 2003. **Mecanismos neuropsicofisiológicos do stress: teoria e aplicações clínicas**. São Paulo, Casa do Psicólogo. 227p.

- LOPEZ-CALDERON, A.; GONZALEZ-QUIJANO, M.I.; TRESQUERRES, J.A.F. & ARIZNAVARETTA, C. 1990. Role of LHRH in the gonadotropin response to restraint stress in intact male rats. **Journal of Endocrinology** **124**:241-256.
- MAZARO, R. & LAMANO-CARVALHO, T.L. 2001. Effects of neonatal and peripuberal stress on the onset of puberty in male rats. *In*: Congresso de Integração em Biologia da Reprodução, Ribeirão Preto. Abstracts. pp.144.
- McGRADY, A.V. 1984. Effects of psychological stress on male reproduction: a review. **Archives of Andrology** **13** (1): 1-7.
- MIRAGLIA, S.M.; HAYASHI, H. & GOLDFEDER, E.M. 1990. Histomorfometria dos testículos de ratos albinos normais em várias idades. **Revista Brasileira de Ciências Morfológicas** **7**: 8-15.
- MIRAGLIA, S.M. & HAYASHI, H. 1993. Histomorphometry of Immature Rat Testis After Heating. **Journal of Morphology** **217**: 65-74.
- PELLEGRINI, A.; GRIECO, M.; MATERAZZI, G.; GESI, M. & RICCIARDI, M.P. 1998. Stress-induced morphohistochemical and functional changes in rat adrenal cortex, testis and major salivary glands. **The Histochemical Journal** **30** (10): 695-701.
- PONTES, D.A.; FAVARETO A.P.A.; CAMARGO, I.C.C; NOGUEIRA, L.C.; MESQUITA, S.F.P & FARIA, M.J.S. 2004. Efeito da incorporação do agente antineoplásico ciclofosfamida ao lipossoma dipalmitoil fosfatidilcolina sobre aspectos morfológicos de testículos de ratos adultos. *In*: VI Congresso Londrinense de Biologia Aplicada à Saúde e I Simpósio Paranaense de Patologia Experimental, Londrina. Resumos, CD-ROM.
- RAI, J.; PANDEY, S.N. & SRIVASTAV, R.K. 2003. Effect of Immobilization Stress on Spermatogenesis of Albino Rats. **Journal of the Anatomical Society of Índia** **52** (1): 55-57.
- ROCHA, L.R.N. & HAYASHI, H. 1984. Histomorfometria de testes calentados de rata. **Revista Iberoamericana de Fertilidade** **2**: 8-15.
- SAKSENA, S.K.; LAU, I.F. & CHANG, M.C. 1979. Age dependent changes in the sperm population and fertility in the male rat. **Experimental Aging Research** **5** (4): 373-381.
- SCHOELTEN, J.A. & LIPTRAP, R.M. 1978. A role for the adrenal cortex in the onset of cystic ovarian follicles in the sow. **Canadian Journal of Comparative Medicine** **42**: 525-533
- SELYE, H. 1936. A syndrome produced by diverse noxious agent. **Nature** **138**: 32.
- STEINBERGER, E. 1978. The etiology & pathophysiology of testicular dysfunction in man. **Fertility and Sterility** **29**: 481.
- TSUMA, V.T.; EINARSSON, S.; MADEJ, A.; KINDAHL, H. & LUNDEHEIM, N. 1996. Effect of food deprivation during early pregnancy on endocrine changes in primiparous sows. **Animal Reproduction Science** **41**: 267-278.
- TSUMA, V.T.; EINARSSON, S.; MADEJ, A.; FOSBERG, M. & LUNDEHEIM, N. 1998. Plasma levels of progesterone and cortisol after ACTH administration in lactating primiparous sows. **Acta Veterinaria Scandinavica** **39**: 71-76.
- URDAMPILLETA, L. & Fernandez D. 1999. Psicologia da ovulação. pp.69-81. *In*: BUSO, N.E.; ACOSTA, A.A. & REMOHI, J. (orgs.). **Indução da ovulação**. São Paulo, Editora Atheneu.p.
- VARLEY, M. 1991. Stress and reproduction. **Pig News and Information** **12**: 567- 571.
- VIEIRA, S.I. & SCHÜLLER SOBRINHO, O. 1995. Estresse e sua Prevenção. pp.199-217. *In*: VIEIRA, S.I. (org.). **Medicina Básica do Trabalho**. Curitiba: Genesis, p.
- VILA, E.M. & ZAKIR, N.S. 2003. Tratamento do estresse: desenvolvimento de habilidades de enfrentamento. pp.123-128. *In*: Almeida, C.G. (org.). **Intervenções em grupo: estratégias psicológicas para a melhoria da qualidade de vida**. Campinas, Papyrus. p.
- WASSER, S.K.; SEWALL, G & SOULES, M.R. 1993. Psychosocial stress as a cause of infertility. **Fertility and Sterility** **59** (3): 685-689.

Recebido: 25/05/2006

Revisado: 10/07/2006

Aceito: 11/08/2006