

UNIVERSIDADE FEDERALDE MINAS GERAIS  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

Luiza Alves Andrade Colen

**AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS DE LEYDIG DAS REGIÕES PERIFÉRICA E  
INTERMEDIÁRIA DO PARÊNQUIMA TESTICULAR DE SUÍNOS:  
Marcadores moleculares, eficiência esteroidogênica  
e proporção de macrófagos**

Belo Horizonte

2020

Luiza Alves Andrade Colen

**AVALIAÇÃO DAS CÉLULAS DE LEYDIG DAS REGIÕES PERIFÉRICA E  
INTERMEDIÁRIA DO PARÊNQUIMA TESTICULAR DE SUÍNOS:  
Marcadores moleculares, eficiência esteroidogênica  
e proporção de macrófagos**

**Versão final**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador(a): Dr<sup>a</sup>. Gleide Fernandes de Avelar

Belo Horizonte

2020

043

Colen, Luiza Alves Andrade.

Avaliação das células de Leydig das regiões periférica e intermediária do parênquima testicular de suínos: marcadores moleculares, eficiência esteroidogênica e proporção de macrófagos [manuscrito] / Luiza Alves Andrade Colen. - 2020.

48 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador(a): Dr<sup>a</sup>. Gleide Fernandes de Avelar.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Suínos. 3. Testículo. 4. Células Intersticiais do Testículo. 5. Testosterona. 6. Hormônios. I. Avelar, Gleide Fernandes de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576

## ATA DA DEFESA



Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE

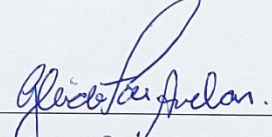
LUIZA ALVES ANDRADE COLEN

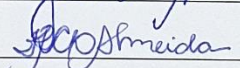
331/2020  
entrada  
1º/2018  
2018697492

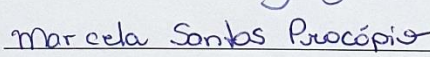
Às **quatorze horas** do dia **28 de fevereiro de 2020**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**AValiação DAS CÉLULAS DE LEYDIG DAS REGIÕES PERIFÉRICA E INTERMEDIÁRIA DO PARENQUIMA TESTICULAR DE SUÍNOS: MARCADORES FENOTÍPICOS, EFICIÊNCIA ESTEROIDOGÊNICA E PROPORÇÃO DE MACRÓFAGOS**", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Gleide Fernandes de Avelar**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Gleide Fernandes de Avelar	UFMG	APROVADA
Dra. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida	UFMG	APROVADA
Dra. Marcela Santos Procópio	Instituto de Reprodução Humana	APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA  
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 28 de fevereiro de 2020.**

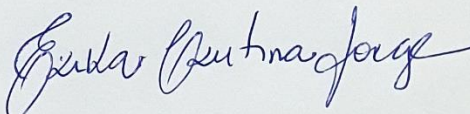
Dr<sup>a</sup>. Gleide Fernandes de Avelar (Orientadora) 

Dr<sup>a</sup>. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida 

Dr<sup>a</sup>. Marcela Santos Procópio 

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Prof. Erika Cristina Jorge  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Celular ICB/UFMG



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Áurea e Estácio, por sempre me apoiarem, mesmo quando achavam que eu não estava fazendo o que eles pensavam ser certo. Pelo suporte em todos os momentos, pelas brigas e discussões, pois elas também nos fazem crescer. E por terem me proporcionado ser a pessoa que sou hoje. Agradeço ao meu irmão, Lucas, por ser um companheiro ótimo, para rir, chorar, reclamar, brigar, ouvir minhas teorias mirabolantes. Agradeço ao meu namorado, Leonardo, que não poderia ser pessoa melhor. Sempre comigo, me apoiando e ajudando sempre no que pode. Sendo realmente companheiro e parceiro de todos os momentos. Amo vocês com todo o meu coração!

Agradeço à minha família, por estarem sempre reunindo, em festas, cafés, ou simplesmente aparecendo para colocar a conversa em dia. Esses momentos são muito importantes para todos, mostrando companheirismo e afeto, mesmo quando a situação de um ou outro não está boa, um momento de carinho é importante. Também, parte importante da minha família, são as minhas meninas, Bela, Mel e Arya, que sempre me recebem com alegria e me ajudam a aliviar as tensões do dia, sempre com lambeijos, mordidas e brincadeiras intermináveis.

Agradeço aos meus amigos por sempre me apoiarem e estarem comigo, por todas as risadas, lágrimas compartilhadas, brincadeiras, conversas, discussões construtivas, ou nem tanto, festas, segredos, babados, tretas solucionadas, ou não, viagens, e por esse amor enorme que tenho por vocês! Em especial para Gheny, Camila, Lílian, Bárbara, Bruno, Alinne, Rayan, e outros que não coloquei o nome aqui, mas estão dentro do meu coração.

Agradeço às pessoas maravilhosas do Laboratório de Biologia Celular, que além de colegas de trabalho, são amigos. André, Bárbara, Camila (e Pedro!), Carol Oliveira, Carol Pinhol, Emily (que cuidou da minha filha antes de ela ser a minha Arya), Fausto, Flávia, Gabriel, Gleide (orientadora linda), Guilherme, Juliana, Mara, Marcos, Matheus, Natália, Rafael, Samyra, Talita, muito obrigada! Sempre me apoiando, ensinando, puxando a orelha, rindo, brincando, contando altos casos, mas tendo os momentos sérios e engajados. Obrigada pelo apoio, pela amizade e ensinamentos. Um obrigada em especial à técnica do nosso laboratório, Mara Lívia,

que me ajudou muito nas correrias do projeto, aos ICs que a acompanharam e à Bárbara que me auxiliou na reta final, quando tempo era essencial! Agradeço aos profissionais de outros laboratórios que também me auxiliaram ao longo desse período.

Agradeço a todos os animais que deram as suas vidas, seus corpos e/ou seus órgãos em prol deste trabalho e em prol da ciência. Nós, pesquisadores, não seríamos quem somos sem vocês. Seus sacrifícios não são em vão. Os humanos são responsáveis por lhes respeitarem e permitirem-vos uma boa vida e uma morte digna.

Por fim, mas não menos importante, agradeço à minha orientadora, Gleide, pessoa maravilhosa e forte, por me acolher e me guiar por esse trajeto. Obrigada pela paciência, sabedoria, profissionalismo e companheirismo. Você teve um papel essencial nesse período, me ajudando a crescer não só profissionalmente, mas como pessoa também. Sempre ofereceu um ombro amigo, nos momentos bons e ruins e nunca deixou a peteca cair! Nunca me deixou desistir, com o seu positivismo, “calma, vai dar certo!”, e deu! Passamos por muitos momentos de provação, mas são esses momentos que nos fazem crescer e sermos pessoas melhores. Obrigada por tudo!

## Resumo

No testículo de suínos é possível identificar dois tipos morfológicamente distintos de células de Leydig, os quais encontram-se preferencialmente distribuídos na região intermediária (ID) e na região periférica (RP) do parênquima testicular. Assim, células hipertrofiadas predominam em ID e células com menor volume individual são frequentes em RP. O presente estudo teve como principal objetivo investigar características fenotípicas que pudessem auxiliar na compreensão das possíveis diferenças funcionais entre as duas populações. Assim, em testículos de suínos pós-púberes observamos que as células de Leydig presentes em RP apresentaram menor intensidade de marcação para o ER $\alpha$  e concomitante aumento no índice de proliferação celular, não sendo verificadas alterações quanto ao padrão de imunorreatividade para AR e LHR. A fim de avaliar a capacidade esteroidogênica das diferentes regiões, realizamos um estudo in vivo utilizando o modelo de xenoinxerto de fragmentos de testículos de doadores suínos jovens. Desse modo pudemos observar uma tendência quanto à ID ser mais eficiente para a síntese de testosterona. Ademais, em RP, a densidade de macrófagos apresentou forte tendência a ser maior. Diante desses achados, sugerimos que na população de células de Leydig em RP predominam células progenitoras e imaturas da linhagem adulta, enquanto em ID estão presentes as células maduras. Contudo, mais estudos serão desenvolvidos para melhor compreendermos as interações celulares nestas regiões distintas do parênquima testicular.

Palavras-chave: Testículo. Suíno. Leydig. Testosterona. Hormônios. Parênquima testicular. Regiões periférica e intermediária.

## Abstract

Two morphologically distinct Leydig cells types are recognized within the interstitial compartment of pigs testes. Moreover, these cells seem to present a preferential distribution, since the hypertrophied cell type is observed in the intermediate region (ID), and those cells with small individual volume are more frequent in the peripheral region of testis parenchyma. Therefore, the present study aimed to phenotypically characterize these two cell populations, in order to better understand the functional differences they may present. In this regard, in testes from postpubertal pigs, we observed that Leydig cells in RP presented a weak intensity of ER $\alpha$  labeling, whereas the proliferation index found for this population was higher. No differences regarding AR and LHR immunoreactivity were observed. Additionally, we evaluated the steroidogenic function in ID and RP through the xenografting approach that enabled to assess *in vivo* the synthesis of androgens. Indeed, ID presented a clear trend and the recipient showed high levels of testosterone. On the other hand, macrophages were more observed in RP. These findings suggest that Leydig cells in RP are mainly progenitors and immature types, whereas ID maintain the mature type. However, further studies are being developed so to better comprehend the cells' interactions and how they modulate the different regions of testis parenchyma.

Keywords: Testis. Swine. Leydig. Testosterone. Hormones. Testicular parenchyma. Peripheral and intermediate regions.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação das três regiões do parênquima testicular de suínos, determinadas de acordo com o gradiente de maturação tubular (Avelar et al., 2010).

Figura 2: Fotomicrografias representativas do parênquima testicular da região intermediária (ID; A, B, C) e periférica (RP; A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, C<sub>1</sub>) do testículo de suínos pós-púberes, apresentando imunorreatividade para os receptores de andrógeno (AR), LH (LHR) e estrógeno (ER $\alpha$ ), e a intensidade de marcação (A<sub>2</sub>, B<sub>2</sub>, C<sub>2</sub>).

Figura 3: Fotomicrografias representativas da região periférica (A) e intermediária (B) do testículo de suínos pós-púberes mostrando células de Leydig positivas para o marcador de proliferação Ki67 e o índice de proliferação obtido para essas células.

Figura 4: Avaliação *in vivo* da atividade esteroidogênica de células de Leydig das diferentes regiões do parênquima testicular de doadores suínos jovens (7dpn), utilizando o modelo de xenoenxerto em camundongos imunodeficientes.

Figura 5: Fotomicrografias apresentando as características dos macrófagos de diferentes regiões do parênquima testicular de doadores suínos jovens (7dpn) e a proporção entre células de Leydig e macrófagos, 32 dias após a realização do enxerto em camundongos receptores imunodeficientes.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

3 $\beta$ -HSD - 3 $\beta$ -Hidroxiesteroide dehidrogenase

AMH – Hormônio anti-Mulleriano

AR – Receptor de andrógeno

CL – Células de Leydig

DAB – Diaminobenzidina

Dpn – Dias pós-natal

ER $\alpha$  – Receptor  $\alpha$  de estrógeno

FSH – Hormônio folículo estimulante

GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofinas

HBSS – Solução tamponada de sais de Hank (*Hank's Buffered Salt Solution*)

ID – Região intermediária

Igf3 – Proteína semelhante à insulina 3

INSL3 – Fator semelhante à insulina 3

Ki67 – Marcador de células em proliferação

LH – Hormônio luteinizante

LHR – Receptor de hormônio luteinizante

PBS – Tampão fosfato

RA – Ácido Retinóico

RP – Região periférica

TA – Região de túnica albugínea

TR – Região de transição

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>14</b>
2.1 Estrutura testicular em mamíferos .....	14
2.2 Desenvolvimento do testículo .....	15
2.3 Células de Leydig e seu desenvolvimento .....	18
2.4 Suínos .....	21
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
3.1 Objetivo geral.....	23
3.2 Objetivos específicos .....	23
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
4.1 Animais experimentais.....	24
4.2 Coleta e processamento dos testículos .....	24
4.3 Imunoperoxidase .....	25
4.4 Quantificação da imunoperoxidase por intensidade de pixels .....	26
4.5 Análise de proliferação .....	26
4.6 Xenoenxerto .....	27
4.7 Análise da proporção de macrófagos e células de Leydig.....	27
4.8 Avaliação da testosterona periférica.....	28
4.9 Análises estatísticas .....	28
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>30</b>
5.1 Localização e intensidade de marcação de AR, LHR e ER $\alpha$ .....	30
5.2 Proliferação de células de Leydig .....	31
5.3 Avaliação da eficiência esteroidogênica .....	32
5.4 Proporção de células de Leydig por macrófago.....	34
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>36</b>
<b>7. CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS</b> .....	<b>40</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>41</b>

## 1. INTRODUÇÃO

No interior dos lóbulos testiculares é possível identificar dois compartimentos: o tubular e o intertubular (intersticial). No compartimento intertubular, são encontradas células de Leydig, células alvo do presente estudo. Os andrógenos produzidos por essas células são responsáveis pela diferenciação e desenvolvimento do sistema genital masculino na fase fetal, dentre outras funções. No interstício, há uma grande população de macrófagos, os quais produzem citocinas potencialmente importantes para o privilégio imunológico dos testículos e influenciam o desenvolvimento das células de Leydig, as provendo com fatores de crescimento e diferenciação, apresentando até mesmo digitações citoplasmáticas entre essas células, que aumenta a área de contato entre elas.

O desenvolvimento testicular pode ser dividido em três estágios: embrionário/fetal, infantil ou juvenil e púbere. No estágio embrionário/fetal, a diferenciação das células de Sertoli ocorre a partir da expressão do gene *Sry*. Ao serem formados os cordões seminíferos, células de Leydig fetais se diferenciam e se instalam nos espaços entre os mesmos, no interstício. O estágio infantil/juvenil é caracterizado por mitoses sucessivas das células de Sertoli e germinativas. O término da proliferação da célula de Sertoli ocorre entre duas e três semanas após o nascimento para camundongos e ratos, respectivamente. No entanto, trabalhos recentes têm sugerido que no testículo pós-púbere de ratos e hamsters, células de Sertoli localizadas em uma região de transição dos túbulos seminíferos com a rede testicular preservam sua capacidade de proliferação. Por outro lado em suínos, espécie que tem grande importância como modelo animal em alternativa aos roedores, o período mitótico das células de Sertoli coincide principalmente com o primeiro mês pós-natal e a maturação por volta do terceiro mês de idade.

Na maioria das espécies, a localização espacial dos primeiros eventos da espermatogênese é considerada aleatória. Porém, em equinos pré-púberes é possível identificar macroscopicamente duas regiões distintas no parênquima testicular, sendo uma central, com tonalidade mais clara, em contraste com a região subcapsular, mais escura. Este padrão de desenvolvimento se relaciona

temporalmente com o aumento da proporção dos túbulos seminíferos e uma redução da densidade de macrófagos e demais células intersticiais. De maneira semelhante, embora sem a presença de marcadores macroscópicos, as alterações morfofuncionais no parênquima testicular de suínos pré-púberes também obedecem a um padrão. A maturação das células de Sertoli tem início nos túbulos localizados na área central do testículo, próximo ao mediastino, e progride em direção à periferia, sendo seguida pela onda espermatogênica.

A maioria dos mamíferos investigados apresenta um padrão de desenvolvimento bifásico (fetal e pós-natal) das células de Leydig. Porém, em suínos, assim como humanos e outros primatas, as células de Leydig apresentam 3 fases distintas de desenvolvimento, sendo uma fetal e duas durante o período pós-natal. A população fetal se diferencia no compartimento intertubular a partir de 30 dias pós-coito. Após o nascimento, a primeira onda de proliferação ocorre ao longo do primeiro mês de vida e estabelece a população infantil. Durante a fase de quiescência, que corresponde ao intervalo entre 1 e 3 meses de idade, ambas as populações de Leydig (fetal e infantil) passam por um processo de regressão. Portanto, a segunda onda de expansão pós-natal de células de Leydig em suínos tem início por volta de 3 meses e se estende até o 4º mês, sendo responsável pela determinação da população adulta. Em suínos, o volume das células de Leydig e o número de receptores de LH e andrógenos alteram-se grandemente ao longo do desenvolvimento.

Em estudos envolvendo o xenoenxerto de fragmentos testiculares em camundongos imunodeficientes castrados, a maturação do parênquima testicular (do doador) e espermatogênese são moduladas pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônada; nesse caso, o componente “gônada” é substituído pelo enxerto. Uma vez estimulado, o enxerto assume a produção de testosterona, que atua na restauração do peso e tamanho das glândulas seminais dos camundongos receptores.

O terceiro maior grupo de animais destinados ao comércio de carnes no Brasil é composto por suínos, demonstrando a sua importância econômica para o país. Os suínos também têm mostrado a sua importância como modelos animais em estudos de doenças humanas. Os testículos de suínos são caracterizados como os “mais versáteis órgãos produtores de esteroides conhecidos” e geram importantes materiais para pesquisa em diferentes áreas.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Estrutura testicular em mamíferos**

Em mamíferos eutérios, os testículos são envoltos por várias túnicas de revestimento, dentre elas, a albugínea, que é uma camada de tecido conjuntivo fibroso que ao emitir septos, divide o parênquima testicular em lóbulos. Assim, no interior dos lóbulos é possível identificar dois compartimentos: o tubular, onde ocorre a espermatogênese, e o intertubular (intersticial), responsável pela sinalização hormonal, dentre outras funções. A maior parte do testículo é constituída pelo compartimento de túbulos seminíferos, os quais são formados pelo epitélio seminífero, com células germinativas em diferentes estágios de diferenciação e células de Sertoli, que fornecem nutrientes e suporte físico, bem como medeiam ação de hormônios, criando um ambiente adequado para o desenvolvimento da espermatogênese (Setchell et al., 2003). Também apresenta lume central e a túnica própria, constituída de matriz extracelular e células peritubulares mioides, que ao se contraírem, atuam na propulsão de fluidos e dos espermatozoides através dos túbulos seminíferos (Russell, 1990). No compartimento intertubular, são encontradas células de Leydig, o componente celular mais abundante da região, células de defesa como macrófagos e mastócitos, células e fibras do tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e linfáticos e nervos (Russell, 1990).

A função testicular é modulada por uma complexa interação de diversas moléculas que envolvem sinalizações tanto endócrinas quanto parácrinas, e a regulação apropriada é a garantia do sucesso reprodutivo (Minagawa et al., 2014). Os andrógenos, produzidos pelas células de Leydig, são os responsáveis pela diferenciação e desenvolvimento do sistema genital masculino na fase fetal (Pelliniemi et al., 1996), assim como manutenção quantitativa da espermatogênese e determinação das características sexuais secundárias (George e Wilson, 1994; Zirkin et al., 1994; Gendt et al., 2004; McEwan e Brinkmann, 2016; Kangawa et al., 2019). Adicionalmente, os estrógenos tais como o estradiol, são responsáveis por funções fisiológicas cruciais para a reprodução nos machos (Joshi e Raeside, 1973; Rochira et al., 2016; Kangawa et al., 2019).

## 2.2 Desenvolvimento do testículo

O desenvolvimento testicular pode ser dividido em três estágios: embrionário/fetal, infantil ou juvenil e púbere (Ou et al., 2014). No estágio embrionário/fetal, a diferenciação das células de Sertoli, cuja origem provável é o epitélio celomático, ocorre a partir da expressão do gene *Sry* localizado no braço curto do cromossomo Y e determina o principal evento de uma cascata de severas mudanças moleculares e morfológicas, minuciosamente reguladas e que orquestram o desenvolvimento. Portanto, células de Sertoli e peritubulares mioides envolvem conjuntos de gonócitos, resultando na formação dos cordões seminíferos, os quais correspondem ao primeiro marcador morfológico da determinação testicular (Mclaren, 2000; Chen et al., 2009). Nesse contexto, a diferenciação dos testículos se inicia por volta de 11,5 dias de gestação em camundongos (Capel, 2000; Combes et al., 2009), 26 dias em suínos (Pelliniemi, 1975) e 56 dias em humanos (Pelliniemi et al., 1993).

Ao serem formados os cordões seminíferos, células de Leydig fetais se diferenciam e se instalam nos espaços entre os mesmos, no interstício. A masculinização do feto e o estabelecimento da estrutura essencial dos testículos são regulados pelas células de Leydig e de Sertoli diferenciadas, juntamente com outros tipos celulares e hormônios, como a testosterona, hormônio anti-Mulleriano (AMH) e proteína semelhante à insulina 3 (IGFBP3) (Hughes et al., 1999). O estágio infantil/juvenil é caracterizado por mitoses sucessivas das células de Sertoli e germinativas (Ou et al., 2014). Nesta fase intermediária, gonadotrofinas originárias da hipófise (particularmente FSH) participam na regulação da proliferação de células de Sertoli (Griswold et al., 1977; Orth, 1984), determinando a capacidade de produção espermática e o tamanho dos testículos na fase adulta (Petersen e Söder, 2006; Ou et al., 2014).

De maneira geral, para roedores, normalmente utilizados como modelo experimental, o período de proliferação de células de Sertoli após o nascimento é bem estabelecido (Orth, 1982; Vergouwen et al., 1991; Joyce et al., 1993; França et al., 2000). O término da proliferação da célula de Sertoli corresponde ao período de formação do citoesqueleto de actina, o desenvolvimento dos componentes da barreira hemato-testicular, o início da secreção e fluxo do líquido tubular e, a primeira onda de proliferação de espermatócitos (Russell et

al., 1989; Gondos e Berndston, 1993). Todos estes eventos ocorrem entre duas e três semanas após o nascimento para camundongos e ratos, respectivamente. No entanto, trabalhos recentes têm sugerido que no testículo pós-púbere de ratos e hamsters, células de Sertoli localizadas em uma região de transição dos túbulos seminíferos com a rede testicular preservam sua capacidade de proliferação (Aiyama et al., 2015; Figueiredo et al., 2016). Por outro lado em suínos, espécie que tem grande importância como modelo animal em alternativa aos roedores, o período mitótico das células de Sertoli coincide principalmente com o primeiro mês pós-natal (Erickson, 1964; Putra e Blackshaw, 1985; Swanlund et al., 1995) e a maturação por volta do terceiro mês de idade (Tran et al., 1981; Kosco et al., 1989; França et al., 2000).

Em diferentes espécies, o interstício, que compreende todas as áreas entre os túbulos seminíferos, apresenta grandes variações em relação às proporções de células de Leydig, macrófagos, mastócitos, vasos linfáticos e tecido conjuntivo (Fawcett et al., 1973; Nistal et al., 1984; Dirami et al., 1991; Anton et al., 1998; Foley, 2001; Kangawa et al., 2019). Em roedores, este compartimento é caracterizado por conjuntos de células de Leydig ao redor de vasos capilares sanguíneos e espaços linfáticos; porém, em humanos, esta região apresenta principalmente, tecido conjuntivo frouxo e delicados vasos linfáticos (Fawcett et al., 1973; De Kretser, 1994; Setchell et al., 1994; Setchell et al., 2003). Como resultado imediato da progressão da espermatogênese, há um crescimento abundante do compartimento tubular, fazendo com que o espaço intersticial sofra relativa diminuição (Setchell et al., 1988).

Nesta região há uma grande população de macrófagos, cujo número, em ratos, aumenta durante a puberdade (Niemi et al., 1986; Pöllänen e Niemi, 1987; Hutson, 1990). Essas células fagocitam debris celulares no interstício, produzem citocinas potencialmente importantes para o chamado privilégio imunológico dos testículos, influenciam o desenvolvimento das células de Leydig, as provendo com fatores de crescimento e diferenciação, além de desempenharem um papel no controle do nicho espermatogonial (Khan et al., 1992a; Hutson, 1994; Kern et al., 1995; Hales, 1996; Haschek et al., 2010; Potter e De Falco, 2017). A interação existente entre os macrófagos e as células de Leydig é também representada pelo desenvolvimento de digitações citoplasmáticas, que ao



produzir o aumento da área de contato, possibilita o intercâmbio mais eficiente de fatores/sinais entre estes tipos celulares (Hutson, 1992; Lara et al., 2018).

Em suínos, assim como em outros vertebrados, o epitélio seminífero é constituído somente por dois tipos celulares nos períodos fetal e pós-natal inicial, as células de Sertoli abundantemente distribuídas, sobretudo na periferia dos cordões seminíferos; e células germinativas, gonócitos e espermatogônias, localizadas centralmente e junto a membrana basal, respectivamente (Van Straaten e Wensing, 1977; Godinho e Cardoso, 1979; Van Vorstenbosch et al., 1987; França et al., 2000; França et al., 2005; Ford e Wise, 2009). Durante a fase intrauterina, as células germinativas de suínos se desenvolvem de maneira independente da ação de gonadotrofinas, principalmente do FSH (hormônio folículo estimulante) (Van Vorstenbosch et al., 1984; Vorstenbosch et al., 1987; Haeussler et al., 2007). Após o nascimento, as células germinativas proliferam em um ritmo constante, em oposição ao observado para as células de Leydig e Sertoli (Van Straaten e Wensing, 1977; Godinho e Cardoso, 1979; Okwun et al., 1993; França et al., 2000). Assim, os primeiros espermátócitos e espermátides somente são vistos entre 2 a 3 meses de idade (Erickson, 1964; Godinho e Cardoso, 1979; França et al., 2000) e somente após 10 semanas pós-natal, com pico em 15 semanas, ocorre crescimento e aumento de peso mais acentuados dos testículos pré-púberes em raças suínas de grande porte (Godinho e Cardoso, 1979).

Na maioria das raças de suínos, a puberdade ocorre entre 4 e 5 meses de idade e diversos parâmetros, tais como a maturação das células de Sertoli, primeira espermição, aumento dos níveis plasmáticos de testosterona, do diâmetro tubular e peso testicular são considerados como referência para sua determinação. Entre 7 e 8 meses de idade observa-se o início da estabilização dos vários parâmetros testiculares, indicando maturidade sexual, que é plenamente alcançada aos 10 meses de idade, de acordo com avaliações da fertilidade e da qualidade espermática (Wrobel e Dierichs, 1975; Van Straaten e Wensing, 1977; Okwun et al., 1993; França et al., 2000; Rodríguez-Martínez, 2001).

Na maioria das espécies, a localização espacial dos primeiros eventos da espermatogênese é considerada aleatória (Courrot et al., 1970). Porém, em equinos pré-púberes é possível identificar macroscopicamente duas regiões

distintas no parênquima testicular, sendo uma central, com tonalidade mais clara, em contraste com a região subcapsular (periférica) mais escura (Bouin e Ancel, 1905; Nishikawa e Horie, 1955; Johnson, 1991; Clemmons et al., 1995). Este padrão de desenvolvimento se relaciona temporalmente com o aumento da proporção dos túbulos seminíferos e uma redução da densidade de macrófagos e demais células intersticiais (Clemmons et al., 1995).

De maneira semelhante ao observado em equinos, embora sem a presença de marcadores macroscópicos, as alterações morfofuncionais no parênquima testicular de suínos pré-púberes também obedecem a um padrão (Ford e Wise, 2009; Avelar et al., 2010). Nesse sentido, a maturação das células de Sertoli tem início nos túbulos localizados na área central do testículo e progride em direção à periferia (Ford e Wise, 2009). Sendo assim, a onda espermatogênica tem início nos túbulos próximos ao mediastino, uma vez que as células de Sertoli desta região já se encontram mais adiantadas no processo de maturação, secretando o fluido tubular e, portanto aptas a suportar o desenvolvimento da espermatogênese (Avelar et al., 2010). Não obstante o estabelecimento do microambiente, as células de Sertoli maduras presentes nesta região secretam ácido retinoico (RA), especialmente importante para a primeira onda da espermatogênese, haja vista que nesta etapa as células germinativas meióticas, responsáveis pela regulação de RA no interior dos túbulos seminíferos estão ausentes (revisão em Gewiss et al., 2019).

### **2.3 Células de Leydig e seu desenvolvimento**

As células de Leydig estão distribuídas entre os túbulos seminíferos, próximas aos vasos sanguíneos e, entre os túbulos e o tecido conjuntivo que compõe o mediastino e túnica albugínea (Russell e Brinster, 1996).

Ultra-estruturalmente estas células são identificadas pela presença de mitocôndrias com cristas tubulares e retículo endoplasmático liso abundante e desenvolvido, características que determinam a função esteroidogênica das células de Leydig (Bardin, 1996; Pelliniemi et al., 1996; Wu e Wan, 2007; Lervik et al., 2013). Nesse sentido, o hormônio luteinizante (LH), uma glicoproteína que assim como o FSH, tem sua síntese na adenohipófise estimulada pelo GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas). A ação do LH é mediada por receptores

localizados na membrana citoplasmática das células de Leydig e os esteroides sexuais secretados exercem um controle harmônico de retroalimentação negativa na produção de LH, tanto no hipotálamo quanto adenohipófise (Shupnik e Schreihofner, 1997; Rochira et al., 2006; Avelar et al., 2010). Receptores para andrógenos estão presentes nos diferentes tipos de células somáticas testiculares, incluindo as próprias células de Leydig, células de Sertoli, células peritubulares mioídes e células endoteliais (Schlatt et al., 1997; Suarez-Quian et al., 1998; Avelar et al., 2010).

O papel desempenhado pela testosterona na manutenção da espermatogênese, e ainda como fator anabólico para diversos tecidos não vinculados à atividade reprodutiva, já é bem estabelecido na literatura (Ewing e Zirkin, 1983; Deslypere et al., 1984; Fan e Robaire, 1998; Goyal et al., 1999; Kerr, 2006; Setchell e Breed, 2006; Costa et al., 2011; Yu et al., 2017). Em estudos envolvendo o xenoenxerto de fragmentos testiculares em camundongos imunodeficientes castrados, a maturação do parênquima testicular (do doador) e espermatogênese são moduladas pelo eixo hipotálamo-hipófise-gônada; nesse caso, o componente “gônada” é substituído pelo enxerto. Uma vez estimulado, o enxerto assume a produção de testosterona, que atua na restauração do peso e tamanho das glândulas seminais bem como na manutenção do percentual de massa magra dos camundongos receptores (Honaramooz et al., 2002; Schlatt et al., 2002; Schlatt et al., 2003; Snedaker et al., 2004). Portanto, foi demonstrado que um ciclo de retroalimentação endócrina é estabelecido entre o enxerto e o eixo hipotálamo-hipófise do hospedeiro e que os níveis de FSH diminuem até atingir os níveis normais, de precastração (Schlatt et al., 2003; Zeng et al., 2006).

A origem e a via de diferenciação de células precursoras de Leydig da população adulta são ainda temas de discussão na literatura (Shima, 2019). Apesar da origem mesenquimal sugerida por vários autores (Russell et al., 1995; Ge et al., 1996; Lejeune et al., 1998), atualmente já se considera que essas células podem compartilhar um precursor comum com as células de Leydig da população fetal, envolvendo mecanismos de desdiferenciação e rediferenciação (De Kretser e Kerr, 1994; Gaytan et al., 1994; Russell et al., 1995; Dombrowicz et al., 1996; Shima, 2019). Embora pouco frequentes, mitoses também podem ocorrer em células de Leydig adultas (Russell et al., 1995).

Em ratos, as células de Leydig fetais são gradualmente substituídas pela população adulta. O processo de maturação das células da população adulta tem início com as células progenitoras, que avançam e se diferenciam nas células imaturas e então, culmina com a célula madura da população adulta de células de Leydig (Setchell et al., 2003; Chen et al., 2017; Zirkin e Papadopoulos, 2018). Essas células podem ser diferenciadas pela sua morfologia e também pela capacidade de síntese, uma vez que as células imaturas produzem androstane-3 $\alpha$  e 17 $\beta$ -diol ao invés de testosterona, como o fazem as células maduras (Ge et al., 1996).

Uma fase anterior àquela das precursoras corresponderia às células de Leydig tronco. Estas células se diferenciam no testículo fetal e se comprometem com a formação da população de célula de Leydig fetal e como já mencionado, das precursoras da população adulta. Temporalmente, as células de Leydig fetais são responsáveis pela masculinização do feto e pelo descenso testicular, produzindo andrógenos e o fator semelhante à insulina 3 (INSL3); já as células de Leydig adultas são responsáveis pela produção de testosterona e demais esteroides sexuais para a manutenção das atividades associadas a eles (Kerr e Knell, 1988; Huhtaniemi e Pelliniemi, 1992; Haider, 2004; Barsoum e Yao, 2006; Wu e Wan, 2007; Avelar et al., 2010).

A maioria dos mamíferos investigados apresenta um padrão de desenvolvimento bifásico (fetal e pós-natal) das células de Leydig (Gondos et al., 1976). Porém, em suínos, assim como humanos e outros primatas, as células de Leydig apresentam 3 fases distintas de desenvolvimento, sendo uma fetal e duas durante o período pós-natal (Griswold e Behringer, 2009). Assim, a população fetal se diferencia no compartimento intertubular a partir de 30 dias pós-coito e, ao final da gestação, sua função é dependente da ação do LH (Van Straaten e Wensing, 1978; O'Shaughnessy e Fowler, 2011). Após o nascimento, a primeira onda de proliferação ocorre ao longo do primeiro mês de vida e estabelece a população infantil. Durante a fase de quiescência, que corresponde ao intervalo entre 1 e 3 meses de idade, ambas as populações de Leydig (fetal e infantil) passam por um processo de regressão. Portanto, a segunda onda de expansão pós-natal de células de Leydig em suínos tem início por volta de 3 meses e se estende até o 4º mês, sendo responsável pela determinação da população adulta destas células esteroideogênicas (Dierichs et al., 1973; Van Straaten e Wensing,

1978; França et al., 2000; Picut et al., 2018). Em suínos, o volume das células de Leydig e o número de receptores de LH e andrógenos alteram-se grandemente ao longo do desenvolvimento, sendo que cada célula de Leydig apresenta cerca de 80.000 sítios específicos de ligação para LH aos 30 dias pós-natais, e aproximadamente 35.000 sítios na fase adulta, não apresentando períodos sem a presença de sítios de ligação para esse hormônio (Dierichs et al., 1973; Van Straaten e Wensing, 1978b; Peyrat, et al., 1981; Lunstra e Christenson, 1986; França et al., 2000; Tripepi et al., 2000). Deste modo, o número de receptores estaria relacionado com o tamanho das células, e não com o seu estágio de maturação sexual (Peyrat et al., 1981).

## **2.4 Suínos**

O terceiro maior grupo de animais destinados ao comércio de carnes no Brasil é composto por suínos (“IBGE | Resultados do Censo Agro 2017,” n.d.), demonstrando a sua importância econômica para o país, uma vez que abrange uma grande área e engloba diferentes realidades sócio-culturais (da Silva et al., 2017). Já foi demonstrado que a engorda e melhor produção de carne destes animais estão relacionados com fatores genéticos (Šprysl et al., 2005). Os suínos também têm mostrado a sua importância como modelos animais em estudos de doenças humanas (Jiang e Rothschild, 2007; Bergfelder-Drüing et al., 2015; Yu et al., 2017). Além disso, guardam semelhança com o padrão de desenvolvimento testicular em humanos, uma vez que apresentam três fases distintas, inclusive devido à presença de um tipo celular visto em poucos mamíferos, as células de Leydig infantis (Van Straaten e Wensing, 1978; França et al., 2000; Griswold e Behringer, 2009;). Ademais, a maturação dos túbulos seminíferos de suínos se inicia na região central do parênquima (ID, intermediária e TR, transição; Figura 1) e parece estar relacionada com um aumento de tamanho das células de Leydig e da sua função na região intermediária (Avelar et al., 2010). Nesse contexto, e apesar da população de células de Leydig mais robusta se comparado com outras espécies (Kangawa et al., 2019) foi observado em suínos uma grande diferença regional em relação a características das células de Leydig. Assim, os volumes citoplasmático, nuclear e o tamanho individual são notavelmente maiores em ID do que nas outras

regiões, durante todo o desenvolvimento pós-natal, além de apresentarem baixo índice mitótico (Avelar et al., 2010). Contudo, estudos quanto ao fenótipo relacionado com a expressão de proteínas associadas à função específica dessas células ainda permanecem para serem realizados.

Os testículos de suínos são caracterizados como os “mais versáteis órgãos produtores de esteroides conhecidos” e geraram importantes materiais para pesquisa em diferentes áreas, como morfologia, fisiologia, genética e estudos acerca da espermatogênese (Raeside et al., 2006; Yu et al., 2017; Kangawa et al., 2019). Assim, o nosso estudo tem como foco os suínos, particularmente as diferenças fenotípicas e funcionais das células de Leydig da região intermediária (ID) do testículo, uma vez que essa região apresenta peculiaridades (Avelar et al., 2010), em comparação com as células de Leydig da região periférica (RP). Deste modo, o estudo teve como objetivo comprovar a hipótese de existência de duas populações funcional e morfológicamente diferentes de células de Leydig em testículos de suínos.

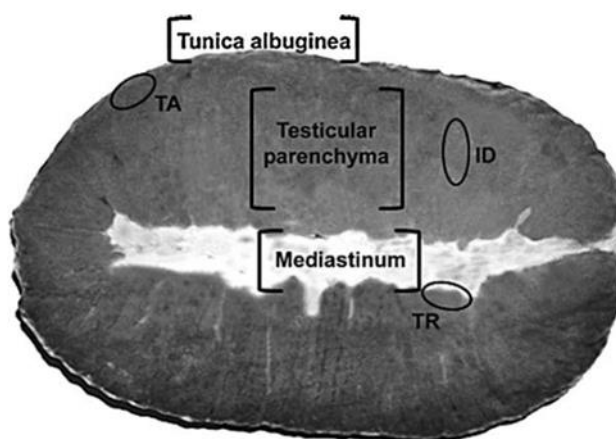


Figura 1: Representação das três regiões do parênquima testicular de suínos, determinadas de acordo com o gradiente de maturação tubular (Avelar et al., 2010). TA, região de túnica albugínea; ID, região intermediária; TR, região de transição.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

A partir dos estudos prévios realizados em nosso laboratório (Avelar et al., 2010) e conhecendo a morfologia distinta dessas prováveis subpopulações de Leydig, propomos no presente trabalho caracterizar fenotípica e funcionalmente as células de Leydig localizadas nas regiões periférica (subcapsular e adjacente ao mediastino) e intermediária do parênquima testicular de suínos aos 180 dias de idade (pós-púberes), bem como avaliar, por meio do xenoinxerto de fragmentos do parênquima testicular, a capacidade de síntese de andrógenos e a relação entre as células de Leydig e macrófagos das regiões periférica e intermediária.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Localizar, por meio de imunohistoquímica, os receptores para andrógeno (AR), hormônio luteinizante (LHR) e estrógeno  $\alpha$  ( $ER\alpha$ ), em células de Leydig das regiões ID e RP.

- Determinar, por meio da contagem de pixels, a intensidade da marcação obtida para as proteínas (AR, LHR,  $ER\alpha$ ) localizadas em ambas as regiões.

- Determinar o índice de proliferação por meio da identificação das células de Leydig positivas para o marcador de proliferação Ki67 nas regiões ID e RP.

- Avaliar a eficiência das células de Leydig das diferentes regiões do parênquima testicular (ID e RP) quanto à produção de andrógeno, utilizando o modelo de xenoinxerto em camundongos *nude*.

- Estabelecer a razão entre o número de macrófagos e células de Leydig nas diferentes regiões do parênquima testicular.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Animais experimentais**

Para os ensaios de imunohistoquímica foram utilizados blocos já existentes no acervo do Laboratório de Biologia Celular, provenientes do estudo realizado por Avelar et al., 2010. Assim, foram selecionados fragmentos de testículos de 4 suínos pós-púberes (180 dias de idade), provenientes da Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa, localizada no município de Igarapé-MG e vinculada à Escola de Veterinária da UFMG.

Para a avaliação da eficiência de síntese de andrógenos e quantificação de macrófagos nas diferentes regiões do parênquima, testículos de três suínos aos 07 dias de idade foram obtidos junto à Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa. Os testículos foram coletados de acordo com as diretrizes de manejo em granjas comerciais, seguindo técnica asséptica e sob orientação veterinária, transferidos para HBSS (*Hank's Buffered Salt Solution*) contendo 0,1% de antibiótico, e transportados em gelo ao Laboratório de Biologia Celular/ICB-UFMG.

Para a desenvolvimento do modelo de xenoenxerto, seis camundongos imunodeficientes NCr-BALB/c *nude* machos, sexualmente maduros e castrados foram utilizados como receptores. Durante todo o período experimental estes animais foram mantidos em microisoladores ventilados (Alesco®), sob condições de fotoperíodo controlado (12h luz, 12h escuro) com acesso à ração autoclavada (Nuvilab CR1 Autoclavável) e água filtrada, *ad libitum*.

Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com protocolos institucionais de cuidados com os animais e seguiram diretrizes aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG) (Protocolo nº123/2013).

### **4.2 Coleta e processamento dos testículos**

Previamente à cirurgia, os suínos foram sedados com 1 mg/Kg de azaperone (Destress, Des-Far Laboratórios LTDA, São Paulo, SP, Brasil) pela via intramuscular, e anestesiados com 3 mg/Kg de associação zolazepam e



tiletamina (Zoletil 50; Vibrac do Brasil, Ind. e Com. LTDA, São Paulo, Brasil) pela via endovenosa. Os animais foram orquiectomizados e os testículos, após serem separados do epidídimo, foram pesados e seccionados longitudinalmente. Os fragmentos de testículo foram obtidos de 3 diferentes regiões do parênquima testicular: próximo à túnica albugínea (TA); na transição dos túbulos seminíferos e o mediastino (*rete testis*) (RT); e na região intermediária (ID) entre TA e RT (Figura 1). Estas amostras foram fixadas por imersão em paraformaldeído 4% (tamponado em PBS), incluídas em paraplast e rotineiramente preparadas para análises histológicas. A partir do conhecimento que células de Leydig adjacentes ao mediastino são morfometricamente semelhantes àsquelas subcapsulares (Avelar et al., 2010), consideramos estas regiões dentro de um único grupo, referido nas próximas seções deste trabalho como região periférica (RP).

### 4.3 Imunohistoquímica

Fragmentos dos testículos dos animais descritos em 3.2, destinados à imunohistoquímica, foram desparafinizados em xilol e hidratados em concentrações decrescentes de etanol e água destilada. Em seguida, a recuperação antigênica foi realizada utilizando-se tampão citrato (pH 6,0) em banho-maria por quarenta minutos a 80°C. Após o resfriamento, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena utilizando-se peróxido de hidrogênio em metanol (para marcação de membrana, utilizado peróxido de hidrogênio em tampão fosfato, PBS) a 3% por 30 minutos. As lâminas foram incubadas com soro normal específico a 10%, por 10 minutos e, em seguida, com o anticorpo primário “*overnight*” a 4°C. Todos os anticorpos foram previamente testados quanto à titulação ideal. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em tampão e incubadas a temperatura ambiente com o anticorpo secundário biotilado pertinente, por 20 minutos, e com complexo estreptavidina-peroxidase (Peroxidase Dual Link System - Dako Envision), por 30 minutos. A reação foi revelada com 3,3'-diaminobenzidina (DAB) e os cortes contra-corados com Hematoxilina de Harris. É importante mencionar que para fins de quantificação, as lâminas relacionadas a um mesmo marcador foram reveladas de maneira padronizada. Foram utilizados anticorpos para AR (1:100), LHR (1:50), ER $\alpha$

(1:100), Ki67 (1:50) (respectivamente, sc-815, Santa Cruz; sc-24828, Santa Cruz; sc-542, Santa Cruz; 550609, BD Biosciences; sc-30820).

#### **4.4 Quantificação da marcação por intensidade de pixels**

A fim de quantificar a marcação obtida para os receptores de andrógeno, de hormônio luteinizante e de estrógeno  $\alpha$  nas células de Leydig, foram capturadas imagens aleatórias do parênquima testicular de cada animal, de modo que foram selecionadas aproximadamente 150 células por grupo. As imagens foram documentadas com a utilização do fotomicroscópio BX60 Olympus acoplado ao sistema de captura Q-Color 3/Olympus. Cada uma dessas imagens foi tratada no programa Photoshop CS3 v10.0 sendo convertidas em escala de cinza, e, em seguida, as cores foram invertidas. Após esse passo, as mesmas foram analisadas no programa ImageJ. As células marcadas foram circuladas (o núcleo inteiro nas marcações nucleares ou uma região de citoplasma para marcações citoplasmáticas) e os valores obtidos no histograma (que correspondem à intensidade de pixels) foram coletados. Os valores das médias de todas as células marcadas foram plotados em tabelas.

Para se excluir a variação de *background* e interferência da marcação por hematoxilina, circulou-se uma região homóloga em células não marcadas (citoplasma ou núcleo) e o valor obtido no histograma foi subtraído dos valores de cada célula avaliada. Assim, foram tratados estatisticamente somente os valores referentes às marcações com os anticorpos, sem interferências de marcações inespecíficas e da coloração com hematoxilina.

#### **4.5 Análise de proliferação**

Uma vez finalizada a imunomarcação para Ki67, as lâminas foram montadas e analisadas por meio de microscópio óptico para detecção de proliferação de células de Leydig. Desse modo, foi possível determinar as taxas de proliferação a partir da contagem de 4.000 núcleos de células de Leydig (positivas ou negativas) em cada uma das regiões.

#### **4.6 Xenoenxerto**

Os testículos dos suínos coletados a partir da castração de animais da Fazenda Experimental Professor Hélio Barbosa foram tratados dentro de fluxo laminar, com material estéril e embebidos em solução salina HBSS.

Os testículos ainda contidos pelas fâscias espermáticas foram levados ao fluxo laminar, retirados do fluido de transporte e higienizados com álcool 70%. Em seguida, as membranas envoltórias foram retiradas e as gônadas depositadas em placas de petri estéreis. Com o auxílio de lâmina de bisturi nº 24, os testículos foram seccionados ao longo de seu maior eixo e fragmentos com aproximadamente 8mm<sup>3</sup> foram obtidos das regiões periférica (próximo ao tecido conjuntivo) e central do parênquima testicular. Os tecidos foram armazenados em meio de cultura DMEM/F12 (Gibco™) até o momento da realização do enxerto.

Os camundongos receptores foram anestesiados com a associação de cloridrato de cetamina (135 mg/Kg PV, Vetanarcol, König, Brasil) e cloridrato de xilazina (6mg/Kg PV, Dopaser, Calier, Espanha). Inicialmente, os animais foram orquiectomizados e em seguida, posicionados em decúbito ventral. Quatro incisões com aproximadamente 0,5 cm foram produzidas; 2 craniais e medialmente às escápulas e 2 caudais, junto às cristas ilíacas. Após divulsão romba, fragmentos das diferentes regiões testiculares foram inseridos na camada subcutânea dos camundongos. A sutura foi realizada com fio monofilamento nylon 5.0. Os animais foram mantidos sobre uma superfície aquecida a 37° C até recuperação da anestesia. Os camundongos foram divididos em dois grupos, definidos de acordo com a origem do fragmento: parênquima central (ID) ou periférico (RP), sendo n = 3 por grupo. Os procedimentos cirúrgicos realizados foram realizados por médica veterinária treinada.

#### **4.7 Análise da proporção de células de Leydig por macrófagos**

Aos 31 dias após a cirurgia de xenoenxerto, os animais foram injetados com 300 µL de solução 2% de azul de tripan através da via intraperitoneal. Doze horas após a injeção, os animais foram eutanasiados com o correspondente a

3x a dose anestésica de cloridrato de cetamina (Vetanarcol, König, Brasil) e cloridrato de xilazina (Dopaser, Calier, Espanha), em associação. As vesículas seminais foram dissecadas e pesadas para verificação da eficiência do andrógeno produzido pelo enxerto. Os enxertos foram coletados, pesados e fixados em paraformaldeído 4% (tamponado em PBS) e glutaraldeído 4% (tamponado em tampão fosfato) para inclusão em paraplast e metacrilato, respectivamente. Os fragmentos incluídos em paraplast foram corados com hematoxilina de Harris e levados ao microscópio, onde foram contadas 1.000 células por lâmina, entre macrófagos e células de Leydig. Os tecidos incluídos em metacrilato foram corados com azul de toluidina + borato de sódio 1% e o total de 1.000 células, entre Leydig e macrófagos, por lâmina, foram contadas.

#### **4.8 Avaliação da testosterona periférica**

Para mensurar os níveis de testosterona, o sangue foi coletado diretamente da base cardíaca após secção dos grandes vasos e as amostras assim obtidas foram centrifugadas por 20 minutos a 4°C e 2.000 rpm para obtenção do soro. As alíquotas de soro foram processadas na plataforma automatizada Cobas 8000 (Roche Diagnostics Inc., Indianápolis, IN, EUA) e o ensaio de quimiluminescência foi realizado para a avaliação direta da testosterona. O menor nível de quantificação foi de 10 ng/dL (coeficiente de variação intra-ensaio entre 1,7% e 4,6%). Estes procedimentos foram realizados no Laboratório Tecsa (Tecnologia em Sanidade Animal) em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

#### **4.9 Análises estatísticas**

Os dados quantitativos foram avaliados quanto à normalidade e homocedacidade, com o teste de Kolmogorov-Smirnov. Quando apresentaram distribuição normal, os dados foram analisados para a presença de *outliers* pela ferramenta *Outlier Calculator*, submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo pós-teste de t. Os dados não paramétricos foram avaliados por meio do teste Kruskal-Wallis, e a diferença entre as médias foi determinada pelo pós-teste de Mann-Whitney. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa GraphPadPrism 6 (GraphPad Software, Inc).

Os resultados obtidos foram expressos como média  $\pm$  Dp (desvio padrão da média) e o nível de significância considerado foi de  $p \leq 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Localização e intensidade de marcação de AR, LHR e ER $\alpha$

A localização e intensidade de marcação para AR, LHR e ER $\alpha$  em células de Leydig nas duas diferentes regiões dos testículos podem ser observadas na Figura 2. Não foram verificadas diferenças para AR e LHR quanto à presença, tampouco imunorreatividade, obtida pela análise semiquantitativa de pixels, entre as células de RP e ID (Fig. 2A – A<sub>2</sub>; 2B – B<sub>2</sub>). Entretanto, ER $\alpha$  apresentou menor intensidade de marcação nas células de Leydig de RP ( $p < 0,05$ ) quando comparada a ID (Fig. 2C – C<sub>2</sub>). Para as análises de AR ( $p = 0,3468$ ) e LHR ( $p = 0,8575$ ), foi utilizado o teste t; e para ER ( $p = 0,0118$ ), foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

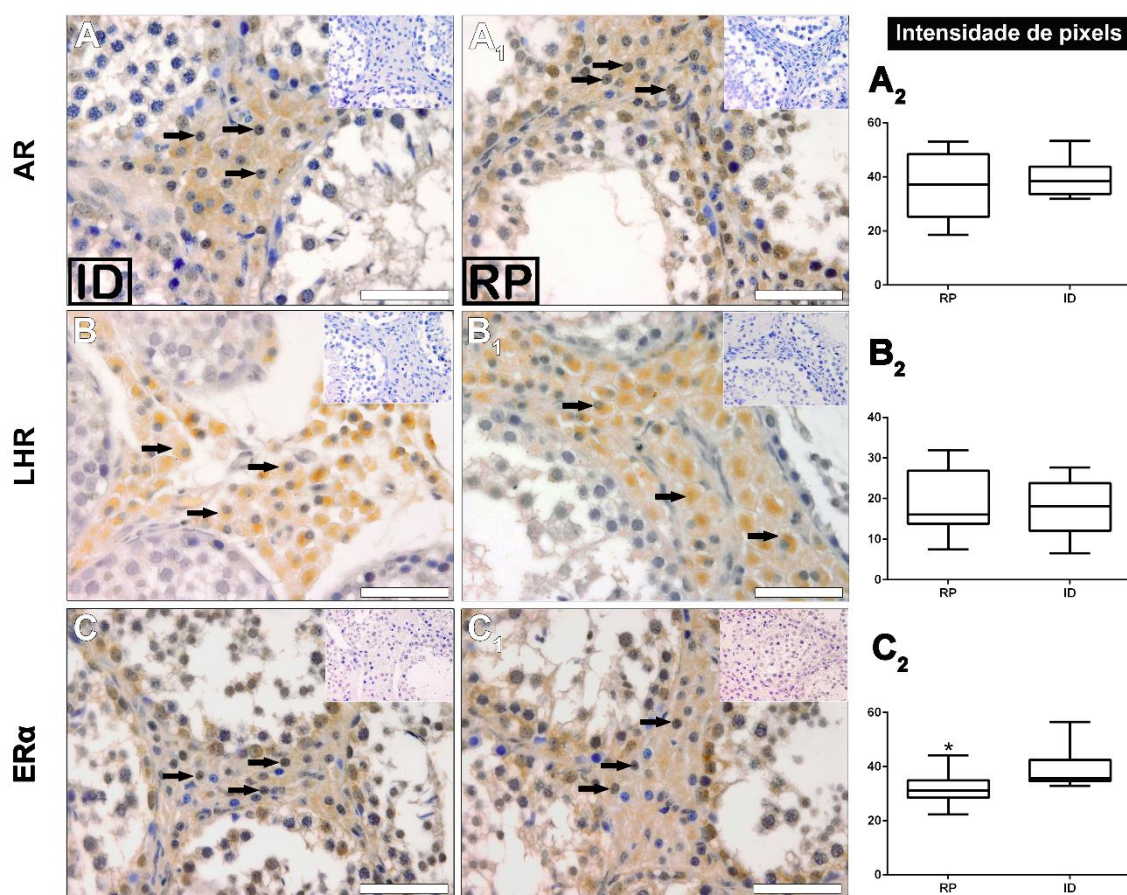


Figura 2: Fotomicrografias representativas do parênquima testicular da região intermediária (ID; A, B, C) e periférica (RP; A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub>, C<sub>1</sub>) do testículos de suínos pós-púberes, apresentando imunorreatividade para os receptores de andrógeno

(AR), LH (LHR) e estrógeno ( $ER\alpha$ ), e a intensidade de marcação ( $A_2$ ,  $B_2$ ,  $C_2$ ). Mesmo padrão de marcação foi obtido para AR e LHR, seja em relação à distribuição subcelular ou intensidade de marcação ( $A - A_2$ ,  $B - B_2$ ).  $ER\alpha$  apresentou localização nuclear ( $C$ ,  $C_1$ ) embora com menor intensidade ( $p < 0,05$ ) nas células de Leydig de RP ( $C_2$ ). Setas pretas indicam células de Leydig positivas para cada um dos marcadores investigados. Insertos, mostram o controle negativo da imunohistoquímica. Barra = 50  $\mu$ m.

## 5.2 Proliferação de células de Leydig

Células de Leydig-Ki67<sup>+</sup> foram observadas em ambas as regiões investigadas (Fig. 3A e 3B). Os índices de proliferação (% células Ki67<sup>+</sup>) obtidos para as regiões RP e ID (Fig. 3C) foram respectivamente,  $13,8 \pm 2,35$  e  $6,1 \pm 1,61$ , sendo analisadas estatisticamente pelo teste de Mann-Whitney. Assim, apresentou-se significativamente menor na região intermediária ( $p = 0,0286$ ).

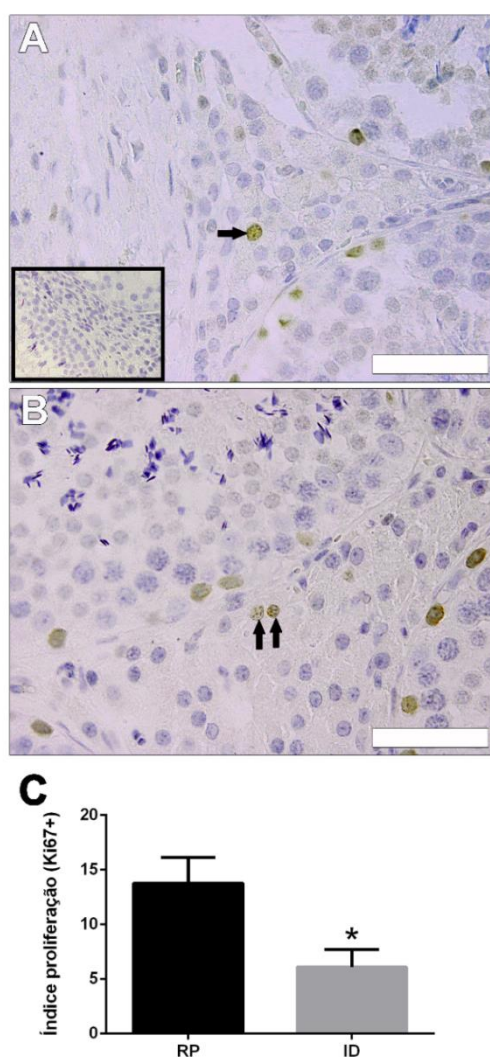


Figura 3: Fotomicrografias representativas da região periférica (A) e intermediária (B) do testículo de suínos pós-púberes mostrando células de Leydig positivas para o marcador de proliferação Ki67 e o índice de proliferação obtido para essas células. Apesar de presentes nas duas regiões, células de Leydig Ki67<sup>+</sup> foram menos frequentes em ID ( $p < 0,05$ ). Setas pretas indicam células de Leydig positivas para cada um dos marcadores investigados. Insetos, mostram o controle negativo da imunohistoquímica. Barra = 50  $\mu$ m.

### 5.3 Avaliação da eficiência esteroidogênica

A avaliação da capacidade de síntese de esteroides sexuais nas diferentes regiões foi realizada utilizando o modelo de xenoinxerto de fragmentos testiculares. Assim, foram recuperados 23 dos 24 enxertos realizados, indicando uma taxa de sucesso de 96% com relação ao *engrafting*, ou seja, a capacidade do tecido se estabelecer e desenvolver no animal receptor. Nesse contexto, o único fragmento que não desenvolveu foi de ID (11/12).

A análise histológica dos fragmentos mostrou cordões seminíferos, constituídos pela túnica própria, envolvendo as células de Sertoli imaturas e gonócitos/espermatogônias A, enquanto no interstício foram observadas células de Leydig, macrófagos e demais componentes do tecido conjuntivo, além dos vasos sanguíneos e linfáticos (Fig. 4E-F). As células de Leydig, além de abundantes no compartimento intersticial, apresentavam tamanho individual distinto de acordo com a origem do enxerto (RP ou ID).

O peso dos enxertos não variou de maneira significativa entre os grupos (Fig. 4A). A vesícula seminal, um marcador biológico importante da função dos andrógenos periféricamente, não apresentou diferença significativa para o peso entre os grupos, apesar da tendência observada para RP (Fig. 4B). Adicionalmente, os valores encontrados para vesícula seminal foram equivalentes ao daqueles observados em camundongos não castrados, indicando atividade androgênica nos receptores castrados no momento da realização do enxerto.

De modo geral, os níveis séricos de testosterona foram semelhantes entre os grupos investigados, mas quando observada a tendência, verificou-se um



comportamento inverso ao peso da vesícula seminal. Assim, a concentração sérica média de testosterona tendeu a ser maior em ID ( $p = 0,700$ ) (Fig. 4C). Diante disso, verificamos que ID produziu aproximadamente 1,5 vezes mais andrógeno por grama de enxerto em comparação com RP (Fig. 4D).

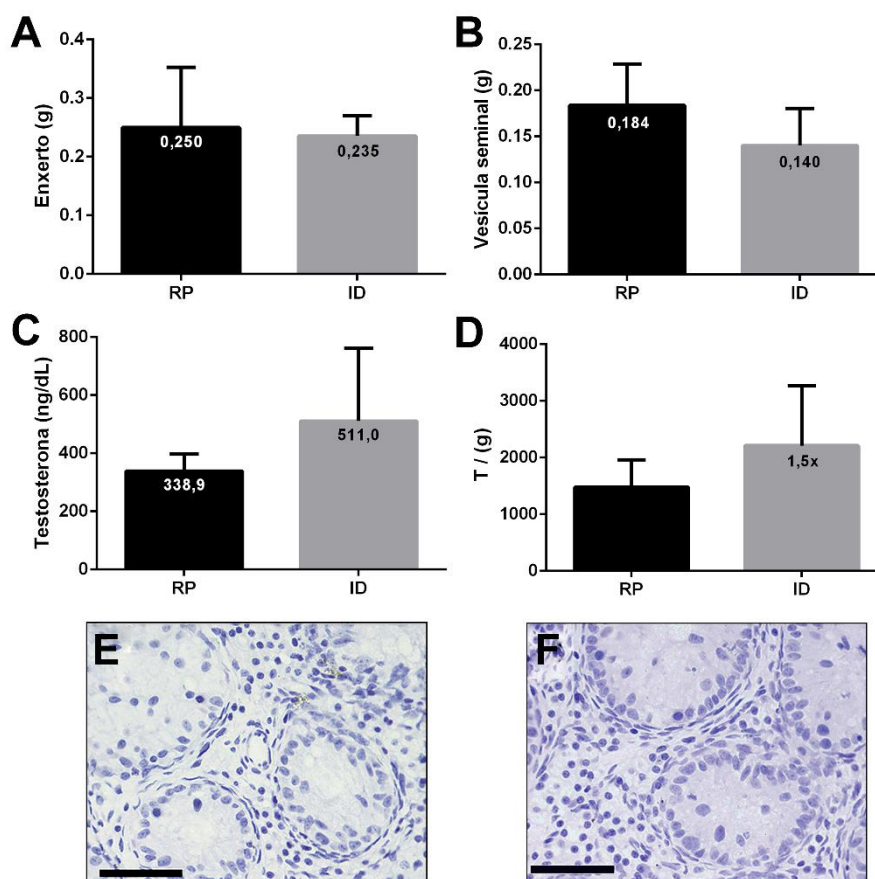


Figura 4: Avaliação *in vivo* da atividade esteroidogênica de células de Leydig das diferentes regiões do parênquima testicular de doadores suínos jovens (7dpn), utilizando o modelo de xenoenxerto em camundongos imunodeficientes. Não observou-se diferença de peso dos fragmentos (A) das regiões periférica (RP) e intermediária (ID) ( $p = 0,700$ ), tampouco no peso da vesícula seminal (B) ( $p = 0,400$ ), 32 dias após o enxerto. A concentração periférica de testosterona (C) ( $p = 0,700$ ) e a proporção de testosterona por grama de parênquima testicular (D) ( $p = 0,700$ ) não diferiu entre os grupos, contudo ID produziu 1,5 vezes mais andrógenos que RP. Em E (RP) e F (ID) observa-se as características histológicas do parênquima testicular, compatíveis com o corte *in situ* (Avelar et al., 2010). Dpn; dias pós-natal. Barra = 50  $\mu$ m.

#### 5.4 Proporção células de Leydig por macrófago

A contagem do número de macrófagos foi realizada com o auxílio do corante vital azul de tripan. Portanto, os macrófagos foram identificados nos cortes histológicos como células com morfologia variada, com distribuição intersticial e peritubular, mas que apresentavam em seu citoplasma granulações amareladas ou arroxeadas (Fig. 5A-B). Assim, a proporção entre o número de células de Leydig por macrófago obtida foi 8:1 e 10:1, respectivamente, em RP e ID, sendo  $p = 0,0694$  (Fig. 5C).

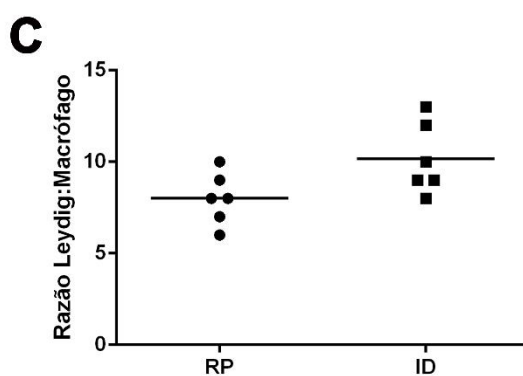
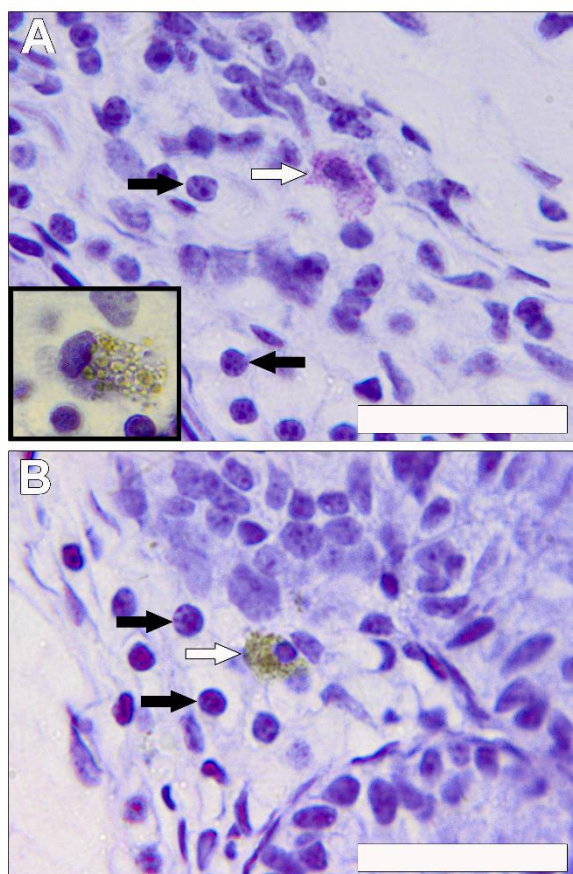


Figura 5: Fotomicrografias apresentando as características dos macrófagos de diferentes regiões do parênquima testicular de doadores suínos jovens (7dpm) e a proporção entre células de Leydig e macrófagos, 32 dias após a realização do enxerto em camundongos receptores imunodeficientes. Para melhor identificação dos macrófagos, os camundongos receptores receberam o corante vital azul de tripan, sendo assim possível observá-los adjacentes ao tecido conjuntivo na RP, conforme pode ser visto em A, ou intersticiais presentes em ID (B) e também em RP (inserto em A). O número de células de Leydig por macrófagos foi semelhante entre as regiões estudadas. Setas pretas indicam núcleos de células de Leydig. Setas brancas indicam macrófagos que incorporaram o azul de tripan. Barra = 50  $\mu$ m.

## 6. DISCUSSÃO

No presente estudo foi possível descrever diferenças funcionais região-específicas das células de Leydig no compartimento intersticial dos testículos de suínos pós-púberes, estabelecendo assim um fenótipo para essas subpopulações de células. Além disso, a partir dos nossos estudos, é possível sugerir que as células progenitoras da população adulta de Leydig de suínos, ou seja, células Ki67<sup>+</sup>, localizadas preferencialmente na região periférica, são menos responsivas aos estrógenos testiculares, embora a capacidade esteroidogênica e a proporção de macrófagos não seja significativamente diferente entre as regiões, conforme observado nos ensaios *in vivo* utilizando o xenoenxerto de fragmentos de parênquima testicular.

Assim, a maior intensidade de marcação obtida para ER $\alpha$  em ID sugere que as células de Leydig desta região sejam mais responsivas aos estrógenos. Essa hipótese é corroborada por outros achados do presente estudo, como a ausência de diferenças para os receptores de outras moléculas particularmente importantes para a função esteroidogênica destas células (AR e LHR). Nesse sentido, os estrógenos parecem desempenhar importante papel modulador para funções específicas desta população de células de Leydig, funções estas que podem relacionar-se com uma via direta e independente do LH para estimular a atividade esteroidogênica ou ainda, otimizando a expressão de CYP19A1, importante para a conversão de testosterona em estradiol. É consenso na literatura que os estrógenos têm importante função reguladora na atividade testicular de suínos, e estudos mostraram evidências do seu importante papel no desenvolvimento pós-natal da gônada masculina (At-Taras et al., 2006; Berger et al., 2013) e no controle da espermatogênese (Wagner et al., 2006; Schuler et al., 2018). Porém, mais estudos são necessários para melhor elucidar a função dos estrógenos nos testículos desses animais bem como a relação desses hormônios com a atividade das células de Leydig maduras, principalmente aquelas localizadas na região intermediária do parênquima testicular (Braun et al., 2018; Hess e Cooke, 2018).

No presente estudo foi possível identificar células com características morfológicas de Leydig, imunorreativas para o marcador de proliferação celular

Ki67, nas duas regiões investigadas embora o índice de proliferação tenha sido maior na região periférica. Quando consideramos os resultados de proliferação frente aos achados relacionados com a intensidade de marcação de ER $\alpha$ , verificamos que as células presentes na região periférica provavelmente ainda não estariam terminalmente diferenciadas. Nesse sentido, é sabido que células de Leydig maduras não proliferam, sendo essa atividade desempenhada pelas progenitoras. Assim, são formadas as células imaturas que, após desenvolverem a maquinaria intracelular para a produção plena de esteroides, se tornam maduras (Ariyaratne e Mendis-Handagama, 2000). Adicionalmente, é bem estabelecida a relação entre o conteúdo de retículo endoplasmático liso e produção de esteroides sexuais (Ewing et al., 1979; Zirkin et al., 1980), e conforme demonstrado por Avelar e colaboradores (Avelar et al., 2010), as células de Leydig em ID apresentam-se hipertrofiadas em comparação à região periférica. Assim, estudos ultra-estruturais que possibilitem avaliar comparativamente as células de Leydig de ID e RP ainda permanecem como perspectiva para o presente estudo.

Desde o início dos anos 2000, o xenoenxerto de fragmentos de testículos em camundongos imunodeficientes tem sido utilizado como uma importante ferramenta para o estudo da função testicular de várias espécies de mamíferos (Honaramooz et al., 2002; Arregui e Dobrinski, 2014). Nesse sentido, a preservação do microambiente da espécie doadora favorece o desenvolvimento da espermatogênese, mesmo as gonadotrofinas (LH e FSH) sendo de origem alógena (camundongo receptor). Espermatogênese completa e gametas viáveis, inclusive com a formação de prole, já foram relatados (Honaramooz et al., 2002; Nakai et al., 2010). Diante desse cenário altamente favorável, utilizamos esta metodologia para investigar, de maneira comparada, a capacidade de síntese de esteroides sexuais bem como a população de macrófagos, por meio do uso de azul de tripan, nas diferentes regiões do parênquima testicular. Assim, foi observado o aumento do volume médio dos fragmentos (RP, 250 mm<sup>3</sup>; ID, 235 mm<sup>3</sup>), haja vista o volume inicial médio em torno de 8 mm<sup>3</sup>. O peso da vesícula seminal corresponde a um marcador da biossíntese de andrógenos, particularmente neste modelo, uma vez que os camundongos receptores são castrados no momento do enxerto. Assim, a presença de vesícula seminal

funcional é resultado da ação dos andrógenos produzidos pelas células de Leydig dos enxertos. Em nosso estudo, as vesículas seminais dos camundongos receptores estavam igualmente desenvolvidas entre os grupos com enxertos das duas regiões do parênquima e semelhantes ao relatado na literatura (Li et al., 2019), refletindo assim não somente o sucesso do enxerto, mas também a capacidade semelhante de ID e RP para produção de andrógenos.

A ausência de diferença para a concentração periférica média de testosterona não invalida a discussão de uma interessante tendência, uma vez observado que ID gerou aproximadamente 1,5 vezes mais testosterona que RP, de acordo com a normalização realizada no presente trabalho, que considerou a concentração de testosterona periférica por grama de parênquima testicular. Nesse sentido, a concentração periférica deste andrógeno pode não mimetizar o contexto testicular, uma vez que a intensidade de marcação para AR nas células de Leydig de ID foi semelhante ao encontrado para RP, sugerindo que andrógenos medeiam funções relacionadas intrinsecamente à natureza da célula de Leydig enquanto estrógenos estariam mais associados ao controle das funções adquiridas já na fase de célula madura, como sugerido no presente estudo. Nesse aspecto é importante mencionar que os dados obtidos para concentração de testosterona periférica resultaram do ensaio de xenoenxerto, de modo que o parênquima testicular responsável pela produção de andrógenos ainda não havia avançado na espermatogênese ao longo do intervalo de 32 dias, conforme considerado neste trabalho. Portanto, consideramos ainda como importante perspectiva deste estudo a realização de novos xenoenxertos, porém aguardar um período de no mínimo 90 dias para o estabelecimento da espermatogênese completa e então, procedermos com as mesmas avaliações.

De acordo com as razões obtidas no presente estudo, foi possível verificar que os macrófagos estão mais densamente localizados em RP e essa diferença apresentou forte tendência, conforme observado pelo valor de  $p$  (0,0694). Essa maior densidade de macrófagos tem um importante significado funcional, pois aponta uma forte interação com as células de Leydig em RP. Segundo nossos achados indicam, esta população de células de Leydig ainda não está completamente madura, entretanto, é bem estabelecido que a esteroidogênese

nas células de Leydig é modulada por macrófagos (Lara et al., 2018). Diante disso, o papel desempenhado pelos macrófagos nesta região ainda permanece para ser melhor elucidado. Conforme mencionado anteriormente, este estudo será também reproduzido no modelo de xenoenxerto em estágio de maturação mais avançado, isto é, com espermatogênese completa.

Finalmente, de modo geral nossos resultados corroboram com os dados obtidos por Avelar et al. (2010), no entanto o presente estudo acrescenta um refinamento aos parâmetros para caracterização das distintas células de Leydig para além das avaliações estereológicas, uma vez que propõem marcadores fenotípicos para essas células.

## 7. CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

A partir dos dados obtidos no presente estudo podemos concluir que existem no parênquima testicular de suínos duas populações de células de Leydig com características fenotípicas distintas. Assim, de maneira geral as células de RP apresentam menor expressão de ER $\alpha$  e são mais positivas para Ki67, além estarem em um meio no qual a densidade de macrófagos tende a ser maior. Por outro lado, as células de Leydig de ID são mais fortemente marcadas por ER $\alpha$  e o índice de proliferação é menor, associado ao fato deste meio ter menor densidade de macrófagos. Diante desses achados, sugerimos que RP represente uma região do parênquima testicular com maior potencial de células progenitoras de Leydig, portanto mais imaturas, e que ID concentra as células de Leydig terminalmente diferenciadas.

A fim de esclarecer a interação entre macrófagos e células de Leydig nas diferentes regiões do parênquima, são perspectivas deste estudo realizar mais experimentos de xenoenxerto das duas regiões, RP e ID, permitindo que os fragmentos permaneçam nos receptores até o estabelecimento da espermatogênese, que ocorre por volta de 90 dias após o enxerto. Com estes fragmentos será possível investigar outras enzimas da via esteroidogênica, tais como 3 $\beta$ -HSD, aromatase (CYP19A1), responsável pela conversão de testosterona em estrógeno, e de 5 $\alpha$ -redutase, que participa da redução de testosterona em di-hidrotestosterona, ampliando assim a caracterização fenotípicas das células de Leydig. Nestas condições, estamos propondo a utilização de CD163, considerado marcador específico dos macrófagos em suínos para investigarmos de maneira mais acurada, as suas funções.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aiyama, Y., Tsunekawa, N., Kishi, K., Kawasumi, M., Suzuki, H., Kanai-Azuma, M., ... Kanai, Y. (2015). A Niche for GFR $\alpha$ 1-Positive Spermatogonia in the Terminal Segments of the Seminiferous Tubules in Hamster Testes. *STEM CELLS*, 33(9), 2811–2824. <https://doi.org/10.1002/stem.2065>
- Anton, F., Morales, C., Aguilar, R., Bellido, C., Aguilar, E., & Gaytán, F. (1998). A Comparative Study of Mast Cells and Eosinophil Leukocytes in the Mammalian Testis. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 45(1–10), 209–218. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.1998.tb00819.x>
- Ariyaratne, H. B. S., & Mendis-Handagama, S. M. L. C. (2000). Changes in the Testis Interstitium of Sprague Dawley Rats from Birth to Sexual Maturity. *Biology of Reproduction*, 62(3), 680–690. <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.3.680>
- Arregui, L., & Dobrinski, I. (2014). Testis tissue xenografting: twelve years of an in vivo spermatogenesis system. *Reproduction*, REP-14.
- At-Taras, E. E., Berger, T., McCarthy, M. J., Conley, A. J., Nitta-Oda, B. J., & Roser, J. F. (2006). Reducing Estrogen Synthesis in Developing Boars Increases Testis Size and Total Sperm Production. *Journal of Andrology*, 27(4), 552–559. <https://doi.org/10.2164/jandrol.05195>
- Avelar, G. F., Oliveira, C. F. A., Soares, J. M., Silva, I. J., Dobrinski, I., Hess, R. A., & França, L. R. (2010). Postnatal somatic cell proliferation and seminiferous tubule maturation in pigs: A non-random event. *Theriogenology*, 74(1), 11–23. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2009.12.014>
- Bardin, C. W. (1996). Androgens: early attempts to evaluate Leydig cell function in man. *The Leydig Cell*. Cache River Press, Vienna, IL, 30–42.
- Barsoum, I., & Yao, H. H. (2006). The road to maleness : from testis to Wolffian duct. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 17(6). <https://doi.org/10.1016/j.tem.2006.06.009>
- Berger, T., Conley, A. J., Van Klompenberg, M., Roser, J. F., & Hovey, R. C. (2013). Increased testicular Sertoli cell population induced by an estrogen receptor antagonist. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 366(1), 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.11.011>
- Bergfelder-Drüing, S., Grosse-brinkhaus, C., Lind, B., Erbe, M., Schellander, K., Simianer, H., & Tholen, E. (2015). A Genome-Wide Association Study in Large White and Landrace Pig Populations for Number Piglets Born Alive. *PLOS ONE*, 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117468>
- Bouin, P., & Ancel, P. (1905). La glande interstitielle du testicule chez le cheval. *Arch Zool Exp Gen*, 3, 391 – 437.
- Braun, B. C., Okuyama, M. W., Müller, K., Dehnhard, M., & Jewgenow, K. (2018). Steroidogenic enzymes, their products and sex steroid receptors during testis development and spermatogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 178, 135–149. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.11.013>
- Capel, B. (2000). The battle of the sexes. *Mechanisms of Development*, 92, 89–103.
- Chen, H., Wang, Y., Ge, R., & Zirkin, B. R. (2017). Leydig cell stem cells: Identification, proliferation and differentiation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 445, 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.10.010>
- Chen, M., Wilson, C. W., Li, Y., King, K., Law, L., Lu, C., ... Chuang, P. (2009).

- Cilium-independent regulation of Gli protein function by Sufu in Hedgehog signaling is evolutionarily conserved. *Genes and Development*, 23, 1910–1928. <https://doi.org/10.1101/gad.1794109.issue>.
- Clemmons, A. M. Y. J., Thompson, D. L., & Johnson, L. (1995). Local Initiation of Spermatogenesis in the Horse. *Biology of Reproduction*, 1267, 1258–1267.
- Combes, A. N., Wilhelm, D., Davidson, T., Dejana, E., Harley, V., Sinclair, A., & Koopman, P. (2009). Endothelial cell migration directs testis cord formation. *Developmental Biology*, 326(1), 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.10.040>
- Courot, M., Hochereau, D. E., Reviere, M. T., & Ortavant, R. (1970). Spermatogenesis. *The Testis*, 1, 339 – 442.
- da Silva, I. C. M., Bremm, B., Teixeira, J. L., Costa, N. S., Barcellos, J. O. J., Braccini, J., ... McManus, C. (2017). Spatialization of Brazilian pig production: relationship between productive, physical, environmental, and socio-economic variables. *Tropical Animal Health and Production*, 49(5), 951–958. <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1281-0>
- De Kretser, D. M. (1994). The cytology of the testis. *The Physiology of Reproduction*.
- De Kretser, M., & Kerr, J. B. (1994). The cytology of the testis. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 1177–1290.
- Dierichs, R., Wrobel, K. H., & Schilling, E. (1973). Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an den Leydigzellen des Schweines während der postnatalen Entwicklung. *Z. Zellforsch*, 143, 207–227.
- Dirami, G., Poulter, L. W., & Cooke, B. A. (1991). Separation and characterization of Leydig cells and macrophages from rat testes. *Journal of Endocrinology*, 130(3), 357–365. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1300357>
- Dombrowicz, D., Sente, B., Reiter, E., & Hennen, G. (1996). Pituitary of Leydig Immature Control of Proliferation and Differentiation Cells and Their Putative Precursors in Hypophysectomized Rat Testis. *Journal of Andrology*, 17(6).
- Erickson, B. H. (1964). Effects of neonatal gamma irradiation on hormone production and spermatogenesis in the testis of the adult pig. *Journal of Reproduction and Fertility*, 8, 91–100.
- Ewing, L. L., Zirkin, B. R., Cochran, R. C., Kromann, N., Peters, C., & Ruiz-Bravo, N. (1979). Testosterone Secretion by Rat, Rabbit, Guinea Pig, Dog, and Hamster Testes Perfused in Vitro: Correlation with Leydig Cell Mass. *Endocrinology*, 105(5), 1135–1142. <https://doi.org/10.1210/endo-105-5-1135>
- Fawcett, D. W., Neaves, W. B., & Flores, M. N. (1973). Comparative Observations on Intertubular Lymphatics and the Organization of the Interstitial Tissue of the Mammalian Testis. *Biology of Reproduction*, 9, 500–532.
- Figueiredo, A. F. A., França, L. R., Hess, R. A., & Costa, G. M. J. (2016). Sertoli cells are capable of proliferation into adulthood in the transition region between the seminiferous tubules and the *rete testis* in Wistar rats. *Cell Cycle*, 15(18), 2486–2496. <https://doi.org/10.1080/15384101.2016.1207835>
- Foley, G. L. (2001). Overview of male reproductive pathology. *Toxicologic Pathology*, 29(1), 49–63. <https://doi.org/10.1080/019262301301418856>

- Ford, J. J., & Wise, T. H. (2009). Sertoli cell differentiation in pubertal boars. *American Society of Animal Science*, *87*, 2536–2543.
- França, L. R., Avelar, G. F., & Almeida, F. F. L. (2005). Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*, *63*(2), 300–318.  
<https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2004.09.014>
- França, L. R., Silva, V. A., Garcia, S. K., & Debeljuk, L. (2000). Cell Proliferation and Hormonal Changes During Postnatal Development of the Testis in the Pig. *Biology of Reproduction*, *1636*, 1629–1636.
- Gaytan, F., Bellido, C., Aguilar, E., & van Rooijen, N. (1994). Requirement for testicular macrophages in Leydig cell proliferation and differentiation during prepubertal development in rats. *Journal of Reproduction and Fertility*, *102*, 393–399.
- Ge, R. S., Shan, L. X., & Hardy, M. P. (1996). Pubertal development of Leydig cells. *The Leydig Cell*. Cache River Press, *1*, 159–174.
- Gendt, K. De, Swinnen, J. V., Saunders, P. T. K., Schoonjans, L., Dewerchin, M., Devos, A., ... Verhoeven, G. (2004). A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *PNAS*, *101*(5), 1327–1332.
- George, F. W., & Wilson, J. D. (1994). Sex determination and differentiation. Raven Press, New York. *The Physiology of Reproduction*, (2), 3–28.
- Gewiss, R., Topping, T., & Griswold, M. D. (2019). Cycles, waves, and pulses: Retinoic acid and the organization of spermatogenesis. *Andrology*, andr.12722. <https://doi.org/10.1111/andr.12722>
- Godinho, H. P., & Cardoso, F. M. (1979). Testis development in Yorkshire pigs II. Establishment and evolution of spermatogenesis. *Arq Esc Vet UFMG*, *31*, 351–361.
- Gondos, B., & Berndston, W. E. (1993). Postnatal and pubertal development. *The Sertoli Cell*, *1*, 179–189. Retrieved from <https://ci.nii.ac.jp/naid/10005454731/>
- Gondos, B., Renston, R. H., & Goldstein, D. A. (1976). Postnatal Differentiation of Leydig Cells in the Rabbit Testis. *American Journal of Anatomy*, 167–181.
- Griswold, M. D., Solar, A., Tung, P. S., & Irving, B. (1977). Stimulation by follicle-stimulating hormone of DNA synthesis and of mitosis in cultured Sertoli cells prepared from testes of immature rats. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *7*, 151–165.
- Griswold, S. L., & Behringer, R. R. (2009). Fetal Leydig Cell Origin and Development. *Sexual Development*, *3*, 1–15.  
<https://doi.org/10.1159/000200077>
- Haeussler, S., Wagner, A., Welter, H., & Claus, R. (2007). Changes of testicular aromatase expression during fetal development in male pigs (*Sus scrofa*). *Reproduction*, *133*, 323–330. <https://doi.org/10.1530/rep.1.01169>
- Haider, S. G. (2004). Cell biology of Leydig cells in the testis. *International Review of Cytology*, *233*, 181–241.
- Hales, B. D. (1996). Leydig cell-macrophage interactions : An overview. *The Leydig Cell*, 451–465.
- Haschek, W., Rousseaux, C., & Wallig, M. (2010). Male Reproductive System in Fundamentals of Toxicologic Pathology. Elsevier. Academic Press.
- Hess, R. A., & Cooke, P. S. (2018, July 1). Estrogen in the male: A historical

- perspective. *Biology of Reproduction*. Oxford University Press.  
<https://doi.org/10.1093/biolre/iy043>
- Honaramooz, A., Megee, S. O., & Dobrinski, I. (2002). Germ Cell Transplantation in Pigs. *Biology of Reproduction*, *66*, 21–28.
- Honaramooz, A., Snedaker, A., Boiani, M., Schöler, H., Dobrinski, I., & Schlatt, S. (2002). Sperm from neonatal mammalia testes grafted in mice. *Nature*, *418*(6899), 778–781. <https://doi.org/10.1038/nature00918>
- Hughes, I. A., Coleman, N., & Ahmed, S. F. (1999). Sexual dimorphism in the neonatal gonad. *Acta Pædiatr*, *428*, 23–30.
- Huhtaniemi, I., & Pelliniemi, L. J. (1992). Fetal Leydig cells: cellular origin, morphology, life span, and special functional features. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, *201*(2), 125–140.
- Hutson, J. C. (1990). Changes in the Concentration and Size of Testicular Macrophages during Development. *Biology of Reproduction*, *43*(5), 885–890. <https://doi.org/10.1095/biolreprod43.5.885>
- Hutson, J. C. (1992). Development of cytoplasmic digitations between Leydig cells and testicular macrophages of the rat. *Cell and Tissue Research*, *267*(2), 385–389. <https://doi.org/10.1007/BF00302977>
- Hutson, J. C. (1994). Testicular Macrophages. *International Review of Cytology*, *149*(C), 99–143. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)62087-2](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)62087-2)
- IBGE | Resultados do Censo Agro 2017. (n.d.). Retrieved March 8, 2020, from [https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo\\_agro/resultadosagro/pecuaria.html](https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo_agro/resultadosagro/pecuaria.html)
- Jiang, Z., & Rothschild, M. F. (2007). Swine Genome Science Comes of Age. *International Journal of Biological Sciences*, *3*, 129–131.
- Johnson, L. (1991). Spermatogenesis. *Reproduction in Domestic Animals*, 173–219.
- Joshi, H. S., & Raeside, J. I. (1973). Synergistic Effects of Testosterone and Oestrogens on Accessory Sex Glands and Sexual Behaviour of The Boar. *Journal of Reproduction and Fertility*, *33*, 411–423.
- Joyce, K. L., Porcelli, J., & Cooke, P. S. (1993). Neonatal Goitrogen Treatment Increases Adult Testis Size and Sperm Production in the Mouse. *Journal of Andrology*, *14*(6), 448–455. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1993.tb03261.x>
- Kangawa, A., Otake, M., Enya, S., Yoshida, T., & Shibata, M. (2019). Histological Changes of the Testicular Interstitium during Postnatal Development in Microminipigs. *Toxicologic Pathology*, *47*(4), 469–482. <https://doi.org/10.1177/0192623319827477>
- Kern, S., Robertson, S. A., Mau, V. J., & Maddocks, S. (1995). Cytokine Secretion by Macrophages in the Rat Testis1. *Biology of Reproduction*, *53*(6), 1407–1416. <https://doi.org/10.1095/biolreprod53.6.1407>
- Kerr, J. B., & Knell, C. M. (1988). The fate of fetal Ley dig cells during the development of the fetal and postnatal rat testis. *Development*, *103*, 535–544.
- Khan, S., Teerds, K., & Dorrington, J. (1992). Growth Factor Requirements for DNA Synthesis by Leydig Cells from the Immature Rat. *Biology of Reproduction*, *46*(3), 335–341. <https://doi.org/10.1095/biolreprod46.3.335>
- Kosco, M. S., Loseth, K. J., & Crabo, B. G. (1989). Development of the seminiferous tubules after neonatal hemicastration in the boar. *Reproduction*, *87*(1), 1–11.

- Lara, N. de L. e. M., Costa, G. M. J., Figueiredo, A. F. A., & de França, L. R. (2018). The Sertoli cell: What can we learn from different vertebrate models? In *Animal Reproduction* (Vol. 16, pp. 81–92). Colegio Brasileiro de Reproducao Animal. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0125>
- Lejeune, H., Habert, R., Saez, J. M., & Bouvier, R. S. (1998). Origin , proliferation and di ff erentiation of Leydig cells. *Journal of Molecular Endocrinology*, *20*, 1–25.
- Lervik, S., Oskam, I., Krogenæs, A., Andresen, Ø., Dahl, E., Haga, H. A., ... Ropstad, E. (2013). Androstenone and testosterone levels and testicular morphology of Duroc boars related to estimated breeding value for androstenone. *Theriogenology*, *79*(6), 986–994. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2013.01.023>
- Li, R., Li, H., Rao, K., Liu, K., Zhang, Y., Liu, X., ... Liu, J. (2019). Curcumin ameliorates atrophy of seminal vesicle via reduction of oxidative stress in castrated mice. *PeerJ*, *7*, e7192. <https://doi.org/10.7717/peerj.7192>
- Lunstra, D. D., & Christenson, R. K. (1986). Changes in Leydig Cell Ultrastructure and Function during Pubertal Development in the Boar. *Biology of Reproduction*, *34*, 145–158.
- McEwan, I. J., & Brinkmann, A. O. (2016). Androgen Physiology: Receptor and Metabolic Disorders. *Endotext*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25905257>
- Mclaren, A. (2000). Germ and somatic cell lineages in the developing gonad. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *163*, 3–9.
- Minagawa, I., Sagata, D., Pitia, A. M., Kohriki, H., Shibata, M., Sasada, H., ... Kohsaka, T. (2014). Dynamics of insulin-like factor 3 (INSL3) and its receptor expression in boar testes. Dynamics of insulin-like factor 3 and its receptor expression in boar testes. *Article in Journal of Endocrinology*, *220*, 247–261. <https://doi.org/10.1530/JOE-13-0430>
- Nakai, M., Kaneko, H., Somfai, T., Maedomari, N., Ozawa, M., Noguchi, J., ... Kikuchi, K. (2010). Production of viable piglets for the first time using sperm derived from ectopic testicular xenografts. *Reproduction*, *139*, 331–335.
- Niemi, M., Sharpe, R. M., & Brown, W. R. A. (1986). Macrophages in the interstitial tissue of the rat testis. *Cell and Tissue Research*, *243*(2), 337–344. <https://doi.org/10.1007/BF00251049>
- Nishikawa, Y., & Horie, T. (1955). Studies on the development of the testes and epididymides of the horse. *Natl Inst Agric Sci Jpn Bull*, *10*, 229 – 349.
- Nistal, M., Santamaria, L., & Paniagua, R. (1984). Mast Cells in the Human Testis and Epididymis from Birth to Adulthood. *Cells Tissues Organs*, *119*(3), 155–160. <https://doi.org/10.1159/000145878>
- Okwun, O. E., Igboeli, G., Ford, J. J., Lunstra, D. D., & Johnson, L. (1993). spermatogonia , and daily sperm production in three breeds of boar. *Journal of Reproduction and Fertility*, *107*, 137–149.
- Orth, J. M. (1982). Proliferation of sertoli cells in fetal and postnatal rats: A quantitative autoradiographic study. *The Anatomical Record*, *203*(4), 485–492. <https://doi.org/10.1002/ar.1092030408>
- Orth, J. M. (1984). The Role of Follicle-Stimulating Hormone in Controlling Sertoli Cell Proliferation in Testes of Fetal Rats\*. *Endocrinology*, *115*(4), 1248–1255. <https://doi.org/10.1210/endo-115-4-1248>
- Ou, Y., Dores, C., Rodriguez-Sosa, J.-R., van der Hoorn, F. A., & Dobrinski, I. (2014). Primary cilia in the developing pig testis. *Cell and Tissue Research*,

- 358(2), 597–605. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1973-y>
- Pelliniemi, L. J. (1975). Ultrastructure of the Early Ovary and Testis in Pig Embryos. *American Journal of Anatomy*, 144, 89–112.
- Pelliniemi, L. J., Fröjdman, K., & Paranko, J. (1993). Embryological and prenatal development and function of Sertoli cells. *The Sertoli Cell*, 87–113.
- Pelliniemi, L. J., Kuopio, T., & Fröjdman, K. (1996). The cell biology and function of the fetal Leydig cell. *The Leydig Cell*. Cache River Press, Vienna, IL, 143–158.
- Petersen, C., & Söder, O. (2006). The Sertoli Cell – A Hormonal Target and ‘ Super ’ Nurse for Germ Cells That Determines Testicular Size. *Hormone Research*, 66, 153–161. <https://doi.org/10.1159/000094142>
- Peyrat, J.-P., Meusy-Dessolle, N., & Garnier, J. (1981). Changes in Leydig Cells and Luteinizing Hormone Receptors in Porcine Testis during Postnatal Development. *Endocrinology*, 108(2), 625–631. <https://doi.org/10.1210/endo-108-2-625>
- PÖLLÄNEN, P., & NIEMI, M. (1987). Immunohistochemical identification of macrophages, lymphoid cells and HLA antigens in the human testis. *International Journal of Andrology*, 10(1), 37–42. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1987.tb00163.x>
- Potter, S. J., & De Falco, T. (2017). Role of the testis interstitial compartment in spermatogonial stem cell function. *Reproduction*, 153(4), R151–R162. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0588>
- Putra, D. K. H., & Blackshaw, A. W. (1985). Quantitative studies of compensatory testicular hypertrophy following unilateral castration in the boar. *Australian Journal of Biological Sciences*, 38(4), 429–434. <https://doi.org/10.1071/BI9850429>
- Raeseide, J. I., Christie, H. L., Renaud, R. L., & Sinclair, P. A. (2006). The boar testis: the most versatile steroid producing organ known. *Society of Reproduction and Fertility*, 62, 85–97.
- Rochira, V., Madeo, B., Diazz, C., Zirilli, L., Santi, D., & Carani, C. (2016). Estrogens and Male Reproduction. *Endotext*, 1–53.
- Rochira, V., Zirilli, L., Genazzani, A. D., Balestrieri, A., Aranda, C., Fabre, B., ... Maffei, L. (2006). Hypothalamic – pituitary – gonadal axis in two men with aromatase deficiency : evidence that circulating estrogens are required at the hypothalamic level for the integrity of gonadotropin negative feedback. *European Journal of Endocrinology*, 155, 513–522. <https://doi.org/10.1530/eje.1.02254>
- Rodríguez-Martínez, H. (2001). Sperm function in cattle and pigs: morphological and functional aspects. *Archiv Fur Tierzucht*, 44, 102–113.
- Russell, L D, et al. (1990). Evaluation of the testis. *Evaluation of the Testis*.
- Russell, D., & Brinstert, L. (1996). Ultrastructural observations of spermatogenesis following transplantation of rat testis cells into mouse seminiferous tubules. *Journal of Andrology*, 17(6).
- Russell, L. D., Bartke, A., & Goh, J. C. (1989). Postnatal development of the sertoli cell barrier, tubular lumen, and cytoskeleton of sertoli and myoid cells in the rat, and their relationship to tubular fluid secretion and flow. *American Journal of Anatomy*, 184(3), 179–189. <https://doi.org/10.1002/aja.1001840302>
- Russell, L. D., Franga, L. R. De, Hess, R., & Cooke, P. (1995). Characteristics of mitotic cells in developing and adult testes with observations on cell

- lineages. *Tissue & Cell*, 27, 105–128.
- Schlatt, S., Honaramooz, A., Boiani, M., Scho, H. R., & Dobrinski, I. (2003). Progeny from Sperm Obtained after Ectopic Grafting of Neonatal Mouse Testes 1 Evaluation of Testicular Growth. *Biology of Reproduction*, 68, 2331–2335. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.014894>
- Schlatt, S., Kim, S. S., & Gosden, R. (2002). Spermatogenesis and steroidogenesis in mouse, hamster and monkey testicular tissue after cryopreservation and heterotopic grafting to castrated hosts. *Reproduction*, 124, 339–346.
- Schlatt, S., Meinhardt, A., & Nieschlag, E. (1997). Paracrine regulation of cellular interactions in the testis: factors in search of a function. *European Journal of Endocrinology*, 137, 107–117.
- Schuler, G., Dezhkam, Y., Tenbusch, L., Klymiuk, M. C., Zimmer, B., & Hoffmann, B. (2018). Sulfonation Pathways: Formation and hydrolysis of sulfonated estrogens in the porcine testis and epididymis. *Journal of Molecular Endocrinology*, 61(2), 13–25.
- Setchell, B., Maddocks, S., BROOKS, D., MADDOCKS, S., Brooks, D., & Brooks, C. (1994). Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive tract. *The Physiology of Reproduction*.
- Setchell, B. P., Hertel, T., & Söder, O. (2003). Postnatal Testicular Development, Cellular Organization and Paracrine Regulation. *The Developing Testis. Physiology and Pathophysiology. Endocr Dev.*, 5, 24–37.
- Setchell, B. P., Pöllänen, P., & Zupp, J. L. (1988). Development of the blood-testis barrier and changes in vascular permeability at puberty in rats. *International Journal of Andrology*, 11(3), 225–233. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1988.tb00997.x>
- Shima, Y. (2019). Development of fetal and adult Leydig cells. *Reproductive Medicine and Biology*, 18(4), 323–330. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12287>
- Shupnik, M. A., & Schreihof, D. A. (1997). Molecular aspects of steroid hormone action in the male reproductive axis. *Journal of Andrology*, 18(4), 341–344.
- Snedaker, A. M. Y. K., Honaramooz, A. L. I., & Dobrinski, I. N. A. (2004). A Game of Cat and Mouse: Xenografting of Testis Tissue From Domestic Kittens Results in Complete Cat Spermatogenesis in a Mouse Host. *Journal of Andrology*, 25(6), 926–930.
- Šprysl, M., Stupka, R., & Čítek, J. (2005). Genotype impact on the economy of production performance in pigs. *Agricultural Economics*, 3, 123–133.
- Suarez-Quian, C. A., Oke, B. O., & Musto, N. A. (1998). Localization of the androgen receptor in the rodent testis. *Male Reproduction: A Multidisciplinary Overview. Madrid: Churchill Communications Europe Espana*, 113–124.
- Swanlund, D. J., N'Diaye, M. R., Loseth, K. J., Pryor, J. L., & Crabo, B. G. (1995). Diverse Testicular Responses to Exogenous Growth Hormone and Follicle-Stimulating Hormone in Prepubertal Boars. *Biology of Reproduction*, 53(4), 749–757. <https://doi.org/10.1095/biolreprod53.4.749>
- Tran, D., Meusy-Dessolle, N., & Josso, N. (1981). Waning of Anti-Müllerian Activity: An Early Sign of Sertoli Cell Maturation in the Developing Pig. *Biology of Reproduction*, 24(4), 923–931. <https://doi.org/10.1095/biolreprod24.4.923>
- Tripepi, S., Carelli, A., Perrotta, E., Brunelli, E., Tavolaro, R., Facciolo, R. M., &

- Canonaco, M. (2000). Morphological and Functional Variations of Leydig Cells in Testis of the Domestic Pig During the Different Biological Stages of Development. *Journal of Experimental Zoology*, 287, 167–175.
- Van Straaten, H. W. M., & Wensing, G. (1977). Histomorphometric aspects of testicular morphogenesis in the pig. *Biology of Reproduction*, 472, 467–472.
- Van Straaten, H. W. M., & Wensing, J. G. (1978a). Leydig cell development in the testis of the pig. *Biology of Reproduction*, 18, 86–93.
- Van Straaten, H. W. M., & Wensing, J. G. (1978b). Leydig Cell Development in the Testis of the Pig. *Biology of Reproduction*, 18, 86–93.
- Van Vorstenbosch, C. J. A. H. V., Spek, E., & Colenbrander, B. (1984). Sertoli of Pig Testis in the Fetal and Neonatal Period. *Biology of Reproduction*, 31, 565–577.
- Van Vorstenbosch, C. J. A. H. V., Spek, E., Colenbrander, B., & Wensing, C. J. G. (1987). The ultrastructure of normal fetal and neonatal pig testis germ cells and the influence of fetal decapitation on the germ cell development. *Development*, 563, 553–563.
- Vergouwen, R. P., Jacobs, S. G., Huiskamp, R., Davids, J. A., & de Rooij, D. G. (1991). Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *Journal of Reproduction and Fertility*, 93(1), 233–243. <https://doi.org/10.1530/JRF.0.0930233>
- Wagner, A., Messe, N., Bergmann, M., Lekhkota, O., & Claus, R. (2006). Effects of Estradiol Infusion in GnRH Immunized Boars on Spermatogenesis. *Journal of Andrology*, 27(6), 880–889. <https://doi.org/10.2164/jandrol.106.000448>
- Wrobel, K. H., & Dierichs, R. (1975). Growth and differentiation of Sertoli cells in the procine testis during postnatal ontogenesis. *Verhandlungen Der Anatomischen Gesellschaft*, (69), 273.
- Wu, X., & Wan, S. (2007). Key Factors in the Regulation of Fetal and Postnatal Leydig Cell Development. *Journal of Cellular Physiology*, 213, 429–433. <https://doi.org/10.1002/JCP>
- Yu, S., Zhang, P., Dong, W., Zeng, W., & Pan, C. (2017). Identification of Stem Leydig Cells Derived from Pig Testicular Interstitium. *Stem Cells International*, 2017, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2017/2740272>
- Zeng, W., Avelar, G. F., Rathi, R., Franca, L. R., & Dobrinski, I. (2006). The Length of the Spermatogenic Cycle Is Conserved in Porcine and Ovine Testis Xenografts. *Journal of Andrology*, 27(4), 527–533. <https://doi.org/10.2164/jandrol.05143>
- Zirkin, B. R., Awoniyi, C., Griswold, M. D., Russell, L. D., & Sharpe, R. (1994). Is FSH required for adult spermatogenesis? *Journal of Andrology*, 15, 273–276.
- Zirkin, B. R., Ewing, L. L., Kromann, N., & Cochran, R. C. (1980). Testosterone Secretion by Rat, Rabbit, Guinea Pig, Dog, and Hamster Testes Perfused in Vitro: Correlation with Leydig Cell Ultrastructure. *Endocrinology*, 107(6), 1867–1874. <https://doi.org/10.1210/endo-107-6-1867>
- Zirkin, B. R., & Papadopoulos, V. (2018, July 1). Leydig cells: Formation, function, and regulation. *Biology of Reproduction*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/biolre/i0y059>