



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
Campus Universitário Ministro Petrônio Portella– Bairro Socopo CEP 64049-550 -Teresina-Pi, Fone (86) 3215-5741

ESTUDO DA MORFOGÊNESE TESTICULAR A PARTIR DA AVALIAÇÃO DE XENOENXERTOS DE CÉLULAS TESTICULARES DE CATETOS (*TAYASSU TAJACU*) E SUÍNOS (*SUS DOMESTICUS*) EM MODELO DE CAMUNDONGOS IMUNODEFICIENTES

SÂMIA CLARA RODRIGUES DE OLIVEIRA

Teresina, Piauí – Brasil
Julho-2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
Campus Universitário Ministro Petrônio Portella– Bairro Socopo CEP 64049-550 -Teresina-Pi, Fone (86) 3215-5741

ESTUDO DA MORFOGÊNESE TESTICULAR A PARTIR DA AVALIAÇÃO DE XENOENXERTOS DE CÉLULAS TESTICULARES DE CATETOS (*TAYASSU TAJACU*) E SUÍNOS (*SUS DOMESTICUS*) EM MODELO DE CAMUNDONGOS IMUNODEFICIENTES

SÂMIA CLARA RODRIGUES DE OLIVEIRA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutora em Ciência Animal.

Área de Concentração: Sanidade e Reprodução Animal.

Orientadora
Prof^a. Dra. Maria Acelina Martins de Carvalho

Co-orientadora
Prof^a. Dra. Gleide Fernandes de Avelar

Teresina, Piauí - Brasil
Julho-2014

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processamento Técnico

O48e Oliveira,Sâmia Clara Rodrigues de
Estudo da morfogênese testicular a partir da avaliação de xenoenxerto de células testiculares de catetos (*Tayassu Tacaju*) e suínos(*sus domesticus*) em modelo de camundongos imunodeficientes / Sâmia Clara Rodrigues de Oliveira - 2014.

71f.: il.

Tese(Doutorado em Ciência Animal)– Universidade Federal do Piauí,Teresina, 2014.

Orientação: Prof^a.Dr.^a Maria Acelina Martins de Carvalho

1. Cateto. 2. Testículo 3.Espermatogênese 4.Xenoenxerto 5. Interações celulares I. Título


CDD 636.9734

ESTUDO DA MORFOGÊNESE TESTICULAR A PARTIR DA AVALIAÇÃO
DE XENOENXERTOS DE CÉLULAS TESTICULARES DE CATETOS (*Tayassu
tajacu*) E SUÍNOS (*Sus domesticus*) EM MODELO DE CAMUNDONGOS
IMUNODEFICIENTES

SÂMIA CLARA RODRIGUES DE OLIVEIRA

Tese aprovada em: 25/07/2014

Banca Examinadora:



Profa. Dra. Maria Acelina Martins de Carvalho (Presidente) / DMV/CCA/UFPI



Prof. Dr. Antônio Augusto Nascimento Machado Júnior (Interno) / CPCE/UFPI



Prof. Dr. Antônio Chaves de Assis Neto (Externo) / FMVZ/USP



Prof. Dr. Danilo José Ayres de Menezes (Externo) / UFCG



Profa. Dra. Gláucia Fernandes de Avelar (Externa) / UFMG



Prof. Dr. Guilherme Mattos Jardim Costa (Externo) / UFMG

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

Dedico este trabalho a todos que contribuíram para sua realização, além dos meus pais: Valdinei e Neusa de Oliveira, irmãos: Chiara e Junior de Oliveira e marido Cristiano Coelho.

AGRADECIMENTOS

A amizade, parceria, apoio, incentivo e carinho de todos foram elementos fundamentais para a concretização deste trabalho!!!

À Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades, mostrar os caminhos nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

Aos meus pais que sempre primaram pela minha educação, incentivaram nos momentos diversos e, de forma incondicional, me amaram, me apoiaram e nada me deixaram faltar.

A meus irmãos, Chiara e Junior Oliveira, meu agradecimento especial, pois, a seu modo, sempre se orgulharam de mim e confiaram em meu trabalho.

À minha avó Gracinéia Castro e tio Ubiraci Santos e também meus tios Ilda, Enio e Dinaldo Fernandes por terem contribuído para que meus estudos não fossem abalados pelas dificuldades e eu sempre pudesse continuar minha jornada.

A meu querido esposo, Cristiano Jackson da Costa Coelho, por ser tão importante na minha vida. Sempre a meu lado, me colocando para cima e me fazendo acreditar que posso mais do que imagino. Somente por causa do seu companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio, alegria e amor, este trabalho pôde ser concretizado.

Às minhas orientadoras Profa.Dra. Maria Acelina Martins de Carvalho e Profa. Dra. Gleide Fernandes de Avelar, por acreditarem em mim, me mostrarem o caminho da ciência, fazerem parte da minha vida nos momentos bons e ruins, por serem exemplos de profissional e de

mulheres as quais sempre farão parte da minha vida.

A Profa. Alana Lislea de Sousa por me apresentar a pesquisa e fazer sentir vontade de fazer o que fiz até aqui com prazer e dedicação. E pelo total incentivo profissional.

Ao Professor Luís Renato de França, pela confiança, receptividade e total colaboração neste incrível trabalho, no qual tive orgulho e prazer em executá-lo.

Ao Professor Guilherme Mattos Jardim Costa e à Pós Dra. Samyra Maria dos Santos Nassif Lacerda pela contribuição na concretização deste trabalho, incentivo e ensinamentos nos momentos diversos em que estive no laboratório de Biologia celular da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Aos amigos de laboratório da Universidade Federal do Piauí (UFPI) que colaboraram, por diversas vezes, com a realização deste trabalho: Hatawa Melo de Almeida, Anaemília das Neves Diniz, Dayseany Bezerra de Oliveira, Gerson Tavares Pessoa, Nilcely Guimarães, Andressa Rego da Rocha, Matheus Levi Tajra Feitosa.

Aos amigos do laboratório de Biologia celular da UFMG: Thaís Carolina Alves Santos Bicalho, Bárbara Ramalho Ladeiro Cardoso (parceiras no preparo de todo material de análise), Nathalia de Lima e Martins Lara, Carolina Felipe Alves de Oliveira, André Felipe de Figueredo Almeida (parceiro das imunohistoquímicas), Mariana de Araújo da Silva, Mara Livia dos Santos, e Marcela Santos Procópio. Á todos vocês, meu reconhecimento à amizade e disponibilidade com que me atenderam durante os experimentos e durante minha estadia em Belo Horizonte.

Á UFPI e ao Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, incluindo toda Coordenação. Foi uma honra ter feito parte desta Instituição. Agradeço a oportunidade e o privilégio que tive em fazer parte deste Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal que muito contribuiu para o enriquecimento da minha formação acadêmica e científica.

Á UFMG especialmente ao Laboratório de Biologia celular do Departamento de morfologia pela maravilhosa estrutura fornecida, fundamental para execução deste trabalho.

Ao Casadinho/PROCAD e ao Professor João Batista Lopes pelo auxílio financeiro dado a esta pesquisa pela UFPI.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão (IFMA) Campus Timon, que me apoiou e incentivou bastante durante toda essa trajetória de trabalho. E desta instituição agradeço aos colegas de trabalho e amigos sempre presentes Jackellyne Geórgia Dutra, Talita Oliveira, Mackléia Silva, Carolina Nunes, Juliana Viegas, Carlene Bitu, Luís Filho, José Luís Bueno e Dastur Campus.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	13
1.1 Catetos: generalidades	13
1.2 Desenvolvimento dos testículos	14
1.3 Aspectos gerais do testículo em mamíferos e as células de Sertoli	17
1.4 Espermatogênese e demais interações celulares no testículo	20
2 JUSTIFICATIVA	29
3 OBJETIVOS.....	31
3.1 Objetivo Geral.....	31
3.2 Objetivos específicos.....	31
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1 Local.....	34
4.2 Animais experimentais	34
4.2.1 Catetos	34
4.2.2 Suínos	34
4.2.3 Camundongos.....	35
4.3 Coleta dos testículos e preparação dos pellets	35
4.4 Xenoenxerto	36
4.5 Recuperação dos enxertos.....	37
4.6 Coleta e fixação dos fragmentos	37
4.6.1 Preparação histológica	37
4.6.2 Avaliação histológica.....	38
4.7 Morfometria	38
4.7.1 Proporção volumétrica.....	38
4.7.2 Diâmetro dos túbulos seminíferos e espermatogônias	39
4.7.3 Distribuição das células de Leydig.....	39
4.8 Imunohistoquímica.....	39
5 RESULTADOS	42
5.1 Biometria	42
5.2 Morfogênese testicular <i>de novo</i> e progressão da espermatogênese	42
5.3 Avaliação morfométrica dos testículos após enxerto e morfogênese <i>de novo</i>	44
5.4 Caracterização molecular da atividade funcional das células somáticas e germinativas 8 meses após morfogênese <i>de novo</i>	46
6 DISCUSSÃO	48
7 CONCLUSÕES	53
FIGURAS E TABELA	55
REFERÊNCIAS	71

RESUMO

O xenoenxerto de células testiculares isoladas trata-se de uma abordagem estabelecida recentemente e que recapitula o desenvolvimento dos testículos sob a pele de camundongos imunodeficientes. Esta técnica permite manusear diferentes tipos de células testiculares, a fim de investigar as suas interações durante a organização do testículo. Além disso, esta técnica revela-se útil para a conservação e armazenamento de material genético de diferentes espécies de mamíferos ameaçados ou de alto valor zootécnico. O cateto (*Tayassu tajacu*) apresenta uma citoarquitetura testicular única, no qual as células de Leydig estão localizadas em torno dos túbulos seminíferos formando lobos. Esta característica particular poderia representar um indício importante relacionado com os mecanismos que regulam o desenvolvimento dos testículos em mamíferos. Desta forma, este trabalho teve o intuito de investigar a capacidade de interação funcional das células dos testículos de cateto e de suíno em retomar o desenvolvimento testicular após a dissociação enzimática. Para isto, foram utilizados testículos de 6 catetos de três meses e 8 suínos de 30 dias de idade. As suspensões celulares obtidas a partir de cada uma das espécies foram misturadas e sedimentadas formando os seguintes grupos: células de Leydig de suíno com túbulos seminíferos de catetos; células de Leydig de cateto com túbulos seminíferos de suíno, e os controles (suspensões de cateto e de suíno). Os *pellets* foram enxertados sob a pele de camundongos CB-17/SCID castrados e avaliados de 10/16 dias até 8 meses após o enxerto. Assim, foi observado que de maneira geral houve aumento do peso dos tecidos ao longo do período investigado. Embora aos 5 meses o menor peso registrado tenha sido verificado no grupo contendo suspensão pura de suíno. O peso da vesícula seminal demonstrou uma redução inicial com subsequente recuperação aos dois 2 meses exceto no animal contendo tecidos formados a partir da suspensão pura de cateto. As análises histológicas revelaram que aos 10 dias nenhuma estrutura testicular típica foi observada, mas com 16 dias uma rede testicular central e alguns cordões seminíferos já eram reconhecidos. No período compreendido entre 1 e 4 meses cordões seminíferos predominaram em todos os grupos investigados. Entretanto aos 5 meses dois padrões foram facilmente definidos em função da espécie na qual as células de Leydig se originaram. Assim os grupos contendo células de Leydig de cateto não apresentaram evolução do processo espermatogênico, permanecendo estabilizados em cordões seminíferos *Sertoli Cell Only* (SCO) até os 8 meses. O segundo padrão observado está relacionado com a presença da célula de Leydig do suíno, no qual aos 5 meses espermátides alongadas e paquítenos

foram observados respectivamente na quimera Leydig de suíno e suspensão pura de suíno. Aos 6 e aos 8 meses foram observados túbulos seminíferos contendo espermatogênese completa nestes mesmos grupos. A citoarquitetura testicular típica de cateto com células de Leydig formando cordões entre os lobos testiculares ficou bem definida aos 8 meses no tecido quimera Leydig de suíno e túbulos seminíferos de cateto. A expressão de marcadores moleculares tais como: 3betaHSD, receptor de andrógeno, GATA4 e Ki67, nas células somáticas e germinativas dos tecidos obtidos a partir da suspensão contendo quimera Leydig de suíno e suspensão pura de suíno revelou a integridade funcional destes tipos celulares. Tomados juntos, os resultados obtidos no presente estudo demonstraram a habilidade de interação entre células testiculares de diferentes espécies de mamíferos resultando na formação de um testículo funcional, no qual todos os componentes celulares estavam preservados. Além disso apesar de pertencerem a espécies diferentes a célula de Leydig de suíno respondeu a modulação provavelmente promovida pelo componente tubular de cateto, o que resultou na formação do arranjo testicular típico dessa espécie silvestre. Neste contexto, estudos mais profundos a fim de determinar os mecanismos de regulação e interações celulares durante o desenvolvimento testicular pós-natal ainda serão necessários.

Palavras-chave: Testículo. Espermatogênese. Cateto. Xenoenxerto. Interações celulares.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Catetos: generalidades

O cateto (*Tayassu tajacu* Linnaeus, 1758), também chamado catitu, taititu, coleira branca, pecari ou porco-do-mato (LOBO, 1962) é um mamífero ungulado pertencente à ordem Artiodactyla, à subordem Suiformes, Superfamília Suoidea e à família *Tayassuidae*. (ROTTA e RÖNNAU, 2006). Apresenta ampla distribuição, ocorrendo do sul dos Estados Unidos da América até o norte da Argentina, inclusive na Amazônia, e pode ocupar diversos *habitats*, desde florestas tropicais úmidas até savanas e desertos (Gilbert, 1999).

Tayassuídeos e suídeos têm origem em um ancestral comum, entretanto estima-se que a divergência evolutiva tenha ocorrido há cerca de 40 milhões de anos (Adega et al., 2008). Este aspecto resultou nas diferentes distribuições geográficas observadas: tayassuídeos na América do Norte e Novo Mundo, e suídeos na Eurásia e Velho Mundo (SOWLS, 1997). O cateto é considerado onívoro, pois se alimenta de invertebrados, sementes, raízes, alimentos fibrosos, sobras de legumes, frutos e insetos (DEUSTSCH E PUGLIA, 1988). Em cativeiro, se adapta facilmente a diferentes tipos de alimentação, frequentemente, o milho, mandioca, abóbora, banana, cana-de-açúcar triturada, silagem de milho, silagem de sorgo e ração comercial de suínos (LIVA et al., 1989).

Tayassu tajacu é uma espécie gregária e rústica que, em condições naturais, vive em grupos de 3 a 50 indivíduos, com frequência, de até 15 animais (SOWLS, 1984), dentro dos quais os caititus exibem dominância hierárquica, com *status* possivelmente relacionado ao tamanho do animal. (BISSONETTE, 1982). São sedentários, diferentemente dos queixadas (*Tayassu pecari*) (SOWLS, 1997). A forma compacta e cilíndrica do seu corpo é vista como uma adaptação morfológica que permite o ágil deslocamento destes animais entre a vegetação densa. O cateto adulto tem em torno de 0,75 a 1,0 m de comprimento; de 0,40 a 0,45 m de altura e seu peso adulto varia de 14 a

30 kg (NOWAK, 1991). Seus pelos são longos e ásperos, geralmente pretos com anéis brancos, o que confere aos animais uma pelagem acinzentada. Em seu dorso, existe uma crina erétil composta por pelos que tendem a ser mais escuros; na região do pescoço, destaca-se uma faixa de pelos brancos, conferindo um aspecto de colar (SOWLS, 1984; FOWLER e MILLER, 2003).

Sabe-se que em condições naturais, catetos se reproduzem durante o ano todo, com comportamento de cópula e nascimento de filhotes ocorrendo sem época preferencial. O início da vida reprodutiva de machos e fêmeas ocorre dos 8 aos 16 meses de idade. A duração do ciclo estral é de 22 a 28 dias, e a duração média da gestação em *caititus* é de 140 a 150 dias, sendo mais longa que na porca doméstica, a qual apresenta gestação de 114 dias. O tamanho da ninhada varia de um a quatro filhotes (média de dois), sendo que o peso ao nascer é aproximadamente de 604 gramas, e o desmame ocorre em torno de dois meses (SOWLS, 1966, 1984).

Apesar de até o momento serem poucos os estudos na literatura que abordem aspectos relacionados à biologia reprodutiva de catetos (COSTA et al., 2010; CAMPOS-JR et al., 2011; CAMPOS-JR et al., 2012; GUIMARÃES et al., 2013; CAMPOS-JR et al., 2014), os mesmos apontam características que tornam esta espécie silvestre como um modelo experimental importante para se investigar a interação entre as células testiculares durante o desenvolvimento testicular em mamíferos.

1.2 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 e humanos (PELLINIEMI, 1975; 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-LI LARIOS & MORENO-MENDOZA, 2001; TILMANN & CAPEL, 2002; YAO et al., 2002, SEKIDO et al., 2004; KANAI et al., 2005; SVINGEN & KOOPMAN, 2013). Assim, estudos recentes mostram que a remoção da célula de Sertoli durante a fase fetal resulta em profundas modificações na arquitetura do testículo, não sendo observados túbulos seminíferos e mesmo a expressão de proteínas expressas pelas células peritubulares mióides (REBOURCET et al., 2014). Neste contexto, foi demonstrado 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 espécies de mamíferos já investigadas neste aspecto (BARSOUM & YAO, 2010), 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).

Apesar da escassez de trabalhos a cerca do desenvolvimento testicular durante o período fetal em catetos, à semelhança de outros vertebrados, incluindo o suíno, somente dois tipos celulares estão presentes no epitélio seminífero durante o período 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; CAMPOS-JR et al., 2011; GUIMARÃES et al., 2013). Particularmente em suínos, o desenvolvimento das células germinativas 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

prolifera continuamente após o nascimento (VAN STRAATEN & WENSING, 1977; GODINHO & CARDOSO, 1979; OKWUN et al., 1996; FRANÇA et al., 2000; CAMPOS-JR et al., 2011; GUIMARÃES et al., 2013). Assim, em suínos, os primeiros espermatócitos 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). A maturação testicular em catetos ocorre em um ritmo mais lento quando comparado com o suíno doméstico. Neste contexto, os primeiros espermatócitos primários são observados entre 7-8 meses e as espermátides alongadas a partir de 10 meses (CAMPOS-JR et al., 2011; GUIMARÃES et al., 2013).

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 & DIERICH, 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 (RODRIGUÉZ-MARTINÉZ, 2001). Em catetos, o número de célula de Sertoli aumenta consistentemente até 10-11 meses, período no qual se observa o término da proliferação deste tipo celular, culminando com a sua diferenciação terminal. Ainda, nesta fase os níveis plasmáticos de testosterona apresentam-se significativamente aumentados, coincidindo com a primeira espermição, embora o diâmetro tubular demonstre um aumento significativo até os 24 meses de idade. Neste contexto, observou-se que a puberdade em catetos

ocorre mais tardiamente, entre 11-12 meses de idade, e o estabelecimento da maturidade sexual somente após os 24 meses, idade na qual ainda há o aumento do diâmetro tubular (CAMPOS-JR et al., 2011; GUIMARÃES et al., 2013).

1.3 Aspectos gerais do testículo em mamíferos e as células de Sertoli

Os testículos, na maioria das espécies de mamíferos, estão localizados no escroto, estrutura capaz de regular a temperatura testicular através de vários mecanismos envolvendo vasos sanguíneos, músculo liso e esquelético, glândulas sudoríparas e pelos (SETCHELL e BREED, 2006). O testículo é revestido externamente por tecido conjuntivo espesso denominado de túnica albugínea, que emite septos para o interior deste órgão, delimitando os lobos testiculares. Próximo à sua extremidade *capitata* localiza-se o funículo espermático constituído pelas artérias, vasos linfáticos, veias, nervos, músculo cremáster e o ducto deferente, que se origina na cauda do epidídimo (AMANN, 1981; RUSSELL et al., 1990).

Na grande maioria das espécies de vertebrados, o testículo é dividido morfofuncionalmente em compartimentos tubular e intertubular (RUSSELL et al., 1990). O compartimento tubular compreende os túbulos seminíferos, que representam aproximadamente de 70% a 90% do parênquima testicular e se estendem numa rede convoluta que se conecta com a *rete testis* localizada na região do mediastino testicular (FRANÇA e RUSSELL, 1998). Os túbulos seminíferos são formados pela túnica própria, epitélio seminífero e lume. A túnica própria é formada pelas células peritubulares mióides, que possuem características de células contráteis, e a membrana basal, (Dym, 1994; Skinner, 2005). Assim, o epitélio seminífero, delimitado pela túnica própria, é constituído pelas células germinativas (originadas do epiblasto) nas diferentes fases de desenvolvimento e pelas células de Sertoli (DE FALCO E CAPEL, 2009). Já a região central dos túbulos compreende o lume tubular que resulta da secreção de fluido através das células de Sertoli, sob a influência principalmente dos andrógenos, particularmente a testosterona. É por meio do lume tubular que os espermatozoides recém-formados/espermiados e ainda imóveis são carregados através de parte dos ductos excretores (*rete testis*,

dúctulos eferentes, e ducto epididimário) (RUSSELL et al., 1990; RUSSELL e GRISWOLD, 1993).

As células de Sertoli desempenham papel crucial na espermatogênese e na estrutura dos túbulos seminíferos e, juntamente com as células peritubulares mióides, sintetizam a membrana basal que é fundamental para a integridade e a função tubular, sendo um elemento importante para o estabelecimento do nicho das células tronco espermatogoniais, as quais produzem as células germinativas, que irão se desenvolver para formar o espermatozoide (DYM, 1994; RICHARDSON et al., 1995; SKINNER, 2005). Por meio de suas junções de oclusão, as células de Sertoli dividem o epitélio seminífero em compartimentos basal e adluminal (RUSSELL e GRISWOLD, 1993). No compartimento basal estão localizadas as espermatogônias e espermátocitos primários iniciais (pré-leptótenos/leptótenos), enquanto no adluminal encontram-se os espermátocitos primários a partir de zigóteno, espermátocitos secundários e espermátides. Funcionalmente, as junções de oclusão compõem a barreira de células de Sertoli, o que propicia um microambiente específico e imunoprivilegiado essencial para o desenvolvimento do processo espermatogênico (RUSSELL et al., 1990; RUSSELL e GRISWOLD, 1993, SMITH E WALKER, 2014).

Nos testículos de animais sexualmente maduros as células de Sertoli estão completamente diferenciadas. A variação considerável na forma e estrutura da célula de Sertoli, durante o ciclo do epitélio seminífero, demonstra o alto grau de plasticidade desta célula, o que reflete as alterações morfológicas e funcionais que ocorrem nas células germinativas (RUSSELL et al., 1993). Além da formação da barreira de célula de Sertoli, estas células somáticas desempenham funções essenciais para o desenvolvimento das células germinativas. Assim, podem ser citados o fornecimento de nutrientes e inúmeros outros fatores importantes para as células germinativas, mediação da ação do FSH e da testosterona na espermatogênese, fornecimento de suporte físico (sustentação) para as células espermatogênicas, participação ativa no processo de liberação (espermição) das espermátides alongadas para o lume tubular, fagocitose do excesso de citoplasma (corpos residuais) resultante da liberação das células espermiadas bem como de células germinativas que sofrem apoptose. As células de Sertoli secretam o fluido tanto em direção ao

lume tubular quanto para o compartimento intertubular. Em direção ao lume o fluido colabora com o transporte dos espermatozoides, além de contribuir com substâncias importantes para a função epididimária e maturação espermática. No compartimento intertubular o fluido está relacionando com os mecanismos de regulação parácrina de outros tipos celulares do testículo tais como as células peritubulares mióides, de Leydig e musculares lisas dos vasos (RUSSELL e GRISWOLD, 1993; SHARPE, 1994; FRANÇA e RUSSELL, 1998; HESS e FRANÇA, 2007). Ainda em relação às células de Sertoli ressalta-se que diversos estudos mostram que o número desta importante célula somática por testículo é o principal fator na determinação da magnitude da produção espermática e do tamanho do testículo (HESS et al., 1993; SHARPE, 1994; FRANÇA et al., 1995; HESS E FRANÇA, 2007). Neste contexto, a capacidade das células de Sertoli de suportar um número de células germinativas é relativamente fixa para cada espécie, e que a população deste tipo celular mantém-se estável após a puberdade (FRANÇA e RUSSELL, 1998; SHARPE et al., 2003), não havendo também alteração no seu número ao longo dos diferentes estádios do ciclo do epitélio seminífero (WING e CHRISTENSEN, 1982).

Em relação ao compartimento intertubular seus elementos componentes são as células de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e uma população celular variável constituída principalmente de fibroblastos, macrófagos e mastócitos (RUSSELL et al., 1990). Apesar de existir grande variação entre as diversas espécies quanto à proporção volumétrica dos diferentes componentes do compartimento intertubular, a célula de Leydig é o tipo celular mais frequente neste compartimento (FAWCETT et al., 1973; FRANÇA e RUSSELL, 1998).

De acordo com trabalho realizado por Fawcett et al. (1973) e posteriormente revisado por Russell (1996), o arranjo e a proporção dos elementos constituintes do espaço intertubular seguem três padrões distintos: (I) espécies nas quais as células de Leydig e o tecido conjuntivo ocupam uma área relativamente pequena no espaço intertubular, contrastando com extensos sinusóides e espaços linfáticos, conforme observado em ratos, camundongos, hamsteres, chinchilas e *guinea pig*; (II) espécies que apresentam grupos de células de Leydig espalhados em abundante tecido conjuntivo frouxo que é

drenado por vasos, arranjo este observado em bovinos, ovinos e primatas, incluindo-se o homem; e (III) espécies nas quais abundantes agrupamentos de células de Leydig ocupam praticamente todo o espaço intertubular, apresentando muito pouco tecido conjuntivo e linfáticos, conforme visto em suídeos e zebras. Entretanto, o cateto, uma espécie que assim como o suíno doméstico, pertence a subordem Suiformes (GROOVER E GRUBB, 1993), apresenta uma citoarquitetura testicular peculiar, não sendo a mesma observada em nenhuma das espécies de mamíferos já investigadas. Neste contexto, as células esteroideogênicas ficam localizadas principalmente nos lobos que circundam os túbulos seminíferos, sendo rara a ocorrência das mesmas no compartimento intertubular (COSTA et al., 2010; CAMPOS-JR et al., 2012).

1.4 Espermatogênese e demais interações celulares no testículo

Conforme já mencionado, um dos componentes do túbulo seminífero é o epitélio seminífero, formado pelas células de Sertoli e pelas células germinativas que se encontram em diferentes fases de um processo altamente complexo e bem organizado denominado espermatogênese e que dura cerca de 40 a 60 dias na maioria das espécies de mamíferos já investigados (FRANÇA e RUSSELL, 1998; FRANÇA et al., 1998; HESS e FRANÇA, 2007). Com base nas características morfológicas e funcionais, o processo espermatogênico pode ser dividido em três etapas: fase espermatogonial ou mitótica, fase espermatocitária ou meiótica e fase espermiogênica ou de diferenciação (RUSSELL et al., 1990; SHARPE, 1994).

A fase espermatogonial é caracterizada pela auto-renovação e diferenciação das espermatogônias, gerando células “amplificadoras” e de reserva ou células comprometidas com a diferenciação. Estas células mais diferenciadas darão continuidade ao processo espermatogênico de modo que um intrincado processo de diferenciação e proliferação irá ocorrer até a última divisão mitótica que originará os espermatócitos primários (pré-leptótenos), dando assim início à fase espermatocitária (DE ROOIJ e RUSSELL, 2000). Nesta etapa, na qual ocorre a duplicação do DNA, a recombinação gênica e a segregação dos cromossomos homólogos, a fase mais longa corresponde à prófase I que é subdividida em pré-leptóteno/leptóteno, zigóteno, paquíteno e

diplóteno que formará os espermátócitos secundários. Após a segunda divisão meiótica, estes espermátócitos secundários darão origem a células haploides denominadas espermátides (HESS e FRANÇA, 2007). Estas espermátides constituem a fase espermiogênica na qual, através de um complexo processo de diferenciação, que inclui a formação do acromossomo e do flagelo e a compactação do DNA (substituição das histonas por protaminas), as espermátides arredondadas se alongam para originar os espermatozoides. Estes últimos, após passarem pelo processo de maturação no epidídimo, estarão aptos a fertilizarem o ovócito (RUSSEL et al., 1990; HESS e FRANÇA, 2007).

Assim como a célula de Sertoli, cujo papel na regulação da função testicular e especificamente na espermatogênese já foi mencionado, as células de Leydig são fundamentais para a síntese e secreção dos esteroides sexuais, seja durante a fase fetal quanto pós-natal, os quais são sintetizados a partir de uma molécula base, o colesterol (BARDIN, 1996). De modo geral as células de Leydig são encontradas próximas aos vasos sanguíneos ou do tecido conjuntivo da cápsula testicular (túnica albugínea) e sua ultra-estrutura evidencia sua atividade esteroidogênica pela presença de retículo endoplasmático liso bem desenvolvido e mitocôndrias com cristas tubulares (RUSSELL et al., 1996). A produção dos esteroides 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 negativo do LH é exercido principalmente pela testosterona tanto na adenohipófise quanto no hipotálamo (SHUPNIK & SCHREIHOFER, 1997). 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). Além dos andrógenos, as células de Leydig também são responsáveis pela produção do estrógeno no sistema genital masculino. Desse modo, durante o desenvolvimento testicular pós-natal, associada às células de Sertoli imaturas, 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 esteroide sexual, de maneira que as principais fontes de estrógenos no testículo pós-púbere e adulto são as células de Leydig e as células germinativas (CARREAU et al., 1999; PETERSEN & SÖDER, 2006). 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 sistema genital masculino são os ductos eferentes, nos quais ocorre a reabsorção de fluido tubular (OLIVEIRA et al., 2002), e o epidídimo, onde também desempenham um importante papel na regulação da função deste órgão (CARREAU et al.; 2007; HESS et al., 2011). Além disso, o envolvimento do estrógeno na regulação da proliferação das células de Sertoli foi demonstrado em ratos (LUCAS et al., 2008) e em suínos (AT-TARAS et al., 2006a; BERGER et al., 2008).

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). Entretanto a proliferação e a diferenciação destas células são reguladas por diversos hormônios, tais como os esteroides sexuais (estrógenos e andrógenos) e o hormônio tireoidiano, e por fatores de transcrição como GATA (WU et al., 2007, HU et al., 2013). 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/hCG, IGF-I, TGF alfa e beta, FSH, MIS, estrógenos, hormônio tireoidiano e andrógenos (GE et al. 1996; ROUILLER-FABRE et al. 1998; MENDISHANDAGAMA & ARIYARATNE, 2001; WU et al., 2007;).

As células mesenquimais peritubulares são consideradas as principais precursoras das células de Leydig do tipo adulto (RUSSELL et al., 1995; GE et al., 1996; LEJEUNE et al., 1998; LANDREH et al., 2013). 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 KRETZER et al., 1994; GAYTAN et al., 1994; RUSSELL et al., 1995; DOMBROWICZ et al., 1996; DAVIDOFF et al., 2004). 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, estendendo-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 de andrógenos, 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 esteroidogênica 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; REBOURCET et al., 2014).

Indicativos da ação parácrina das células de Leydig sobre as células germinativas em catetos foram recentemente demonstrados (CAMPOS-JR et al., 2012). Nesta espécie, as células de Leydig parecem desempenhar um importante papel na regulação da diferenciação espermatogonial, que consiste na transição da espermatogônia A alinhada para A_1 . Neste aspecto, foi observado que as espermatogônias A indiferenciadas localizam-se preferencialmente em regiões do túbulo seminífero que não estejam em contato com partes do compartimento intertubular que contenham células de Leydig. Assim, tão logo ocorra o processo de diferenciação, as espermatogônias diferenciadas A_1 apresentam um posicionamento que indica a transição entre uma localização preferencial e outra distribuída ao acaso, conforme é vista para as gerações espermatogoniais subsequentes (A_2 , A_3 , A_4 , In e B) (CAMPOS-JR et al., 2012).

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. A partir de trabalhos recentemente desenvolvidos, esta importante interação entre as células somáticas do testículo tem sido fortemente demonstrada. Assim, conforme relatado por Welsh et al. (2009), camundongos cujas células peritubulares mióides não possuem receptores de andrógenos (PTM-ARKO) são inférteis. Conforme mencionado anteriormente, essas células, juntamente com as células de Sertoli, são responsáveis pela formação da lâmina basal (DYM, 1994; SKINNER, 2005). A relação funcional entre células peritubulares mióides e células de Sertoli foi demonstrada recentemente por Rebourcet et al. (2014), utilizando modelo murino no qual as células de Sertoli foram removidas tanto na fase fetal quanto após o nascimento. Neste contexto ficou evidenciado que a manutenção do *status* diferenciado das células peritubulares mióides durante o desenvolvimento fetal e neonatal, representado pela secreção de proteínas típicas de células contráteis (α -isoactina, F-actina e miosina), é dependente tanto da presença quanto da proximidade física com as células de Sertoli (REBOURCET et al., 2014). De maneira geral, 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 formando 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). Os filamentos produzidos nas células peritubulares apresentam-se 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).

1.5 Xenoenxerto de fragmentos do testículo e morfogênese *de novo* a partir do enxerto de suspensões de células testiculares

O enxerto de fragmentos de testículo de animais jovens na região subcutânea do dorso de camundongos imunodeficientes (HONARAMOOZ et al., 2002; DOBRINSKI, 2005) constitui uma excelente abordagem experimental, que diferentemente do que ocorre com o transplante de células germinativas (BRINSTER E AVARBOCK, 1994; DOBRINSKI et al., 1999; BRINSTER, 2002), pode ser adaptada a diversas espécies de mamíferos filogeneticamente distantes, produzindo espermatozoides viáveis geralmente alguns meses após o enxerto (HONARAMOOZ et al., 2002; SCHLATT et al., 2002; SHINOHARA et al., 2002; NAKAI et al., 2010). Mais especificamente, o desenvolvimento bem sucedido dos fragmentos enxertados deve-se ao fato das células germinativas serem co-transplantadas para o camundongo receptor, juntamente com as células somáticas do testículo, preservando-se assim o ambiente testicular original (DOBRINSKI, 2008; RODRIGUEZ-SOSA et al., 2013). Desta forma, o xenoenxerto de fragmentos testiculares é uma importante ferramenta que pode ser utilizada para se investigar a função testicular, particularmente os aspectos relacionados ao processo espermatogênico. No entanto, merece ser ressaltado que, por razões ainda não conhecidas, dentre as várias espécies nas quais esta técnica já foi realizada, o sucesso da progressão da espermatogênese varia de acordo com a espécie doadora (DOBRINSKI, 2005). Assim, a maior frequência de sucesso do xenoenxerto tem sido associada com a espécie suína, utilizando-se ambos tecido fresco ou criopreservado (HONARAMOOZ et al., 2008; NAKAI et al., 2010; KANEKO et al., 2013; KANEKO et al., 2014). Recentemente foi demonstrada, com sucesso, a eficiência desta técnica para a conservação de tecido testicular de cateto (CAMPOS-JR et al., 2014). Contudo, no xenoenxerto de fragmentos de testículo a possibilidade de estudar individualmente os tipos celulares e suas interações dentro do nicho espermatogonial é limitada (DORES E DOBRINSKI, 2014). Neste contexto, o xenoenxerto das células testiculares isoladas foi desenvolvido mais recentemente. Nesta abordagem, células obtidas pela digestão enzimática de testículos de suínos recém-nascidos, quando transplantadas sob a pele do dorso de camundongos imunocomprometidos foram capazes de formar uma

unidade endócrina e espermatogênica funcional, suportando a completa maturação e desenvolvimento do gameta masculino (HONARAMOOZ et al., 2007). Até o presente momento, a capacidade morfogênica das células testiculares isoladas pode ser investigada em suínos (HONARAMOOZ et al. 2007), roedores (KITA et al. 2007), ovinos (ARREGUI et al. 2008), bovinos (ZHANG et al. 2008), cateto (CAMPOS-JR et al., 2014) e organismos utilizados como modelos em biologia do desenvolvimento tais como zebrafish (KAWASAKI *et al.* 2010) e *Xenopus* (KAWASAKI et al. 2006). Particularmente em cateto, o espermatozoide formado foi utilizado para fertilização *in vitro*, resultando em embrião viável (CAMPOS-JR et al., 2014). A dinâmica de manipulação propiciada pela morfogênese *de novo* a partir do enxerto de células testiculares foi demonstrada recentemente por Dores e Dobrinski (2014). Neste estudo, o desenvolvimento dos enxertos foi avaliado em diferentes condições, tais como variações no número total de células e no percentual de células germinativas utilizadas bem como o uso de Matrigel como um molde para o rearranjo testicular.

Desta forma, a partir da habilidade morfogênica das células testiculares isoladas em reconstituir um “testículo funcional”, permitindo o estabelecimento da espermatogênese após o transplante (RODRIGUEZ-SOSA e DOBRINSKI, 2009), criam-se novas possibilidades envolvendo, por exemplo, o estudo das interações entre as células somáticas e germinativas do testículo

JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

A célula de Sertoli tem sido considerada um importante elemento para o direcionamento do desenvolvimento gonadal, em ambos os períodos fetal e pós-natal. Entretanto, a participação das demais células na orientação da organização testicular deve ser investigada. Assim, conforme demonstrado recentemente por Avelar et al. (2010), a regionalização da maturação tubular observada durante o período pós-natal em suínos está correlacionada com a presença de um tipo específico de células de Leydig. Contudo, apesar dos diversos modelos animais geneticamente manipulados disponíveis, ainda não é possível estabelecer como os vários processos celulares durante o desenvolvimento dos testículos são integrados e coordenados (WARR E GREENFIELD, 2012). Neste contexto, o cateto é uma espécie que apresenta uma citoarquitetura testicular peculiar, com as células de Leydig predominando entre os lobos testiculares, que o torna um sugestivo modelo para se estudar as interações celulares durante o desenvolvimento testicular. Diante disso e utilizando a técnica de enxerto de células testiculares e a morfogênese *de novo*, o presente trabalho tem como proposta dar início a uma ampla investigação, a partir da manipulação do conteúdo das suspensões celulares, das interações celulares que direcionam o desenvolvimento dos testículos em mamíferos.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar nos tecidos quiméricos neoformados a partir do enxerto da mistura de células testiculares de catetos (*Tayassu tajacu*) e suínos (*Sus scrofa domesticus*) jovens em camundongos imunodeficientes, a viabilidade de interação funcional e recapitulação do desenvolvimento testicular utilizando espécies diferentes.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o peso dos tecidos neoformados e da vesícula seminal em diferentes tempos após o enxerto (10/16d, 1, 2, 4, 5, 6 e 8 meses);
- ✓ Caracterizar histologicamente os tecidos neoformados quanto à progressão da espermatogênese aos 10/16d, 1, 2, 4, 5, 6 e 8 meses;
- ✓ Investigar a morfometria dos fragmentos obtidos a partir da mistura de células de Leydig de suíno e túbulos seminíferos de catetos bem como da suspensão pura de suíno aos 5, 6 e 8 meses, através da proporção volumétrica dos diferentes componentes do parênquima testicular, incluindo-se o diâmetro das espermatogônias A indiferenciadas e dos túbulos seminíferos;
- ✓ Avaliar a distribuição das células esteroideogênicas no compartimento intertubular e nos cordões que circundam os túbulos seminíferos nos tecidos neoformados por mistura de células de Leydig de suíno e túbulos seminíferos de catetos bem como pela suspensão pura de suíno aos 5, 6 e 8 meses;
- ✓ Analisar o grau de maturação dos túbulos seminíferos, através da identificação das células germinativas mais avançadas nos tecidos obtidos a partir da mistura de células de Leydig de suíno e túbulos seminíferos de catetos bem como da suspensão pura de suíno aos 5, 6 e 8 meses;

- ✓ Avaliar o peso dos tecidos neoformados e da vesícula seminal em diferentes tempos após o enxerto (10/16d, 1, 2, 4, 5, 6 e 8 meses);
- ✓ Caracterizar histologicamente os tecidos neoformados quanto à progressão da espermatogênese aos 10/16d, 1, 2, 4, 5, 6 e 8 meses;
- ✓ Investigar a morfometria dos fragmentos obtidos a partir da mistura de células de Leydig de suíno e túbulos seminíferos de catetos bem como da suspensão pura de suíno aos 5, 6 e 8 meses, através da proporção volumétrica dos diferentes componentes do parênquima testicular, incluindo-se o diâmetro das espermatogônias A indiferenciadas e dos túbulos seminíferos.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local

A pesquisa foi realizada nos Laboratórios de Pesquisas Morfológicas em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí - UFPI e de Biologia Celular- Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG (Programa Casadinho/Procad). Os catetos foram obtidos junto ao Núcleo de Estudos e Preservação de Silvestres (NEPAS) – (Certificado de Registro IBAMA/PI N°. 02/08-618) da Universidade Federal do Piauí-UFPI; os suínos foram obtidos junto à Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa, localizada no município de Igarapé-MG e vinculada à Escola de Veterinária da UFMG; os camundongos imunodeficientes originaram-se da criação própria do Laboratório de Biologia Celular/ICB/UFMG. Esta pesquisa possui autorizações do CEUA/UFMG nº64/2013; CEEA/UFPI no 001/13 e do IBAMA/SISBIO nº 37988-1.

4.2 Animais experimentais

4.2.1 Catetos

Seis catetos (*Tayassu tajacu*) machos, com até 5 meses de idade, foram utilizados como doadores das células de Leydig e também das demais células testiculares (células germinativas, células de Sertoli e outras células somáticas). Nesta fase, as células germinativas mais avançadas observadas nos cordões seminíferos são espermatogônias do tipo A (Campos-Jr et al., 2011; Guimarães et al., 2013).

4.2.2 Suínos

Testículos de oito suínos domésticos (*Sus domesticus*), com 30 dias de idade, foram utilizados como doadores de células de Leydig e também das demais células testiculares (células germinativas, células de Sertoli e outras células somáticas) para a elaboração das suspensões celulares. De maneira

semelhante aos catetos, nos testículos de suínos aos 30 dias de idade também são observadas espermatozônias do tipo A (Avelar et al., 2010).

4.2.3 Camundongos

Vinte e oito camundongos imunodeficientes da linhagem CB-17/SCID, machos, sexualmente maduros e castrados foram utilizados como receptores. Durante todo o período experimental, estes animais foram mantidos em microisoladores sob condições de manejo e tratamento apropriados.

4.3 Coleta dos testículos e preparação dos *pellets*

Os catetos foram submetidos a jejum alimentar de 12 horas e hídrico de 8 horas. Em seguida foi administrado 15 mg/Kg de cloridrato de cetamina (Francotar®, Virbac) associado a 1 mg/Kg de maleato de midazolam (Dormire, CRISTÁLIA®) e 2 mg/Kg de cloridrato de meperidina (Dolosal, CRISTÁLIA®) por via intramuscular profunda com auxílio de zarabatana pneumática (Mod.45 DELTA STANDARD®). Os animais foram então encaminhados ao Hospital Veterinário Universitário (HVU) da Universidade Federal do Piauí e posicionados em decúbito dorsal para tricotomia do escroto. Em seguida foi realizada antissepsia de rotina com álcool a 70% e Iodopovidona (PVPI). Os testículos foram posicionados em situação pré-escrotal, onde pele e tecido subcutâneo foram incisados e os funículos espermáticos foram divulsionados e expostos. A fim de se manter os testículos estéreis, sem que houvesse a abertura das demais fáscias testiculares, foram realizadas duas transfixações do funículo espermático com fio cirúrgico inabsorvível 2-0 (Nylon®) e foi realizada uma incisão no meio das duas suturas para total exérese dos testículos. A rafia da pele e tecido subcutâneo foi realizada com fio cirúrgico inabsorvível 2-0 (Nylon 2-0®). Quando necessário, foi administrada metade da dose inicial de cloridrato de cetamina por via intramuscular para manutenção anestésica. Com relação aos suínos antes da cirurgia 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 um veterinário e seguiram as recomendações do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais – CETEA/UFMG.

Após as cirurgias, em ambas as situações os testículos obtidos foram transferidos para o HBSS contendo 0,1% de antibiótico e transportados em gelo. No laboratório e em ambiente estéril, os testículos foram separados da túnica albugínea e mediastino. O parênquima testicular foi submetido a digestão enzimática dupla (colagenase e hialuronidase). A suspensão obtida foi mantida em repouso por 30 minutos, permitindo assim que os fragmentos dos túbulos seminíferos se depositassem no fundo do frasco e o sobrenadante contendo as células intersticiais fosse recolhido. As células de Leydig foram recuperadas e mantidas em DMEM enriquecido com 10% de soro fetal bovino, em banho de gelo, até serem utilizadas. Após o procedimento inicial de digestão, os fragmentos de túbulos seminíferos foram incubados por 20 minutos a temperatura de 37°C em uma solução de tripsina. Posteriormente, as células foram filtradas através de filtros com *mesh* de 60µm, para remover todos os agregados celulares e assegurar que uma suspensão de células isoladas fosse adquirida. As alíquotas com aproximadamente 5×10^7 células foram preparadas de acordo com um dos seguintes protocolos: células de Leydig de suínos + túbulo de cateto; células de Leydig de cateto + túbulos seminíferos de suínos; suspensão contendo somente células de cateto; suspensão contendo somente células de suíno. Os *pellets* foram obtidos por centrifugação e mantidos em banho de gelo até o momento do xenoenxerto nos camundongos imunodeficientes.

4.4 Xenoenxerto

Vinte e oito camundongos imunodeficientes CB-17/SCID com aproximadamente 60 dias de idade foram anestesiados com a associação de cloridrato de cetamina (135 mg/Kg PV, Vetanarcol, König, Brasil) e cloridrato de xilazina (6mg/Kg PV, Dopaser, Calier, Espanha). Inicialmente, os animais foram orquiectomizados e em seguida, posicionados em decúbito ventral e 4 incisões com aproximadamente 0,5 cm foram feitas bilateralmente ao plano mediano. Estas foram divulsionadas formando bolsos, dentro dos quais foi colocado um *pellet* contendo a mistura celular. Após receberem o enxerto, as incisões foram

suturadas com grampos cirúrgicos de Michel 11mm. Com a finalidade de impedir a hipotermia durante a cirurgia e facilitar a recuperação, os animais foram mantidos sobre uma superfície aquecida a 37° C.

4.5 Recuperação dos enxertos

Os camundongos receptores foram distribuídos em 4 grupos com 7 indivíduos seguindo a distribuição já descrita neste Material e Métodos (ver item 4.3). As coletas foram realizadas inicialmente após 10 e 16 dias; 1, 2, 4, 5, 6 e 8 meses. Os camundongos foram eutanasiados após anestesia com tiopental (50 mg/Kg PV, Thiopentax, Cristália, Brasil) e os enxertos, bem como as glândulas sexuais acessórias andrógeno-dependentes (vesícula seminal e glândula de coagulação) foram coletadas e pesadas.

4.6 Coleta e fixação dos fragmentos

No período programado para a coleta do material foram tomados dados biométricos referentes ao peso dos camundongos, das vesículas seminais e dos enxertos retirados do seu dorso (craniais e caudais).

4.6.1 Preparação histológica

Os fragmentos craniais e caudais direito e esquerdo retirados do dorso dos camundongos foram fixados em solução de Bouin por um período de 24h. Em seguida foi realizada desidratação em concentrações crescentes de álcool (70°, 90° e 100°) e diafanizados em xilol e incluídos em paraplast. Cortes histológicos com 5µm de espessura foram obtidos e corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE), montadas com Entellan e analisadas em microscópio óptico. Fragmentos das mesmas regiões também foram fixados em solução de glutaraldeído a 4% em tampão fosfato 0,05M, pH 7,2 pelo tempo aproximado de 24h, a 4°C. Estes foram posteriormente desidratados em concentrações crescentes de álcool (70°, 80°, 95° e 100°) com trocas a cada 1h. Após a desidratação, os fragmentos foram incluídos em glicol metacrilato (Leica Historresin Embedding Kit, Leica Instruments), e posteriormente seccionados na espessura de 4 µm em micrótomo rotativo Leica, com navalhas de vidro e

tungstênio. As secções obtidas foram coradas com azul de toluidina-borato de sódio a 1%, montadas com Entellan e analisadas em microscópio óptico.

4.6.2 Avaliação histológica

Para se verificar o sucesso de desenvolvimento dos tecidos que se formaram após o enxerto das suspensões celulares, foram avaliadas lâminas representativas de todos os tecidos recuperados. Para se investigar o desenvolvimento das células germinativas, 30 secções transversais de cordões/túbulos seminíferos foram avaliadas para cada um dos fragmentos. A presença dos seguintes tipos de células germinativas foi avaliada:, espermatogônia (incluindo-se as do tipo A, intermediária e tipo B), espermatócito primário (pré-leptóteno, leptóteno e zigóteno, paquíteno e diplóteno), espermatídes arredondada e alongada. Esta avaliação foi realizada em aumento de 1000x.

4.7 Morfometria

Em função dos resultados obtidos para os tecidos que se formaram a partir das misturas contendo células de Leydig de cateto, para os dados relativos a proporção volumétrica, diâmetro tubular e diâmetro nuclear das espermatogônias indiferenciadas foram utilizados somente das suspensões contendo células de Leydig de suínos e túbulos seminíferos de catetos e nas suspensões contendo apenas células de suínos nas idades mais avançadas de 5, 6 e 8 meses. Todos os resultados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.) mensurados para regiões representativas craniais e caudais de cada suspensão analisada

4.7.1 Proporção volumétrica

As proporções volumétricas dos componentes tubulares e intertubulares presentes nas suspensões foram determinadas através de microscopia de luz, em aumento de 400x, utilizando-se retículo com 441 intersecções ajustada à ocular do microscópio Olympus BX40. Nesta análise, 15 campos escolhidos ao

acaso foram utilizados para cada fragmento cranial e caudal, perfazendo-se um total de 6615 pontos por fragmento investigado.

4.7.2 Diâmetro dos túbulos seminíferos e espermatogônias

Fragmentos craniais e caudais foram utilizados para esta análise, onde o diâmetro tubular médio por suspensão foi obtido a partir da mensuração ao acaso de 15 secções transversais de cordões/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 200x. Para o diâmetro nuclear das espermatogônias indiferenciadas de catetos e suínos foram escolhidas 20 células, caracterizadas morfológicamente de acordo com Campos-Jr et al., (2012) e Avelar et al. 2010; respectivamente, nas quais o nucléolo estivesse mais evidente. Assim, o diâmetro obtido é resultado da mensuração dos eixos nucleares maior e menor destas células.

4.7.3 Distribuição das células de Leydig

Para se investigar o padrão de distribuição das células de Leydig nos fragmentos recuperados, foram escolhidos 15 campos ao acaso, em aumento de 200x, utilizando-se retículo com 441 intersecções ajustada à ocular.e foram consideradas as células de Leydig presentes nos lobos testiculares e no compartimento intertubular.

4.8 Imunohistoquímica

Após a fixação inicial com solução de Bouin, as secções histológicas obtidas foram aderidas em lâminas tratadas com poli-L-lisina, desparafinizadas em xilol e hidratadas em concentrações decrescentes de etanol e água destilada. Em seguida, o bloqueio da peroxidase endógena foi realizado através da incubação dos cortes com “Dual Endogenous Enzyme Block” (Dako Envision), por 30 minutos.

A recuperação antigênica foi realizada utilizando-se tampão citrato (pH 6,0) em microondas, com potência máxima, por cinco minutos contados a partir da ebulição. Após o resfriamento, as lâminas foram incubadas com Ultra V

Block (Dako Envision) por 5 minutos e em seguida com o anticorpo primário “*overnight*” à 4°C. Em diferentes baterias foram utilizados anticorpos para GATA-4, um marcador específico das células de Sertoli; Ki67, um marcador de proliferação celular; 3beta-HSD, enzima da via esteroidogênica e receptor de andrógeno (TABELA 1). Todos os anticorpos foram testados quanto à titulação ideal. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em tampão e incubadas com o anticorpo secundário biotilado por 60 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram expostas ao complexo estreptavidina-peroxidase (Peroxidase Dual Link System- Dako Envision) por 15 minutos, à temperatura ambiente. A reação foi revelada com diaminobenzidina (DAB) e os cortes contra-corados com Hematoxilina de Mayer. Secções histológicas de testículos de camundongos adultos foram utilizadas como controle positivo, enquanto no controle negativo o anticorpo primário foi substituído por PBS (omissão do anticorpo primário). Após esta etapa, as lâminas foram analisadas para se investigar os tipos celulares marcados, bem como a localização dos mesmos nas diferentes regiões do testículo.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Biometria

Como pode ser observado na Figura 1, os tecidos formados produziram uma elevação facilmente perceptível sob a pele dos camundongos receptores (A). Após a coleta, verificou-se a superfície lisa, com um revestimento externo de tecido conjuntivo (B). De maneira geral o peso dos tecidos recuperados aumentou em função do tempo. Entretanto aos 5 meses, o peso obtido para o tecido formado a partir das células de suíno apresentou um decréscimo importante em relação aos 4 e aos 6 meses. (Figura 2 A). O peso da vesícula seminal obtido a partir de um animal do grupo Leydig de suíno e túbulos de cateto, 10 dias após a castração e o enxerto foi semelhante ao controle. Contudo, uma queda entre 10 e 16 dias pós-enxerto foi observada, seguida pela recuperação, atingindo o peso controle aos 2 meses. Entretanto, para os animais que hospedavam a suspensão pura de cateto, o peso da glândula retornou ao controle apenas aos 4 meses (Figura 2 B).

5.2 *Morfogênese testicular de novo e progressão da espermatogênese*

A avaliação histológica revelou que maiores pesos não estavam diretamente relacionados ao grau de desenvolvimento dos tecidos, particularmente em relação à maturação dos túbulos seminíferos e a presença de células germinativas mais avançadas (Figura 3). Isto foi particularmente observado nos grupos em que havia células de Leydig de cateto com túbulos seminíferos de suíno e nas suspensões celulares puras de catetos, onde os fragmentos aumentaram de tamanho, mas se encontravam atrasados em relação aos grupos que continham células de Leydig de suíno com túbulos seminíferos cateto e nas suspensões celulares puras de suíno (Figura 3).

Assim, a primeira avaliação foi realizada nos tecidos recuperados entre 10 e 16 dias após o enxerto. Nas unidades teciduais formadas a partir das suspensões puras (cateto e suíno) já foi possível identificar cordões

seminíferos, formados por células de Sertoli imaturas e espermatogônias (Figura 3; A e A’’). Apenas células de Leydig estavam presentes no tecido que se organizou a partir da suspensão contendo célula de Leydig de cateto e túbulos de suíno (Figura 3; A’). Nenhuma formação típica do testículo foi identificada no grupo Leydig de suíno e túbulos de cateto (Figura 3; A’’),

O padrão de organização observado entre 1 e 4 meses foi semelhante para os quatro grupos estudados (Figura 3; B – B’’, C – C’’, D – D’’). Neste contexto, cordões seminíferos, rede testicular e o compartimento intertubular bem definidos estavam presentes. Entretanto, o ritmo de desenvolvimento das unidades teciduais se tornou diferente entre os grupos a partir de 5 meses, quando 2 padrões puderam ser definidos, baseando-se na espécie doadora da célula de Leydig. Assim, os grupos nos quais as células de Leydig de cateto estavam presentes, a progressão da espermatogênese não foi observada (Figura 3; E, E’). O aspecto imaturo, isto é, a presença de cordões seminíferos contendo apenas células de Sertoli (*SCO, Sertoli cell only*, somente células de Sertoli, sem células germinativas), caracterizou estes testículos formados *de novo*

também aos 6 e 8 meses (Figura 3; F, F’, G, G’). Desse modo não foi possível identificar o padrão para a distribuição das células de Leydig nestes tecidos. Por outro lado, nos grupos que continham células de Leydig de suínos observou-se o avanço da espermatogênese. Assim, aos 5 meses espermátides alongadas e espermatócitos primários em paquíteno eram as células germinativas mais avançadas encontradas respectivamente, nos túbulos seminíferos do tecido Leydig suíno (célula de Leydig de suíno e túbulos de cateto) e no tecido formado a partir da suspensão pura de suíno (Figura 3; E’’, E’’’). Diante disso, aos 6 meses a espermatogênese completa estava presente em ambos os grupos, inclusive sendo observados espermatozoides no lume tubular (Figura 3; F’’, F’’’). Aos 8 meses observou-se a continuidade do processo espermatogênico (Figura 3; G’’, G’’’; Figura 4 I, J).

Contudo, o estabelecimento a citoarquitetura testicular, no que diz respeito ao padrão de distribuição seguido pelas células de Leydig, especialmente no tecido formado a partir da mistura das células de espécies diferentes (quimera), ocorreu aos 8 meses após o enxerto. Conforme pode ser observado na Figura 4 A, que representa o tecido com células de Leydig de

suíno e túbulos de cateto, os lobos testiculares estavam bem definidos, e as células de Leydig formando cordões nesta região, também estavam localizadas entre os túbulos seminíferos (Figura 4 C, E, G). Diferentemente do que ocorre no tecido de suíno, no qual não se observa lobos (Figura 4 B) e as células de Leydig se localizam entre os túbulos seminíferos (Figura 4 D, F, H).

5.3 Avaliação morfométrica dos testículos após enxerto e morfogênese *de novo*

Embora espermatogênese completa tenha sido alcançada nos grupos contendo células de Leydig de suínos (quimera e suspensão pura), conforme pode ser visto na Figura 5 (A e B), o percentual de túbulos com células germinativas foi menor diante do grande número de túbulos SCO. Assim, do total de túbulos analisados, pelo menos 50% deles apresentavam a característica SCO. Com relação à célula germinativa mais avançada, conforme já mencionado, aos 5 meses espermatídes alongadas estavam presentes no tecido formado da mistura e paquítenos no tecido suspensão suíno. Contudo, aos 6 meses, em 7,3% e 9,3%, e posteriormente aos 8 meses, em 17% e 38% dos túbulos, respectivamente para os grupos Leydig suíno (quimera) e suspensão suíno, a espermatogênese estava completa (Figura 5, A e B).

O diâmetro tubular foi obtido para os túbulos seminíferos nos quais células germinativas estavam presentes (Figura 6). Assim, aos 5 meses o diâmetro tubular nos tecidos da suspensão pura de suíno correspondeu a aproximadamente 52% daquele obtido para o tecido com células de Leydig de suíno e túbulos de cateto. Com o estabelecimento da espermatogênese a partir de 6 meses, as médias encontradas para este parâmetro foram semelhantes em ambos os grupos.

A distribuição dos componentes do parênquima testicular nos tecidos quimera Leydig suíno e suspensão pura de suíno pode ser vista nas figuras 7 e 8. Assim, entre 5 e 6 meses observou-se um aumento de aproximadamente 28,5% e 38% de epitélio seminífero, respectivamente, no tecido quimera e suspensão de suíno. Aos 8 meses estes valores se mantiveram estáveis (Figura 7 A). O lume tubular foi observado pela primeira vez no tecido suíno

aos 6 meses após o enxerto, tornando-se cerca de 38% maior aos 8 meses. Por outro lado, aos 5 meses o lume já estava presente no tecido quimera Leydig suíno, refletindo a antecipação da maturação tubular (Figura 7 B). De maneira geral, o percentual de túnica própria apresentou um padrão de redução dentro do período investigado. Neste contexto, na quimera foi observada uma redução de aproximadamente 50% entre 5 e 8 meses e, em menor amplitude (~19%), no tecido suíno entre 5 e 6 meses (Figura 7 C). Seguindo a mesma tendência observada para o epitélio seminífero, o percentual do total ocupado pelo compartimento tubular aumentou 10% e 34%, respectivamente para os tecidos quimera Leydig suíno e suíno entre 5 e 6 meses. Aos 8 meses, cerca de 82% e 88% do parênquima, respectivamente, da quimera e suíno estavam ocupados pelos túbulos seminíferos (Figura 7 D). Embora tenha sido observada uma redução no percentual ao longo do período estudado, as células de Leydig correspondem ao principal componente do compartimento intertubular. Assim, 5 meses pós-enxerto o percentual de células de Leydig correspondeu, respectivamente, a 15,8% e 17,4% nos tecidos quimera Leydig suíno e suíno. Aos 6 meses observou-se uma redução deste percentual (13,9% e 10,6%, respectivamente, quimera e suíno), mas que manteve-se em valores próximos aos 8 meses (14,4% e 9,9%, respectivamente, quimera e suíno) (Figura 8 A). A diminuição do percentual de tecido conjuntivo e vasos sanguíneos foi observada ao longo dos três momentos investigados. Assim, aos 8 meses valores tão baixos quanto 2,8% e 1,7% para o tecido conjuntivo, e 0,2% e 0,4% para vaso sanguíneo foram obtidos respectivamente, para a quimera e suíno (Figura 8 B e C). Neste contexto e configurando, conforme o esperado, uma relação inversa com o total de túbulos seminíferos, o total de compartimento intertubular reduziu ao longo do período em ambos os grupos (Figura 8 D).

Conforme já indicado pela análise histológica e confirmado pela morfometria, no tecido quimera as células de Leydig apresentaram-se distribuídas tanto entre os lobos testiculares quanto entre os túbulos seminíferos (Figura 9 A). Diferentemente no suíno, as células esteroideogênicas permaneceram entre os túbulos seminíferos (Figura 9 B).

O diâmetro nuclear associado à caracterização morfológica das espermatogônias foi utilizado para se definir a espécie doadora em cada um

dos tecidos avaliados. Assim, apesar do diâmetro nuclear não ter variado numa amplitude maior entre os grupos (Figura 10 A), as espermatogônias A indiferenciadas presentes nos túbulos seminíferos do tecido quimera Leydig suíno apresentavam núcleo esférico e um nucléolo central, compacto e arredondado, com a heterocromatina dispersa de maneira homogênea pelo nucleoplasma (Figura 10 B). Nos túbulos doados pelos suínos, a espermatogônias A indiferenciadas foram identificadas pelo núcleo levemente achatado, nucléolo ligeiramente excêntrico e heterocromatina formando pequenos acúmulos junto ao envoltório nuclear (Figura 10 C).

5.4 Caracterização molecular da atividade funcional das células somáticas e germinativas 8 meses após morfogênese *de novo*

A enzima 3betaHSB apresentou ampla distribuição nas células de Leydig, entretanto, a marcação mais forte foi obtida quando as células esteroideogênicas de suíno estavam associadas aos túbulos seminíferos de cateto (Figura 11, A e B). Quanto ao receptor de andrógeno, as células peritubulares, Sertoli e Leydig apresentaram um padrão semelhante de marcação, independentemente do grupo (Figura 11, C e D). A expressão do fator de transcrição GATA4 foi observada nas células de Sertoli de cateto e suíno, e no caso do grupo Leydig suíno, nas células de Leydig (Figura 11, E e F).

Por meio da avaliação do marcador de proliferação celular Ki67 foi possível identificar células no compartimento basal dos túbulos seminíferos, em ambos os grupos, que mantinham sua atividade proliferativa, o que revela a capacidade das células em sustentarem a renovação do processo espermatogênico (Figura 11, G e H).

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Este estudo é pioneiro na descrição da morfogênese testicular *de novo* a partir do enxerto de suspensões contendo células de diferentes composições genéticas, neste caso por duas espécies diferentes, o cateto e o suíno. Nossos resultados demonstraram a formação de uma quimera testicular funcional, mas que em função das interações celulares que se estabeleceram, foi capaz de produzir gametas de uma espécie tardia como o cateto, mais precocemente. Assim, o conhecimento obtido no presente trabalho abre perspectivas para estudos que visem a melhor compreensão destas possíveis interações celulares responsáveis pelo direcionamento do desenvolvimento testicular pós-natal em mamíferos.

Em reprodução, a obtenção do peso testicular é fundamental para se inferir a atividade espermatogênica de um indivíduo. Assim, pesos testiculares maiores estariam indicando progressão da espermatogênese, haja vista o aumento de peso observado durante o desenvolvimento pós-natal até a puberdade e durante a fase adulta, quando finalmente estabiliza. Apesar de no presente estudo haver uma recapitulação da morfogênese testicular, e de modo geral, o peso dos tecidos formados após o enxerto aumentarem, a avaliação histológica dos mesmos ao longo de todo o período investigado, mostrou em alguns casos a ausência da progressão da espermatogênese (túbulos contendo apenas células de Sertoli, sem células germinativas) ou mesmo a existência fragmentos constituídos exclusivamente por células de Leydig. De maneira geral, os tecidos que se formaram a partir das suspensões celulares contendo Leydig de cateto não apresentaram a progressão da espermatogênese enquanto aqueles nos quais as células de Leydig de suíno estavam presentes observou-se a espermatogênese completa já aos 5 meses pós-enxerto. Estes achados sugerem um importante mecanismo de regulação da maturação tubular promovido provavelmente pelas células de Leydig de suíno. Uma vez que a puberdade do suíno ocorre entre 4 e 5 meses (França et al., 2000) as células de Leydig estariam produzindo os fatores necessários para o compartimento tubular que resultariam na formação de um ambiente muito

favorável para 1) a maturação das células de Sertoli e 2) sustentação e manutenção (via Sertoli) da diferenciação das células germinativas. Neste sentido, pode-se sugerir que associação das células de Leydig de suíno aos túbulos de cateto, espécie cuja puberdade ocorre por volta de 11-12 meses (Campos-Jr et al., 2011; Guimarães et al., 2013), resultou na antecipação do estabelecimento da espermatogênese. Esta hipótese é reforçada quando verificamos que a presença de espermátides alongadas em tecido de cateto formado a partir da suspensão de células testiculares totais foi demonstrada por Campos-Jr e colaboradores (2014) somente aos 8 meses após o enxerto.

O peso das vesículas seminais como um indicador bioativo para a produção de testosterona tem sido utilizado para várias espécies submetidas ao xenoenxerto (Snedaker et al., 2004; Honaramooz et al., 2004; Rodriguez-Sosa e Dobrinski, 2009), incluindo-se o cateto (Campos-Jr et al., 2014). Em nosso estudo, a variação observada no peso da glândula refletiu diretamente os níveis circulantes de andrógenos, até atingir o peso controle. Este dado é um importante indicativo da função da célula esteroideogênica, uma vez que a partir do momento em que os hormônios esteroides sexuais passaram a ser produzidos pelas células de Leydig da espécie doadora, eles atuam positivamente na manutenção da atividade das estruturas andrógeno-dependentes (Simanainen et al., 2008).

Em todos os grupos investigados no presente estudo foram observados cordões e túbulos SCO. Para os tecidos contendo células de Leydig de cateto, sugere-se como causas mais prováveis para a ausência de progressão da espermatogênese, 1) as perdas iniciais que normalmente ocorrem em resposta à hipóxia (Dores e Dobrinski, 2014), 2) associado ao pequeno percentual de espermatogônias A indiferenciadas presentes na suspensão celular (De Rooij, 2000) e 3) a característica mais tardia das células esteroideogênicas desta espécie (Campos-Jr et al., 2011; Guimarães et al., 2013). Quanto aos grupos de célula de Leydig de suíno nos quais a espermatogênese se completou, o percentual de túbulos SCO foi alto entre 5 e 8 meses, ou seja, desde o aparecimento dos primeiros espermátócitos até as espermátides alongadas. Segundo Arregui et al. (2008) no tecido testicular intacto de várias espécies de mamíferos, a percentagem de túbulos SCO diminui rapidamente quando as

células germinativas pós-meióticas surgem e a porcentagem de túbulos com espermatídes arredondadas e alongadas aumentam. Contudo, nos tecidos formados após o enxerto de suspensões celulares de ovinos e nos quais a espermatogênese também avançou (Arregui et al., 2008), as mudanças quanto à presença de túbulos SCO foram menos pronunciadas, à semelhança do que ocorreu no presente estudo. Neste contexto, duas razões podem explicar este fato: (1) os fatores que apoiam o desenvolvimento dos túbulos não estão disponíveis uniformemente a todos os túbulos; (2) os túbulos não estão igualmente receptivos a sinais estimulantes (Arregui et al., 2008).

Nosso estudo demonstrou que a citoarquitetura testicular típica de cateto prevaleceu no tecido formado a partir de células de Leydig de suíno e túbulos de cateto, com células de Leydig formado cordões entre os lobos testiculares e presentes entre os túbulos seminíferos (Costa et al., 2010; Campos-Jr et al., 2012) Diante desse resultado, podemos afirmar que fatores emanados do compartimento tubular estariam direcionando a organogênese testicular em catetos. O fato das células de Leydig de suíno responderem a estes estímulos de maneira semelhante a Leydig de cateto pode ser um indicativo de que trata-se de um mecanismo envolvendo fatores conservados filogeneticamente. No entanto, ainda resta esclarecer quais são estes fatores e as células diretamente envolvidas neste processo.

A proporção dos diferentes componentes dos compartimentos tubular e intertubular não apresentou uma grande amplitude de variação entre a quimera com Leydig de suíno e o tecido da suspensão pura de suíno. Com relação ao diâmetro tubular, a variação encontrada para o mesmo estava dentro da faixa esperada para as espécies doadoras, sendo, portanto, semelhantes aos valores obtidos no testículo *in situ* (Avelar et al., 2010; Costa et al., 2010).

A expressão dos marcadores moleculares nas células somáticas e germinativas presentes nos tecidos obtidos a partir das suspensões com Leydig de suíno e túbulo de cateto bem como suíno, demonstrou a integridade funcional destes tipos celulares. Recentemente foi demonstrado que o fator de transcrição GATA4, associado a outros fatores como SF-1, participa da regulação da enzima esteroideogênica StAR (Hu et al., 2013). Neste contexto a

expressão encontrada nas células de Leydig para GATA4 no presente estudo sugere que esta via de regulação esteja atuando também em suínos.

Sumarizando, os achados obtidos no presente estudo mostraram pela primeira vez a interação entre células testiculares de diferentes espécies de mamíferos resultando na formação de um testículo funcional, no qual todos os componentes celulares estavam preservados. Neste contexto, ainda foi possível observar que apesar da célula de Leydig pertencer a outra espécie (suíno), a organização foi típica do cateto, revelando um papel importante dos componentes tubulares para a definição da citoarquitetura testicular nesta espécie silvestre. Diante disso, nossas perspectivas apontam para mais estudos, os quais possam determinar os mecanismos de regulação e o papel desempenhado por cada uma das células dentro da organogênese testicular.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

- ✓ Células testiculares de espécies diferentes são capazes de interagir e formar um testículo funcional;
- ✓ A função das células somáticas e germinativas está preservada nos tecidos quiméricos contendo células de Leydig de suíno;
- ✓ Os componentes do túbulo seminífero do cateto podem desempenhar um importante papel na formação dos cordões de células de Leydig.
- ✓ A interação entre as células de Leydig do suíno e os túbulos seminíferos de cateto promoveu uma aceleração da espermatogênese conforme pôde ser verificada a partir da presença de espermátides alongadas aos 5 meses no tecido quimérico.

FIGURAS E TABELA

FIGURAS E TABELA

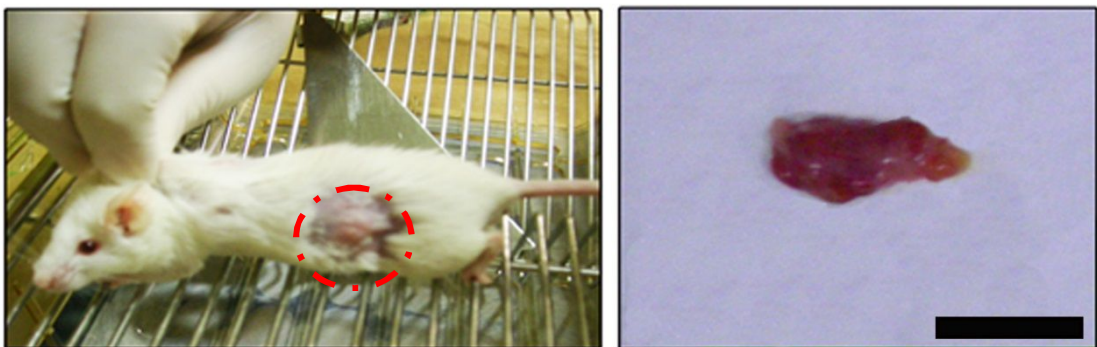


Figura 1: Morfogênese testicular *de novo* 4 meses após o enxerto de uma suspensão contendo células de Leydig de suíno e túbulos seminíferos de cateto. Nesta condição o tecido corresponde a uma quimera, uma vez que é formado por células derivadas de duas linhagens geneticamente diferentes. Observe uma elevação sob a pele do camundongo imunodeficiente (A) e o aspecto macroscópico do tecido recuperado (B). Barra = 1 cm.

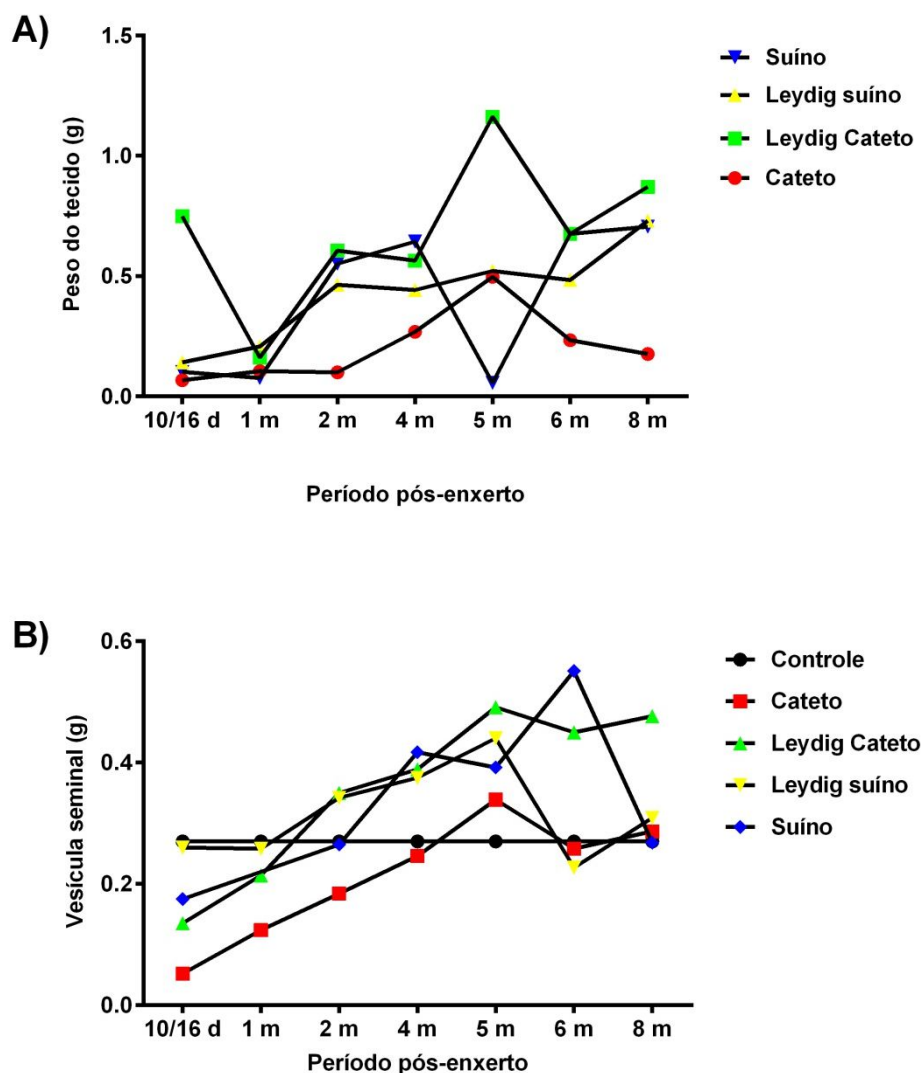


Figura 2: Biometria dos tecidos após morfogênese *de novo* a partir do enxerto de suspensões celulares puras (cateto e suíno) ou quiméricas (Leydig de cateto e túbulo de suíno; Leydig de suíno e túbulo de cateto) e da vesícula seminal. De maneira geral, foi observada tendência de aumento do peso dos tecidos ao longo de período investigado, embora aos 5 meses o menor peso registrado tenha sido verificado no grupo contendo suspensão pura de suíno (A). O peso da vesícula seminal é um importante marcador biológico da ação dos andrógenos. Observe que o peso da vesícula seminal foi semelhante entre os animais controle e castrado hospedando a quimera Leydig suíno (células de Leydig de suíno e túbulo de cateto), 10 dias após o enxerto. Porém, para os outros grupos, o peso foi obtido aos 16 d após a castração/enxerto, e neste momento já era possível identificar uma redução em relação ao controle, resultado da diminuição nos níveis de andrógenos. Entretanto, com 2 meses o peso da glândula já havia retornado ao padrão controle, exceto para no grupo contendo suspensão pura de cateto, onde somente aos 4 meses esta característica foi observada (B).

Figura 3: Morfogênese testicular *de novo* 10/16 d, 1, 2, 4, 5, 6 e 8 meses após o enxerto de suspensões puras (cateto ou suíno) ou contendo células de cateto e suíno (quimeras) em camundongos imunodeficientes. Aos 10 d (A'') não foi observado nenhum arranjo testicular típico, enquanto aos 16 d após o enxerto os fragmentos provenientes das suspensões de doadores únicos (A cateto e A''' suíno) já apresentavam organização típica, com cordões seminíferos (*). Apenas células de Leydig (L) foram encontradas na quimera formada pelas células de Leydig de cateto e túbulo seminífero de suíno (A'). De maneira semelhante para os 4 grupos estudados, nos períodos subsequentes de desenvolvimento (1, 2 e 4 meses) foram observados cordões seminíferos contendo apenas células Sertoli (SCO; B – B''', C – C''', e D – D''', respectivamente). Entretanto aos 5 meses, observe que os tecidos contendo células de Leydig de cateto (E e E') apresentaram o mesmo padrão anterior, isto é, cordões SCO, enquanto espermatídes alongadas e espermatócitos primários em paquíteno foram observados nos tecidos formados a partir de suspensões contendo células de Leydig de suíno (E'' e E''', respectivamente). Embora não tenha sido observado o desenvolvimento das células germinativas nos grupos contendo suspensões puras de cateto e a quimera de célula de Leydig de cateto e túbulo seminífero de suíno aos seis (F e F') e oito meses (G e G') após o enxerto, a progressão da espermatogênese foi observada nos grupos contendo a quimera de célula de Leydig de suíno e túbulo seminífero de cateto bem como nas suspensões puras de suíno tanto aos seis (F'' e F''') quanto aos 8 meses (G'' e G'''). Barra = 40 µm.

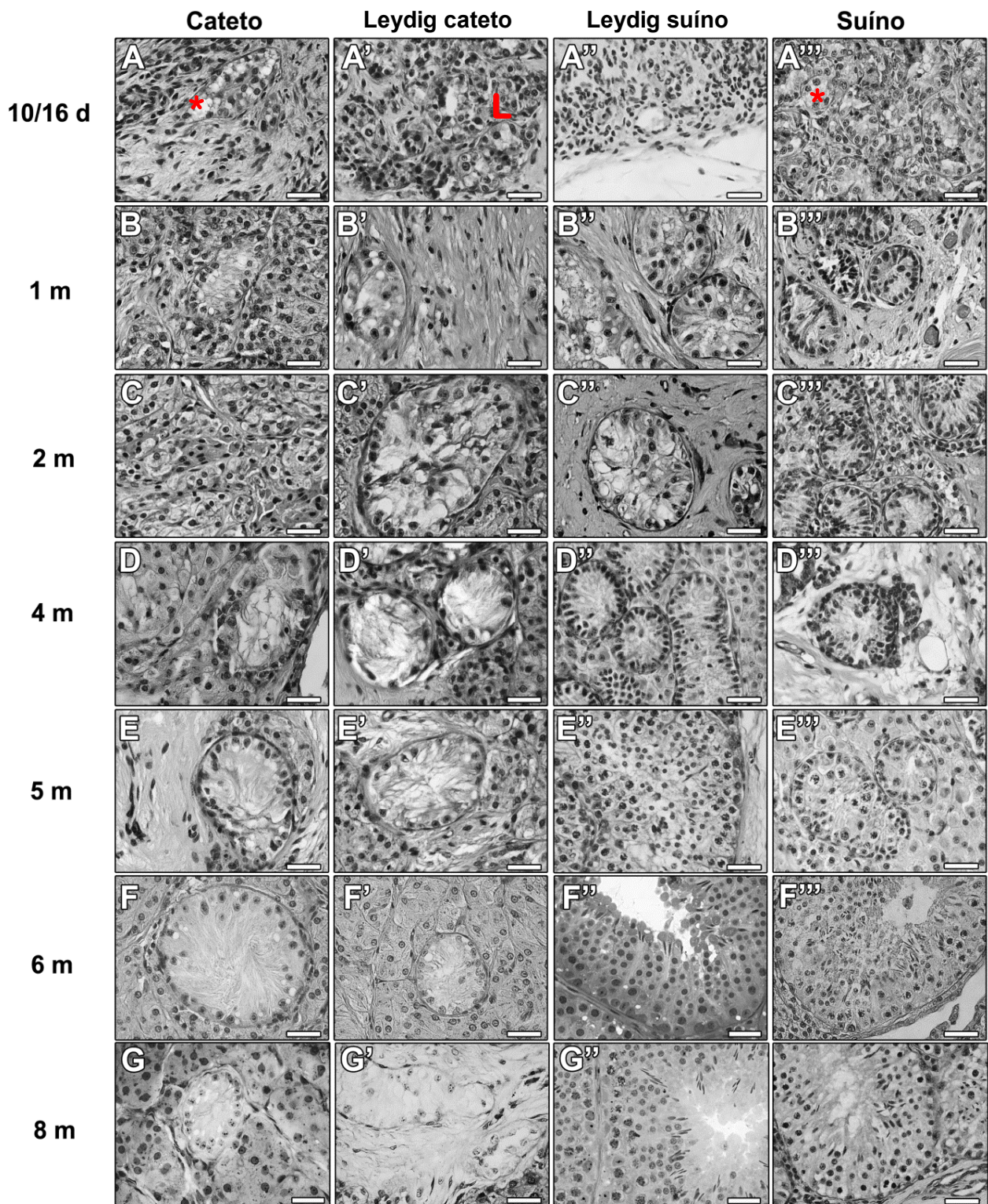
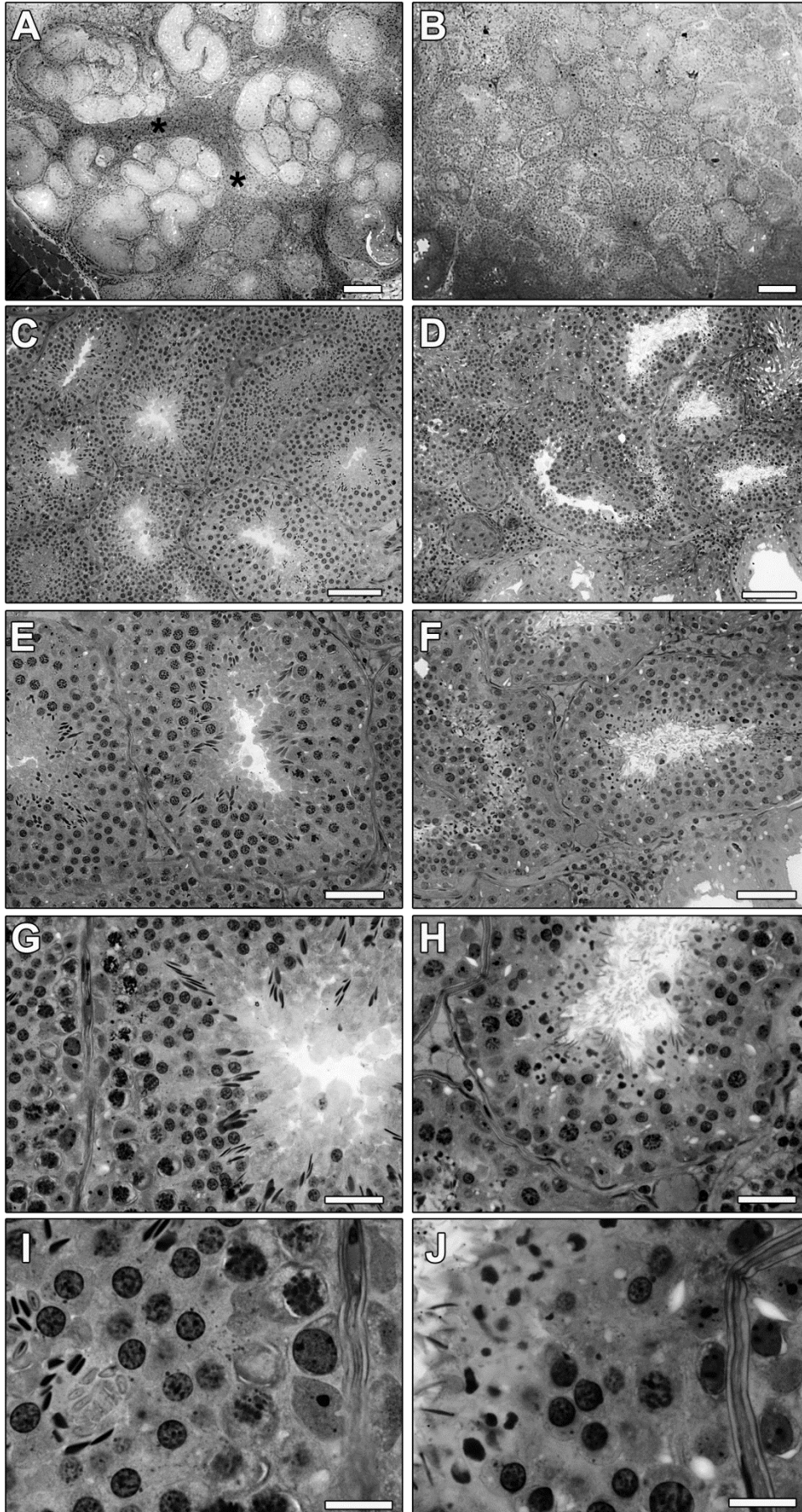


Figura 4: Citoarquitetura do parênquima testicular após morfogênese *de novo*. Observe em A, que representa a quimera com células de Leydig de suíno, que os túbulos seminíferos estão delimitados por lobos, onde também estão localizadas as células de Leydig, seguindo o arranjo típico já descrito para catetos (Costa et al., 2010; Campos-Jr et al., 2012). Por outro lado, o tecido formado a partir da suspensão pura de suíno recapitulou a organização típica para esta espécie (B). Nos maiores aumentos (C – J), observe os detalhes dos compartimentos tubular e intertubular. Barras; A e B = 200 μm , C e D = 105 μm , E e F = 60 μm , G e H = 35 μm , I e J = 18 μm .

Leydig Suíno

Suíno



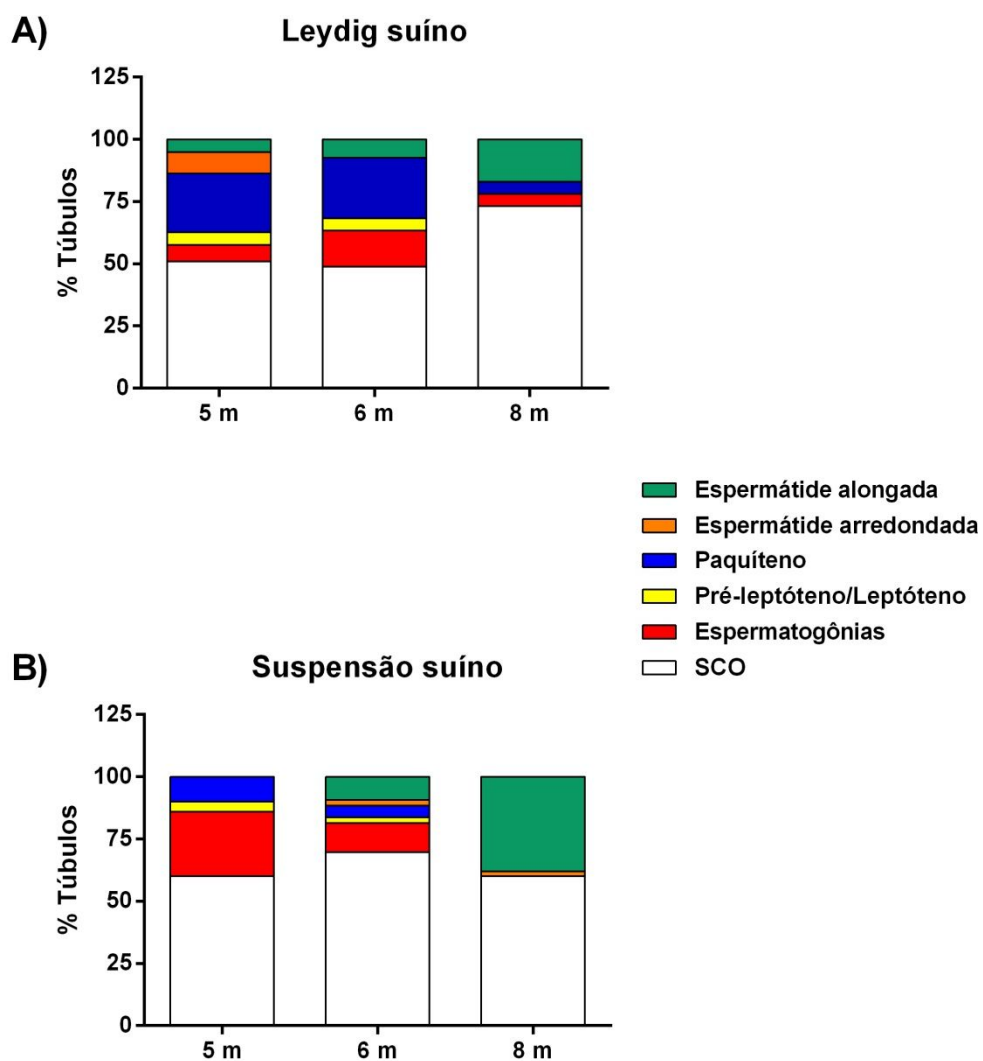


Figura 5: Percentual de túbulos seminíferos representando os diferentes tipos de células germinativas na quimera com Leydig de suíno e no tecido formado a partir da suspensão pura de suíno. Note que aos 5 meses espermátides alongadas foram encontradas na quimera (A), enquanto espermatócitos primários em paquítenos representavam as células germinativas mais avançadas da suspensão pura de suíno (B).

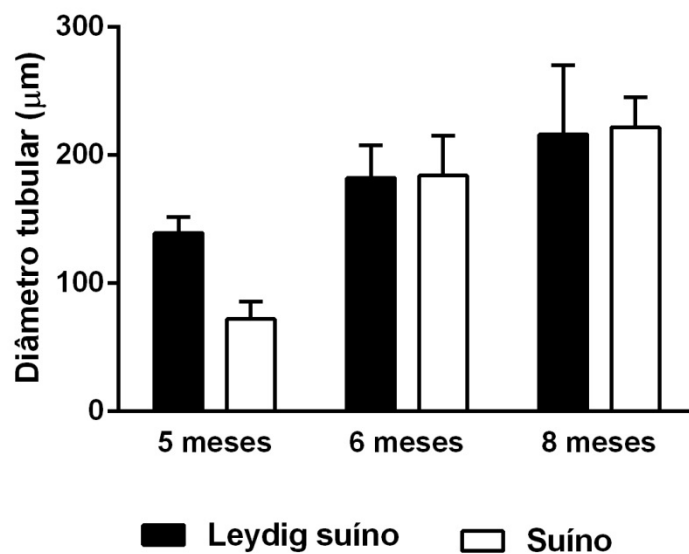


Figura 6: Diâmetro dos túbulos seminíferos após enxerto e morfogênese *de novo*, obtido para a quimera com Leydig de suíno e a suspensão pura de suíno. Note em ambos os grupos, o aumento do diâmetro tubular entre 5 e 6 meses, correspondendo ao avanço da espermatogênese observado neste intervalo e a tendência a estabilização aos 8 meses.

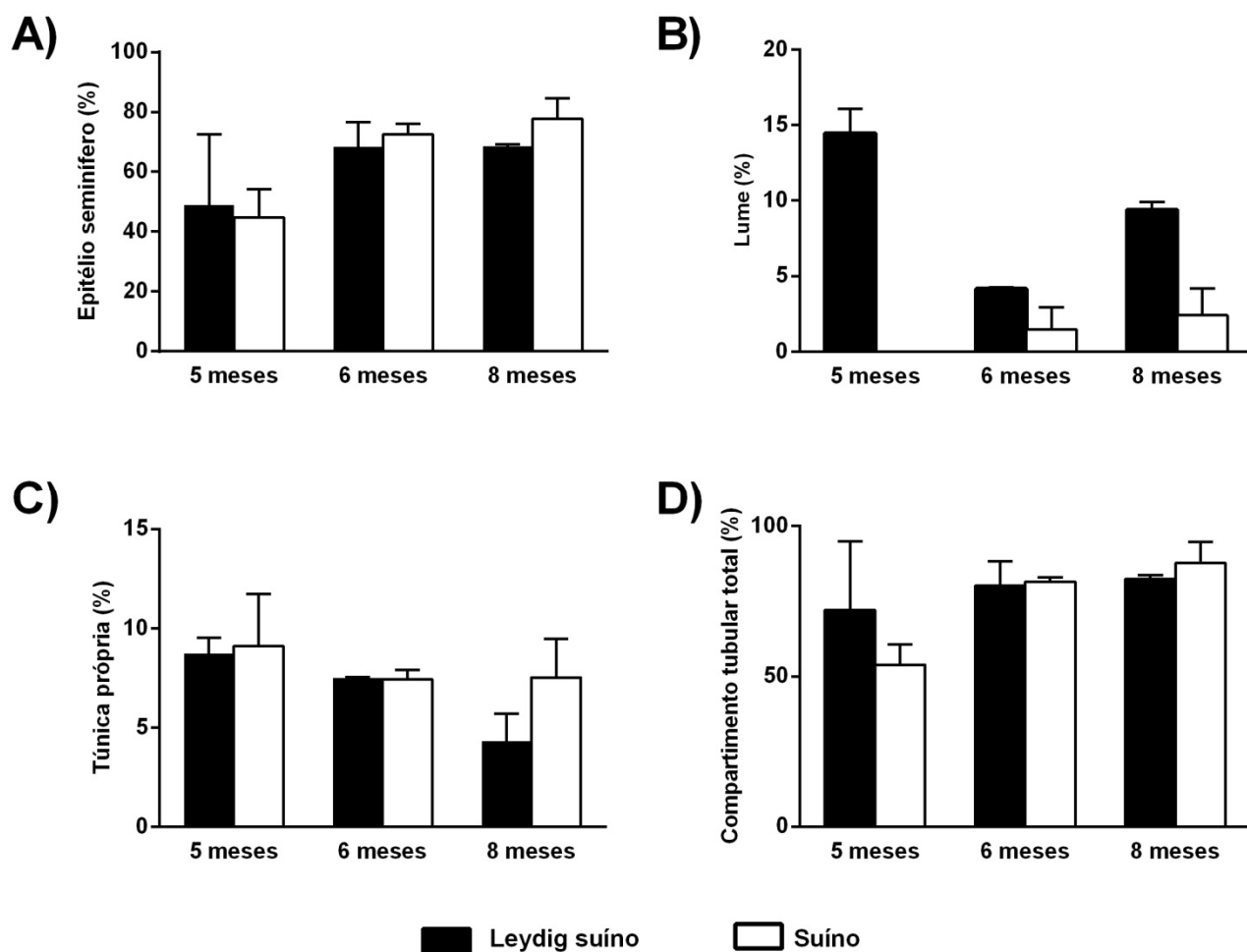


Figura 7: Proporção dos diferentes componentes do compartimento tubular obtidos para a quimera de células de Leydig de suíno e suspensão pura de suínos aos 5, 6 e 8 meses após o enxerto.

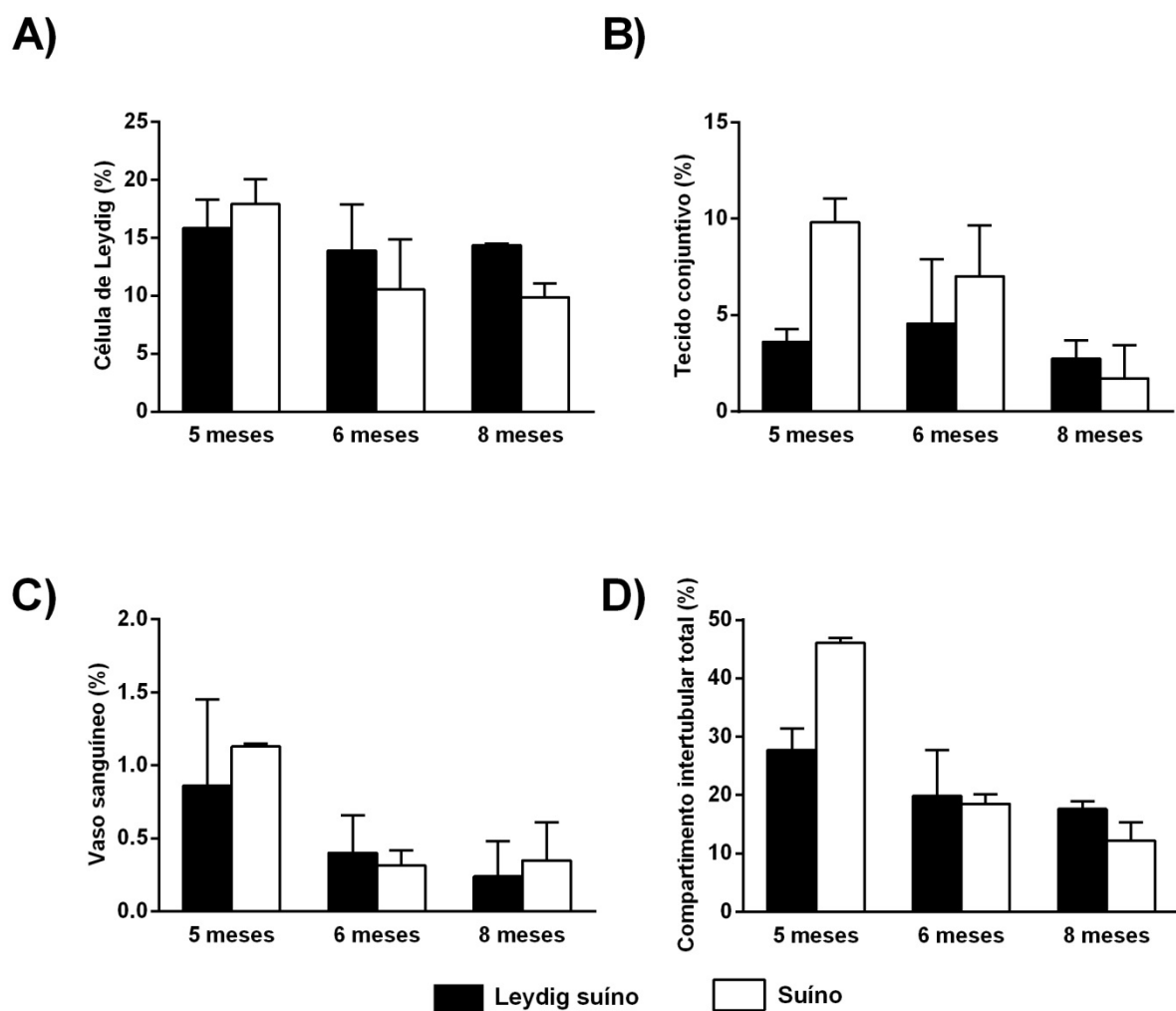


Figura 8: Proporção dos diferentes componentes do compartimento intertubular obtidos para a quimera de células de Leydig de suíno e suspensão pura de suínos aos 5, 6 e 8 meses após o enxerto.

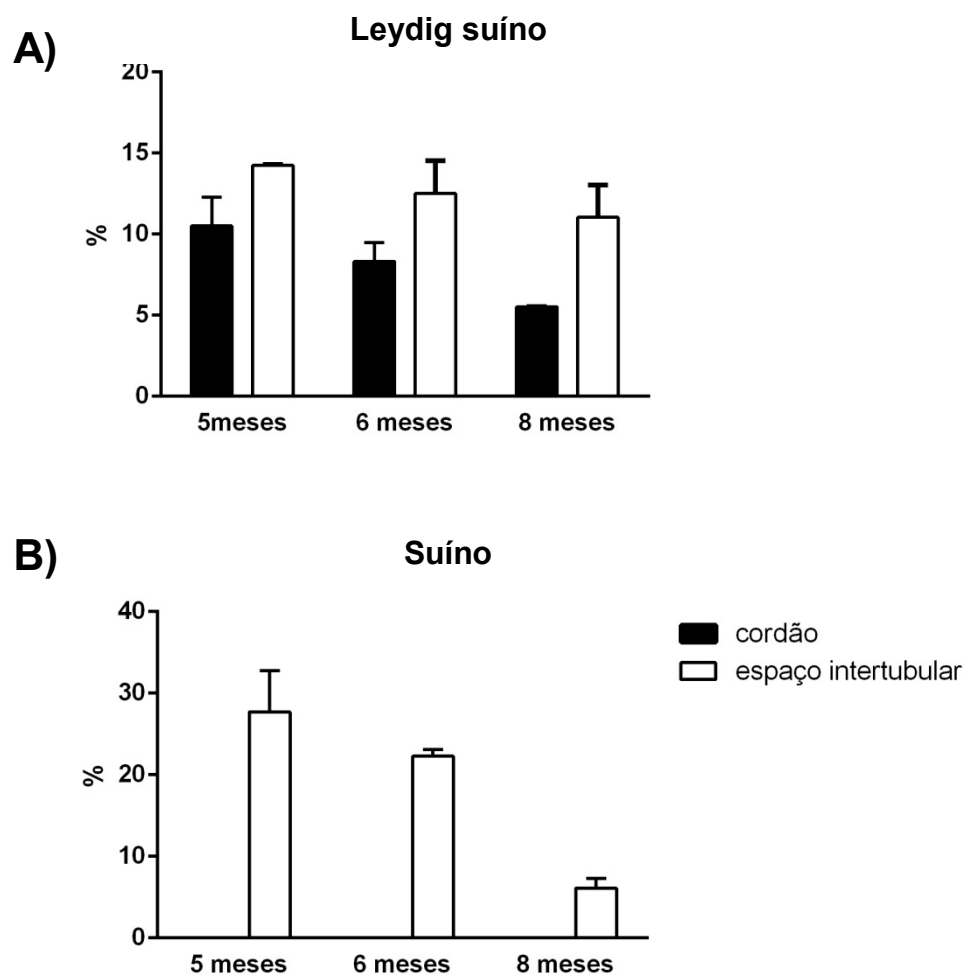


Figura 9: Distribuição das células de Leydig nos tecidos recuperados aos 5, 6 e 8 meses após o enxerto de suspensões com células de Leydig de suíno e túbulo de cateto e suspensões puras de suíno. Observe em A que na quimera com Leydig de suíno as células esteroidogênicas estavam presentes entre os lobos, formando os cordões de células de Leydig e também entre os túbulos seminíferos. Por outro lado, no suíno as células se localizavam entre os túbulos seminíferos (B).

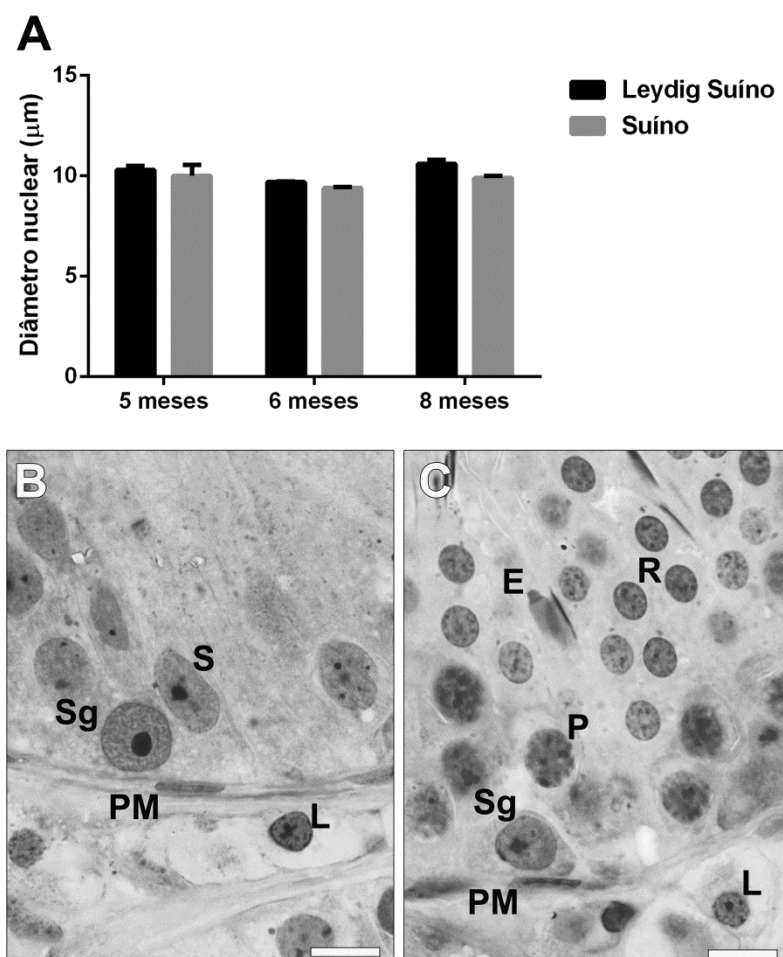


Figura 10: Caracterização das espermatogônias A indiferenciadas de acordo com as espécies doadoras de túbulos seminíferos. Embora a avaliação qualitativa inicial indicasse uma amplitude maior para a variação do diâmetro nuclear, os valores obtidos na mensuração não confirmaram esta hipótese (A). Assim, este tipo celular foi identificado a partir da caracterização morfológica previamente descrita por Campos-Jr et al. (2012) para catetos e Avelar (2010) para suínos. Barra = 12 µm. S, Célula de Sertoli; L, célula de Leydig; PM, célula peritubular mióide; Sg, espermatogonia; P, espermatócito em paquíteno; R, Espermátide arredondada e E, espermátide alongada.

Figura 11: Imunomarcção (cabeça de seta) para 3betaHSD (A e B), receptor de andrógeno (C e D), GATA4 (E e F) e Ki67 (G e H), de tecidos recuperados 8 meses após o enxerto das suspensões com células de Leydig de suíno e túbulo de cateto e suspensão pura de suíno em camundongos imunocomprometidos. Observe que de acordo com a distribuição da expressão dos diferentes marcadores foi possível demonstrar que tanto as células somáticas quanto as células germinativas mantiveram suas características funcionais patentes. Barra = 40 μ m.

Leydig Suíno

Suíno

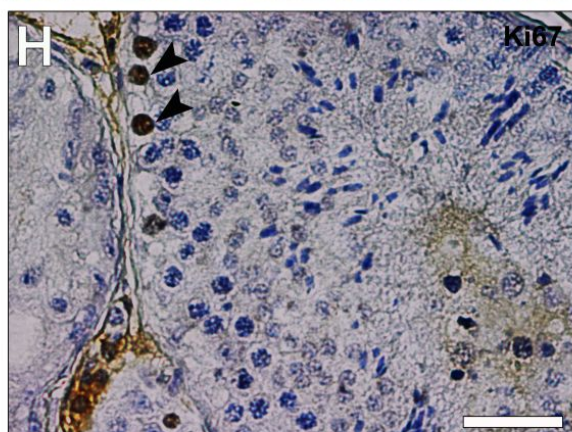
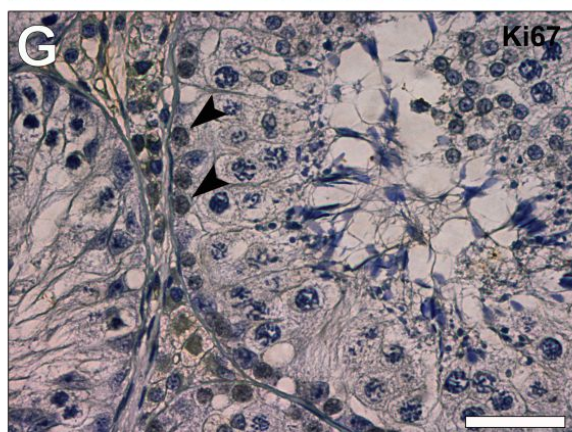
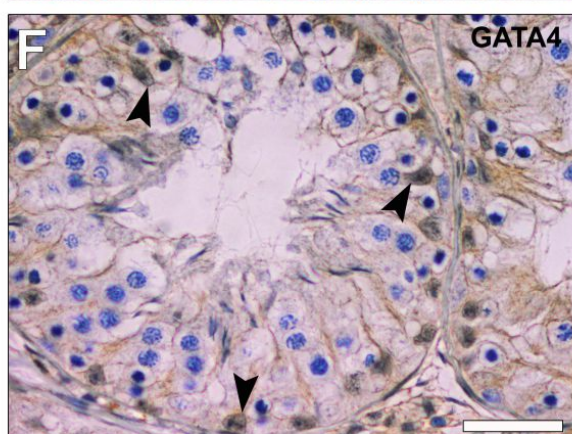
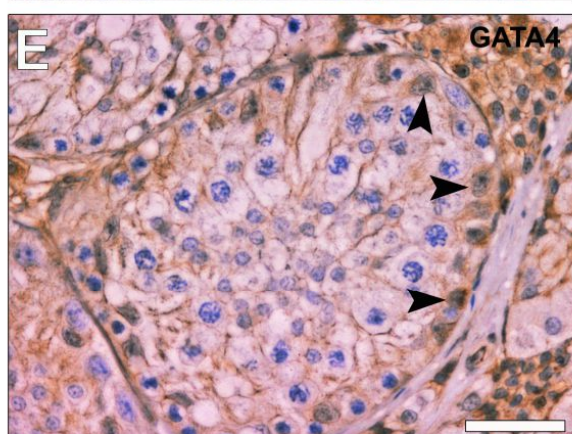
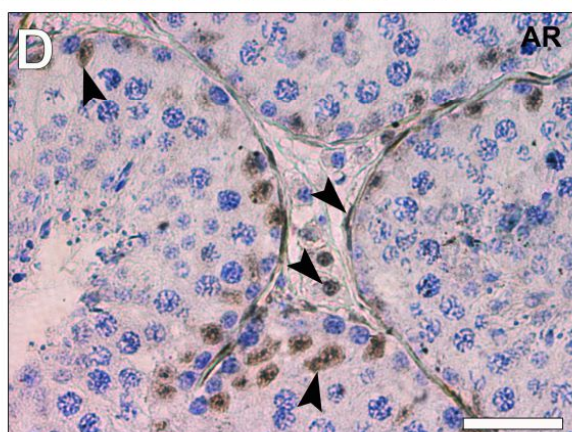
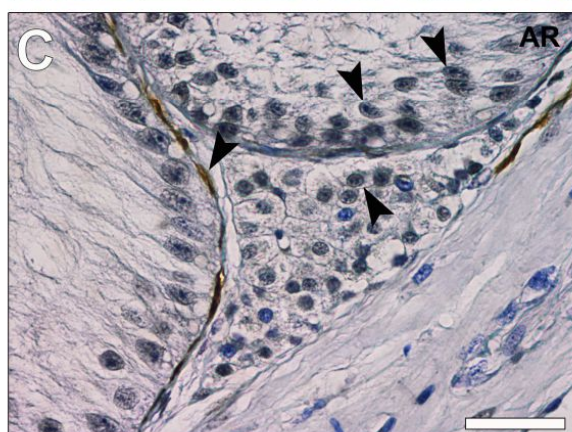
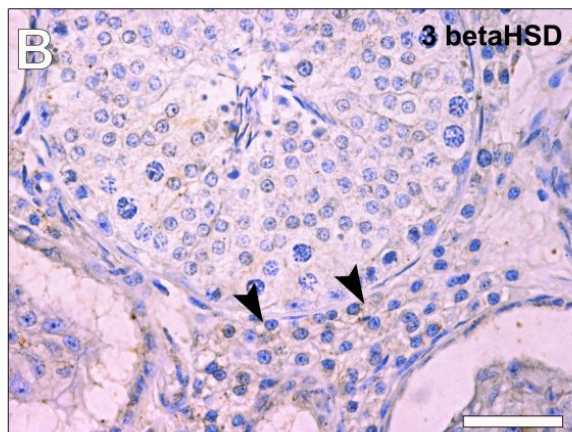
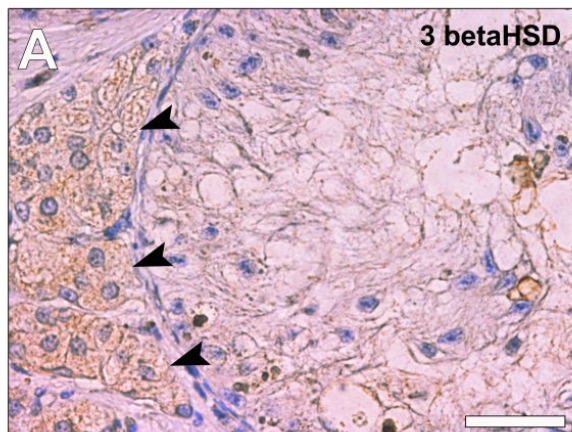


Tabela1. Referencias dos Anticorpos utilizados na imunohistoquímica

ANTICORPO	EMPRESA	TITULAÇÃO	PRIMÁRIO	EXPRESSÃO
AR	Santa Cruz Biotech	1:100	goat	Leydig, peritubulares, Sertoli
GATA4	Santa Cruz Biotech	1:200	mouse	Sertoli,
Ki-67	BD Biosciences Pharmingen	1:50	mouse	proliferação
3BHSD	Santa Cruz Biotech	1:750	goat	Leydig

REFERENCIAS

REFERÊNCIAS

ADEGA F, CHAVES R, GUEDES-PINTO H. Suiformes orthologous satellite DNAs as a hallmark of Pecari tajacu and Tayassu pecari (Tayassuidae) evolutionary rearrangements. *Micron* 2008; 39:1281-1287.

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

ARREGUI L, RATHI R, ZENG W, HONARAMOOZ A, GOMENDIO M, ROLDAN ERS, DOBRINSKI I. Xenografting of adult mammalian testis tissue. *Anim Reprod Sci.* v.106(1-2), p.65-76, 2008.

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.

AVELAR GF, OLIVEIRA CFA, SOARES JM, SILVA IJ, DOBRINSKI I, HESS RA, FRANÇALR. Postnatal somatic cell proliferation and seminiferous tubule maturation in pigs: A nonrandomevent. *Theriogenology.* 2010.

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, A.H., HARDY, M.P., RUSSELL, L.D. (Eds). *The Leydig cell.* Viena: Cache River Press. p.31-42 1996.

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

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.

BISSONETTE JA. *Ecology and social behavior of the collared peccary in Big Bend Nacional Park.* 1982. Washington, DC: U.S. National Parks Services, 1982. (Monography, 16)

BRINSTER, R. L. & AVARBOCK, M. R. (1994) *Proc. Natd. Acad. Sci. USA* 91, 11303-11307.

BRINSTER RL. Germline stem cell transplantation and transgenesis. *Science*, v.296, p.2174-2176. 2002.

CAMPOS-JR, P. H. ; COSTA, G. M. J. ; RESENDE-NETO, J. V. ; Lacerda SMSN ; Guimarães, D.A. ; Kahwage, PR ; FRANCA, L. R. . Avaliação Do Testículo de Catetos (*Tayassu tajacu*) Durante o Desenvolvimento Pós-Natal com Ênfase no Estabelecimento da Espermatogênese e Status Funcional das Células de Sertoli. In: IV Simpósio de Biologia Celular, 2011, Belo Horizonte, MG. IV SBC, 2011

CAMPOS-JUNIOR PHA, COSTA GM, LACERDA SM, REZENDE-NETO JV, DE PAULA AM, HOFMANN MC & FRANÇA LR The spermatogonial stem cell niche in the collared peccary (*Tayassu tajacu*). *Biol Reprod*. 86(5) 1-10. 2012

CAMPOS-JUNIOR, PAULO HENRIQUE ET AL. Derivation of sperm from xenografted testis cells and tissues of the peccary (*T. tajacu*). *Reproduction*, p. REP-13-0581, 2014.

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

Carreau, S., Genissel, C., Bilinska, B., Levallet, J.,. Sources of oestrogen in the testis and reproductive tract of the male. *Int. J. Androl*. 22, 211–223,1999.

COSTA GMJ, LEAL MC, SILVA JV, FERREIRA AC, GUIMARÃES DA, FRANÇA LR. Spermatogenic cycle length and sperm production in a feral pig species (collared peccary, *Tayassu tajacu*), *J. Androl*. v.31(2) p.221-30, 2010.

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.

DAVIDOFF, M. S., MIDDENDORFF, R., ENIKOLOPOV, G., RIETHMACHER, D., HOLSTEIN, A. F. AND MULLER, D. Progenitor cells of the testosterone-producing Leydig cells revealed. *J. Cell Biol*. 167, 935-944. 2004.

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*, v. 101, p.1327-32, 2004.

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 ROOIJ DG & RUSSELL LD. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *Journal of Andrology*, v.21, p.776-98, 2000.
- DE FALCO T & CAPEL B. Gonad morphogenesis in vertebrates: divergent means to a convergent end. *Annu Rev Cell Dev Biol.* v.25, p.457-482, 2009.
- DE KRETZER M, KERR JB. The cytology of the testis. In: Eds. KNOBIL E, NEILL JD (Eds). *The physiology of reproduction*. Raven Press, , p.1177-1290. 1994
- DEUSTSCH LA, PUGLIA LRR. *Os animais silvestres: Produção e manejo*. Rio de Janeiro: Globo, 1988. p.69-72.
- DIERICHS R, WROBEL KH, SCHILLING E. Licht-, und Elektronenmikroskopische Untersuchungen an den Leydigzellen des Schweines während der postnatalen Entwicklung. *Z. Zellforsch. Mikrosk Anat.*;143:207-27. 1973
- DOBRINSKI I, AVARBOCK MR, BRINSTER RL. Transplantation of germ cells from rabbits and dogs into mouse testes. *Biol Reprod*, v.61, p.1331-1339, 1999.
- DOBRINSKI I. Germ cell transplantation and testis tissue xenografting in domestic animals. *Anim Reprod Sci.* v.89(1-4), p.137-45, 2005.
- 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.
- DORES C.; DOBRINSKI I. *De novo* morphogenesis of testis tissue: an improved bioassay to investigate the role of VEGF-165 during testis formation. *Reproduction Advance Publication* first posted on 6 May 2014 as Manuscript REP-13-0303
- DYM M. Spermatogonial stem cells of the testis. *Proc. Natl. Acad. Sci*, v.91, p.11298-11302, 1994.
- ERICKSON BH. Effects of Neonatal Gamma Irradiation on Hormone Production and Spermatogenesis in Testis of the Adult Pig. *J Reprod Fertil.*;53:91-100. 1964
- FAN X & ROBAIRE B. Orchidectomy induces a wave of apoptotic cell death in the epididymis. *Endocrinology.* v.139, p.2128-2136, 1998.
- FAWCETT DW, NEAVES WB, FLORES MN. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biol Reprod*, v.9(5), p.500-532, 1973.

- FORD JJ, WISE TH. Sertoli cell differentiation in pubertal boars. *J Anim Sci.*;87:2536-43. 2009
- FOWLER ME, MILLER RE. *Zoo and wild animal medicine*. 5.ed. St. Louis: Saunders, 2003. 782p.
- FRANÇA LR & RUSSELL LD. The testis of domestic animals. In: REGADERA, J; GARCIA, M (Ed.). *Male reproduction: a multidisciplinary overview*. Madrid: Churchill Livingstone. p.197-219. 1998.
- 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.*;63:1629-1636. 2000.
- 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.
- GILBERT, B. "Do not take the javelin lightly." *Smithsonian* 30 (5): 52-60. 1999
- 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, RENSTON RH, GOLDSTEIN DA. Postnatal differentiation of Leydig cells in the rabbit testis. *Am J Anat*. 1976;145:167-82.
- GOYAL SR, TALIB VH, KHURANA SK. An overview of PSA/free PSA with special reference to recent trends in diagnosis of prostatic cancer. *Indian J Pathol Microbiol*. v.42, p.171-178, 1999.
- GRISWOLD SL, BEHRINGER RR. Fetal Leydig cell origin and development. *Sex Dev*. 2009;3:1-15
- GUIMARÃES D.A.; CARDOSO, D.L.; FERREIRA, M.A.P., ALBUQUERQUE, N.I. Puberty in male collared peccary (*Pecari tajacu*) determined by quantitative analysis of spermatogenic cells. *Act. Amazônica*. vol. 43(1) 2013: 99 – 104
- 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.

HESS RA & FRANCA LR. Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. In: CHENG, CY (Ed). *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis.* N.Y.: Landes Bioscience. 2007.

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.* 132:2607-2613. 1993.

HESS RA, FERNANDES SAF, GOMES GR, OLIVEIRA CA, LAZARI MF, AND PORTO CS (2011) Estrogen and its receptors in efferent ductules and epididymis. *J. Androl* Volume 32, Issue 6, pages 600–613. 2011

HONARAMOOZ A, SNEDAKER A, BOIANI M, SCHOLER H, DOBRINSKI I, SCHLATT S. Sperm from neonatal mammalian testes grafted in mice. *Nature.* v.418, p.778-781, 2002.

HONARAMOOZ A, MEGEE SO, RATHI R, DOBRINSKI I. Building a testis: formation of functional testis tissue after transplantation of isolated porcine (*Sus scrofa*) testis cells. *Biol Reprod.* v.76(1), p.43-7, 2007.

HONARAMOOZ A, CUI XS, KIM NH & DOBRINSKI I. Porcine embryos produced after intracytoplasmic sperm injection using xenogeneic pig sperm from neonatal testis tissue grafted in mice. *Reproduction, Fertility and Development* 20 802–807. 2008.

KANEKO H, KIKUCHI K, NAKAI M, SOMFAI T, NOGUCHI J, TANIHARA F, et al. Generation of live piglets for the first time using sperm retrieved from immature testicular tissue cryopreserved and grafted into nude mice. *PLoS One* 2013.

KANEKO H., KIKUCHI K., TANIHARA F., NOGUCHI J., NAKAI M. , ITO J. , KASHIWAZAKI N. Normal reproductive development of pigs produced using sperm retrieved from immature testicular tissue cryopreserved and grafted into nude mice. *Theriogenology.* 82: 325–331.2014

KAMINSKI MA, CORBIN CJ, CONLEY AJ. Development and differentiation of the interstitial and tubular compartments of fetal porcine testes. *Biol Reprod.* 60:119 271999;

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

KAWASAKI, T., IMURA, F., NAKADA, A., KUBOTA, H., SAKAMAKI, K., ABE, S. & TAKAMUNE, K. Functional demonstration of the ability of a

primary spermatogonium as a stem cell by tracing a single cell destiny in *Xenopus laevis*. Dev. Growth Differ. 48, 525–535. 2006

KAWASAKI, T., SAITO, K., SHINYA, M., OLSEN, L.C. & SAKAI, N. Regeneration of spermatogenesis and production of functional sperm by grafting of testicular cell aggregates in zebrafish. Biol. Reprod. 83, 533–539.2010.

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

KITA K, WATANABE T, OHSAKA K, HAYASHI H, KUBOTA Y, NAGASHIMA Y, AOKI I, TANIGUCHI H, NOCE T, INOUE K, MIKI H, OGONUKI N, TANAKA H, OGURA A, OGAWA T. Production of functional spermatids from mouse germline stem cells in ectopically reconstituted seminiferous tubules. Biol Reprod. v.76(2), p.211-7, 2007.

Landreh, L.,Stukenborg, J.-B., Söder, O. and Svechnikov, K.. Phenotype and steroidogenic potential of PDGFRalpha-positive rat neonatal peritubular cells.Mol. Cell. Endocrinol., 372, 96-104. 2013

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

LIVA H, MORAES LFD, NOGUEIRA FILHO SLG, LAVORENTI A. Aspectos da alimentação do caititu (*Tayassu tajacu*) em cativeiro. In: Congresso Paulista de Iniciação Científica, 1, 1989, Piracicaba, SP. *Anais...* Piracicaba, SP: FEALQ, 1989.

LOBO FS. *Mamíferos*. 2.ed. Rio de Janeiro: Artes Gráficas Gomes de Sousa, 1962.

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

MAJDIC G, SAUNDERS PTK, TEERDS KJ. Immunoexpression of the steroidogenic enzymes 3-Beta Hydroxysteroid dehydrogenase and 17 -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.;58:520-25. 1998

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

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

NAKAI M, KANEKO H, SOMFAI T, MAEDOMARI N, OZAWA M, NOGUCHI J, ITO J, KASHIWAZAKI N, KIKUCHI K. Production of viable piglets for the first

time using sperm derived from ectopic testicular xenografts. *Reproduction*. v.139(2), p.331-5, 2010.

NOWAK RM. Order Artiodactyla. In: Nowak, RM. *Walker's mammals of the world* 5.ed. Baltimore: John Hopkins University Press,. p.1334-1347. 1991

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.*;107:137-49. 1996.

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. 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, p.3-42. 1993

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

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.*;139:1141-46. 1998

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;, p.87-113. 1993

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

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.

REBOURCET, D., et al. Sertoli cells control peritubular myoid cell fate and support adult Leydig cell development in the prepubertal testis. *Development*, 2014, vol. 141, no. 10, p. 2139-2149

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.

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

- RODRIGUEZ-SOSA JR, DOBRINSKI I. Recent developments in testis tissue xenografting. *Reproduction*. v.138(2), p.187-94, 2009.
- RODRIGUEZ-SOSA JR, DOBSON H, HAHNEL A. Isolation and transplantation of spermatogonia in sheep. *Theriogenol*. 66: 2091-2103. 2006
- ROTTA, I. T., RÖNNAU, M. Comparação histológica entre a região cervical do esôfago de cateto (*Tayassu tajacu* LINNAEU - 1758) e de javali (*Sus scrofa scrofa* LINNAEU - 1758). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, v. 43, n. 6, p. 762- 766, 2006.
- 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*.;139:2926-34. 1998.
- RUSSELL, LD; ETTLIN, RA; SINHA-HIKIM, AP; CLEGG, ED. Histological and histopathological evaluation of the testis. Clearwater: Cache River Press. 1990.
- RUSSELL LD, FRANÇA LR, HESS R, COOKE P. Characteristics of mitotic cells in developing and adult testes with observations on cell lineages. *Tissue & Cell*.;27:105-28. 1995
- RUSSELL LD, FRANÇA LR, BRINSTER RL. Ultrastructural observations of spermatogenesis in mice resulting from transplantation of mouse spermatogonia. *J Androl*.;17:603-14. 1996
- RUSSEL, LD; GRISWOLD, MD. The Sertoli cell. (1 ed). 1993.
- SCHLATT S, KIM SS, GOSDEN R. Spermatogenesis and steroidogenesis in mouse, hamster and monkey testicular tissue after cryopreservation and heterotopic grafting to castrated host. *Reproduction*. v.124, p.339-346, 2002.
- SIMANAINEN,U.; MCNAMARA,K; DAVEY, R.A.; ZAJAC,J.D.; HANDELSMAN,D.J. Severe Subfertility in Mice with Androgen Receptor Inactivation in Sex Accessory Organs But Not in Testis. *Endocrinology* 149(7):3330–3338.2014
- SMITH, L.B., WALKER,W.H. The regulation of spermatogenesis by androgens. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 30 (2014) 2–13
- 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 & BREED WG. Anatomy, vasculature and innervation of the male reproductive tract. In: NEILL, JD (Ed), *Physiology of Reproduction*. Elsevier. p.771-825. 2006.
- SHARPE RM. Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL, E; NEIL, JD. (Eds). *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press. p.1363-1434. 1994.

- SHINOHARA T, INOUE K, OGONUKI N. Birth of offspring following transplantation of cryopreserved immature testicular pieces and in vitro microinsemination. *Hum Reprod.* v.17, p.3039-3045, 2002.
- SHUPNIK MA & SCHREIHOFFER DA. Molecular aspects of steroid hormone action in the male reproductive axis. *J Androl.* v.18, p.341-344, 1997.
- 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.
- SOWLS LK. *Javelines and other peccaries: Their biology, management and use.* 2.ed. Tucson: Texas A&M University Press, 1997. 324p.
- SUÁREZ-QUIAN CA, MARTÍNEZ-GARCÍA F, NISTAL M, REGADERA J. Androgen receptor distribution in adult human testis. *J Clin Endocrinol Metab.* v.84, p.350-358. 1999.
- SVINGEN,T; KOOPMAN,P. Building the mammalian testis: origins, differentiation, and assembly of the component cell populations. *Genes Dev.* 27: 2409-2426. 2013
- TABONE E, BENAHMED M, REVENTOS J, SAEZ JM. Interactions between immature porcine Leydig and Sertoli in vitro. *Cell Tissue Res.*1984,237:357-62
- TILMANN C, CAPEL B. Cellular and molecular pathways regulating mammalian sex determination. *Recent Prog Horm Res.* 2002;57:1-18.
- 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.
- WARR,N.,GREENFIELD,A. The molecular and cellular basis of gonadal sex reversal in mice and humans. *Dev Biol.* 2012, 1:559–577
- 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.
- 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.
- WING, TY; CHRISTENSEN, AK. Morphometric studies on rat seminiferous tubules. *Am J Anat.* 165:13-25, 1982.
- WROBEL KH, DIERICHS R. Growth and differentiation of Sertoli cells in the procine 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.
- ZHANG Z, SHEN X, JONES BH, XU B, HERR JC, STRAUSS JF III. Phosphorylation of mouse sperm axoneme central apparatus protein SPAG16L by a testis-specific kinase, TSSK2. *Biol Reprod.* 2008;79:75–83.
- ZIRKIN BR, AWONIYI C, GRISWOLD MD, RUSSELL LD, SHARPE R. Is FSH required for adult spermatogenesis? *J Androl.* 1994;15:273-76.