

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA

**ANÁLISES MORFOMÉTRICA E FUNCIONAL DAS CÉLULAS SOMÁTICAS
DO TESTÍCULO DE SUÍNOS DURANTE O DESENVOLVIMENTO PÓS-
NATAL**

DOUTORANDA: Gleide Fernandes de Avelar

ORIENTADOR: Luiz Renato de França

BELO HORIZONTE
2010

GLEIDE FERNANDES DE AVELAR

**ANÁLISES MORFOMÉTRICA E FUNCIONAL DAS CÉLULAS SOMÁTICAS DO
TESTÍCULO DE SUÍNOS DURANTE O DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Biologia Celular da Universidade Federal de
Minas Gerais, como requisito parcial para
obtenção do título de doutor em Biologia Celular

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador: Prof. Dr. Luiz Renato de França.

BELO HORIZONTE

2010

Este trabalho é dedicado aos meus pais, Neide e Flávio, e meu irmão, Flavinho.

AGRADECIMENTOS:

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente:

À Deus, pela oportunidade de estar presente;

Ao professor Luiz Renato de França pela competente orientação, disponibilidade e por todos os ensinamentos ao longo dos anos de convivência;

Aos funcionários da suinocultura da Fazenda Prof. Hélio Barbosa, Nenêgo e Douglas, pela cooperação e dedicação com a qual auxiliaram na execução deste trabalho;

À todos os amigos do Laboratório de Biologia Celular;

À Jaqueline Soares Melo, pelo companheirismo, entusiasmo e principalmente, pela amizade;

Ao Adriano, Mara e Rachel, técnicos do Laboratório de Biologia Celular;

Às fundações que financiaram o desenvolvimento deste projeto, CAPES, CNPq e FAPEMIG;

Ao corpo administrativo do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular;

À todos os professores e colegas do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Departamento de Morfologia;

Meus sinceros agradecimentos.

Esta tese foi realizada no Laboratório de Biologia Celular do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação do Prof. Luiz Renato de França e contou com o auxílio dos seguintes pesquisadores e instituições:

Dra. Ina Dobrinski – Department of Comparative Biology and Experimental Medicine,
University of Calgary, Canada

Prof. Israel José da Silva – Departamento de Medicina Veterinária Preventiva – Escola
de Veterinária/UFMG

Dr. Rex A. Hess – Department of Veterinary Biosciences, University of Illinois, USA

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior (CAPES)

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG)

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	13
1. Desenvolvimento dos testículos.....	13
2. Proliferação das células de Sertoli e sua regulação.....	14
3. Células de Leydig e peritubulares mióides.....	20
JUSTIFICATIVA.....	24
OBJETIVO GERAL.....	25
1. Objetivos específicos.....	25
1.1. Capítulo 1.....	25
1.2. Capítulo 2.....	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
CAPÍTULO 1: PROLIFERAÇÃO PÓS-NATAL DAS CÉLULAS SOMÁTICAS E MATURAÇÃO DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS EM SUÍNOS: UM EVENTO NÃO- ALEATÓRIO.....	43
Resumo.....	43
Abstract.....	44
1. Introdução.....	45
2. Material e Métodos.....	46
2.1. Animais.....	46
2.2. Morfometria testicular.....	47
2.2.1. Proporção volumétrica e diâmetro de cordões e túbulos seminíferos.....	47
2.2.2 Estabelecimento da espermatogênese.....	47
2.2.3 Célula de Leydig.....	47
2.2.4 Volume nuclear da célula de Sertoli.....	48
2.2.5 Índice de proliferação das células somáticas testiculares.....	48
2.3 Análise estatística.....	48

3. Resultados.....	48
3.1. Biometria.....	48
3.2. Diâmetro dos cordões/túbulos seminíferos e proporção volumétrica dos componentes do parênquima testicular.....	49
3.3. Estabelecimento da espermatogênese.....	50
3.4. Células de Sertoli.....	51
3.5. Célula de Leydig.....	51
3.6. Proliferação das células somáticas testiculares.....	52
4. Discussão.....	53
5. Referências bibliográficas.....	58
6. Figuras.....	63
CAPÍTULO 2: EFEITOS DO TRATAMENTO PÓS-NATAL COM ACETATO DE LEUPROLIDE (LUPRON® <i>DEPOT</i>) NA HISTOFISIOLOGIA DO TESTÍCULO DE SUÍNOS...	78
Resumo.....	78
1. Introdução.....	80
2. Material e métodos.....	82
2.1. Animais.....	82
2.2. Avaliação do peso corporal.....	83
2.3. Tratamento com acetato de leuprolide e análises hormonais.....	83
2.4. Morfometria testicular.....	84
2.4.1. Proporção volumétrica e diâmetro dos túbulos seminíferos.....	84
2.4.2. Células de Leydig.....	84
2.5. Análise estatística.....	84
3. Resultados.....	85
3.1. Pesos corporal e testicular e índice gonadossomático.....	85
3.2. Concentrações séricas de FSH, LH, testosterona e 17 β -estradiol.....	85
3.3. Diâmetro dos túbulos seminíferos e proporção volumétrica dos componentes do parênquima testicular.....	86

3.4. Células de Leydig.....	87
4. Discussão.....	87
5. Referências Bibliográficas.....	94
6. Figuras e tabelas.....	100
CONCLUSÕES.....	114
Anexo: Trabalho <i>in press</i>.....	115

LISTAS DE FIGURAS E TABELAS

CAPÍTULO 1: PROLIFERAÇÃO PÓS-NATAL DAS CÉLULAS SOMÁTICAS E MATURAÇÃO DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS EM SUÍNOS: UM EVENTO NÃO-ALEATÓRIO

Figura 1. Representação das regiões do parênquima testicular.....	63
Figura 2. Biometria e índice gonadossomático.....	64
Figura 3. Diâmetro dos cordões/túbulos seminíferos.....	65
Figura 4. Proporção volumétrica dos componentes do compartimento tubular.....	66
Figura 5. Proporção volumétrica dos componentes do compartimento intertubular...	68
Figura 6. Morfologia do parênquima testicular de suínos pré e pós-púberes.....	70
Figura 7. Morfologia nuclear da célula de Sertoli.....	71
Figura 8. Volume nuclear da célula de Sertoli.....	72
Figura 9. Células de Leydig em diferentes regiões do parênquima testicular.....	73
Figura 10. Morfometria das células de Leydig.....	74
Figura 11. Índices de proliferação de células somáticas.....	76

CAPÍTULO 2: EFEITOS DO TRATAMENTO PÓS-NATAL COM ACETATO DE LEUPROLIDE (LUPRON® *DEPOT*) NA HISTOFISIOLOGIA DO TESTÍCULO DE SUÍNOS

Figura 1. Representação das regiões do parênquima testicular.....	100
Figura 2. Evolução do peso corporal.....	101
Figura 3. Biometria e índice gonadossomático.....	103
Figura 4. Diâmetro tubular.....	105
Figura 5. Percentual dos diferentes componentes do compartimento tubular.....	106
Figura 6. Percentual dos diferentes componentes do compartimento intertubular....	108
Figura 7. Morfometria das células de Leydig.....	110
Tabela 1. Concentrações séricas de FSH, LH, testosterona e 17 β -estradiol durante o desenvolvimento pós-natal de suínos controles e tratados com acetato de leuprolide aos 35 dias de idade.....	112
Tabela 2. Concentrações séricas de FSH, LH, testosterona e 17 β -estradiol durante o desenvolvimento pós-natal de suínos controles e tratados com acetato de leuprolide aos 70 dias de idade.	113

RESUMO

RESUMO

O desenvolvimento pós-natal dos testículos em mamíferos é marcado por importantes modificações na estrutura e composição deste órgão, as quais são reguladas, principalmente, pelos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH) e também são resultantes de complexas interações essenciais para a maturação dos elementos somáticos e germinativos. Diferentemente de outras espécies de mamíferos, a maturação testicular em equinos se inicia na região central deste órgão. No entanto, estudos recentemente realizados em nosso laboratório indicaram que em suínos a maturação dos túbulos seminíferos parece não ocorrer de forma aleatória. No presente estudo, duas diferentes abordagens experimentais foram utilizadas para se investigar funcionalmente o testículo de suínos. Na primeira delas, os objetivos foram os de se avaliar o padrão de maturação dos cordões e túbulos seminíferos e as características morfológicas e funcionais das células somáticas testiculares, durante o desenvolvimento pós-natal, em três diferentes regiões do testículo, conforme segue: a) próximo a túnica albugínea (TA); b) na região de transição entre os túbulos seminíferos e o mediastino testicular/*rete testis* (RT); e c) na região intermediária (ID) entre TA e RT. Já os objetivos da segunda abordagem foram os de se avaliar os efeitos da inibição do eixo hipotálamo-hipófise-gônada nos níveis de gonadotrofinas (FSH, LH), testosterona (T) e 17 β -estradiol (E2) e na estrutura e função das três diferentes regiões mencionadas para o parênquima testicular de suínos sexualmente maduros, tratados com acetato de leuprolide, um potente agonista/antagonista sintético do GnRH, em duas diferentes idades pré-púberes. Baseado no diâmetro dos cordões/túbulos seminíferos, no tamanho do núcleo das células de Sertoli, bem como na secreção de fluido tubular, principalmente aos 90 e 120 dias de idade, os resultados encontrados na primeira etapa do estudo mostraram que o processo de maturação dos túbulos seminíferos estava mais adiantado nas regiões ID e RT. A atividade mitótica das células de Sertoli foi maior em RT que em ID e TA aos 7 e 120 dias. Exceto para o índice mitótico das células de Leydig, o qual foi menor em ID, em comparação com TA e RT aos 7, 30 e 180 dias, os demais parâmetros avaliados para esta importante célula esteroideogênica, tais como volume celular individual, volume nuclear e citoplasmático, foram sempre maiores em ID, sugerindo que a esteroideogênese é mais ativa nesta região, ao longo de todo o período investigado. Em conjunto, estes resultados acima sugerem que as células de Leydig em ID parecem desempenhar papel chave durante o desenvolvimento testicular pós-natal em suínos. Ainda, este tipo celular provavelmente está envolvido com o desenvolvimento não-aleatório do parênquima testicular e, neste contexto, a região de transição se comportaria como zona primária de crescimento dos túbulos seminíferos. Por outro lado, os resultados obtidos com a segunda abordagem experimental mostraram que, apesar das concentrações séricas de

LH, FSH e T não terem apresentado, de maneira geral, alterações marcantes em decorrência dos dois períodos de tratamentos com o acetato de leuprolide, estes tratamentos foram efetivos. Particularmente em ID, no grupo que recebeu a droga aos 35 dias de idade, o tratamento promoveu alterações significativas em vários importantes parâmetros morfométricos investigados, tais como: percentual e volume nuclear das células de Leydig, lume tubular e túnica própria. Em conjunto, os resultados obtidos com esta abordagem confirmam aqueles encontrados na abordagem anterior, os quais mostraram que a região intermediária desempenha papel crucial no desenvolvimento testicular de suínos, principalmente a partir das células de Leydig, que funcionalmente se mostraram distintas daquelas localizadas nas outras duas regiões investigadas após o tratamento com leuprolide. Ainda, os resultados encontrados na última abordagem utilizada sugerem que as células de Leydig localizadas em ID foram mais susceptíveis ao tratamento realizado com leuprolide, no início do segundo mês de idade. Em conclusão, os resultados encontrados no presente trabalho mostraram que, à semelhança do observado em equinos, a maturação do testículo em suínos também ocorre de maneira regionalizada. Mais importante ainda, nossos resultados sugerem fortemente que as células de Leydig localizadas na região intermediária do parênquima testicular de suínos são funcionalmente distintas daquelas encontradas nas outras duas regiões investigadas, desempenhando papel central no desenvolvimento deste órgão. Neste aspecto em particular, o presente estudo é o primeiro a abordar este intrigante fenômeno biológico.

Palavras-chave: Suínos, desenvolvimento testicular pós-natal, morfometria, células de Sertoli, células de Leydig, células peritubulares mióides, GnRH, acetato de leuprolide, gonadotrofinas, esteróides sexuais.

INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1. Desenvolvimento dos testículos

A célula de Sertoli é a primeira célula somática a se diferenciar nos testículos. Origina-se provavelmente do epitélio celômico e seus precursores expressam o gene determinante do sexo masculino *Sry* no braço curto do cromossomo Y. Desta forma, a célula de Sertoli desempenha papel crucial no direcionamento da diferenciação do testículo que ocorre em torno de 11,5 dias de gestação em camundongos (Capel, 2000, Combes et al., 2009) e por volta de 26 e 56 dias em suínos (Pelliniemi, 1975) e humanos (Pelliniemi et al., 1993), respectivamente. A migração das demais células somáticas do testículo, tais como células endoteliais, fibroblastos e células de Leydig a partir da região mesonéfrica (ou provavelmente de outros locais) para a crista genital ocorre sob a influência de fatores tais como *Sox 9*, produzidos pelas células precursoras das células de Sertoli (Merchant-Larios & Moreno-Mendoza, 2001; Tilmann & Capel, 2002; Yao et al., 2002, Sekido et al., 2004; Kanai et al., 2005). Estudos recentes demonstraram que as células peritubulares mióides não fazem parte da população de células que migram do mesonefro e sim, tem origem mais provável do epitélio celômico ou mesmo do mesênquima que constitui a crista genital (Combes et al., 2009). Conforme visto para as outras poucas espécies de mamíferos já investigados neste aspecto, estudos desenvolvidos em suínos têm mostrado que a diferenciação das células de Leydig fetal é provavelmente dependente da diferenciação das células de Sertoli (Kaminski et al., 1999).

À semelhança de outros vertebrados, somente dois tipos celulares estão presentes no epitélio seminífero em suínos durante os períodos fetal e pós-natal inicial: células de Sertoli, abundantemente distribuídas, principalmente na periferia dos cordões seminíferos, e gonócitos/espermatogônias, localizadas centralmente (Van Straaten & Wensing, 1977; Godinho & Cardoso, 1979; Van Vorstenbosch et al., 1984; França et al., 2000; França et al., 2005; Ford & Wise, 2009). O desenvolvimento das células germinativas em suínos, durante o período fetal, é provavelmente independente da ação de gonadotrofinas, especificamente do FSH (Van Vorstenbosch et al., 1984; Van Vorstenbosch et al., 1987; Haeussler et al., 2007). Porém, nos mamíferos em geral, considera-se que o FSH desempenha importante papel para a iniciação da espermatogênese durante o desenvolvimento pós-natal dos testículos (Sharpe, 1994). Embora num ritmo diferente de crescimento, quando comparadas às células de Leydig e de Sertoli, as células germinativas proliferam continuamente após o nascimento (Van Straaten & Wensing, 1977; Godinho & Cardoso, 1979; Okwun et al., 1996; França et al.,

2000). Entretanto, os primeiros espermátocitos primários e as primeiras espermátides são observados somente entre dois a três meses e após os três meses de idade, respectivamente (Erickson, 1964; Godinho & Cardoso, 1979; França et al., 2000). Por esta razão, o crescimento mais acentuado de testículos pré-púberes em raças suínas de grande porte inicia-se após 10 semanas de idade e o peso testicular aumenta dramaticamente após 15 semanas (Godinho & Cardoso, 1979).

Baseado em vários parâmetros, tais como peso do testículo, diâmetro tubular, maturação da célula de Sertoli, primeira liberação de espermátides do epitélio seminífero e aumento dos níveis plasmáticos de testosterona, a puberdade, na maioria das raças de suínos, ocorre entre 4 e 5 meses de idade. Já a maturidade sexual na grande maioria das raças de suínos já investigadas é alcançada entre 7 e 8 meses de idade, época na qual se observa estabilização do diâmetro tubular, do percentual de túbulos seminíferos e de células de Leydig no parênquima testicular, e no número de células germinativas e núcleo de células de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero (Wrobel & Dierichs, 1975; Van Straaten & Wensing, 1977; Okwun et al., 1996; França et al., 2000). No entanto, baseado na avaliação da qualidade espermática e fertilidade nesta espécie, a maturidade sexual plena só é alcançada após os 10 meses de idade (Rodríguez-Martínez, 2001).

Fatores parácrinos produzidos pelas células de Leydig podem diminuir a proliferação *in vivo* das células de Sertoli em resposta ao FSH em ratos (Orth, 1993). Entretanto, durante o desenvolvimento dos testículos em suínos, a correlação significativa e positiva observada entre os níveis de FSH e testosterona com o número total de células de Sertoli, Leydig e germinativas por testículo, indica uma regulação parácrina dinâmica e bem balanceada entre os mesmos. Neste contexto, os resultados encontrados por França et al. (2000), mostrando um padrão similar de crescimento do número total de células de Sertoli e de células Leydig por testículo, do nascimento aos 4 meses de idade sugerem claramente a interação funcional entre estes dois tipos celulares, durante o desenvolvimento dos testículos em suínos.

2. Proliferação das células de Sertoli e sua regulação

As células de Sertoli em mamíferos proliferam ativamente durante o período fetal (Orth, 1984; Orth, 1993; McCoard et al., 2003a). Porém, os mecanismos regulatórios responsáveis por esta proliferação são até agora pouco conhecidos, sendo, pelo menos em camundongos, independentes de gonadotrofinas (Baker & O'Shaughnessy, 2001). No entanto, durante o período pós-natal, é fortemente sugerido na literatura para mamíferos, principalmente a partir de dados obtidos para roedores de laboratório (ratos e

camundongos) e primatas, que o FSH é o principal fator responsável pela proliferação das células de Sertoli neste período (Orth, 1984; Orth, 1993; Heckert & Griswold, 2002), mais especificamente através da ativação das ciclinas D1 e D2, durante a fase G1 do ciclo celular (Sicinski et al., 1996; Crepieux et al., 2001). Evidências na literatura mostram que os andrógenos são importantes na determinação do número de células de Sertoli na fase fetal (Scott et al., 2007) e possivelmente também no período pós-natal (Sharpe et al., 2003).

Embora o FSH controle as diferentes funções das células de Sertoli através de pelo menos cinco vias de sinalização (Walker & Cheng, 2005), os efeitos mitogênicos desta gonadotrofina nas células de Sertoli imaturas são mediados pelo aumento dos níveis intracelulares de AMPc/PKA (Dorrington et al., 1972; Orth & Boehm, 1990; Simoni et al., 1997; Dias et al., 2001; Rossi et al., 2007). Entretanto, além da PKA, outras vias também estimuladas pelo FSH podem estar envolvidas na proliferação das células de Sertoli. Neste contexto, foi demonstrado que a ativação das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAP quinases) ERK1 e ERK2 nas células de Sertoli imaturas, em resposta ao estímulo promovido pelo FSH, resultou no aumento da expressão das ciclinas D1 e D2, as quais estão diretamente relacionadas com a atividade proliferativa destas células (Crepieux et al., 2001; Walker & Cheng, 2005; Musnier et al., 2009). Contudo, pouco se sabe ainda a respeito dos eventos específicos que coordenam a proliferação da célula de Sertoli sob a estimulação do FSH. Alguns estudos experimentais sugerem que, sob a influência desta gonadotrofina, estrógenos produzidos pela aromatização de andrógenos em células de Sertoli imaturas poderiam exercer uma influência importante na divisão destas células através da indução do fator TGF β (Orth, 1984; Orth, 1993).

Ontogenicamente, o FSH e o LH são detectados na adenohipófise fetal de suínos somente a partir do 75º dia de gestação (2/3 da gestação); os mesmos aumentam continuamente, e suas concentrações nesta mesma glândula exibem um pico logo antes do nascimento (McNamara et al., 1985). Já a quantidade de receptores de FSH no testículo aumenta continuamente do nascimento até a puberdade (Vandalem et al., 1986).

A capacidade de resposta das células de Sertoli ao FSH é variável ao longo do desenvolvimento testicular pós-natal em suínos, conforme foi demonstrado por ensaios *in vitro* (Monet-Kuntz & Fontaine, 1989). Nesse contexto, vários estudos realizados nesta espécie sugerem que os níveis plasmáticos de FSH não estão rigorosamente correlacionados com a proliferação ativa das células de Sertoli que ocorre durante os períodos de gestação tardia e pós-natal inicial (Ford et al., 1997; Ford et al., 2001; Lunstra et al., 2003; McCoard et al., 2003a, b; Wagner & Claus, 2009). Também, diferente

de ratos, nenhuma correlação foi observada entre a evolução dos receptores testiculares e níveis plasmáticos de gonadotrofinas durante o desenvolvimento pós-natal dos testículos em suínos, bem como sobre o papel indutor que o FSH exerce nos receptores de LH, observação esta já documentada para ratos (Vandalem et al., 1986).

Ao contrário do FSH, o T3 é responsável pela mudança do estado funcional mitótico para o não-mitótico das células de Sertoli, que ocorre antes do estabelecimento da puberdade (Cooke et al., 1994a; França et al., 1995). O mecanismo de regulação desta mudança mediada pelo T3 está relacionado com o aumento da concentração dos inibidores das quinases dependentes de ciclinas (CDKIs) p27^{Kip1} e p21^{Cip1}, através da inibição da E3 ubiquitina ligase SKP2 (S-phase kinase protein 2), enzima responsável por regular a meia-vida destas CDKIs (Nakayama et al., 2004; Holsberger et al., 2005a; Fotovati et al., 2006; Egozi et al., 2007). Conforme foi visto em camundongos adultos *knockout* para SKP2, o tamanho do testículo e o número de células de Sertoli apresentaram redução significativa quando comparado com os animais controles (Holsberger et al., 2005b, Egozi et al., 2007). Ao contrário, em camundongos *knockout* para p27^{Kip1} e p21^{Cip1} observaram-se os testículos maiores devido ao aumento no número de células de Sertoli (Kiyokawa & Koff, 1998; Holsberger et al., 2003; Holsberger et al., 2005b). Neste contexto, fica evidente que através do controle da concentração celular de p27^{Kip1}, a proteína SKP2 é um importante regulador da proliferação da célula de Sertoli (Holsberger et al., 2005a).

Estudos desenvolvidos em nosso laboratório e outros já publicados sugerem fortemente que o T3 também está envolvido na regulação da função das células de Sertoli em suínos (Caussanel et al., 1996; Palmero et al., 1996; McCoard et al., 2003b; Silva Jr, 2000; Cooke et al., 2005). Contudo, o papel deste fator na proliferação e maturação destas importantes células somáticas do testículo não está ainda claramente estabelecido para esta mesma espécie (Tarn et al., 1998; Silva Jr, 2000; Klobucar et al., 2003; Cooke et al., 2005). Ontogenicamente, o hormônio estimulador da tireóide (TSH) é detectado pela primeira vez na adenohipófise de suínos aos 75 dias de gestação, aumentando sua concentração de maneira contínua até a 6ª semana após o nascimento (McNamara et al., 1985).

Nos roedores relativamente bem investigados (ratos e camundongos) tem sido demonstrado que a proliferação das células de Sertoli inicia-se após a diferenciação sexual, exibindo um pico logo antes do nascimento, diminuindo então de forma gradual entre a 2ª e 3ª semanas pós-natal (Kluin et al., 1984; Orth et al., 1988; Vergouwen et al., 1991; Baker & O'Shaughnessy, 2001). Porém, padrão diferente de proliferação de células de Sertoli após o nascimento é observado para não-roedores (Plant et al., 2005) e animais de grande porte, nos quais a puberdade ocorre vários meses ou anos após o

nascimento (Sharpe et al., 2003). Em geral, nestas espécies as células de Sertoli têm duas distintas e proeminentes fases mitóticas. A primeira ocorre após o nascimento, por um período de tempo variável entre as espécies, e a segunda logo antes da puberdade (Sharpe et al., 2003). A proliferação da célula de Sertoli em suínos é muito ativa no período tardio da gestação (McCoard et al., 2003a) e vários relatos na literatura sugerem que a proliferação pós-natal da célula de Sertoli nesta espécie ocorre predominantemente durante as primeiras semanas após o nascimento (Putra & Blackshaw, 1985; Swanlund et al., 1995; McCoard et al., 2001; McCoard et al., 2003a, b). Porém, estudos desenvolvidos em suínos Piau por França et al. (2000), corroborados por Klobucar et al. (2003), demonstraram que a proliferação pós-natal desta célula em suínos apresenta duas fases distintas. A primeira fase estende-se do nascimento ao primeiro mês de vida, quando o número de células de Sertoli por testículo aumenta aproximadamente seis vezes; outra notável expansão celular ocorre entre o 3º e 4º mês de idade, correlacionando a mesma com o período no qual a maturação da célula de Sertoli é observada na maioria das raças suínas investigadas (Tran et al., 1981; Kosco et al., 1989; França et al., 2000; Klobucar et al., 2003). O primeiro período de proliferação pós-natal de célula de Sertoli é também coincidente com aumento de 6 vezes em comprimento/massa dos cordões/túbulos seminíferos por testículo (França et al., 2000; McCoard et al., 2001a). Embora mostrando um padrão de declínio, os níveis plasmáticos de FSH em suínos são mais elevados no início destes dois períodos de proliferação das células de Sertoli (Colenbrander et al., 1982; Vandalem et al., 1986; França et al., 2000; Ford et al., 2001; McCoard et al., 2001a).

Durante o desenvolvimento testicular pós-natal, as células de Sertoli imaturas e as células de Leydig apresentam atividade da enzima aromatase, responsável pela síntese de estrógenos. Entretanto, após o estabelecimento da puberdade, as células de Sertoli perdem a capacidade de sintetizar este esteróide sexual, de maneira que as principais fontes de estrógenos no testículo pós-púbere e adulto são as células de Leydig e as células germinativas (Petersen & Söder, 2006; Carreau et al., 2007). Nas espécies sazonais, a expressão da aromatase é dependente do fotoperíodo (Tsubota et al., 1997; Bilinska et al.; 2001). Os principais alvos da ação dos estrógenos no trato genital masculino são os ductos eferentes, nos quais ocorre a reabsorção de fluido tubular (Oliveira et al., 2002). Além disso, os estrógenos também desempenham um importante papel na regulação da função epididimária (Carreau et al.; 2007). Recentemente foi demonstrado que o estrógeno participa na regulação da proliferação das células de Sertoli em ratos (Lucas et al., 2008). Os equinos e principalmente os suínos apresentam as maiores concentrações plasmáticas de estrógenos entre os animais domésticos já investigados (Raeside, 1969; Velle, 1976; Claus & Hoffmann, 1980; Setchell & Cox,

1986). Particularmente em suínos, os receptores de estrógenos estão amplamente distribuídos nos testículos e epidídimo (Rago et al., 2004; Mutembei et al., 2005; Pearl et al., 2007; Ramesh et al., 2007). Recentemente, vários trabalhos têm demonstrado a importância dos estrógenos durante o desenvolvimento testicular pós-natal nesta espécie (At-Taras et al., 2006a, b; Ramesh et al., 2007; At-Taras et al., 2008; Berger et al., 2008). Desta forma, em suínos nos quais a síntese endógena de estrógenos foi inibida da primeira semana de vida à maturidade, observa-se que, durante a fase pré-púbere, ocorre atraso na formação do lume tubular, bem como menor número de células de Sertoli e baixo peso testicular. Entretanto, quando estes animais atingem a maturidade, observa-se recuperação e aumento destes parâmetros, de modo que o peso testicular estava aumentado em resposta ao maior número de células de Sertoli, o que resultou em maior produção espermática diária observada nestes animais (At-Taras et al., 2006a; Berger et al., 2008).

Em todas as espécies de mamíferos investigadas até o presente momento, incluindo-se aí os suínos, a proliferação das células de Sertoli não é observada após a puberdade. Assim, é considerado que em todas estas espécies, a proliferação de células de Sertoli termina próximo do período de desenvolvimento da barreira de células de Sertoli, secreção de fluido tubular (com conseqüente formação do lume tubular), desenvolvimento do citoesqueleto de actina nas células de Sertoli e extensa proliferação de espermátócitos primários (Russell et al., 1988; Russell et al., 1989; Gondos & Berndston, 1993; França et al., 2000). Em raças de suínos de maior porte, a maioria destes eventos, os quais são considerados como bons marcadores morfológicos e funcionais da diferenciação das células de Sertoli, acontece entre 3 a 4 meses de idade (Tran et al., 1981; França et al., 2000). Provavelmente pelo fato das células de Sertoli diferenciadas estarem protegidas pela proteína anti-apoptótica *Bcl/w* (Russell et al., 2001), a apoptose de células de Sertoli não é observada no epitélio seminífero de animais sexualmente maduros (Ross et al., 2001). No entanto, merece ser ressaltado que o fato de ocorrer aumento significativo do comprimento tubular total na grande maioria de mamíferos sexualmente maduros já investigados, sem concomitante aumento no diâmetro tubular e capacidade de suporte das células de Sertoli (eficiência da célula de Sertoli), sugere fortemente que proliferação das células de Sertoli na região de transição entre os túbulos seminíferos e a *rete testis* pode ocorrer por um período mais longo, uma vez que as células de Sertoli particularmente localizadas nesta região apresentam características de células indiferenciadas ou imaturas (Miranda et al., 2002).

Pelo menos em algumas espécies de peixes teleósteos já investigados (tilápias e bagres africanos), as células de Sertoli maduras mantêm a capacidade de se dividirem (Schulz et al., 2005; Alvarenga & França, 2009). Neste aspecto, é importante ser

mencionado que, embora em condições normais as células de Sertoli de mamíferos encerrem sua atividade proliferativa antes do estabelecimento da puberdade, estudos *in vitro* mostraram que, em ratos, as células de Sertoli terminalmente diferenciadas que super-expressam as proteínas inibidoras de diferenciação (ID1 e ID2) são capazes de reingressarem ao ciclo celular e sofrerem mitoses (Chaudhary et al., 2005). Desse modo deve-se ressaltar a importância da presença de outros fatores, além do FSH, também necessários para proliferação das células de Sertoli. Além disso, em estudo mais recente foi demonstrado que as células de Sertoli adultas de camundongos e humanos são capazes de retornarem à atividade mitótica *in vitro* (Ahmed et al., 2009). Também em camundongos, o papel fundamental da conexina 43, constitutiva das *gap junctions*, como regulador da atividade proliferativa das células de Sertoli foi demonstrado. As células de Sertoli de camundongos *knockout* para esta proteína conservam sua capacidade de divisão mesmo durante a vida adulta destes animais, que são, contudo inférteis (Sridharan et al., 2007). Em *djungarian hamsters* adultos inibidos pelo fotoperíodo e submetidos a estimulação hormonal apropriada, observa-se que as células de Sertoli são capazes de retomar a atividade mitótica (Meachem et al., 2005; Tarulli et al., 2006). Embora estes resultados sejam controversos, variações sazonais no número de células de Sertoli em garranhões também são citadas na literatura (Johnson & Thompson, 1983).

Conforme já mencionado, devido ao fato de cada célula de Sertoli individualmente ser capaz de suportar um número finito de células germinativas, de maneira espécie-específica (Russell & Peterson, 1984; Orth et al., 1988; França & Russell, 1998), o número total de células de Sertoli por testículo estabelecido durante o desenvolvimento testicular determina a magnitude do tamanho deste órgão e da produção espermática (Orth et al., 1988; Berndtson & Thompson, 1990; Cooke et al., 1992; Hess et al., 1993; Sharpe, 1994; França & Russell, 1998). Em decorrência deste aspecto, todas as condições nas quais a atividade proliferativa da célula de Sertoli é afetada determinam, em última análise, o número total de espermatozoides produzidos por testículo. Dentre estas condições podem ser citadas, principalmente a partir de resultados obtidos para roedores, mudanças nos níveis plasmáticos de FSH e seus receptores (Orth et al., 1988; Sharpe, 1994; Abel et al., 2000; Sairam & Krishnamurthy, 2001), deficiência do receptor IIA da ativina (Kumar et al., 2001), hipotireoidismo neonatal transitório (Cooke et al., 1994a, b) e hemicastração (Ford et al., 2001). Merece ser ainda ressaltado que, apesar dos animais serem férteis, o tamanho dos testículos é menor em camundongos *knockout* para o FSH e seu receptor, devido à redução no número das células de Sertoli (Kumar et al., 1997; Kumar et al., 2001; Sairam & Krishnamurthy, 2001; Kumar, 2005). Vários outros fatores, principalmente determinados a partir de estudos *in vitro* para roedores, parecem estar envolvidos na regulação da proliferação e diferenciação das células de Sertoli.

Dentre estes fatores podem ser mencionados o ácido retinóico, testosterona, estrógenos, ativina, folistatina, inibina, interleucina-1 α (IL-1 α), fator de crescimento tumoral α e β (TGF α e β), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento semelhante à insulina I e II (IGF-I e II), fator de célula tronco (SCF) e β -endorfina (Orth, 1986; Orth & Boehm, 1990; Nakai et al., 2001; Petersen et al., 2001; Khan et al., 2002; Petersen et al., 2002; Buzzard et al., 2003a, b). No entanto, as vias de atuação destes fatores e os mecanismos fisiológicos relacionados com os mesmos não são ainda bem estabelecidos (Kumar et al., 2001; Sairam & Krishnamurthy, 2001).

Neste contexto em particular, merece ser mencionado que a produção de suínos é muito importante no Brasil, estando a mesma em franco crescimento (Silveira & Talamini, 2007). Porém, a lucratividade depende de vários fatores, derivados tanto das fêmeas quanto dos machos. Num esforço para se aumentar a eficiência da produção de suínos, o uso da inseminação artificial (IA) tem mostrado crescimento excepcional e, nas granjas comerciais nos grandes países produtores de suínos, incluindo-se o Brasil, grande parte dos cruzamentos são feitos utilizando-se esta técnica (Scheid & Silveira, 2002; Silveira & Talamini, 2007). Esta eficiência resulta de aumento no número de fêmeas que podem ser inseminadas com um único macho com alta fertilidade. Neste contexto, o número de espermatozoides por ejaculado é um fator determinante para alcançar esta eficiência.

3. Células de Leydig e peritubulares mióides

As células de Leydig são geralmente encontradas próximas aos vasos sangüíneos ou do tecido conjuntivo da cápsula testicular (túnica albugínea) e sua ultra-estrutura evidencia sua atividade esteroideogênica pela presença de retículo endoplasmático liso bem desenvolvido e mitocôndrias com cristas tubulares (Russell et al., 1996). Desta forma, estas células são bastante conhecidas por sua marcante produção de esteróides, os quais são sintetizados a partir de uma molécula base, o colesterol (Bardin, 1996). Esta produção ocorre através de estímulos do LH (hormônio luteinizante) em receptores localizados na membrana citoplasmática destas células. À semelhança do FSH, o LH é uma glicoproteína sintetizada e secretada na adenohipófise sob a influência do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) proveniente do hipotálamo. O controle de retroalimentação negativa do LH é exercido tanto pela testosterona quanto pelo estrógeno concomitantemente na adenohipófise e hipotálamo (Shupnik & Schreihofner, 1997; Rochira et al., 2006). Nos testículos, existem receptores para andrógenos nas células de Sertoli, peritubulares mióides, musculares lisas dos vasos e na própria célula de Leydig (Schlatt et al., 1997; Suárez-Quian et al., 1998; De Gent et al., 2004). Dentre os andrógenos sintetizados pelas células de Leydig incluem-se a testosterona e a diidrotestosterona, os quais são responsáveis pela diferenciação do trato genital

masculino e da genitália externa na fase fetal (Pelliniemi et al., 1996; Wu et al., 2007) e pelo aparecimento dos caracteres sexuais secundários e a manutenção quantitativa da espermatogênese a partir da puberdade (Sharpe, 1994; Zirkin et al., 1994; De Gendt et al., 2004; Wu et al., 2007). Particularmente, a diidrotestosterona é também responsável pela manutenção funcional das glândulas sexuais acessórias e do epidídimo (Fan & Robaire, 1998; Goyal et al., 1999).

Nos mamíferos em geral, existem dois tipos de células de Leydig: as células de Leydig fetais, que são produtoras de andrógenos e do fator semelhante a insulina-3 (INSL3), responsáveis pela masculinização fetal e descenso testicular, e as células de Leydig do tipo adulto produtoras principalmente de testosterona (Kerr & Knell, 1988; Huhtaniemi & Pelliniemi, 1992; Haider, 2004; Barsoum & Yao, 2006; Wu et al., 2007). No homem e outros primatas, um terceiro tipo de células de Leydig, denominadas do tipo infantil, são também encontradas (Griswold & Behringer, 2009). O início da diferenciação das células de Leydig fetais, que podem se originar de células somáticas que expressam o fator esteroideogênico 1 (*Sf1*) (Barsoum & Yao, 2009), e da produção de andrógenos, não estão sob o controle das gonadotrofinas (Van Vorstenbosch et al., 1982; Lejeune et al., 1998; Majdic et al., 1998; O'Shaughnessy et al., 1998; Wu et al., 2007). Enquanto a proliferação e a diferenciação destas células são reguladas por diversos hormônios, tais como os esteróides sexuais (estrógenos e andrógenos) e o hormônio tireoidiano, e por fatores de transcrição como GATA (Wu et al., 2007). O desenvolvimento pós-natal das células de Leydig envolve a proliferação celular, diferenciação morfológica e aquisição da capacidade de produção de testosterona (Wu et al., 2007). À semelhança das células de Leydig fetais, a proliferação e diferenciação das células de Leydig do tipo adulto e suas progenitoras são também reguladas por diversos hormônios e fatores, dentre os quais podem ser mencionados o LH, IGF-I, TGF α e β , FSH, gonadotrofina coriônica humana, hormônio anti-mulleriano, estrógenos, hormônio tireoidiano e andrógenos (Ge et al. 1996; Rouiller-Fabre et al. 1998; Mendis-Handagama & Ariyaratne, 2001; Wu et al., 2007).

As células mesenquimais são consideradas as principais precursoras das células de Leydig do tipo adulto (Russell et al., 1995; Ge et al., 1996; Lejeune et al., 1998). Outros tipos celulares do testículo tais como as células peritubulares mióides, células endoteliais dos vasos linfáticos e células perivasculares (pericitos) também podem dar origem às células de Leydig (De Kretser et al., 1994; Gaytan et al., 1994; Russell et al., 1995; Dombrowicz et al., 1996). Apesar de pouco documentado, mitoses de células de Leydig em animais adultos também ocorrem (Russell et al., 1995).

Em contraste com a maioria das espécies de mamíferos investigadas, as quais exibem um padrão bifásico (fetal e pós-natal) de desenvolvimento das células de Leydig (Gondos et al., 1976), em suínos estas células esteroideogênicas apresentam três fases

de desenvolvimento. Duas fases transitórias, uma durante a fase inicial (de 30 a 35 dias) do período fetal (Van Straaten & Wensing, 1978) e a outra durante o período perinatal (Dierichs et al., 1973; Van Straaten & Wensing, 1978; França et al., 2000). A última fase ocorre a partir do período pré-puberal, extendendo-se para a idade adulta (Dierichs et al., 1973; Van Straaten & Wensing, 1978; França et al., 2000). Ainda em suínos, já é bem estabelecido que o volume das células de Leydig e o número de receptores de LH e de andrógenos por célula de Leydig alteram-se substancialmente durante as diferentes fases do desenvolvimento testicular (Dierichs et al., 1973; Van Straaten & Wensing, 1978; Lunstra et al., 1986; França et al., 2000; Tripepi et al., 2000).

Além da produção dos esteróides sexuais, várias outras substâncias são também produzidas pelas células de Leydig do tipo adulto. Estas substâncias participam no controle autócrino e parácrino das funções das células de Leydig e de Sertoli. Por exemplo, através de peptídeos derivados da pro-opiomelanocorticotrofina (POMC), tais como β -endorfina, hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e hormônio melanotrófico (MSH), as células de Leydig podem influenciar a função das células de Sertoli tanto em animais imaturos quanto em animais adultos (Bardin et al., 1987). Evidências relatadas na literatura (Orth & Boehm, 1990; Orth, 1993; Sharpe, 1994) sugerem que as células de Leydig têm influência direta na determinação do número definitivo de células de Sertoli via β -endorfina. Da mesma forma, as células de Sertoli parecem regular de forma parácrina a determinação da população das células de Leydig e a capacidade esteroideogênica das mesmas, através da secreção de fatores de crescimento estimulados pelo FSH e andrógenos, dentre outros (Tabone et al., 1984; Waites et al., 1985; De Gendt et al., 2005).

As células peritubulares mióides constituem o principal componente da parede dos túbulos seminíferos e provavelmente participam de maneira bastante ativa da regulação parácrina da função testicular. Essas células, juntamente com as células de Sertoli, são responsáveis pela formação da lâmina basal (Dym, 1994; Skinner, 2005). As células peritubulares mióides apresentam citoplasma delgado e núcleo central. Ao microscópio eletrônico, o citoplasma dessas células possui grande número de filamentos paralelos ao seu grande eixo e o núcleo é fusiforme, com cromatina em massas eletrondensas distribuídas por toda sua extensão (Dym, 1994). As células peritubulares mióides secretam várias substâncias componentes da matriz extracelular (laminina, fibronectina, colágenos dos tipos I e IV e proteoglicanas) e fatores de crescimento como PmodS, IGF-I, activina-A e TGF- β que regulam a função parácrina das células de Sertoli (Richardson et al., 1995; Skinner, 2005). As células peritubulares mióides, como células contráteis, expressam marcadores de citoesqueleto (α -isoactina, F-actina e miosina) cujos filamentos são arranjados longitudinal e circularmente ao maior eixo do túbulo seminífero.

A atividade desses filamentos é responsável pela contração dos túbulos seminíferos que resulta em movimentação de fluidos e propulsão dos espermatozoides (Skinner, 2005). Recentemente, foi demonstrado que os camundongos cujas células peritubulares mióides não possuem receptores de andrógenos (PTM-ARKO; Welsh et al., 2009) são inférteis.

Merece ser salientado que, para que o processo espermatogênico transcorra de maneira normal e eficiente, é necessária a interação das células germinativas com os componentes somáticos do testículo, principalmente células de Sertoli, células de Leydig e células mióides (Russell et al., 1994; Griswold, 1995; Schlatt et al., 1997; França & Russell, 1998; Skinner, 2005; Hess & França, 2007). A integridade funcional da membrana basal elaborada pelas células de Sertoli e células peritubulares mióides é também essencial para o processo espermatogênico (Dym, 1994; Skinner, 2005).

JUSTIFICATIVA

JUSTIFICATIVA

A compreensão detalhada da regulação do desenvolvimento testicular pós-natal é fundamental para se utilizar abordagens experimentais com o objetivo de se obter aumento do número total de espermatozoides por ejaculado. Ao longo das últimas décadas, diversos trabalhos com a finalidade de se investigar o desenvolvimento testicular em suínos têm sido realizados (Van Straaten & Wensing, 1977, Van Straaten & Wensing, 1978; Lunstra et al., 1986; Vandalem et al., 1986; França et al., 2000; McCoard et al., 2001; McCoard et al., 2003a, b; At-Taras et al., 2006a; Berger et al., 2008). Em última análise, os períodos críticos relacionados com o crescimento testicular resultam da atividade mitótica das células somáticas e germinativas, que podem ser reguladas tanto por fatores extrínsecos e intrínsecos (França et al., 2005). No entanto, apesar de terem sido relativamente bem estudados em suínos, estes importantes aspectos referentes à morfofisiologia do testículo permanecem ainda pouco conclusivos (França et al., 2000; Silva Jr., 2000; Cooke et al., 2005; At-Taras et al., 2006a).

Diferentemente de outras espécies de mamíferos, a maturação testicular em equinos se inicia na região central deste órgão (Bouin & Ancel, 1905; Nishikawa & Horie, 1955; Johnson, 1991; Clemmons et al., 1995). Estudos recentemente realizados no Laboratório de Biologia Celular do ICB/UFMG indicaram que em suínos a maturação dos túbulos seminíferos parece não ocorrer de forma aleatória. Desta forma, dando continuidade a estes estudos, o presente trabalho pretende investigar de forma mais detalhada este intrigante aspecto do desenvolvimento testicular, utilizando-se para tal finalidade análises biométricas, histomorfométricas e inibição do eixo hipotálamo-hipófise-gônada de suínos Landrace x Large White, através de drogas específicas (agonista/antagonista de GnRH).

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo principal investigar a histofisiologia de três diferentes regiões do testículo (região próxima a túnica albugínea; região de transição entre os túbulos seminíferos e o mediastino testicular/*rete testis*; e região intermediária entre a túnica albugínea e o mediastino) de suínos Landrace x Large White, durante o desenvolvimento pós-natal. Foram também avaliados os efeitos da inibição do eixo hipotálamo-hipófise-gônada, através do acetato de leuprolide, nos níveis séricos das gonadotrofinas e dos esteróides sexuais e na estrutura e função testicular de suínos sexualmente maduros.

1. Objetivos específicos:

1.1. Capítulo 1

Nesta etapa do trabalho, foi realizada a investigação morfofuncional detalhada de três diferentes regiões do parênquima testicular de suínos Landrace x Large White, no período entre 7 e 180 dias de idade, com ênfase nos seguintes objetivos:

- a) investigar o desenvolvimento ponderal e a morfometria testicular, incluindo-se o diâmetro dos cordões e túbulos seminíferos e a proporção volumétrica (%) dos compartimentos tubular e intertubular que compõem o parênquima testicular;
- b) avaliar o grau de maturação testicular, através da presença da célula germinativa mais avançada, nas diferentes regiões do testículo de suínos pré-púberes;
- c) caracterizar morfológicamente e estimar o volume do núcleo das células de Sertoli;
- d) investigar os volumes nuclear, citoplasmático e individual das células de Leydig;
- e) obter índices de proliferação das células somáticas (Sertoli, Leydig e peritubular mióide).

1.2. Capítulo 2

Nesta segunda etapa do presente estudo foram avaliados os efeitos da inibição do eixo hipotálamo-hipófise-gônada, através do acetato de leuprolide, nos níveis séricos de FSH, LH, testosterona e 17β -estradiol (durante o desenvolvimento pós-natal) e na estrutura e função testiculares de suínos Landrace x Large White sexualmente maduros, tratados aos 35 e 70 dias de idade, enfatizando-se os seguintes objetivos:

- a) investigar o desenvolvimento corporal dos suínos dos três grupos experimentais

- (controle e tratados aos 35 e 70 dias de idade), durante o período experimental;
- b) avaliar as concentrações séricas de FSH, LH, testosterona e 17β -estradiol durante as seis primeiras semanas após o tratamento e ao final do período experimental;
 - c) avaliar a biometria e morfometria testiculares, incluindo-se o diâmetro dos túbulos seminíferos e a proporção volumétrica (%) dos compartimentos tubular e intertubular que compõem o parênquima de três diferentes regiões do testículo;
 - d) investigar os volumes nuclear, citoplasmático e individual das células de Leydig.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL MH, WOOTTON AN, WILKINS V, HUHTANIEMI I, KNIGHT PG, CHARLTON HM. The effect of a null mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene on mouse reproduction. *Endocrinology*. 2000;141:1795-1803.

AHMED EA, BARTEN-VAN RIJBROEK AD, KAL HB, SADRI-ARDEKANI H, MIZRAK SC, VAN PELT AM, DE ROOIJ DG. Proliferative activity in vitro and DNA repair indicate that adult mouse and human Sertoli cells are not terminally differentiated, quiescent cells. *Biol Reprod*. 2009;80:1084-91.

ALVARENGA ER, FRANÇA LR. Effects of Different Temperatures on Testis Structure and Function, with Emphasis on Somatic Cells, in Sexually Mature Nile Tilapias (*Oreochromis niloticus*). *Biol Reprod*. 2009;80:537-44.

AT-TARAS EE, BERGER T, MCCARTHY MJ, CONLEY AJ, NITTA-ODA BJ, ROSER JF. Reducing estrogen synthesis in developing boars increases testis size and total sperm production. *J Androl*. 2006a;27:552-9.

AT-TARAS EE, CONLEY AJ, BERGER T, ROSER JF. Reducing estrogen synthesis does not affect gonadotropin secretion in the developing boar. *Biol Reprod*. 2006b;74:58-66.

AT-TARAS EE, KIM IC, BERGER T, CONLEY A, ROSER JF. Reducing endogenous estrogen during development alters hormone production by porcine Leydig cells and seminiferous tubules. *Domest Anim Endocrinol*. 2008;34:100-8.

BAKER PJ, O'SHAUGHNESSY PJ. Role of gonadotrophins in regulating numbers of Leydig and Sertoli cells during fetal and postnatal development in mice. *Reproduction*. 2001;122:227-34.

BARDIN CW, CHEN CC, MORRIS PL, GERENDAI I, BOITANI C, LIOTTA AS, MARGORIS A, KRIEGER DT. Proopiomelanocortin-derived peptides in testis, ovary, and tissues of reproduction. *Recent Prog Horm Res*. 1987;43:1-28.

BARDIN CW. Androgens: early attempts to evaluate Leydig cell function in man. In: PAYNE AH, HARDY MP, RUSSELL LD (Eds). *The Leydig cell*. Ed. Viena: Cache River Press, 1996. Cap. 2, p.31-42.

BARSOUM I, YAO HH. The road to maleness: from testis to Wolffian duct. *Trends Endocrinol Metab*. 2006;17:223-28.

BARSOUM IB, YAO HH. Fetal Leydig Cells: Progenitor Cell Maintenance and Differentiation. *J Androl*. 2009.

BERGER T, MCCARTHY M, PEARL CA, AT-TARAS E, ROSER JF, CONLEY A. Reducing endogenous estrogens during the neonatal and juvenile periods affects reproductive tract development and sperm production in postpuberal boars. *Anim Reprod Sci*. 2008;109:218-35

BERNDTSON W, THOMPSON T. Changing relationships between testis size, Sertoli cell number and spermatogenesis in Sprague-Dawley rats. *J Androl*. 1990;11:429-35.

BILIŃSKA B, SCHMALZ-FRACZEK B, KOTULA M, CARREAU S. Photoperiod-dependent capability of androgen aromatization and the role of estrogens in the bank vole testis visualized by means of immunohistochemistry. *Mol Cell Endocrinol*. 2001;178:189-98.

BOUIN P, ANCEL P. La glande interstitielle du testicule chez le cheval. *Arch Zool. Exp Gen*. 1905;3:391-437.

BUZZARD JJ, FARNWORTH PG, DE KRETZER DM, O'CONNOR AE, WREFORD NG, MORRISON JR. Proliferative phase sertoli cells display a developmentally regulated response to activin in vitro. *Endocrinology*. 2003a;144:474-83.

BUZZARD JJ, WREFORD NG, MORRISON JR. Thyroid hormone, retinoic acid, and testosterone suppress proliferation and induce markers of differentiation in cultured rat Sertoli cells. *Endocrinology* 2003b;144:3722-31.

CAPEL B. The battle of the sexes. *Mech Dev*. 2000;92:89-103.

CARREAU S, SILANDRE D, BOIS C, BOURAIMA H, GALERAUD-DENIS I, DELALANDE C. Estrogens: a new player in spermatogenesis. *Folia Histochem Cytobiol*. 2007;45:5-10.

CAUSSANEL V, TABONE E, MAUDUIT C, DACHEUX F, BENAHMED M. Cellular distribution of EGF, TGF α and their receptor during postnatal development and spermatogenesis of the boar testis. *Mol Cell Endocrinol*. 1996;123:61-69.

CHAUDHARY J, SADLER-RIGGLEMAN I, AGUE JM, SKINNER MK. The helix-loop-helix inhibitor of differentiation (ID) proteins induce post-mitotic terminally differentiated Sertoli cells to re-enter the cell cycle and proliferate. *Biol Reprod*. 2005;72:1205-17.

CLAUS R, HOFFMANN B. Oestrogens, compared to other steroids of testicular origin, in blood plasma of boars. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1980;94:404-11.

CLEMMONS AJ, THOMPSON DL JR, JOHNSON L. Local initiation of spermatogenesis in the horse. *Biol Reprod.* 1995;52:1258-67.

COLENBRANDER B, VAN DE WIEL DF, VAN ROSSUM-KOK CM, WENSING CJ. Changes in serum FSH concentrations in the pig during development. *Biol Reprod.* 1982;26:105-09.

COMBES AN, WILHELM D, DAVIDSON T, DEJANA E, HARLEY V, SINCLAIR A, KOOPMAN P. Endothelial cell migration directs testis cord formation. *Dev Biol.* 2009;326:112-20.

COOKE PS, PORCELLI J, HESS RA. Induction of increased testis growth and sperm production in adult rats by neonatal administration of the goitrogen propylthiouracil (PTU): the critical period. *Biol Reprod.* 1992;46:146-54.

COOKE PS, HESS RA, KIRBY JD, BUNICK D, HARDY MP. Neonatal propylthiouracil (PTU) treatment as a model system for studying factors controlling testis growth and sperm production. In: BARTKE A (Ed). *Function of Somatic Cells in the Testis.* New York: Springer-Verlag. 1994a, 400-407.

COOKE PS, ZHAO YD, BUNICK D. Triiodothyronine inhibits proliferation and stimulates differentiation of cultured neonatal Sertoli cells: possible mechanism for increased adult testis weight and sperm production induced by neonatal goitrogen treatment. *Biol Reprod.* 1994b;51:1000-05.

COOKE P, HOLSEBERGER DR, FRANÇA LR. Thyroid hormone regulation of Sertoli cell development. In: SKINNER MK, GRISWOLD MD (Eds). *Sertoli cell Biology.* Elsevier Academic Press, 2005, p. 217-226.

CREPIEUX P, MARION S, MARTINAT N, FAFEUR V, VERN YL, KERBOEUF D, GUILLOU F, REITER E. The ERK-dependent signalling is stage-specifically modulated by FSH, during primary Sertoli cell maturation. *Oncogene.* 2001;20:4696-709.

DE GENDT K, SWINNEN JV, SAUNDERS PT, SCHOONJANS L, DEWERCHIN M, DEVOS A, TAN K, ATANASSOVA N, CLAESSENS F, LÉCUREUIL C, HEYNS W, CARMELIET P, GUILLOU F, SHARPE RM, VERHOEVEN G. A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:1327-32.

DE GENDT K, ATANASSOVA N, TAN KA, DE FRANÇA LR, PARREIRA GG, MCKINNELL C, SHARPE RM, SAUNDERS PT, MASON JI, HARTUNG S, IVELL R, DENOLET E,

VERHOEVEN G. Development and function of the adult generation of Leydig cells in mice with Sertoli cell-selective or total ablation of the androgen receptor. *Endocrinology*. 2005;146:4117-26

DE KRETZER M, KERR JB. The cytology of the testis. In: Eds. KNOBIL E, NEILL JD (Eds). *The physiology of reproduction*. Raven Press, 1994, p.1177-1290.

DIAS JA. Is there any physiological role for gonadotrophin oligosaccharide heterogeneity in humans? *Hum Reprod*. 2001;16:824-30.

DIERICHS R, WROBEL KH, SCHILLING E. Licht-, und Elektronenmikroskopische Untersuchungen an den Leydigzellen des Schweines während der postnatalen Entwicklung. *Z. Zellforsch. Mikrosk Anat*. 1973;143:207-27.

DOMBROWICZ, D., SENTE, B., REITER, E., CLOSSET, J., HENNEN, G. Pituitary control of proliferation and differentiation of Leydig cells and their putative precursors in immature hypophysectomized rat testis. *J Androl*. 1996;17:639-50.

DORRINGTON JH, VERNON RG, FRITZ IB. The effect of gonadotrophins on the 3',5'-AMP levels of seminiferous tubules. *Biochem Biophys Res Commun*. 1972;46:1523-28.

DYM M. Basement membrane regulation of Sertoli cells. *Endocr Rev*. 1994;15:102-15.

EGOZI D, SHAPIRA M, PAOR GG, BEN-IZHAK O, SKORECKI K, HERSHKO DD. Regulation of the cell cycle inhibitor p27 and its ubiquitin ligase Skp2 in differentiation of human embryonic stem cells. *FASEB J*. 2007;21:2807-17.

ERICKSON BH. Effects of Neonatal Gamma Irradiation on Hormone Production and Spermatogenesis in Testis of the Adult Pig. *J Reprod Fertil*. 1964;53:91-100.

FAN, X., ROBAIRE, B. Orchidectomy induces a wave of apoptotic cell death in the epididymis. *Endocrinology*. 1998;139:2128-36.

FORD JJ, WISE TH, LUNSTRA DD. Negative relationship between blood concentrations of follicle-stimulating hormone and testicular size in mature boars. *J Anim Sci*. 1997;75:790-95.

FORD JJ, WISE TH, LUNSTRA DD, ROHRER GA. Interrelationships of porcine X and Y chromosomes with pituitary gonadotropins and testicular size. *Biol Reprod*. 2001;65: 906-12.

FORD JJ, WISE TH. Sertoli cell differentiation in pubertal boars. *J Anim Sci*. 2009;87:2536-43.

FOTOVATI A, NAKAYAMA K, NAKAYAMA KI. Impaired germ cell development due to compromised cell cycle progression in Skp2-deficient mice. *Cell division*. 2006;4:1-10.

FRANÇA LR, HESS RA, COOKE PS, RUSSELL LD. Neonatal hypothyroidism causes delayed Sertoli cell maturation in rats treated with propylthiouracil: evidence that the Sertoli cell controls testis growth. *Anat Rec*. 1995;242:57-69.

FRANÇA LR, RUSSELL LD. The testis of domestic mammals. In: MARTÍNEZ-GARCÍA F, REGADERA J (Eds). *Male reproduction; a multidisciplinary overview*. Madrid: Churchill Communications Europe España; 1998, p.198-219.

FRANÇA LR, SILVA VA, JR., CHIARINI-GARCIA H, GARCIA SK, DEBELJUK L. Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. *Biol Reprod*. 2000;63:1629-1636.

FRANÇA LR, AVELAR GF, ALMEIDA FFL. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*. 2005;63: 300-18.

GAYTAN F, BELLIDO C, AGUILAR E, VAN ROOIJEN N. Requirement for testicular macrophages in Leydig cell proliferation and differentiation during prepuberal development in rats. *J Reprod Fertil*. 1994;102:393-99.

GE RS, SHAN LX, HARDY MP. Pubertal development of Leydig cells. In: PAYNE AH, HARDY MP, RUSSELL LD (Eds). *The Leydig cell*. Cache River Press, 1996, p.159-174.

GODINHO HP, CARDOSO FM. Testis development in Yorkshire pigs. II. Establishment and evolution of spermatogenesis. *Arq Esc Vet UFMG*. 1979;31:351-61.

GONDOS B, BERNDSTON WE. Postnatal and pubertal development. In: RUSSELL LD, GRISWOLD MD (Eds). *The Sertoli Cell*. Clearwater: Cache River Press; 1993, p.115-54.

GONDOS B, RENSTON RH, GOLDSTEIN DA. Postnatal differentiation of Leydig cells in the rabbit testis. *Am J Anat*. 1976;145:167-82.

GOYAL, H.O., WILLIAMS, C.S., KHALIL M.K., VIG, M.M., MALONEY, M.A. Postnatal differentiation of ductus deferents, tail of the epididymis, and distal body of epididymis in goats occurs independently of rete testis fluid. *Anat Rec*. 1999;254:508-20.

GRISWOLD MD. Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. *Biol Reprod*. 1995;52:211-16.

GRISWOLD SL, BEHRINGER RR. Fetal Leydig cell origin and development. *Sex Dev.* 2009;3:1-15

HAEUSSLER S, WAGNER A, WELTER H, CLAUS R. Changes of testicular aromatase expression during fetal development in male pigs (*Sus scrofa*). *Reproduction.* 2007;133:323-30.

HAIDER SG. Cell biology of Leydig cells in the testis. *Int Rev Cytol.* 2004;233:181-241.

HECKERT LL, GRISWOLD MD. The expression of the follicle-stimulating hormone receptor in spermatogenesis. *Recent Prog Horm Res.* 2002;57:129-48.

HESS RA, COOKE PS, BUNICK D, KIRBY JD. Adult testicular enlargement induced by neonatal hypothyroidism is accompanied by increased Sertoli and germ cell numbers. *Endocrinology.* 1993;132:2607-13.

HESS RA, FRANÇA LR. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: CHENG CY (Ed). *Molecular mechanisms in spermatogenesis.* Landes Bioscience, 2007, p.1-15.

HOLSBERGER DR, JIRAWATNOTAI S, KIYOKAWA H, COOKE PS. Thyroid hormone regulates the cell cycle inhibitor p27Kip1 in postnatal murine Sertoli cells. *Endocrinology.* 2003;144:3732-38.

HOLSBERGER D, et al. The cell cycle protein Skp2 is a critical regulator of adult Sertoli cell number and testis size. In: XXVIII North American Testis Workshop "Testicular Cell Dynamics and Endocrine Signalling", Seattle. Program and Abstract book 2005a, p.127.

HOLSBERGER DR, FRANÇA LR, LEAL MC, HESS RA, COOKE P, BUCHOLD GM, KIESEWETTER SE, OBRIEN DA, KIYOKAWA H. Cell cycle inhibitors p27kip1 e p21cip1 regulate murine Sertoli cell proliferation. *Biol Reprod.* 2005b;72:1429-36.

HUHTANIEMI I, PELLINIEMI LJ. Fetal Leydig cells: cellular origin, morphology, life span, and special functional features. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1992;201:125-40

JOHNSON L, THOMPSON DL JR. Age-related and seasonal variation in the Sertoli cell population, daily sperm production and serum concentrations of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone in stallions. *Biol Reprod.* 1983;29:777-89.

JOHNSON L. Spermatogenesis. In: CUPPS PT (Ed). *Reproduction in Domestic Animals.* Academic Press, 1991, p.173-219.

KAMINSKI MA, CORBIN CJ, CONLEY AJ. Development and differentiation of the interstitial and tubular compartments of fetal porcine testes. *Biol Reprod.* 1999;60:119-27.

KANAI Y, HIRAMATSU R, MATOBA S, KIDOKORO T. From SRY to SOX9: Mammalian Testis Differentiation. *J Biochem.* 2005;138:13–19.

KERR JB, KNELL CM. The fate of fetal Leydig cells during the development of the fetal and postnatal rat testis. *Development.* 1988;103:535-44.

KHAN SA, NDJOUNTCHE L, PRATCHARD L, SPICER LJ, DAVIS JS. Follicle-stimulating hormone amplifies insulin-like growth factor I-mediated activation of AKT/protein kinase B signaling in immature rat Sertoli cells. *Endocrinology.* 2002;143: 2259-67.

KIYOKAWA H, KOFF A. Roles of cyclin-dependent kinase inhibitors: lessons from knockout mice. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1998;227:105-20.

KLOBUCAR I, KOSEC M, CEBULJ-KADUNC N, MAJDIC G. Postnatal hypothyroidism does not affect prepubertal testis development in boars. *Reprod Domest Anim.* 2003;38:193-98.

KLUIN PM, KRAMER MF, DE ROOIJ DG. Proliferation of spermatogonia and Sertoli cells in maturing mice. *Anat Embryol (Berl).* 1984;169:73-78.

KOSCO MS, LOSETH KJ, CRABO BG. Development of the testicular interstitium after neonatal hemicastration in the boar. *J Reprod Fertil.* 1989;87:13-21.

KUMAR TR, WANG Y, LU N, MATZUK MM. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat Genet.* 1997;15:201-04.

KUMAR TR, VARANI S, WREFORD NG, TELFER NM, DE KRETZER DM, MATZUK MM. Male reproductive phenotypes in double mutant mice lacking both FSH β and activin receptor IIA. *Endocrinology.* 2001;142:3512-18.

KUMAR TR. What have we learned about gonadotropin function from gonadotropin subunit and receptor knockout mice? *Reproduction.* 2005;130:293-302.

LEAL MC, FRANÇA LR. Slow increase of Sertoli cell efficiency and daily sperm production causes delayed establishment of full sexual maturity in the rodent *Chinchilla lanigera*. *Theriogenology.* 2009;71:509-18.

LEJEUNE, H., HABERT, R., SAEZ, J.M. Origin, proliferation and differentiation of Leydig cells. *J Mol Endocrinol.* 1998;20:1-25.

LUCAS TFG, SIU ER, ESTEVES CA, MONTEIRO HP, OLIVEIRA CA, PORTO CS, LAZZARI MFM. 17Beta-estradiol induces the translocation of the estrogen receptors ESR1 and ESR2 to the cell membrane, MAPK3/1 phosphorylation and proliferation of cultured immature rat Sertoli cells. *Biol Reprod.* 2008;78:101-14.

LUNSTRA DD, FORD JJ, CHRISTENSON RK, ALLRICH RD. Changes in Leydig cell ultrastructure and function during pubertal development in the boar. *Biol Reprod.* 1986;34:145-58.

LUNSTRA DD, WISE TH, FORD JJ. Sertoli cells in the boar testis: changes during development and compensatory hypertrophy after hemicastration at different ages. *Biol Reprod.* 2003;68:140-50.

MAJDIC G, SAUNDERS PTK, TEERDS KJ. Immunoexpression of the steroidogenic enzymes 3-Beta Hydroxysteroid dehydrogenase and 17 α -hydroxylase, C17,20 lyase and the receptor for luteinizing hormone (LH) in fetal rat testis suggests that the onset of Leydig cell steroid production is independent of LH action. *Biol Reprod.* 1998;58:520-25.

MCCOARD SA, LUNSTRA DD, WISE TH, FORD JJ. 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.* 2001;64:689-95.

MCCOARD SA, WISE TH, LUNSTRA DD, FORD JJ. Stereological evaluation of Sertoli cell ontogeny during fetal and neonatal life in two diverse breeds of swine. *J Endocrinol.* 2003a;178:395-403.

MCCOARD SA, WISE TH, FORD JJ. Endocrine and molecular influences on testicular development in Meishan and White Composite boars. *J Endocrinol.* 2003b;178:405-16.

MCNAMARA M, VAN DALEM JL, HENNEN G, COLENBRANDER B, MACDONALD AA, VAN DE WIEL D, MEIJER J. The ontogeny of hypothalamic pituitary function in the pig. I. Pituitary LH and FSH in the fetus and neonate. *Mol Cell Endocrinol.* 1985;39:119-24.

MEACHEM SJ, STANTON PG, SCHLATT S. Follicle-stimulating hormone regulation both Sertoli cell and spermatogonial populations in the adult photoinhibited djungarian hamster testis. *Biol Reprod.* 2005;72:1187-93.

MENDIS-HANDAGAMA SM, ARIYARATNE HB. Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biol Reprod.* 2001;65:660-71.

MERCHANT-LARIOS H, MORENO-MENDOZA N. Onset of sex differentiation: dialog between genes and cells. *Arch Med Res.* 2001;32:553-58.

MIRANDA JR, ROCHA DCM, HESS RA, CASSALI GD, FRANÇA LR. Sertoli cell proliferation in the transition between seminiferous tubules and the rete testis. In: 12th European Workshop on Molecular and Cellular Endocrinology of the Testis, 2002, Doorweth, The Netherlands, p. 13.

MONET-KUNTZ C, FONTAINE I. Age-dependent changes in the in-vitro response of a pig Sertoli cell-enriched population to FSH. *J Reprod Fertil.* 1989;86:643-51.

MUSNIER A, HEITZLER D, BOULO T, TESSERAUD S, DURAND G, LÉCUREUIL C, GUILLOU H, POUPON A, REITER E, CRÉPIEUX P. Developmental regulation of p70 S6 kinase by a G protein-coupled receptor dynamically modeled in primary cells. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66:3487-503.

MUTEMBEI HM, PESCH S, SCHULER G, HOFFMANN B. Expression of oestrogen receptors alpha and beta and of aromatase in the testis of immature and mature boars. *Reprod Domest Anim.* 2005;40:228-36.

NAKAI M, BOUMA J, NIE R, ZHOU Q, CARNES K, JASSIM E, LUBAHN DB, HESS RA. Morphological analysis of endocytosis in efferent ductules of estrogen receptor-alpha knockout male mouse. *Anat Rec.* 2001;263:10-18.

NAKAYAMA K, NAGAHAMA H, MINAMISHIMA YA, MIYAKE S, ISHIDA N, HATAKEYAMA S, KITAGAWA M, IEMURA S, NATSUME T, NAKAYAMA K. Skp2-mediated degradation of p27 regulates progression into mitosis. *Dev Cell.* 2004;6:661-672.

NISHIKAWA Y, HORIE T. Studies on the development of the testes and epididymides of the horse. I. Studies on the development of the testes of the horse, with special reference to singularity and the age of sexual maturity. *Natl Inst Agric Sci Jpn. Bull Ser G Anim Husband.* 1955;10:229-349.

OKWUN OE, IGBOELI G, FORD JJ, LUNSTRA DD, JOHNSON L. Number and function of Sertoli cells, number and yield of spermatogonia, and daily sperm production in three breeds of boar. *J Reprod Fertil.* 1996;107:137-49.

OLIVEIRA CA, ZHOU Q, CARNES K, NIE R, KUEHL DE, JACKSON GL, FRANCA LR, NAKAI M, HESS RA. ER function in the adult male rat: short- and long-term effects of the

antiestrogen ICI 182,780 on the testis and efferent ductules, without changes in testosterone. *Endocrinology*. 2002;143:2399-409.

ORTH JM. The role of follicle-stimulating hormone in controlling Sertoli cell proliferation in testes of fetal rats. *Endocrinology*. 1984;115:1248-1255.

ORTH JM. FSH-induced Sertoli cell proliferation in the developing rat is modified by beta-endorphin produced in the testis. *Endocrinology*. 1986;119:1876-78.

ORTH JM, GUNSALUS GL, LAMPERTI AA. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology*. 1988;122:787-794.

ORTH JM, BOEHM R. Endorphin suppresses FSH-stimulated proliferation of isolated neonatal Sertoli cells by a pertussis toxin-sensitive mechanism. *Anat Rec*. 1990;226: 320-327.

ORTH JM. Cell biology of testicular development in fetus and neonate. In: DESJARDINS C, EWING LL (Eds). *Cell and Molecular Biology of the Testis*. New York: Oxford University Press, 1993, p.3-42.

O'SHAUGHNESSY PJ, BAKER P, SOHNIUS U, HAAVISTO AM, CHARLTON HM, HUHTANIEMI I. Fetal development of Leydig cell activity in the mouse is independent of pituitary gonadotroph function. *Endocrinology*. 1998;139:1141-46.

PALMERO S, BARDI G, BOLLA F, FUGASSA E. Influence of thyroid hormone on Sertoli cell protein metabolism in the prepubertal pig. *Boll Soc Ital Biol Sper*. 1996;72:163-170.

PEARL CA, AT-TARAS E, BERGER T, ROSER JF. Reduced endogenous estrogen delays epididymal development but has no effect on efferent duct morphology in boars. *Reproduction*. 2007;134:593-604.

PELLINIEMI LJ. Ultrastructure of the early ovary and testis in pig embryos. *Am J Anat*. 1975;144: 89-111.

PELLINIEMI LJ, KFROJDMAN K, PARANKO J. Embryological and prenatal development and function of Sertoli cells. In: RUSSELL LD, GRISWOLD MD (Eds). *The Sertoli Cell*. Clearwater: Cache River Press; 1993, p.87-113.

PELLINIEMI LJ, KUOPIO T, FRÖJDMAN K. The cell biology and function of the fetal Leydig cell. In: PAYNE AH, HARDY MP, RUSSELL LD (Eds). The Leydig cell. Viena: Cache River Press, 1996, p.143-157.

PETERSEN C, BOITANI C, FROYSA B, SODER O. Transforming growth factor-alpha stimulates proliferation of rat Sertoli cells. Mol Cell Endocrinology. 2001;181:221-227.

PETERSEN C, BOITANI C, FROYSA B, SODER O. Interleukin-1 is a potent growth factor for immature rat sertoli cells. Mol Cell Endocrinology. 2002;186:37-47.

PETERSEN C, SODER O. The Sertoli cell – A hormonal target and super nurse for germ cells that determines testicular size. Horm Res. 2006;66:153-61.

PLANT TM, MARSHALL GR. The functional significance of FSH in spermatogenesis and the control of its secretion in male primates. Endocr Rev. 2001;22(6):764-86.

PLANT TM, RAMASWAMY S, SIMORANGKIR D, MARSHALL GR. Postnatal and pubertal development of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) testis. Ann N Y Acad Sci. 2005;1061:149-62.

PUTRA DK, BLACKSHAW AW. Quantitative studies of compensatory testicular hypertrophy following unilateral castration in the boar. Aust J Biol Sci. 1985;38:429-434.

RAESIDE JI. The isolation of estrone sulfate and estradiol-17 beta sulfate from stallion testes. Can J Biochem. 1969;47:811-15.

RAGO V, MAGGIOLINI M, VIVACQUA A, PALMA A, CARPINO A. Differential expression of estrogen receptors (ERalpha/ERbeta) in testis of mature and immature pigs. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol. 2004;281:1234-39.

RAMESH R, PEARL CA, AT-TARAS E, ROSER JF, BERGER T. Ontogeny of androgen and estrogen receptor expression in porcine testis: effect of reducing testicular estrogen synthesis. Anim Reprod Sci. 2007;102:286-99.

RICHARDSON LL, KLEINMAN HK, DYM M. Basement membrane gene expression by Sertoli and peritubular myoid cells in vitro in the rat. Biol Reprod. 1995;52:320-30.

ROCHIRA V, ZIRILLI L, GENAZZANI AD, BALESTRIERI A, ARANDA C, FABRE B, ANTUNEZ P, DIAZZI C, CARANI C, MAFFEI L. Hypothalamic-pituitary-gonadal axis in two men with aromatase deficiency: evidence that circulating estrogens are required at the

hypothalamic level for the integrity of gonadotropin negative feedback. *Eur J Endocrinol.* 2006;155:513-22.

RODRIGUÉZ-MARTINÉZ H. Sperm function in cattle and pigs: morphological and functional aspects. *Arch Animal Breed.* 2001;44:102-113.

ROSS AJ, AMY SP, MAHAR PL, LINDSTEN T, KNUDSON CM, THOMPSON CB, KORSMEYER SJ, MACGREGOR GR. BCLw mediates survival of postmitotic Sertoli cells by regulating BAX activity. *Dev Biol.* 2001;239:295-308.

ROSSI G, GASPERI V, PARO R, BARSACCHI D, CECCONI S, MACCARRONE M. Follicle-stimulating hormone activates fatty acid amide hydrolase by protein kinase A and aromatase-dependent pathways in mouse primary Sertoli cells. *Endocrinology.* 2007;148:1431-39.

ROUILLER-FABRE V, LECERF L, GAUTIER C, SAEZ JM, HABERT R. Expression and effects of insulin-like growth factor I on rat fetal Leydig cell function and differentiation. *Endocrinology.* 1998;139:2926-34.

RUSSELL LD, PETERSON RN. Determination of the elongate spermatid-Sertoli cell ratio in various mammals. *J Reprod Fertil.* 1984;70:635-41.

RUSSELL LD, GOH JC, RASHED RM, VOGL AW. The consequences of actin disruption at Sertoli ectoplasmic specialization sites facing spermatids after in vivo exposure of rat testis to cytochalasin D. *Biol Reprod.* 1988;39:105-18.

RUSSELL LD, BARTKE A, GOH JC. 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.* 1989;184:179-89.

RUSSELL LD, SINHA-HIKIM AP, GHOSH S, BARTKE A. Structure-function relationships in somatic cells of the testis and accessory reproductive glands. In: BARTKE A (Ed). *Function of somatic cells in the testis*; New York: Springer-Verlag, 1994, p.55-84.

RUSSELL LD, FRANÇA LR, HESS R, COOKE P. Characteristics of mitotic cells in developing and adult testes with observations on cell lineages. *Tissue & Cell.* 1995;27:105-28.

RUSSELL LD, FRANÇA LR, BRINSTER RL. Ultrastructural observations of spermatogenesis in mice resulting from transplantation of mouse spermatogonia. *J Androl.* 1996;17:603-14.

RUSSELL LD, WARREN J, DEBELJUK L, RICHARDSON LL, MAHAR PL, WAYMIRE KG, AMY SP, ROSS AJ, MACGREGOR GR. Spermatogenesis in Bclw-deficient mice. *Biol Reprod.* 2001;65:318-32.

SAIRAM MR, KRISHNAMURTHY H. The role of follicle-stimulating hormone in spermatogenesis: lessons from knockout animal models. *Arch Med Res.* 2001;32:601-608.

SCHEID IR, SILVEIRA PRS. Uma análise da suinocultura brasileira. *Suínos & Cia.* 2002;1:25-28.

SCHLATT S, MEINHARDT A, NIESCHLAG E. Paracrine regulation of cellular interactions in the testis: factors in search of a function. *Eur J Endocrinol.* 1997;137:107-17.

SCHULZ RW, MENTING S, BOGERD J, FRANÇA LR, VILELA DAR, GODINHO HP. Sertoli cell proliferation in the adult testis – evidence from two fish species belonging to different orders. *Biol Reprod.* 2005;75:891-98.

SCOTT HM, HUTCHISON GH, MAHOOD K, HALLMARK N, WELSH M, DE GENDT K, VERHOEVEN G, O'SHAUGHNESSY P, SHARPE RM. Role of androgens in fetal testis development and dysgenesis. *Endocrinology.* 2007;148:2027-36.

SEKIDO R, BAR I, NARVÁEZ V, PENNY G, LOVELL-BADGE R. SOX9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. *Dev Biol.* 2004;274:271-79.

SETCHELL BP, COX JE. Secretion of free and conjugated steroids by the horse testis into lymph and venous blood. *J Reprod Fertl Suppl.* 1982;32:123-27.

SHARPE R. Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL E, NEILL J (Eds). *The Physiology of Reproduction*, vol. 2. New York: Raven Press; 1994, p.1363-1434.

SHARPE RM, MCKINNELL C, KIVLIN C, FISHER JS. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction.* 2003;125:769-784.

SHUPNIK MA, SCHREIHOFER DA. Molecular aspects of steroid hormone action in the male reproductive axis. *J Androl.* 1997;18:341-44.

SICINSKI P, DONAHER JL, GENG Y, PARKER SB, GARDNER H, PARK MY, ROBKER RL, RICHARDS JS, MCGINNIS LK, BIGGERS JD, EPPIG JJ, BRONSON RT, ELLEDGE SJ,

WEINBERG RA. Cyclin D2 is an FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis. *Nature*. 1996;384:470-474.

SILVA JR, VA. Efeitos da indução do hipotireoidismo e hipertireoidismo pós-natal na proliferação das células de Sertoli e na função testicular de suínos. Tese de doutorado, ICB/UFMG, 2000; 191p.

SILVEIRA PRS, TALAMINI DJD. A cadeia produtiva de suínos no Brasil. Conselho Federal de Medicina Veterinária. 2007;42:11-20.

SIMONI M, GROMOLL J, NIESCHLAG E. The follicle-stimulating hormone receptor : biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocrinology Reviews*. 1997;19:739-73.

SKINNER MK. Sertoli cell-somatic cell interactions. In: SKINNER MK, GRISWOLD MD (Ed). *Sertoli cell biology*. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. p.317-328.

SRIDHARAN S, SIMON L, MELING DD, CYR DG, GUTSTEIN DE, FISHMAN GI, GUILLOU F, COOKE PS. Proliferation of adult Sertoli cells following conditional knockout of the gap junctional protein GJA1 (connexin 43) in mice. *Biol Reprod*. 2007;76:804-12.

SUÁREZ-QUIAN CA, OKE BO, MUSTO N. Localization of the androgen receptor in the rodent testis. In: MARTÍNEZ-GARCÍA F, REGADERA J (Eds). *Male reproduction; a multidisciplinary overview*. Madrid: Churchill Communications Europe España; 1998, p.114-124.

SWANLUND DJ, N'DIAYE MR, LOSETH KJ, PRYOR JL, CRABO BG. Diverse testicular responses to exogenous growth hormone and follicle-stimulating hormone in prepubertal boars. *Biol Reprod*. 1995;53:749-57.

TABONE E, BENAHMED M, REVENTOS J, SAEZ JM. Interactions between immature porcine Leydig and Sertoli in vitro. *Cell Tissue Res*. 1984;237:357-62.

TARN CY, ROSENKRANS CF, JR., APPLE JK, KIRBY JD. Effects of 6-N-propyl-2-thiouracil on growth, hormonal profiles, carcass and reproductive traits of boars. *Anim Reprod Sci*. 1998;50:81-94.

TARULLI GA, STANTON PG, LERCHL A, MEACHEM SJ. Adult sertoli cells are not terminally differentiated in the Djungarian hamster: effect of FSH on proliferation and junction protein organization. *Biol Reprod*. 2006;74:798-806.

TILMANN C, CAPEL B. Cellular and molecular pathways regulating mammalian sex determination. *Recent Prog Horm Res.* 2002;57:1-18.

TRAN D, MEUSY-DESSOLLE N, JOSSO N. Waning of anti-mullerian activity: an early sign of Sertoli cell maturation in the developing pig. *Biol Reprod.* 1981;24:923-31.

TRIPEPI S, CARELLI A, PERROTTA E, BRUNELLI E, TAVOLARO R, FACCILOLO RM, CANONACO M. Morphological and functional variations of Leydig cells in testis of the domestic pig during the different biological stages of development. *J Exp Zool.* 2000;287:167-75.

TSUBOTA T, HOWELL-SKALLA L, NITTA H, OSAWA Y, MASON JI, MEIERS PG, NELSON RA, BAHR JM. Seasonal changes in spermatogenesis and testicular steroidogenesis in the male black bear *Ursus americanus*. *J Reprod Fertil.* 1997;109:21-7.

VAN STRAATEN HW, WENSING CJ. Histomorphometric aspects of testicular morphogenesis in the pig. *Biol Reprod.* 1977;17:467-472.

VAN STRAATEN HWM, WENSING CJG. Leydig cell development in the testis of the pig. *Biol Reprod.* 1978;18:86-93.

VAN VORSTENBOSCH CJ, COLENBRANDER B, WENSING CJG. Leydig cell development of pig testis in the early fetal period: an ultrastructural study. *Am J Anat.* 1982;165:305-18.

VAN VORSTENBOSCH CJ, SPEK E, COLENBRANDER B, WENSING CJ. Sertoli cell development of pig testis in the fetal and neonatal period. *Biol Reprod.* 1984;31:565-577.

VAN VORSTENBOSCH CJ, SPEK E, COLENBRANDER B, WENSING CJ. The ultrastructure of normal fetal and neonatal pig testis germ cells and the influence of fetal decapitation on the germ cell development. *Development.* 1987;99:553-63.

VAN DALEM JL, MCNAMARA M, PETIT R, HENNEN G. Developmental changes in gonadotrophins and testicular gonadotrophin receptors in the pig, from neonatal to adult life. *J Endocrinol.* 1986;111:301-308.

VELLE W. Endogenous anabolic agents in farm animals. *Environ Qual Saf Suppl.* 1976;5:159-70.

VERGOUWEN RP, JACOBS SG, HUISKAMP R, DAVIDS JA, DE ROOIJ DG. Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *J Reprod Fertil.* 1991;93:233-43.

WAGNER A, CLAUS R. The effects of postnatal FSH substitution on Sertoli cell number and the sperm production capacity of the adult boar. *Anim Reprod Sci.* 2009;110:269-82.

WAITES GM, SPEIGHT AC, JENKINS N. The function maturation of the Sertoli cell and Leydig cell in mammalian testis. *J Reprod Fertil.* 1985;75:317-26.

WALKER WH, CHENG J. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction.* 2005;130:15-28.

WELSH M, SAUNDERS PT, ATANASSOVA N, SHARPE RM, SMITH LB. Androgen action via testicular peritubular myoid cells is essential for male fertility. *FASEB J.* 2009;23:4218-30.

WROBEL KH, DIERICHS R. Growth and differentiation of Sertoli cells in the porcine testis during postnatal ontogenesis. *Verh Anat Ges.* 1975;69:723-724.

WU X, WAN S, LEE MM. Key factors in the regulation of fetal and postnatal Leydig cell development. *J Cell Physiol.* 2007;213:429-33.

YAO HH, TILMANN C, ZHAO GQ, CAPEL B. The battle of the sexes: opposing pathways in sex determination. *Novartis Found Symp.* 2002;244:187-198; discussion 198-206, 253-187.

ZIRKIN BR, AWONIYI C, GRISWOLD MD, RUSSELL LD, SHARPE R. Is FSH required for adult spermatogenesis? *J Androl.* 1994;15:273-76.

CAPÍTULO 1: PROLIFERAÇÃO PÓS-NATAL DAS CÉLULAS SOMÁTICAS E MATURAÇÃO DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS EM SUÍNOS: UM EVENTO NÃO-ALEATÓRIO.

CAPÍTULO 1

PROLIFERAÇÃO PÓS-NATAL DAS CÉLULAS SOMÁTICAS E MATURAÇÃO DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS EM SUÍNOS: UM EVENTO NÃO-ALEATÓRIO

Resumo

Embora a maturação testicular em equinos tenha início na região central do testículo, este processo é considerado um evento que ocorre de maneira aleatória nos testículos da maioria dos mamíferos. Estudos desenvolvidos em nosso laboratório sugerem que o estabelecimento da espermatogênese pode não ser um evento aleatório no parênquima testicular de suínos. Os objetivos do presente estudo foram avaliar o padrão de maturação dos cordões/túbulos seminíferos e as características morfológicas e funcionais das células somáticas testiculares durante o desenvolvimento pós-natal em três diferentes regiões do testículo de suínos: a) próximo a túnica albugínea (TA); b) na região de transição entre os túbulos seminíferos e o mediastino testicular (RT); e c) na região intermediária (ID) entre TA e RT. Baseado no diâmetro dos cordões e túbulos seminíferos, no tamanho do núcleo das células de Sertoli, bem como na secreção de fluido tubular, principalmente aos 90 e 120 dias de idade, os resultados encontrados mostraram que o processo de maturação dos túbulos seminíferos estava mais adiantado nas regiões ID e RT. A atividade mitótica das células de Sertoli foi maior ($p < 0,05$) em RT que em ID e TA aos 7 e 120 dias. Exceto para o índice mitótico das células de Leydig, o qual foi menor em ID ($p < 0,05$) em comparação com TA e RT aos 7, 30 e 180 dias, os demais parâmetros avaliados para esta importante célula esteroidogênica, tais como volume celular individual e volumes nuclear e citoplasmático, foram sempre maiores ($p < 0,05$) em ID, sugerindo que a esteroidogênese é mais ativa nesta região ao longo de todo o período investigado. Em conjunto, estes resultados sugerem que as células de Leydig em ID podem desempenhar papel chave durante o desenvolvimento testicular pós-natal em suínos. Ainda, este tipo celular provavelmente está envolvido com o desenvolvimento assincrônico do parênquima testicular e, neste contexto, a região de transição se comportaria como a zona primária de crescimento dos túbulos seminíferos.

Palavras-chave: Suínos, desenvolvimento testicular pós-natal, morfometria, células de Sertoli, células de Leydig, células peritubulares mióides.

Abstract

Although seminiferous tubule maturation in horses begins in the central area of the testis, this process is thought to occur randomly throughout the testis in most mammals. Studies in our laboratory suggest that the establishment of spermatogenesis may not be a synchronous event in the testicular parenchyma of pigs. The objectives of the present study were to evaluate the pattern of seminiferous cord/tubule maturation and the morphological and functional characteristics of testicular somatic cells during postnatal development in three different pig testis regions: a) near the tunica albuginea (TA); b) in the transitional area between the seminiferous tubules and mediastinum (TR); and c) in the intermediate area (ID) between the TA and TR. Based on the diameter of seminiferous cords/tubules, nucleus size of Sertoli cells and fluid secretion, mainly at 90 and 120 days of age, the results reveal that seminiferous tubule maturation was more advanced in the ID and TR. The mitotic activity of Sertoli cells was higher ($p < 0.05$) in the TR than the ID and TA at 7 and 120 d. Except for the mitotic index of the Leydig cells, which was lower ($p < 0.05$) in the ID at 7, 30 and 180 d than in the TA and TR, other Leydig cell indices, such as individual cell size, nuclear volume and cytoplasmic volume, were always higher ($p < 0.05$) in the ID, suggesting that steroidogenesis is more active in this region throughout the entire period investigated. Overall, these results suggest that Leydig cells in the ID may play a pivotal role in postnatal testis development in pigs and this type of cell is likely related to asynchronous testicular parenchyma development, with the transitional area providing the primary zone for the growth of the seminiferous tubules.

Key words: Pigs, postnatal testis development, morphometry, Sertoli cells, Leydig cells, peritubular myoid cells.

1. Introdução

A célula de Sertoli é a primeira célula somática a se diferenciar na gônada durante o período embrionário e desempenha papel crucial na diferenciação e desenvolvimento do testículo (Karl & Capel, 1998; Cool & Capel, 2009). Entretanto, durante este período, as interações entre as células de Sertoli e demais células somáticas presentes nos testículos, tais como células peritubulares mióides e células de Leydig, são essenciais para manter a integridade dos cordões e túbulos seminíferos e do microambiente testicular, além de direcionar o desenvolvimento do sistema reprodutor masculino (França et al., 2000; DiNapoli & Capel, 2008; Alvarenga & França, 2009; Welsh et al., 2009).

Em mamíferos, a proliferação das células de Sertoli geralmente se inicia logo após a diferenciação gonadal e termina antes da puberdade (Orth et al., 1988; Sharpe et al., 2003; Plant et al., 2005). Especificamente em suínos, duas fases distintas de proliferação pós-natal das células de Sertoli foram observadas; a primeira durante o período neonatal e a segunda próximo ao início da puberdade, que em suínos normalmente ocorre por volta de 4 meses de idade (França et al., 2000).

Diferente das células de Sertoli, na maioria das espécies de mamíferos já investigadas parecem existir duas populações distintas de células de Leydig: as fetais, que surgem logo após a diferenciação testicular, e as células de Leydig do tipo adulta, que são observadas a partir do período pré-púbere (Griswold & Behringer, 2009; O'Shaughnessy et al., 2009). Em suínos, e provavelmente em humanos e outras espécies de primatas, três fases de desenvolvimento das células de Leydig foram descritas (Dierichs et al., 1973; Van Straaten & Wensing, 1978; Griswold & Behringer, 2009): duas fases transitórias, a primeira no início do período fetal e outra durante o período perinatal; e a fase final, que se inicia por volta de 3 meses de idade, persistindo durante a puberdade e maturidade do indivíduo (Dierichs et al., 1973; Van Straaten & Wensing, 1978; França et al., 2000). Além disso, observa-se que o volume individual da célula de Leydig em suínos sofre mudanças significativas durante o desenvolvimento testicular (Van Straaten & Wensing, 1978; Lunstra et al., 1986; França et al., 2000) e estas mudanças estão provavelmente relacionadas à alta densidade de receptores de LH (Peyrat et al., 1981; Lunstra et al., 1986) e andrógenos (Tripepi et al., 2000).

Na maioria das espécies de mamíferos, o estabelecimento da espermatogênese é considerado um evento que ocorre de maneira aleatória no testículo (Courot et al., 1970). Entretanto, diferenças macroscópicas na coloração do parênquima testicular têm sido descritas em equinos pré-púberes, nos quais foi observada uma região clara no centro do testículo e outra escura na periferia deste órgão (Bouin & Ancel, 1905; Nishikawa & Horie, 1955; Johnson, 1991; Clemmons et al., 1995). A presença deste padrão foi associada à

relação temporal entre a redução da proporção de macrófagos ou demais células intersticiais e o desenvolvimento dos túbulos seminíferos (Clemmons et al., 1995). Recentemente, em um estudo desenvolvido em suínos utilizando marcações específicas (AMH e p27^{kip1}), Ford e Wise (2009) demonstraram a existência de um gradiente de maturação de células de Sertoli, a partir do mediastino testicular (região central) em direção a túnica albugínea.

O número de células de Sertoli nos testículos determina o número final de espermatozoides produzidos e, de maneira geral, a eficiência reprodutiva nos machos (França et al., 2000; Cooke et al., 2005; Leal & França, 2009). Particularmente em suínos, nos quais o uso de inseminação artificial corresponde a uma importante ferramenta para se melhorar a eficiência reprodutiva, compreender a regulação do desenvolvimento testicular pós-natal é crucial para se obter aumento do número total de espermatozoides por ejaculado. Entretanto, estudos relacionados à regulação da atividade mitótica das células de Sertoli em suínos são ainda inconclusivos (França et al., 2000; Klobucar et al., 2003; Lunstra et al., 2003), apesar dos importantes avanços recentemente obtidos quanto ao possível papel desempenhado pelos estrógenos na proliferação e maturação das células de Sertoli (At-Taras et al., 2006; Ramesh et al., 2007; At-Taras et al., 2008; Berger et al., 2008). Além disso, estudos em desenvolvimento em nosso laboratório sugerem que o estabelecimento da espermatogênese pode não ser um evento sincronizado no parênquima testicular em suínos.

Os objetivos do presente estudo foram os de se realizar uma cuidadosa investigação morfofuncional dos elementos somáticos do testículo, bem como da maturação dos cordões/túbulos seminíferos, durante o desenvolvimento pós-natal em suínos. Para tal finalidade, fragmentos obtidos em três diferentes regiões do parênquima testicular (situados entre o mediastino e a túnica albugínea) foram avaliados.

2. Material e Métodos

2.1. Animais

Vinte suínos Landrace x Large White pré-púberes (7, 30, 60, 90 e 120 dias de idade) e quatro pós-púberes (180 dias de idade), provenientes da Fazenda Experimental “Prof. Hélio Barbosa” da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, foram utilizados. Estes animais foram orquiectomizados e os testículos, após serem separados do epidídimo, foram pesados e, com o auxílio de uma lâmina afiada, seccionados longitudinalmente. Os fragmentos de testículo foram obtidos de três diferentes regiões do parênquima testicular: próximo à túnica albugínea (TA); na transição dos túbulos seminíferos

e o mediastino (*rete testis*) (RT); e na região intermediária (ID) entre TA e RT (Figura 1). Estas amostras foram fixadas por imersão em glutaraldeído tamponado 5%, incluídas em plástico (glicol metacrilato) e rotineiramente preparadas para análises histológicas e morfológicas. Antes da cirurgia, todos os suínos foram sedados pela via intramuscular com 1 mg/Kg de azaperone (Destress, Des-Far Laboratórios LTDA, São Paulo, SP, Brasil) e anestesiados pela via endovenosa com 3 mg/Kg com a associação zolazepam e tiletamina (Zoetil 50; Virbac do Brasil, Ind. E Com. LTDA, São Paulo, Brazil). Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados por um veterinário e seguiram as recomendações do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais – CETEA/UFMG.

2.2. Morfometria testicular

2.2.1. Proporção volumétrica e diâmetro de cordões e túbulos seminíferos

As proporções volumétricas dos componentes testiculares presentes nas três diferentes regiões do parênquima testicular investigadas foram determinadas através de microscopia de luz, em aumento de 400x, utilizando-se retículo com 441 intersecções ajustada à ocular do microscópio Olympus BX40. Para tal finalidade, 15 campos distribuídos em três fragmentos representativos de cada uma das regiões foram escolhidos, perfazendo-se um total de 6615 pontos por região investigada. O diâmetro tubular/cordonal médio por animal foi obtido a partir da mensuração ao acaso de 30 secções transversais de túbulos/cordões seminíferos que apresentavam contorno o mais circular possível, em cada uma das regiões investigadas. Estas medidas foram realizadas utilizando-se régua micrométrica adaptada a uma das oculares de 10x, em aumento final de 400x.

2.2.2 Estabelecimento da espermatogênese

Para se investigar o desenvolvimento pós-natal das células germinativas, 30 secções transversais de cordões/túbulos seminíferos foram avaliadas por região do testículo em cada suíno, nas diferentes idades pré-púberes estudadas. A presença dos seguintes tipos de células germinativas foi avaliada: gonócitos, espermatogônia (incluindo-se as do tipo A, intermediária e tipo B), espermatócito primário inicial (pré-leptóteno, leptóteno e zigóteno), intermediário e espermatócito primário final (paquíteno e diplóteno), espermátides arredondada e alongada. Esta avaliação foi realizada em aumento de 1000x.

2.2.3 Célula de Leydig

O volume individual das células de Leydig foi obtido a partir do volume do núcleo e da proporção entre núcleo e citoplasma destas células. O volume do núcleo foi obtido utilizando-se a média do diâmetro nuclear, tendo sido avaliados 30 diâmetros nucleares em cada uma das regiões investigadas, por animal. O volume nuclear individual obtido foi expresso em (μm^3), utilizando-se a fórmula $4/3\pi R^3$, onde $R = \text{diâmetro nuclear}/2$. Para calcular a proporção entre núcleo e citoplasma, foi utilizado retículo com 441 intersecções (pontos), em aumento de 1000x. Aproximadamente mil pontos sobre células de Leydig foram contados em cada uma das três diferentes áreas do parênquima testicular, em cada um dos animais utilizados.

2.2.4 Volume nuclear da célula de Sertoli

O volume nuclear da célula de Sertoli também foi expresso em μm^3 e obtido através da mesma fórmula utilizada para se obter o volume da célula de Leydig. Entretanto, uma vez que o núcleo da célula de Sertoli de suínos nas diferentes idades investigadas se apresenta sob a forma ovóide ou alongada (França et al., 2000), o diâmetro nuclear médio foi obtido a partir da mensuração dos eixos nucleares maior e menor.

2.2.5 Índice de proliferação das células somáticas testiculares

O índice de proliferação das células de Sertoli, peritubular mióide e de Leydig foram determinados como número de células em mitose por pelo menos 1000 células analisadas, para cada tipo de célula somática considerada, em cada uma das regiões do parênquima testicular, por animal. Estas células foram cuidadosamente identificadas de acordo com sua localização e aspecto morfológico, como por exemplo, a forma do núcleo.

2.3 Análise estatística

Todos os resultados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.) e foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas utilizando-se o teste Student Newman-Keuls. A análise de correlação de Pearson foi realizada entre os índices de proliferação de células somáticas e proporção dos diversos componentes do parênquima testicular. Para todos estes testes estatísticos utilizou-se o software STATISTICA 3.11 (StatSoft, Inc., Tulsa, Oklahoma, USA, 1995), e o nível de significância considerado foi $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1 Biometria

Conforme esperado, o peso corporal aumentou cerca de 25 vezes entre a primeira semana pós-natal e 180 dias de idade (figura 2A). Seguindo esta mesma tendência, marcante aumento no peso testicular também foi observado. Assim, aos 7 dias de idade a média do peso do testículo era de $0,5 \pm 0,1$ gramas, chegando a 224 ± 24 gramas aos 180 dias (figura 2B). Em dois períodos distintos ao longo do desenvolvimento pós-natal, dos 7 aos 30 dias e dos 120 aos 180 dias de idade foi observado um acentuado aumento no índice gonadossomático (IGS), que corresponde a massa testicular dividida pelo peso corporal (figura 2C).

3.2 Diâmetro dos cordões e túbulos seminíferos e proporção volumétrica dos componentes do parênquima testicular

Em todas as idades investigadas, o diâmetro dos cordões e túbulos seminíferos foi semelhante ($p > 0,05$) nas três diferentes regiões testiculares avaliadas (figura 3). Porém, em comparação com TA, os cordões e túbulos seminíferos presentes em ID e RT mostraram tendência de maiores diâmetros, principalmente aos 90 e 120 dias de idade. Considerando-se somente as diferentes idades, dos 7 aos 60 dias os diâmetros dos cordões e túbulos foram semelhantes ($p > 0,05$). Porém, aos 90 dias de idade, aumentos de aproximadamente 65% ($p < 0,05$), 80% ($p < 0,05$) e 40% ($p > 0,05$) nos valores encontrados para este parâmetro foram observados, respectivamente em RT, ID e TA. Aos 180 dias, verificou-se crescimento significativo ($p < 0,05$) no diâmetro tubular nas três diferentes regiões investigadas.

As figuras 4 e 5 mostram os percentuais dos componentes do parênquima testicular investigados dos 7 aos 180 dias de idade, nas três diferentes regiões avaliadas. O percentual de compartimento tubular variou de aproximadamente 25 a 40% aos 7 dias de idade e foi menor ($p < 0,05$) em ID (figura 4A). Tendência semelhante foi observada para o epitélio seminífero e túnica própria (figura 4B-C). Para todas as três regiões investigadas, os componentes do compartimento tubular atingiram seus menores valores aos 30 dias de idade, particularmente em RT ($p < 0,05$). Dos 30 aos 180 dias de idade, a proporção do compartimento tubular aumentou gradualmente, chegando a constituir aproximadamente 80% do parênquima testicular. Embora os menores valores percentuais tenham sido observados geralmente em RT, diferenças significativas não foram encontradas entre as regiões avaliadas, e a mesma tendência foi observada para o percentual de epitélio seminífero. Ao contrário dos outros elementos do compartimento tubular, o percentual de túnica própria diminuiu dos 60 aos 180 dias de idade, e somente nesta última idade os valores encontrados para ID foram significativamente maiores (figura 4C).

O lume tubular foi observado pela primeira vez aos 90 dias de idade e mostrou variação muito alta ($p > 0,05$) entre as três regiões avaliadas bem como em uma mesma

região (figura 4D). Entre 90 e 120 dias de idade a formação do lume tubular em TA foi muito baixa, quando comparado com as demais regiões. Porém, aos 180 dias o percentual de lume foi aproximadamente 10% em todas as regiões investigadas.

Conforme esperado, entre 7 e 180 dias de idade o percentual ocupado pelo compartimento intertubular mostrou tendência oposta àquela observada para o compartimento tubular (figura 5A). Em comparação com ID e RT, o percentual deste compartimento foi menor em TA aos 7 dias de idade. Resultado semelhante foi também encontrado para células de Leydig, que é o principal componente do compartimento intertubular (figura 5B). De maneira geral, o percentual desta importante célula somática esteroideogênica foi o mais alto em todas as idades investigadas, diminuindo aproximadamente 80% durante o desenvolvimento testicular pós-natal. Em comparação com as demais regiões, aos 180 dias de idade a proporção de células de Leydig ficou em torno de 10-15% maior em ID ($p>0,05$). Seguindo a mesma tendência da maioria dos elementos presentes no interstício, o percentual de vasos sanguíneos diminuiu entre 7 e 180 dias de idade (figura 5C). Entretanto, seu percentual foi maior em ID ($p<0,05$) durante o desenvolvimento pós-natal inicial (entre 7 e 30 dias de idade), e diferenças significativas entre as regiões não foram observadas para este parâmetro nas idades subsequentes. Em relação a outro importante componente do compartimento intertubular, o tecido conjuntivo, sua proporção foi significativamente menor ($p<0,05$) em ID, em todas as idades investigadas (figura 5D).

3.3 Estabelecimento da espermatogênese

Na figura 6 pode se observar o aspecto do parênquima testicular de suínos em diferentes idades durante o desenvolvimento pós-natal. No período inicial do desenvolvimento (7 dias) somente gonócitos (figura 6A) foram observados nos cordões seminíferos avaliados nas três regiões do parênquima testicular investigadas. O percentual de secções transversais de cordões seminíferos contendo este tipo de célula germinativa diminuiu de 60 para 30% do primeiro para o segundo mês após o nascimento, nas diferentes regiões testiculares estudadas. Assim, aos 30 e aos 60 dias de idade a célula germinativa mais avançada presente nos demais cordões seminíferos nas diferentes regiões do testículo foi a espermatogônia do tipo A (figura 6B e C). Já aos 90 dias de idade, o espermatócito primário em paquíteno era o tipo celular predominante em aproximadamente 70% dos cordões e túbulos seminíferos avaliados. Nesta mesma idade, espermátides alongadas foram encontradas somente em ID e RT, enquanto poucos túbulos em TA continham espermátides arredondadas (figura 6D). Esta tendência tornou-se ainda mais evidente aos 120 dias, quando aproximadamente 50% dos túbulos avaliados em ID e RT já

apresentavam espermátides arredondadas e apenas 5% dos túbulos em TA continham este tipo celular (figura 6E). Deve ser mencionado que grande variação individual com relação à progressão da espermatogênese foi observada, particularmente, aos 120 dias de idade. Para ilustrar este aspecto nesta idade, embora a espermatogênese se mostrasse virtualmente completa em dois dos quatro suínos investigados, as células germinativas ainda se encontravam na fase meiótica em outros dois animais. Além disso, em comparação com ID e RT, o desenvolvimento das células germinativas estava sempre mais atrasado em TA. Contudo, aos 180 dias de idade não foram observadas diferenças entre regiões, de maneira que a espermatogênese completa já havia se estabelecido em todo parênquima testicular (figura 6F).

3.4 Células de Sertoli

Independentemente da região do parênquima testicular, o núcleo da célula de Sertoli mudou sua morfologia de imaturo para maduro/diferenciado entre os períodos pré e pós-púbere. Os núcleos das células de Sertoli imaturas apresentavam dois padrões morfológicos distintos: arredondado ou ovóide e alongado ou colunar (figura 7A-E) com heterocromatina formando grumos mais grosseiros, os quais foram observados em todas as idades pré-púberes investigadas (7 – 120 dias de idade). Já os núcleos das células de Sertoli maduras ou diferenciadas (figura 7F) eram alongados ou ovóides e somente na idade pós-púbere (180 dias) apresentavam nucléolo proeminente. Como pode ser observado na figura 8, o volume nuclear da célula de Sertoli não mudou de maneira significativa entre 7 e 90 dias de idade, entretanto, aumento marcante ($p < 0,05$) foi observado para este parâmetro dos 120 aos 180 dias de idade nas três regiões investigadas. Em comparação com ID e RT, o volume nuclear da célula de Sertoli em TA foi menor ($p < 0,05$), particularmente aos 30 e aos 90 dias de idade.

Uma vez que a secreção de fluido, a formação do lume e o tamanho do núcleo da célula de Sertoli são bons marcadores de maturação desta importante célula somática do testículo (Russell et al. 1989), correlação significativa ($p < 0,05$) e positiva foi encontrada entre o volume nuclear desta célula e o percentual de lume, em duas regiões do testículo (ID, $r = 0,83$; RT, $r = 0,47$).

3.5 Célula de Leydig

Diferenças marcantes foram encontradas para o tamanho da célula de Leydig durante o desenvolvimento do testículo e ainda nas três diferentes regiões do parênquima testicular avaliadas (figuras 9 e 10). Assim, foi observado que em todas as idades investigadas as células de Leydig em ID apresentavam-se sempre maiores ($p < 0,05$), em

comparação com aquelas presentes em RT e TA (figura 9C). O mesmo padrão foi observado para os volumes nuclear e citoplasmático da célula de Leydig (figura 10A-B). Além disso, nas diferentes regiões investigadas, todos os parâmetros morfométricos avaliados para a célula de Leydig foram maiores ($p < 0,05$) aos 7 dias, reduzindo-se gradativamente até por volta de 90 dias de idade, quando então estes valores se mantiveram estáveis até os 180 dias (figura 10).

3.6 Proliferação das células somáticas testiculares

Considerando que as células de Sertoli não mais se dividem após a puberdade, em todas as três diferentes regiões do parênquima testicular estudadas o índice de proliferação desta célula de suporte foi estimado no período de 7 a 120 dias, (figura 11A). Entre as diferentes idades avaliadas, o índice de proliferação desta importante célula somática foi maior aos 7 dias (~5%, $p < 0,05$), tornando-se relativamente estável (1- 2%) nas idades subsequentes tanto em RT quanto em TA. Por outro lado, em ID o índice mitótico da célula de Sertoli aumentou significativamente de ~1 para ~6% ($p < 0,05$) aos 60 dias de idade, diminuindo para ~1% nas idades subsequentes. Comparando-se as três regiões avaliadas, aos 7 dias de idade o índice de proliferação das células de Sertoli foi maior ($p < 0,05$) em RT e TA. Embora em uma amplitude menor, aos 120 dias os valores obtidos para este parâmetro foi maior ($p < 0,05$) em ID e RT (figura 11A).

Com relação às células peritubulares mióides, nenhuma diferença significativa foi observada para o índice mitótico entre as diferentes regiões testiculares avaliadas (figura 11B). As maiores taxas de proliferação para esta célula somática foram observadas nas idades mais iniciais (7-30 dias), enquanto as menores taxas de proliferação foram observadas principalmente aos 90-120 dias (figura 11B).

Os índices de proliferação das células de Leydig estão apresentados na figura 11C. Exceto para ID, na qual o maior índice mitótico ($p < 0,05$) foi observado aos 7 dias de idade, nenhuma diferença significativa foi encontrada para as outras duas regiões, ao longo do período investigado no presente estudo. Considerando as três diferentes regiões, mais células de Leydig estavam dividindo em RT aos 7 dias ($p < 0,05$) e em RT e TA aos 30 dias de idade enquanto figuras mitóticas predominavam em TA nos animais pós-púberes ($p < 0,05$). Interessantemente, em todas as idades investigadas, as menores taxas de proliferação de células de Leydig foram observadas em ID, enquanto, de maneira geral, tendência oposta foi observada para as células de Leydig presentes em RT.

Foi observada correlação positiva e significativa, em duas regiões do testículo, para o índice de proliferação das células de Leydig e percentual de vasos sanguíneos (RT, $r = 0,48$; ID, $r = 0,55$) e entre o percentual de mitoses das células peritubulares mióides e vasos

sanguíneos (RT, $r = 0,59$; ID, $r = 0,67$). A atividade mitótica das células de Leydig em ID mostrou correlação significativa ($p < 0,05$) com os índices de proliferação de células de Sertoli em RT ($r = 0,60$) e TA ($r = 0,70$).

4. Discussão

Este é o primeiro estudo a descrever as diferenças região-específicas no parênquima testicular em suínos, durante o desenvolvimento pós-natal, e a associar este evento com o padrão de proliferação das células somáticas, bem como, com a função e maturação dos túbulos seminíferos. O conhecimento obtido no presente trabalho pode, por exemplo, ser utilizado em estudos envolvendo a metodologia de xenoenxerto, que é atualmente uma importante ferramenta para se investigar a função testicular em suínos.

Baseado em vários parâmetros investigados, concluímos que a maturação dos túbulos seminíferos se inicia em ID e RT e parece estar associada com o aumento no tamanho e função da célula de Leydig em ID. Além disso, as células de Sertoli apresentaram índice mitótico mais alto aos 7 e 120 dias de idade em RT, coincidindo com os períodos de maior proliferação desta célula somática, conforme previamente descrito para suínos (França et al., 2000). Desse modo, os dados no presente estudo sugerem que o crescimento primário dos túbulos seminíferos em comprimento ocorre a partir de RT.

Independentemente da região, de maneira geral o padrão de desenvolvimento testicular pós-natal em suínos quanto aos diversos importantes parâmetros investigados tais como peso testicular, diâmetro tubular, percentual dos diferentes componentes do parênquima testicular, secreção de fluido tubular, volume individual de célula de Leydig e o estabelecimento da puberdade, bem como a primeira liberação de espermatozoides do epitélio seminífero, seguem a mesma tendência previamente descrita na literatura para várias raças de suínos (Van Straaten & Wensing, 1977; Flor-Cruz & Lapwood, 1978; França et al., 2000).

O crescimento em comprimento dos cordões/túbulos seminíferos, o qual tem início com a proliferação das células de Sertoli (França et al., 2000), eventualmente fornece ambiente adequado para o estabelecimento dos nichos das células-tronco espermatogoniais, o que provavelmente favorece a auto-renovação espermatogonial (Hess et al., 2006). Entretanto, para manter a contínua produção de espermatozoides ao longo de toda a vida adulta (maturidade), os túbulos seminíferos devem estabelecer a “onda do epitélio seminífero” (Perey et al., 1961). Para isso, algumas células de Sertoli provavelmente devem parar de dividir e diferenciar mais cedo que outras. Estas células que se diferenciaram mais cedo suportam as fases iniciais da espermatogênese, as quais incluem a diferenciação das espermatogônias mais jovens e a subsequente maturação das células

germinativas através da meiose, na primeira onda do ciclo espermatogênico. Por outro lado, as células de Sertoli remanescentes continuam sua proliferação durante a primeira onda com a finalidade de permitir o crescimento testicular, além de criar novas regiões de nichos, para as quais as células-tronco espermatogoniais que se auto-renovaram irão migrar, e iniciar uma sequência de estádios do ciclo espermatogênico nesta onda em formação. No presente estudo houve uma evidente tendência de que maior proliferação de células de Sertoli tenha ocorrido em RT após o nascimento e antes da puberdade, enquanto túbulos seminíferos contendo espermátides, bem como a primeira formação de espermatozóides, foram observados particularmente em ID aos três e quatro meses de idade, respectivamente. Assim, baseando-se nestes resultados, podemos concluir que a primeira onda da espermatogênese em suínos acontece em ID e se estende predominantemente para RT, onde novas células de Sertoli formam mais nichos. De maneira geral, a baixa taxa de proliferação das células de Sertoli em ID corrobora a hipótese de que as células de Sertoli presentes nesta região param de se dividir mais precocemente, em função da necessidade destas células suportarem a diferenciação do epitélio seminífero durante a primeira onda da espermatogênese. Também suportando esta hipótese, a aparência mais “madura” das células de Leydig em ID poderia estar associada ao possível aumento da concentração de testosterona nesta região. Isto seria consistente com o resultado do presente estudo, o qual mostra que ID é a primeira região onde ocorre proliferação das células germinativas ao longo do processo espermatogênico, onde a fase meiótica ou espermatocitária é a mais dependente de andrógenos (Sharpe, 1994; De Gent et al., 2004; Wang et al., 2009).

A saída da célula de Sertoli da fase proliferativa coincide com aumento do volume nuclear desta célula, o início da secreção de fluido tubular, formação de lume, surgimento e intensa proliferação de espermátocitos primários, formação e desenvolvimento da barreira de célula de Sertoli e do citoesqueleto desta célula. Conforme já mencionado, estes parâmetros são considerados bons marcadores da diferenciação/maturação da célula de Sertoli (Russell et al., 1989; Gondos & Berndston, 1993; França et al., 2000; Leal & França, 2008). Assim, a correlação significativa observada entre o volume nuclear da célula de Sertoli e o percentual ocupado pelo lume tubular em RT, e particularmente em ID, é uma evidência do estado funcional mais maduro/diferenciado da célula de Sertoli nestas duas regiões do testículo em suínos. Corroborando este achado, o diâmetro dos cordões/túbulos seminíferos foi significativamente maior aos 90 dias de idade em ID e RT, quando comparado com os valores observados para este parâmetro aos 60 dias de idade. Ao que parece, este padrão de estabelecimento do lume tubular é necessário para permitir que o fluido dos túbulos seminíferos siga em direção ao mediastino (Ford & Wise, 2009).

Particularmente aos 90 dias de idade, as células de Sertoli em TA apresentavam-se funcionalmente mais imaturas em comparação com as outras duas regiões, e a progressão das células germinativas ao longo da espermatogênese estava também atrasada em TA. Embora uma cuidadosa e detalhada avaliação morfológica do parênquima testicular tenha sido conduzida no presente estudo, nós não temos uma justificativa que explique o atraso observado na maturação/diferenciação das células de Sertoli em TA. Uma vez que a atividade mitótica da célula de Leydig em ID apresentou correlação significativa com o índice de proliferação da célula de Sertoli em TA e RT, esta célula esteroidogênica poderia estar desempenhando importante papel na função da célula de Sertoli, bem como no desenvolvimento do testículo como um todo.

À semelhança dos resultados já descritos na literatura (Van Straaten & Wensing, 1978; Peyrat et al., 1981; Lunstra et al., 1986; França et al., 2000), o percentual de células de Leydig no parênquima testicular foi muito alto no presente estudo, particularmente aos 7-30 dias após o nascimento, e o volume individual desta célula alterou-se substancialmente durante o desenvolvimento pós-natal do testículo. Porém, dramática diferença regional com relação aos vários parâmetros avaliados para as células de Leydig foram encontrados. Assim, exceto para o índice mitótico, o qual foi baixo em ID, os volumes do núcleo e do citoplasma da célula de Leydig, bem como o volume individual desta célula, foram significativamente maiores nesta região ao longo de todo o período investigado, o que refletiu, sobremaneira, no alto percentual observado para estas células em ID. Uma vez que nenhuma correlação evidente foi encontrada entre o tamanho das células de Leydig e outros parâmetros investigados, estes resultados tornaram-se difíceis de serem interpretados. Além disso, esta mesma tendência foi observada em todas as idades investigadas, o que impediu correlacionar estes achados com a puberdade e o estabelecimento da espermatogênese. Entretanto, à semelhança das células peritubulares mióides, o índice de proliferação das células de Leydig em ID apresentou-se significativamente correlacionado com o percentual de vasos sanguíneos. Ao contrário do observado para os vasos sanguíneos, o percentual de tecido conjuntivo foi sempre menor em ID. Pelo fato das células de Leydig serem aparentemente mais funcionais em ID, esta correlação com os vasos sanguíneos e o baixo percentual de tecido conjuntivo seria, de certa forma, esperada. Finalmente, deve ser mencionado que, independentemente das diferentes regiões, as células de Leydig estão funcionalmente relacionadas com as células de Sertoli e peritubulares mióides (França et al., 2000; DiNapoli & Capel, 2008; Alvarenga & França, 2009; Welsh et al., 2009). Neste contexto, a partir dos resultados encontrados no presente estudo, podemos inferir que, em suínos, estas interações apresentam um gradiente distinto do centro para a periferia do parênquima testicular (Ford & Wise, 2009). No entanto, os mecanismos que coordenam todos estes eventos deveriam ser melhor investigados, considerando-se inclusive a

importância dos vasos sanguíneos durante o desenvolvimento testicular (Combes et al., 2009). Uma vez que a literatura claramente demonstra que o desenvolvimento pós-natal do testículo de equinos apresenta um padrão distinto (Clemmons et al., 1995), e que este padrão é agora corroborado pelos presentes achados em suínos, esta peculiaridade pode também ser investigada em outras espécies de mamíferos. Este gradiente de desenvolvimento e crescimento testicular, que pode ser estabelecido já durante a diferenciação gonadal no período fetal (Bowles et al., 2006; Koubova et al., 2006), é claramente observado em algumas espécies de vertebrados ditos inferiores, mesmo durante a vida adulta (Schulz et al., 2009).

Algumas breves considerações a respeito da escolha das diferentes regiões testiculares investigadas no presente estudo devem ser aqui feitas. Além de vários outros parâmetros, os resultados em particular obtidos para as células de Leydig, os quais foram notadamente significativos em ID em todas as idades investigadas, claramente demonstram que pelo menos esta região apresenta características distintas em suínos. Ao se agrupar TA e ID ou mesmo ID e RT, observa-se que os resultados encontrados foram estatisticamente significativos para aproximadamente 25% e 30% dos parâmetros investigados, respectivamente. A partir deste exercício, podemos assumir que o nosso desenho experimental foi apropriado. Entretanto, este raciocínio não exclui a possibilidade de existência outras regiões funcionalmente distintas no parênquima testicular de suínos durante o desenvolvimento pós-natal.

Em resumo, os resultados da presente investigação mostraram a existência de um gradiente região-específico para a maturação dos túbulos seminíferos e para o desenvolvimento das células somáticas em suínos, particularmente para as células de Leydig, as quais parecem desempenhar importante papel no desenvolvimento pós-natal do testículo. Estes achados são funcionalmente importantes e oferecem uma nova perspectiva a respeito da investigação do desenvolvimento testicular nesta espécie doméstica. Por exemplo, o conhecimento obtido no presente estudo pode ser utilizado em estudos envolvendo o xenoenxerto de fragmentos de testículo como ferramenta para se investigar a função testicular em suínos (Rodriguez-Sosa & Dobrinski, 2009). Particularmente pelo fato de que a área da qual os fragmentos de testículo para o enxerto são obtidos pode, em tese, influenciar o desenvolvimento destes fragmentos. As observações aqui apresentadas podem também auxiliar na interpretação dos resultados inesperados encontrados envolvendo a proliferação/diferenciação da célula de Sertoli, em condições experimentais de hiper e hipotireoidismo transitório em suínos (Tarn et al., 1998; Klobucar et al., 2003; Cooke et al., 2005). Entretanto, muitas questões permanecem ainda em aberto, tais como, por que as células de Leydig aparentam ser mais funcionais em ID? Poderia este resultado refletir algumas diferenças na condição funcional desta importante célula esteroideogênica e/ou

existem diferentes populações de células de Leydig em regiões particulares do testículo que poderiam ser reguladas por distintos fatores extrínsecos ou intrínsecos/locais? Estas e outras relevantes questões relacionadas ao desenvolvimento e a função testiculares são particularmente importantes para suínos, nos quais o número total de espermatozóides por ejaculado é crucial para o aumento da eficiência reprodutiva na cadeia produtiva de suínos.

5. Referências bibliográficas

ALVARENGA ER, FRANÇA LR. Effects of different temperatures on testis structure and function, with emphasis on somatic cells, in sexually mature Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*). *Biol Reprod.* 2009;80:537-44.

AT-TARAS EE, BERGER T, MCCARTHY MJ, CONLEY AJ, NITTA-ODA BJ, ROSER JF. Reducing estrogen synthesis in developing boars increases testis size and total sperm production. *J Androl.* 2006;27:552-9.

AT-TARAS EE, KIM IC, BERGER T, CONLEY A, ROSER JF. Reducing endogenous estrogen during development alters hormone production by porcine Leydig cells and seminiferous tubules. *Domest Anim Endocrinol.* 2008;34:100-8.

BERGER T, MCCARTHY M, PEARL CA, AT-TARAS E, ROSER JF, CONLEY A. Reducing endogenous estrogens during the neonatal and juvenile periods affects reproductive tract development and sperm production in postpuberal boars. *Anim Reprod Sci.* 2008;109:218-35.

BOUIN P, ANCEL P. La glande interstitielle du testicule chez le cheval. *Arch Zool. Exp Gen.* 1905; 3:391-437.

BOWLES J, KNIGHT D, SMITH C, WILHELM D, RICHMAN J, MAMIYA S, YASHIRO K, CHAWENGSAKSOPHAK K, WILSON MJ, ROSSANT J, HAMADA H, KOOPMAN P. Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science.* 2006;312:596-600.

CLEMMONS AJ, THOMPSON DL JR, JOHNSON L. Local initiation of spermatogenesis in the horse. *Biol Reprod.* 1995;52:1258-67.

COMBES AN, WILHELM D, DAVIDSON T, DEJANA E, HARLEY V, SINCLAIR A, KOOPMAN P. Endothelial cell migration directs testis cord formation. *Dev Biol.* 2009;326:112-20.

COOKE PS, HOLSBERGER DR, FRANÇA LR. Thyroid hormone regulation of Sertoli cell development. In: SKINNER MK, GRISWOLD MD (Ed), *Sertoli cell Biology*, Elsevier Academic Press, 2005, p.217-26.

COOL J, CAPEL B. Mixed signals: development of the testis. *Semin Reprod Med.* 2009;27:5-13.

COUROT M, HOCHEREAU-DE REVIERS M-T, ORTAVANT R. Spermatogenesis. In: JOHNSON AD, GOMES WR, VAN DEMARK NL (Ed), The Testis, vol. I, Academic Press, 1970, p.339-442.

DE GENDT K, SWINNEN JV, SAUNDERS PT, SCHOONJANS L, DEWERCHIN M, DEVOS A, TAN K, ATANASSOVA N, CLAESSENS F, LÉCUREUIL C, HEYNS W, CARMELIET P, GUILLOU F, SHARPE RM, VERHOEVEN G. A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;10:1327-32.

DIERICHS R, WROBEL KH, Schilling E. Light and electron microscopic studies on the porcine testicular interstitial cells during postnatal development. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*. 1973;143:207-27

DINAPOLI L, CAPEL B. SRY and the standoff in sex determination. *Mol Endocrinol*. 2008;22:1-9.

FLOR-CRUZ SZ, LAPWOOD KR. A longitudinal study of pubertal development in boars. *Int J Androl*. 1978;1:317–30.

FORD JJ, WISE TH. Sertoli cell differentiation in pubertal boars. *J Anim Sci*. 2009;87:2536-43.

FRANÇA LR, SILVA VA JR, CHIARINI-GARCIA H, GARCIA SK, DEBELJUK L Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. *Biol Reprod*. 2000;63:1629-36.

GONDOS B, BERNDSTON WE. Postnatal and pubertal development. In: RUSSELL LD, GRISWOLD MD (Ed), The Sertoli Cell, Cache River Press; 1993, p.115–54.

GRISWOLD SL, BEHRINGER RR. Fetal Leydig cell origin and development. *Sex Dev*. 2009;3:1-15.

HESS RA, COOKE PS, HOFMANN MC, MURPHY KM. Mechanistic insights into the regulation of the spermatogonial stem cell niche. *Cell Cycle*. 2006;5:1164-70.

JOHNSON L. Spermatogenesis. In: CUPPS PT (Ed), Reproduction in Domestic Animals, Academic Press, 1991, p.173-219.

KARL J, CAPEL B. Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Dev Biol.* 1998;203:323-33.

KLOBUCAR I, KOSEC M, CEBULJ-KADUNC N, MAJDIC G. Postnatal hypothyroidism does not affect prepubertal testis development in boars. *Reprod Domest Anim.* 2003;38:193-208.

KOUBOVA J, MENKE DB, ZHOU Q, CAPEL B, GRISWOLD MD, PAGE DC. Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:2474-9.

LEAL MC, FRANÇA LR. Postnatal Sertoli and Leydig cell proliferation and the establishment of puberty and sexual maturity in *Chinchilla lanigera* (Rodentia, Chinchillidae). *Reprod Fertil Dev.* 2008;20:665-73.

LEAL MC, FRANÇA LR. Slow increase of Sertoli cell efficiency and daily sperm production causes delayed establishment of full sexual maturity in the rodent *Chinchilla lanigera*. *Theriogenology.* 2009;71:509-18.

LUNSTRA DD, FORD JJ, CHRISTENSON RK, ALLRICH RD. Changes in Leydig cell ultrastructure and function during pubertal development in the boar. *Biol Reprod.* 1986;34:145-58.

LUNSTRA DD, WISE TH, FORD JJ. Sertoli cells in the boar testis: changes during development and compensatory hypertrophy after hemicastration at different ages. *Biol Reprod.* 2003;68:140-50.

NISHIKAWA Y, HORIE T. Studies on the development of the testes and epididymides of the horse. I. Studies on the development of the testes of the horse, with special reference to singularity and the age of sexual maturity. *Natl Inst Agric Sci Jpn. Bull Ser G Anim Husbandry.* 1955;10:229-349.

ORTH JM, GUNSALUS GL, LAMPERTI AA. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology.* 1988;122:787-94.

O'SHAUGHNESSY P, MONTEIRO A, VERHOEVEN G, DE GENDT K, ABEL M. Effect of FSH on testicular morphology and spermatogenesis in gonadotrophin-deficient hypogonadal (hpg) mice lacking androgen receptors. *Reproduction.* 2009.

PEREY B, CLERMONT Y, LEBLOND CP. The wave of the seminiferous epithelium in the rat. *Am. J. Anat.* 1961;108, 47-77.

PEYRAT JP, MEUSY-DESSOLLE N, GARNIER J. Changes in Leydig cells and luteinizing hormone receptors in porcine testis during postnatal development. *Endocrinology.* 1981;108:625-31.

PLANT TM, RAMASWAMY S, SIMORANGKIR D, MARSHALL GR. Postnatal and pubertal development of the rhesus monkey (*Macaca mulatta*) testis. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1061:149-62.

RAMESH R, PEARL CA, AT-TARAS E, ROSER JF, BERGER T. Ontogeny of androgen and estrogen receptor expression in porcine testis: effect of reducing testicular estrogen synthesis. *Anim Reprod Sci.* 2007;102:286-99.

RODRIGUEZ-SOSA JR, DOBRINSKI I. Recent developments in testis tissue xenografting. *Reproduction.* 2009;138:187-94.

RUSSELL LD, BARTKE A, GOH JC. 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.* 1989;184:179-89.

SCHULZ RW, DE FRANÇA LR, LAREYRE JJ, LEGAC F, CHIARINI-GARCIA H, NOBREGA RH, MIURA T. Spermatogenesis in fish. *Gen Comp Endocrinol.* 2009.

SHARPE RM. Regulation of Spermatogenesis. In: KNOBIL E, NEILL JD (Ed.), *The Physiology of Reproduction*, Raven Press, 1994; p.1363–1434.

SHARPE RM, MCKINNELL C, KIVLIN C, FISHER JS. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction.* 2003;125:769-84.

TARN CY, ROSENKRANS CF JR, APPLE JK, KIRBY JD. Effects of 6-N-propyl-2-thiouracil on growth, hormonal profiles, carcass and reproductive traits of boars. *Anim Reprod Sci.* 1998;50:81-94.

TRIPEPI S, CARELLI A, PERROTTA E, BRUNELLI E, TAVOLARO R, FACCILOLO RM, CANONACO M. Morphological and functional variations of Leydig cells in testis of the

domestic pig during the different biological stages of development. *J Exp Zool.* 2000;287:167-75.

VAN STRAATEN HW, WENSING CJ. Histomorphometric aspects of testicular morphogenesis in the pig. *Biol Reprod.* 1977;17:467-72

VAN STRAATEN HW, WENSING CJ. Leydig cell development in the testis of the pig. *Biol Reprod.* 1978;18:86-93.

WANG RS, YEH S, TZENG CR, CHANG C. Androgen receptor roles in spermatogenesis and fertility: lessons from testicular cell-specific androgen receptor knockout mice. *Endocr Rev.* 2009;30:119-32.

WELSH M, SAUNDERS PT, ATANASSOVA N, SHARPE RM, SMITH LB. Androgen action via testicular peritubular myoid cells is essential for male fertility. *FASEB J.* 2009.

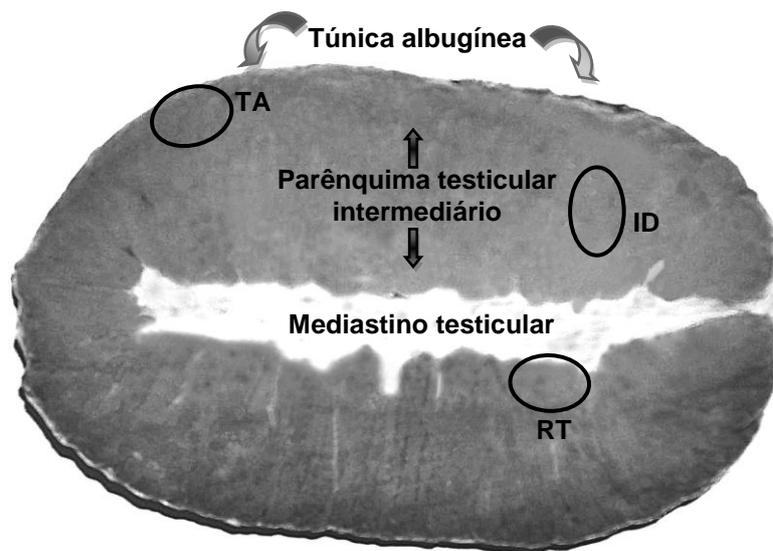


Figura 1 – Representação das regiões do parênquima testicular das quais foram coletadas as amostras utilizadas no presente estudo. TA, túnica albugínea; ID, região intermediária; RT, região de transição dos túbulos seminíferos com o mediastino/*rete testis*.

Biometria e índice gonadossomático

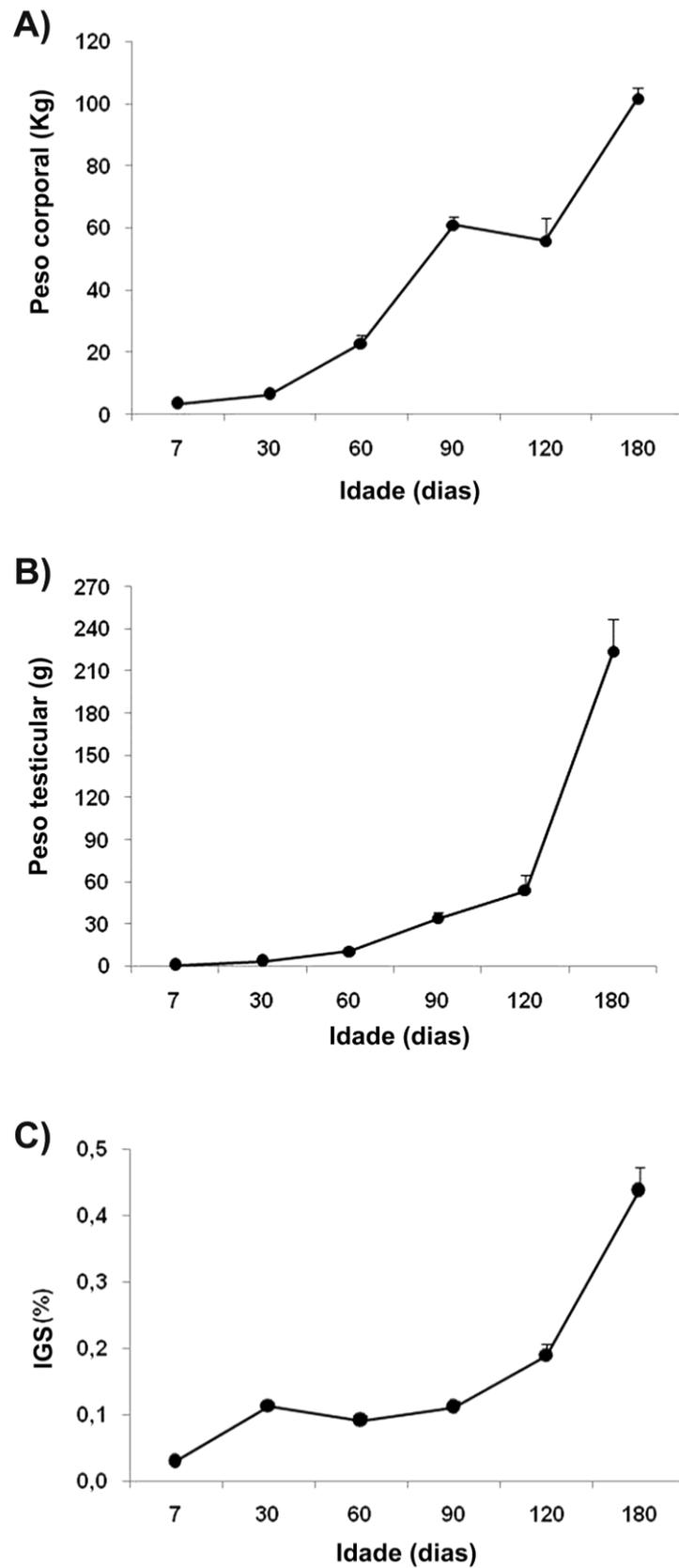


Figura 2 – Dados biométricos durante o desenvolvimento pós-natal (média \pm e.p.m.). A, peso corporal; B, peso testicular; C, índice gonadossomático (IGS).

Diâmetro dos cordões/túbulos seminíferos

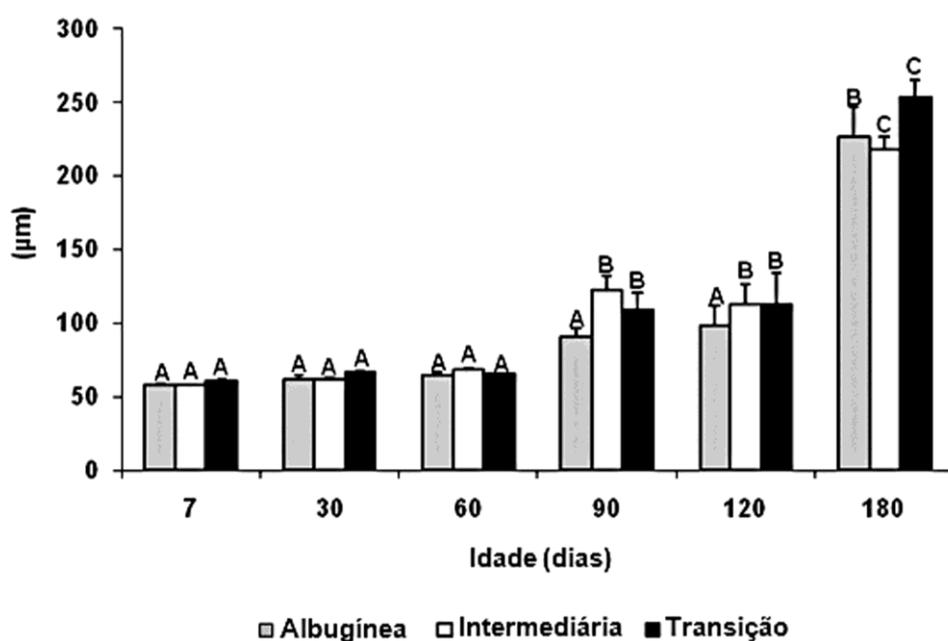


Figura 3 - Diâmetro dos cordões e túbulos seminíferos em três diferentes regiões do parênquima testicular de suínos, durante o desenvolvimento pós-natal (média \pm e.p.m.). Letras maiúsculas diferentes denotam diferenças entre idades para uma mesma região ($p < 0,05$).

Figura 4 – Proporção volumétrica dos componentes do compartimento tubular em três diferentes regiões do parênquima testicular de suínos, durante o desenvolvimento pós-natal (média \pm e.p.m.). Letras minúsculas e maiúsculas diferentes denotam diferenças entre regiões em uma mesma idade e entre idades para uma mesma região, respectivamente ($p < 0,05$).

Proporção volumétrica dos componentes do compartimento tubular

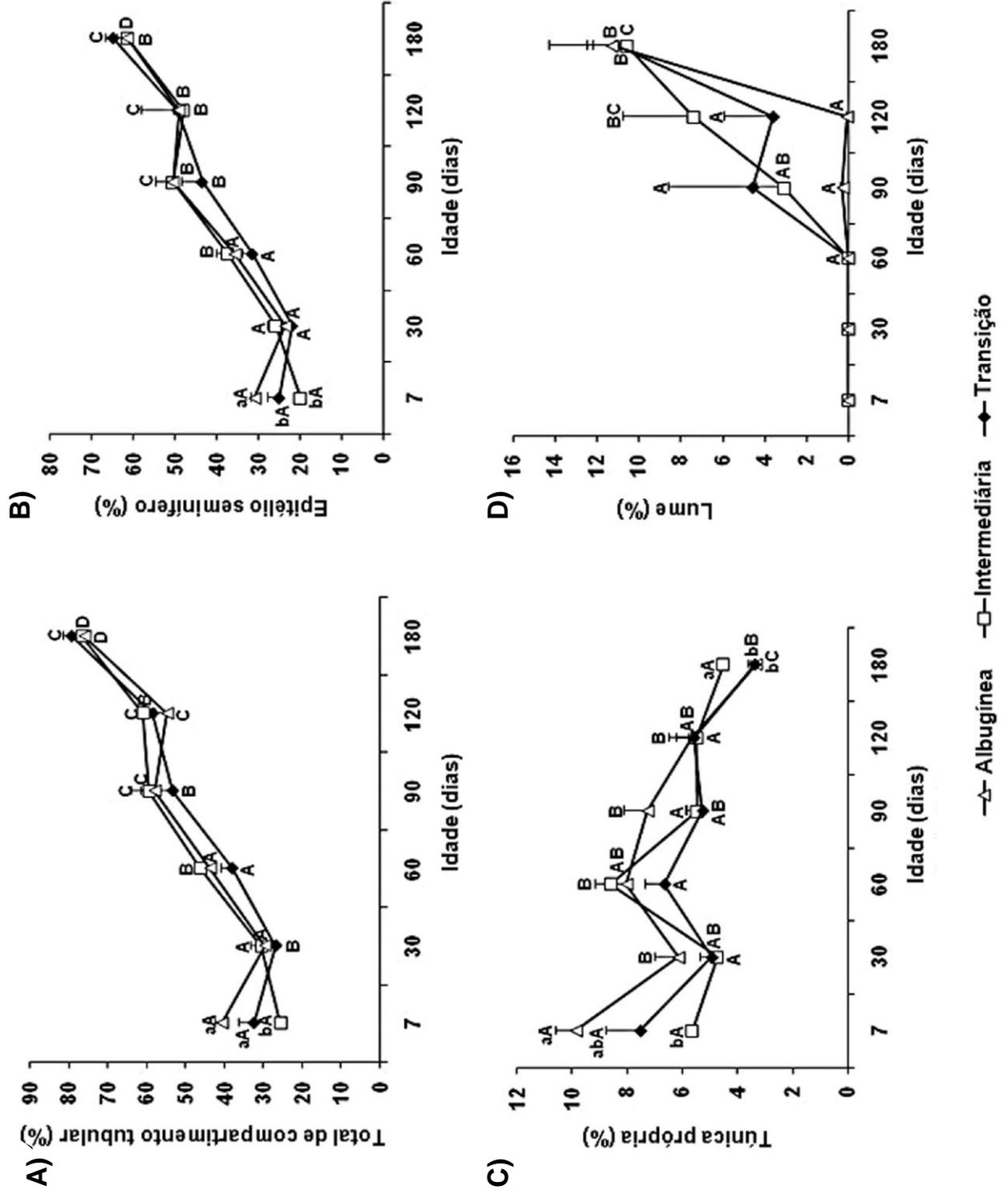
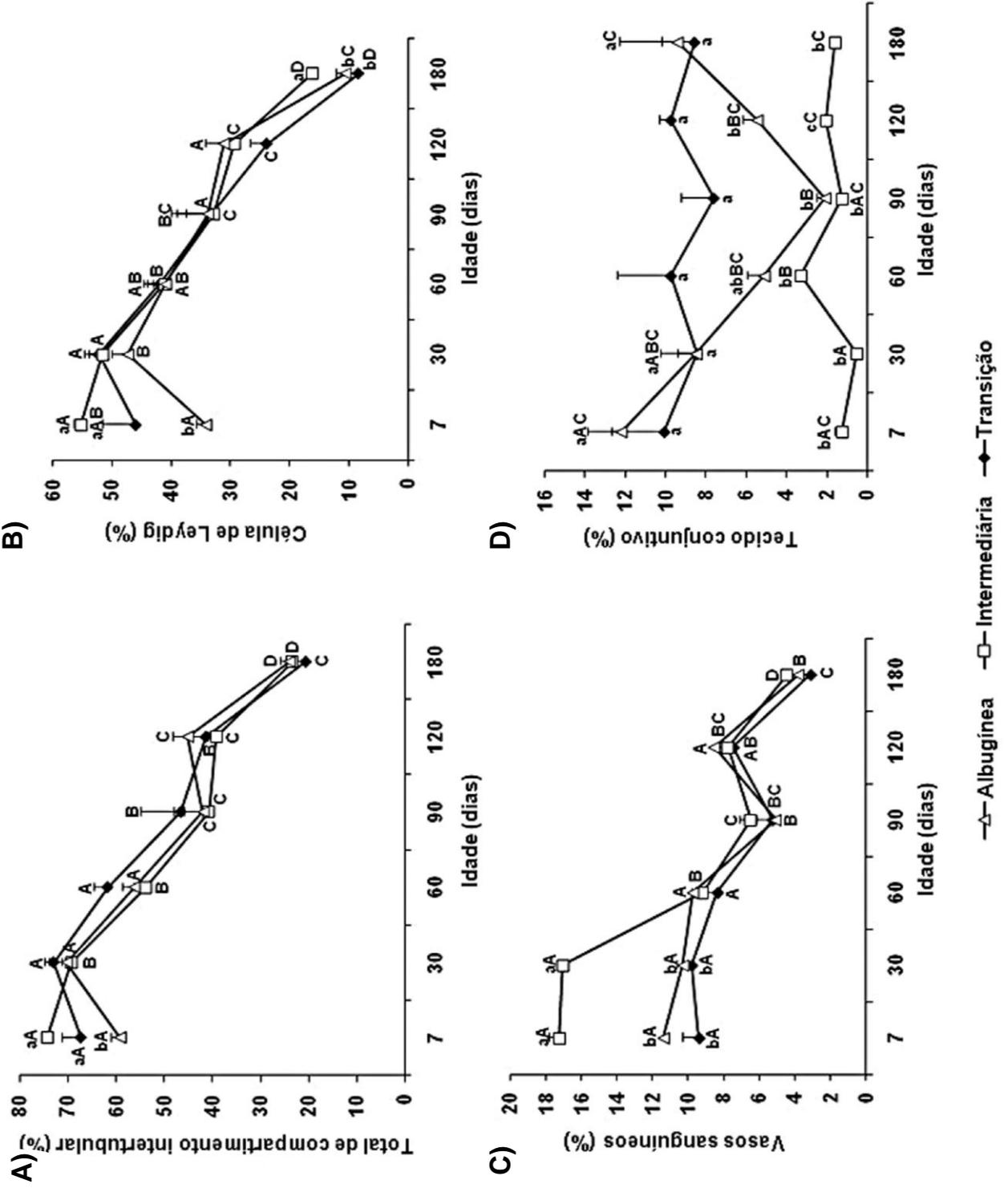


Figura 5 – Proporção volumétrica dos componentes do compartimento intertubular em três diferentes regiões do parênquima testicular de suínos, durante o desenvolvimento pós-natal (média \pm e.p.m.). Letras minúsculas e maiúsculas diferentes denotam diferenças entre regiões em uma mesma idade e entre idades para uma mesma região, respectivamente ($p < 0,05$).

Proporção volumétrica dos componentes do compartimento intertubular



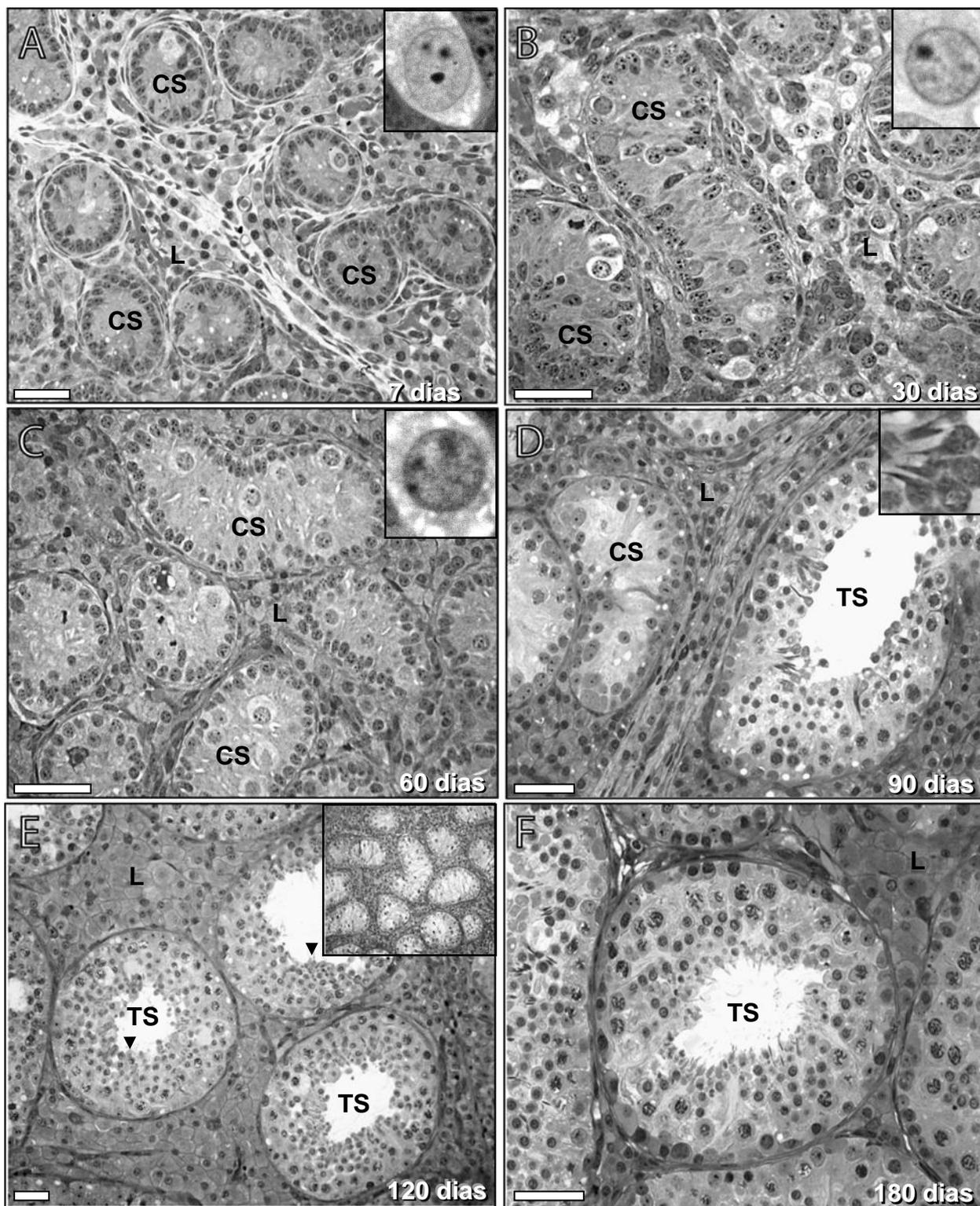


Figura 6 – Morfologia do parênquima testicular de suínos pré-púberes (A – E) e pós-púberes (F). Aos 7 dias (A), observa-se cordões seminíferos (CS) constituídos por células de Sertoli imaturas e gonócitos (detalhe). Com 30 e 60 dias (B e C, respectivamente), ainda predominam os cordões seminíferos, porém, a célula germinativa mais avançada observada foi a espermatogônia do tipo A (ver detalhe). Já aos 90 dias (D) observa-se que o processo de maturação dos túbulos seminíferos ocorre de maneira desigual, uma vez que são encontrados concomitantemente cordões, túbulos imaturos e túbulos seminíferos (TS), nos quais a célula germinativa mais avançada é a espermatíde alongada (detalhe). Este mesmo padrão ainda pode ser observado aos 120 dias (E, detalhe superior), entretanto nos túbulos seminíferos o processo espermatogênico progride e espermatídes alongadas no estágio 6 da morfologia tubular passam a ser observadas (cabeça de seta). Após a puberdade (180 dias, F) a espermatogênese já está completamente estabelecida em todos os túbulos seminíferos. Barra = 40 µm.

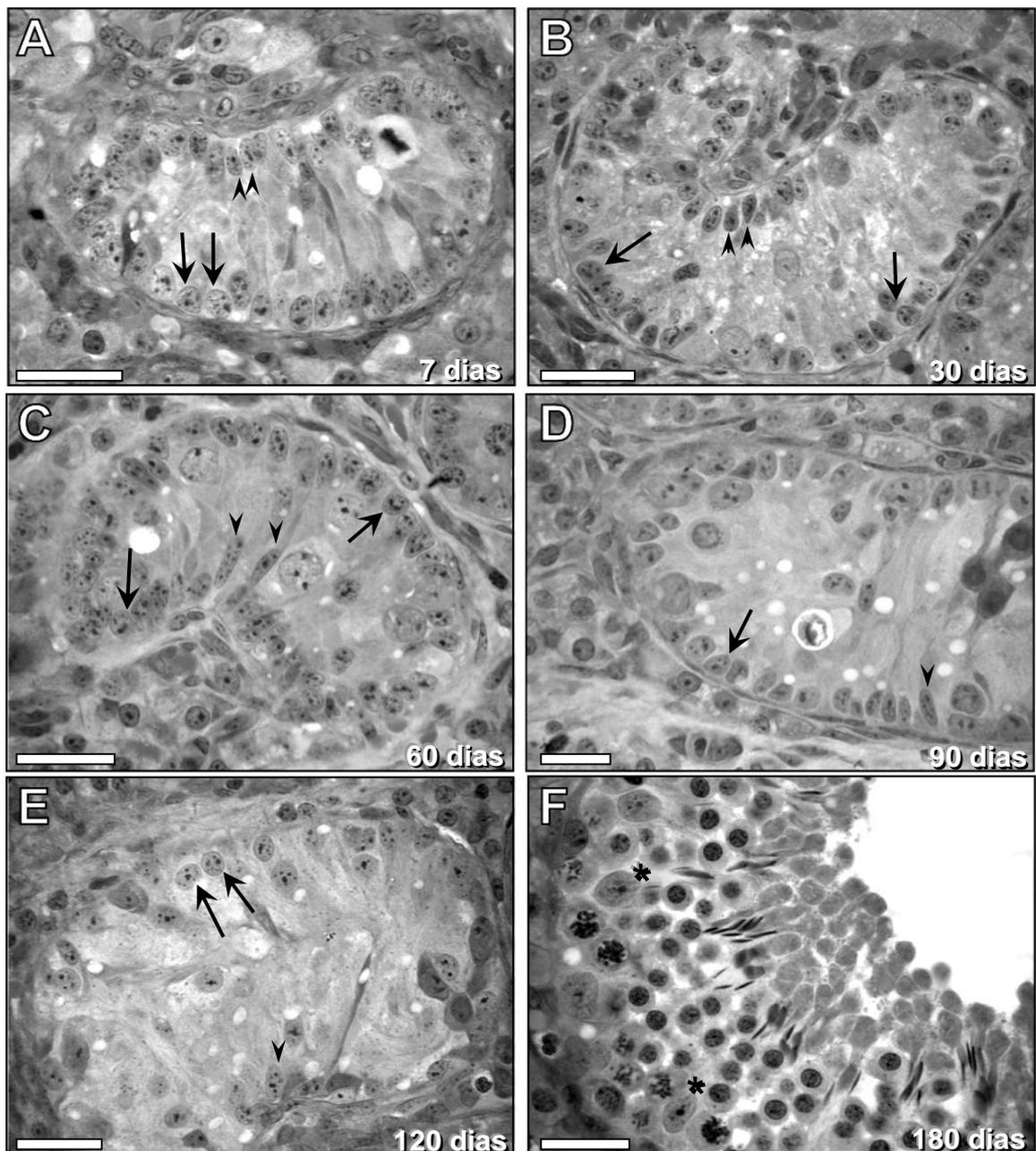


Figura 7 – Núcleo de célula de Sertoli aos 7 (A), 30 (B), 60 (C), 90 (D), 120 (E) e 180 (F) dias de idade. Em todas as idades pré-púberes investigadas (A – E), células de Sertoli imaturas exibem dois tipos nucleares morfologicamente distintos: arredondado/ovóide (setas) ou alongado/colunar (cabeças de seta). Após a puberdade (F), somente células de Sertoli maduras/diferenciadas com núcleo típico e nucléolo evidente (*) foram observadas. A- E, barra = 30 μ m; F, barra = 20 μ m.

Volume nuclear da célula de Sertoli

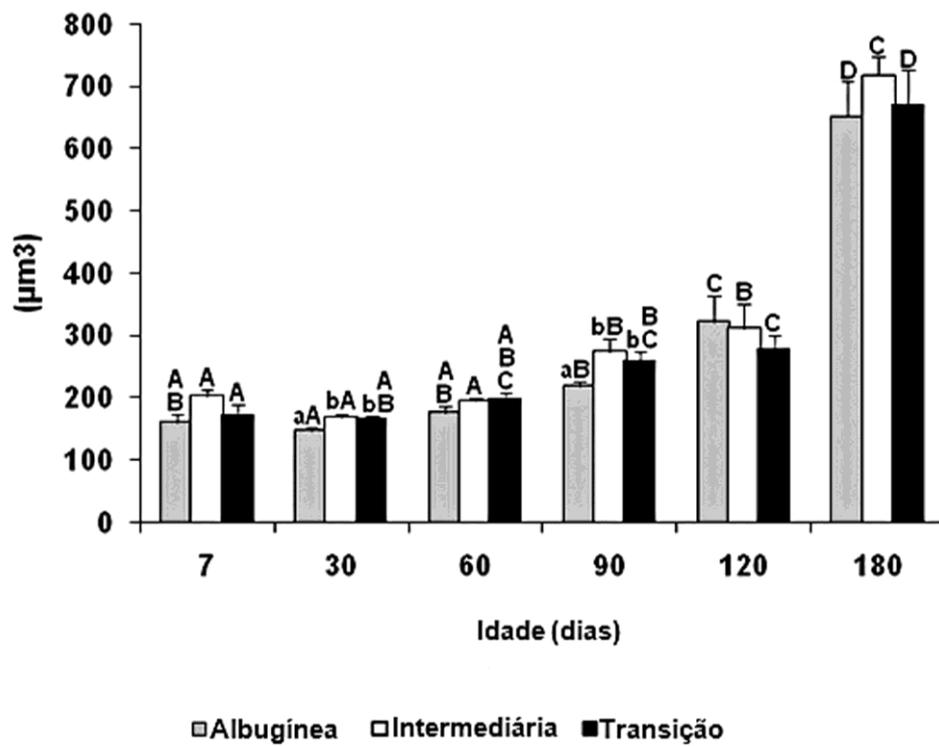


Figura 8 – Volume nuclear da célula de Sertoli em três diferentes regiões do parênquima testicular de suínos, durante o desenvolvimento pós-natal (média ± e.p.m.). Letras minúsculas e maiúsculas diferentes denotam diferenças entre regiões em uma mesma idade e entre idades para uma mesma região, respectivamente ($p < 0,05$).

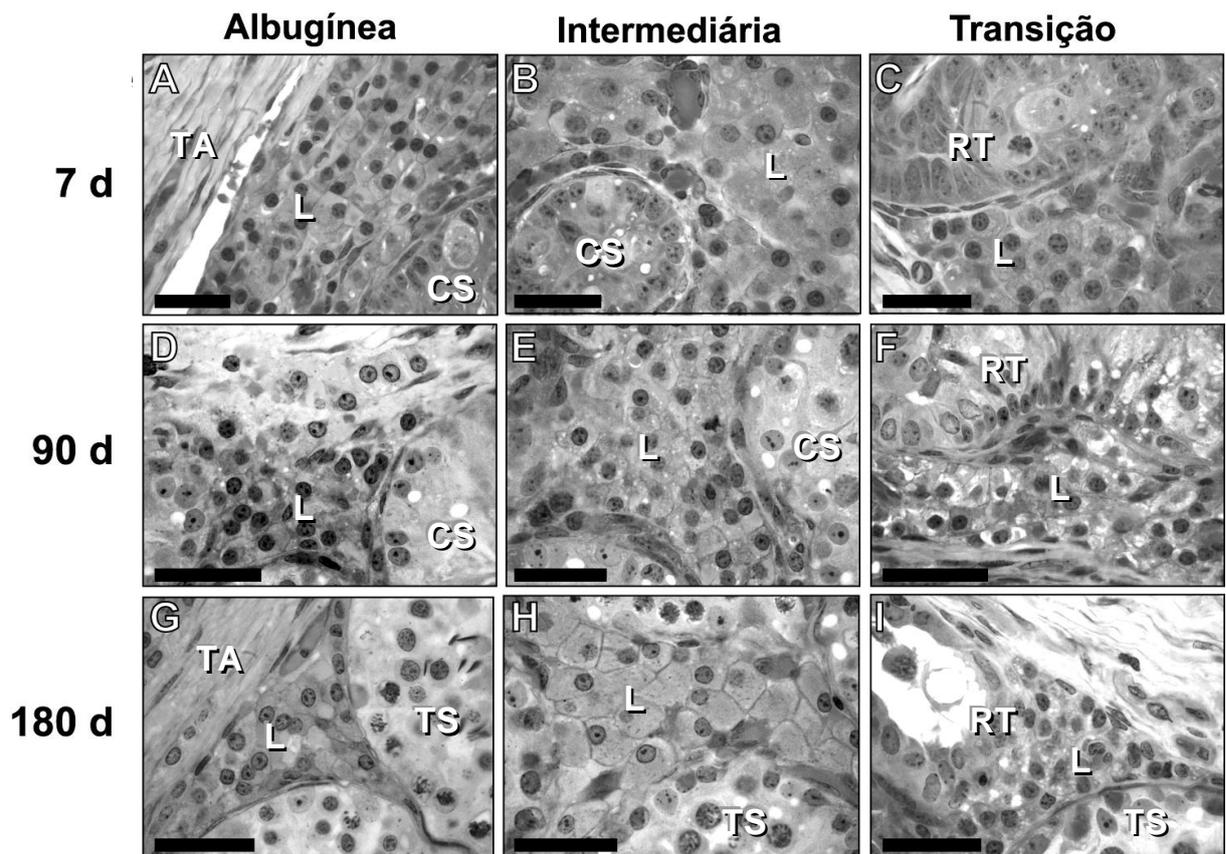


Figura 9 – Células de Leydig em diferentes regiões do parênquima testicular de suínos aos 7, 90 e 180 dias de idade. Observe que as células de Leydig próximas ou abaixo da túnica albugínea (A, D, G) e próximas ao mediastino (região de transição; C, F, I) são menores em comparação àquelas localizadas na região intermediária (B, E, H). TA, túnica albugínea; RT, região de transição; CS, cordões seminíferos; TS, túbulos seminíferos; L, células de Leydig. Barra = 40 μ m.

Figura 10 – Volumes nuclear, citoplasmático e individual de células de Leydig localizadas em três diferentes regiões do parênquima testicular de suínos, durante o desenvolvimento pós-natal (média \pm e.p.m.). Letras minúsculas e maiúsculas diferentes denotam diferenças entre regiões em uma mesma idade e entre idades para uma mesma região, respectivamente ($p < 0,05$).

Morfometria das células de Leydig

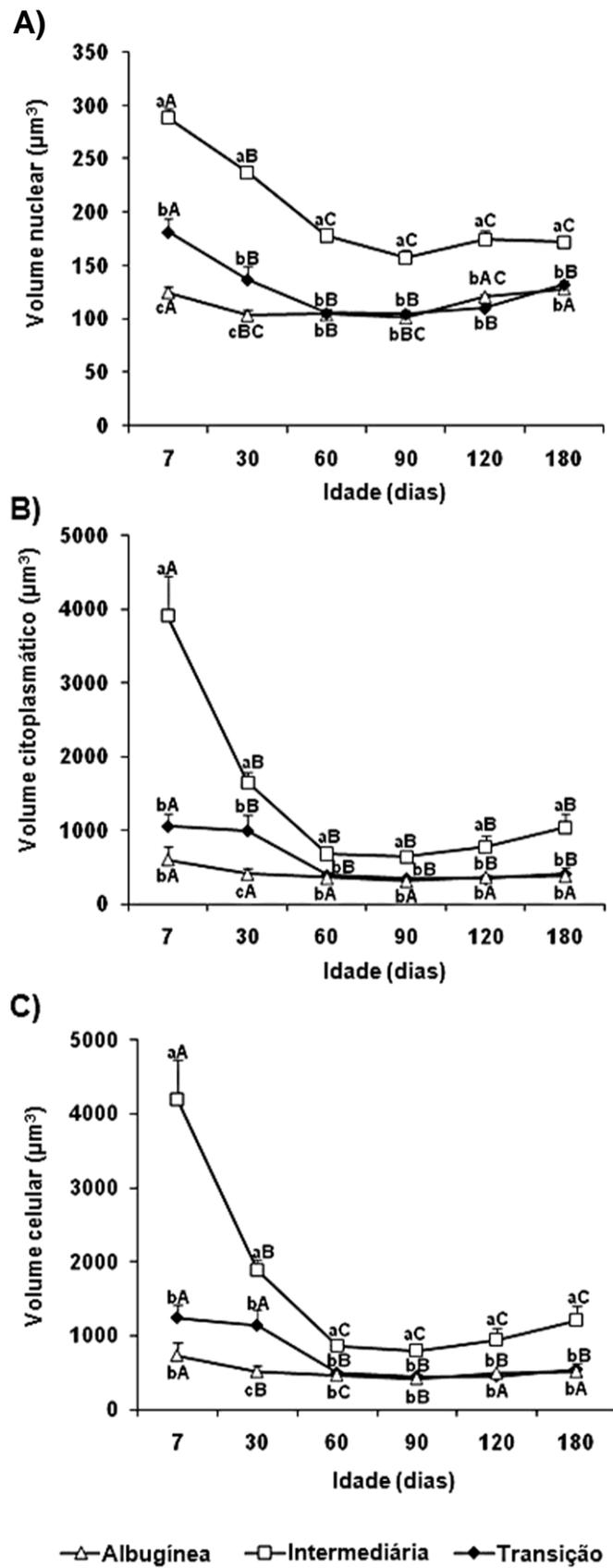
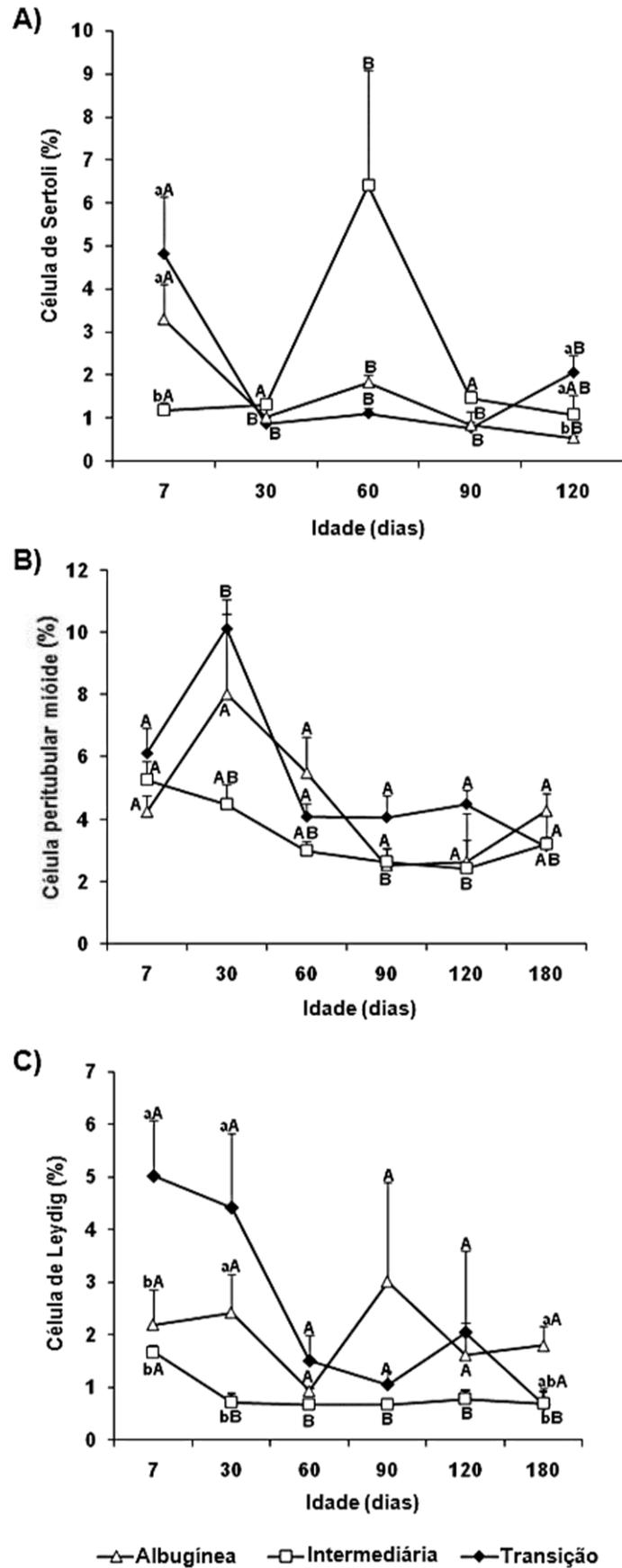


Figura 11 – Índice de proliferação das células somáticas localizadas nas diferentes regiões do parênquima testicular de suínos, durante o desenvolvimento pós-natal (média \pm e.p.m.). Letras minúsculas e maiúsculas diferentes denotam diferenças entre regiões em uma mesma idade e entre idades para uma mesma região, respectivamente ($p < 0,05$).

Índices de proliferação de células somáticas



**CAPÍTULO 2: EFEITOS DO TRATAMENTO PÓS-NATAL COM
ACETATO DE LEUPROLIDE (LUPRON® *DEPOT*) NA
HISTOFISIOLOGIA DO TESTÍCULO DE SUÍNOS.**

CAPÍTULO 2

EFEITOS DO TRATAMENTO PÓS-NATAL COM ACETATO DE LEUPROLIDE (LUPRON® DEPOT) NA HISTOFISIOLOGIA DO TESTÍCULO DE SUÍNOS

Resumo

O desenvolvimento pós-natal dos testículos em mamíferos é marcado por importantes modificações na estrutura e composição deste órgão, as quais são reguladas principalmente pelo FSH e LH e resultantes de complexas interações cruciais para a maturação dos elementos somáticos e germinativos. Estudos recentemente realizados em nosso laboratório demonstraram que em suínos a maturação dos túbulos seminíferos não ocorre de forma aleatória, e sim, de maneira regionalizada. Nesse contexto, os objetivos principais deste capítulo do presente trabalho foram os de se avaliar os efeitos da inibição do eixo hipotálamo-hipófise-gônada nos níveis de gonadotrofinas (FSH, LH), testosterona (T) e 17 β -estradiol (E2) e na estrutura e função de três diferentes regiões do parênquima testicular de suínos, tratados com leuprolide em duas diferentes idades. Dezenove suínos Landrace x Large White pré-púberes foram tratados com acetato de leuprolide (100 μ gr/Kg/PC s.c.) aos 35 (T35) e 70 (T70) dias de idade. Estes suínos [Controle, n=9; T35, n=4; T70, n=6;] tiveram seu sangue coletado em intervalos semanais e mensais, do início do tratamento até os nove meses de idade, com a finalidade de avaliar os níveis séricos de FSH, LH, T e E2. Ao final do experimento os suínos sexualmente maduros foram orquiectomizados e os fragmentos de seus testículos, utilizados para análises histomorfométricas, foram obtidos de três diferentes regiões do parênquima testicular conforme segue: a) próximo à túnica albugínea; b) na região de transição entre os túbulos seminíferos e a *rete testis*; e c) na região intermediária localizada entre as duas outras regiões investigadas. Os resultados encontrados mostraram que, apesar das concentrações séricas de LH, FSH e T não terem apresentado, de maneira geral, alterações marcantes em decorrência dos dois períodos de tratamentos com leuprolide, o tratamento foi efetivo, promovendo alterações significativas, particularmente na região intermediária do parênquima testicular em T35, para vários importantes parâmetros morfométricos avaliados, tais como: percentual e volume nuclear das células de Leydig, lume tubular e túnica própria. Em conjunto, os resultados obtidos no presente capítulo confirmam aqueles encontrados no capítulo anterior (Avelar et al., 2010), os quais mostraram que a região intermediária desempenha papel crucial no desenvolvimento testicular de suínos, principalmente a partir das células de Leydig, que funcionalmente se mostraram distintas daquelas localizadas nas outras duas regiões investigadas. Ainda, os resultados encontrados no presente capítulo sugerem que as células

Leydig localizadas na região intermediária foram mais susceptíveis ao tratamento realizado com leuprolide no início do segundo mês de idade.

Palavras-chave: Suínos, desenvolvimento testicular pós-natal, GnRH, acetato de leuprolide, gonadotrofinas (FSH e LH), testosterona, células de Sertoli, células de Leydig, regionalização do parênquima testicular.

1. Introdução

O desenvolvimento pós-natal em mamíferos é marcado por grandes modificações na estrutura e função testiculares, resultantes de complexas interações das células somáticas testiculares entre si e com as células da linhagem germinativa. Estas interações, reguladas por fatores intrínsecos e extrínsecos, são cruciais para os processos de maturação do parênquima testicular.

O hormônio folículo-estimulante (FSH) é considerado o principal fator mitogênico para as células de Sertoli (Orth, 1982; Sharpe, 1994; França & Chiarini-Garcia, 2005). Considerando que, de maneira espécie-específica, as células de Sertoli apresentam capacidade de suporte relativamente fixa para células germinativas (Russell & Peterson, 1984; Orth et al., 1988; França & Russel, 1998), o número destas células estabelecido no período pré-púbere determina, em última análise, o tamanho do testículo e a magnitude da produção espermática nos animais adultos (Berndtson et al., 1987; Hochereau-De Reviers et al., 1987; Orth et al., 1988; Orth, 1993; Hess et al., 1993; Johnson et al., 1994; França & Russel, 1998; França & Chiarini-Garcia, 2005; França et al., 2005).

Apesar de estar bem estabelecido em roedores (ratos e camundongos), o papel do FSH na proliferação de células de Sertoli em suínos é considerado ainda controverso (Lunstra et al., 2003; McCoard et al., 2003; Wagner & Claus, 2009). Entretanto, trabalho desenvolvido por França e colaboradores (2000) demonstrou que os picos de proliferação de células de Sertoli (no primeiro mês de idade e pré-púbere) correlacionam-se temporalmente com aumentos nas concentrações plasmáticas de FSH. Neste sentido, aumento do comprimento dos túbulos seminíferos em suínos tratados com FSH durante a fase pós-natal inicial (8-40 dias de idade) foi observado, sendo o mesmo atribuído ao maior índice de proliferação das células de Sertoli em resposta a esta gonadotrofina (Swanlund et al., 1995). Após o estabelecimento da puberdade e durante toda a vida adulta dos animais, o FSH, juntamente com os andrógenos, regula diversas e importantes funções das células de Sertoli maduras, determinantes para o desenvolvimento do processo espermatogênico (Hess & França, 2007; O'Shaughnessy et al., 2009).

A proliferação e a diferenciação das células de Leydig fetais são reguladas por diversos hormônios, tais como os esteróides sexuais (estrógenos e andrógenos) e o hormônio tireoidiano, e por fatores de transcrição como o GATA (Wu et al., 2007). À semelhança das células de Leydig fetais, a proliferação e diferenciação das células de Leydig do tipo adulto e suas progenitoras são também reguladas por diversos hormônios e fatores, dentre os quais podem ser mencionados o hormônio luteinizante (LH), a gonadotrofina coriônica humana (hCG), o fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I), o fator de crescimento tumoral (TGF) alfa e beta, FSH, o hormônio anti-Mulleriano (AMH),

estrógenos, hormônio tireoidiano e andrógenos (Rouiller-Fabre et al. 1998; Mendis-Handagama & Ariyaratne, 2001; Wu et al., 2007).

Na maioria das espécies já investigadas, as células de Leydig apresentam padrão de desenvolvimento bifásico que ocorre durante os períodos fetal e pós-natal (Gondos et al., 1976). Já em suínos, e provavelmente em humanos e outras espécies de primatas, estas células mostram padrão de desenvolvimento trifásico (Dierichs et al., 1973; Van Straaten & Wensing, 1978; Griswold & Behringer, 2009). Assim, neste padrão, duas fases transitórias são observadas: a primeira ocorre no início do período fetal, enquanto as outras duas acontecem durante o período perinatal e por volta do 3º mês de idade, persistindo esta última durante a puberdade e maturidade sexual (Dierichs et al., 1973; Van Straaten & Wensing, 1978; França et al., 2000). Ainda em suínos, variações nas concentrações dos receptores de LH e andrógenos nas células de Leydig são encontradas, estando as mesmas diretamente associadas às alterações significativas observadas para o volume individual destas células (Dierichs et al., 1973; Van Straaten & Wensing, 1978; Peyrat et al., 1981; Lunstra et al., 1986; França et al., 2000; Tripepi et al., 2000).

Estudos em equinos mostram que a maturação dos túbulos seminíferos ocorre de maneira não-aleatória (Bouin & Ancel, 1905; Nishikawa & Horie, 1955; Johnson, 1991; Clemmons et al., 1995). Recentemente, estes achados foram também observados em suínos (Ford & Wise, 2009; Avelar et al., 2010), nos quais foi demonstrado a existência de um gradiente de maturação, onde os túbulos seminíferos localizados na região intermediária do parênquima testicular iniciam esta maturação que se estende em seguida para a região central ou de transição com a *rete testis* e, mais tardiamente, para a periferia do órgão, próximo à túnica albugínea (Avelar et al., 2010). Ainda em suínos, foi demonstrado que as células de Leydig localizadas na região intermediária provavelmente são o fator primário na regulação deste padrão de desenvolvimento do parênquima testicular (Avelar et al., 2010).

O acetato de leuprolide é um agonista/antagonista sintético de GnRH que, devido a sua formulação de longa duração (*depot*), em dose única, permite a liberação constante da droga por várias semanas após sua administração (Luan & Bodmeier, 2006). Os efeitos do tratamento prolongado com o leuprolide são bifásicos. Assim, inicialmente, observa-se uma fase estimulatória extremamente curta (poucas horas) com elevação dos níveis plasmáticos de LH, FSH e testosterona, seguida de uma fase inibitória relativamente longa (semanas), com redução na secreção destes hormônios (Okada et al., 1994). Devido a estas propriedades, o leuprolide pode ser utilizado durante o período de desenvolvimento pós-natal dos testículos, com a finalidade de se investigar a proliferação das células de Sertoli e de Leydig e função testicular (Miranda, 2006). No único trabalho disponível na literatura para suínos utilizando-se esta droga (Sinclair et al., 2001), foi demonstrado que após uma única aplicação de

acetato de leuprolide o efeito supressor máximo ocorre duas semanas após o tratamento, estendendo-se este efeito por um período de cerca de um mês.

Considerando a importância das gonadotrofinas para a proliferação das células de Sertoli e de Leydig, e as interações celulares que ocorrem durante o desenvolvimento pós-natal dos testículos, o principal objetivo do presente trabalho foi o de se avaliar os efeitos da inibição do eixo hipotálamo-hipófise-gônada, através do acetato de leuprolide, na estrutura e função testiculares de suínos Landrace x Large White sexualmente maduros, tratados em duas diferentes idades que antecedem o estabelecimento da puberdade. A partir do conhecimento recente mostrando a existência de gradiente de maturação dos túbulos seminíferos no testículo de suínos, o presente estudo também teve como objetivo investigar três diferentes regiões do parênquima deste órgão, tendo como pontos de referência a túnica albugínea e o mediastino testicular.

2. Material e Métodos

2.1. Animais

Dezenove suínos Landrace x Large White provenientes da Fazenda Experimental “Prof. Hélio Barbosa” da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, foram utilizados. Estes animais foram distribuídos em três diferentes grupos conforme segue: controle (n = 9); T35 (n = 4); e T70 (n = 6). Os animais dos grupos T35 e T70 foram tratados com acetato de leuprolide (*Lupron® Depot*) conforme será descrito no item 3.2.3. Ao final do experimento, os suínos que na época contavam com 270 dias de idade, foram orquiectomizados. Os testículos destes animais foram separados do epidídimo, pesados e, com o auxílio de uma lâmina afiada, seccionados longitudinalmente. Após este procedimento, fragmentos do testículo foram obtidos de três diferentes regiões do parênquima testicular: próximo à túnica albugínea (TA); na transição dos túbulos seminíferos com o mediastino (*rete testis*) (RT); e na região intermediária (ID) entre TA e RT (Figura 1). Estas amostras foram fixadas por imersão em glutaraldeído tamponado 5%, incluídas em plástico (glicol metacrilato) e rotineiramente preparadas para análises histológicas e morfométricas. Antes da cirurgia, todos os suínos foram sedados pela via intramuscular com 1 mg/Kg de azaperone (Destress, Des-Far Laboratórios LTDA, São Paulo, SP, Brasil) e anestesiados pela via endovenosa com 3 mg/Kg com a associação zolazepam e tiletamina (Zoletil 50; Virbac do Brasil, Ind. e Com. LTDA, São Paulo, Brazil). Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados por veterinários e seguiram as recomendações do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais – CETEA/UFMG.

2.2. Avaliação do peso corporal

O peso corporal dos suínos foi obtido ao nascimento (Dia 0) e a desmama (Dia 28). A partir do dia 35, quando os animais foram distribuídos em grupos, seguiram-se pesagens semanais até o 150º dia pós-natal, as quais foram então realizadas quinzenalmente até o final do experimento (Dia 270). Merece ser ressaltado que, embora os tratamentos com leuprolide tenham se iniciado aos 35 e 70 dias de idade (ver descrição detalhada no próximo item), independentemente do momento do tratamento os animais de todos os três grupos tiveram os seus pesos tomados desde o nascimento.

2.3. Tratamento com acetato de leuprolide e análises hormonais

A fim de se verificar o papel das gonadotrofinas em diferentes períodos do desenvolvimento testicular pós-natal de suínos, os animais foram tratados com o acetato de leuprolide (Lupron® *Depot*). Esta droga, com uma formulação de liberação lenta (depot), foi injetada s.c. em dose única de 100 µg/Kg PV aos 35 (T35) e 70 (T70) dias de idade. Os suínos controles, que também foram submetidos ao mesmo efeito da manipulação, receberam 0,8 mL de solução fisiológica estéril (veículo) pela também pela via subcutânea. Para avaliação dos níveis séricos dos hormônios folículo estimulante (FSH), luteinizante (LH), testosterona (T) e 17 β-estradiol (E2), as amostras de sangue foram obtidas entre 9:00 e 10:00 horas da manhã, com frequência semanal durante 7 semanas a partir da injeção de leuprolide, seguindo-se coletas mensais até os 9 meses, idade na qual todos os animais foram orquiectomizados. Entretanto, no presente trabalho serão apresentadas as concentrações hormonais correspondentes ao dia de início do tratamento (Dia 0), ao período compreendido entre a 1ª e 4ª semanas pós-tratamento, a 6ª semana após a injeção de leuprolide e a última idade, que corresponde ao final do período experimental (38ª semana). Vale mencionar que as amostras coletadas no dia 0 foram feitas imediatamente antes da injeção do leuprolide.

As amostras de sangue obtidas foram centrifugadas e os soros coletados foram armazenados em freezer a -20º C até a avaliação dos mesmos. As concentrações séricas de FSH, LH, T e E2 foram determinadas por meio do método de quimioluminescência no equipamento Immulite 2000 (Siemens Medical Solutions Diagnostics, IL, USA), realizado pelo laboratório de análises clínicas Hermes Pardini. Merece ser ressaltado que, devido ao seu enorme custo financeiro, baseado no conhecimento prévio sobre os efeitos do leuprolide em suínos (Sinclair et al., 2001), bem como nos dados relativos ao desenvolvimento testicular desta espécie e das curvas de gonadotrofinas (FSH e LH) e de esteróides (T e E2) (Schwarzenberger et al., 1993; França et al., 2000), estas avaliações hormonais foram feitas nos intervalos/períodos acima mencionados, que foram por nós considerados críticos para o

objetivo do presente estudo. No entanto, apesar dos procedimentos adotados, pelo fato dos efeitos do leuprolide em suínos serem ainda pouco conhecidos, não podemos garantir que os intervalos por nós escolhidos foram totalmente adequados. Os altos custos das dosagens hormonais também limitaram o número de animais avaliados. Desta forma, dos nove animais controles, seis foram selecionados para as avaliações hormonais já mencionadas. Quanto aos suínos tratados, todos os quatro de T35 foram utilizados, enquanto somente quatro dentre os seis disponíveis foram investigados para T70.

2.4. Morfometria testicular

2.4.1. Proporção volumétrica e diâmetro dos túbulos seminíferos

As proporções volumétricas dos componentes testiculares presentes nas três diferentes regiões do parênquima testicular foram determinadas através de microscopia de luz, em aumento de 400x, utilizando-se retículo com 441 intersecções ajustada à ocular do microscópio. Nesta análise, 15 campos escolhidos ao acaso e distribuídos em três fragmentos representativos de cada uma das regiões foram utilizados, perfazendo-se um total de 6615 pontos por região investigada. Em cada uma das três regiões investigadas, o diâmetro tubular médio por animal foi obtido a partir da mensuração ao acaso de 30 secções transversais de túbulos seminíferos que apresentavam contorno o mais circular possível. Estas medidas foram realizadas utilizando-se régua micrométrica adaptada a uma das oculares de 10x, em aumento de 400x.

2.4.2. Células de Leydig

O volume individual das células de Leydig foi obtido a partir do volume do núcleo e da proporção entre núcleo e citoplasma destas células. O volume do núcleo foi obtido utilizando-se a média do diâmetro nuclear, tendo sido avaliados 30 diâmetros nucleares para cada uma das regiões investigadas, por animal. O volume nuclear individual obtido foi expresso em (μm^3), utilizando-se a fórmula $4/3\pi R^3$, onde $R = \text{diâmetro nuclear}/2$. Para calcular a proporção entre núcleo e citoplasma, foi utilizado retículo com 441 intersecções (pontos), em aumento de 1000x. Aproximadamente mil pontos sobre células de Leydig foram contados em cada uma das três diferentes áreas do parênquima testicular, para cada animal utilizado.

2.5. Análise estatística

Todos os resultados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.). Os mesmos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e posteriormente as médias obtidas foram comparadas utilizando-se o teste Student Newman-Keuls. Análise de correlação de Pearson foi também realizada entre os parâmetros investigados. Para todos estes testes estatísticos utilizou-se o software STATISTICA 3.11 (StatSoft, Inc., Tulsa, Oklahoma, USA, 1995), sendo o nível de significância considerado igual a $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Pesos corporal e testicular e índice gonadossomático

Conforme pode ser observado na figura 2, o peso corporal dos suínos dos três grupos avaliados foi semelhante até o 35º dia pós-natal. Entretanto, no grupo que recebeu injeção do acetato de leuprolide aos 35 dias, observou-se, uma semana após o tratamento, redução ($p < 0,05$) no ganho de peso corporal, quando comparado aos animais controle. Embora de maneira geral esta tendência tenha se mantido até a idade de 180 dias, as diferenças encontradas não foram significativas. A partir desta idade, os pesos corporais em T35 mostraram flutuações também não significativas. Já nos suínos tratados aos 70 dias, não foram observadas flutuações evidentes no peso corporal. Desta forma, ao longo de todo o período investigado, a curva de desenvolvimento ponderal deste grupo foi bastante semelhante àquela do grupo controle e mesmo daquela obtida para os animais tratados aos 35 dias de idade (figura 2 e 3A).

As figuras 3B e C mostram que, embora tanto o peso testicular quanto o índice gonadossomático tenham sido menores em T35 (~6% e ~9%, respectivamente), as diferenças encontradas não foram significativas ($p > 0,05$). De maneira esperada, todos os grupos experimentais investigados mostraram correlação positiva e significativa ($p < 0,05$) entre o peso corporal e o peso testicular (controle, $r = 0,81$; T35, $r = 0,95$; T70, $r = 0,85$).

3.2. Concentrações séricas de FSH, LH, testosterona e 17 β -estradiol

Os dados referentes às dosagens hormonais obtidas para os grupos T35 e T70 estão mostrados, respectivamente, nas tabelas 1 e 2. Conforme já foi mencionado, as comparações expressadas em semanas apresentadas nestas tabelas tiveram como ponto de referência o início do tratamento. No entanto, as idades dos animais nos diferentes grupos experimentais e seus controles correspondentes são as mesmas. Apesar de terem sido observadas tendências variadas para os diferentes hormônios avaliados durante o período investigado apenas para a testosterona foram encontradas diferenças significativas, particularmente para T35 na segunda semana após o tratamento, e na primeira e segunda

semana para T70. Embora não tenha apresentado significância estatística, em comparação com os respectivos controles para ambos os períodos de tratamentos os níveis séricos das gonadotrofinas FSH e LH mostraram nítida tendência de diminuição nas primeiras semanas após a injeção de leuprolide, especialmente entre o Dia 0 e a primeira semana. Por outro lado, os níveis destas gonadotrofinas aumentaram entre três e dez vezes na quarta semana após a injeção de leuprolide. Após a quarta semana, tanto nos controles quanto em T35 estes hormônios apresentaram nítida tendência de aumento em seus níveis séricos. No entanto, apesar de seus respectivos controles terem apresentado esta mesma tendência, este aumento não ocorreu em T70. Em relação à testosterona e o 17 β -estradiol, embora não tenha havido diferenças significativas entre os grupos tratados e controles, seus níveis também apresentaram marcante aumento entre a terceira/quarta e a trigésima-oitava semanas, nos três diferentes grupos experimentais.

3.3. Diâmetro dos túbulos seminíferos e proporção volumétrica dos componentes do parênquima testicular

O diâmetro tubular foi semelhante entre os três grupos e entre as três regiões investigadas do parênquima testicular e ficou no patamar de 250-270 μm (figura 4). Tendência de maiores valores para este parâmetro foi observada para o grupo T35, particularmente nas regiões intermediária do parênquima testicular e próxima da túnica albugínea.

Conforme pode ser visto na figura 5 (A e B), os percentuais de túbulos seminíferos e de epitélio seminífero foram semelhantes nos três grupos experimentais e nas diferentes regiões investigadas. No entanto, pôde ser notado que os valores encontrados para o grupo T35, particularmente para a região intermediária, foram nitidamente menores ($p = 0,08$). Em contraste, tendência exatamente oposta foi observada para o percentual de lume tubular, onde os valores para T35 na região intermediária foram significativamente maiores (~35 e ~50%, respectivamente) do que aqueles encontrados para os grupos controle e T70 (figura 5C).

Entre as três regiões investigadas do parênquima testicular, o percentual de túnica própria nos grupos controle e T70 foi maior ($p < 0,05$) na região intermediária. Na comparação entre grupos, observou-se que em T35 houve redução de cerca de 40% ($p < 0,05$) no percentual de túnica própria na região intermediária, quando comparado com o percentual encontrado na mesma região para os grupos controle e T70 (figura 4D).

O percentual total do compartimento intertubular não sofreu variações significativas entre regiões ou mesmo entre grupos experimentais. Entretanto, na região intermediária, quando se compara os três grupos investigados, foi possível observar tendência de maior

percentual ($p > 0,05$) para este parâmetro em T35 (figura 6A). Com relação às células de Leydig, que é o principal componente do compartimento intertubular de suínos, diferenças regionais e entre grupos foram encontradas (figura 6B). Particularmente, o percentual de células de Leydig foi maior ($p < 0,05$) na região intermediária para o grupo T35, o qual também apresentou maior percentual (~50%; $p < 0,05$) em comparação com o grupo controle.

Quanto aos vasos sanguíneos, com exceção da região intermediária, as outras duas regiões do parênquima testicular investigadas mostraram tendência semelhante para este componente (figura 6C). Assim, verificou-se que os percentuais de vasos sanguíneos nos grupos controle e T35 foram maiores na região intermediária ($p < 0,05$), em comparação com os valores encontrados para estes mesmos grupos nas outras duas regiões estudadas. Já o percentual de vasos linfáticos na região intermediária foi o menor ($p < 0,05$) quando comparado com as outras regiões (figura 6D). Em relação ao percentual de tecido conjuntivo, apesar de não terem sido encontradas diferenças entre tratamentos na mesma região ($p > 0,05$), os valores observados da região intermediária foram menores do que àqueles observados nas regiões próximas à túnica albugínea e a *rete testis* (figura 6E).

3.4. Células de Leydig

Em sua grande maioria, no presente experimento os parâmetros investigados para os volumes nuclear, citoplasmático e individual das células de Leydig apresentaram grande variação entre as três diferentes regiões do parênquima testicular. Assim, os referidos volumes mencionados para estas células que se encontravam na região intermediária foram maiores ($p < 0,05$) do que aqueles das células presentes nas duas outras regiões (figura 7A-C). Particularmente, na comparação entre grupos o T35 apresentou os maiores valores para os volumes nuclear, citoplasmático e individual das células de Leydig. No entanto, somente para o volume nuclear as diferenças observadas foram significativas ($p < 0,05$) (figura 7A).

4. Discussão

O tratamento com o acetato de leuprolide, realizado em duas diferentes idades pré-púberes de suínos Landrace x Large White, teve como objetivos principais inibir a secreção das gonadotrofinas e avaliar os possíveis efeitos desta inibição nos níveis séricos de LH, FSH, T e 17- β estradiol, durante o desenvolvimento pós-natal destes animais. Os efeitos deste tratamento na estrutura e função testiculares de três diferentes regiões do parênquima deste órgão também foram avaliados, especificamente nos suínos sexualmente maduros. No nosso conhecimento, esta abordagem experimental é a primeira a ser utilizada para se investigar os efeitos deste agonista/antagonista de GnRH na histofisiologia testicular desta

espécie doméstica de grande importância na produção animal. Os resultados encontrados mostraram que, apesar dos níveis séricos de LH, FSH e T não terem apresentado, de maneira geral, alterações marcantes, o tratamento foi efetivo, promovendo alterações significativas em vários importantes parâmetros morfométricos avaliados, especificamente na região intermediária do parênquima testicular de suínos sexualmente maduros. Em conjunto, estes resultados confirmam estudos anteriores (Avelar et al., 2010), os quais indicam que esta região desempenha papel crucial no desenvolvimento testicular desta espécie, principalmente a partir das células de Leydig, que funcionalmente se mostraram distintas daquelas localizadas nas outras duas regiões investigadas. Ainda, os resultados encontrados sugerem que, provavelmente, as células Leydig localizadas na região intermediária foram mais susceptíveis ao tratamento realizado com leuprolide no início do segundo mês de idade.

A exposição ao acetato de leuprolide não afetou substancialmente o desenvolvimento corporal dos suínos investigados no presente estudo. Assim, a evolução do peso corporal dos mesmos seguiu tendência já citada na literatura para suínos Yorkshire tratados logo após o nascimento com dose similar àquela por nós utilizada (Sinclair et al., 2001). Resultado semelhante foi também encontrado para ratos tratados ao nascimento com a dose de 250 µg/Kg de peso corporal de acetato de leuprolide (Miranda, 2006). Apesar do peso testicular e do índice gonadossomático dos suínos tratados aos 35 dias terem apresentado tendência de menores valores, as diferenças observadas não foram significativas e similares ao encontrado também em suínos (Sinclair et al., 2001), contrastando assim com os resultados obtidos em nosso laboratório para ratos adultos (Miranda, 2006).

Baseando-se nas variações das concentrações séricas dos diferentes hormônios investigados no presente estudo, pode-se inferir que os tratamentos com o acetato de leuprolide na dose de 100 µg/Kg de peso corporal foram suficientes para reduzir, embora não significativamente, os níveis séricos de LH e FSH avaliados uma semana após o início de injeção da droga, os quais mostraram nítida tendência de aumento cerca de um mês esta injeção. Os níveis destas gonadotrofinas infelizmente não foram avaliados no único estudo disponível para suínos utilizando o leuprolide (Sinclair et al., 2001). No entanto, no trabalho realizado em ratos Wistar, o efeito supressor provocado pelo acetato de leuprolide resultou em redução dos níveis plasmáticos de FSH, que foram significativos em cerca de 40% das avaliações realizadas (Miranda, 2006). A tendência de redução observada nas primeiras semanas após o tratamento para os níveis de LH e FSH em suínos, seguida de aumento na 4ª semana, correspondem, respectivamente, ao período de supressão provocado pelo tratamento com a formulação de longa duração (*depot*) do acetato de leuprolide e ao “efeito rebote” deste tratamento, quando os gonadotrofos localizados na adenohipófise voltam

então a ser responsivos aos estímulos do GnRH produzido no hipotálamo (Okada et al., 1994; Miranda, 2006). Em ratos, este período supressor estendeu-se no mínimo até a 5ª semana após o tratamento, uma vez que o “efeito rebote” que resultou em elevados níveis de FSH se mostrou bastante evidenciado nesta espécie na 6ª semana (Miranda, 2006). Pelo fato de no presente estudo não termos mensurado os níveis de FSH na 5ª semana, não podemos excluir que o período de duração dos efeitos do leuprolide não seja mais longo. No entanto, de acordo com os valores obtidos para os níveis de FSH e LH na 6ª semana, podemos inferir que este “efeito rebote” poderia ser um pouco mais longo em suínos e assim, portanto, semelhante ao observado para o rato. Esta inferência seria mais lógica pelo fato da puberdade ocorrer mais tardiamente em suínos (~4 meses) quando comparado com ratos (~2 meses).

A redução significativa por nós encontrada logo após os tratamentos para os níveis de testosterona foi semelhante ao observado em suínos Yorkshire (Sinclair et al., 2001) e deve ser considerada como efeito secundário, uma vez que, conforme já é sabido, o LH, que é o principal estímulo para a síntese de andrógenos nas células de Leydig, encontrava-se diminuído neste período. Assim, as mesmas tendências foram encontradas para os níveis de testosterona em suínos tratados com acetato de leuprolide e avaliados em diferentes períodos ao longo do desenvolvimento testicular pós-natal. Isto é, ao nascimento (Sinclair et al., 2001) e aos 35 e 70 dias (presente estudo), apesar destes suínos terem sido tratados com diferentes dosagens de acetato de leuprolide (100 µg/Kg, Sinclair et al., 2001 e presente estudo; 200 µg/Kg Sinclair et al., 2001). Estes resultados em particular reforçam que a dosagem de acetato de leuprolide por nós utilizada foi efetiva, uma vez que os efeitos da mesma não diferem daqueles encontrados por Sinclair e colaboradores (2001) com as duas dosagens já mencionadas.

Durante o desenvolvimento pós-natal de suínos, observa-se um pico entre a 2ª e 4ª semanas de idade na concentração plasmática de testosterona, seguido por uma redução evidente que persiste por alguns meses (Schwazerberger et al., 1993, França et al., 2000). Este pico correlaciona-se diretamente com marcantes variações observadas no tamanho das células de Leydig (Van Straaten & Wensing, 1977; França et al., 2000). Com o estabelecimento da puberdade (~4-5 meses), observa-se novamente aumento na concentração de testosterona, a qual se mantém ao longo da vida adulta dos animais (Schwazerberger et al., 1993, França et al., 2000). Nos suínos tratados com leuprolide aos 35 dias, a supressão do eixo hipotálamo-hipófise-gônada ocorreu exatamente no início do período no qual os níveis fisiológicos deste andrógeno já apresentavam tendência de redução. Por outro lado, naqueles tratados aos 70 dias, os níveis de testosterona encontravam-se em patamar mais elevado. Desta forma, os períodos nos quais os tratamentos foram realizados provavelmente refletiram na diminuição significativa, mais

rápida e ligeiramente mais duradoura, observada para os níveis deste importante andrógeno em T70.

A concentração plasmática de estrógeno em suínos machos adultos pode atingir 280 pg/mL, sendo esta a maior concentração encontrada entre as espécies domésticas já investigadas (Claus & Hoffmann, 1980). De acordo com Ford (1983), durante o desenvolvimento pós-natal de suínos observa-se um pico na concentração de estrógenos entre a 1ª e 3ª semanas de vida. Após este período, observa-se redução dos níveis deste esteróide que se mantêm em um patamar mais baixo até o estabelecimento da puberdade. Os estrógenos no trato genital masculino estão particularmente associados com a reabsorção do fluido tubular nos ductulos eferentes e segmento inicial do epidídimo (Oliveira et al., 2001; Oliveira et al., 2004), e também como na função espermática e epididimária (Hess et al., 2001; Pearl et al., 2007; Carreau et al., 2009; Hoffmann et al., 2009). Especificamente em suínos, foi demonstrado que os estrógenos desempenham importante papel na regulação da proliferação das células de Sertoli (At-taras et al., 2006; Berger et al., 2008). Os valores para 17 β -estradiol encontrados no presente trabalho mostraram tendência semelhante àquela descrita na literatura. Entretanto, diferentemente do observado para a testosterona, nos períodos avaliados para ambos os grupos tratados com o acetato de leuprolide os valores encontrados para este esteróide mantiveram-se bastante próximos de seus respectivos controles. Desta forma, nas condições do presente experimento, podemos inferir que o tratamento com leuprolide parece não ter afetado a conversão de andrógenos em estrógenos. Finalmente, é importante mencionar que, para o grupo de animais tratados aos 35 dias (T35), devido a limitações das amostras (volume <500 μ L), não foi possível obter a concentração de 17 β -estradiol em todos os intervalos escolhidos para as avaliações hormonais. No entanto, ao que parece este aspecto não alterou a interpretação dos resultados obtidos para este hormônio.

Nas diversas raças de suínos já investigadas, as células de Leydig compreendem cerca de 50-70% do parênquima testicular nas primeiras semanas após o nascimento, diminuindo este percentual para aproximadamente 25% aos 70 dias de idade (Van Straaten & Wensing, 1977; França et al., 2000; Avelar et al., 2010). Esta notável densidade das células de Leydig está provavelmente associada a importantes funções desempenhadas por estas células, durante a fase do desenvolvimento testicular que antecede o estabelecimento da puberdade nesta espécie (Avelar et al., 2010). Conforme foi observado no presente estudo, o percentual de células de Leydig na região intermediária foi maior nos animais tratados aos 35 dias, em comparação com as outras duas regiões avaliadas, e também entre grupos nesta mesma região, onde os suínos tratados aos 35 dias apresentaram maior percentual destas células em comparação com os animais controles. Da mesma forma, nos três grupos investigados os volumes nuclear, citoplasmático e individual das células de

Leydig foram maiores nesta região. No entanto, somente para o volume nuclear foi observada diferença entre grupos, onde, mais uma vez, o T35 apresentou o maior valor. Estes resultados sugerem fortemente que as células de Leydig localizadas na região intermediária são funcionalmente mais ativas e que estas células aí localizadas podem ter apresentado maior índice de proliferação no grupo T35, durante o período experimental. Em suínos, o único relato longitudinal (do nascimento à maturidade sexual plena), referente ao número total de células de Leydig por testículo, mostra que estas células exibem dois evidentes períodos de proliferação (França et al., 2000). O primeiro, antes da puberdade, ocorre entre 1 e 2 meses de idade, enquanto o segundo está compreendido entre 5 e 6 meses, estando os mesmos correlacionados com picos de testosterona observados nestes períodos (França et al., 2000). Ainda de acordo com a literatura, as células de Leydig são insensíveis à estimulação produzida pelo LH no período compreendido entre a 4ª e a 8ª semanas pós-natal, sendo observada até mesmo redução no número de receptores para esta gonadotrofina (Vandalem et al., 1986). No entanto, a concentração de receptores de LH nesta célula tende a aumentar a partir da 12ª semana de idade (Peyrat, 1981; Vandalem et al., 1986). Entre os diversos fatores estimuladores da proliferação e diferenciação das células de Leydig do tipo adulto, o LH é um dos que apresentam papel mais estabelecido (Mendis-Handagama & Ariyaratne, 2001; Wu et al., 2007). Por outro lado, os estrógenos parecem exercer efeitos contrários aos do LH (Mendis-Handagama & Ariyaratne, 2001; Wu et al., 2007). Portanto, ao que parece, o aumento evidente na concentração sérica de LH, observado algumas semanas após a injeção de leuprolide em T35, pode ter ocorrido em uma fase na qual as células de Leydig localizadas na região intermediária do parênquima testicular estariam mais sensíveis aos efeitos estimulatórios promovidos por esta gonadotrofina. No entanto, como os estudos disponíveis até recentemente na literatura para suínos não levavam em consideração a regionalização funcional do parênquima testicular por nós agora estabelecida (Avelar et al., 2010), a interpretação acima aventada seria inédita e a primeira a fornecer subsídios neste aspecto.

A formação do lume tubular que ocorre antes do estabelecimento da puberdade deve-se ao fluido secretado pelas células de Sertoli, em direção ao centro do cordão seminífero (Russell et al., 1989). Nesta fase de desenvolvimento, esta importante função exercida pelas células de Sertoli é regulada tanto pelo FSH quanto pelos andrógenos (Sharpe, 1994). Entretanto, com o estabelecimento da puberdade e durante a maturidade, este processo passa a ser controlado exclusivamente pela ação dos andrógenos (Sharpe, 1994; De Gent et al., 2004). Nos animais adultos, em condições experimentais ou funcionais nos estádios do ciclo do epitélio seminífero que antecedem a espermição, as possíveis alterações observadas no percentual de lume tubular podem estar associadas à maior sensibilização das células de Sertoli pelos andrógenos (Bremner et al., 1994; Sharpe, 1994;

Atassonova et al., 2006). No presente estudo, os suínos sexualmente maduros que receberam injeção de leuprolide aos 35 dias de idade mostraram maior percentual de lume tubular na região intermediária do parênquima testicular. Conforme já foi discutido, maior percentual, bem como maior volume nuclear, foram observados para as células de Leydig localizadas nesta região, resultados estes que sugerem fortemente maior atividade funcional para estas células esteroidogênicas. Portanto, podemos hipotetizar que as células de Leydig da região intermediária produziram mais andrógenos, que estariam assim mais concentrados nesta região específica do parênquima testicular, promovendo maior secreção de fluido tubular. Independentemente destas considerações referentes à concentração de andrógenos, as células de Sertoli poderiam também ser mais responsivas aos andrógenos, o que provavelmente já seria suficiente para promover maior produção de fluido nos túbulos seminíferos.

A importância do FSH para a proliferação das células de Sertoli em roedores de laboratório já está bem estabelecida na literatura e em camundongos *knockout* para o receptor desta gonadotrofina, tanto o número de células de Sertoli quanto o peso testicular estão significativamente reduzidos (Sharpe, 1994; Krishnamurthy et al., 2001; Sairam & Krishnamurthy, 2001; Miranda, 2006; O'Shaughnessy et al., 2009). Em suínos, o FSH também parece desempenhar importante papel na atividade mitótica destas células somáticas e os dois picos de proliferação das células de Sertoli (do nascimento ao primeiro mês de idade e entre 3 e 4 meses) são coincidentes com maiores níveis plasmáticos de FSH (França et al., 2000). No entanto, talvez refletindo os períodos de maior e menor proliferação das células de Sertoli de suínos, deve ser ressaltado que estas células nesta espécie parecem ser menos responsivas ao FSH durante o desenvolvimento pós-natal, particularmente após nove semanas de idade (Vandalen et al., 1986). À semelhança dos estudos desenvolvidos em ratos (Miranda, 2006), as análises histomorfométricas realizadas no presente trabalho não mostraram diferenças significativas para os percentuais de túbulos e epitélio seminífero. Por outro lado, em contraste com o presente estudo, tanto o diâmetro tubular quanto o peso testicular estavam significativamente diminuídos em ratos adultos tratados com leuprolide durante as primeiras semanas de vida (Miranda, 2006). Desta forma, independentemente das concentrações séricas de FSH obtidas nos diferentes períodos avaliados após os tratamentos, os resultados encontrados em nosso estudo para os parâmetros acima mencionados sugerem fortemente que o número de células de Sertoli por testículo não sofreu alteração evidente.

À semelhança de vários outros parâmetros morfométricos, o percentual de túnica própria encontrado no presente trabalho mostra a mesma tendência já observada para suínos (Avelar et al., 2010), nos quais significativa variação regional foi encontrada para o percentual deste componente do compartimento tubular (Avelar et al., 2010). Em relação

aos diferentes grupos experimentais, nos suínos tratados aos 35 dias com o leuprolide o percentual de túnica própria foi significativamente menor. Conforme já é sabido, a túnica própria é constituída pelas células peritubulares mióides e pela membrana basal secretada tanto por este tipo celular quanto pelas células de Sertoli (Skinner et al., 1985; Skinner, 2005; Dym, 1994; Cheng et al., 2009), e evidentes interações morfofuncionais são observadas entre estes dois tipos de células somáticas (Dym, 1994; Papadopoulus & Dym, 1994; Skinner, 2005; Richardson et al., 1995). Neste sentido, camundongo *knockout* para receptores de andrógeno exclusivamente nas células peritubulares mióides foi recentemente desenvolvido, o qual, além de ser infértil, apresentou alterações na constituição da membrana basal, com progressiva diminuição da expressão de laminina (Welsh et al., 2009). Apesar de nenhuma alteração morfofuncional evidente nos túbulos seminíferos ter sido notada no presente estudo, não podemos descartar que o tratamento com leuprolide em T35 tenha causado modificações na túnica própria. Um possível efeito direto ou indireto deste tratamento nas células de Sertoli não poderia também ser descartado.

5. Referências Bibliográficas

ATANASSOVA N, KOEVA Y, BAKALSKA M, PAVLOVA E, NIKOLOV B, DAVIDOFF M. Loss and recovery of androgen receptor protein expression in the adult rat testis following androgen withdrawal by ethane dimethanesulfonate. *Folia Histochem Cytobiol.* 2006;44:81-6.

AT-TARAS EE, BERGER T, MCCARTHY MJ, CONLEY AJ, NITTA-ODA BJ, ROSER JF. Reducing estrogen synthesis in developing boars increases testis size and total sperm production. *J Androl.* 2006;27:552-9.

AVELAR GF, OLIVEIRA CFA, SOARES JM, SILVA IJ, DOBRINSKI I, HESS RA, FRANÇA LR. Postnatal somatic cell proliferation and seminiferous tubule maturation in pigs: A non-random event. *Theriogenology.* 2010. *In press.*

BERGER T, MCCARTHY M, PEARL CA, AT-TARAS E, ROSER JF, CONLEY A. Reducing endogenous estrogens during the neonatal and juvenile periods affects reproductive tract development and sperm production in postpuberal boars. *Anim Reprod Sci.* 2008;109:218-35.

BERNDTSON WE, IGBOELI G, PICKETT BW. Relationship of absolute numbers of Sertoli cells to testicular size and spermatogenesis in young beef bulls. *J Anim Sci.* 1987;64:241-6.

BOUIN P, ANCEL P. La glande interstitielle du testicule chez le cheval. *Arch Zool. Exp Gen.* 1905;3:391-437.

BREMNER WJ, MILLAR MR, SHARPE RM, SAUNDERS PT. Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens. *Endocrinology.* 1994;135:1227-34.

CARREAU S, DELALANDE C, GALERAUD-DENIS I. Mammalian sperm quality and aromatase expression. *Microsc Res Tech.* 2009;72:552-7

CHENG CY, WONG EW, YAN HH, MRUK DD. Regulation of spermatogenesis in the microenvironment of the seminiferous epithelium: New insights and advances. *Mol Cell Endocrinol.* 2009.

CLAUS R, HOFFMANN B. Oestrogens, compared to other steroids of testicular origin, in blood plasma of boars. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1980;94:404-11.

CLEMMONS AJ, THOMPSON DL JR, JOHNSON L. Local initiation of spermatogenesis in the horse. *Biol Reprod.* 1995;52:1258-67.

DE GENDT K, SWINNEN JV, SAUNDERS PT, SCHOONJANS L, DEWERCHIN M, DEVOS A, TAN K, ATANASSOVA N, CLAESSENS F, LÉCUREUIL C, HEYNS W, CARMELIET P, GUILLOU F, SHARPE RM, VERHOEVEN G. A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101:1327-32.

DIERICHS R, WROBEL KH, SCHILLING E. Licht-, und Elektronenmikroskopische Untersuchungen an den Leydigzellen des Schweines während der postnatalen Entwicklung. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 1973;143:207-27.

DYM M. Basement membrane regulation of Sertoli cells. *Endocr Rev.* 1994;15:102-15.

FORD JJ. Serum estrogen concentrations during postnatal development in male pigs. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1983;174:160-4.

FORD JJ, Wise TH. Sertoli cell differentiation in pubertal boars. *J Anim Sci.* 2009;87:2536-43.

FRANÇA LR, RUSSEL LD. The testis of domestic mammals. In: Martínez-GARCIA F; REGADERA J (Ed). *Male reproduction: a multidisciplinary overview.* España: Churchill Communications Europe España. 1998. p.197-219.

FRANÇA LR, SILVA VA, JR., CHIARINI-GARCIA H, GARCIA SK, DEBELJUK L. Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. *Biol Reprod.* 2000;63:1629-36.

FRANÇA LR, AVELAR GF, ALMEIDA FF. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology.* 2005;2:300-18.

FRANÇA LR, CHIARINI-GARCIA H. Célula de Sertoli. In: CARVALHO HF; COLLARES-BUZATO CB (Ed). *A Célula: Uma abordagem multidisciplinar.* São Paulo: Ed. Manole, 2005. v.01, p.302-24.

GONDOS B, RENSTON RH, GOLDSTEIN DA. Postnatal differentiation of Leydig cells in the rabbit testis. *Am J Anat.* 1976;145:167-82.

GRISWOLD SL, BEHRINGER RR. Fetal Leydig cell origin and development. *Sex Dev.* 2009;3:1-15.

HESS RA, COOKE PS, BUNICK D, KIRBY JD. Adult testicular enlargement induced by neonatal hypothyroidism is accompanied by increased Sertoli and germ cell numbers. *Endocrinology*. 1993;132:2607-13.

HESS RA, ZHOU Q, NIE R, OLIVEIRA C, CHO H, NAKAIA M, CARNES K. Estrogens and epididymal function. *Reprod Fertil Dev*. 2001;13:273-83.

HESS RA, FRANÇA LR. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: CHENG CY (Ed). *Molecular mechanisms in spermatogenesis*. Landes Bioscience, 2007. p.1-15.

HOCHEREAU-DE REVIERS MT, MONET-KUNTZ C, COUROT M. Spermatogenesis and Sertoli cell numbers and function in rams and bulls. *J Reprod Fertil Suppl*. 1987;34:101-14.

HOFFMANN B, ROSTALSKI A, MUTEMBEI HM, GOERICKE-PESCH S. Testicular Steroid Hormone Secretion in the Boar and Expression of Testicular and Epididymal Steroid Sulphatase and Estrogen Sulphotransferase Activity. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2009.

JOHNSON L. Spermatogenesis. In: CUPPS PT (Ed). *Reproduction in Domestic Animals*. Academic Press, 1991, p.173-219.

JOHNSON L, CARTER GK, VARNER DD, TAYLOR TS, BLANCHARD TL, REMBERT MS. The relationship of daily sperm production with number of Sertoli cells and testicular size in adult horses: role of primitive spermatogonia. *J Reprod Fertil*. 1994;100:315-21.

KRISHNAMURTHY H, BABU PS, MORALES CR, SAIRAM MR. Delay in sexual maturity of the follicle-stimulating hormone receptor knockout male mouse. *Biol Reprod*. 2001;65:522-31.

LUAN X, BODMEIER R. In situ forming microparticle system for controlled delivery of leuprolide acetate: influence of the formulation and processing parameters. *Eur J Pharm Sci*. 2006;27:143-9

LUNSTRA DD, FORD JJ, CHRISTENSON RK, ALLRICH RD. Changes in Leydig cell ultrastructure and function during pubertal development in boar. *Biol Reprod*. 1986;34:145-58.

LUNSTRA DD, WISE TH, FORD JJ. Sertoli cells in the boar testis: changes during development and compensatory hypertrophy after hemicastration at different ages. *Biol Reprod*. 2003;68:140-150.

MCCOARD SA, WISE TH, FORD JJ. Endocrine and molecular influences on testicular development in Meishan and White Composite boars. *J Endocrinol.* 2003;178:405-16.

MENDIS-HANDAGAMA SM, ARIYARATNE HB. Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biol Reprod.* 2001;65:660-71.

MIRANDA JR. Regulação da proliferação pós-natal das células de Sertoli em ratos. 2006.125p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Veterinária, UFMG. Belo Horizonte, Brasil.

NISHIKAWA Y, HORIE T. Studies on the development of the testes and epididymides of the horse. I. Studies on the development of the testes of the horse, with special reference to singularity and the age of sexual maturity. *Natl Inst Agric Sci Jpn. Bull Ser G Anim Husband.* 1955;10:229-349.

OKADA H, DOKEN Y, OGAWA Y, TOGUCHI H. Sustained suppression of the pituitary-gonadal axis by leuporelin three-month depot microspheres in rats and dogs. *Pharm Res.* 1994;8:1199-1203.

OLIVEIRA CA, CARNES K, FRANÇA LR, HESS RA. Infertility and testicular atrophy in the antiestrogen-treated adult male rat. *Biol Reprod.* 2001;65:913-20.

OLIVEIRA CA, MAHECHA GA, CARNES K, PRINS GS, SAUNDERS PT, FRANÇA LR, HESS RA. Differential hormonal regulation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta and androgen receptor expression in rat efferent ductules. *Reproduction.* 2004;128:73-86.

ORTH JM. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. *Anat Rec.* 1982;203:485-92.

ORTH JM, GUNSALUS GL, LAMPERTI AA. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology.* 1988;122:787-94.

ORTH JM. Cell biology of testicular development in fetus and neonate. In: Desjardins C; Ewing LL, (Ed.). *Cell and molecular biology of the testis.* New York,CL: Oxford University Press, 1993. p.3-42.

O'SHAUGHNESSY PJ, MORRIS ID, HUHTANIEMI I, BAKER PJ, ABEL MH. Role of androgen and gonadotrophins in the development and function of the Sertoli cells and Leydig cells: data from mutant and genetically modified mice. *Mol Cell Endocrinol.* 2009;306:2-8.

PAPADOPOULOS V, DYM M. Sertoli cell differentiation on basement membrane is mediated by the c-fos protooncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91:7027-31.

PEARL CA, AT-TARAS E, BERGER T, ROSER JF. Reduced endogenous estrogen delays epididymal development but has no effect on efferent duct morphology in boars. *Reproduction*. 2007;134:593-604.

PEYRAT JP, MEUSEY-DESSOLLE N, GARNIER J. Changes in Leydig cell and luteinizing hormone receptors in porcine testis during postnatal development. *Endocrinology*. 1981;108:625-31.

RICHARDSON LL, KLEINMAN HK, DYM M. Basement membrane gene expression by Sertoli and peritubular myoid cells in vitro in the rat. *Biol Reprod*. 1995;52:320–30.

ROUILLER-FABRE V, LECERF L, GAUTIER C, SAEZ JM, HABERT R. Expression and effects of insulin-like growth factor I on rat fetal Leydig cell function and differentiation. *Endocrinology*. 1998;139:2926-34.

RUSSELL LD, PETERSON RN. Determination of the elongate spermatid-Sertoli cell ratio in various mammals. *J Reprod Fertil*.. 1984;70:635-41.

RUSSELL LD, BARTKE A, GOH JC. 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*. 1989;184:179-89.

SAIRAM MR, KRISHNAMURTHY H. The role of follicle-stimulating hormone in spermatogenesis: lessons from knockout animal models. *Arch Med Res*. 2001;32:601–08.

SCHWARZENBERGER F, TOOLE GS, CHRISTIE HL, RAESIDE JI. Plasma levels of several androgens and estrogens from birth to puberty in male domestic pigs. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1993;128:173-77.

SHARPE RM. Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL E; NEILL JD (Ed). *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press, 1994. v.1, p.1363-1434.

SINCLAIR PA, SQUIRES EJ, RAESIDE JI, BRITT JH, HEDGPETH VG. The effect of early postnatal treatment with a gonadotropin-releasing hormone agonist on the developmental profiles of testicular steroid hormones in the intact male pig. *J Anim Sci*. 2001;79:1003-10.

SKINNER MK, TUNG PS, FRITZ IB. Cooperativity between Sertoli cells and testicular peritubular cells in the production and deposition of extracellular matrix components. *J Cell Biol.* 1985;100:1941-7.

SKINNER MK. SERTOLI CELL-SOMATIC CELL INTERACTIONS. In: SKINNER MK; GRISWOLD MD. (Ed). *Sertoli cell biology*. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. p.317-328.

SWANLUND DJ, N'DIAYE MR, LOSETH KJ, PRYOR JL, CRABO BG. Diverse testicular responses to exogenous growth hormone and follicle-stimulating hormone in prepubertal boars. *Biol Reprod.* 1995;53:749-57.

TRIPEPI S, CARELLI A, PERROTTA E, BRUNELLI E, TAVOLARO R, FACCIOLO RM, CANONACO M. Morphological and functional variations of Leydig cells in testis of the domestic pig during the different biological stages of development. *J Exp Zool.* 2000;287:167-75.

VAN STRAATEN HWM, WENSING CJG. Histomorphometric aspects of testicular morphogenesis in pig. *Biol Reprod.* 1977;17:467-72.

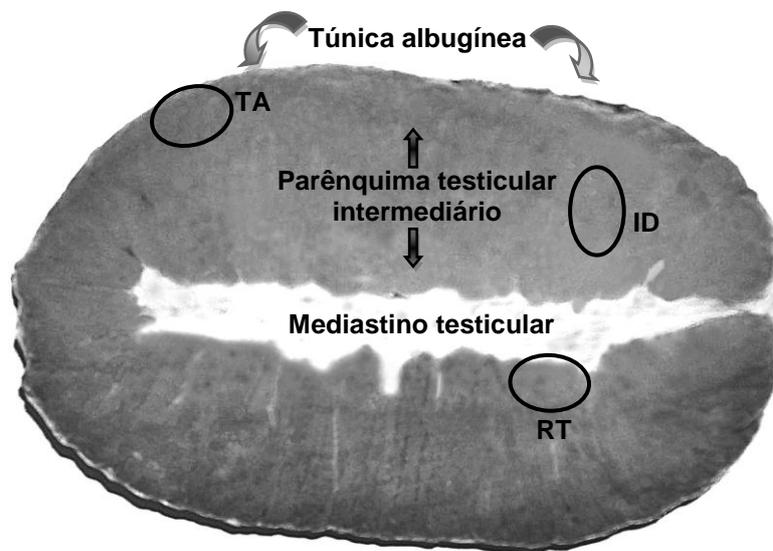
VAN STRAATEN HWM, WENSING CJG. Leydig cell development in the testis of the pig. *Biol Reprod.* 1978;18:86-93.

VAN DALEM JL, MCNAMARA M, PETIT R, HENNEN G. Development changes in gonadotrophins and testicular gonadotrophins receptors in pig, from neonatal to adult life. *J Endocrinol.* 1986;111:301-08.

WAGNER A, CLAUS R. The effects of postnatal FSH substitution on Sertoli cell number and the sperm production capacity of the adult boar. *Anim Reprod Sci.* 2009;110:269-82.

WELSH M, SAUNDERS PT, ATANASSOVA N, SHARPE RM, SMITH LB. Androgen action via testicular peritubular myoid cells is essential for male fertility. *FASEB J.* 2009;23:4218-30.

WU X, WAN S, LEE MM. Key factors in the regulation of fetal and postnatal Leydig cell development. *J Cell Physiol.* 2007;213:429-33.



Avelar et al., 2010.

Figura 1 – Representação das regiões do parênquima testicular das quais foram coletadas as amostras utilizadas no presente estudo. TA, túnica albugínea; ID, região intermediária; RT, região de transição dos túbulos seminíferos com o mediastino/*rete testis*.

Figura 2 – Curva de desenvolvimento corporal do nascimento (0) aos 270 dias de idade de suínos controle e tratados com acetato de leuprolide aos 35 (T35) e 70 (T70) dias de idade. Observe que aos 42 dias o peso corporal médio do grupo T35 foi menor quando comparado com o grupo controle (*; $p < 0,05$).

Evolução do peso corporal

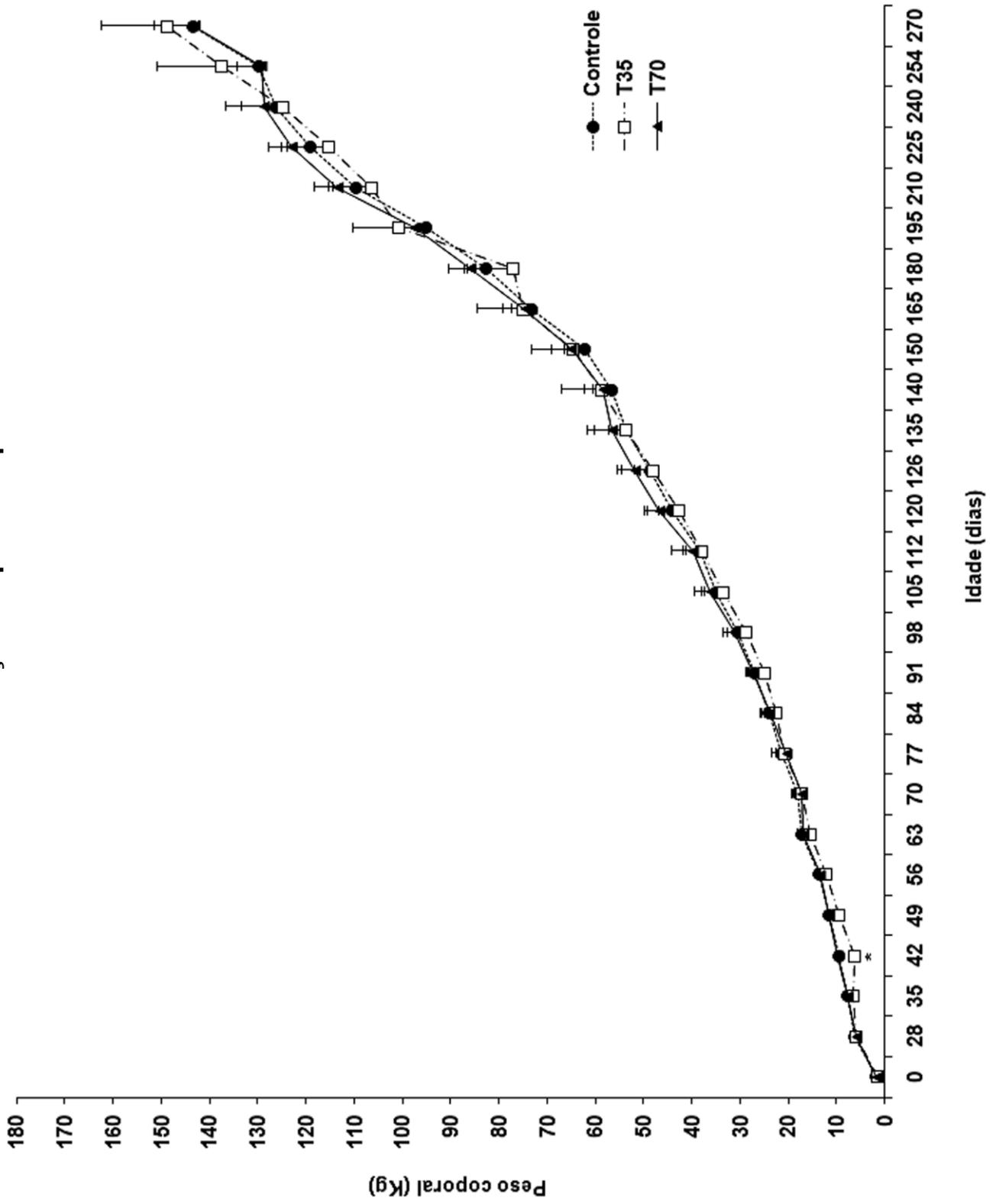
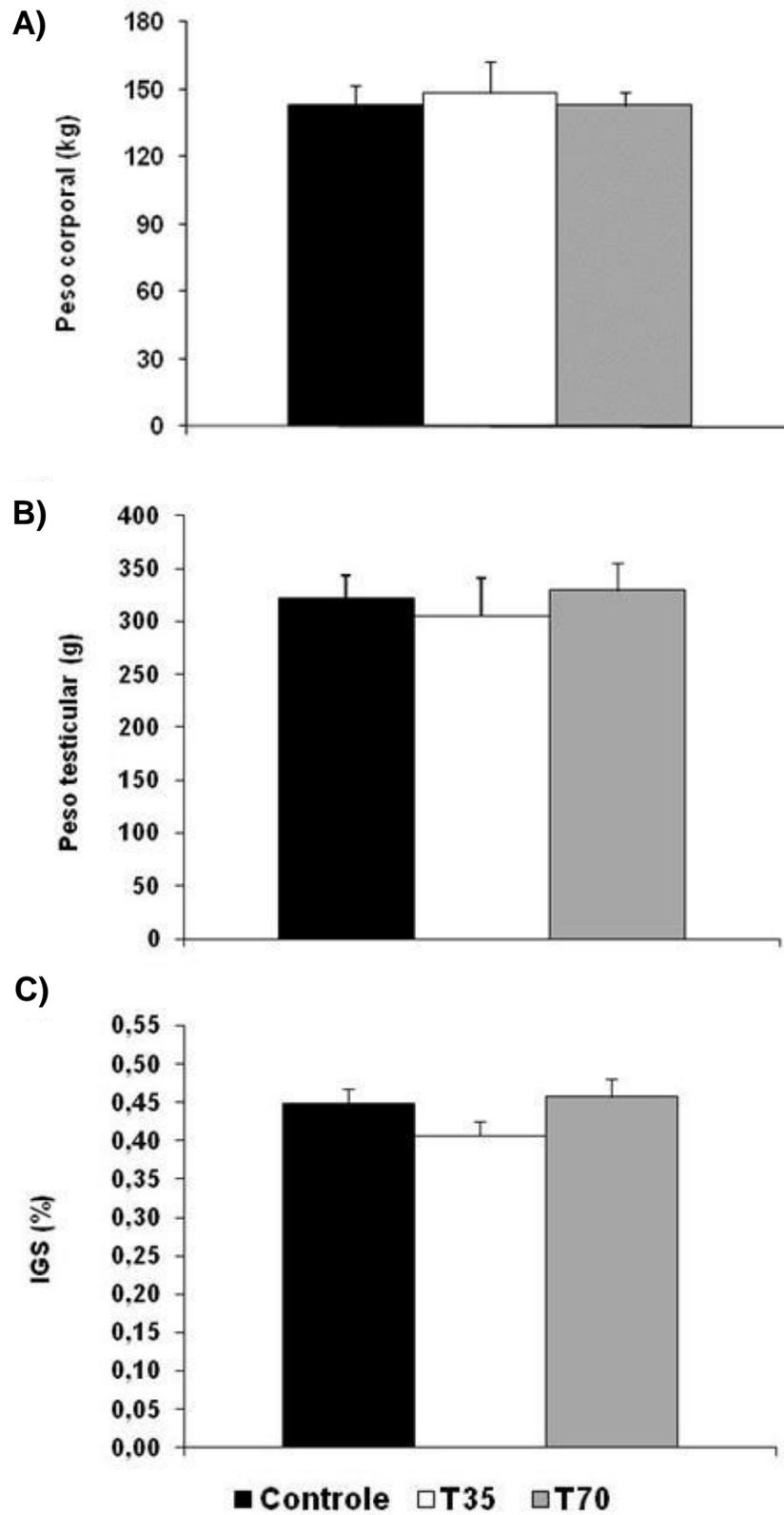


Figura 3 – Peso corporal, testicular e índice gonadossomático (IGS) de suínos controles e tratados com acetato de leuprolide aos 35 (T35) e 70 (T70) dias pós-natal e orquiectomizados aos 270 dias de idade (média \pm e.p.m.).

Biometria e índice gonadossomático



Diâmetro tubular

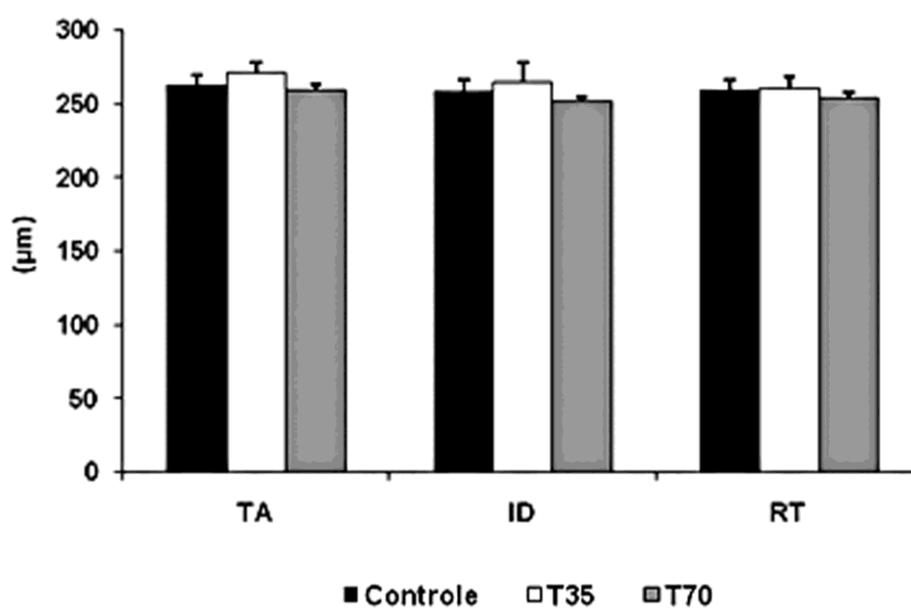


Figura 4 – Diâmetro dos túbulos seminíferos em três diferentes regiões do parênquima testicular de suínos controles e tratados com acetato de leuprolide aos 35 (T35) e 70 (T70) dias pós-natal e orquiectomizados aos 270 dias de idade (média \pm e.p.m.). TA, túnica albugínea; ID, intermediária; RT, região de transição.

Figura 5– Proporção volumétrica dos diferentes componentes do compartimento tubular em três regiões do parênquima testicular de suínos controles e tratados com acetato de leuprolide aos 35 (T35) e 70 (T70) dias pós-natal e orquiectomizados aos 270 dias de idade (média ± e.p.m.). Letras minúsculas e maiúsculas diferentes denotam diferenças entre regiões em um mesmo tratamento e entre tratamentos para uma mesma região, respectivamente ($p < 0,05$). TA, túnica albugínea; ID, intermediária; RT, região de transição.

Percentual dos diferentes componentes do compartimento tubular

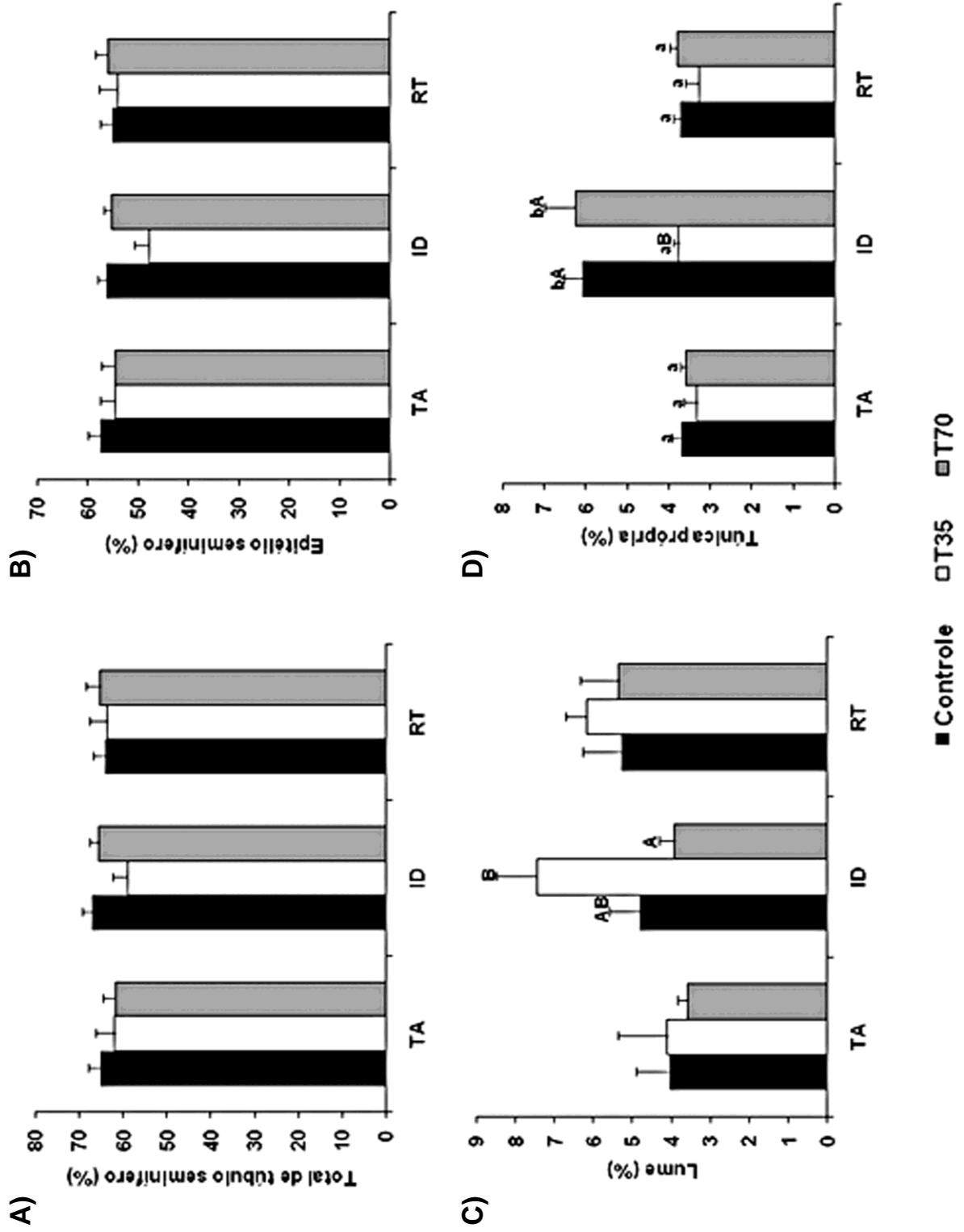
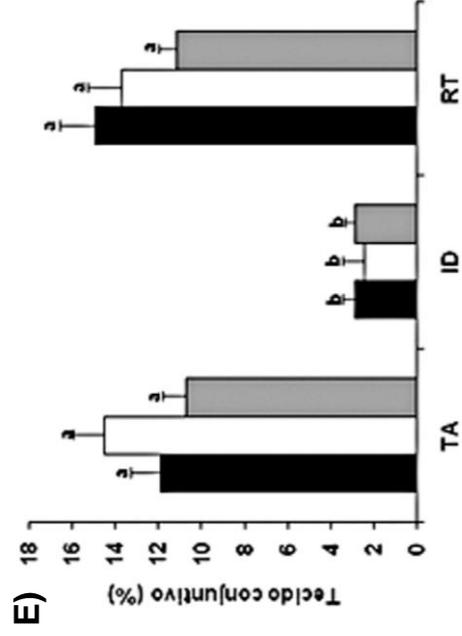
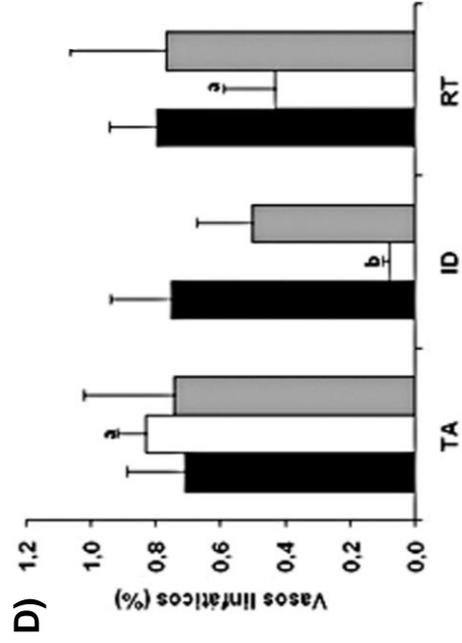
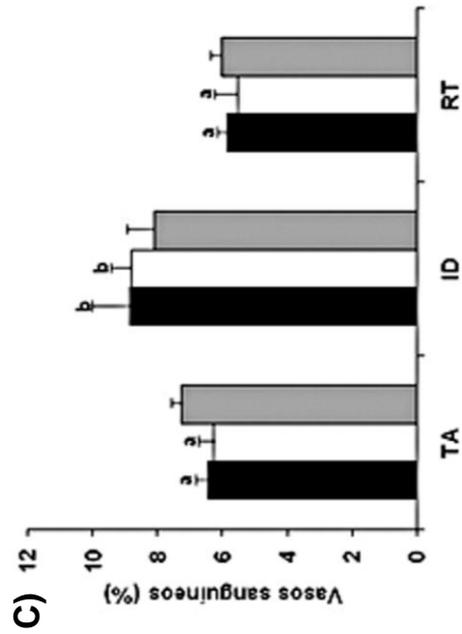
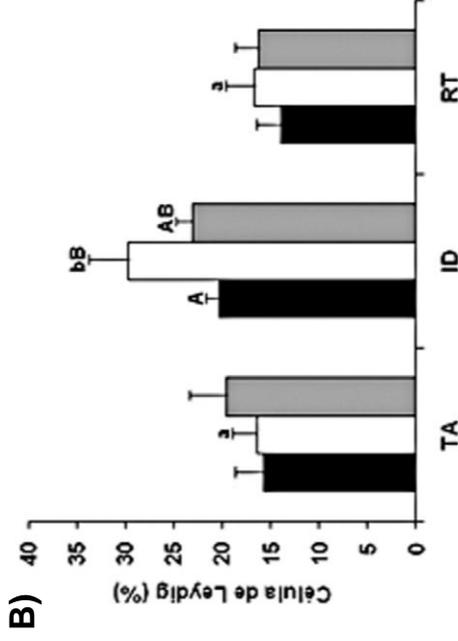
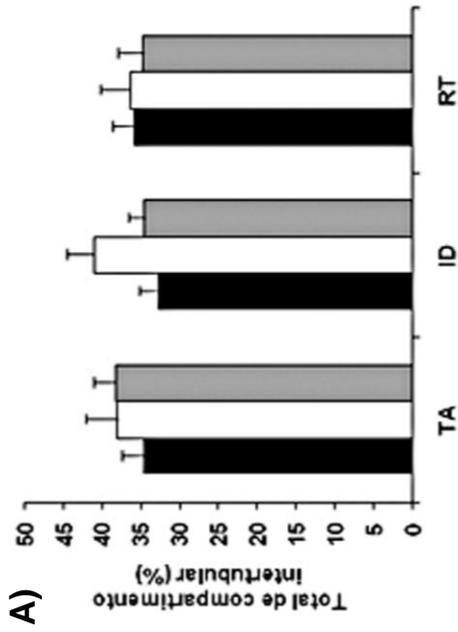


Figura 6 – Proporção volumétrica dos diferentes componentes do compartimento intertubular em três regiões do parênquima testicular de suínos controle e tratados com acetato de leuprolide aos 35 (T35) e 70 (T70) dias pós-natal e orquiectomizados aos 270 dias de idade (média \pm e.p.m.). Letras minúsculas e maiúsculas diferentes denotam diferenças entre regiões em um mesmo tratamento e entre tratamentos para uma mesma região, respectivamente ($p < 0,05$). TA, túnica albugínea; ID, intermediária; RT, região de transição.

Percentual dos diferentes componentes do compartimento intertubular



■ Controle □T35 □T70

Figura 7 – Parâmetros de células de Leydig em três diferentes regiões do parênquima testicular de suínos controles e tratados com acetato de leuprolide aos 35 (T35) e 70 (T70) pós-natal e orquiectomizados aos 270 dias de idade (média ± e.p.m.). Letras minúsculas e maiúsculas diferentes denotam diferenças entre regiões em um mesmo tratamento e entre tratamentos para uma mesma região, respectivamente ($p < 0,05$). TA, túnica albugínea; ID, intermediária; RT, região de transição.

Morfometria das células de Leydig

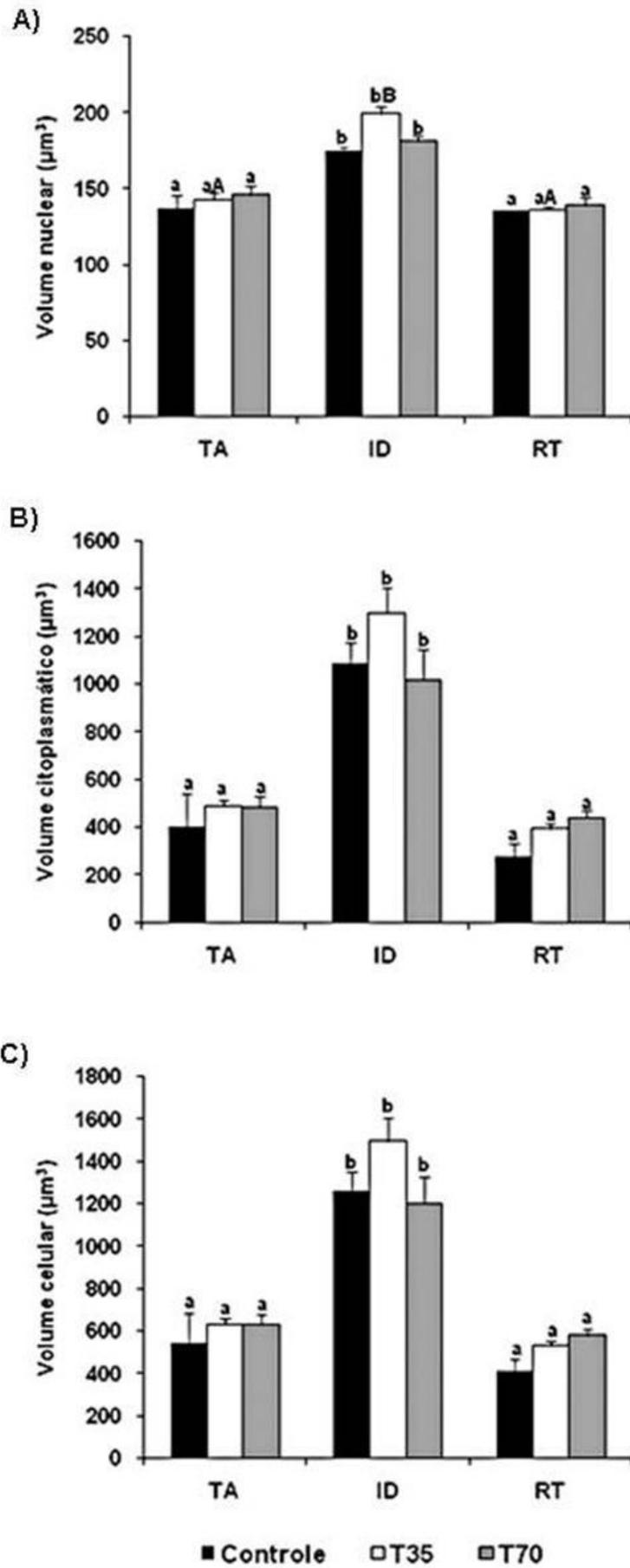


Tabela 1 - Concentrações séricas de FSH, LH, testosterona (T) e 17 β -estradiol (E2), durante o desenvolvimento pós-natal de suínos controles e tratados com acetato de leuprolide aos 35 dias de idade (média \pm e.p.m.).

Período pós-tratamento	FSH (MUI/mL)		LH (MUI/mL)		T (ng/mL)		E2 (pg/mL)	
	Controle	T35	Controle	T35	Controle	T35	Controle	T35
Dia 0	0,01 \pm 0,00	0,03 \pm 0,01	0,05 \pm 0,03	0,22 \pm 0,17	0,5 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1		
1ª semana	0,02 \pm 0,00	0,01 \pm 0,00	0,02 \pm 0,01	0,11 \pm 0,01	0,5 \pm 0,0	0,5 \pm 0,2	27 \pm 7	24 \pm 4
2ª semana	0,09 \pm 0,07	0,02 \pm 0,00	0,18 \pm 0,04	0,13 \pm 0,04	0,9 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1*		
3ª semana	0,02 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01	0,01 \pm 0,00	0,03 \pm 0,01	0,9 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1	23 \pm 3	29 \pm 2
4ª semana	0,01 \pm 0,00	0,05 \pm 0,02	0,04 \pm 0,02	0,11 \pm 0,04	1,0 \pm 0,5	0,9 \pm 0,2		
6ª semana	0,06 \pm 0,02	0,04 \pm 0,02	0,02 \pm 0,00	0,09 \pm 0,01	0,9 \pm 0,2	0,6 \pm 0,03		
38ª semana	0,25 \pm 0,07	0,14 \pm 0,09	0,40 \pm 0,12	0,17 \pm 0,04	3,6 \pm 0,9	3,8 \pm 1,0	110 \pm 23	143 \pm 56

(*) representa diferença em relação ao controle ($p < 0,05$).

Tabela 2 - Concentrações séricas de FSH, LH, testosterona (T) e 17 β -estradiol (E2), durante o desenvolvimento pós-natal de suínos controles e tratados com acetato de leuprolide aos 70 dias de idade (média \pm e.p.m.).

Período pós-tratamento	FSH (MUI/mL)		LH (MUI/mL)		T (ng/mL)		E2 (pg/mL)	
	Controle	T70	Controle	T70	Controle	T70	Controle	T70
Dia 0	0,03 \pm 0,01	0,07 \pm 0,05	0,02 \pm 0,00	0,19 \pm 0,16	0,8 \pm 0,1	0,9 \pm 0,4	20 \pm 0	20 \pm 0
1ª semana	0,06 \pm 0,02	0,01 \pm 0,00	0,20 \pm 0,09	0,03 \pm 0,01	0,9 \pm 0,2	0,3 \pm 0,1*	28 \pm 3	25 \pm 3
2ª semana	0,04 \pm 0,01	0,06 \pm 0,02	0,04 \pm 0,02	0,11 \pm 0,04	1,9 \pm 0,5	0,6 \pm 0,1*	21 \pm 1	21 \pm 1
3ª semana	0,04 \pm 0,03	0,02 \pm 0,01	0,14 \pm 0,08	0,10 \pm 0,03	0,8 \pm 0,5	1,0 \pm 0,3	22 \pm 2	21 \pm 0
4ª semana	0,04 \pm 0,01	0,13 \pm 0,06	0,04 \pm 0,02	0,43 \pm 0,22	1,5 \pm 0,8	0,9 \pm 0,2	27 \pm 0	35 \pm 10
6ª semana	0,09 \pm 0,03	0,18 \pm 0,09	0,29 \pm 0,10	0,64 \pm 0,22	1,5 \pm 0,8	1,2 \pm 0,4	55 \pm 5	52 \pm 11
38ª semana	0,25 \pm 0,07	0,07 \pm 0,02	0,40 \pm 0,12	0,17 \pm 0,05	3,6 \pm 0,9	2,2 \pm 0,4	110 \pm 23	174 \pm 48

(*) representa diferença em relação ao controle (p<0,05).

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

O presente estudo foi o primeiro a investigar as modificações morfo-funcionais das células somáticas em três diferentes regiões do testículo durante o desenvolvimento pós-natal de suínos. Assim, baseado nos resultados encontrados para a proliferação das células de Sertoli na região de transição e o grau de desenvolvimento dos túbulos seminíferos na região intermediária, pode-se concluir no presente trabalho que, à semelhança do observado em equinos, a maturação do testículo de suínos ocorre de maneira regionalizada. Ainda, os resultados obtidos sugerem que as células de Leydig localizadas na região intermediária do testículo de suínos são funcionalmente distintas daquelas encontradas nas outras duas regiões investigadas (transição e próximo à túnica albugínea), sugerindo que estas células estejam desempenhando papel crucial ao longo do desenvolvimento deste órgão. Neste contexto, a região intermediária se constitui como provável centro organizador durante o processo de maturação dos testículos de suínos

ANEXO: TRABALHO *IN PRESS*