

PATRÍCIA DE ALENCAR AULER

**IMPACTOS DO PESO AO NASCIMENTO SOBRE PARAMETROS
TESTICULARES EM SUÍNOS AVALIADOS NOS PERÍODOS NEONATAL E
PÓS-PUBERAL**

Orientadora: Dra. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida

Coorientador: Dr. Hélio Chiarini-Garcia

Belo Horizonte

Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

2013

PATRÍCIA DE ALENCAR AULER

**IMPACTOS DO PESO AO NASCIMENTO SOBRE PARAMETROS
TESTICULARES EM SUÍNOS AVALIADOS NOS PERÍODOS NEONATAL E
PÓS-PUBERAL**

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

Área de concentração: Biologia Celular

Orientadora: Dra. Fernanda Radicchi Campos
Lobato de Almeida
Universidade Federal de Minas Gerais

Coorientador: Dr. Hélio Chiarini-Garcia
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

2013



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE

PATRÍCIA DE ALENCAR AULER

237/2013/10
entrada
1º/2011
2011667679

Às nove horas do dia 26 de fevereiro de 2013, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado de Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "IMPACTOS DO PESO AO NASCIMENTO SOBRE PARÂMETROS TESTICULARES EM SUÍNOS AVALIADOS NOS PERÍODOS NEONATAL E PÓS-PUBERAL", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular, área de concentração: **Biologia Celular**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida**, 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. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida	UFMG	APROVADA
Dr. Hélio Chiarini-Garcia	UFMG	Aprovado
Dra. Elizete Rizzo	UFMG	ERIZO APROVADO
Dr. Hugo Pereira Godinho	UFMG	Aprovado

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, 26 de fevereiro de 2013.**

Dra. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida (Orientadora) FRCA Almeida

Dr. Hélio Chiarini-Garcia (Co-Orientador) HCG

Dra. Elizete Rizzo ERIZO

Dr. Hugo Pereira Godinho Hugo Godinho

Cleida Aparecida de Oliveira
Prof. Cleida Aparecida de Oliveira
COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO
EM BIOLOGIA CELULAR UFMG

Esta dissertação foi desenvolvida no Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução (ICB/UFMG), sob a coordenação dos Professores Dra. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida e Dr. Hélio Chiarini-Garcia.

O projeto foi executado com o apoio logístico e parte do apoio financeiro da empresa de genética de suínos Agroceres PIC e da granja de suínos Granja Paraíso. Também foi apoiado financeiramente pelo Programa de Pós-graduação em Biologia Celular do Departamento de Morfologia do ICB/UFMG, pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

*“A melhor coisa, a sorte mais maravilhosa que pode recair
sobre qualquer ser humano é ter como profissão
o que apaixonadamente adora fazer”*

Abrahm Maslow

*“A descoberta consiste em ver o que todos viram
e em pensar o que ninguém pensou.”*

Szent-Gvorgyi

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e à espiritualidade, a quem tenho muita fé, por guiarem meus caminhos.

Aos meus pais, os alicerces da minha vida, por todo apoio e confiança nas minhas escolhas e no meu trabalho, por amarem comigo este projeto e por compartilharem das alegrias e frustrações durante esse período.

À minha irmã pelo exemplo, preocupação, conselhos e pelas incríveis e casuais ideias que muitas vezes me permitiram enxergar um resultado brilhante, antes imperceptível.

Ao meu companheiro, Gustavo, a quem devo essa dissertação, pela equipe que formamos para a execução deste trabalho. Companheiros inseparáveis durante as idas a campo, madrugadas em claro no galpão de maternidade, os dias e noites no laboratório, as horas no computador e os momentos de descanso. Agradeço pela ajuda, ideias, discussões, e pelos resultados obtidos no campo, muitas vezes por sua insistência e esforço que sempre superavam nosso cansaço.

À minha avó, Myrian, por ter inspirado em mim a paixão pela produção animal, a criação com amor, e pelo incentivo nos estudos.

À professora Fernanda por ter aceitado com tanto carinho ser minha orientadora e me permitido realizar esse projeto, pelo qual me encantei na primeira leitura. Agradeço pela confiança no meu trabalho e pela parceria durante esse período.

Ao professor Hélio pelos ensinamentos, auxílio na execução do experimento e pelas vibrações com o projeto, que me animavam mais a cada dia.

Ao professor Geovanni mestre em quem me espelho, pai científico e grande amigo, por todos os ensinamentos, conselhos e conversas, e por manter as inúmeras portas sempre abertas.

À toda a equipe do LABER, Lu, Pati, Mirna, Amanda, André, Camilinha, Gabi e Malú, equipe de amigos e colegas de trabalho. Agradeço pela ajuda a qualquer hora, mas principalmente pelo conforto de saber que nunca estaria desamparada. À Rayane devo um agradecimento especial por ter participado diretamente do trabalho, me auxiliando

com tanta dedicação nas análises que fortalecia minha confiança na qualidade do trabalho.

À professora Ana Maria e à Zelina pelo auxílio com a técnica de Imuno-histoquímica.

Aos professores Monteiro e Fernando Bortolozzo, pela grande disponibilidade, pelas respostas esclarecedoras aos meus questionamentos, por vezes desesperados, e pelos ensinamentos contidos em cada conversa ou email.

A todos os colegas, professores e funcionários do ICB, mas mais especificamente do Departamento de Morfologia.

À AGROCERES PIC, pela estrutura e por todo apoio oferecidos para que este trabalho se tornasse viável, e principalmente pela confiança, nos permitindo executar um projeto tão extenso. Agradeço especialmente à equipe que esteve diretamente envolvida neste trabalho, Ezio, João Donisete, Jefferson, Camila e Maristela, pessoas incríveis que facilitaram muito o experimento a campo.

À Granja Paraíso, simplesmente agradeço, pois não existem palavras que possam descrever a minha gratidão pela recepção carinhosa, pelos sorrisos, respeito, lições de vida, confiança, experiência, aprendizado, ajuda incansável, e por torcerem por bons resultados conosco. Agradeço especialmente aos funcionários que se envolveram diretamente neste projeto e, por vezes, demonstraram um apego especial ao experimento. Ao Marcelo, agradeço pela confiança e por ter facilitado tanto a execução do trabalho. Aos amigos, Midian, Evaldo e Adalberto, agradeço pela amizade e carinho e por toda a empolgação em nos ajudar nos partos, manejo dos animais, e castrações.

Não menos importante, aos animais devo grande admiração e respeito pela experiência e aprendizado adquiridos.

Enfim, agradeço a todos que estiveram comigo e me auxiliaram durante esse período, mas não posso deixar de agradecer imensamente pelas noites não dormidas naquele galpão de maternidade, que representam todo aprendizado e experiência que adquiri durante esse período.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ANEXOS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
INTRODUÇÃO	14
REVISÃO DE LITERATURA	16
1. Crescimento intrauterino retardado (CIUR)	16
1.1. Crescimento intrauterino retardado em suínos	17
2. Desenvolvimento dos testículos em suínos	19
2.1. Desenvolvimento testicular embrionário	19
2.2. Desenvolvimento testicular pós-natal	21
3. Estrutura testicular e espermatogênese em suínos	23
3.1. Anatomia dos testículos	23
3.2. Parênquima testicular	23
3.3. Espermatogênese	25
3.4. Ciclo do epitélio seminífero	27
4. Proliferação celular e proteína MCM7	30
HIPÓTESE	32
OBJETIVOS	32
1. Objetivo geral	32
2. Objetivos específicos	32
MATERIAL E MÉTODOS	34
1. Local e período	34
2. Instalações e manejo do sistema de produção	34
3. Amostragem dos animais e grupos experimentais	36
4. Manejo dos animais	37
5. Coleta das amostras	38
5.1. Parâmetros corporais externos	38
5.2. Procedimento cirúrgico	38
5.3. Biometria testicular	41
6. Processamento histológico	41

7. Avaliações morfológicas e morfométricas	43
7.1. Número de células de Sertoli por secção transversal de cordão/túbulo seminífero	43
7.2. Diâmetro dos cordões/túbulos seminíferos	43
7.3. Número de secções transversais de cordões/túbulos seminíferos por área de tecido	43
7.4. Proporções volumétricas dos componentes do parênquima testicular	44
7.4.1. Proporção volumétrica diferencial de gonócitos	44
7.5. Número absoluto de células de Sertoli, Leydig, e gonócitos total e diferencial por testículo	45
7.6. Eficiência do processo espermatogênico	48
8. Número de espermátides testiculares	49
9. Imuno-histoquímica	50
10. Análise estatística	52
RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
1. Biometria corporal	54
2. Biometria testicular	56
3. Avaliações morfológicas e morfométricas	59
3.1. Número de células de Sertoli por secção transversal de cordão/túbulo seminífero	59
3.2. Diâmetro dos cordões/túbulos seminíferos	60
3.3. Número de secções transversais de cordões/túbulos seminíferos por área de tecido	62
3.4. Proporções volumétricas dos componentes do parênquima testicular	63
3.4.1. Diferenciação morfológica e proporção volumétrica de gonócitos	65
3.5. Número absoluto das células de Sertoli, Leydig e gonócitos por testículo	69
3.6. Eficiência do processo espermatogênico	71
3.7. Número de espermátides testiculares	77
3.8. Proliferação celular	78
CONCLUSÕES	83
CONSIDERAÇÕES FINAIS	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
ANEXOS	93

LISTA DE ABREVIATURAS

Alto PN – alto peso ao nascimento
AMH – hormônio Anti-Mulleriano
As – espermatogônia A isolada
Apr – espermatogônia A pareada
Aal – espermatogônia A alinhada
Baixo PN – baixo peso ao nascimento
BSA – bovine serum albumin
CA – circunferência abdominal
CCC – comprimento cabeça-cauda
Cdc6 – cell division cycle 6
Cdt1 – chromatin licensing and DNA replication factor 1
CT – circunferência torácica
CIUR – crescimento intrauterino retardado
DNA – ácido desoxirribunucleico
DPC – diâmetro biparietal da cabeça
FSH – follicle stimulating hormone
g – grama
GPMD – ganho de peso médio diário
IGS – índice gonadossomático
kg - quilograma
MCM – minichromosome maintenance complex
mg – miligrama
mL - mililitro
mm – milímetro
 μm - micrômetro
ORC – complexo de reconhecimento de origem
PBS – phosphate buffered solution
PC – peso corporal
PN – peso ao nascimento
PT – peso testicular
TGF- β – transforming growth factor β
VT – volume testicular

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotografias indicando os locais de inserção onde foram obtidos as medidas da biometria corporal	40
Figura 2 – Fotografias demonstrando o corte dos fragmentos de testículo para o processamento histológico	42
Figura 3 – Número de células de Sertoli por secção transversal de cordão ou túbulo seminífero (estádio 1), nas idades de oito dias e oito meses, respectivamente, entre os grupos de alto (Alto PN) e baixo (Baixo PN) pesos ao nascimento	59
Figura 4 – Diâmetro dos cordões/túbulos seminíferos, nas idades de oito dias e oito meses, respectivamente, entre os grupos de alto (Alto PN) e baixo (Baixo PN) peso ao nascimento	61
Figura 5 – Número de secções transversais de cordões/túbulo seminífero por mm ² de área de testículo nas idades de oito dias e oito meses, respectivamente, entre os grupos de alto (Alto PN) e baixo (Baixo PN) peso ao nascimento	63
Figura 6 – Fotomicrografia de luz de testículo de suíno aos 8 dias de idade	67
Figura 7 – Descrição morfológica dos gonócitos sob a microscopia de luz	68
Figura 8 – Número de células espermatogênicas/secção transversal de túbulo seminífero em estágio um nos grupos de alto (Alto PN) e baixo (Baixo PN) peso ao nascimento, aos oito meses de idade	72
Figura 9 – Eficiência da espermatogênese	74
Figura 10 – Fotomicrografia de luz de testículo de suíno aos 8 meses de idade	76
Figura 11 – Índice de proliferação celular em testículos de suínos aos oito dias de idade	79
Figura 12 – Índice de proliferação celular em testículos de suínos aos oito meses de idade	79
Figura 13 – Expressão da proteína MCM7 em testículo de suíno aos 8 dias de idade	81
Figura 14 – Expressão da proteína MCM7 em testículo de suíno aos 8 meses de idade	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Peso e morfometria corporais ao nascimento, aos oito dias e aos oito meses de idade em leitões de alto e baixo peso ao nascimento	54
Tabela 2 - Peso corporal, peso e volume testiculares e índice gonadossomático aos 8 dias e 8 meses de idade em leitões de baixo e alto peso ao nascimento	57
Tabela 3 - Proporção volumétrica ($V_v\% \pm dp$) dos componentes do parênquima testicular e índices mitóticos e apoptóticos do tecido intersticial e cordões seminíferos em leitões de baixo e alto peso ao nascimento aos 8 dias de idade	64
Tabela 4 - Proporção volumétrica ($V_v\% \pm dp$) diferencial dos gonócitos em leitões de baixo e alto peso ao nascimento aos 8 dias de idade	69
Tabela 5 - Número de células de Sertoli, Leydig e gonócitos totais, em milhões (10^6), por testículo e por grama de testículo em leitões de alto e baixo peso ao nascimento aos oito dias de idade	70
Tabela 6 - Número corrigido dos diferentes gonócitos, em milhões (10^6), por testículo em leitões de alto e baixo peso ao nascimento aos oito dias de idade	71
Tabela 7 - Número de espermátides, em milhões (10^6), por testículo e por grama de testículo em leitões de alto e baixo pesos ao nascimento aos oito meses de idade	77

LISTA DE ANEXOS

Anexo I - Peso corporal, ganho de peso médio diário e taxa de crescimento de leitões de alto e baixo peso ao nascimento castrados aos oito dias de idade	93
Anexo II - Peso corporal, ganho de peso médio diário e taxa de crescimento de leitões de alto e baixo peso ao nascimento castrados aos oito meses de idade	94
Anexo III – Certificado de aprovação no Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)	95

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos do baixo peso ao nascimento (PN) sobre alguns parâmetros testiculares em suínos aos oito dias e oito meses de idade. Quarenta e oito leitões machos (Agroceres PIC) - pares de irmãos, originados de porcas de 4^a a 6^a ordens de parição e leitegadas contendo entre 10 a 15 leitões (peso médio 1,25 kg a 1,65 kg) - foram selecionados e distribuídos em dois grupos experimentais: leitões de alto peso (AP: 1,80 a 2,15 kg) e de baixo peso (BP: 0,75 a 1,10 kg) ao nascimento. Em cada grupo experimental, formaram-se dois subgrupos (n=12) que foram submetidos à orquiectomia aos oito dias ou oito meses de idade, sendo os testículos coletados para avaliações biométricas e morfométricas. Os animais BP apresentaram menor peso corporal (PC), peso (PT) e volume testiculares (VT) e biometria corporal nas duas idades avaliadas ($p < 0,05$), com exceção da circunferência abdominal aos oito meses. O índice gonadossomático também diferiu entre os grupos aos oito dias ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas nas duas idades no que se refere ao diâmetro dos cordões/túbulos seminíferos (CS/TS), número de células de Sertoli por secção transversal de CS/TS e número de secções transversais de CS/TS por área de testículo. Aos oito dias, os animais BP apresentaram número de células de Sertoli (NS), Leydig e germinativas por testículo significativamente menor. Aos oito meses, o número de espermatogônias A e espermatócitos primários em preleptóteno não diferiu entre os grupos ($p > 0,05$). Entretanto, o grupo BP apresentou menor número de espermatócitos primários em paquíteno e espermátides arredondadas, o que influenciou o número total de células espermatogênicas que também foi menor ($p < 0,05$). Mesmo havendo semelhança na eficiência da espermatogênese entre os grupos experimentais ($p > 0,05$), o número de espermátides testiculares foi menor nos animais BP ($p < 0,05$). Adicionalmente, o baixo PN não interferiu na proliferação das células somáticas e germinativas nas duas idades avaliadas. Correlações significativas foram observadas entre PC, PT e VT, e entre PC, PT e NS, aos oito dias e entre PT e VT, e PN e PC ($p < 0,05$), aos oito meses. Conclui-se que o baixo PN apresenta consequências para o desenvolvimento testicular em suínos, entretanto as alterações observadas nos animais BP não parecem ser decorrentes de uma organogênese comprometida e sim devido ao menor tamanho do animal. Portanto, novos estudos devem ser realizados com o objetivo de avaliar os efeitos do baixo PN sobre a fertilidade de machos contemporâneos.

Palavras-chaves: suíno, varrão, peso ao nascimento, desenvolvimento testicular.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effects of low birth weight on some testicular parameters evaluated in neonatal and postpubertal boars. Forty-eight littermate male piglets (Agroceres PIC), born to 4th- 6th parity sows and in litters of 10 to 15 piglets (litter average birth weight of 1.25 kg to 1.65 kg), were individually identified as falling into two birth weight categories: high (HW: 1.80 to 2.15 kg) and low (LW: 0.75 to 1.10 kg) birth weight littermates. Two sub-sets of 12 animals from each experimental group underwent orchietomy at eight days or eight months of age and the testes were collected for morphometrical and biometrical evaluations. LW animals had lower body weight (BW), testicular weight (TW) and volume (TV) and body biometrical measures in both ages evaluated ($p < 0.05$), except for abdominal circumference that was similar between groups at eight months of age. The gonadosomatic index also differed between groups at eight days ($p < 0.05$). No statistical differences were observed in the seminiferous cords/tubules (SC/ST) diameter, Sertoli cells number per cross section of SC/ST and cross section number of SC/ST per testis area in both ages. At eight days of age, LW animals showed lower Sertoli, Leydig and germ cell number per testis ($p < 0.05$). However these differences were not maintained when those values were divided by their respective average testis weight. At eight months old, the number of type A spermatogonia and preleptotene primary spermatocytes were similar between experimental groups ($p > 0.05$). However, LW males presented fewer pachytene primary spermatocytes and round spermatids numbers, which influenced the total number of spermatogenic cells that was also reduced in this group ($p < 0.05$). The efficiency of spermatogenesis was similar in both groups, however LW animals presented a reduced number of sperm per testis ($p < 0.05$). Furthermore, low birth weight did not affect somatic and germ cell proliferation in both ages analyzed. Significant correlations between BW, TW and TV were observed at eight days of age. BW and TW were also correlated to the total number of Sertoli cells at this age. At eight months, TW was positively correlated to TV, and birth weight to BW ($p < 0.05$). These results suggest that low birth weight have negative effects on testis development in pigs, however the differences observed in low birth weight animals may not be mediated by a compromised organogenesis and yet to the smaller size of the animal. Therefore, studies are necessary to further address this question.

Keywords: pig, boar, birth weight, testis development.

INTRODUÇÃO

Na indústria de suínos, a eficiência reprodutiva é uma importante característica econômica utilizada para avaliar a produtividade do rebanho, sendo frequentemente determinada pelo número de leitões desmamados por fêmea por ano. Durante as últimas décadas, a contínua busca pelo aumento da produtividade tem levado à utilização de estratégias de melhoramento genético animal voltadas para o incremento da eficiência reprodutiva. Segundo Knox (2005), os maiores ganhos em termos de número de leitões desmamados/fêmea/ano seriam alcançados por meio de investimentos no aumento do número de leitões nascidos. Dessa forma, priorizou-se a seleção de fêmeas reprodutoras para maior tamanho de leitegada, gerando um aumento das chamadas fêmeas hiperprolíficas nos sistemas de produção de suínos.

Os resultados da seleção genética para maior número de leitões nascidos têm apresentado crescente evolução ao longo dos anos. Dados de 20 anos apresentados por Lima (2007) revelaram um aumento médio, no Brasil, de 2,67 leitões nascidos/parto do início ao final do período estudado. Um aumento considerável também pode ser observado nos relatórios anuais desenvolvidos pelo PIGCHAMP^{®1} para os rebanhos americanos, que mostram um aumento de 1,19 leitão nascido vivo por parto do ano de 2005 ao ano de 2011, sendo esse incremento acompanhado pelo aumento crescente do número de leitões desmamados/fêmea/ano, de 20,63 para 22,77. Atualmente, os índices de produtividade nacionais mostram uma evolução de 0,59 leitão nascido vivo/parto e 1,52 leitão desmamado/fêmea/ano do ano de 2007 ao ano de 2011, sendo esperado um aumento de 3,65% na média de nascidos vivos até 2015 (AGRINESS, 2012).

Apesar da crescente elevação na produtividade observada ao longo das últimas décadas em diversos países, a intensa pressão de seleção para alta prolificidade tem causado um desequilíbrio entre o número de fetos presentes no útero e a capacidade uterina da fêmea suína gestante (Foxcroft et al., 2006). Quando o número de conceptos excede a capacidade uterina da fêmea, ocorre uma redução considerável do desenvolvimento placentário e conseqüentemente do suprimento sanguíneo por feto, promovendo uma competição por nutrientes e oxigênio *in utero* (Town et al., 2005; Foxcroft et al., 2006; Martin-Gronert e Ozanne, 2006). Os fetos acometidos por uma deficiência nutricional passam por um processo de adaptação por meio de alterações fisiológicas e metabólicas, no intuito de aumentar as chances de sobrevivência após o nascimento (Martin-Gronert

¹ PIGCHAMP Knowledge software.

e Ozanne, 2006). O resultado desse processo é o nascimento de leitões menores, mais leves e, conseqüentemente, mais fracos, devido a um reduzido desenvolvimento e crescimento fetais, sinais característicos do chamado crescimento intra-uterino retardado (CIUR) (Wu et al., 2006).

Diversos estudos têm demonstrado que leitões acometidos pelo CIUR apresentam um desenvolvimento pós-natal comprometido, bem como alterações nas características de carcaça (Gondret et al., 2006; Rehfeldt e Kuhn, 2006, Alvarenga et al., 2013). No entanto, são poucas as evidências que comprovam a interferência de injúrias durante o período pré-natal sobre a função reprodutiva do macho. Pesquisas preliminares desenvolvidas em nosso laboratório mostraram que leitões de baixo peso ao nascimento (0,8 a 1,2 kg) apresentaram, além de testículos mais leves, menor número de células de Sertoli, bem como menor número de células germinativas aos sete dias de idade em comparação aos animais de peso mais elevado (1,8 a 2,2 kg) (Almeida et al., 2009).

O estudo dos fatores que afetam o desenvolvimento testicular e das possíveis conseqüências sobre a espermatogênese e qualidade do sêmen do animal adulto se torna especialmente importante no âmbito da suinocultura moderna mundial, no qual a utilização da inseminação artificial se encontra incorporada ao manejo reprodutivo das granjas tecnificadas (Bortolozzo et al., 2005). Nesse contexto, a qualidade dos machos reprodutores, selecionados como doadores de sêmen, é essencial para a redução dos custos de produção e maximização dos lucros, tanto das centrais de inseminação artificial quanto das granjas tecnificadas.

A seleção de reprodutores é realizada aproximadamente entre os 130 e 140 dias de vida, com base nas características morfológicas externas e desempenho produtivo dos animais. Até o presente momento não se conhecem as dimensões dos efeitos do crescimento intrauterino retardado sobre o desenvolvimento testicular bem como as implicações destas alterações na vida pós-natal do suíno macho. Dessa forma, não é sabido se tais efeitos, quando presentes, estariam aparentes no momento da seleção, comprometendo a qualidade do plantel de reprodutores e a eficiência reprodutiva das granjas ou centrais de inseminação.

Diante do exposto, o estudo do peso ao nascimento do macho suíno e seus efeitos sobre a eficiência reprodutiva no animal adulto se torna essencial, fornecendo evidências sobre a importância do peso ao nascimento como um critério avaliativo na seleção de animais para a reprodução.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Crescimento intrauterino retardado (CIUR)

A programação do crescimento e desenvolvimento fetais é coordenada por uma associação entre o genótipo do embrião/feto e a regulação das expressões gênicas que, por sua vez, é extremamente influenciada pelo ambiente intrauterino (Martin-Gronert e Ozanne, 2006). Um dos fatores mais importantes para o desenvolvimento *in utero* é a capacidade materna em fornecer o suprimento adequado de nutrientes e oxigênio, permitindo que o feto atinja seu potencial de crescimento e apresente, ao nascimento, o desenvolvimento e o tamanho apropriado para a sua sobrevivência na vida pós-natal (Wu et al., 2004; Martin-Gronert e Ozanne, 2006).

A habilidade materna em fornecer nutrientes para o feto depende do seu estado nutricional, tamanho, composição e metabolismo corporais. Qualquer anormalidade nestes parâmetros pode resultar em uma deficiência no aporte nutricional para o feto, levando ao comprometimento do crescimento e desenvolvimento deste (Chiswick, 1985; Martin-Gronert e Ozanne, 2006).

Frente a uma deficiência nutricional, um processo de adaptação fetal é desencadeado, com o objetivo de aumentar as chances de sobrevivência após o nascimento. De acordo com Barker (1998) e Martin-Gronert e Ozanne (2006), a resposta imediata é a obtenção de energia por meio de um processo catabólico, sendo esta seguida de alterações na taxa metabólica, na produção hormonal e na sensibilidade dos tecidos aos hormônios produzidos, quando a deficiência nutricional se prolonga durante a gestação. Além destas, outra importante alteração é a redistribuição do fluxo sanguíneo para órgãos-chave, especialmente o cérebro, em detrimento a outros órgãos e tecidos como músculos, rins, pâncreas e fígado (“*brain sparing effect*” ou “efeito de poupar o cérebro”) (Bauer et al., 1998). Essas adaptações metabólicas e fisiológicas determinam um menor crescimento fetal, aquém de seu potencial, o que resulta no nascimento de indivíduos de baixo peso, caracterizando, assim, a ocorrência de um crescimento intrauterino retardado (CIUR).

Devido à ausência de parâmetros clínicos para avaliar as alterações decorrentes dos distúrbios no desenvolvimento e crescimento fetais, o baixo peso ao nascimento tem sido sugerido como um potencial indicador para a avaliação dessas alterações (Chiswick, 1985; Martin-Gronert e Ozanne, 2006).

Segundo Wu et al. (2004), devido a modificações no status epigenético do genoma e, conseqüentemente, na expressão gênica do embrião ou feto, a ocorrência de injúrias nutricionais durante a vida fetal pode ocasionar alterações permanentes nos próximos estágios de desenvolvimento durante a vida pós-natal. Em humanos, esta reprogramação do desenvolvimento, denominada programação pré-natal tem sido associada a doenças na vida adulta, relacionadas a alterações metabólicas, endócrinas e imunológicas (Barker, 1998; Harding, 2001).

1.1. Crescimento intrauterino retardado em suínos

Na espécie suína, o CIUR é um evento observado naturalmente e de forma mais severa que em outros animais domésticos, em decorrência do maior número de conceptos que a fêmea é capaz de gerar em uma gestação. Dados da literatura revelam que 15 a 20% dos leitões recém-nascidos nesta espécie apresentam um peso ao nascimento inferior a 1,10 kg (Wu et al., 2006). Entretanto, ao longo das últimas décadas, as conseqüências deste fenômeno foram agravadas, devido à utilização de estratégias de melhoramento genético que priorizaram a seleção de fêmeas com maiores taxas de ovulação. Como resultado destes programas, surgiram as chamadas fêmeas hiperprolíficas, caracterizadas por um desequilíbrio entre o elevado número de fetos presentes no útero e a capacidade uterina da fêmea gestante (Town et al., 2004; Town et al., 2005; Foxcroft et al., 2006).

A placenta da fêmea suína é individual e do tipo epitélio-corial difusa, portanto o resultado da superlotação uterina observada nestas fêmeas é o comprometimento do desenvolvimento placentário, devido a um reduzido espaço uterino disponível por feto (Town et al., 2004; 2005). Knight et al. (1977) demonstraram um menor desenvolvimento placentário em fêmeas suínas submetidas a ovariectomia unilateral e efeitos negativos sobre o crescimento fetal, em conseqüência à redução da área de contato da placenta com os tecidos maternos. A redução da eficiência placentária descrita por Knight et al. (1977) foi corroborada por Vallet e Christenson. (2003) que observaram a redução na secreção de algumas proteínas pela placenta, em quadros de superlotação uterina, independente do peso apresentado por essa.

De acordo com Père e Etienne (2000), o aumento do número de fetos não é acompanhado, na mesma proporção, pelo aumento do fluxo sanguíneo uterino, o que determina um reduzido suprimento sanguíneo e, conseqüentemente, nutricional para

cada feto. Dessa forma, a quantidade de nutrientes disponíveis por embrião/feto depende diretamente do número de conceptos presentes no útero. Segundo Bérard et al. (2008), isso poderia explicar a variação no desenvolvimento fetal, originando nascidos com pesos inversamente relacionados ao tamanho da leitegada. Quiniou et al. (2002) demonstraram que o aumento de apenas cinco leitões por leitegada foi responsável pela redução de 35 gramas no peso fetal para cada feto excedente adicionado ao útero.

A literatura demonstra que um suprimento nutricional desproporcional ao longo do corno uterino resulta no nascimento de leitões mais leves, fracos, que não atingiram o seu potencial de crescimento. As alterações ocorridas nestes animais durante a vida fetal podem permanecer ao longo da vida e determinar uma parte considerável da variação, principalmente a limitação, do crescimento pós-natal e do desempenho do animal adulto (Foxcroft e Town, 2004; Wu et al., 2004). De fato, estudos têm sugerido que os principais efeitos do CIUR descritos em suínos estão associados ao crescimento pós-natal e ao desenvolvimento muscular. De acordo com diversos autores, os leitões acometidos pelo CIUR apresentam uma redução do desempenho produtivo, caracterizado por um baixo ganho de peso diário e peso ao final das várias fases de crescimento, inclusive ao abate (Quinou et al., 2002; Gondret et al., 2006; Beaulieu et al., 2010; Alvarenga et al., 2013). Foi demonstrado também que estes animais apresentariam um menor número de fibras musculares esqueléticas ao nascimento, que não seria compensado durante a vida pós-natal, além de alterações nas características de qualidade de carne (Town et al., 2004; Gondret et al., 2006; Rehfeldt e Kuhn, 2006; Beaulieu et al., 2010; Alvarenga et al., 2013).

Além da influência sobre o desenvolvimento muscular, desempenho produtivo e qualidade de carne, alguns estudos revelam uma maior extensão dos efeitos do CIUR, como a redução no desenvolvimento de diversos órgãos (Bauer et al., 1998; Wang et al., 2005; Wang et al., 2010; Alvarenga et al., 2013).

No aspecto reprodutivo, estudos ainda são escassos na literatura. Em fêmeas, Da Silva-Buttkus et al. (2003) demonstraram que leitoas de baixo peso apresentam, ao nascimento, um menor peso do ovário e alterações no desenvolvimento folicular. Segundo estes autores, o maior número de folículos primordiais associado ao menor número de folículos primários e secundários, observados nestes animais, caracterizam um atraso no desenvolvimento reprodutivo. Em machos, investigações apontando a

influência do peso ao nascimento sobre o desenvolvimento do trato reprodutivo ainda não foram realizadas.

2. Desenvolvimento dos testículos em suínos

2.1. Desenvolvimento testicular embrionário

O desenvolvimento gonadal em suínos, como em outros mamíferos, inicia-se com a formação da crista urogenital a partir de células somáticas derivadas do mesoderma intermediário que, por sua vez, se estende ao longo do eixo antero-posterior do embrião (Park e Jameson, 2005; Wilhelm et al., 2007). A crista urogenital pode ser dividida em três regiões: pronefro, mesonefro e metanefro. No mesonefro, mais especificamente em sua superfície ventro-lateral, ocorre o surgimento de uma sub-região denominada crista genital ou gonadal - decorrente do espessamento do epitélio celomático - sendo esta o local em que é observado o desenvolvimento das gônadas (Capel, 2000).

A formação da gônada indiferenciada tem início no momento em que as células germinativas primordiais, originadas do epiblasto, proliferam e migram, via intestino primitivo, da base do alantoide para a crista genital (Ginsburg et al. 1990; Wilhelm et al., 2007). A colonização da gônada indiferenciada pelas células germinativas primordiais, agora denominadas gonócitos, estimula a proliferação das células mesenquimais e do epitélio celomático. Neste momento, a gônada indiferenciada apresenta quatro linhagens celulares bipotenciais: as células germinativas primordiais, células endoteliais originadas da aorta dorsal, células mesenquimais originadas do mesoderma, e a linhagem celular originada do epitélio celomático, sendo composta, principalmente, pelas células de suporte e esteroideogênicas, precursoras das células de Sertoli e de Leydig no testículo, respectivamente (Swain e Lovell-Badge, 1999; Merchant-Larios e Moreno-Mendoza, 2001).

A diferenciação testicular em suínos ocorre em torno do 26^o-27^o dia de gestação, iniciando-se com a expressão do fator de determinação testicular (gene SRY) no braço curto do cromossomo Y pelas células de pré-Sertoli - células precursoras das células de Sertoli presentes na gônada indiferenciada (Pelliniemi, 1975; Capel, 2000). A expressão deste fator promove a diferenciação dos precursores das células de Sertoli, direcionando, posteriormente, a diferenciação e a migração dos outros tipos celulares do testículo, incluindo as células de Leydig fetais, através de interações célula-célula e/ou

secreção de fatores estimulatórios (Kaminsky et al., 1999; Swain e Lovell-Badge, 1999; Ross e Capel, 2005).

O início do desenvolvimento testicular é marcado pela formação dos cordões seminíferos primitivos, após a diferenciação das células de Sertoli que se agregam e envolvem os gonócitos. Os ninhos celulares recém-formados são contornados por uma camada de células peritubulares mioides supostamente originadas tanto do epitélio celomático como do próprio mesênquima da crista genital (Combes et al., 2009). Entre os ninhos celulares e as células peritubulares mioides se encontra uma membrana basal. O tecido intersticial que circunda os cordões seminíferos é ocupado por células mesenquimais e endoteliais e pelas células de Leydig fetais (Pelliniemi, 1975; Van Strateen e Wensing, 1978; Kaminski et al., 1999; Merchant-Larios e Moreno-Mendoza, 2001; Ross e Capel, 2005).

A partir da diferenciação das células de Sertoli, ocorre a ativação de genes envolvidos na regulação das funções destas células. Dentre estas, a expressão do AMH (Hormônio Anti-Mulleriano), membro da família TGF- β , é especialmente importante por induzir a regressão dos ductos Mullerianos, suprimindo o desenvolvimento do trato genital feminino (Swain e Lovell-Badge, 1999; Capel, 2000).

Durante o desenvolvimento pré-natal, aproximadamente do 60º dia pós-coito ao nascimento, as células de Sertoli proliferam ativamente, entretanto, os mecanismos regulatórios deste processo ainda não estão esclarecidos. Esta característica está associada ao aumento da massa de cordões seminíferos, do peso do testículo e das concentrações séricas de FSH observados durante este período (Van Strateen e Wensing, 1977; Colenbrander et al., 1982; McCoard et al., 2003). As células de Leydig presentes durante a fase pré-natal são as células de Leydig fetais, responsáveis pelo desenvolvimento do trato genital masculino e dos caracteres sexuais secundários (Van Strateen e Wensing, 1978; Wilhelm et al., 2007).

A integridade dos principais eventos ocorridos durante o desenvolvimento testicular embrionário, formação dos cordões seminíferos e a diferenciação das células de Sertoli e de Leydig, está diretamente relacionada à função reprodutiva do animal adulto (Merchant-Larios e Moreno-Mendoza, 2001).

2.2. Desenvolvimento testicular pós-natal

O desenvolvimento testicular pós-natal em suínos é variável dentre as diferentes raças, provavelmente devido a diferenças iniciadas a partir da diferenciação sexual e que se mantém durante a organogênese (Kaminsky et al., 1999).

Ao nascimento, o parênquima testicular é constituído por cordões seminíferos, formados por células de Sertoli e gonócitos, envolvidos por uma camada de células peritubulares mioides, e por um tecido intersticial composto principalmente por células de Leydig, células do tecido conjuntivo e vasos sanguíneos (Van Strateen e Wensing, 1978; Godinho e Cardoso, 1979; França, 1987; Avelar et al., 2010). De acordo com Harayama et al. (1991), o principal componente dos testículos, neste momento, é o tecido intersticial.

Durante o período compreendido entre o nascimento e o primeiro e segundo meses de vida, a população de gonócitos presente nos cordões seminíferos reduz acentuadamente, sendo observadas, ao final destes períodos, as primeiras espermatogônias A (Godinho e Cardoso, 1979; França et al., 1988; Avelar et al., 2010). Apesar da existência de um consenso quanto ao momento do desaparecimento total dos gonócitos, o surgimento das primeiras espermatogônias A parece variar entre raças e cruzamentos (Godinho e Cardoso, 1979; França e Cardoso, 1998; Avelar et al., 2010). A população de espermatogônias A apresenta um discreto aumento entre dois e três meses de idade, momento em que ocorre simultaneamente a estabilização da população destas células e o desaparecimento dos gonócitos (Godinho e Cardoso, 1979; França et al., 1988). De acordo com França et al. (1988), neste momento, o estoque basal de espermatogônias A está definido.

Aos dois meses de idade, concomitante ao início do crescimento da população de espermatogônias A, surgem as primeiras espermatogônias B e espermatócitos primários e, em algumas raças, as primeiras espermátides arredondadas. Assim como em outros mamíferos, a população celular dos cordões/túbulos seminíferos se mantém baixa até próximo à puberdade. Entretanto, com o início deste período, ocorre um aumento acentuado dessa população, sendo constituída por espermatogônias, espermatócitos primários e secundários e espermátides arredondadas e alongadas (Godinho e Cardoso, 1979; França et al., 1988; Harayama et al., 1991; Avelar et al., 2010). Estas modificações na população celular dos túbulos seminíferos durante a fase pré-púbere são acompanhadas pelo aumento progressivo do peso testicular, comprimento e

diâmetro dos túbulos seminíferos e porcentagem destas estruturas no parênquima testicular (Godinho e Cardoso, 1979; França et al., 1988; Harayama et al., 1991; Lunstra et al., 2003; Avelar et al., 2010; Ford e Wise, 2011).

Em suínos, a puberdade é caracterizada por um aumento significativo nos pesos corporal e testicular, comprimento e diâmetro dos túbulos seminíferos, na população de células espermatogênicas, concentrações plasmáticas de testosterona, além do percentual de túbulos seminíferos no parênquima. Entretanto, os eventos mais marcantes da puberdade são a presença de espermátides alongadas no lúmen tubular e a maturação das células de Sertoli (França, 1987; Harayama et al., 1991; França et al., 2000; Avelar et al., 2010). Durante o período compreendido entre a puberdade e a maturidade sexual, a população de células espermatogênicas aumenta progressivamente (Godinho e Cardoso, 1979; França, 1987).

Por sua vez, a maturidade sexual é caracterizada pela estabilização de vários parâmetros testiculares, como a porcentagem de túbulos seminíferos e células de Leydig no parênquima testicular, diâmetro tubular e população de células espermatogênicas (França, 1987; Harayama et al., 1991; França et al., 2000; Avelar et al., 2010). Este momento é marcado também pela estabilização das concentrações plasmáticas de testosterona (França et al., 2000).

Durante o desenvolvimento testicular, as células de Sertoli apresentam duas fases funcionalmente distintas, denominadas de fase de proliferação e fase de maturação. A fase de proliferação corresponde ao período pré-púbere, no qual as células de Sertoli proliferam ativamente. Durante esta fase, são observados dois momentos marcantes de divisão celular. O primeiro compreende o período do nascimento até os 30 dias de idade, principalmente durante os primeiros 15 dias pós-nascimento (McCoard et al., 2001; McCoard et al., 2003; Avelar et al., 2010), quando ocorre o aumento de aproximadamente seis vezes no número de células de Sertoli por testículo. O segundo momento é observado entre três e quatro meses de idade para a maioria das raças, no período que antecede o início da puberdade, quando se observa um aumento de quase 100% no número de células de Sertoli por testículo (França et al., 2000). Estes períodos de maior proliferação das células de Sertoli coincidem com níveis plasmáticos mais elevados de FSH (França et al., 2000). O encerramento da atividade mitótica das células de Sertoli define o início da fase de maturação, caracterizada pela diferenciação destas células. Nesta fase, alguns eventos relacionados às funções das células de Sertoli

passam a ser observados, como a formação do lúmen tubular devido à secreção de fluidos pelas células de Sertoli, desenvolvimento do citoesqueleto e filamentos de actina relacionados às especializações destas células, e formação das junções de oclusão responsáveis pelas barreiras de células de Sertoli e proliferação de espermátócitos primários (Russel et al., 1989; França et al., 2000; Ford e Wise, 2009; Avelar et al., 2010).

As células de Leydig se encontram completamente diferenciadas após o nascimento (Van Strateen e Wensing, 1977; França et al., 2000; França et al., 2005), sendo observadas, durante o desenvolvimento pós-natal, duas fases de proliferação destas células. A primeira ocorre durante o período perinatal compreendido entre o nascimento e 30 dias de vida e a segunda, entre o início da puberdade até a idade adulta. Ambas as fases coincidindo com o aumento das concentrações plasmáticas de testosterona (Van Strateen e Wensing, 1977; França et al., 2000).

3. Estrutura testicular e espermatogênese em suínos

3.1. Anatomia dos testículos

Os testículos são os órgãos do sistema genital masculino responsáveis pela produção de espermatozoides e do hormônio sexual masculino testosterona. Na espécie suína, os testículos estão localizados no interior do escroto, estrutura formada pela pele da parede ventral do abdome, que se encontra na região perineal, não sendo pendular como em outras espécies de animais domésticos. Apresentam posição oblíqua com o eixo longo direcionado dorso caudalmente. A borda livre do testículo, associada à cabeça do epidídimo, se encontra em posição cranio-ventral, enquanto a borda fixada à cauda do epidídimo, porção mais alta, em posição caudo-dorsal (Getty, 1986; Dyce et al., 2010).

Dentro do compartimento escrotal, os testículos estão localizados em uma cavidade serosa revestida por uma evaginação do peritônio, a túnica vaginal (parietal e visceral), o que permite certo grau de mobilidade do órgão no interior do escroto (Gartner e Hiatt, 2007).

3.2. Parênquima testicular

O parênquima testicular é envolvido por uma cápsula de tecido conjuntivo denso modelado denominada túnica albugínea (Setchell, 1977). A túnica albugínea apresenta

um espessamento, o mediastino, de onde partem septos fibrosos que dividem todo o órgão em lóbulos, sendo o espaço interlobular muito abundante na espécie suína (Getty, 1986; Junqueira e Carneiro, 2008).

Assim como em outros mamíferos, o parênquima testicular do suíno sexualmente maduro é formado por dois compartimentos principais: o compartimento intersticial e o compartimento tubular. O interstício é composto por tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e por um grande número de células de Leydig, produtoras de esteroides (França e Chiarini-Garcia, 2005).

O compartimento tubular consiste basicamente na túnica própria, no epitélio seminífero, um espesso epitélio especializado, e no lúmen tubular. Os túbulos seminíferos são estruturas longas e convolutas, desprovidas de inervação e vascularização, que compreendem aproximadamente 90% do testículo. Entretanto, nos suínos, devido à grande abundância de células de Leydig, essa proporção é reduzida (Setchell, 1977; França e Chiarini-Garcia, 2005). França et al. (2005) demonstraram uma proporção de aproximadamente 85% de túbulos seminíferos e 10% de células de Leydig no testículo de suínos em contraste a, aproximadamente, 90% de túbulos seminíferos e 4% de células de Leydig nos testículos de pequenos roedores de laboratório. A túnica própria reveste externamente o epitélio, sendo formada por uma camada externa de tecido conjuntivo, uma camada mais interna composta por células musculares lisas - células peritubulares mioides - e a membrana basal, que por sua vez, é formada pelas células peritubulares mioides juntamente com as células de Sertoli, que serve de suporte para o epitélio seminífero. As células peritubulares mioides são células contráteis responsáveis pela movimentação de fluidos e propulsão de espermatozoides no lúmen tubular (Setchell, 1977; França e Chiarini-Garcia, 2005; Gartner e Hiatt, 2007). Adicionalmente, apresentam um importante papel no processo espermatogênico, devido à produção de fatores que modulam a função das células de Sertoli (Skinner et al., 1985).

No interior dos túbulos seminíferos, o epitélio seminífero é constituído pelas células de Sertoli e por três diferentes gerações de células germinativas que se encontram inseridas e associadas às criptas do citoplasma das células de Sertoli: espermatogônias, espermatócitos e espermátides. A orientação das células germinativas no epitélio seminífero ocorre de acordo com o grau de diferenciação destas, sendo as células mais

avançadas localizadas mais próximas do lúmen tubular (França e Chiarini-Garcia, 2005).

3.3. Espermatogênese

No suíno, como em outros mamíferos, a espermatogênese é um processo contínuo, cíclico altamente organizado e complexo, no qual há formação dos espermatozoides a partir de uma espermatogônia tronco. Este processo é composto por três fases funcional e morfológicamente distintas: espermatogonial, espermatocitária e espermiogênica.

A fase espermatogonial (proliferativa ou mitótica) é o período no qual as espermatogônias proliferam por sucessivas divisões mitóticas, dando origem às classes consecutivas de espermatogônias e, por fim, aos espermatócitos. Simultaneamente, mantém o número de espermatogônias tronco por meio da auto renovação. A segunda fase, denominada fase espermatocitária ou meiótica, é o momento no qual os espermatócitos passam por uma sequência de divisões meióticas, resultando na formação de células haploides, as espermátides. A terceira e última fase é denominada de fase espermiogênica ou de diferenciação, na qual as espermátides passam por uma série de processos de diferenciação, resultando na formação das células germinativas mais diferenciadas, os espermatozoides (Clermont, 1972; Russel et al., 1990; França et al., 2005).

De acordo com Frankenhuis et al. (1982), a espermatogênese no varrão possui grande similaridade à observada em pequenos roedores de laboratório, descrita previamente por Clermont e Leblond (1955), sendo observadas quatro classes de espermatogônias: espermatogônia A indiferenciada, espermatogônia A diferenciada, espermatogônia intermediária e espermatogônia B. As espermatogônias indiferenciadas ainda podem ser divididas em três categorias de acordo com a sua localização topográfica: espermatogônia A isolada (As), A pareada (Apr) e A alinhada (Aal). As espermatogônias diferenciadas também podem ser subdivididas em quatro gerações: espermatogônia tipo A₁, A₂, A₃ e A₄. Dessa forma, durante a espermatogênese no suíno, uma espermatogônia tronco sofre aproximadamente 10 divisões mitóticas antes de se diferenciar em espermatócito, sendo observada a seguinte sequência de gerações espermatogoniais formadas pelas divisões mitóticas dessas células: espermatogônia tipo A indiferenciada (A isolada (As); A pareada (Apr); A alinhada (Aal)), tipo A

diferenciada (A₁, A₂, A₃, A₄), intermediária e tipo B (Frankenhuis et al., 1982; França et al., 2005).

A fase espermatocitária é similar entre as espécies de mamíferos e se inicia quando, após as sucessivas divisões mitóticas, as espermatogônias mais avançadas (espermatogônias tipo B) entram na prófase da primeira divisão meiótica, dando origem aos espermatócitos primários. A primeira fase da prófase meiótica é a de preleptóteno/leptóteno, seguida pela fase de zigóteno, quando ocorre o pareamento dos cromossomos homólogos. À medida que o volume nuclear aumenta progressivamente e os cromossomos se encurtam e engrossam, é iniciada a fase de paquíteno, que apresenta duração mais longa e durante a qual os volumes nuclear e celular aumentam progressivamente. Esta é seguida pela fase de diplóteno, durante a qual os cromossomos se dividem parcialmente. Finalmente, o núcleo entra em metáfase, anáfase e telófase, dando origem ao espermatócito secundário, que possui tempo de vida curto, iniciando a segunda divisão meiótica para dar origem às espermátides (Clermont, 1972).

Durante a fase espermiogênica, as espermátides sofrem uma série de alterações morfológicas, denominadas, em conjunto, espermiogênese, após as quais ocorrerá a formação dos espermatozoides. Neste processo, os principais eventos observados são compactação da cromatina e alongamento nuclear, formação do acrossomo a partir do complexo de Golgi, formação da cauda e eliminação de grande parte do citoplasma (Clermont, 1972; Lino-Neto et al., 2005).

Segundo França et al. (2005), em suínos, apenas 20 a 30% do número total de espermatozoides são produzidos a partir de cada espermatogônia do tipo A, devido à grande perda de células germinativas durante a fase espermatogonial, principalmente nas gerações A₂-A₄. Essa perda mantém o número ótimo de células germinativas que a célula de Sertoli é capaz de suportar. As apoptoses são também observadas nas fases espermatocitária e espermiogênica, nas quais ocorre uma perda de, respectivamente, 10% das células germinativas nas divisões de espermatogônia B para espermatócito primário em preleptóteno (França et al., 2005), e de 25% das espermátides arredondadas (França et al., 1988). Segundo França et al. (1988), as perdas celulares observadas na fase espermiogênica podem ser atribuídas a alterações cromossomais originadas durante as divisões meióticas e a descamações para o lúmen tubular.

3.4. Ciclo do epitélio seminífero

Durante o processo espermatogênico, as células germinativas em diferentes estágios de desenvolvimento se organizam em quatro ou cinco camadas celulares, formando associações específicas entre si denominadas estádios. As associações celulares ocorrem em uma sequência específica, sendo que um mesmo estágio se repete em uma determinada área do epitélio seminífero com o decorrer do tempo (Clermont, 1972). Em suínos, é observado apenas um estágio por secção transversal de túbulo seminífero (França et al., 2005).

Dois métodos foram descritos para a identificação dessas associações celulares no testículo do suíno: o método do sistema acrossômico, descrito para a espécie suína por França et al. (2005), baseado no desenvolvimento do sistema acrossômico nas espermátides recém-formadas; e o método da morfologia tubular, baseado simultaneamente nas características morfológicas do núcleo das espermátides e a posição dos núcleos das espermátides mais avançadas no epitélio seminífero (Swierstra, 1968). Este último método determina oito estádios do ciclo do epitélio seminífero na espécie suína. Nesta revisão, apenas o método da morfologia tubular será descrito por ter sido utilizado na metodologia de análise morfométrica.

A descrição dos oito estádios do ciclo do epitélio seminífero, de acordo com o método da morfologia tubular, foi realizada para diferentes raças de suínos de forma muito similar por diversos autores (Swierstra, 1968; Ortavant et al., 1977; Okwun et al., 1996; França e Cardoso, 1998; Garcia-Gil et al., 2002). Entretanto, devido à ocorrência de pequenas diferenças quanto ao início e término de alguns estádios e quanto à classificação e presença dos tipos espermatogoniais também em alguns estádios, tal descrição será apresentada de acordo com os achados mais frequentes:

- O estágio 1 se estende desde a ausência das espermátides alongadas no lúmen até o início da elongação do núcleo destas células. Nesse estágio, apenas são observadas espermátides arredondadas, formando quatro a seis camadas no compartimento adluminal do epitélio seminífero. Próximas à membrana basal, são observadas espermatogônia tipo A e espermátócitos primários em transição de preleptóteno para leptóteno. Acima da camada de espermátócitos primários em preleptóteno/leptóteno são observadas uma ou duas camadas de espermátócitos primários em paquíteno (Swierstra, 1968; Ortavant et al., 1977; Okwun et al., 1996; França e Cardoso, 1998; Garcia-Gil et

al., 2002). A frequência observada para este estágio é de aproximadamente 10,8% (Ortavant et al., 1977).

- O estágio 2 se inicia com o alongamento do núcleo das espermátides e termina com a formação dos feixes de espermátides alongadas. Nesse estágio, são observadas espermatogônias do tipo A e espermatócitos primários na fase de zigóteno e paquíteno da prófase meiótica (Swierstra, 1968; Ortavant et al., 1977; Okwun et al., 1996; França e Cardoso, 1998; Garcia-Gil et al., 2002). Para este estágio, a frequência observada é de aproximadamente 14,4% (Ortavant et al., 1977).

- O estágio 3 compreende o momento do ciclo entre a formação dos feixes de espermátides alongadas no citoplasma das células de Sertoli e o aparecimento de figuras de meiose. As espermátides alongadas formam os feixes com seus núcleos direcionados para os núcleos das células de Sertoli na base do túbulo seminífero. São observadas espermatogônias do tipo A, espermatócitos primários em zigóteno e em transição da fase de paquíteno para diplóteno da prófase meiótica (Swierstra, 1968; Ortavant et al., 1977; Okwun et al., 1996; França e Cardoso, 1998 e Garcia-Gil et al., 2002). A frequência observada para este estágio é de aproximadamente 3,5 % (Ortavant et al., 1977).

- O estágio 4 se estende do início da primeira divisão meiótica ao término da segunda divisão meiótica. É caracterizado pela presença das figuras de meiose da primeira e segunda divisão e espermatócitos secundários. Estão ainda presentes espermatogônias do tipo A, espermatócitos primários em transição da fase de zigóteno para paquíteno da prófase meiótica e espermátides arredondadas e alongadas. Os feixes de espermátides alongadas se localizam nas criptas do citoplasma das células de Sertoli no meio do epitélio seminífero (Swierstra, 1968; Ortavant et al., 1977; Okwun et al., 1996; França e Cardoso, 1998; Garcia-Gil et al., 2002). Para este estágio, a frequência observada é de aproximadamente 11,6 % (Ortavant et al., 1977).

- No estágio 5 são ainda observadas duas gerações de espermátides: arredondadas e alongadas. Os feixes de espermátides alongadas se localizam nas criptas do citoplasma das células de Sertoli, na porção mais basal do epitélio seminífero. São observados espermatócitos primários em paquíteno e espermatogônias do tipo A e intermediárias (Swierstra, 1968; Ortavant et al., 1977; Okwun et al., 1996; França e Cardoso, 1998; Garcia-Gil et al., 2002). A frequência observada para este estágio é de aproximadamente 8,9 % (Ortavant et al., 1977).

- O estágio 6 apresenta a mesma população celular do estágio V. Entretanto, observa-se o início da migração dos feixes de espermátides alongadas em direção ao lúmen do túbulo seminífero. Nesse momento, os feixes são menos evidentes. As espermatogônias intermediárias são observadas em maior número, podendo ser observadas espermatogônias tipo B (Swierstra, 1968; Okwun et al., 1996; França e Cardoso, 1998). A frequência observada para este estágio é de aproximadamente 20,3 % (Ortavant et al., 1977).

- No estágio 7, os feixes de espermátides alongadas terminam a migração em direção ao lúmen e se dissociam. São observados os primeiros corpos residuais. Espermatogônias tipo A e tipo B, além de espermatócitos primários em paquíteno e espermátides arredondadas podem ser observados (Swierstra, 1968; Okwun et al., 1996; França e Cardoso, 1998). Para este estágio, a frequência observada é de aproximadamente 18,5 % (Ortavant et al., 1977).

- O estágio 8 se estende do momento em que as espermátides alongadas estão localizadas no lúmen do túbulo ao seu completo desaparecimento da porção luminal. A principal característica deste estágio é a liberação das espermátides alongadas no lúmen, com a presença de corpos residuais na superfície luminal do epitélio seminífero e no citoplasma das células de Sertoli em direção à base do túbulo. São observadas espermatogônias tipo A, espermatócitos primários em preleptóteno e paquíteno e espermátides arredondadas. Ocasionalmente podem ser observadas espermatogônias do tipo B (Swierstra, 1968; Ortavant et al., 1977; Okwun et al., 1996; França e Cardoso, 1998; Garcia-Gil et al., 2002). Para este estágio, a frequência observada é de aproximadamente 12,0 % (Ortavant et al., 1977).

A frequência dos estágios pode variar entre as diferentes raças da espécie suína, como foi demonstrado em estudos realizados para as raças Yorkshire e Lacombe (Swierstra, 1968), Meishan (Okwun et al., 1996), Piau (França e Cardoso, 1998) e Landrace (Garcia-Gil et al., 2002).

O intervalo compreendido entre a ocorrência de um determinado estágio e o seu reaparecimento em um mesmo ponto do epitélio seminífero, ou seja, uma série completa de associações celulares é denominada ciclo do epitélio seminífero (Clermont, 1972). Em torno de 4,5 ciclos são necessários para que a espermatogênese se complete a partir do surgimento da espermatogônia A (Russel et al., 1990). Para uma mesma espécie, a duração do ciclo espermatogênico é considerada constante (Clermont, 1972), muito

embora exista uma pequena variação entre raças e, possivelmente, genéticas de suínos, como observados em alguns estudos (Swierstra, 1968; Okwun et al., 1996; França e Cardoso, 1998; Garcia-Gil et al., 2002). Cada ciclo do epitélio seminífero, na espécie suína, apresenta a duração média de 8,5 a 9 dias, sendo a duração total da espermatogênese de aproximadamente 38,5 a 40 dias (Swierstra, 1968; França e Cardoso, 1998; Garcia-Gil et al., 2002). Neste período, cada fase da espermatogênese apresenta duração de aproximadamente duas semanas (França et al., 2005). Devido a curta duração do ciclo do epitélio seminífero e também à maior eficiência da célula de Sertoli, os suínos apresentam uma elevada eficiência da espermatogênese quando comparados a outras espécies de mamíferos (França et al., 2005).

4. Proliferação celular e proteína MCM7

O desenvolvimento, a sobrevivência e a manutenção dos tecidos em mamíferos dependem de um controle sistemático sobre a proliferação celular. O ponto crucial durante este processo é a iniciação da replicação do DNA, evento coordenado por uma série de moléculas sinalizadoras responsáveis por controlar o momento no qual a célula iniciará o processo de divisão (Stoeber et al., 2001). A primeira etapa na replicação do DNA é a formação do complexo pré-replicativo ainda na fase G1 do ciclo celular, a partir da associação entre o complexo de reconhecimento da origem de replicação (Origin Recognition Complex - ORC) e proteínas iniciadoras da replicação. O primeiro componente desta complexa estrutura é composto por seis subunidades, Orc₁₋₆, sendo responsável por reconhecer as origens de replicação no DNA e promover o recrutamento sequencial dos fatores de iniciação, sendo eles: Cdc6 (cell division cycle 6), Cdt1 (chromatin licensing and DNA replication factor 1) e proteínas da família MCM₂₋₇ (Minichromosome maintenance complex) (Labib e Diffley, 2001; Diffley e Labib, 2002). Neste processo, o complexo MCM₂₋₇ possui um papel fundamental para a duplicação do material genético por apresentar atividade de helicase, promovendo a abertura da dupla-hélice e a separação do DNA em duas fitas simples, para que, desta forma, sua replicação seja possível (Labib e Diffley, 2001).

As proteínas da família MCM₂₋₇ são expressas em todas as fases do ciclo de proliferação celular – G1, S, G2 e M - não estando presentes nos estados considerados fora deste, como a quiescência ou fase G0 - células hábeis a proliferar e facilmente estimuladas por sinais apropriados como fatores de crescimento, ou a senescência e a maturação, sendo

as células nestes últimos estados permanentemente não-proliferativas. Evidências na literatura demonstram que os tipos celulares que se encontram nestes três estados perderam as proteínas MCM₂₋₇ e estão funcionalmente não “licenciados” (Stoeber et al., 2001; Blow e Hodgson, 2002).

Atualmente, estas proteínas têm sido consideradas como potenciais marcadores de proliferação celular, sendo utilizadas como ferramentas de escolha no diagnóstico das células em replicação (Giaginis et al., 2010). Isto se deve à sua expressão durante toda a fase G1 do ciclo celular, em contraste a outros marcadores convencionais, como o Ki67, que apenas são expressos no final desta fase. Esta diferença permite que a marcação das proteínas MCM₂₋₇ detecte tanto as células que estão em proliferação ativa quanto as que apresentam potencial de proliferação, ou seja, células que foram “licenciadas” para a replicação e, portanto, se encontram ativadas, mas ainda estão sintetizando o DNA. (Stoeber et al., 2001).

A expressão da proteína MCM7 foi demonstrada em testículos de ratos de diferentes idades por Com et al. (2006). Segundo estes autores, tanto a presença da marcação imunohistoquímica para esta proteína, quanto a intensidade de marcação variam de acordo com a fase de proliferação e grau de diferenciação das células somáticas e germinativas do testículo. Foi demonstrado que, no período impúbere, a expressão da proteína MCM7 pôde ser observada tanto nos gonócitos quanto nas células de Sertoli, que se encontram na fase de proliferação (França et al., 2000). Por sua vez, nos animais adultos, a imunorreatividade foi observada apenas nas células germinativas, em qualquer estágio do ciclo do epitélio seminífero, apresentando maior intensidade nas espermatogônias e espermatócitos primários jovens. Com a progressão do processo de diferenciação dos espermatócitos, a intensidade de marcação apresentou uma redução progressiva, não sendo mais observada reatividade nos espermatócitos secundários e nas espermatídes arredondadas. A marcação das células peritubulares mioides e células de Leydig também foi observada.

HIPÓTESE

Diante das evidências dos efeitos negativos do baixo peso ao nascimento sobre o ganho de peso, o desenvolvimento da musculatura esquelética e da mucosa do intestino delgado em suínos, sugere-se que o baixo peso ao nascimento também esteja relacionado a um desenvolvimento testicular inadequado, com o comprometimento da eficiência reprodutiva dos machos.

OBJETIVOS

1. Objetivo geral:

- Investigar, os efeitos do baixo peso ao nascimento sobre o desenvolvimento testicular de suínos, aos oito dias e oito meses de idade, avaliando as possíveis consequências para o desempenho reprodutivo do animal pós-púbere.

2. Objetivos específicos:

- Determinar os possíveis efeitos sobre a biometria corporal e testicular aos oito dias e oito meses de idade;
- Investigar, por meio de análises histomorfométricas, a ocorrência de alterações no parênquima testicular, avaliando o diâmetro dos cordões/túbulos seminíferos, o número de células de Sertoli/secção transversal de cordão ou túbulo seminífero e o número de cordões/túbulos seminíferos por área de testículo aos oito dias e oito meses de idade, bem como as proporções volumétricas (Vv%) entre os diferentes componentes do parênquima testicular aos oito dias de idade;
- Determinar os efeitos sobre o número de células de Sertoli, Leydig e gonócitos por testículo e por grama de testículo aos oito dias de idade;
- Quantificar, aos oito meses de idade, os diferentes tipos celulares presentes nos túbulos seminíferos em estágio 1 do sistema tubular, determinando a ocorrência de alterações no número corrigido das células observadas;
- Avaliar a eficiência da espermatogênese aos oito meses de idade, através do cálculo das razões entre os números corrigidos de células espermatogênicas e das células de Sertoli;
- Avaliar o número de espermátides testiculares, resistentes à sonicação, aos oito meses de idade;

- Determinar as alterações na atividade proliferativa das células de Sertoli, Leydig e germinativas aos oito dias de idade, e das células de Leydig e germinativas aos oito meses de idade.

MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA), protocolo nº 65/2011 (Anexo III).

1. Local e período

O experimento foi realizado na Granja Paraíso, núcleo filial de multiplicação genética de suínos da empresa Agroceres PIC[®], no período compreendido entre novembro de 2011 a agosto de 2012. A granja localiza-se no município de Patos de Minas/MG, à margem da rodovia BR-365, Km 429, na região do Alto Paranaíba e na Mesorregião do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba.

2. Instalações e manejo do sistema de produção

A Granja Paraíso é uma granja multiplicadora de ciclo completo com sistema de produção em sítios segregados, apresentando três unidades de produção denominadas Sítio, Nest I e Nest II. Na unidade de produção Sítio, estão localizados os setores de Reposição, Gestação e Maternidade e em ambas as unidades Nest I e Nest II, encontram-se os setores de creche, recria e terminação. Durante o período do experimento, o plantel era composto por 4007 fêmeas reprodutoras, com um total de 107.189 leitões desmamados/ano.

No setor de gestação, ao término do período de aleitamento, as matrizes eram alojadas em gaiolas individuais, para posteriormente serem submetidas à inseminação artificial. O período médio de descanso após a desmama era de cinco dias, sendo as fêmeas inseminadas 24 horas após a primeira detecção de cio, seguindo um protocolo de 24, 48 e 72 horas, quando ainda se observava manifestação de cio pela fêmea. A confirmação da gestação era realizada entre 45 e 50 dias pós-inseminação, quando então, as fêmeas eram transferidas para baias coletivas onde permaneciam até o período pré-parto. Do primeiro dia pós-desmame ao sexto dia pós-inseminação, as fêmeas consumiam ração peletizada para gestantes *ad libitum*. A partir do sétimo dia pós-inseminação, o fornecimento de ração passava a ser controlado de acordo com o tempo de gestação, sendo do 7º ao 74º dia, 2,0 a 2,5 kg de ração/dia; do 75º ao 89º dia, 3,0 kg de ração/dia; e dos 90 aos 110 dias de gestação, 3,0 a 3,3 kg de ração/dia. As matrizes eram conduzidas ao setor de maternidade, em média, quatro a cinco dias antes da data prevista para o parto. Após desinfecção das salas da maternidade, era realizado vazio

sanitário, por um período de dois dias. De 110 dias de gestação até o dia do parto, as fêmeas recebiam, de forma controlada, ração farelada para lactantes, sendo que após o parto até a desmama, a ração passava a ser oferecida *ad libitum*.

A granja não utilizava protocolo de indução de parto, entretanto, o tempo máximo de gestação permitido para porcas multíparas era de 115 dias, quando então se realizava a aplicação de prostaglandina F2 α (Lutalyse[®]) para induzir o parto. Imediatamente após o nascimento, era realizada a limpeza e secagem dos leitões, sendo, em seguida, direcionados e estimulados a mamar o colostro. Não eram utilizadas como medidas de manejo o corte e a cura de umbigo e o corte de dentes. Após um período mínimo de 12 horas de colostragem, eram realizados o corte de cauda, o registro dos animais e a homogeneização de leitegada. O registro dos animais era realizado com tatuagem, que continha os códigos da linhagem do leitão, da linhagem da mãe e o dia do nascimento. Os leitões de baixo peso ao nascimento eram transferidos para mães de leite de primeira ordem de parto e recebiam, durante os primeiros dias de vida, manejo diferenciado, principalmente o estímulo constante para mamada.

Os leitões eram desmamados em média aos 21 dias de idade, quando eram levados para o setor de Creche nos Nests I ou II, onde passavam por uma nova homogeneização de lote. As baias tinham capacidade para 50 animais, sendo evitada a mistura de lotes nas transferências para os setores subsequentes. O período de Creche era de 42 dias, compreendendo animais do 21^o até o 63^o dia de vida. Durante esse período, os leitões recebiam ração peletizada triturada *ad libitum*, dividida em quatro tipos de acordo com a idade: pré I, pré II, Inicial I e Inicial II. A transferência para a Recria ocorria aos 63 dias de idade, onde permaneciam por 42 dias. Na Recria, os animais recebiam a ração Recria I, *ad libitum*, dos 65 aos 90 dias de idade, e ração Recria II, também *ad libitum*, dos 91 aos 105 dias, quando eram transferidos para o setor de terminação, onde permaneciam até serem vendidos como reprodutores ou para o abate. Nesse período, era fornecida ração para Terminação I dos 106 aos 120 dias, Terminação II, dos 121 aos 130 dias de vida, e Final, dos 131 dias até o abate.

No setor de terminação, era realizada a seleção dos machos reprodutores, nas linhagens desenvolvidas para reprodução, a partir dos 140 dias de vida. Eram avaliadas as seguintes características: peso corporal, sendo o peso mínimo de 80 kg e o máximo de 150 kg, a conformação corporal, apurcos, conformação testicular, espessura de toucinho, profundidade de lombo e classificação do pernil (escore de 2 a 10).

3. Amostragem dos animais e grupos experimentais

Para a execução do presente trabalho, foram selecionados 48 leitões machos, de composição racial Landrace, Large White e Puro sintético (Landrace, Large White e Duroc), originadas de cruzamento entre fêmeas da linhagem 1062 x machos AG1020 ou 1210. Os animais utilizados no experimento eram provenientes da linha fêmea, ou seja, filhos de porcas cujas fêmeas são destinadas à reprodução e os machos, ao abate.

Para garantir a superlotação uterina e a consequente ocorrência do crescimento intrauterino retardado, foram utilizadas fêmeas entre a 4^a e a 6^a ordens de parição e leitegadas compostas por 10 a 15 leitões (Alvarenga et al., 2013). Em cada leitegada, foi selecionado um par de leitões que foram distribuídos uniformemente entre dois grupos experimentais, de acordo com o peso ao nascimento, sendo um dos animais de alto peso ao nascimento (Alto PN) – peso variando entre 1,800 a 2,150 kg, e o outro animal, de baixo peso ao nascimento (Baixo PN) – peso variando entre 0,750 a 1,100 kg.

Para estabelecer as faixas de peso que representariam cada grupo experimental, foram pesados imediatamente após o nascimento aproximadamente 1000 (mil) leitões do plantel, originados da mesma linhagem materna. Dessa forma, foram calculados a média (μ) e o desvio-padrão (σ) da variável peso ao nascimento. As faixas de peso de cada grupo foram determinadas como sendo: $\mu + \sigma$ a $\mu + 2\sigma$, para o grupo Alto PN e $\mu - 2\sigma$ a $\mu - \sigma$, para o grupo Baixo PN.

Com o objetivo de evitar possíveis efeitos do peso de leitegada sobre o desenvolvimento fetal (Foxcroft, 2007), somente foram selecionados leitões oriundos de leitegadas de peso médio. Para definir o intervalo de confiança da média (95%) utilizado como critério de seleção das leitegadas, foi realizado um levantamento do peso médio de leitegada obtido e registrado na granja durante o ano anterior. Dessa forma, foi definido o intervalo para peso médio de leitegada, sendo este de 1,250 kg a 1,650 kg.

Ao término da seleção dos animais, foram formados dois grupos, compostos por 24 animais cada: Alto peso ao nascimento e Baixo peso ao nascimento. Em cada grupo, foram formados dois subgrupos, de acordo com a idade à castração: oito dias e oito meses de idade.

As idades escolhidas para a castração foram determinadas com o objetivo de se avaliar os testículos dos animais nos períodos neonatal e pós-puberal. A definição exata das idades foi baseada nas facilidades e limitações das instalações e manejo dos animais.

Dessa forma, foram obtidos os seguintes grupos experimentais:

I – Animais de alto peso ao nascimento castrados aos oito dias de idade

II – Animais de baixo peso ao nascimento castrados aos oito dias de idade

III – Animais alto peso ao nascimento castrados aos oito meses de idade

IV – Animais baixo peso ao nascimento castrados aos oito meses de idade

4. Manejo dos animais

Os procedimentos adotados no parto e posterior manejo dos leitões foram os mesmos utilizados na granja, descritos anteriormente. Imediatamente após o nascimento e antes da mamada do colostro, foi realizada a pesagem dos leitões e obtidas as seguintes medidas biométricas, por meio da utilização de uma fita métrica: diâmetro biparietal da cabeça, comprimento cabeça-cauda, circunferência torácica e circunferência abdominal. A descrição das aferições métricas e do posicionamento dos animais (similar aos oito dias) se encontra no **item 5.1**.

Após a pesagem e avaliação biométrica, os leitões eram identificados com um número na região dorsal, referente à ordem de nascimento. Após 24 horas do nascimento, os animais foram tatuados com a sequência utilizada pela granja, sendo acrescentados, à direita da tatuagem, o número três, que indicava serem animais do experimento, e as letras A ou B, que indicavam animais de alto ou baixo peso ao nascimento, respectivamente. Adicionalmente à tatuagem, os animais receberam dois piques na borda superior da orelha direita e foram brincados com brincos para leitões, sendo utilizada a cor branca para os animais de alto peso ao nascimento e a cor laranja para os animais de baixo peso ao nascimento. À desmama, os leitões foram brincados com brincos de identificação para grandes animais, sendo utilizada a cor branca para os animais de baixo peso ao nascimento e a cor verde, para os animais de alto peso ao nascimento.

Durante os períodos de creche, recria e terminação, os animais permaneceram no fluxo normal de produção, sendo submetidos à rotina diária da granja. Devido à homogeneização de lotes realizada na desmama, os grupos de alto e baixo peso ao nascimento permaneceram em baias separadas, com mesma densidade animal, até os 180 dias de idade. Nesse momento, os animais foram retirados do fluxo de produção da granja e transferidos para uma baia coletiva, com capacidade para 50 animais,

previamente dividida ao meio por uma estrutura metálica removível. Os grupos experimentais foram mantidos separados, sendo cada grupo alocado em um lado da baía. A alimentação dos animais, neste período, manteve-se inalterada.

5. Coleta das amostras

A coleta das amostras foi realizada aos oito dias e oito meses de idade. Todos os procedimentos e avaliações realizados durante as coletas foram os mesmos para ambas as idades, com a exceção do procedimento cirúrgico.

5.1. Parâmetros corporais externos

Foram realizadas a pesagem dos animais em balança mecânica para suínos e a mensuração da biometria corporal - diâmetro biparietal da cabeça (DPC), comprimento cabeça-cauda (CCC), circunferência torácica (CT) e circunferência abdominal (CA) - por meio da utilização de uma fita métrica.

Para as aferições métricas aos oito dias de idade, os animais foram sustentados em posição de estação e os membros traseiros ligeiramente tracionados caudalmente (Figura 1). Aos oito meses, os animais foram mantidos em estação.

As medidas biométricas DPC e CCC foram obtidas pela demarcação prévia de um ponto central no crânio, equidistante entre as bases da orelha e entre um ponto na altura dos olhos e a nuca. A partir da sobreposição da fita métrica ao ponto central do crânio, o DPC foi determinado pela distância compreendida entre as bases das orelhas (Figura 1A) e o CCC foi determinado pela distância compreendida entre o ponto central do crânio e a base da cauda (Figura 1B). A CT foi obtida pela sobreposição da fita métrica sobre uma linha imaginária delimitada ao longo do contorno do tórax, tangente à cernelha e caudalmente ao túber do olecrano (Figura 1C). Para a obtenção da CA, a fita métrica foi sobreposta a uma linha imaginária delimitada ao longo do contorno do abdômen, imediatamente cranial ao túber coxal do íleo (Figura 1D). Todas as aferições métricas foram realizadas pelo mesmo avaliador.

5.2. Procedimento cirúrgico

Para o procedimento cirúrgico realizado aos oito dias e oito meses de idade, foi adotado o método de orquiectomia aberta (Turner e McIlwaith, 2002). Os animais orquiectomizados aos oito dias de idade foram posicionados em um suporte para

castração de leitões modelo vertical e receberam aplicação de anestesia local, com 0,3 mL de cloridrato de lidocaína a 2%, na linha de incisão. Foi realizada uma incisão longitudinal no escroto, e, em seguida, na túnica vaginal, para a exteriorização e exposição do testículo. O cordão espermático foi seccionado com o auxílio de uma tesoura, a fim de causar o esgarçamento do tecido e uma hemostasia local. Após a retirada do testículo, foi aplicado spray repelente e cicatrizante na ferida cirúrgica. O mesmo procedimento foi realizado para o testículo contra-lateral. Os animais foram acompanhados durante os primeiros dez dias após a cirurgia.

Para os animais orquiectomizados aos oito meses de idade, foi realizada a anestesia geral com cloridrato de xilazina a 2% e quetamina a 10%, na dose de 1,0 mg/kg e 5,0 mg/kg, respectivamente, ambas por via endovenosa. Posteriormente, foi realizada a aplicação de anestesia local na linha de incisão, com 20 mL de cloridrato de lidocaína a 2%. Realizou-se incisão longitudinal no escroto, e, em seguida na túnica vaginal, conforme mencionado anteriormente. O cordão espermático foi obliterado por uma ligadura com fio categute cromado nº 4, e posteriormente seccionado caudalmente à ligadura, com o auxílio de uma tesoura, com o objetivo de causar o esgarçamento do tecido e hemostasia local. Após a remoção do testículo, foram aplicados, no interior do escroto, solução de gentamicina a 2% em solução fisiológica 0,5% e pó larvicida (Tanidil[®]), e, externamente, na área ao redor da incisão, spray repelente e cicatrizante. O mesmo procedimento foi realizado para o testículo contra-lateral. Os animais foram acompanhados durante os primeiros dez dias após a cirurgia, quando foram realizadas as aplicações de anti-parasitário (Ivermectina, Ivomec[®]), antiinflamatório (Flunixin meglumine, Flumegam[®]) e antibiótico (enrofloxacino, Kinetomax[®]).

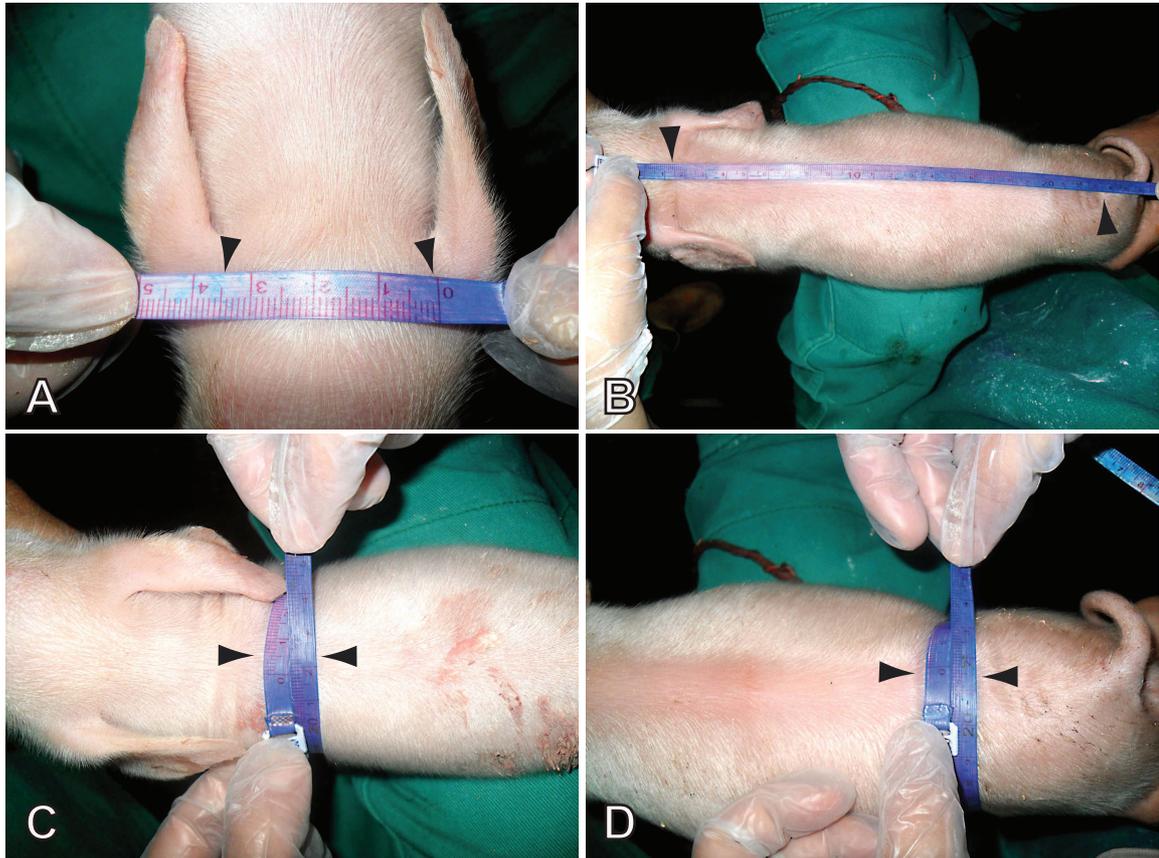


Figura 1. Fotografias indicando os locais de inserção (cabeças-de-seta) onde foram obtidas as medidas da biometria corporal. (A) Diâmetro biparietal da cabeça (DPC); (B) Comprimento cabeça-cauda (CCC); (C) Circunferência torácica (CT); (D) Circunferência abdominal (CA).

5.3. Biometria testicular

Os testículos coletados foram identificados em direito e esquerdo, pesados em balança de precisão e mensurados, com o auxílio de um paquímetro (mm), para obtenção das medidas morfométricas largura, altura e comprimento.

O volume testicular utilizado para comparação entre os dois grupos experimentais foi obtido pela multiplicação entre as três medidas – altura, largura e comprimento.

Para a obtenção do índice gonadossomático (IGS), parâmetro também utilizado para comparação entre os dois grupos experimentais, foi calculada a razão entre o peso médio dos testículos direito e esquerdo e o peso corporal, sendo o valor final obtido multiplicado por 100.

6. Processamento histológico

Para as avaliações morfológicas e morfométricas, foram coletados fragmentos dos testículos de 1,0 a 2,0 mm de espessura (Figura 2), fixados por imersão em solução de glutaraldeído a 5% em tampão fosfato a 0,05M e pH 7,3, por 24 horas. Após esse período, as amostras foram armazenadas a 4°C em solução tampão fosfato a 0,05M e pH 7,3 até o momento da inclusão. Os fragmentos foram desidratados em série crescente de alcoóis (70%, 80%, 90%, 95%, 100%) e infiltrados em resina plástica à base de glicol metacrilato (Historesin, Leica®), para posterior inclusão.

Após a polimerização dos blocos, foram obtidos cortes histológicos de três e cinco µm de espessura, que, após terem sido distendidos em água destilada, foram transferidos para lâminas histológicas e secos em chapa quente a 60°C. Os mesmos foram submetidos à técnica de coloração histológica com azul de toluidina-borato de sódio (Chiarini-Garcia et al., 2011).

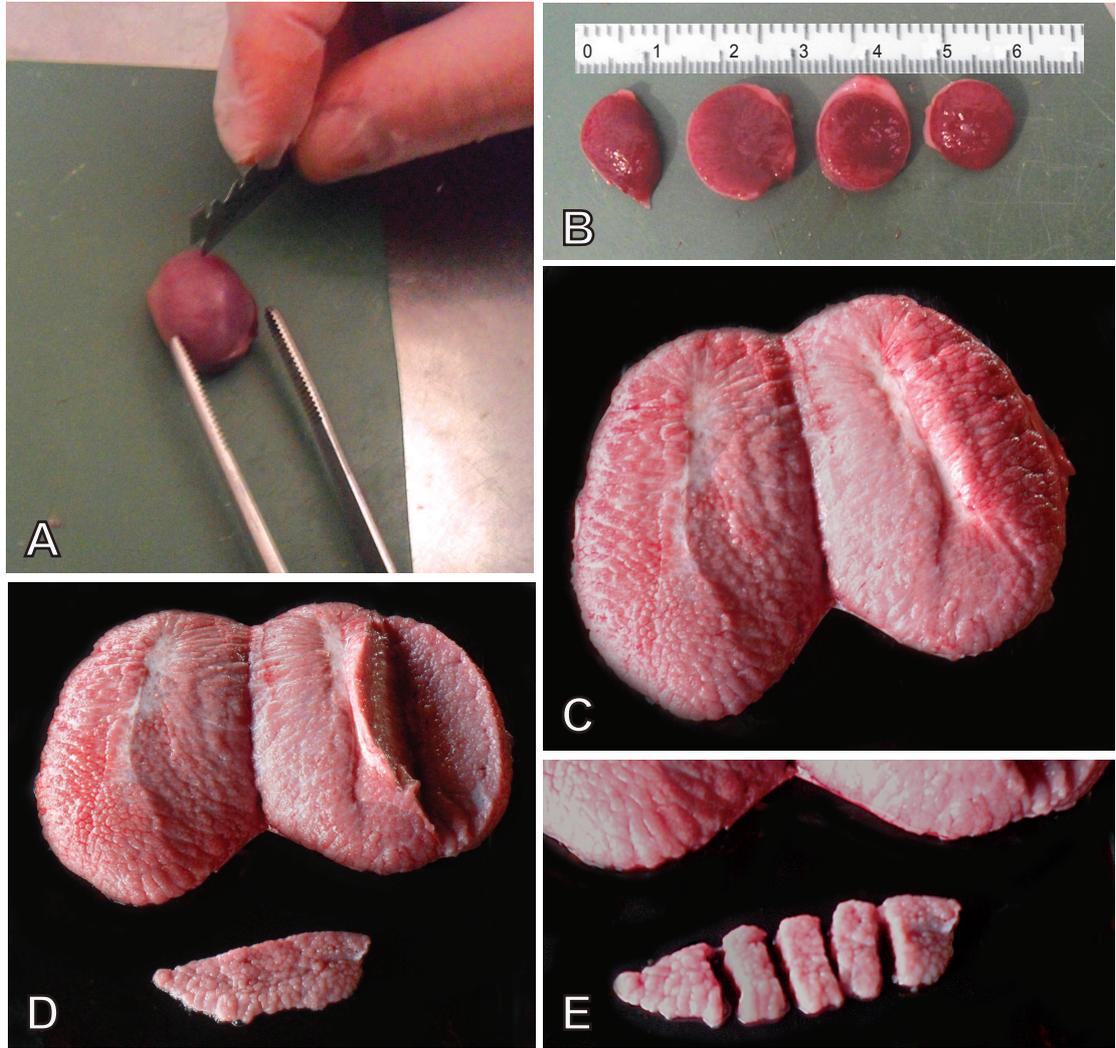


Figura 2. Fotografias demonstrando o corte dos fragmentos de testículo para o processamento histológico. (A) e (B) Testículos de suínos ao oito dias de idade. (C), (D) e (E) Testículos de suínos aos oito meses de idade.

7. Avaliações morfológicas e morfométricas

Para as análises morfométricas foram selecionados, aleatoriamente, sete animais em cada grupo experimental.

7.1. Número de células de Sertoli por secção transversal de cordão/túbulo seminífero

O número de células de Sertoli por secção transversal de cordão/túbulo seminífero foi determinado nos cortes histológicos de 5 µm de espessura, com aumento final de 400X em microscópio Olympus BX-41. Foram analisadas cinco secções transversais por testículo (direito e esquerdo), de contorno o mais circular possível. Para os testículos coletados aos oito dias de idade, as secções transversais foram selecionadas aleatoriamente em varredura horizontal do tecido. Para os testículos coletados aos oito meses, foram analisados apenas túbulos seminíferos em estágio um, de contorno o mais circular possível.

7.2. Diâmetro dos cordões/túbulos seminíferos

O diâmetro médio dos cordões/túbulos seminíferos foi determinado nos cortes histológicos de cinco µm de espessura, utilizando-se uma régua graduada acoplada à ocular de um microscópio Olympus BX-41, régua esta aferida com o auxílio de uma lâmina micrométrica de Leitz. Foi mensurado o diâmetro de cinco secções transversais por testículo (direito e esquerdo), de contorno o mais circular possível, selecionadas aleatoriamente por varredura horizontal do tecido. As mensurações foram realizadas em aumento final de 400X para os testículos coletados aos oito dias e 200X para os testículos coletados aos oito meses de idade.

7.3. Número de secções transversais de cordão/túbulo seminífero por área de tecido

Para a determinação do número de secções transversais de cordão/túbulo seminífero por área de testículo, foram analisados 20 campos por animal, sendo dez campos por testículo (direito e esquerdo), selecionados aleatoriamente por varredura horizontal do tecido. A contagem dos campos foi realizada em microscópio CX31, em aumento final de 200X para os testículos coletados em ambas as idades. Para a determinação da área correspondente a cada campo, foi mensurado o diâmetro do campo com o auxílio de uma régua graduada acoplada à ocular do microscópio, e, posteriormente, a área foi

calculada pela fórmula πR^2 . A área obtida correspondente a cada campo foi de 0,0314 mm².

7.4. Proporções volumétricas dos componentes do parênquima testicular

A análise das proporções volumétricas (Vv%) dos diferentes componentes do parênquima testicular foi realizada nos testículos coletados aos oito dias de idade, utilizando-se um retículo com 21 linhas horizontais e 21 linhas verticais, totalizando 441 intersecções (pontos), acoplado à ocular de um microscópio Olympus BX-41. Foram analisados, em cada testículo, cinco campos, selecionados aleatoriamente por varredura horizontal do tecido, perfazendo-se um total de 4.410 pontos. Para a obtenção das proporções volumétricas, foram contados, em aumento final de 400X, os pontos coincidentes com os componentes selecionados para avaliação. Os componentes testiculares avaliados foram: cordões seminíferos, túnica própria, células de Sertoli, gonócitos, mitoses e apoptoses nos cordões seminíferos, interstício, células de Leydig, tecido conjuntivo, vasos sanguíneos, mitoses e apoptoses no interstício.

Foram calculados os índices mitóticos e apoptóticos dos cordões seminíferos e do interstício a partir da razão entre o número total de pontos coincidentes com as figuras de mitoses e apoptoses e o total de pontos coincidentes com os cordões seminíferos e interstício.

O número final de campos contados por animal foi obtido a partir da contagem de 20 campos em um único animal, sendo 10 por testículo, e desse total de 20 campos foram retirados três grupos, de 10, 15 e 20 campos. Os grupos foram comparados quanto à existência de diferenças estatísticas nas proporções volumétricas dos componentes testiculares. Como não houve diferenças entre os grupos, o número de 10 campos por animal foi definido para esta análise morfométrica.

7.4.1. Proporção volumétrica diferencial de gonócitos

Para a realização desta análise morfométrica, foi realizada previamente a caracterização morfológica de diferentes estágios de diferenciação dos gonócitos, de acordo com a observação das características da cromatina, nucléolo e do núcleo dessas células. Levando em consideração estas características, os gonócitos puderam ser divididos em quatro tipos diferentes (GI, GII, GIII e GIV).

As proporções volumétricas dos quatro diferentes tipos de gonócitos foram obtidas pela análise de dez campos por testículo (direito e esquerdo), selecionados aleatoriamente por varredura horizontal do tecido. A análise foi realizada em aumento final de 1000X, utilizando-se um retículo com 441 intersecções (pontos), acoplado à ocular de um microscópio Olympus BX-41, perfazendo-se um total de 8.820 pontos. Foram registrados os pontos coincidentes com os diferentes tipos de gonócitos previamente caracterizados (GI, GII, GIII e GIV).

7.5. Número absoluto de células de Sertoli, Leydig e gonócitos total e diferencial por testículo

O número absoluto, em milhões, das células de Sertoli, Leydig e de gonócitos presentes nos testículos foi determinado nos animais de alto e baixo peso ao nascimento, aos oito dias de idade. Para se determinar o número absoluto de cada tipo celular, foi realizada a seguinte sequência de cálculos dos parâmetros morfométricos:

- a) Volume do parênquima testicular - $V_T (\mu\text{m}^3)$
- b) Proporção volumétrica dos tipos celulares/testículo – $V_v (\%)$
- c) Volume nuclear médio de cada tipo celular - $V_n (\mu\text{m}^3)$
- d) Número absoluto dos tipos celulares por testículo - $NC (10^6 - \text{milhões})$

a. Volume do parênquima testicular - $V_T (\mu\text{m}^3)$

Uma vez que não foi retirada a túnica albugínea no momento da pesagem do testículo, o peso testicular (P_T) obtido corresponde ao peso do parênquima testicular acrescido do peso da túnica albugínea. A fim de se calcular o volume do parênquima testicular, foi subtraído do P_T , o valor referente ao peso da túnica albugínea (Sinha-Hikim et al., 1988).

$$P_{Tc} = P_T - T_A$$

onde:

P_{Tc} = Peso do parênquima testicular

P_T = Peso testicular

T_A = Peso da túnica albugínea

Para a obtenção do valor percentual médio correspondente ao peso da túnica albugínea, foram dissecadas e pesadas as túnicas albugíneas de três testículos (um por animal) de animais aos oito meses de idade, selecionados aleatoriamente durante a coleta. O valor correspondente ao peso da túnica albugínea obtido foi de aproximadamente 10% do peso testicular.

Peso da túnica albugínea (g)	Peso testicular (g)	% Túnica Albugínea
51,0	418,0	12,2
34,0	408,0	8,3
19,0	202,0	9,4
\bar{x}		10,0

Para se obter o volume testicular, o peso do parênquima testicular obtido foi multiplicado por $10^{12} \mu\text{m}^3$. De acordo com Sinha-Hikim et al. (1988), a densidade do testículo é muito próxima a 1g/mL (1,03 a 1,04), dessa forma para cada grama de testículo tem-se o volume correspondente a $10^{12} \mu\text{m}^3$. Sendo empregada a fórmula a seguir:

$$V_T = P_{Tc} \times 10^{12} \mu\text{m}^3$$

onde:

P_{Tc} = Peso do parênquima testicular

V_T = Volume testicular

b. Proporção volumétrica do núcleo das células de Sertoli, Leydig e gonócitos - V_{vc} (%)

As proporções volumétricas dos núcleos das células de Sertoli, Leydig e gonócitos foram obtidas a partir da análise morfométrica descrita no **item 7.4**. Para a obtenção das proporções volumétricas dos núcleos dos diferentes tipos de gonócitos, foi utilizada a análise descrita no **item 7.4.1**.

A partir do percentual ocupado pelos núcleos das células de Sertoli, Leydig e gonócitos no testículo e do volume testicular, foi estimado o volume total dessas células, conforme a fórmula:

$$V_{t_c} = \frac{V_T \cdot V_{v_c}}{100}$$

onde:

V_{t_c} = volume celular (μm^3)

V_T = volume do parênquima testicular (μm^3)

V_{v_c} = proporção volumétrica dos núcleos por testículo (%)

c. Volume nuclear médio das células de Sertoli, Leydig e gonócitos - V_n (μm^3)

Para se calcular o volume nuclear médio das células de Sertoli, Leydig e gonócitos, foi obtido o diâmetro nuclear médio dessas células. Assim, foram mensurados os diâmetros de 10 núcleos por animal, cinco por testículo, selecionados em diferentes cordões seminíferos, sendo essas medidas representadas pela média entre os diâmetros maior e menor do núcleo. A medição do diâmetro nuclear das células de Sertoli e Leydig foi realizada em imagens digitais obtidas em aumento final de 200X, utilizando câmera fotográfica digital Q-Color 3 da Olympus acoplada ao microscópio BX-51. As imagens foram analisadas através do software Image Pro-Express. O diâmetro nuclear dos diferentes tipos de gonócitos foi mensurado, em aumento final de 1000X, utilizando-se uma régua graduada acoplada à ocular de um microscópio Olympus CX-31. Para o cálculo do diâmetro nuclear médio dos gonócitos totais, as células foram selecionadas aleatoriamente, independente do tipo, por varredura horizontal do tecido. Sendo empregada a fórmula a seguir:

$$V_n = \frac{4\pi R^3}{3}$$

onde:

V_n = volume nuclear (μm^3)

$\pi = 3,1416$

R = raio nuclear (diâmetro nuclear dividido por 2)

d. Número absoluto das células de Sertoli, Leydig e gonócitos por testículo – NC (10^6)

Para a obtenção do número absoluto das células de Sertoli, Leydig e gonócitos por testículo, o volume total ocupado pelos núcleos, de cada tipo celular, foi dividido pelo volume nuclear, sendo o número obtido expresso em milhões ($\times 10^6$). Sendo empregada a fórmula a seguir:

$$NC = \frac{V_{t_n}}{V_n}$$

onde:

NC = número de células presente no testículo (milhões)

V_{t_n} = volume total ocupado pelos núcleos das células no testículo (μm^3)

V_n = volume nuclear da célula (μm^3)

O número de células por grama de testículo foi obtido a partir da razão entre o valor obtido em milhões para cada tipo celular e o peso médio testicular.

7.6. Eficiência do processo espermatogênico

A análise da eficiência do processo espermatogênico foi realizada nos testículos coletados aos oito meses de idade, por meio da contagem das células espermatogênicas do epitélio seminífero e do cálculo das razões entre os números corrigidos dessas células e entre estas e as células de Sertoli.

A contagem destes tipos celulares foi realizada em 10 secções transversais de túbulo seminífero (cinco por testículo) de contorno o mais circular possível, contendo o estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero, estágio este classificado de acordo com o método da morfologia tubular (Swiestra, 1968; França e Cardoso, 1998). A escolha do estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero foi determinada pela presença, neste estágio, das células germinativas necessárias para o cálculo da eficiência do processo espermatogênico, sendo elas: espermatogônia do tipo A, espermatócito primário em preleptóteno, espermatócito primário em paquíteno e espermátides arredondadas. Também foram contados os nucléolos das células de Sertoli. As seguintes razões baseadas nas contagens celulares foram obtidas:

- Espermatócito em preleptóteno / Espermatogônia do tipo A (coeficiente de eficiência de mitose espermatogonial)
- Espermátide arredondada / Espermatogônia do tipo A (rendimento geral da espermatogênese)
- Espermatócito primário em preleptóteno / Espermatócito primário em paquíteno (índice apoptótico)
- Espermátide arredondada / Espermatócito primário em paquíteno (índice meiótico)

- Espermátide arredondada / nucléolo da célula de Sertoli (eficiência da célula de Sertoli)

A população celular obtida por secção transversal de túbulo seminífero em estágio 1 foi corrigida pela espessura do corte histológico (3 µm) e pelo diâmetro nuclear, utilizando-se a fórmula de Abercrombie (1946), modificada por Amann e Almquist (1962):

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

Devido à forma irregular do núcleo da célula de Sertoli, os nucléolos foram utilizados para a obtenção dos números corrigidos desse tipo celular por secção transversal de túbulo seminífero.

O diâmetro nuclear médio (DM), para cada tipo celular estudado, foi obtido pela média das medidas do diâmetro de 10 núcleos por animal, sendo cinco por testículo. Devido à sua forma irregular, o diâmetro do núcleo das espermatogônias foi calculado pela média entre os diâmetros maior e menor. A mensuração do diâmetro nuclear foi realizada, em aumento final de 1000X, utilizando-se uma régua graduada acoplada à ocular de um microscópio Olympus CX-31.

8. Número de espermátides testiculares

Para a contagem das espermátides testiculares, foi utilizada a técnica de sonicação, adaptada de Drumond, 2011, com o objetivo de promover a destruição das células presentes na amostra, com exceção das espermátides alongadas e espermatozoides, células conhecidamente resistentes a esse processo.

Para a realização da técnica, fragmentos dos testículos (direito e esquerdo) sem a túnica albugínea, coletados aos oito meses de idade, foram congelados a -20° C. Posteriormente ao descongelamento do tecido, foram obtidos fragmentos de aproximadamente 0,10 a 0,20 gramas que, após serem pesados, foram transferidos para microtubos de congelamento (Eppendorfs®) contendo 1,0 mL de água destilada. Os tecidos foram submetidos à sonicação por exatamente um minuto, em 60Hz de

amplitude. Para evitar o aquecimento e possível perda de espermátides, as amostras foram mantidas imersas em gelo durante todo o procedimento, principalmente durante o processo de sonicação. Da solução obtida (tecido testicular homogeneizado em água destilada), 10 µL foram aliqüotados e transferidos para um hematocítômetro (câmara de Neubauer), permanecendo em descanso por 10 minutos para permitir a sedimentação dos debris celulares. As amostras foram analisadas em duplicata, utilizando-se os dois lados do hematocítômetro, em aumento de 400X, em microscópio de contraste de fase Olympus BX-41.

O número de espermátides testiculares foi calculado a partir da seguinte fórmula:

$$M \times (N/D) \times 10^4 \times (\text{Vol. Hom.} + (0,001 \times \text{PT}/1,05))$$

onde:

M = média dos valores contados nos dois lados do hematocítômetro

N = número de quadrados disponíveis para contagem na área analisada do hematocítômetro

D = número de quadrados contados na área analisada do hematocítômetro

Vol. Hom. = volume em que o tecido foi homogeneizado

PT = peso do fragmento testicular

O número de espermátides obtido foi corrigido para o peso total do testículo pela utilização de uma regra de três simples. O procedimento foi realizado separadamente para cada testículo, sendo o resultado final obtido pela média do número de espermátides dos testículos direito e esquerdo.

9. Imuno-histoquímica

A técnica de imuno-histoquímica foi realizada para a avaliação do índice de proliferação das células somáticas e germinativas testiculares pela imunomarcagem para a proteína MCM7. Para o procedimento imuno-histoquímico, fragmentos de um a dois mm de espessura dos testículos coletados foram fixados por 24 horas em solução de paraformaldeído a 4% em tampão fosfato a 0,05M e pH 7,3, e, após esse período, armazenados a 4°C na mesma solução tampão fosfato até o momento da inclusão. Os fragmentos foram desidratados em série crescente de alcoóis (70%, 80%, 95% e 100%),

diafanizados em xilol e incluídos em parafina, para, posteriormente, serem obtidos cortes histológicos de 4µm de espessura. Após a distensão em água, os cortes foram transferidos para lâminas silanizadas e secos em estufa a 37°C, por 16 a 18 horas.

No protocolo imuno-histoquímico, os cortes histológicos foram submetidos à desparafinização em xilol, seguida pela hidratação em série decrescente de alcoóis (100%, 90%, 80%). Posteriormente, foi realizada a recuperação antigênica em calor úmido (98° C), a partir da imersão dos cortes histológicos em solução tampão citrato pH 6,0, durante 30 minutos. Após o arrefecimento por 30 minutos, as lâminas foram secas e os cortes circundados com barreira hidrofóbica (Pap Pen), com o objetivo de minimizar a quantidade de solução de anticorpos utilizada. Posteriormente, foi realizado o bloqueio das reações inespecíficas, em câmara úmida por uma hora, com solução de BSA (bovine serum albumin) 30% a 0,3% em PBS (phosphate buffered solution), seguido por incubação overnight (16 a 18 horas) a 4° C com o anticorpo primário biotilado (anticorpo anti-MCM7, monoclonal anti-IgG de camundongo, clone 47DC141, Abcam[®]), na diluição 1:800. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado a partir da imersão das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio 30% a 3% em PBS, por 30 minutos. A incubação com o anticorpo secundário anti-camundongo biotilado (Kit Vector Laboratories[®]) (diluição 1:500), por 30 minutos em temperatura ambiente, foi seguida pela incubação com o complexo avidina-estreptavidina-peroxidase (Kit Vector Laboratories[®]) por 30 minutos, também em temperatura ambiente. A revelação da imunomarcção foi realizada pelo cromógeno DAB (DAB substrate kit, Vector Laboratories[®]) por 2 minutos. Após esta incubação, realizou-se uma lavagem em água corrente durante 10 minutos, procedendo-se com a contra-coloração nuclear com hematoxilina de Harris (uma passagem) e novamente as lâminas foram lavadas em água corrente por 10 minutos. Posteriormente, foi realizada a desidratação dos cortes histológicos em série crescente de alcoóis (80%, 90% e 100%), e duas passagens em xilol, seguida da montagem das lâminas.

Os controles negativos foram obtidos pela substituição do anticorpo primário por PBS, e como controles positivos foram utilizadas amostras de testículos de ratos adultos previamente testadas.

O índice de proliferação celular foi calculado pela razão entre o número de células com marcação nuclear positiva e o número total de células contadas (positivas + negativas). A análise do índice de proliferação celular foi realizada nos testículos coletados aos oito

dias de idade para as células de Sertoli, Leydig e germinativas. Foram analisados seis campos por animal, três por testículo, selecionados aleatoriamente por varredura horizontal do tecido, com um total de aproximadamente 1000 células contadas, em aumento final de 400X. Nos testículos coletados aos oito meses de idade, o índice de proliferação celular foi avaliado para as células de Leydig e germinativas. Devido à dificuldade de diferenciação entre os núcleos positivos dos espermatócitos primários em preleptóteno e as espermatogônias B, a avaliação do índice de proliferação aos oito meses foi realizada em todas as células situadas próximas à membrana basal dos túbulos seminíferos. Esta análise não foi realizada para as células de Sertoli devido à cessação da atividade mitótica destas após a puberdade. Para a determinação do índice de proliferação das células de Leydig, foram analisados 10 campos por animal, cinco por testículo, selecionados aleatoriamente por varredura horizontal do tecido, com um total de aproximadamente 1000 células contadas, em aumento final de 400X. Para o índice de proliferação das células germinativas, foram analisadas 30 secções transversais de túbulos seminíferos por animal, sendo 15 por testículo.

10. Análise estatística

O delineamento experimental em blocos ao acaso foi utilizado para as variáveis peso corporal, biometria corporal, peso e volume testiculares, IGS e número de espermátides testiculares, sendo a matriz o bloco. Para a característica peso ao nascimento foram utilizados dois tratamentos, sendo cada tratamento composto por 24 repetições. Para as demais variáveis, cada tratamento (alto e baixo peso ao nascimento) foi composto por 12 repetições.

Para as variáveis avaliadas nas análises histomorfométricas, o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso, sendo utilizados dois tratamentos (alto e baixo peso ao nascimento), compostos por sete repetições cada.

As variáveis avaliadas em ambas as idades, oito dias e oito meses, diâmetro do cordão/ túbulo seminífero, número de células de Sertoli/ secção transversal de cordão ou túbulo seminífero, número de cordões/ túbulos seminíferos por área de testículo e índice de proliferação das células de Leydig foram analisadas no delineamento experimental inteiramente ao acaso em arranjo fatorial 2 x 2. Quando não foi observada diferença significativa na interação idade versus peso ao nascimento, os dados foram analisados separadamente para cada idade.

Todas as variáveis avaliadas foram submetidas ao teste Shapiro-Wilk para verificar a distribuição de normalidade dos dados. As variáveis que respeitaram o princípio de normalidade foram submetidas à análise de variância (ANOVA) e as médias dos resultados comparadas pelo teste de Fisher (entre os tratamentos). Quando da violação desse pressuposto, as médias foram transformadas pela fórmula Log (Y). Algumas variáveis, apesar de serem quantitativas, violaram esse princípio mesmo após a transformação dos dados, sendo dessa forma a comparação entre as médias realizada pelo teste não paramétrico de Mann Whitney.

Análises das correlações foram realizadas entre as variáveis peso ao nascimento, peso e volume testiculares, peso corporal e o número de células de Sertoli por testículo.

Os dados foram analisados pelo programa SISVAR versão 5.0 e as correlações realizadas pelo programa SAS (Statistical Analysis System *Institute Inc, Cary, NC, 2003*), com nível de probabilidade $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Biometria corporal

Os valores médios de peso corporal e medidas biométricas de ambos os grupos experimentais, obtidos ao nascimento, aos oito dias e aos oito meses de idade estão apresentados na Tabela 1. O peso ao nascimento, utilizado como critério de seleção dos grupos experimentais, foi adicionado na Tabela 1 para permitir uma avaliação da evolução das diferenças existentes entre os grupos no que se refere ao peso corporal.

Tabela 1. Peso e morfometria corporais ao nascimento, aos oito dias e aos oito meses de idade em leitões de alto e baixo peso ao nascimento

	Alto PN	Baixo PN
Nascimento		
PC (kg)	1,87 ± 0,11 a ⁴	1,03 ± 0,14 b
DPC (cm)	4,86 ± 0,31 a ⁴	4,34 ± 0,31 b
CA (cm)	22,58 ± 1,18 a ⁴	17,82 ± 1,31 b
CCC (cm)	27,26 ± 1,11 a ⁴	22,62 ± 1,29 b
CT (cm)	26,98 ± 0,85 a ⁴	22,06 ± 1,14 b
8 dias		
PC (kg)	3,63 ± 0,68 a ⁴	2,34 ± 0,39 b
DPC (cm)	5,92 ± 0,36 a ⁴	5,13 ± 0,53 b
CA (cm)	29,04 ± 2,40 a ⁴	25,75 ± 1,96 b
CCC (cm)	32,25 ± 3,69 a ³	28,00 ± 1,76 b
CT (cm)	33,79 ± 3,47 a ²	30,00 ± 1,68 b
8 meses		
PC (kg)	176,15 ± 13,69 a ²	157,77 ± 17,05 b
DPC (cm)	14,96 ± 0,85 a ²	13,82 ± 1,08 b
CA (cm)	132,36 ± 6,41 a	127,18 ± 6,66 a
CCC (cm)	135,12 ± 5,79 a ¹	128,09 ± 5,45 b
CT (cm)	127,55 ± 4,85 a ²	119,80 ± 7,30 b

Valores expressos como média ± desvio-padrão. PC: peso corporal; DPC: Diâmetro biparietal da cabeça; CA: circunferência abdominal; CCC: comprimento cabeça-cauda; CT: circunferência torácica. Letras distintas na linha diferem pelo teste de Fisher. Alto PN vs. baixo PN: ¹p<0,05, ²p<0,01, ³p<0,005, ⁴p<0,001. Para cada grupo nas diferentes idades, n = 12.

Ao nascimento, foram observadas diferenças estatísticas ($p < 0,001$) para as medidas biométricas, demonstrando haver uma grande diferença no tamanho dos animais integrantes de uma mesma leitegada. Esta diferença era esperada, considerando ter sido utilizado o peso ao nascimento como critério de seleção dos animais. A presença de leitões pequenos ao nascimento caracterizados por baixo peso corporal (Wang et al., 2010; Alvarenga et al., 2013) e medidas biométricas reduzidas (Poore e Fowden, 2003; Da Silva-Buttkus et al., 2003; Poore e Fowden, 2004) também foi demonstrada previamente por outros autores.

As grandes diferenças observadas ao nascimento, em relação ao peso corporal e biometria de leitões, ainda se mantiveram aos oito dias de idade nos animais do presente trabalho (Tabela 1), tal como observado previamente por Wang et al. (2010). Conforme exposto no Anexo I, os animais do grupo Alto PN apresentaram ganho de peso médio diário (GPMD) significativamente maior do que o grupo Baixo PN, durante a primeira semana neonatal. De acordo com alguns autores, o menor ganho de peso do grupo Baixo PN pode ser explicado pelo comprometido desenvolvimento do epitélio intestinal observado nestes animais (Wang et al., 2005; Alvarenga et al., 2013). Wang et al. (2010) demonstraram que leitões de baixo peso apresentam, tanto ao nascimento quanto aos sete dias de vida, menor peso e comprimento do jejuno, assim como menor altura das vilosidades jejunais quando comparados a leitões que nasceram com peso normal. Além disso, estes autores também observaram que diversas proteínas associadas à digestão, absorção e ao metabolismo de nutrientes, como glicose, lipídeos, aminoácidos, vitaminas e minerais, se encontravam drasticamente reduzidas nesses animais.

Aos oito meses de idade, as diferenças existentes entre os dois grupos experimentais podem ainda ser observadas para todas as características avaliadas ($p < 0,05$), com exceção da circunferência abdominal. Apesar de ainda presente, as diferenças estatísticas observadas entre os animais de alto e baixo peso ao nascimento parecem reduzir no período pós-púbere.

Atualmente, ainda que os conhecimentos sobre os efeitos deletérios do crescimento intrauterino retardado (CIUR) em suínos estejam avançando, faltam estudos na literatura que abordem seus reflexos em machos inteiros sexualmente maduros. As pesquisas desenvolvidas até o momento enfocam, principalmente, animais destinados ao abate em decorrência das alterações observadas no peso final e na carne de animais acometidos pelo CIUR (Rehfeldt e Kuhn, 2006; Bérard et al., 2008; Alvarenga et al.,

2013). Alvarenga et al. (2013) observaram que leitões de baixo peso ao nascer castrados, quando comparados a leitões pesados, apresentam menor peso corporal durante todo o período de crescimento até os 150 dias de idade. Em estudos realizados por Poore e Fowden (2003 e 2004), utilizando leitões machos inteiros classificados em baixo e alto peso ao nascimento, foi demonstrado que as diferenças observadas entre os dois grupos, no que se refere ao peso corporal e medidas biométricas, foram perdidas aos três e 12 meses de idade. Entretanto, é importante ressaltar que neste estudo, as faixas de peso utilizadas para a classificação dos grupos foram muito próximas entre si (alto peso > 1,53 kg e baixo peso < 1,48 kg). Além disto, foram utilizados apenas quatro animais para cada grupo experimental, sendo estes animais selecionados ao acaso entre diferentes leitegadas. Estes três critérios de seleção reduzem as diferenças entre os grupos experimentais. No presente estudo, ao contrário, além de ter sido utilizado um grande intervalo entre as faixas de peso de cada grupo, os leitões de baixo peso foram selecionados em pares com leitões de alto peso dentro da mesma leitegada, com o objetivo de limitar os efeitos maternos sobre o desenvolvimento destes animais.

Um importante fator que deve ser considerado na redução das diferenças aos oito meses é a transferência dos grupos, aos 180 dias de idade, para baias de igual tamanho, mantendo a mesma densidade (cabeça/área). Entretanto, em decorrência do menor peso dos animais do grupo Baixo PN aos 180 dias (Anexo II), a densidade kg/área foi menor neste grupo, o que provavelmente levou estes animais a terem um maior acesso ao cocho, com menos competição por alimento, e conseqüentemente, elevando o ganho de peso diário a partir deste período.

Os achados relacionados à circunferência abdominal aos oito meses podem ser explicados pela maior deposição de gordura observada nos animais mais leves ao nascimento. Poore e Fowden, 2004 encontraram uma correlação positiva entre a circunferência abdominal e a espessura de toucinho em machos inteiros aos 12 meses de idade. Segundo estes autores, estes achados corroboram com trabalhos em humanos que sugerem que o aumento do acúmulo de gordura abdominal esteja relacionado a um comprometido crescimento fetal (Law et al., 1992).

2. Biometria testicular

Os valores médios referentes aos pesos corporal e testicular, índice gonadossomático (IGS) e volume testicular estão apresentados na Tabela 2. O peso médio corporal de

cada grupo experimental foi novamente apresentado, pois é utilizado como denominador na razão Peso testicular/Peso corporal, realizada para o cálculo do IGS.

Tabela 2. Peso corporal, peso e volume testiculares e índice gonadossomático aos 8 dias e 8 meses de idade em leitões de baixo e alto peso ao nascimento

	8 dias		8 meses	
	Alto PN	Baixo PN	Alto PN	Baixo PN
PC (kg)	3,63 ± 0,68	2,34 ± 0,39	176 ± 14	158 ± 17
PT (g)	2,43 ± 0,76 a ³	1,36 ± 0,63 b	415 ± 78 a ¹	358 ± 60 b
IGS	0,07 ± 0,02 a ¹	0,06 ± 0,02 b	0,24 ± 0,05 a	0,23 ± 0,04 a
VT (cm ³)	3,94 ± 1,33 a ³	2,28 ± 1,17 b	682 ± 161 a ¹	581 ± 101 b

Valores expressos como média ± desvio-padrão. Os dados são apresentados como a média entre os testículos direito e esquerdo. Alto PN: alto peso ao nascimento; Baixo PN: baixo peso ao nascimento. PC: peso corporal; PT: peso testicular; IGS: índice gonadossomático (peso testicular/peso corporal x 100); VT: volume testicular. Letras distintas na linha diferem pelo teste de Fisher. Alto PN vs. baixo PN: ¹p<0,05; ²p<0,005; ³p<0,001. Para cada grupo nas diferentes idades, n=12.

O peso e o volume testicular foram estatisticamente diferentes entre os animais de alto e baixo peso em ambas as idades avaliadas (p<0,05). É interessante observar que o IGS obtido aos oito dias de idade diferiu entre os dois grupos experimentais, indicando uma ausência de proporção entre o peso do testículo e o peso corporal nos animais de baixo peso ao nascimento. No entanto, aos oito meses de idade, o IGS não apresentou diferenças entre os grupos, sugerindo uma proporcionalidade entre o menor peso do testículo e o menor peso corporal observados no grupo Baixo PN.

Foram observadas correlações altamente significativas, aos oito dias de idade, entre o peso corporal e o peso e volume testiculares (r = 0,72 para ambas), e entre estes dois últimos parâmetros (r = 0,98) (p<0,0001). Aos oito meses, ainda foi encontrada correlação altamente significativa entre o peso e o volume testicular (r = 0,96) (p<0,01).

É importante salientar a relevância estatística do efeito materno para determinadas características reprodutivas. Neste trabalho, o efeito materno utilizado como bloco no delineamento experimental foi significativo para as características peso e volume testiculares aos oito dias e para o IGS em ambas as idades (p<0,05).

A primeira evidência da ocorrência de efeitos deletérios do CIUR sobre o desenvolvimento testicular de suínos, no período neonatal, foi apresentada por Almeida et al. (2009). Estes autores demonstraram que leitões de baixo peso ao nascimento (0,8 a 1,2 kg) apresentam menor peso corporal e testículos mais leves aos sete dias de idade

em comparação aos animais de peso mais elevado (1,8 a 2,2 kg). Assim como observado no presente estudo, foi demonstrado também que os animais de baixo peso apresentam o IGS estatisticamente menor, indicando um crescimento desproporcional dos testículos em relação ao corpo. Alvarenga et al. (2013) também demonstraram que, ao nascimento, o baixo peso está diretamente relacionado a um menor peso testicular médio, entretanto nenhuma outra característica reprodutiva foi avaliada neste trabalho.

Achados semelhantes também foram demonstrados na espécie ovina por Da Silva et al. (2001). Segundo estes autores, carneiros acometidos pelo CIUR apresentam o pico de crescimento testicular na mesma idade que animais com desenvolvimento normal, contudo, no primeiro grupo, o volume testicular máximo alcançado foi significativamente menor que no segundo.

No presente estudo, a diferença significativa observada no IGS aos oito dias é provavelmente em decorrência da maior taxa de crescimento (parâmetro referente a quantas vezes o indivíduo cresceu em relação a seu peso inicial) dos animais de baixo peso ao nascimento (Anexo I). Como pode ser observado no Anexo I, os animais Baixo PN apresentaram uma taxa de crescimento estatisticamente maior que o grupo Alto PN, sendo 2,27 e 1,94, respectivamente. Considerando que, até aproximadamente 30 dias pós-nascimento, o desenvolvimento testicular é mínimo (França, 1987; Avelar et al., 2010), uma mesma taxa de crescimento testicular é esperada entre os grupos durante a primeira semana neonatal. Dessa forma, sugere-se que a proporção entre o peso dos testículos e o peso corporal nos animais Baixo PN tenha sido perdida aos oito dias devido à maior taxa de crescimento destes em relação aos animais Alto PN durante este período, o que levou a uma redução da razão peso testicular/peso corporal.

Esta maior taxa de crescimento observada nos animais de baixo peso ao nascimento é, provavelmente, consequência do manejo de aleitamento diferenciado fornecido a estes animais durante a primeira semana neonatal. No entanto, é importante ressaltar que uma maior taxa de crescimento não significa um melhor desempenho, representado pelo peso corporal e ganho de peso diário, durante esta e as demais fases da vida ou uma reversão dos efeitos do CIUR. Conforme demonstrado nos Anexos I e II, o grupo Baixo PN apresentou menor ganho de peso diário do nascimento aos 180 dias de idade, quando comparado ao grupo Alto PN.

O aumento do IGS nos animais de baixo peso observado aos oito meses de idade indica que, em algum momento da fase pré-púbere, o menor IGS observado nos animais de

baixo peso aos oito dias foi compensado, provavelmente devido a um acentuado crescimento testicular em relação ao corporal (Godinho e Cardoso, 1979; França, 1987; Avelar et al., 2010).

Estudos envolvendo diferentes raças têm demonstrado que o peso e o volume testiculares são características altamente correlacionadas à produção espermática no animal pós-púbere (Toele et al., 1984; Borg et al., 1993; Wilson et al., 1999; Ren et al., 2009). Estes dados sugerem que, no presente estudo, o reduzido peso testicular médio observado nos animais de baixo peso aos oito meses de idade esteja relacionado a uma menor produção espermática em comparação aos animais de alto peso.

3. Avaliações morfológicas e morfométricas

3.1. Número de células de Sertoli por secção transversal de cordão seminífero

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais no número de células de Sertoli por secção transversal de cordão e de túbulo seminífero em estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero (Figura 3).

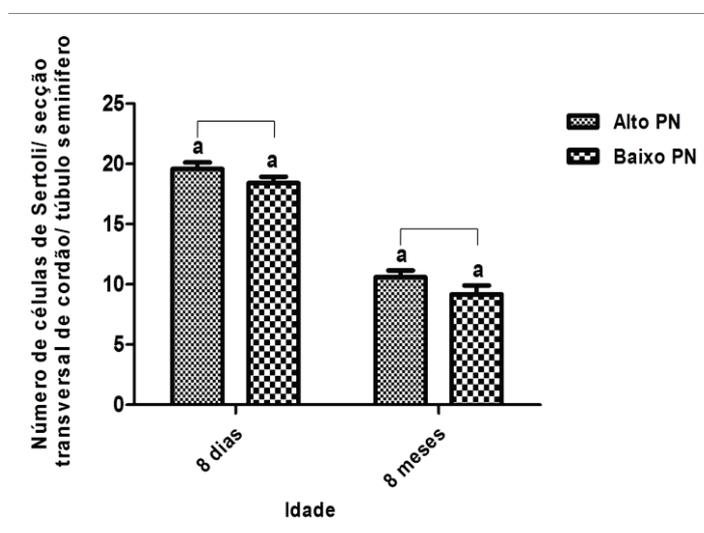


Figura 3. Número de células de Sertoli por secção transversal de cordão ou túbulo seminífero (estádio 1), nas idades de oito dias e oito meses, respectivamente, entre os grupos de alto (Alto PN) e baixo (Baixo PN) pesos ao nascimento. Os dados são apresentados como a média dos testículos direito e esquerdo. Valores expressos como a média \pm desvio-padrão. Letras distintas para cada idade indicam diferença estatística pelo teste de Fisher ($p < 0,05$). Para cada grupo nas diferentes idades, $n = 7$.

Dados da literatura relacionados às alterações do número de células de Sertoli por secção transversal de cordão/túbulo seminífero em decorrência a injúrias sofridas durante o período pré-natal são escassos e aqueles existentes são controversos.

Ao contrário do observado no presente estudo, Almeida et al. (2009) demonstraram que leitões leves ao nascimento (0,800 a 1,200 kg), quando comparados aos animais de peso mais elevado (1,8 a 2,2 kg), também ao nascimento, apresentaram menor número de células de Sertoli, assim como menor número de células germinativas por secção transversal de cordão seminífero aos sete dias de idade. As diferenças nos resultados encontrados em ambos os estudos podem estar relacionadas à utilização de animais de genéticas diferentes, que envolvem distintos cruzamentos entre raças. Até o presente momento, a sensibilidade das diferentes linhagens a insultos pré-natais não foi descrita.

Em um estudo realizado com ratos adultos com o objetivo de investigar os efeitos tardios da deficiência nutricional durante a vida fetal, observou-se um menor número de células de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero nos animais submetidos à restrição proteica *in utero* (Toledo et al., 2011). Em estudo semelhante, outros autores (Melo et al., 2013) não detectaram alteração nesse parâmetro.

Apesar de algumas evidências da redução do número de células de Sertoli por secção transversal de cordão/túbulo seminífero, é importante ressaltar que a ausência de diferenças nesta característica não significa que o número total destas células no testículo seja semelhante entre os grupos. Segundo França et al. (2000) existe uma correlação significativa entre o número absoluto de células de Sertoli no testículo e o comprimento total dos cordões/túbulos seminíferos, sendo o alongamento destes durante a fase pré-puberal dependente da atividade mitótica das células de Sertoli. Isto significa que, no presente estudo, apesar da ausência de diferença estatística entre os grupos experimentais no número destas células por secção transversal de cordão/túbulo seminífero, poderiam ser observadas diferenças significativas no número total de células de Sertoli por testículo se o comprimento dos cordões/túbulos seminíferos também diferir entre os grupos.

3.2. Diâmetro dos cordões/túbulos seminíferos

Em correspondência à ausência de diferenças no número de células de Sertoli por secção transversal de cordão/túbulo seminífero, o diâmetro dos cordões seminíferos aos

oito dias e dos túbulos seminíferos aos oito meses de idade também foi semelhante entre os grupos experimentais, conforme demonstrado pela Figura 4.

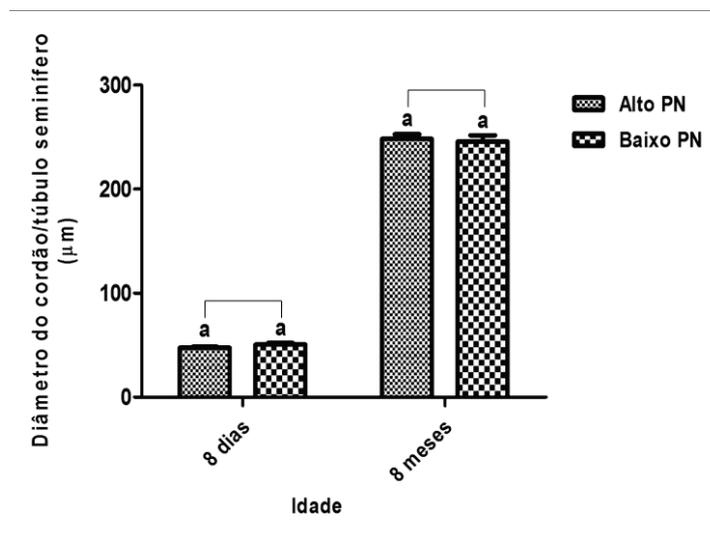


Figura 4. Diâmetro dos cordões/túbulos seminíferos, nas idades de oito dias e oito meses, respectivamente, entre os grupos de alto (Alto PN) e baixo (Baixo PN) peso ao nascimento. Os dados são apresentados como a média dos testículos direito e esquerdo. Letras distintas para cada idade indicam diferença estatística pelo teste de Fisher ($p < 0,05$). Para cada grupo nas diferentes idades, $n=7$.

A ausência de diferenças significativas no diâmetro dos cordões seminíferos aos oito dias de idade se deve, principalmente, à ausência de diferenças no número de células de Sertoli por secção transversal de cordão seminífero, descrita anteriormente (**item 3.1**).

Como demonstrado por alguns autores, o diâmetro dos cordões/túbulos seminíferos depende do tamanho do lúmen tubular e do número total de células por secção transversal de cordão/túbulo seminífero (Godinho e Cardoso, 1979; França et al., 2000; Avelar et al., 2010). Dessa forma, aos oito dias de idade, devido à ausência do lúmen tubular e da posição centralizada dos gonócitos, o diâmetro dos cordões seminíferos é influenciado principalmente pelo número de células de Sertoli por secção transversal. Além disso, esta semelhança também pode ser explicada pelo fato dos cordões seminíferos crescerem principalmente em comprimento e não em diâmetro, durante o período perinatal (Van Straaten e Wesing, 1977).

Em contraste ao observado aos oito dias, aos oito meses de idade, o diâmetro dos túbulos seminíferos pode ser um indicador da eficiência da espermatogênese e das funções das células de Sertoli - produção de fluido tubular e sustentação das células germinativas. Foi demonstrado que o aumento do diâmetro dos cordões seminíferos se inicia com o aparecimento do lúmen tubular (Avelar et al., 2010), sendo também altamente correlacionado ao número de células espermatogênicas (França, 1987). Neste

contexto, pode-se inferir que o diâmetro tubular no animal púbere está diretamente relacionado à maturação das células de Sertoli, caracterizada pelo início da secreção do fluido tubular e o consequente aparecimento do lúmen, e pelo desenvolvimento da barreira de células de Sertoli, com o surgimento e a diferenciação dos espermátocitos primários (Russel et al., 1989; França et al., 2000; Avelar et al., 2010; Ford e Wise, 2011). Isto foi exemplificado por Ford e Wise (2009) que demonstraram uma correlação positiva entre a expansão dos túbulos seminíferos e o início e aumento da expressão de CDKN1B (p27^{kip1}) pelas células de Sertoli, um inibidor de cinase ciclina-dependente que indica diferenciação celular terminal.

A partir do exposto, a semelhança no diâmetro dos túbulos seminíferos aos oito meses de idade sugere que ambos os grupos apresentaram, além de números similares de células de Sertoli e germinativas por secção transversal de túbulo seminífero, capacidade de suporte e produção do fluido tubular pelas células de Sertoli também semelhantes. Entretanto, análises específicas deverão ser realizadas para confirmar estas suposições.

3.3. Número de secções transversais de cordões/túbulos seminíferos por área de tecido

Não foram observadas diferenças significativas no número de secções transversais de cordão/túbulo seminífero entre os animais de alto e baixo peso ao nascimento nas duas idades avaliadas ($p < 0,05$) (Figura 5).

Esse resultado também indica a existência de diferenças entre os grupos Alto PN e Baixo PN no número total de células presentes nos cordões/túbulos seminíferos. Segundo França et al. (2000), o comprimento total dos cordões/túbulos seminíferos é correlacionado positivamente com o número absoluto de células germinativas por testículo e, durante o período compreendido entre o nascimento e a puberdade, com o número absoluto de células de Sertoli por testículo. Isto significa que, uma vez mantidos um mesmo diâmetro tubular e número de células de Sertoli por secção transversal de cordão/túbulo seminífero, será o comprimento destas estruturas o determinante para que o número total de células de Sertoli por testículo apresente diferença significativa entre os grupos. Estes achados foram demonstrados por Bielli et al. (2002) que observaram um menor volume de cordões seminíferos associado a um menor número de células de

Sertoli por testículo em cordeiros recém-nascidos submetidos à deficiência nutricional durante a vida fetal, comparados a animais com desenvolvimento normal.

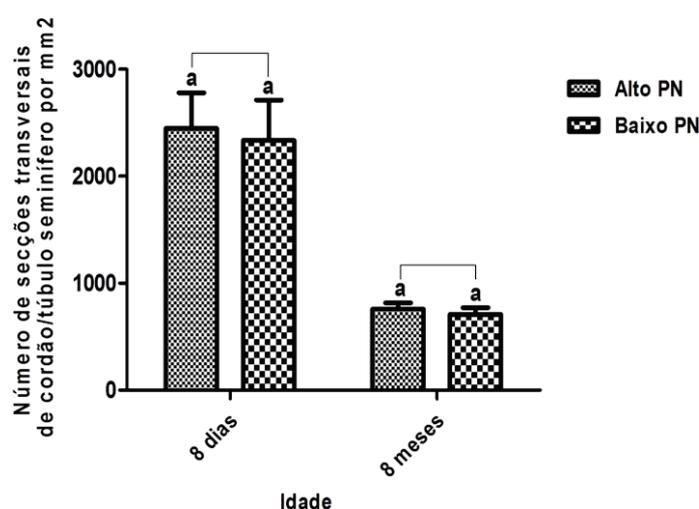


Figura 5. Número de seções transversais de cordão/túbulo seminífero por mm² de área de testículo nas idades de oito dias e oito meses, respectivamente, entre os grupos de alto (Alto PN) e baixo (Baixo PN) peso ao nascimento. Os dados são apresentados como a média dos testículos direito e esquerdo. Letras distintas para cada idade indicam diferença estatística pelo teste de Fisher ($p < 0,05$). Para cada grupo nas diferentes idades, $n=7$.

3.4. Proporções volumétricas dos componentes do parênquima testicular

As proporções volumétricas dos diferentes componentes do parênquima testicular aos oito dias de idade e os índices mitóticos e apoptóticos dos cordões seminíferos e interstício estão apresentados na Tabela 3. Não foram observadas diferenças significativas em nenhum dos parâmetros avaliados ($p > 0,05$).

A ausência de diferenças significativas entre os grupos experimentais indica a existência de uma proporção entre os componentes do parênquima testicular e o tamanho dos testículos. Isto significa que o menor volume de cada componente do parênquima seria proporcional ao menor tamanho dos testículos (Tabela 2), observados nos animais de baixo peso ao nascimento.

Da mesma forma, a semelhança estatística nas porcentagens de mitoses e apoptoses e dos respectivos índices, tanto no compartimento tubular quanto no interstício, sugere que o balanço entre proliferação e morte celular e, conseqüentemente, a taxa de desenvolvimento testicular sejam os mesmos entre os grupos experimentais. Estes achados permitem inferir que, o menor valor de IGS (Tabela 2), observado nos animais Baixo PN aos oito dias de idade, se deve a uma maior taxa de crescimento corporal

(Anexo I) destes em relação aos animais Alto PN associada a um comportamento similar de ambos os grupos em relação ao desenvolvimento testicular observado na primeira semana neonatal.

Tabela 3. Proporção volumétrica (Vv% \pm dp) dos componentes do parênquima testicular e índices mitóticos e apoptóticos do tecido intersticial e cordões seminíferos em leitões de baixo e alto peso ao nascimento aos 8 dias de idade

	Alto PN	Baixo PN
Tecido intersticial		
Áreas de interstício	76,61 \pm 5,67 a	78,65 \pm 4,82 a
Células de Leydig	6,30 \pm 1,19 a	6,99 \pm 1,15 a
Tecido conjuntivo	16,50 \pm 2,84 a	18,18 \pm 1,57 a
Vasos sanguíneos	12,19 \pm 2,22 a	10,72 \pm 2,34 a
Mitoses	0,17 \pm 0,07 a	0,29 \pm 0,07 a
Apoptoses	0,26 \pm 0,12 a	0,37 \pm 0,07 a
Índice mitótico	0,22 \pm 0,08 a	0,37 \pm 0,11 a
Índice apoptótico	0,34 \pm 0,15 a	0,48 \pm 0,10 a
Cordões seminíferos		
Áreas de cordão seminífero	23,81 \pm 5,33 a	21,35 \pm 4,82 a
Túnica própria	4,51 \pm 1,16 a	4,05 \pm 1,17 a
Células de Sertoli	9,37 \pm 2,25 a	8,49 \pm 2,05 a
Células germinativas	0,67 \pm 0,25 a	0,59 \pm 0,20 a
Mitoses	0,17 \pm 0,05 a	0,20 \pm 0,09 a
Apoptoses	0,06 \pm 0,03 a	0,12 \pm 0,09 a
Índice mitótico	0,74 \pm 0,18 a	1,02 \pm 0,51 a
Índice apoptótico	0,30 \pm 0,25 a	0,58 \pm 0,42 a

Valores expressos como média (%) \pm desvio-padrão. Os dados são apresentados como a média entre os testículos direito e esquerdo. Alto PN: alto peso ao nascimento; Baixo PN: baixo peso ao nascimento. Médias seguidas por letras distintas na linha diferem pelo teste de Fisher ($p < 0,05$). Para cada grupo, $n=7$.

Os valores percentuais observados para o compartimento tubular e o intersticial vão de encontro aos valores demonstrados por Avelar et al. (2010) para suínos aos sete dias de idade e àqueles demonstrados por McCoard et al. (2001) nos dias um e 14 pós-parto. Ressalta-se a dificuldade de comparação das porcentagens obtidas, neste período, com a literatura, provavelmente devido à distribuição heterogênea dos cordões seminíferos no parênquima testicular, que se apresentam mais concentrados na região periférica que no centro do órgão, como demonstrado por Avelar et al. (2010).

3.4.1. Diferenciação morfológica e proporção volumétrica de gonócitos

Ao estudar os gonócitos dos leitões de 8 dias de idade, verificou-se que os mesmos eram heterogêneos quanto à suas características morfológicas em relação à forma e tamanho celulares e quanto à morfologia citoplasmática e nuclear. Diante disto, e com o objetivo de comparar possíveis diferenças entre os grupos experimentais, de alto e baixo peso, dividimos estes gonócitos em quatro tipos diferentes (gonócitos de I a IV), levando em consideração suas características morfológicas, descritas abaixo e apresentadas nas Figuras 6 e 7. Os gonócitos tipo I são caracterizados por um núcleo volumoso, arredondado ou levemente ovalado, de diâmetro nuclear médio de $9,3 \pm 0,52\mu\text{m}$ (variação de 7 a $11\mu\text{m}$). Normalmente, apresentam de um a três nucléolos proeminentes e eucromatina dispersa no nucleoplasma, sendo observados principalmente no centro dos cordões seminíferos. Os gonócitos tipo II apresentam, assim como os gonócitos tipo I, núcleo volumoso, arredondado ou levemente ovalado, de diâmetro médio de $9,9 \pm 0,50\mu\text{m}$ (variação de 7 a $12\mu\text{m}$). Podem ser observados de um a dois nucléolos proeminentes e nucleoplasma levemente granuloso, apresentando predomínio de eucromatina e poucos e pequenos grumos de heterocromatina. Sua localização é, assim como os gonócitos I, principalmente no centro do cordão seminífero. Os gonócitos tipo III apresentam também núcleo volumoso, entretanto mais arredondado que os núcleos dos gonócitos tipo I e II, com diâmetro médio de $9,5 \pm 0,58\mu\text{m}$ (variação entre 7 e $11\mu\text{m}$). Os nucléolos são pouco evidentes devido à maior quantidade de heterocromatina, que se distribui de forma heterogênea pelo nucleoplasma. Podem ser observados no centro dos cordões seminíferos, mas uma característica marcante deste tipo celular é a proximidade com a membrana basal, por vezes ocorrendo o contato entre esta e o citoplasma do gonócito. Os gonócitos tipo IV são caracterizados por um reduzido tamanho nuclear, com diâmetro médio de $8,1 \pm 0,28\mu\text{m}$ (variação entre 7 e $9\mu\text{m}$). Os nucléolos são pouco evidentes devido à alta densidade da cromatina, sendo observados normalmente em contato com a membrana basal do cordão seminífero.

Em um estudo semelhante, Drumond et al. (2011) também realizaram a diferenciação dos tipos de gonócitos presentes em testículos de camundongos. Entretanto, ao contrário do presente estudo, aqueles autores observaram apenas três tipos de células morfológicamente distintas, sendo estas células também caracterizadas por núcleos grandes, medindo entre $10\text{-}12\mu\text{m}$, e contendo de um a três nucléolos. Uma diferença

marcante observada entre o presente trabalho e o de Drumond et al. (2011) é a morfologia nuclear durante o processo de diferenciação celular. No presente estudo observou-se que os núcleos dos gonócitos passam de um estado ovalado para uma forma mais arredondada, observada nos gonócitos tipo IV, enquanto Drumond et al. (2011) descreveram o gonócito menos diferenciado (tipo I) contendo um núcleo arredondado e o mais diferenciado (tipo III), contendo um núcleo mais ovalado.

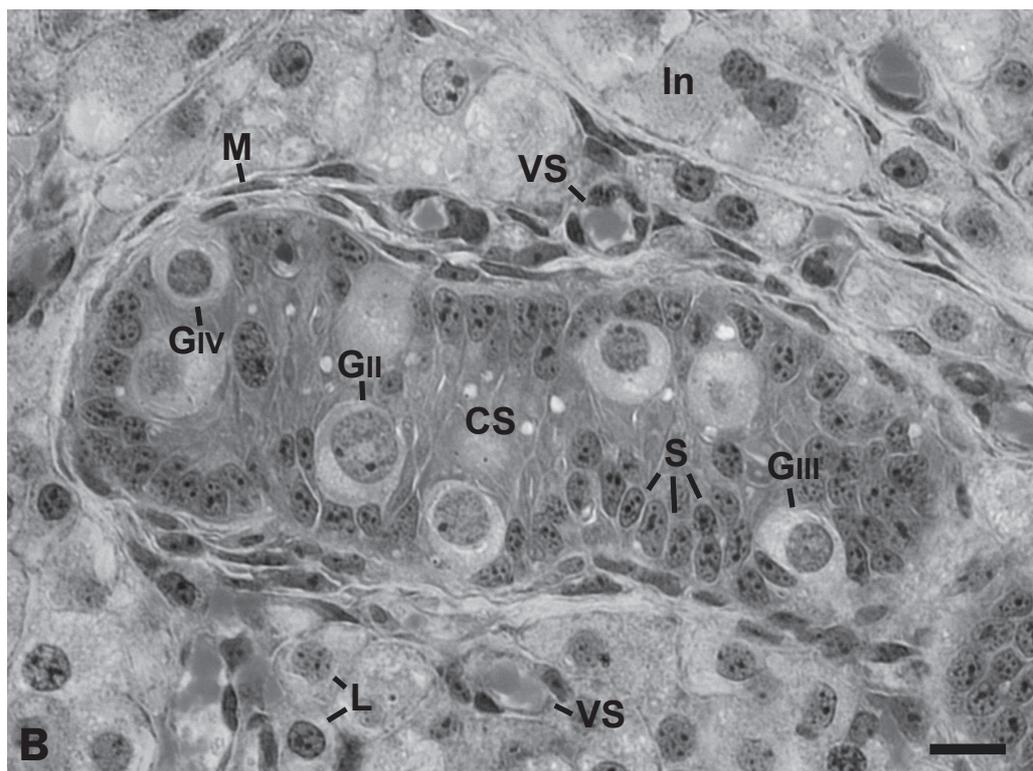
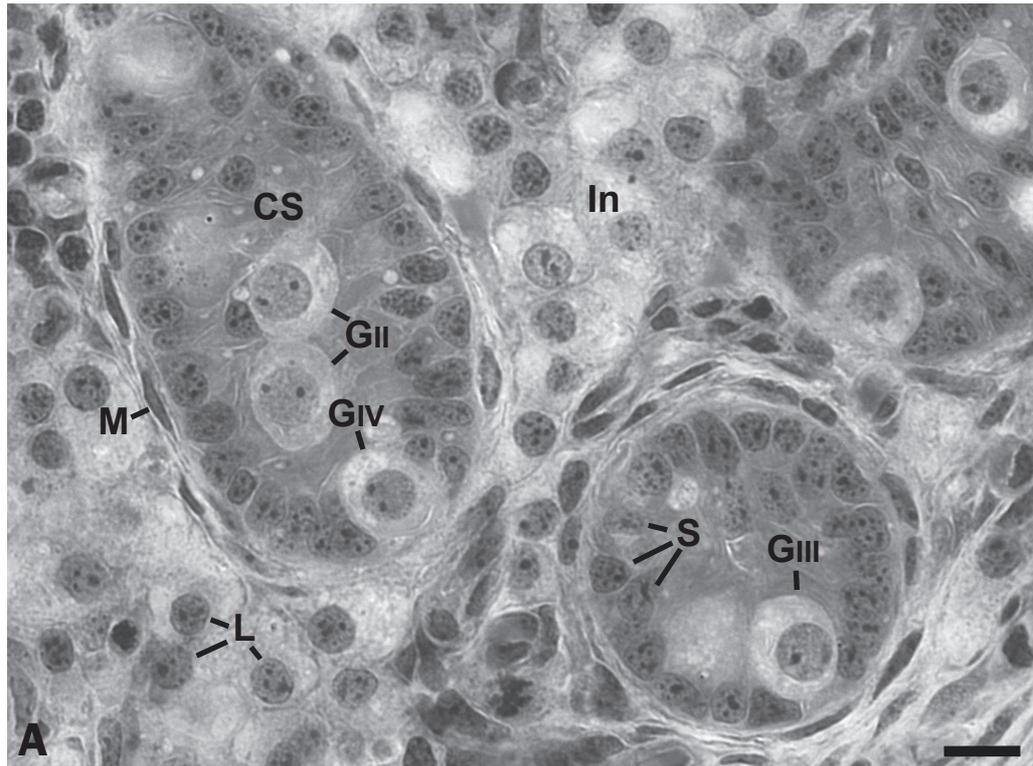
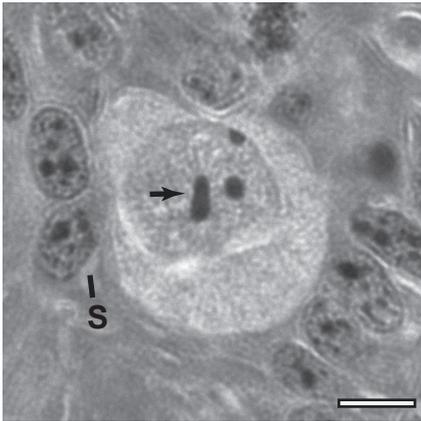
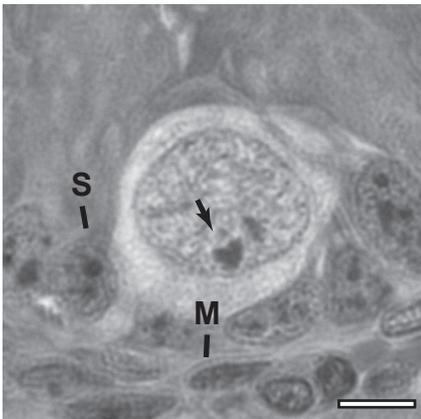


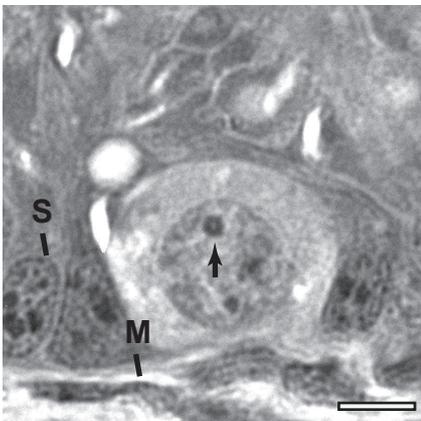
Figura 6. Fotomicrografias de luz de testículo de suíno aos 8 dias de idade. (A) e (B) Parênquima testicular apresentando cordões seminíferos (CS), compostos por células de Sertoli (S) e gonócitos, localizados no tecido intersticial (In), onde também podem ser observadas células de Leydig (L). Nos cordões seminíferos são observados diferentes tipos de gonócitos, sendo os mais diferenciados localizados em contato com a membrana basal. M: célula mióide; VS: vaso sanguíneo; GI: gonócito I; GII: gonócito II; GIII: gonócito III; GIV: gonócito IV. Barra: 15µm.



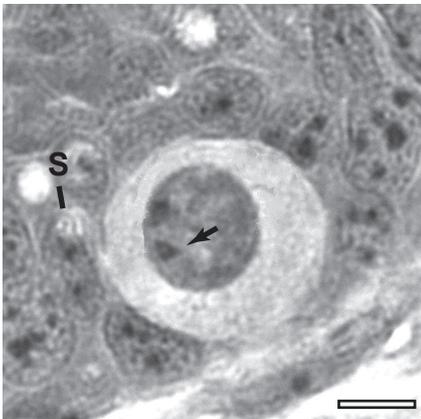
GI - **Gonócito I** - Núcleo arredondado ou levemente ovalado, apresentando um a três nucléolos proeminentes e cromatina homogeneamente distribuída no nucleoplasma. Localizam-se principalmente no centro do cordão seminífero.



GII - **Gonócito II** - Núcleo arredondado ou levemente ovalado, apresentando um a dois nucléolos proeminentes e nucleoplasma levemente granuloso, com predomínio de eucromatina e poucos e pequenos grumos de heterocromatina. Localizam-se principalmente no centro do cordão seminífero.



GIII - **Gonócito III** - Núcleo arredondado, apresentando nucléolos pouco evidentes devido à maior quantidade de heterocromatina, que se distribui de forma heterogênea pelo nucleoplasma. Podem ser observados no centro do cordão seminífero, mas localizam-se principalmente em contato com a membrana basal.



GIV - **Gonócito IV** - Núcleo de tamanho reduzido e arredondado, apresentando nucléolos pouco evidentes devido à alta densidade da cromatina. Localizam-se na base do cordão seminífero, em contato com a membrana basal.

Figura 7. Descrição morfológica dos gonócitos sob a microscopia de luz. S, célula de Sertoli; M, célula mióide; seta, nucléolo. Barra: 5µm.

As proporções volumétricas dos diferentes tipos de gonócitos são demonstradas na Tabela 4. De forma similar às proporções volumétricas apresentadas na Tabela 3 para os diferentes parâmetros testiculares, não foram observadas diferenças nos volumes percentuais dos quatro tipos de gonócitos entre os animais de alto e baixo peso ao nascimento, indicando uma proporcionalidade entre o número destas células e o tamanho dos testículos no grupo Baixo PN.

Tabela 4. Proporção volumétrica (Vv% \pm dp) diferencial dos gonócitos em leitões de baixo e alto peso ao nascimento aos 8 dias de idade

Gonócitos	Alto PN	Baixo PN
GI	1,04 \pm 0,04 a	1,02 \pm 0,02 a
GII	1,08 \pm 0,07 a	1,05 \pm 0,06 a
GIII	1,08 \pm 0,07 a	1,05 \pm 0,06 a
GIV	1,03 \pm 0,05 a	1,03 \pm 0,02 a

Valores expressos como média (%) \pm desvio-padrão. Os dados são apresentados como a média entre os testículos direito e esquerdo. Alto PN: alto peso ao nascimento; Baixo PN: baixo peso ao nascimento. Médias seguidas por letras distintas na linha diferem pelo teste de Mann Whitney para GI, GIII e GIV, e pelo teste de Fisher para GII ($p < 0,05$). Para cada grupo, $n=7$.

3.5. Número absoluto das células de Sertoli, Leydig e gonócitos por testículo

Os números totais das células de Sertoli, Leydig e gonócitos, assim como dos diferentes tipos de gonócitos descritos anteriormente (**item 3.4.1**) estão apresentados nas Tabelas 5 e 6. O número absoluto (em milhões) dessas células no testículo diferiu estatisticamente entre os grupos, sendo os valores observados nos animais de baixo peso equivalentes a, aproximadamente, metade dos observados nos animais de alto peso.

O menor número total de células associado ao menor número de secções transversais de cordão seminífero, observados nos animais de baixo peso, explicam a diferença, entre os grupos, no peso e volume testiculares. Entretanto, é importante ressaltar que o reduzido número de células observado no grupo Baixo PN é proporcional ao tamanho do testículo, o que pode ser comprovado pela ausência de diferenças nas proporções volumétricas dos núcleos dessas células e, principalmente, pelo número de células/grama de testículo.

Tabela 5. Número de células de Sertoli, Leydig e gonócitos totais, em milhões (10^6), por testículo e por grama de testículo em leitões de alto e baixo peso ao nascimento aos oito dias de idade

	Alto PN	Baixo PN
Células de Sertoli/ testículo	1169 \pm 417 a	558 \pm 157 b
Células de Sertoli/g de testículo	535 \pm 201 a	514 \pm 102 a
Células de Leydig/ testículo	568 \pm 254 a	326 \pm 74 b
Células de Leydig/ g de testículo	240 \pm 52 a	320 \pm 138 a
Gonócitos totais/ testículo	12,7 \pm 5,8 a	5,6 \pm 2,9 b
Gonócitos totais/ g de testículo	5,5 \pm 2,9 a	4,8 \pm 1,6 a

Valores expressos como média \pm desvio-padrão. Os dados são apresentados como a média entre os testículos direito e esquerdo. Alto PN: alto peso ao nascimento; Baixo PN: baixo peso ao nascimento. Médias seguidas por letras distintas na linha diferem pelo teste de Fisher ($p < 0,05$). Para cada grupo, $n=7$.

Alguns estudos demonstraram que as células de Sertoli são capazes de suportar um número relativamente fixo de células germinativas para uma determinada espécie (Russell e Peterson, 1984; Orth et al., 1988). Assim, o número total de células de Sertoli estabelecido durante o desenvolvimento testicular até a puberdade vai determinar a dimensão da produção espermática do animal adulto (Orth et al., 1988). Segundo Okwun et al. (1996), em suínos adultos, o número de células de Sertoli é altamente correlacionado ao peso do parênquima testicular e à produção espermática diária. Dessa forma, na ausência de um mecanismo compensatório de proliferação destas células durante o período pré-púbere, o menor número de células de Sertoli apresentado pelos animais Baixo PN aos oito dias será mantido aos oito meses de idade, comprometendo a capacidade de produção espermática do animal adulto.

No presente estudo, correlações significativas foram observadas entre o número de células de Sertoli por testículo e os pesos corporal ($r = 0,56$; $p = 0,04$) e testicular ($r = 0,65$; $p = 0,01$), demonstrando que o peso corporal interfere diretamente no número de células de Sertoli e este, por sua vez, interfere no tamanho do testículo.

Quando os diferentes tipos de gonócitos são analisados separadamente, observa-se que apenas o número corrigido de gonócitos tipo II difere estatisticamente entre os dois grupos experimentais. Entretanto, para os outros três tipos de gonócitos, observa-se uma tendência para o maior número de células por testículo nos animais de alto peso ao nascimento, sendo

de aproximadamente 2,5 vezes o número de células observado no grupo Baixo PN. Nesse contexto, é importante ressaltar os altos desvios padrões observados nessas categorias de gonócitos, devido especificamente à ausência desses tipos celulares (GI, GIII, e GIV) em alguns dos cortes histológicos analisados.

Tabela 6. Número dos diferentes gonócitos, em milhões (10^6), por testículo em leitões de alto e baixo peso ao nascimento aos oito dias de idade

	Alto PN	Baixo PN
Gonócito I/ testículo	1,49 ± 1,51 a	0,58 ± 0,59 a
Gonócito II/ testículo	5,33 ± 2,71 a	2,36 ± 1,22 b
Gonócito III/ testículo	3,87 ± 4,24 a	1,58 ± 1,93 a
Gonócito IV/ testículo	2,31 ± 3,81 a	1,10 ± 0,63 a

Valores expressos como média ± desvio-padrão. Os dados são apresentados como a média entre os testículos direito e esquerdo. Alto PN: alto peso ao nascimento; Baixo PN: baixo peso ao nascimento. Médias seguidas por letras distintas na linha diferem pelo teste de Fisher ($p < 0,05$). Para cada grupo, $n=7$.

3.6. Eficiência do processo espermatogênico

O número de células espermatogênicas presentes no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero (Figura 10) em ambos os grupos experimentais está representado na Figura 8. Os números de espermatogônias A (Alto PN: $1,01 \pm 0,31$ e Baixo PN: $0,81 \pm 0,21$) e espermatócitos primários em preleptóteno (Alto PN: $23,4 \pm 2,2$ e Baixo PN: $20,7 \pm 4,1$) não diferiram entre os grupos. Entretanto, os animais de baixo peso ao nascimento apresentaram menor número de espermatócitos primários em paquíteno (Alto PN: $25,8 \pm 3,3$ e Baixo PN: $19,9 \pm 2,9$) e espermátides arredondadas (Alto PN: $72,9 \pm 12,8$ e Baixo PN: $59,7 \pm 7,3$) ($p < 0,05$). Estas diferenças, associadas a pequenas diferenças não significativas no número de espermatócitos primários em preleptóteno e espermatogônias A, influenciaram o número total de células espermatogênicas que também diferiu entre os grupos. Como pode ser observado na Figura 8, os animais de baixo peso ao nascimento apresentaram menos células germinativas ($101 \pm 10,8$) por secção transversal de túbulo seminífero em relação aos animais de alto peso ($123 \pm 15,2$) ($p < 0,05$).

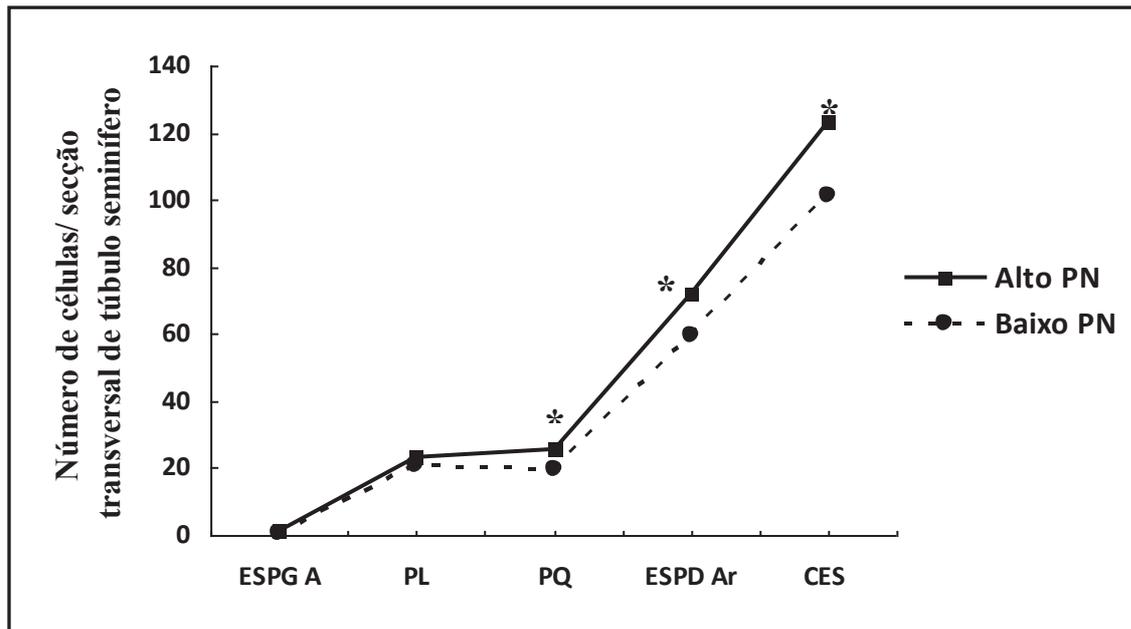


Figura 8. Número de células espermatogênicas/secção transversal de túbulo seminífero em estágio um, nos grupos de alto (Alto PN) e baixo (Baixo PN) peso ao nascimento, aos oito meses de idade. Os dados são apresentados como a média dos testículos direito e esquerdo. Valores expressos como a média de cada grupo. * Representa diferença estatística entre os grupos pelo teste de Fisher ($p < 0,05$). Para cada grupo, $n=7$. ESGP A: espermatogônia A; PL: espermatócito primário em preleptóteno; PQ: espermatócito primário em paquíteno; ESPD Ar: espermátide arredondada; CES: total de células espermatogênicas.

O mesmo número de espermatogônias A e espermatócitos primários em preleptóteno por secção transversal de túbulo seminífero demonstra que as perdas celulares frequentes durante a fase espermatogonial ocorrem na mesma intensidade em ambos os grupos experimentais. De acordo com França et al. (2005), uma perda significativa de células germinativas (25-30% de células) é observada durante essa fase, ocorrendo predominantemente durante as divisões das espermatogônias dos tipos A_2 - A_4 . Esta perda é referida como uma regulação densidade-dependente, sendo responsável por assegurar um número ótimo de células germinativas que pode ser suportado pelas células de Sertoli.

O padrão de divisão espermatogonial governa a produção de espermatócitos primários e pode ser calculado pela razão entre o número destas células na fase de preleptóteno e o número de espermatogônias A, sendo denominado coeficiente de eficiência de mitose espermatogonial (Ortavant et al., 1977). No presente estudo, devido à semelhança nos números destas células apresentados por ambos os grupos experimentais, também não foi observada diferença significativa no coeficiente de eficiência de mitose espermatogonial, sugerindo que o peso ao nascimento não influencia as divisões mitóticas dessa fase da espermatogênese (Figura 9).

Contudo, observa-se que a partir da fase de paquíteno da prófase meiótica, os números de células germinativas são menores nos animais de baixo peso ao nascimento. Entretanto, é importante ressaltar que as diferenças observadas no número de espermátocitos primários em paquíteno se devem muito mais a um aumento da contagem média do grupo Alto PN que à pequena redução do número de células observada no grupo Baixo PN. Apesar dessa diferença estatística, entretanto, as razões celulares obtidas a partir destas contagens se encontram dentro dos valores descritos previamente por França (1987) para suínos após a maturidade sexual (Paquíteno/Preleptóteno: 1,0-1,1; Espermátide arredondada/Preleptóteno: 2,9-3,1). Isto indica que as diferenças observadas não são devido ao aumento ou redução das apoptoses em determinado grupo experimental, o que pode ser comprovado pela ausência de diferenças estatísticas no índice apoptótico da espermatogênese, obtido pela razão entre o número corrigido de espermátocitos primários em preleptóteno e em paquíteno (Figura 9).

A diferença significativa observada no número de espermátides arredondadas sugere uma grande variação nas perdas celulares entre os grupos durante a prófase meiótica, de espermátocito primário em preleptóteno até espermátide arredondada. A redução do número dessas células pode ser atribuída ao processo apoptótico durante as divisões meióticas, devido a prováveis danos cromossômicos e à descamação do epitélio seminífero para o lúmen tubular (Amman e Almquist, 1962; Hess e França, 2008). De acordo com França et al. (2005), devido à alta capacidade de suporte de células germinativas pelas células de Sertoli no suíno, a grande perda de espermátides arredondadas pode estar relacionada ao número final de espermátides alongadas que poderiam ser suportadas nas criptas de cada célula de Sertoli.

Apesar das diferenças observadas no número total de células espermatogênicas, a eficiência da célula de Sertoli, medida da capacidade de suporte e da função desta célula, foi semelhante entre os grupos (Figura 9). Segundo Okwun et al. (1996), este parâmetro está relacionado tanto à produção de espermátides para cada espermatogônia A, quanto à produção espermática diária, sugerindo que estas características também estão preservadas nos animais de baixo peso.

No presente estudo, foi observada uma perda média de células germinativas de aproximadamente 22,9% e 26,1% para os grupos Alto PN e Baixo PN, respectivamente, da fase de preleptóteno da prófase meiótica à espermátide arredondada. Uma perda relativamente

próxima foi observada por França (1987) e Okwun et al. (1996) em suínos das raças Piau (25%) e Meishan (34%), respectivamente.

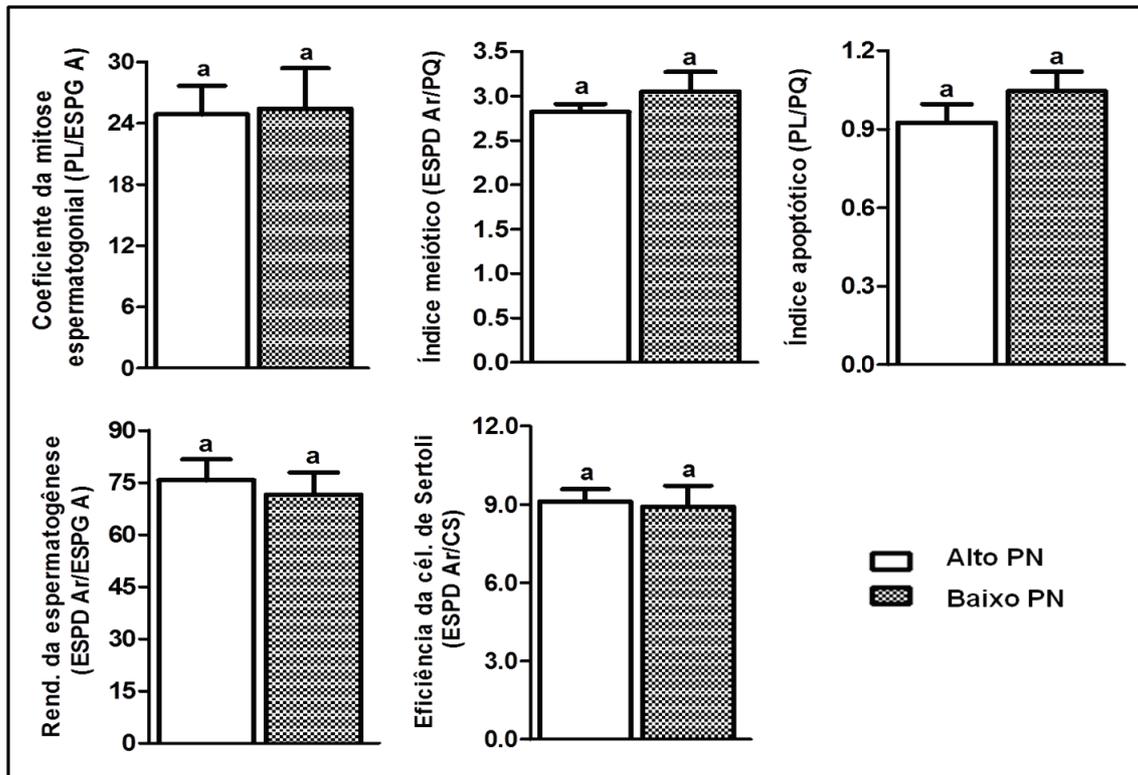


Figura 9. Eficiência da espermatogênese. Razão entre o número de células espermatogênicas secção transversal de túbulo seminífero em estágio um nos grupos de alto (Alto PN) e baixo (Baixo PN) peso ao nascimento, aos oito meses de idade. Os dados são apresentados como a média dos testículos direito e esquerdo. Valores expressos como a média \pm desvio-padrão ESGP A: espermatogônia A; PL: espermatócito primário em preleptóteno; PQ: espermatócito primário em paquíteno; ESPD Ar: espermátide arredondada; CS: célula de Sertoli. Letras distintas para cada variável representam diferença estatística pelo teste de Fisher ($p < 0,05$). Para cada grupo, $n=7$.

O índice meiótico da espermatogênese, obtido pela razão entre o número corrigido de espermátides arredondadas e espermatócitos primários em paquíteno também não diferiu entre os grupos (Figura 9). Da mesma forma, não foram observadas diferenças no rendimento geral da espermatogênese definido pela razão entre o número de espermátides arredondadas e o número de espermatogônias A, indicando que o processo de divisão meiótica e a eficiência de produção espermática não são influenciados pelo peso ao nascimento. França et al. (2005), em uma revisão sobre a espermatogênese em suínos descreveu um índice meiótico médio de aproximadamente 3,2 (20%) e um rendimento geral da espermatogênese de 68 (70%), demonstrando que os valores observados no presente estudo para ambos os grupos experimentais se encontram próximos aos descritos na literatura.

No presente estudo, as características discutidas acima (Figura 9) sugerem que a eficiência da espermatogênese não é afetada por um comprometido crescimento fetal. A ausência de diferenças significativas neste parâmetro foi observada mesmo com as variações no número de algumas células espermatogênicas e no total destas células.

De forma semelhante, Melo et al. (2013) demonstrou que a deficiência nutricional *in utero* não foi capaz de afetar a eficiência da espermatogênese em ratos, ocorrendo apenas uma ligeira redução da capacidade de suporte das células de Sertoli.

No presente trabalho, a redução significativa do número total de células espermatogênicas por secção transversal de túbulo seminífero, observada no grupo Baixo PN, não foi suficiente para alterar o diâmetro tubular, conforme demonstrado no **item 3.2**. Tais resultados são confrontados pelos apresentados por França (1987) que observou uma correlação positiva entre o número total destas células e o diâmetro dos túbulos seminíferos em suínos da raça Piau.

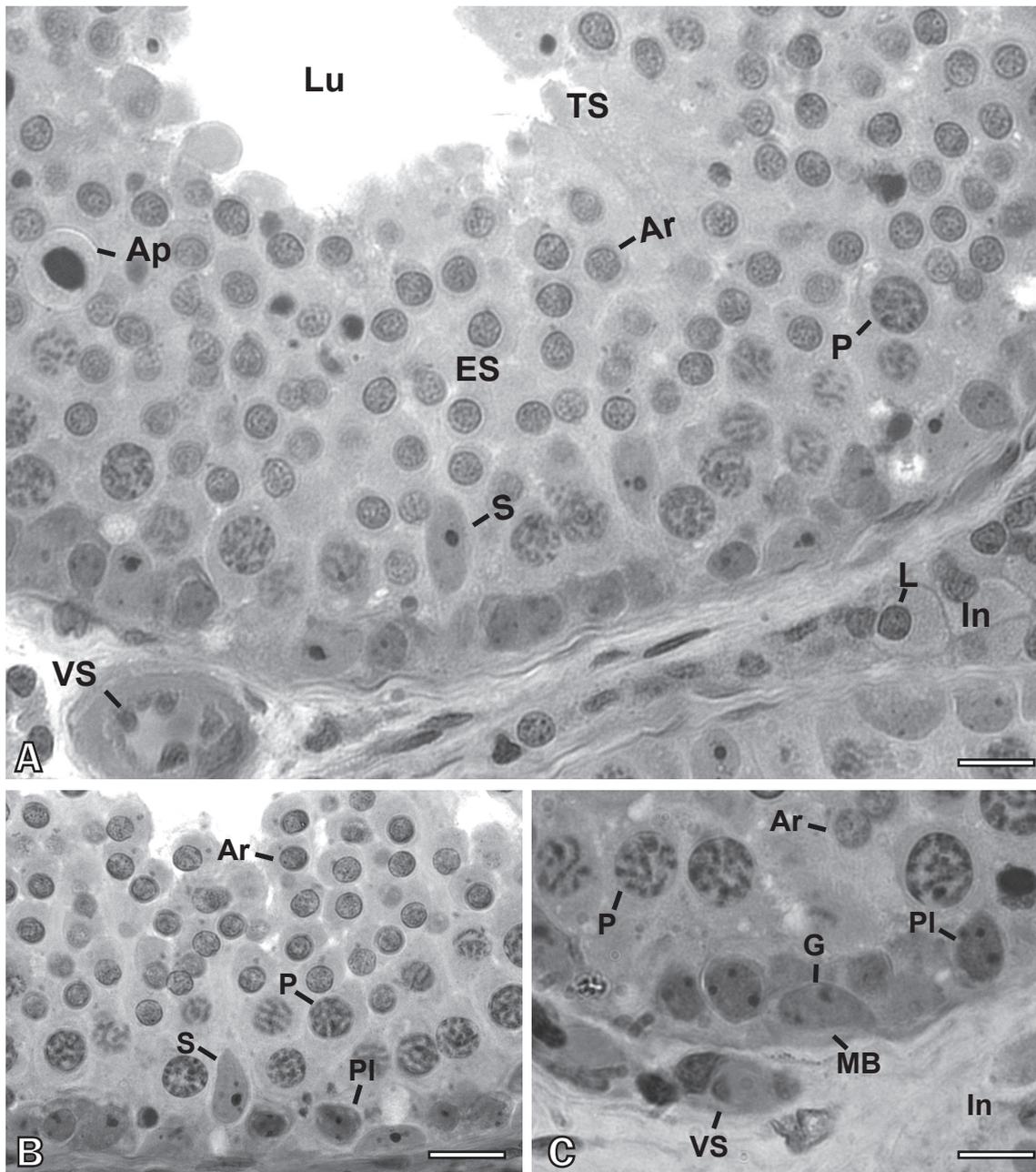


Figura 10. Fotomicrografia de luz de testículo de suíno aos 8 meses de idade. (A) Parênquima testicular apresentando secção transversal de túbulo seminífero (TS) em estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero (sistema tubular) e tecido intersticial (In) contendo células de Leydig (L) e vasos sanguíneos (VS). (B) Epitélio seminífero (ES) apresentando uma camada de espermatócitos primários em preleptóteno (PI) e células de Sertoli (S) na base, espermatócitos primários em paquíteno (P) e espermatídes arredondadas (Ar). (C) Espermatogônia tipo A (G) localizada na base do epitélio seminífero, em contato com a membrana basal (MB). Observa-se a presença de um vaso sanguíneo, no interstício, próximo à espermatogônia. Podem ser observadas também outras células espermatogênicas como espermatócitos primários em pre-leptóteno (PI) e paquíteno (P) e algumas espermatídes arredondadas. Barras: A, 20 μ m e em B-C, 10 μ m.

3.7. Número de espermátides testiculares

O número de espermátides testiculares obtido para cada grupo experimental está demonstrado na Tabela 7. Acompanhando o menor número de células de Sertoli, os animais de baixo peso ao nascimento apresentaram menor número de espermátides testiculares, quando comparados aos animais de alto peso. Entretanto, essa diferença não foi observada quando esse número foi dividido pelo peso testicular, sugerindo haver uma proporção entre o reduzido número de espermátides e o menor peso dos testículos observados nos animais de baixo peso ao nascimento.

Tabela 7. Número de espermátides, em milhões (10^6), por testículo e por grama de testículo em leitões de alto e baixo peso ao nascimento aos oito meses de idade

	Alto PN	Baixo PN
Espermátides/testículo	714 \pm 286 a	466 \pm 187 b
Espermátides/gr testículo	1,70 \pm 0,64 a	1,29 \pm 0,43 a

Valores expressos como média \pm desvio-padrão. Os dados são apresentados como a média entre os testículos direito e esquerdo. Alto PN: alto peso ao nascimento; baixo PN: baixo peso ao nascimento. Médias seguidas por letras distintas na linha diferem pelo teste de Fisher ($p < 0,05$). Para cada grupo, $n = 11$.

A técnica utilizada para a contagem das espermátides testiculares é baseada no conhecimento de que devido à intensa condensação das nucleoproteínas durante a fase espermiogênica da espermatogênese, somente as espermátides mais avançadas (alongadas) resistem à homogeneização (Amman., 1981). Assim, o número obtido fornece evidências sobre a eficiência da produção espermática em determinado momento, estando relacionado ao número total de espermatozoides presentes no sêmen. De acordo com Amann (1970) citado por Russel e Peterson. (1984), a quantidade de espermatozoides do ejaculado pode ser determinada por uma série de fatores, entretanto, é a produção de espermátides alongadas no testículo que exerce a maior influência sobre este parâmetro. Estas observações sugerem que os animais de baixo peso ao nascimento apresentam menor número de espermatozoides totais no sêmen, quando comparados aos animais do grupo Alto PN.

É interessante observar que a proporção entre os números absolutos de células de Sertoli (**item 3.5**) dos animais de alto e baixo peso ao nascimento foi repetida para a contagem de espermátides testiculares, em que valores aproximadamente duas vezes maiores são

observados para os animais do primeiro grupo em ambos os parâmetros. Estes achados foram corroborados por Okwun et al. (1996) que demonstraram alta correlação entre a produção espermática diária e o número de células de Sertoli por testículo. Estes autores também observaram que as taxas de produção ou degeneração de células germinativas por secção transversal de túbulo seminífero contribuem pouco para a variação da produção espermática diária. Isto significa que o fato de os animais de alto e baixo peso apresentarem semelhanças na eficiência da espermatogênese não impede que estes últimos possuam menor produção de espermátides testiculares.

Toledo et al. (2011) demonstraram que ratos adultos quando submetidos à deficiência nutricional durante a vida fetal apresentaram, associado ao menor número de células de Sertoli, menor contagem de espermátides testiculares, sendo este número também proporcional ao peso testicular (espermátides/grama), assim como observado no presente estudo. De forma interessante, estes autores também observaram um aumento da porcentagem de espermatozoides com defeitos de cabeça, além de outros defeitos menores, no grupo desnutrido, sugerindo serem esses decorrentes dos efeitos deletérios da restrição proteica *in utero*.

3.8. Proliferação celular

Os índices de proliferação celular calculados para as idades de oito dias (Figura 13) e oito meses (Figura 14) estão representados pelas Figuras 11 e 12. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais no que se refere ao índice de proliferação das células de Sertoli, Leydig e gonócitos aos oito dias e das células de Leydig e germinativas dos túbulos seminíferos aos oito meses de idade.

A ausência de diferenças estatísticas no índice de proliferação das células somáticas e germinativas tanto aos oito dias quanto aos oito meses de idade indica que o comprometimento do crescimento fetal não alterou a atividade proliferativa destas células nestes momentos do desenvolvimento pós-natal. É importante ressaltar que, considerando as respectivas fases de proliferação, um efeito deletério do baixo peso sobre a proliferação das células de Sertoli aos oito dias e das células de Leydig tanto aos oito dias quanto aos oito meses poderia comprometer o número total dessas na idade adulta.

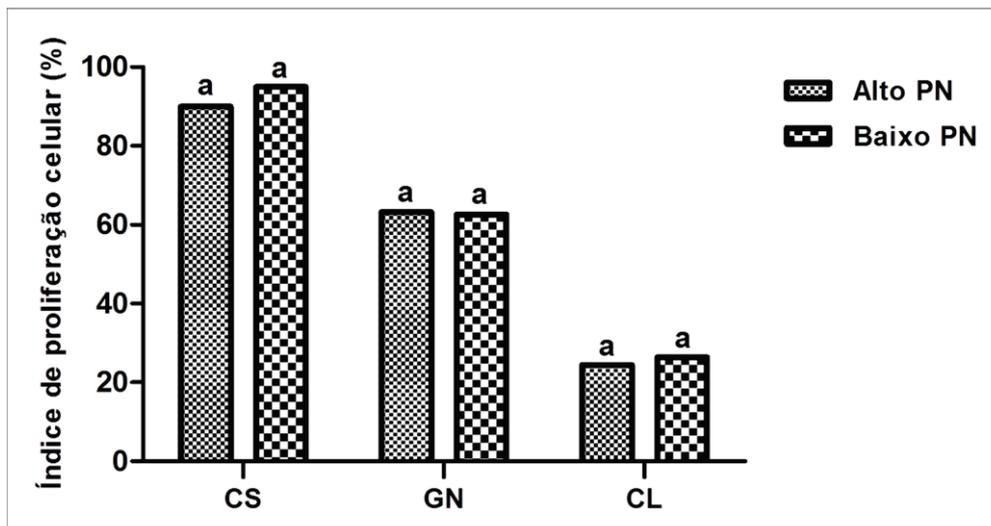


Figura 11. Índice de proliferação celular. Porcentagem de núcleos de células de Sertoli, Leydig e gonócitos positivos para o anticorpo primário anti-MCM7 em testículos de suínos de alto (Alto PN) e baixo (Baixo PN) peso ao nascimento aos oito dias de idade. Os resultados são apresentados como a média entre os testículos direito e esquerdo. Médias seguidas por letras distintas diferem pelo teste de Fisher ($p < 0,05$). CS: células de Sertoli; GN: gonócitos; CL: células de Leydig. Para cada grupo, $n=7$.

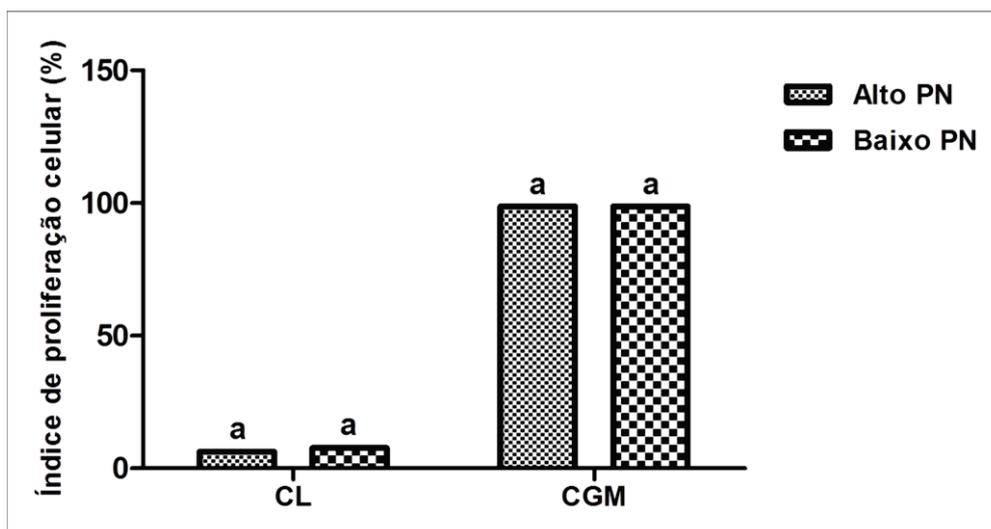


Figura 12. Índice de proliferação celular. Porcentagem de núcleos de células de Leydig e germinativas positivas para o anticorpo primário anti-MCM7 em testículos de suínos de alto (Alto PN) e baixo (Baixo PN) peso ao nascimento aos oito meses de idade. Os resultados são apresentados como a média entre os testículos direito e esquerdo. Médias seguidas por letras distintas diferem pelo teste de Fisher ($p < 0,05$). CL: células de Leydig; CGM: células germinativas. Para cada grupo, $n=7$.

Foi demonstrado que as células de Sertoli apresentam uma elevada atividade proliferativa durante a fase perinatal, principalmente no período compreendido entre o nascimento e o 15º dia pós-parto (McCoard et al., 2001; McCoard et al., 2003; Avelar et al., 2010). Observa-se que aos oito dias após o nascimento, as células de Sertoli se encontram no período mais ativo, apresentando elevada taxa de proliferação, assim

como observado por Avelar et al., 2010. Índices de proliferação das células de Sertoli, no período neonatal, semelhantes aos observados no presente estudo ($\approx 100\%$) foram demonstrados por Angelopoulou et al. (2008).

Em relação aos gonócitos, os mecanismos que envolvem a proliferação destas células e o período em que estas se mantêm quiescentes antes de originar as espermatogônias permanecem desconhecidos na espécie suína. Evidências encontradas na literatura demonstram que as células quiescentes não expressam a proteína MCM7 (Blow e Hodgson, 2002). Dessa forma, de acordo com os resultados obtidos no presente estudo, pode-se inferir que, aos oito dias, parte da população de gonócitos parece não se encontrar no estado de quiescência e sim no estado ativo.

Em síntese, os índices de proliferação das células somáticas e germinativas, associados aos índices mitóticos e apoptóticos (**item 3.4**) e ao coeficiente de mitose espermatogonial (**item 3.6**) discutidos anteriormente, reafirmam a hipótese de que os mecanismos de morte e proliferação celular estão preservados nos animais de baixo peso ao nascimento, em ambas as idades estudadas.

É importante ressaltar que este foi um estudo pontual, sendo que a ausência de diferenças significativas na proliferação das células somáticas e germinativas entre os grupos não significa que não haja a interferência de possíveis efeitos deletérios durante as outras fases de proliferação destas células, ou mesmo em outros momentos durante o desenvolvimento pós-natal.

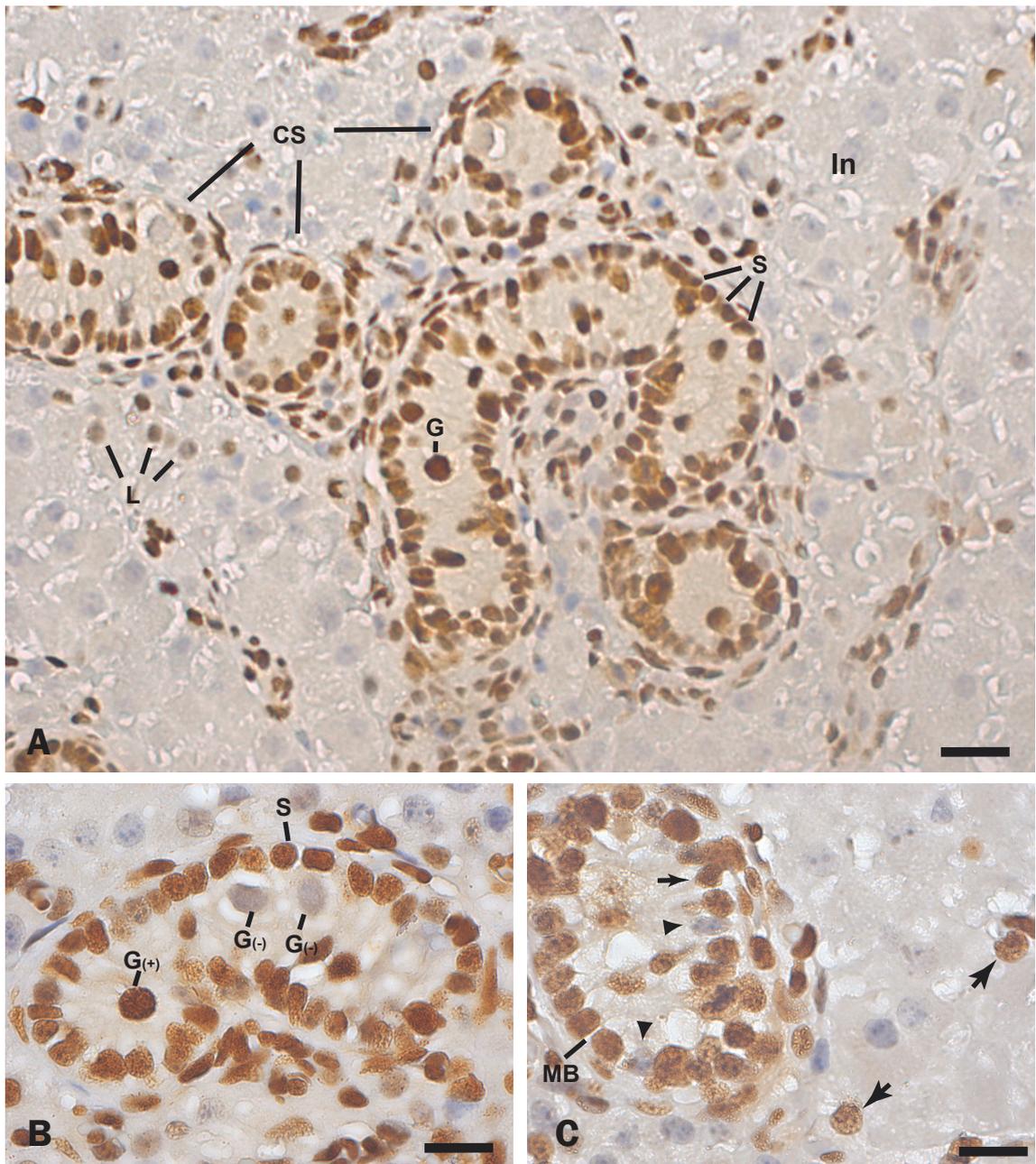


Figura 13. Imuno-histoquímica para a proteína MCM7 em testículo de suíno aos 8 dias de idade. (A) Parênquima testicular apresentando tecido intersticial (In) contendo células de Leydig (L) MCM7-positivas (marrom) e cordões seminíferos (CS) com grande número de células Sertoli (S) e alguns gonócitos (G) positivos. (B) Cordão seminífero apresentando gonócitos com marcação nuclear negativa e positiva para a proteína MCM7. (C) Secção transversal de cordão seminífero mostrando grande número de núcleos de células de Sertoli MCM7-positivos (seta preta) e alguns núcleos negativos (pontas de seta), localizados em contato com a membrana basal (MB). Observa-se também marcação nuclear positiva nas células de Leydig localizadas no interstício (seta longa). Barras: A, 30 μ m e B-C, 15 μ m.

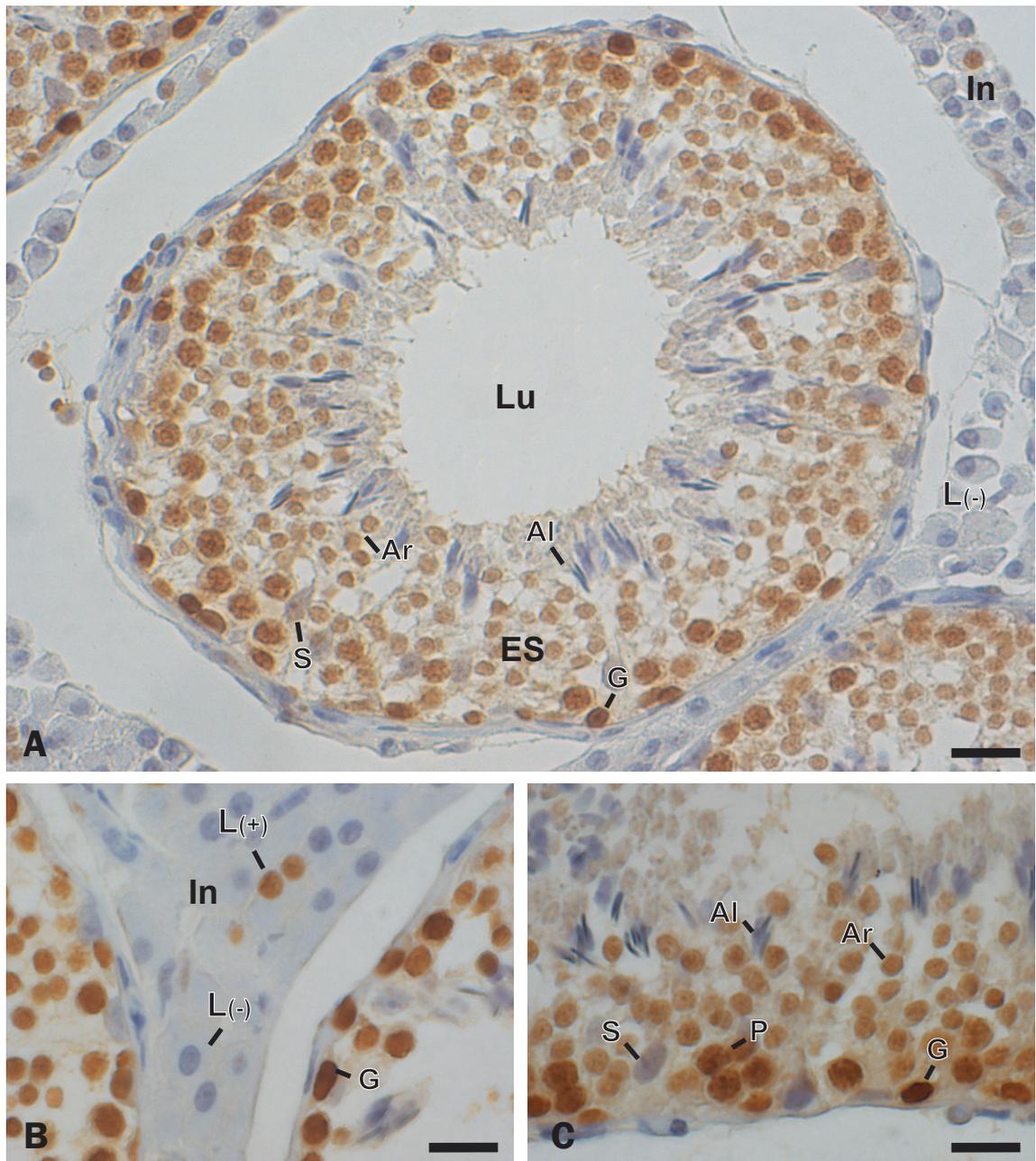


Figura 14. Expressão imuno-histoquímica da proteína MCM7 em testículo de suíno aos 8 meses de idade. (A) Túbulo seminífero apresentando população de células espermatogênicas, de espermatogônias (G) a espermatídes arredondadas (Ar), MCM7-positiva e a geração de espermatídes alongadas (Al) negativa. Observa-se também ausência de marcação nas células de Sertoli (S). (B) Tecido intersticial (In) apresentando células de Leydig MCM7-positivas e negativas. (C) Ampliação do epitélio seminífero (ES) evidenciando a marcação observada em A. Observa-se um núcleo de espermatogônia (G) positivo localizado na base do epitélio seminífero e um núcleo de célula de Sertoli (S) com ausência de expressão. Lu: lúmen tubular; P: paquíteno; Barras: A, 20µm e B-C, 10µm.

CONCLUSÕES

- O baixo peso ao nascimento está relacionado a um menor crescimento corporal e desenvolvimento testicular, representados pela redução das medidas biométricas corporais e testiculares aos oito dias e oito meses de idade;
- As alterações observadas no parênquima testicular dos leitões de baixo peso estão restritas à redução no volume de cordão/túbulo seminífero aos oito dias e oito meses e no número total de células somáticas e germinativas aos oito dias, não havendo alterações nas proporções destas no testículo;
- O baixo peso ao nascer não apresenta influência na eficiência da espermatogênese aos oito meses de idade, ocorrendo apenas uma redução no número total de células espermatogênicas por secção transversal de túbulo seminífero;
- Leitões mais leves ao nascimento apresentam menor número de espermátides testiculares aos oito meses de idade;
- A atividade proliferativa das células de Sertoli, Leydig e germinativas aos oito dias de idade, e das células de Leydig e germinativas aos oito meses de idade não foi influenciada pelo baixo peso ao nascimento.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados apresentados e discutidos neste estudo, observa-se que o baixo peso ao nascimento está relacionado a animais de menor tamanho e peso, corporal e testicular, quando comparados a seus pares, tanto no período neonatal quanto pós-puberal. Entretanto, as reduções no peso e volume testiculares, número total de células somáticas e germinativas por testículo e produção de espermátides reportados não parecem ser decorrentes de uma organogênese comprometida e sim proporcional ao menor tamanho do animal.

Ressalta-se que os achados obtidos sugerem que o menor número de células de Sertoli observado nos animais de baixo peso ao nascimento aos oito dias de idade ainda se mantém aos oito meses. Devido à ausência de outras alterações histológicas, esse provável menor número de células, aos oito meses de idade, seria o único fator capaz de causar alterações na produção espermática desses animais.

Apesar da ausência de resultados sugestivos de comprometimento da organogênese, os achados obtidos no presente estudo não são conclusivos quanto à inclusão do peso ao nascimento como um critério de seleção de reprodutores aos 130 - 140 dias de idade. Portanto, novos estudos relacionados a outros parâmetros reprodutivos como a idade à puberdade e maturidade sexual, libido, qualidade de sêmen e capacidade de fertilização dos espermatozoides são necessários para avaliar se os efeitos do baixo peso estão restritos ao menor tamanho testicular e, conseqüentemente, menor número de células, ou se são estendidos à função hormonal, integridade e funcionalidade da célula espermática, comprometendo a fertilidade do reprodutor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERCROMBIE, M. Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anatom. Rec.*, v. 94, n. 2, p. 239-247, 1946.

AGRINESS. Melhores da suinocultura. Disponível em: <<http://www.melhoresdasuinocultura.com.br/dados/edicoes>>. Acesso em 10 de dezembro de 2012.

ALMEIDA, F. R. C. L.; ALVARENGA, A. L. N.; FOXCROFT, G. R., et al. Birth weight implications for reproductive parameters in boars. In: ADSA-CSAS-ASAS JOINT ANNUAL MEETING, n° 87, 2009, Montreal. *J. Anim. Sci.* Montreal: ASAS, 2009. p. 195-195.

ALVARENGA, A. L. N.; CHIARINI-GARCIA, H.; CARDEAL, P. C., et al. Intra-uterine growth retardation affects birthweight and postnatal development in pigs, impairing muscle accretion, duodenal mucosa morphology and carcass traits. *Reprod. Fertil. Dev.*, v. 25, n. 2, p. 387-395, 2013.

AMANN, R.P. Sperm production rates. In: JOHNSON, A.D.; GOMES W.R.; VANDEMARK, N.L. (Eds.) *The testis*. Nova York e Londres: Academic Press, 1970. v.1, p.433-482.

AMMAN, R. P. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. *J. Androl.*, v.2, p. 37-58, 1981.

AMANN, R. P.; ALMQUIST, J. O. Reproductive capacity of dairy bulls. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. *J. Dairy Sci.*, v. 45, p. 774-781, 1962.

ANGELOPOULOU, R.; BALLA, M.; LAVRANOS, G., et al. Sertoli cell proliferation in the fetal and neonatal rat testis: A continuous phenomenon? *Acta Histochem.*, v. 110, p. 341-347, 2008.

AVELAR, G. F.; OLIVEIRA, C. F. A.; SOARES, J. M., et al. Postnatal somatic cell proliferation and seminiferous tubule maturation in pigs: A non-random event. *Theriogenol.*, v. 74, p. 11-23, 2010.

BARKER, D. J. In utero programming of chronic disease. *Clin. Sci. (Lond.)*, v. 95, p. 115-128, 1998.

BAUER, R.; WALTER, B.; HOPPE, A., et al. Body weight distribution and organ size in newborn swine (*sus scrofa domestica*): A study describing an animal model for asymmetrical intrauterine growth retardation. *Exp. Toxic. Pathol.*, v. 50, p. 59-65, 1998.

BEAULIEU, A. D.; AALHUS, J. L.; WILLIAMS, N. H., et al. Impact of piglet birth weight, birth order, and litter size on subsequent growth performance, carcass quality, muscle composition, and eating quality of pork. *J. Anim. Sci.*, v. 88, p. 2767-2778, 2010.

- BÉRARD, J.; KREUZER, M.; BEE, G. Effect of litter size and birth weight on growth, carcass and pork quality, and their relationship to postmortem proteolysis. *J. Anim. Sci.*, v. 86, p. 2357-2368, 2008.
- BIELLI, A.; PÉREZ, R.; PEDRANA, G., et al. Low maternal nutrition during pregnancy reduces the number of Sertoli cells in the newborn lamb. *Reprod. Fertil. Dev.*, v. 14, p. 333-337, 2002.
- BLOW, J. J.; HODGSON, B. Replication licensing: defining the proliferative state? *Trends Cell Biol.*, v. 12, n. 2, 2002
- BORG, K. E.; LUNSTRA, D. D.; CHRISTENSON, R. K. Semen Characteristics, Testicular Size, and Reproductive Hormone Concentrations in Mature Duroc, Meishan, Fengjing, and Minzhu Boars. *Biol. Reprod.*, v. 49, p. 515-521, 1993.
- BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ, I.; DALLANORA, D. Situação atual da inseminação artificial em suínos. *Acta Scient. Vet.*, v. 33, n. 1, p. 17-32, 2005.
- CAPEL, B. The battle of the sexes. *Mech. Dev.*, v. 92, p. 89-103, 2000.
- CHIARINI-GARCIA, H.; PARREIRA, G. G.; ALMEIDA, F. R. C. L. Glycol methacrylate embedding for improved morphological, morphometrical and immunohistochemical investigations under light microscopy: testes as a model. In: Helio Chiarini-Garcia e Rossana C. N. Melo. (Org.). *Light Microscopy: Methods and Protocols*. 1 ed. Totowa: Humana Press, 2011. v. 689, p. 3-18.
- CHISWICK, M. L. Intrauterine growth retardation. *Brit. Med. J.*, v. 291, p. 845-848, 1985.
- CLERMONT, YVES. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle, and spermatogonial renewal. *Physiol. Rev.*, v. 52, n. 1, p. 198-236, 1972.
- CLERMONT, Y.; LEBLOND, C. P. Spermiogenesis of man, monkey, ram and other mammals as shown by the "periodic acid-schiff" technique. *Am. J. Anat.* v. 96, n. 2, p. 229-253, 1955.
- COLENBRANDER, B.; VAN DE WIEL, D. F. M.; VAN ROSSUM-KOK, et al. Changes in sérum FSH concentration in the pig during development. *Biol. Reprod.*, v. 26, p.105-109, 1982.
- COMBES; A. N.; WILHELM, D.; DAVIDSON, T., et al. Endothelial cell migration directs testis cord formation. *Dev. Biol.*, v. 326, p. 112-120, 2009.
- DA SILVA, P.; AITKEN, R. P.; RHIND, S. M., et al. Influence of placentally mediated fetal growth restriction on the onset of puberty in male and female lambs. *Reprod.*, v. 122, p. 375-383, 2001.

DA SILVA-BUTTKUS, P.; VAN DEN HURK, R.; TE VELDE, E. R., et al. Ovarian development in intrauterine growth-retarded and normally developed piglets originating from the same litter. *Reprod.*, v. 126, p. 249-258, 2003.

DIFFLEY, J. F. X.; LABIB, K. The chromosome replication cycle. *J. Cell Sci.*, v. 115, n. 5, p. 869-872, 2002.

DRUMOND, A. L. *Avaliação da perda de células espermatogênicas e da capacidade de colonização das espermatogônias-tronco, em camundongos expostos a diferentes regimes de tratamento com a ciclofosfamida*. 2011. 117f. Tese (Doutorado em Morfologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

DRUMOND, A. L.; MEISTRICH, M. L.; CHIARINI-GARCIA, H. Spermatogonial morphology and kinetics during testis development in mice: a high-resolution light microscopy approach. *Reprod.*, v. 142, p. 145-155, 2011.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. *Tratado de anatomia veterinária*. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 856p.

FORD, J. J.; WISE, T. H. Sertoli cell differentiation in pubertal boars. *J. Anim. Sci.*, v. 87, p. 2536-2543, 2009.

FORD, J. J.; WISE, T. H. Assessment of pubertal development of boars derived from ultrasonographic determination of testicular diameter. *Theriogenol.*, v. 75, p. 241-247, 2011.

FOXCROFT, G. Pre-natal programming of variation in post-natal performance – how and when? *Adv. Pork Prod.*, v. 18, p. 167-189, 2007.

FOXCROFT, G. R.; TOWN, S. C. Prenatal programming of postnatal performance - the unseen cause of variance. *Adv. Pork Prod.*, v.15, p. 269-279, 2004.

FOXCROFT, G. R.; DIXON, W. T.; NOVAK, S., et al. The biological basis for prenatal programming of postnatal performance in pigs. *J. Anim. Sci.*, v. 84 (Supplement), p. E105-112, 2006.

FRANÇA, L. R. *Desenvolvimento testicular de suínos da raça piau, do nascimento aos 12 meses de idade*. 1987. 40f. Dissertação (Mestrado em Morfologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FRANÇA, L.R.; CARDOSO, F.M. Duration of spermatogenesis and sperm transit time through the epididymis in the Piau boar. *Tissue Cell.*, v. 30, n. 5, p. 573-582, 1998.

FRANÇA, L. R. ; CHIARINI-GARCIA, H. Célula de Sertoli. In: CARVALHO, H. F.; COLLARES-BUZATO, C. B. (eds). *Células, uma abordagem multidisciplinar*. Barueri: Manole, 2005. p. 302-324.

FRANÇA, L. R.; CARDOSO, F. M.; SANTANA-CASTRO, A. C. Desenvolvimento testicular de suínos Piau. IV. População celular dos túbulos seminíferos e rendimento da espermatogênese. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoot.*, v. 40, n. 5, p. 339-53, 1988.

FRANÇA, L. R.; AVELAR, G. F.; ALMEIDA, F. F. L. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenol.*, v. 63, p. 300-318, 2005.

FRANÇA, L. R.; SILVA, V. A. Jr.; CHIARINI-GARCIA, H., et al. Cell proliferation and hormonal changes during post development of the testis in the pig. *Biol. Reprod.*, v. 63, p. 1629-1636, 2000.

FRANKENHUIS, M. T.; KRAMER, M. F.; ROOIJ, D. G. Spermatogenesis in the boar. *Vet. Quart.*, v. 4, n. 2, p. 57-61, 1982.

GARCIA-GIL, N.; PINART, E.; SANCHO, S., et al. The cycle of the seminiferous epithelium in Landrace boars. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 73, p. 211-225, 2002.

GARTNER, L. P.; HIATT, J. L. *Tratado de histologia em cores*. 3ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 592p.

GIAGINIS, C.; VGENOPOULOU, S.; VIELH, P., et al. MCM proteins as diagnostic and prognostic tumor markers in the clinical setting. *Histol. Histopathol.*, v. 25, n. 3, p., 351-370, 2010.

GINSBURG, M.; SNOW, M.; MCLAREN, A. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Dev.*, v. 110, p. 521-528, 1990.

GODINHO, H. P.; CARDOSO, F. M. Desenvolvimento sexual de porcos Yorkshire. II. Estabelecimento e evolução da espermatogênese. *Arq. Esc. Vet.*, v. 31, n. 3, p. 351-361, 1979.

GONDRET, F.; LEFRAUCHEUR, L.; JUIN, H., et al. Low birth weight is associated with enlarged muscle fiber area and impaired meat tenderness of the longissimus muscle in pigs. *J. Anim. Sci.*, v. 84, p. 93-103, 2006.

HARAYAMA, H.; NANJO, I.; KANDA, S., et al. Testicular development in chinese meishan boars. *Theriogenol.*, v. 36, n. 4, p. 637-642, 1991.

HARDING, J. E.; The nutritional basis of the fetal origins of adult disease. *Intern. Epidemiol. Assoc.*, v. 30, p. 15-23, 2001.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 488p.

KAMINSKI, M. A.; CORBIN, C.J.; CONLEY, A.J. Development and Differentiation of the Interstitial and Tubular Compartments of Fetal Porcine Testes. *Biol. Reprod.*, v. 60, p. 119-127, 1999.

KNIGHT, J. W.; BAZER, F. W.; THATCHER, W. W., et al. Conceptus development in intact and unilaterally hysterectomized-ovariectomized gilts: interrelations among hormonal status, placental development, fetal fluids and fetal growth. *J. Anim. Sci.*, v. 44, p. 620-637, 1977.

KNOX, R. Getting to 30 pigs weaned/sow/year. In: LONDON SWINE CONFERENCE – PRODUCTION AT THE LEADING EDGE 6-7, 2005, London, Ontario. *Anais...* London, Ontario: Universidade de Guelph, 2005. p. 47-59.

LABIB, K.; DIFFLEY, J. F. X. Is the MCM2-7 complex the eukaryotic DNA replication fork helicase? *Curr. Opin. Genet. Dev.*, v. 11, n. 1, p. 64-70, 2001.

LAW, C. M.; BARKER, D. J. P.; OSMOND, C., et al. Early growth and abdominal fatness in adult life. *J. Epidemiol. Community Health*, v.46, p. 184-186, 1992.

LIMA, G. J. M. M. Como manejar uma fêmea hiperprolífica e alimentar os seus leitões. *Acta Sci. Vet.*, v. 35s, p. 29-36, 2007.

LINO-NETO, J.; BAHAMONDES, L.; CARREL, D. T., et al. Espermatozoides. In CARVALHO, H. F.; COLLARES-BUZATO, C. B. (eds). *Células, uma abordagem multidisciplinar*. Barueri: Manole, 2005. p. 291-301.

LUNSTRA, D. D.; WISE, T. H.; FORD, J. J. Sertoli Cells in the Boar Testis: Changes During Development and Compensatory Hypertrophy after Hemicastration at Different Ages. *Biol. Reprod.*, v. 68, p. 140-150, 2003.

MARTIN-GRONERT, M. S.; OZANNE, S. E. Maternal nutrition during pregnancy and health of the offspring. *Biochem. Soc. Trans.*, v. 34, n.5, p. 779-782, 2006.

MCCOARD, S. A.; LUNSTRA, D. D.; WISE, T. H., et al. Specific staining of Sertoli cell nuclei and evaluation of Sertoli cell number and proliferative activity in Meishan and white composite boars during the neonatal period. *Biol. Reprod.*, v. 64, p. 689-695, 2001.

MCCOARD, S. A.; T. H. WISE; D. D. LUNSTRA, et al. Stereological evaluation of Sertoli cell ontogeny during fetal and neonatal life in two diverse breeds of swine. *J. Endocrinol.*, v. 178, p. 395–403, 2003.

MELO, M. C.; ALMEIDA, F. R. C. L.; BRANT, A. L. C; PARREIRA, G. G.; CHIARINI-GARCIA. Spermatogenesis recovery in protein-restricted rats subjected to a normal protein diet after weaning. *Reprod.Fertil. Dev.*, (in press), 2013.

MERCHANT-LARIOS, H.; MORENO-MENDOZA, N.; Onset of Sex Differentiation: Dialog Between Genes and Cells. *Arch. Med.Res.*, v. 32, p. 553-558, 2001.

OKWUN, O. E.; IGBOELI, G.; FORD, J. J., et al. Number and function of Sertoli cells, number and yield of spermatogonia, and daily sperm production in three breeds of boar. *J. Reprod. Fertil.*, v. 107, p. 137-149, 1996.

ORTAVANT, R.; COUROT, M.; HOCHEREAU-DE-REVIERS, M.T. Spermatogenesis in domestic mammals. In: H.H. Coole; P.T. Cupps (Eds). *Reproduction in domestic animals*. New York: Academic Press, 1977. p. 203-227.

ORTH, J. M.; GUNSALUS, G. L.; LAMPERTI, A. A. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinol.*, v. 122, p.787-794, 1988.

PARK, S. Y.; JAMESON, J. L. Minireview: Transcriptional regulation of gonadal development and differentiation. *Endocrinol.*, v. 146, n. 3, p. 1035-1042, 2005.

PELLINIEMI, L. J. Ultrastructure of the early ovary and testis in pig embryos. *Am. J. Anat.*, v. 144, p. 89-112, 1975.

PÈRE, M. C.; ETIENNE, M. Uterine blood flow in sows: effects of pregnancy stage and litter size. *Reprod. Nutr. Dev.*, v. 40, p. 369-382, 2000.

POORE, K. R.; FOWDEN, A. L. The effect of birth weight on hypothalamo-pituitary-adrenal axis function in juvenile and adult pigs. *J. Physiol. Soc.*, v. 547, n. 1, p. 107-116, 2003.

POORE, K. R.; FOWDEN, A. L. The effect of birth weight and postnatal growth patterns on fat depth and plasma leptin concentrations in juvenile and adult pigs. *J. Physiol.*, v. 588, n. 1, p. 295-304, 2004.

QUINIOU, N.; DAGORN, J.; GAUDRE, D. Variation of piglets birth weight and consequences on subsequent performance. *Livest. Prod. Sci.*, n. 78, p.63-70, 2002.

REHFELDT, C.; KUHN, G. Consequences of birth weight for postnatal growth performance and carcass quality in pigs as related to myogenesis. *J. Anim. Sci.*, v. 84, n. 13s, p. E113-E123, 2006.

REN, D.; XING, Y.; LIN, M., et al. Evaluations of boar gonad development, spermatogenesis with regard to semen characteristics, libido and serum testosterone levels based on Large White Duroc x Chinese Erhualian Crossbred boars. *Reprod. Dom. Anim.*, v. 44, p. 913-919, 2009.

ROSS, A. J.; CAPEL, B. Signaling at the crossroads of gonad development. *Trends Endocrinol. Metab.*, v. 16, n. 1, p. 19-25, 2005.

RUSSEL, L. D.; PETERSON, R. N. Determination of the elongate spermatid-sertoli cell rati in various mammals. *J. reprod. Fert.*, v. 70, p. 635-641, 1984.

RUSSEL, L. D.; BARTKE, A.; GOH, J. C. 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. *Am. J. Anat.*, v. 184, p. 179-189, 1989.

RUSSEL, L. D.; REN, H. P.; HIKIM, I. S., et al. A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes, and numerical densities os selected

testis components, emphasizing those related to the sertolli cell. *Am. J. Anat.*, v. 188, p. 21-30, 1990.

SETCHELL, B. P. Male Reproductive Organs and Semen. In: COLE, H. H.; CUPPS, P. T. (Eds.) *Reproduction in Domestic Animals*. Nova York: Academic Press, 1977. p. 229-256.

SINHA-HIKIM, A. P.; BARTKE, A.; RUSSELL, L. D. Morphometric studies on hamster testes in gonadally active and inactive states: light microscope findings. *Biol. Reprod.*, v. 39, p. 1225-1237, 1988.

GETTY, R. *Sisson/Grossman, Anatomia dos animais domésticos*. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. 2048 p.

SKINNER, M. K.; TUNG, P. S.; FRITZ, I. B. Cooperativity between Sertoli cells and testicular peritubular cells in the production and deposition of extracellular matrix components. *J. Cell Biol.*, v. 100, p. 1941-1947, 1985.

STOEBER, K.; TLSTY, T. D.; HAPPERFIELD, L., et al. DNA replication licensing and human cell proliferation. *J. Cell Sci.*, v. 114, n. 11, p. 2027-2041, 2001.

SWAIN, A.; LOVELL-BADGE, R. Mammalian sex determination: a molecular drama. *Genes Dev.*, v. 13, p. 755-767, 1999.

SWIESTRA, E. E. Cytology and duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the boar; duration of spermatozoam transit through the epididymis. *Anat. Rec.*, v. 161, p. 171-186, 1968.

TOELE, V. D.; JOHNSON, B. H.; ROBISON, O. W. Genetic parameters for testes traits in swine. *J. Anim. Sci.*, v. 59, p. 967-973, 1984.

TOLEDO, F. C.; PEROBELLI, J. E.; PEDROSA, F. P. C., et al. In utero protein restriction causes growth delay and alters sperm parameters in adult male rats. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, v. 9, p.1-9, 2011.

TOWN, S. C.; PUTMAN, C. T.; TURCHINSKY, N. J., et al. Number of conceptuses in utero affects porcine fetal muscle. *Reprod.*, v. 128, p. 443-454, 2004.

TOWN, S. C.; PATTERSON, J. L.; PEREIRA, C. Z., et al. Embryonic and fetal development in a commercial dam-line genotype. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 85, p. 301-316, 2005.

TURNER, A. S., McILWAITH, C. W. *Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte*. São Paulo: Roca, 2002. 341p

VALLET, J. L.; CHRISTENSON, R. K. Uterine space affects placental protein secretion in swine. *Biol. Reprod.*, v. 48, p. 575-584, 2003.

VAN STRATEEN, H. W. M; WENSING, C. J. G. Histomorphometric Aspects of testicular Morphogenesis in the Pig. *Biol. Reprod.*, v. 17, p. 467-472, 1977.

VAN STRATEEN, H. W. M.; WENSING, C. J. G. Leydig Cell Development in the testis of the pig. *Biol. Reprod.*, v. 18, p. 86-93, 1978.

WANG, T.; HUO, Y. J.; SHI, F., et al. Effects of Intrauterine Growth Retardation on Development of the Gastrointestinal Tract in Neonatal Pigs. *Biol. Neonate.*, v. 88, n.1, p. 66-72, 2005.

WANG, X.; WEIZONG, W.; GANG L., et al. Temporal proteomic analysis reveals continuous impairment of intestinal development in neonatal piglets with intrauterine growth restriction. *J. Proteome Res.*, v. 9, p. 924-935, 2010.

WILHELM, D.; PALMER, S.; KOOPMAN, P. Sex Determination and Gonadal Development in Mammals. *Physiol. Rev.*, v. 87, p. 1-28, 2007.

WILSON, M. E.; BIENSEN, N. J.; FORD, S. P. Novel insight into the control of litter size in pigs, using placental efficiency as a selection tool. *J. Anim. Sci.*, v. 77, p. 1654-1658, 1999.

WU, G.; BAZER, F. W.; CUDD, T. A., et al. Maternal nutrition and fetal development. *J. Nut.*, v. 134, p. 2169-2172, 2004.

Wu, G.; Bazer, F. W.; Wallace, J. M., et al. Board invited review: Intrauterine growth retardation: Implications for the animal sciences. *J. Anim. Sci.*, v. 84, p. 2316-2337, 2006.

ANEXO I

Peso corporal, ganho de peso médio diário e taxa de crescimento de leitões de alto e baixo peso ao nascimento castrados aos oito dias de idade

	Peso ao nascimento (kg) $\bar{x} \pm s$	Peso aos 8 dias (kg) $\bar{x} \pm s$	GPMD (kg) até 8 dias $\bar{x} \pm s$	Taxa de crescimento $\bar{x} \pm s$
Alto PN	1,85 ± 0,11 a	3,63 ± 0,59 a	0,25 ± 0,08 a	1,97 ± 0,32 b
Baixo PN	1,00 ± 0,15 b	2,38 ± 0,37 b	0,20 ± 0,04 b	2,39 ± 0,34 a

Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem pelo teste de Fisher ($p < 0,05$). Alto PN: alto peso ao nascimento; Baixo PN: baixo peso ao nascimento.

ANEXO II

Peso corporal, ganho de peso médio diário e taxa de crescimento de leitões de alto e baixo peso ao nascimento castrados aos oito meses de idade

	Peso ao nascimento (kg) $\bar{x} \pm s$	Peso aos 6 meses (kg) $\bar{x} \pm s$	GMD até 6 meses (kg) $\bar{x} \pm s$	Taxa de crescimento* $\bar{x} \pm s$	Peso aos 8 meses (kg) $\bar{x} \pm s$	GMD após 6 meses (kg) $\bar{x} \pm s$	Taxa de crescimento** $\bar{x} \pm s$
Alto PN	1,87 ± 0,12 a	141,92 ± 11,78 a	0,778 ± 0,065 a	78,62 ± 6,90 b	177,08 ± 13,35 a	0,59 ± 0,17 a	1,24 ± 0,08 b
Baixo PN	1,04 ± 0,12 b	113,54 ± 15,51 b	0,625 ± 0,086 b	109,5 ± 19,07 a	154,92 ± 17,91 b	0,69 ± 0,16 a	1,36 ± 0,11 a

Médias seguidas por letras distintas na coluna diferem pelo teste de Fisher ($p < 0,05$). Alto PN: alto peso ao nascimento; Baixo PN: baixo peso ao nascimento. * Taxa de crescimento do nascimento aos seis meses de idades. ** Taxa de crescimento do nascimento aos oito meses de idade.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 65/2011**, relativo ao projeto intitulado "***Influência do peso ao nascimento sobre a espermatogênese e o desempenho reprodutivo de varrões***", que tem como responsável(is) **Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **11/ 05/2011**.

Este certificado expira-se em **11/ 05/ 2016**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 65/2011**, related to the project entitled "***Birth weight impacts on spermatogenesis and reproductive performance of boars***", under the supervisors of **Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **May 11, 2011**.

This certificate expires in **May 11, 2016**.

Belo Horizonte, 13 de Maio de 2011.


Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br