LUCIANA SENNA SIMÕES

**Estudo qualitativo e quantitativo do testículo de roedores histricomorfos e o efeito do
Letrozol no testículo da paca (*Cuniculus paca*)**

São Paulo
2016

LUCIANA SENNA SIMÕES

**Estudo qualitativo e quantitativo do testículo de roedores histricomorfos e o efeito do
Letrozol no testículo da paca (*Cuniculus paca*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:
Cirurgia

Área de concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:
Prof. Dr. Maria Angélica Miglino

São Paulo
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3406
FMVZ

Simões, Luciana Senna

Estudo qualitativo e quantitativo do testículo de roedores histricomorfos e o efeito do Letrozol no testículo da paca (*Cuniculus paca*) / Luciana Senna Simões. -- 2016.
95 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Maria Angélica Miglino.

1. Estereologia. 2. Roedores. 3. Inibidor da aromatase. 4. Célula de Sertoli. I. Título.

BIOÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo qualitativo e quantitativos de testículo de roedores histricomorfos e o efeito do letrozol no testículo da paca (*Cuniculus paca*)", protocolada sob o CEUA nº 8735070714, sob a responsabilidade de **Maria Angélica Miglino e equipe; Luciana Senna Simões** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 26/08/2016.

We certify that the proposal "Qualitative and quantitative study of testicular histricomorphs rodents and the effect of letrozole in the testis of PACA (*PACA cuniculus*)", utilizing 9 Brazilian wild species (9 males), protocol number CEUA 8735070714, under the responsibility of **Maria Angélica Miglino and team; Luciana Senna Simões** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 08/26/2016.

São Paulo, 06 de novembro de 2016

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SIMÕES, Luciana Senna.

Título: **Estudo qualitativo e quantitativo do testículo de roedores histricomorfos e o efeito do Letrozol no testículo da paca (*Cuniculus paca*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

“Mesmo enfrentando muitas batalhas, te agradeço Deus, por essa etapa vencida.”

“Aos meus pais Uilson e Helena e a minha irmã Flávia, que apesar dos meus erros, sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos, por me apoiarem sempre, no recomeçar da minha vida. Essa conquista também é de vocês.”

Muito Obrigada por tudo!
“Amo vocês”

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Profa. Dra. Maria Angélica Miglino

As palavras aqui declaradas serão, poucas diante de tudo o que fez por mim. Agradeço-te por confiar e acreditar em mim, quando todos disseram não, por ter depositado em mim a esperança, e uma oportunidade para recomeçar. Muito obrigada pela sua amizade, pela orientação dada durante o desenvolvimento deste trabalho. É claro que não poderia deixar de falar “Eu te gosto muito professora”.

Profa Dra Silvia de Campos Boldrini (*in memoriam*)

Muito obrigada pela oportunidade de ter te conhecido, sua amizade, seus ensinamentos serão eternos por toda a minha vida.

Profa Dra Taís Harumi de Castro Sasahara

Taís muito obrigada por me ensinar, pela sua amizade, pela paciência em todos os momentos, você é uma pessoa iluminada, eu gosto muito de você, que Deus possa te retribuir em dobro tudo o que fez por mim, muito obrigada por tudo.

Ao Dr. Fausto Pompeo Reiff

Por ser meu amigo, me ajudando a superar os desafios que venho lutando nestes últimos anos.

.Ao Pr. Carlinhos

Por tudo que sempre fez por mim

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres por permitirem minha titulação nesta instituição de grande respeito e reputação que é a Universidade de São Paulo.

Ao Prof Dr. José Roberto Kfoury, por toda atenção em todo o momento que precisei.

À Profa Dra Márcia Rita Fernandes Machado, por ter ficado ao meu lado, pela orientação, pela amizade, pela paciência, enfim por tudo serei eternamente grata!

Á Profa Dra. Rose Eli Grassi Rici, pela sua ajuda e sua amizade, durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Dr Phelipe Oliveira Favaron, por ser sempre atencioso, me auxiliar neste trabalho e nos artigos, pela sua paciênciae amizade de hoje e sempre.

Á Profa Dra. Paula Fratini, Por ter sido a primeira pessoa que conheci, por contribuir desde o início até ao final deste trabalho, por ser prestativa e atenciosa. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Rodrigo da Silva Nunes Barreto, sempre disposto a colaborar dando sugestões de como poderia melhorar o trabalho.

Ao Prof. Dr. Fabrício Singaretti de Oliveira, por me ajudar auxiliando com o manejo e cirurgia da paca, contribuindo para este trabalho, muito obrigada!

Á Profa Dra Trish Berger, da (University Davis\Califórnia-USA), por nos auxiliar e contribuir grandemente para esta pesquisa.

Ao Prof Dr. Moacir Franco de Oliveira, por conceder o material da cutia.

Ao Ronaldo Agostinho, pelo auxílio durante á pesquisa. “você é tão bom pra mim”.

Á funcionária Jaqueline Santana por sempre prestativa e amiga.

Á funcionária da biblioteca Elza da FMVZUSP, muito obrigada pela normatização da tese.

Agradeço á todos meus **colegas de Pós-Graduação** Aline Candorini, Fausto Fernandes, Patrícia Romagnolli, Jéssica Borghesi, Lara Mario, Carla M. Carvalho, Adriana Anunciação, Márcio Pereira, Ana Paula, Horácio, Maria Angélica Arroyo (M.A.), Amilton, Paulo Ramos, a todos vocês muito obrigada!

À **Capes** pela concessão da bolsa

HÁ TEMPO PARA TUDO

**“Para tudo há uma ocasião certa;
Há um tempo certo para cada propósito debaixo do céu:
Tempo de nascer e tempo de morrer,
Tempo de plantar e tempo de arrancar o que plantou,
Tempo de matar e tempo de curar,
Tempo de derrubar e tempo de construir,
Tempo de chorar e tempo de rir,
Tempo de prantear e tempo para dançar,
Tempo de espalhar pedras e tempo de ajundá-las,
Tempo de abraçar e tempo de conter,
Tempo de procurar, tempo de desistir,
Tempo de guardar e tempo de jogar fora,
Tempo de rasgar e tempo de costurar,
Tempo de calar e tempo de falar,
Tempo de amar e tempo de odiar,
Tempo de Lutar e tempo de viver em paz”**

Eclesiastes 3: 1-8

RESUMO

SIMÕES, L. S. **Estudo qualitativo e quantitativo do testículo de roedores histricomorfos e o efeito do Letrozol no testículo da paca (*Cuniculus paca*)**. [Qualitative and quantitative study of testicular histricomorfs rodents and the effect of Letrozole in the testis of paca (*Cuniculus paca*)]. 2016. 94 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Analisou-se por métodos quantitativos e qualitativos o testículo de roedores histricomorfos nas fases, pré-púbere, púbere e adulto da Paca (*Cuniculus paca*), Cutia (*Dasyprocta leporina*) e Porquinho-da-índia (*Cavia porcellus*). Mediante as técnicas de microscopia de luz, microscopia eletrônica de varredura, microscopia eletrônica de transmissão e método estereológico. Verificou-se a influência do Letrozol um inibidor da enzima aromatase nas dosagens de 0,15mg/kg e 1,0 mg/kg, sobre a morfologia testicular de pacas macho. Este modelo animal apresenta importância, comercial e científica sendo excelente alternativa para a pesquisa, colaborando com o desenvolvimento de investigações vitais ao homem e aos próprios animais. Os resultados desta investigação demonstraram, que os aspectos qualitativos da morfologia testicular do Porquinho-da-índia, Cutia e de Paca foram semelhante nas fases pré-púbere, púbere e adulta. As avaliações quantitativas do Porquinho-da-índia e Cutia realizados mediante o método estereológico permitiram quantificar parâmetros, sem hipóteses de forma, tamanho, orientação ou distribuição das partículas contadas, demonstrando ser um método imparcial e confiável para ser aplicado em estudos de reprodução. Considerando o estrógeno ser essencial para a função da espermatogênese, o efeito do Letrozol no testículo da paca (*Cuniculus paca*), sugeriu que a inibição da enzima aromatase mediante a utilização de Letrozol na dosagem de 0,15mg/kg, sugeriu em um aumento no número das células de Sertoli, refletindo sobre as demais células testiculares, comparando com o testículo basal (controle). O testículo tratado (Letrozol) demonstrou epitélio germinativo íntegro, sendo este dado importante para a reprodução. No animal púbere houve um aumento no número de células de Sertoli, semelhante ao descrito anteriormente. O epitélio seminífero mostrou com alterações morfológicas, tais como proliferação celular, presença de células germinativas com características apoptóticas, e vacúolos e núcleos em picnose. Estes dados poderão ser úteis para o estudo da Síndrome da Disgenesia testicular.

Palavras-chave: Estereologia. Roedores. Inibidor da aromatase. Célula de Sertoli.

ABSTRACT

SIMÕES, L. S. Qualitative and quantitative study of testicular Hystricomorph rodents and the effect of the Letrozol in paca testes (*Cuniculus paca*). [Estudo qualitativo e quantitativo do testículo de roedores histricomorfos e efeito do Letrozol no testículo da paca (*Cuniculus paca*)]. 2016. 94 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Analysis by quantitative and qualitative methods testicular histricomorfs rodents in phases, pre-pubertal, pubertal and adult paca (*Cuniculus paca*), agouti (*Dasyprocta leporina*) and guinea-pig (*Cavia porcellus*). By means of light microscopy techniques, scanning electron microscopy, transmission electron microscopy, stereological method and the influence of an aromatase inhibitor, the Letrozole in dosages of 0.15 mg/kg and 1.0 mg/kg on testicular male morphology paca. This animal model has importance, excellent commercial and scientific alternative to research, contributing to the development of vital research to humans and from animals themselves. The results of this research have shown that the qualitative aspects of testicular morphology guinea-pig, Agouti and paca were similar in pre-pubertal, pubertal and adult stages. Quantitative assessments of the guinea-pig and agouti performed by the stereological method allowed quantify parameters, no change of shape, size, orientation or distribution of particles counted, it is proving to be a partial and reliable method to be applied to reproduction studies. Considering the estrogen is essential for the function of spermatogenesis, the effect of Letrozole in the testis of paca (*Cuniculus paca*), suggested that inhibition of aromatase enzyme through the use of Letrozole in a dosage of 0.15 mg/kg suggested in an increase in number of Sertoli cells, reflecting on the other testicular cells, comparing the baseline testis (control). The treaty testis (Letrozole) showed intact germinal epithelium, which is important data for reproduction. In pubertal animals there was an increase in the number of de Sertoli cells, similar to that described above. The seminiferous epithelium showed to morphological changes such as cell proliferation, the presence of germ cells with apoptotic features and vacuoles and nuclei picnosis. These data may be useful for the study of testicular dysgenesis syndrome.

Key words: Stereology. Rodents. Aromatase of inhibitor of. Sertoli cells

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	ROEDORES	15
2.1.1	Porquinho-da-índia	15
2.1.2	Cutia	15
2.1.3	Paca	16
2.2	TESTÍCULOS DE ROEDORES	17
3	MORFOLOGIA TESTICULAR e ESPERMATOGÊNESE	19
4	EPITELÍOCITO SUSTENTADOR (CÉLULAS DE SERTOLI) E CÉLULAS INTERSTICIAIS (CÉLULAS DE LEYDIG)	23
5	INIBIDOR DA AROMATASE	25
6	OBJETIVO GERAL	28
6.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
7	ARTIGO 1: ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DA ESPERMATOGÊNESE DO PORQUINHO- DA- INDIA (CAVIA PORCELLUS)	29
7.1	INTRODUÇÃO	29
8	ARTIGO 2 A QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS TESTICULARES DURANTE O DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL DO PORQUINHO-DA-ÍNDIA (CAVIA PORCELLUS) E DA CUTIA (DASYPROCTA LEPORINA, 1758)	30
8.1	INTRODUÇÃO	30
8.2	MATERIAIS E MÉTODOS	31
8.2.1	Animais	31
8.3	ESTUDO QUANTITATIVO	31
8.3.1	Estimativa do volume total do testículo $v(t)$	31
8.3.2	Amostragem dos Testículos	32
8.3.3	Número total de sertoli, leydig, espermatogônias, espermatócitos e espermátides	32
8.3.4	Densidade dos túbulos seminífero VV (T) E densidade do volume do interstício VV (I)	33
8.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
8.5	RESULTADOS	34
8.5.1	O volume total dos testículos $v(t)$	34
8.5.2	Número total de células de Sertoli	34
8.5.3	Número total de células de Leydig	35
8.5.4	Número total de espermatogônias	35
8.5.5	Número total de espermatócito	35
8.5.6	Número total de espermátide	35
8.5.7	O volume total do túbulo seminífero (ST) e o volume total de interstício (I)	36
8.6	DISCUSSÃO	40
	REFERÊNCIAS	43

9	ARTIGO 3: ASPECTOS QUALITATIVO E QUANTITATIVE DO EFEITO DO LETROZOL SOBRE A MORFOLOGIA TESTICULAR DA PACA (CUNICULUAS PACA).	46
9.1	INTRODUÇÃO	47
9.2	MATERIAIS E MÉTODOS	47
9.2.1	Animais	47
9.2.2	Dosagem Hormonal	47
9.2.3	Letrozol	48
9.2.4	Hemicastração	48
9.3	HISTOLOGIA E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	49
9.3.1	Microscopia eletrônica de varredura	49
9.3.2	Imunohistoquímica	50
9.3.3	Reação ácido schiff (P.A.S)	51
10	ESTUDO QUANTITATIVO	52
10.1	ESTIMATIVA DO VOLUME TOTAL DO TESTÍCULO V(T)	52
10.2	AMOSTRAGEM DO TESTÍCULO	52
10.3	NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS DE SERTOLI, CÉLULAS DE LEYDIG, ESPERMATOGÔNIAS, ESPERMATÓCITOS E ESPERMÁTIDES	53
10.4	DENSIDADE DE VOLUME DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS VV (T) E DENSIDADE DE VOLUME DO INTERSTÍCIO VV (I)	54
10.5	VOLUME DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS (TS) E DO TECIDO INTERSTICIAL (TI)	54
11	ESTATÍSTICA	55
12	RESULTADOS QUALITATIVO	56
13	RESULTADO QUANTITATIVO	64
13.1	VOLUME TESTICULAR	66
13.2	DOSAGEM HORMONAL	68
13.3	NÚMERO DE CÉLULAS DE SERTOLI	66
13.4	NÚMERO DE CÉLULAS DE LEYDIG	67
13.5	NÚMERO DE ESPERMATOGÔNIA	68
13.6	NÚMERO DE ESPERMATÓCITO	68
13.7	NÚMERO DE ESPERMÁTIDE	69
14	DISCUSSÃO	70
	REFERÊNCIAS	73
15	CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
	REFERÊNCIA	77
	ANEXO	82

1 INTRODUÇÃO

Por sua diversidade, os roedores silvestres tornaram-se úteis para várias pesquisas. Existem aproximadamente 235 espécies de roedores, distribuídas em 71 gêneros, os quais correspondem a 36% da fauna brasileira (OLIVEIRA; BONVICINO, 2006). Dados de pesquisas sobre a biologia e a fisiologia da reprodução em mamíferos são escassos inclusive aqueles relacionados aos parâmetros reprodutivos mais elementares dos animais silvestres, cuja relevância comparativa e evolutiva é essencial nas políticas de conservação. (WILDT, 2005).

O sistema reprodutor masculino do porquinho-da-índia (*Cavia porcellus*) é pouco estudado, destacando-se estudos voltados na quantificação dos tipos celulares nas diferentes fases sexuais e nas glândulas acessórias (GRADELA et al., 2012). O porquinho-da-índia (*Cavia porcellus*) apresenta características de interesse experimental para estudos reprodutivos e moleculares, devido à representação dos estágios meióticos: leptóteno, zigóteno e paquíteno, assim como ocorre em outros roedores e no homem (SIMÕES et al.; 2016).

A cutia possui grande importância para a produção animal experimental como fonte alternativa de proteína, a mesma contribuiu como animal experimental em estudo de reprodução com aplicação importante na conservação de animais silvestres (ARROYO, et al., 2014).

As Pacas são citadas como um dos principais itens de alimento na dieta das populações rurais da região dos trópicos (KLEIMAN et al., 1983) e o Brasil está entre os países com criatórios autorizados para fins comerciais. Sua importância, além da comercial, toma também o âmbito da ciência, pois as pacas, que são roedores, de baixo custo de manutenção, curto período de gestação, podem tornar-se uma boa alternativa para fins de novo modelo para a pesquisa, colaborando com o desenvolvimento de investigações vitais ao homem e aos próprios animais (MOCKRIN et al., 2005).

Estudos recentes têm avançado a hipótese de que a função reprodutiva masculina isto é que a espermatogênese depende de estrogênio, bem como de androgênio, esta se torna necessário em todos os mamíferos no desenvolvimento de testículos e na função da espermatogênese (AT- TARAS et al., 2006). O estradiol previne a apoptose nas células germinativas dentro do túbulo seminífero (PENTIKAINEN et al., 2000). O estradiol induz a

espermatogênese em camundongos hipogonadaís, que carecem de gonadotropinas. Em camundongos sem o gene *Cy19*, funcional, que codifica a enzima aromatase, sendo esta responsável pela bioconversão de androgênios em estrógenos, tem a espermatogênese interrompida e apresentou atrofia testicular (ROBERTSON et al., 1999). A célula de Sertoli reside dentro dos túbulos seminíferos e fornecem suporte para o esperma em desenvolvimento. Previamente as células de Sertoli inicia a diferenciação sexual do sistema reprodutor masculino, estas células proliferam durante a vida pré-natal por duas fases proliferativas (SHARPE et al., 2003). Em Javalis a administração do Letrozol no período neonatal promove um aumento no número de células de Sertoli, no peso testicular e na produção espermática (BERGER et al., 2008). No suíno, a primeira onda de proliferação das células de Sertoli é regulada por estrógenos endógenos, como a redução da atividade da aromatase (BERGER et al., 2008).

A compreensão sobre o número das células de Sertoli é importante para a reprodução animal e avaliar durante o desenvolvimento, as anormalidades da mesma, contribui para estudos sobre a Síndrome da disgenesia testicular, em humanos (WOHEFART-VEJE et al., 2009). Neste contexto, este estudo objetiva-se por meio da análise qualitativa e quantitativa do testículo do porquinho-da-índia (*Cavia porcellus*), cutia (*Dasyprocta agouti*), paca (*Cuniculus paca*), estimar o número de células testiculares por métodos estereológicos que quantificam parâmetros, sem hipóteses de forma, tamanho, orientação ou distribuição das partículas contadas, permitindo uma análise dos parâmetros, das células testiculares de modo imparcial e confiável para ser aplicado em condições experimentais, patológicas e normais. No entanto para as pacas, também a será avaliado o efeito do Letrozol sobre a morfologia testicular dos mesmos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ROEDORES

2.1.1 Porquinho-da-índia (*Cavia porcellus*)

O porquinho-da-índia (*Cavia porcellus*), também chamado de cobaia doméstica, é uma espécie de roedor pertencente à família Caviidae gênero *Cavia*, é conhecido, por muitos, como símbolo representativo dos animais de laboratório. As primeiras utilizações, com fins experimentais, foram realizadas por Lavoiser, em 1790, em investigações relacionadas ao calor. Atualmente, é muito utilizada em experimentações ligadas a pesquisa biológica tais como: nutrição, farmacologia, imunologia, alergia e estudos reprodutivos. (SPOTORNO et al., 2006; DUNNUM; SALAZAR-BRAVO, 2010) (Figura 1).

Figura 1 - Porquinho-da-índia

Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Porquinho-da-índia>

2.1.2 Cutia (*Dasyprocta sp*)

As cutias pertencem à família Dasyproctidae e ao gênero *Dasyprocta*, que compreende doze espécies e 33 subespécies (MOREIRA; MACDONALD, 1997). Possuem ampla variabilidade geográfica distribuindo-se desde o sul do México até o norte da Argentina. As mesmas estão presentes em diversos habitats, como floresta de terra firme, várzea, mata ciliar,

savana úmida arbustiva, florestas secundárias e em áreas cultivadas (MOREIRA; MACDONALD, 1997). A cutia é um animal exclusivamente terrestre alimentando-se principalmente de folhas, raízes e frutos.

Esta espécie pode ser domesticada facilmente e sua carne possui alto valor econômico e nutricional, sendo rica em proteínas (27,7%), com baixo teor de lipídeos (2,4%), carboidratos (1,6%), fibras (0,3%) e resíduos (2,9%). Dentre as várias espécies de cutia, o tamanho (41,5 a 62 cm) e o peso corporal (1,3 a 4 kg) são bastante variáveis. O período de gestação é em média 104 dias e a duração média de seu ciclo estral é em torno de 32 dias. Sabe-se que em cativeiro a cutia se reproduz o ano inteiro. A mesma apresenta reprodução do tipo poliestral contínua, sendo, portanto, um animal de fácil adaptação ao cativeiro (GUIMARÃES, 1997). A puberdade da fêmea ocorre em média aos nove meses de idade (FERREIRA, 2004). Nos machos, a puberdade é alcançada por volta dos 8-9 meses e a maturidade sexual entre o 16º e 17º mês de idade (FERREIRA, 2004) (Figura 2).

Figura 2 - Cutia

Fonte: [http:// www. criadourooncapintada.org](http://www.criadourooncapintada.org). BR criadouroo

2.1.3 Paca (*Cuniculus paca*)

Este roedor, de pelagem curta e castanha, com faixas claras e irregulares na porção lateral do corpo, possui um corpo alongado com patas curtas e unhas muito afiadas propícias para cavar as tocas (OLIVEIRA, 2002). Esta espécie vive em torno de 10 a 15 anos na natureza e cerca de vinte anos em cativeiro (OLIVEIRA et al., 2007). Os animais adultos de ambos os sexos pesam entre 7 a 10 kg. Em condições naturais, estes animais são de natureza agressiva e solitária, territorial e socialmente intolerante, de hábito noturno e se reproduzem durante todo o ano, apesar de possuírem baixo índice reprodutivo (OLIVEIRA et al., 2007). Já em cativeiro, as pacas podem mudar de seu comportamento agressivo e antissocial para animais sociáveis e de fácil manejo. Apesar de a paca ser potencialmente viável do ponto de

vista econômico, existem poucos trabalhos publicados a respeito de sua biologia reprodutiva, os quais, geralmente, fazem abordagem superficial dos aspectos relacionados com a morfologia do sistema genital e com o processo espermatogênico (CARRETTA JÚNIOR, 2008) (Figura 3).

Figura 3 - Paca (*Cuniculus paca*)

Fonte: <http://animais.culturamix.com>

2.2 TESTÍCULOS DE ROEDORES

Os testículos do Porquinho-da-índia são extra-abdominais, situados dentro do escroto, separados crânio-ventralmente pelo corpo e glândula do pênis, medialmente por um fino septo fibroso e caudodorsalmente pelo saco perineal (COOPER; SCHILLER, 1975). A rede testicular do porquinho-da-índia tem características de um tipo intermediário de rede, sendo cavitária, labiríntica e axial devido à disposição, ao aspecto morfológico, dos canais epiteliais interconectados, estes consistem em câmaras epiteliares interligadas que penetram no parênquima testicular (BEU et al., 1997). Constatou-se que os testículos do porquinho-da-índia apresentavam forma cônica, achatados dorsoventralmente. Um desses órgãos ou os dois se situavam na cavidade abdominal, comprovando sua capacidade retrátil. Na fase adulta os testículos mediram entre 35-38 mm, em comprimento, 15- 20 mm em diâmetro e de 5-7 mm em espessura. As superfícies lateral e ventral são livres, enquanto que a dorsomedial estava anexada ao epidídimo. A túnica albugínea que recobre os testículos, espessa e transparente, continham um retináculo de vasos sanguíneos (MIRAND; SHADLE, 1953).

Realizou-se uma análise dos aspectos biométrico do desenvolvimento testicular e o peso corporal em cutias criadas em cativeiro, constatou-se que o desenvolvimento biométrico do testículo pode ser dividido em duas fases, de 0-8 meses e de 9-14 meses de idade, sendo nove meses considerados ponto de corte em se tratando de desenvolvimento testicular de cutias criadas em cativeiro. O peso testicular, o volume testicular, assim como os demais

parâmetros testiculares (comprimento, diâmetro e perímetro) evoluiu lentamente e gradualmente até os oito meses de idade (ASSIS NETO et al., 2003).

Em estudo macroscópico do sistema reprodutor masculino da Cutia, verificaram-se, respectivamente, os seguintes valores médios do comprimento, do diâmetro e do peso testículo: $3,67 \pm 0,12$ cm, $1,67 \pm 0,04$ cm e $5,03 \pm 0,52$ g. O testículo e o epidídimo foram encontrados em contato com os músculos abdominais dentro de bolsas escrotais, sendo estas formadas de evaginações da parede abdominal caudoventral (MOLLINEAU et al., 2006).

O peso testicular da cutia apresentou uma curva de crescimento sigmoide, uma vez que o mesmo apresentou-se lento do nascimento aos oito meses de idade e um crescimento abrupto a partir dos nove meses maiores crescimentos da população de células espermatogênica e presença de espermatozoides no lume tubular. Este comportamento do crescimento tubular foi observado em espécies de animais domésticos e também entre outras espécies de mamíferos, incluindo roedores (RANA; BILASPURI, 1999). O volume testicular dessa espécie, assim como os demais parâmetros biométricos testiculares (comprimento, diâmetro e perímetro), evoluíram lentos e gradualmente até os oito meses de idade, a partir dos nove meses o crescimento foi mais rápido manifestando-se na puberdade (PIMENTA et al., 1984).

Mediante análise qualitativa do estabelecimento da espermatogênese em cutias (*Dasyprocta aguti*) criadas em cativeiros, os seguintes parâmetros foram avaliados: aspectos de luminação dos túbulos seminíferos, presença de espermátócitos primários, presença de espermátides e formação dos primeiros estágios do ciclo do epitélio seminífero segundo o método da morfologia tubular. O período desde o nascimento até os cinco meses de idade correspondeu à fase impúbere; dos seis aos oito meses de idade a fase de transição da pré-puberdade a puberdade; dos nove aos dez meses de idade à fase da puberdade; e dos doze ao quatorze mês de idade à fase da pós-puberdade. A puberdade da cutia (*Dasyprocta aguti*) ocorreu em animais a partir dos sete meses de idade, e o estabelecimento da puberdade foi constatado em todos os animais estudados aos nove meses de idade (ASSIS-NETO et al., 2003).

Na paca os testículos sob o aspecto morfológico macroscópico apresentaram-se como estruturas ovaladas, alongadas crâniocaudalmente. Foi verificado que nesta espécie, alguns animais apresentavam este órgão situado na cavidade abdominal, próximos ao ânulo vaginal, entretanto, também se verificou que em uma oportunidade o testículo direito situava-se no escroto e o esquerdo próximo ao ânulo inguinal profundo; também em outra amostra os dois testículos apresentaram em posição escrotal (BORGES et al., 2013).

Do ponto de vista microscópico dos testículos da paca foi possível constatar a presença de células de Leydig na região intersticial, entre os túbulos seminíferos. No interior destes túbulos, entre a lâmina basal e o seu lúmen, observou-se células espermatogênicas em diferentes fases do processo meiótico. Notaram-se ainda, no interior destes túbulos, junto à sua parede interna, as células de Sertoli, as quais apresentavam citoplasma irregular, projetando-se entre as células da linhagem espermiogênicas e núcleos triangulares (BORGES et al., 2013).

3 MORFOLOGIA TESTICULAR E ESPERMATOGÊNESE

O sistema reprodutor masculino é constituído pelos testículos, onde ocorre a produção de gametas (espermatogênese) e por um sistema de ductos onde ocorre o transporte, maturação e armazenamento dos espermatozoides. Associado aos ductos existe um conjunto de glândulas anexas que secretam o fluido seminal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Os testículos demonstram um formato oval ou arredondado na maioria dos mamíferos, podendo variar anatomicamente, normalmente estão localizados fora da cavidade abdominal, em uma prega cutânea denominada escroto. Esta localização testicular é importante na maioria das espécies de mamíferos, pois a temperatura inferior à temperatura abdominal, para o equilíbrio térmico e manutenção das funções testiculares (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

As gônadas do macho, os testículos, têm duas funções principais: produção de células germinais denominadas espermatozoides que transmitem os genes do macho para o filhote e, produção de andrógenos, que dão características ao sexo masculino (STANBENFELD; EDQVIST, 1996).

A relação entre o tamanho dos testículos e o tamanho do peso corporal é conhecida como índice gonodossomático, este índice pode fornecer informações sobre a fisiologia reprodutiva e até mesmo sobre o sistema de acasalamento de uma espécie (KENAGY; TROMBULAK, 1986). O tamanho testicular está diretamente relacionado ao comportamento reprodutivo, isto é monogâmicos apresentam menor índice gonodossomático enquanto os promíscuos ou poliândricos destaca-se por maior tamanho testicular (KENAGY; TROMBULAK, 1986).

O testículo dos mamíferos está envolto pela túnica vaginal, que por sua vez recobre uma cápsula de tecido conjuntivo rica em fibras de colágeno, a túnica albugínea. Na região posterior, a túnica albugínea apresenta um espessamento, o mediastino testicular, de onde partem os septos fibrosos que dividem o testículo em vários compartimentos, os lóbulos testiculares. Cada lóbulo é ocupado por tubos seminíferos imersos em tecido conjuntivo frouxo contendo células intersticiais, ou de Leydig, responsáveis pela produção de androgénios, nomeado testosterona, e ainda macrófagos, fibroblastos, vasos sanguíneos e vasos ou seios linfáticos, consoante às espécies (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Os túbulos seminíferos constituem a maior parte do testículo ocupando na maioria de 70% a 90% do parênquima testicular. Os túbulos seminíferos são desprovidos de vascularização ou inervação são constituídos por túnica própria reveste o túbulo seminífero externamente, sendo composta por células mióides e elementos acelulares, como fibras colágenas e a membrana basal. No epitélio seminífero são encontradas as células germinativas e as células de Sertoli (RUSSEL et al., 1990). Os tubos seminíferos são túbulos longos extremamente enrolados que terminam nos túbulos retos os quais drenam na rete testis, conjunto de canais escavados no seio da albugínea, de onde partem os dutos eferentes que penetram na porção cefálica do epidídimo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Existe grande variação no número e nas dimensões (diâmetro e comprimento) dos túbulos seminíferos nas diferentes espécies de mamíferos (FRANÇA; RUSSELL, 1998). O camundongo, por exemplo, possui aproximadamente 20 túbulos seminíferos por testículo, perfazendo no total cerca de 2 metros de comprimento tubular por testículo (BASCOM; OSTRUD, 1925). De maneira geral, o valor observado para o diâmetro tubular na grande maioria das espécies de mamíferos está em torno de 180µm a 300µm (ROOSEN-RUNGE, 1977).

O controle da função testicular é obtido pelo equilíbrio do eixo hipotálamo- hipófise-testículo, ou seja, da interação do GnRH, gonadotrofinas e células de Leydig e Sertoli. O hipotálamo sintetiza o GnRH em pulsos a cada 90-120 minutos. O GnRH estimula a hipófise anterior a liberar LH e FSH na circulação sistêmica. O LH se liga a receptores específicos nas células de Leydig, estimulando a produção de testosterona (MOLINA, 2007). O FSH é necessário para a iniciação da espermatogênese durante a puberdade, estimula a produção da proteína de ligação dos esteroides e a produção de inibina B pelas células de Sertoli (Figura 4) (MOLINA, 2007). A inibina B tem como principal função suprimir a secreção hipofisária de FSH por um mecanismo de retroalimentação negativa. A secreção de inibina B mantém correlação com a proliferação e manutenção das células de Sertoli, funções estas reguladas

pelo FSH. Os valores de inibina B correlacionam-se ainda com a contagem total de espermatozoides e com o volume testicular, podendo ser utilizado como índice de espermatogênese (BRAUNSTEIN, 2010).

Figura 4 - Esquema da regulação eixo hipotalâmico-Testicular

Fonte <http://wikiciencias.casadasciencias.org>

O epitélio seminífero apresenta numa lâmina basal e é composto por células somáticas de suporte, as células de Sertoli, e uma população de células germinativas em várias fases de maturação. As únicas células que mantêm contato diretamente com a lâmina basal são as células de Sertoli e as espermatogônias. As restantes células da linhagem germinativa localizam-se em recessos das células de Sertoli, em íntimo contato com estas células (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A espermatogênese é um processo no qual as células germinativas entram em divisão, diferenciação, e meiose para dar origem a espermátide haploides (O' DONNEL et al., 2001).

À medida que progride a maturação, as células germinativas vão-se movendo na direção do lúmen dos tubos onde serão libertadas seguindo depois para a rete testis. Este processo, que origina os espermatozoides a partir das espermatogônias, é denominado espermatogênese. No processo da espermatogênese podem ser distinguidas três etapas funcionais: Fase proliferativa: na qual as espermatogônias se multiplicam por mitose dando origem a células de reserva e, algumas, a elementos que seguem a via da diferenciação em espermatozoides. Fase meiótica: na qual os espermatócitos se dividem, por meiose, dando origem aos espermátideos haplóides. Fase de diferenciação ou espermiogênese: na qual os

espermátides se diferenciam em células estruturalmente especializadas para fertilizar o óvulo, os espermatozoides (RUSSEL et al., 1990).

A mitose assegura a produção de grande número de células germinais, é a primeira fase mais importante da espermatogênese (STANBENFELD; EDQVIST, 1996). As espermatogônias presentes na membrana basal dos túbulos seminíferos são denominadas células germinativas (O'DONNEL et al., 2001). O desenvolvimento da célula germinativa envolve uma série de eventos, é classificada em subtipos de acordo com o estado de diferenciação, incluindo a espermatogônia tipo A, intermediária (presentes apenas em roedores) e tipo B (O'DONNEL et al., 2001; LUNENFELD; HULEIHEL, 2004).

Uma das espermatogônias formadas pela divisão mitótica não se divide nem se diferencia mais e permanece em estado basal de diferenciação; em essência, ela substitui a célula parental, enquanto a outra processa a mitose (STANBENFELD; EDQVIST, 1996).

Na espermatogênese, a mitose tem um número específico; pois há quatro divisões no touro, coelho e carneiro, cinco no rato e quatro no homem. Do ponto de vista quantitativo, quanto maior as divisões mitóticas, maior número de espermatozoides produzidos por unidade de peso dos testículos (STANBENFELD; EDQVIST, 1996).

A meiose é a segunda etapa da espermatogênese e tem como função a redução do número de cromossomos de cada célula germinal para o estado haploide (STANBENFELD; EDQVIST, 1996). Depois da última mitose que forma a espermatogônia do tipo B, espermátocitos no estágio pré-leptóteno primário são formados, essas células replicam o seu DNA e então iniciam a meiose (O'DONNEL et al., 2001).

Durante a prófase da primeira divisão meiótica, as células germinativas entram em transição morfológica que podem ser classificadas com base no tamanho nuclear e morfologia. Na fase zigóteno, os cromossomos homólogos pareados denominados espermátocitos no paquíteno, após a essa fase paquíteno, uma breve fase de diplóteno se segue, na qual os cromossomos pareados parcialmente se separam, e as células então entram na primeira divisão meiótica para produzir as espermátides secundárias, estas entram rapidamente na segunda divisão meiótica para gerar a espermátide haploide arredondada (O'DONNEL et al., 2001).

4 EPITELÍOCITO SUSTENTADOR (CÉLULAS DE SERTOLI) E CÉLULAS INTERSTICIAIS (CÉLULAS DE LEYDIG)

A célula Sertoli, descrita originalmente por Enrico Sertoli, na Itália (1865) é importante para o controle do desenvolvimento das células germinais tanto a respeito da função nutritiva quanto da função reguladora (JOHNSON, 1991). As células de Sertoli são grandes, têm núcleos evidentes e estão situadas basalmente dentro do túbulo. Estas células têm longos processos que controlam os espermátócitos e espermátides e provém uma estreita interação com as células germinais durante todo o seu desenvolvimento (STANBENFELD; EDQVIST, 1996). O citoesqueleto é responsável por manter a forma celular e os movimentos ativos do citoplasma, essencial ao acomodamento das constantes mobilidades das células germinativas (DADOUNE; DEMOULIN, 1993).

As células de Sertoli são interconectadas por *tight junctions* localizadas em regiões basais dos túbulos seminíferos, formando uma barreira hemato-testicular funcional, delimitando assim dois compartimentos anatômicos e funcionais nos túbulos seminíferos: um compartimento basal contendo espermatogônia e espermátócitos no estágio pré-leptoteno e um compartimento adluminal preenchido por espermátócitos primários em estágios posteriores e espermátides arredondadas (AMANN, 1993; DADOUNE; DEMOULIN, 1993). Durante o processo de maturação, os espermátócitos que se originam das espermatogônias no compartimento basal do túbulo, deslocam-se através de *tight junctions* e terminam seu desenvolvimento no compartimento adluminal do túbulo (AMANN, 1993; STANBENFELD; EDQVIST, 1996).

As células de Sertoli têm um papel importantíssimo na integridade do epitélio seminífero, e as suas funções incluem a regulação da espermatogênese, suporte estrutural e metabólico para as células germinativas, libertação dos espermatozóides (espermiacção), secreção de fluido tubular para o transporte dos espermatozóides e ainda a manutenção de uma barreira de permeabilidade entre o espaço intersticial e a luz dos tubos seminíferos, qualquer alteração destas funções pode comprometer seriamente a produção de espermatozóides (CREASY; FOSTER, 2002).

Espécies que apresentam alto percentual de túbulos seminíferos no testículo e elevado número de espermátides por célula de Sertoli (caprino 88% de túbulo seminífero e 15

espermátides por célula de Sertoli, no bovino 75% e 5 e no equino 65% e 9), são as que possuem alta produção espermática por grama de testículo (FRANÇA; GARCIA, 2005).

Nos equinos o número de células de Sertoli é baixo em jovens, aumenta e se estabiliza em adultos e reduz com o avançar da idade. Com 1 a 2 anos de idade há aproximadamente 1×10^9 células de Sertoli, já com 4 a 5 anos de idade há $3,6 \times 10^9$ e ficam neste número até os 13 a 20 anos de idade quando começam a diminuir (JOHNSON et al., 1991).

As células de Sertoli não se proliferam após a puberdade, mas morrem, portanto a capacidade de produção espermática estabelecida antes da puberdade não necessariamente irá persistir por toda vida (O'DONNEL et al., 2001).

As células de Leydig se encontram em contato íntimo com o sistema de capilares e sua função é a produção de testosterona que é importante para o desenvolvimento e manutenção da espermatogênese e das características masculinas (O' DONNEL et al., 2001). A produção de testosterona pelas células de Leydig é controlada pelo hormônio luteinizante (LH). Aumentos na secreção de LH são seguidos, dentre, 30 a 60 minutos, por níveis aumentados de testosterona que duram de uma a várias horas. (STANBENFELD; EDQVIST, 1996).

O LH se liga especificamente às membranas das células de Leydig e ativa a adenosina-fosfato cíclica, este processo dá início à ativação de proteínas cinases que catalisam a fosforilação das proteínas intracelulares e a mobilização dos precursores de esteróides. (STANBENFELD; EDQVIST, 1996).

A remoção do LH cessa a produção de testosterona e leva, a uma redução significativa no tamanho das células de Leydig. Certos estágios do ciclo no epitélio seminífero aumentam a capacidade de produção de testosterona pelas células de Leydig, dessa forma a morfologia dessas células, depende da composição de células germinativas nos túbulos seminíferos vizinhos (HUHTANIEMI; TOPPARI, 1995).

5 INIBIDOR DA AROMATASE

Os hormônios participantes das funções reprodutivas são os esteroides, ou seja, substâncias derivadas do colesterol. Em mamíferos, os principais tecidos produtores de colesterol são a pele, fígado, e mucosa intestinal; a atividade biosintética mensurável também é encontrada no pulmão, rim, adrenal, gônadas, músculos, cérebro e tecido adiposo (NORMAN; LITWACK, 1997). A estrutura de cada hormônio é dependente da glândula onde são formados e da função a ser exercida no organismo. Os andrógenos (19 carbonos), estrógenos (18 carbonos) e progestágenos (21 carbonos) compõem a classe de hormônios sexuais, os quais são transportados pelo sangue até o órgão alvo. Assim, o colesterol sofre clivagem e se transforma em pregnenolona; este, por sua vez, através da ação da enzima 3β -HSD (hidroxiesteroide-desidrogrenase), se transforma em progesterona. Ambos, pela ação da enzima 17α -hidroxilase, são convertidos em 17α -hidroxipregnenolona e 17α -hidroxiprogesterona, respectivamente. Tais hormônios são os primeiros da classe de progestágenos. Ainda, na mesma segmentação, pela clivagem da $17,20$ -liase, originam-se a dehidroepiandrosterona (DHEA) e a androstenediona, da classe dos andrógenos. O primeiro é convertido a androstenediol, já o segundo, em testosterona, pela ação enzimática da 17β -HSD. Dando início à classe de estrógenos, a androstenediona e a testosterona são reduzidas à estrona e estradiol, respectivamente, pela ação da aromatase (NORMAN; LITWACK, 1997; CONLEY; HINSHELWOOD, 2001; GUYTON; HALL, 2011), como ilustrado na figura 5.

Figura 5 –Esquema simplificado dos hormônios esteróides

Os inibidores da aromatase são moléculas desenvolvidas com a finalidade de inibir a síntese de estrogênio, bloqueando a ação da enzima responsável pela transformação dos androgênios em estrogênios.

Essa classe de fármacos pode ser dividida em duas categorias principais: esteroidais, as quais se ligam ao sítio do substrato da enzima, e não-esteroidais, que se ligam à porção heme do complexo enzimático. Os inibidores da aromatase esteroidais (tipo I) são considerados inibidores suicidas, ou seja, liga-se de forma irreversível à enzima, formando um complexo covalente definitivo. Já os não-esteroidais (tipo II), formam ligações temporárias com a enzima e não a inibem de forma definitiva (OSBORNE, 1999).

A primeira geração dos inibidores de aromatase foi desenvolvida no final dos anos 70. A aminoglutetimida, inibidor da aromatase esteroideal não seletivo, foi a primeira a ser efetivamente empregada no tratamento do câncer de mama. Ensaios utilizando essa medicação em pacientes com tumores de mama avançados demonstraram resposta em 20 a 40% das pacientes tratadas e remissão entre 6 a 12 meses (WELLS et al., 1978).

Os inibidores da aromatase de 1ª, 2ª e 3ª geração são divididos em dois tipos de classes – esteróides (tipo 1) e não esteróides (tipo 2). Os do tipo um, também designados como suicidas são análogos da androstenediona que se ligam no sítio ativo da aromatase, mas de um modo irreversível comportando-se, portanto como inibidores enzimáticos. Com efeito, da ligação à aromatase resulta uma hidroxilação que origina uma ligação covalente permanente. Os do tipo 2 são imidazóis ou triazóis, que funcionam como inibidores por se ligarem preferencialmente e de um modo reversível à subunidade citocromo P450 da enzima, através da ligação do átomo de ferro do grupo heme com o anel azólico dos inibidores da aromatase. A eficácia destes inibidores depende, portanto, das concentrações e afinidade da enzima e do inibidor. (THÜRLIMANN et al., 2005).

A aminoglutetimida pertence à 1ª geração, menos potente e com reações adversas por vezes limitantes. Não tem estrutura esteróide (tipo 1). Como exemplos de inibidores de 2ª geração dos tipos 1 e 2 têm o formestano e o fadrozol, respectivamente.

A 3ª geração de inibidores é, sem dúvida, a mais específica em doses clínicas, sendo desprovida de efeitos sobre as concentrações basais de cortisol e aldosterona, incluem o exemestano, Letrozol e anastrozol, estes têm efeito sobre o metabolismo do estrogênio (THÜRLIMANN et al., 2005).

Em pesquisas tem demonstrado que a administração de Letrozol, é um inibidor de síntese de estrógeno administrado no começo do período neonatal promove a proliferação de

células de Sertoli em Javalis, resultando em um aumento de 25% no número de células de Sertoli e produção de esperma (BERGER; CONLEY, 2014).

O Letrozol um endógeno masculino, aumenta o potencial de reprodução e a regulação da proliferação das células de Sertoli em mamíferos. Isso enfatiza duas importantes funções dos estrógenos na função reprodutiva masculina, a primeira é a diferenciação das espécies no que diz a respeito dos estrogênios a fertilidade. Os estrogênios são determinantes no desenvolvimento, funções dos ductos, glândulas e dos testículos (BERGER; CONLEY, 2014).

6 OBJETIVO GERAL

Investigar por métodos quantitativos e qualitativos os testículos de roedores histricomorfos pré-púberes, púberes e adultos da Paca, Cutia e Porquinho-da-índia e avaliar os efeitos do Letrozol no testículo da paca.

6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar qualitativamente a morfologia do Testículo: Porquinho da índia, Cutia e paca.

- Avaliar histologicamente e ultraestruturalmente os testículos;

- Avaliar a atividade da inibição da enzima aromatase em testículo de paca

- Realizar dosagem Hormonal do estradiol em paca;

- Analisar o efeito do Letrozol nos testículos da paca;

- Realizar imunohistoquímica, para a proliferação de células germinativas (PCNA) e com anticorpo Gata-4, para marcação de células Sertoli

- Avaliar a atividade da inibição da enzima aromatase em testículo de paca

Realizar estimativa do volume do testículo, volume dos túbulos seminíferos, do volume intersticial, do número total de células: de Sertoli, espermatogônias, espermatócitos e espermátides do Porquinho-da-índia, Cutia e da Paca.

7 ARTIGO 1: ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DA ESPERMATOGÊNESE DO PORQUINHO-DA-ÍNDIA (*CAVIA PORCELLUS*) 1

7.1 INTRODUÇÃO

RESUMO. - [Análise ultraestrutural da espermatogênese do porquinho-da-índia (*Cavia porcellus*).]¹. A função reprodutiva é um fator de vital compreensão tanto para o estabelecimento de sistemas apropriados de manejo, quanto para o uso de novas espécies como modelos animais. Neste estudo através da microscopia de luz e eletrônica caracterizou-se a fase de desenvolvimento sexual do porquinho-da-Índia (*Cavia porcellus*) em espécimes de 30, 45 e 90 dias de desenvolvimento. Nos animais de 30 dias, a diferenciação dos espermatócitos foi visualizada somente na microscopia eletrônica de transmissão em leptóteno, zigóteno e paquíteno. Durante a puberdade, houve diferenciação do epitélio germinativo, formação do acrossoma, porém não foram evidenciados espermatozóides, assim, infere-se que a puberdade acontece a partir dos 45 dias de idade. A maturidade sexual foi evidente aos 90 dias de idade. Nossos resultados mostraram que ao longo do desenvolvimento sexual pós-natal do porquinho-da-índia, mudanças no epitélio germinativo testicular levam a alterações morfológicas, inclusive com relação ao desenvolvimento das células de Sertoli e de Leydig, as quais estão diretamente relacionadas com a puberdade. Assim, novos subsídios morfológicos são fornecidos para um melhor entendimento dos parâmetros reprodutivos desta espécie, a fim de viabilizar sua utilização como modelo animal no campo da biologia reprodutiva.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Reprodução, meiose, porquinho-da-índia, modelos animais.

(ANEXO A)

¹Pesq. Vet. Bras. 36(Supl.1):89-94, junho 2016

8 ARTIGO 2: A QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS TESTICULARES DURANTE O DESENVOLVIMENTO PÓS-NATAL DO PORQUINHO-DA-ÍNDIA (*CAVIA PORCELLUS*) E DA CUTIA (*DASYPROCTA LEPORINA*, 1758).

8.1 INTRODUÇÃO

O porquinho-da-índia (*Cavia porcellus*) e a cutia (*Dasyprocta agouti*) são roedores que pertencem à subordem Histricomorfa e infraordem Caviomorfa respectivamente. O porquinho-da-índia habita geograficamente na Colômbia, Venezuela e norte da Argentina e a Cutia da Colômbia para o sul do Brasil (MACKENZIE, 1972).

O porquinho-da-índia é amplamente usado como animal experimental, principalmente em doenças infecciosas devido às semelhanças com os seres humanos referentes aos sintomas e resposta imunológica (PADILHA-CARLIN et al., 2008). A cutia possui grande importância para a produção animal como fonte alternativa de proteína, a mesma contribuiu como animal experimental em estudo de reprodução com aplicação importante na conservação de animais silvestres (ARROYO et al., 2014.; CASTELO et al., 2015).

A função da reprodução é vital para estabelecer o manejo animal apropriado, bem como o uso de modelos animais em estudos reprodutivos (FRANÇA; RUSSEL, 1998). Desta forma, a espermatogênese é definida como um processo sincrónico e regular da diferenciação celular e o conhecimento deste mecanismo é importante para identificar as potenciais causas da infertilidade, subfertilidade e para compreender a produção espermática (AGUIAR et al., 2006).

Considerando que a massa testicular está diretamente relacionada com a produção espermática, a variação na proporção de túbulos seminíferos entre as espécies pode ser considerada como um dos fatores principais responsáveis pela diferença observada na produção espermática eficiente (O'DONNEL et al., 2001).

Na reprodução, a quantificação do parênquima testicular é uma ferramenta útil para avaliar a capacidade espermatogênica em condições normais, patológicas e experimentais (CARDOSO, 2009). Vários estudos têm quantificado os testículos utilizando diferentes técnicas, como proposto por Bellvé et al. (1977), utilizam a histomorfometria (NUNES et al., 2013; BERNAL-MANAS et al., 2014). Assim, este trabalho tem como objetivo estimar o

número de células testiculares durante o desenvolvimento pós-natal aplicação do método estereológico baseada em design como uma ferramenta precisa.

8.2 MATERIAIS E MÉTODOS

8.2.1 Animais

Foram utilizados 12 testículos de porquinho-da-índia com idades de 30, 45 e 90 dias pós-nascimento ($n = 4$ para cada idade), com peso médio de 248g, 262g e 582g, respectivamente. Os animais foram adquiridos em petshop comercial nas respectivas idades e mantidos na FMVZ-USP. Para coleta das amostras, os animais foram anestesiados nas seguintes dosagens: ketamina 75-100mg/kg intraperitoneal (IP) e xilazina 10mg/kg IP, para então serem realizadas as orquectomias. Foram doados 16 testículos de Cutia (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758), provenientes do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres-CEMAS, registrado junto ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais, sob o número 1478912. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) (Protocolo número 8735070714).

8.3 ESTUDO QUANTITATIVO

8.3.1 Estimativa do volume total do testículo $v(t)$

O volume total dos testículos foi estimado dividindo-se o peso seco do órgão, em gramas, pela densidade média do tecido testicular: 1,04g/cm³ (MORI; CHRISTENSEN, 1980), de acordo com a fórmula: $V(t) := m(t)/1,04$

8.3.2 Amostragem dos Testículos

Os testículos foram fixados por imersão em paraformaldeído a 4% durante 24 h a 40°C. Os testículos foram cortados em fatias e uma fração de amostragem dessas fatias ($sfs = 1/2$) foi escolhida. As fatias foram escolhidas cortadas em barras, seguida por uma fração de amostragem de barras ($sfb = 1/2$). E finalmente, as barras escolhidas foram cortadas em fragmentos de tamanho diferentes e organizados numa disposição crescente de tamanho, de acordo com o princípio da smooth fractionator (GUNDERSEN, 2002) e uma fração de amostragem de fragmentos ($sff = 1/2$) foi escolhida. As fatias, barras e fragmentos foram amostrados pela sistemática, uniforme e aleatoriamente princípio (SURS) (GUNDERSEN et al., 1999) (Figura 6).

Figura 6 - Amostragem do testículo do porquinho da índia e da Cutia

Fonte: (SIMOES, L. S. 2016)

Legenda: secções transversais ao longo do eixo do testículo tanto para o porquinho-da-índia como para a Cutia, obtemos de 4-8 fatias e selecionamos randomicamente as fatias, barras e fragmentos (blocos), que são colocados em ordem crescente de tamanhos.

8.3.3 Número total de Sertoli, Leydig, espermatogônias, espermatócitos e espermátides.

Os fragmentos escolhidos foram incorporados em Araldite 502 (Electron Microscopy Sciences) e cortados em 0,5 μm em ultramicrotomo (LEICA ULTRACUT

UCT®). As secções foram recolhidas em lâminas e coradas com azul de toluidina. A fracção de amostragem de secções (sfsc) foi escolhida por SURS e a fracção de amplificação de área foi calculada como o comprimento /deslocamento da frame no eixo x e eixo y na área de interesse da secção (sfa). O princípio do fractionator físico (GUNDERSEN, 1986) foi utilizado para estimar o número total de células de Sertoli, Leydig, espermatogônias, espermátócitos e espermátides. Este princípio baseia-se na amostragem aleatória de uma prévia da fracção conhecida de uma estrutura e, em seguida, contagem das partículas nesta fracção. Este método consiste em multiplicar o número de partículas (Q-) pelo inverso das fracções amostradas: sfs (fatias), sfb (barras), sff (fragmentos), sfsc (secções) e sfa (área). Foram utilizadas duas secções físicas paralelas, com uma distância conhecida. A primeira secção é a secção de referência e a segunda, a secção de look-up. A distância entre as secções "referência" e "look-up" foi de 4µm

8.3.4 Densidade dos túbulos seminífero VV (T) e densidade do volume do interstício VV (I)

As secções foram amostradas seguinte princípio SURS. Em cada secção da amostra foi utilizado um sistema de pontos. Os pontos que batem os túbulos seminíferos e do interstício foram contados. O Vv (T) foi estimado dividindo o número de pontos que atingem os túbulos seminíferos por total de pontos que atingem os testículos. O Vv (I) foi estimado dividindo o número de pontos que atingem o interstício pelo total de pontos que atinge todo o testículo.

8.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados por um teste não paramétrico de Kruskal- Wallis. Os resultados quantitativos foram apresentados como média seguida pelo coeficiente de variação (CV). A diferença entre os grupos foi considerada significativa quando o valor de p foi inferior a 0,05. O software de estatística Minitab expresso foi utilizado para a análise.

8.5 RESULTADOS

8.5.1 O volume total dos testículos v (t)

O volume total de testículos era: 0.16cm^3 pré-púberes (0,15), púberes 0.27 cm^3 (0,11) e adultos 0.55 cm^3 (0,35) ($p = 0,02$) para o porquinho-da-índia. Pré-púberes 1.65 cm^3 (0.50), púberes 2.68 cm^3 (0.14) e adultos 3.64 cm^3 (0,05) ($p = 0,02$) para cutia (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Volume testicular (cm^3) do testículo do Porquinho-da-índia e da cutia nas fases pré-púbere, púbere e adulto.

Fonte: (SIMOES, L.S. 2016)

8.5.2 Número total de células de Sertoli

O número total de células de Sertoli foi: pré-púbere 2.82×10^6 (0,06), púbere 3.60×10^6 (0,05) e adulto 3.21×10^6 (0,09) ($p = 0,06$) para o porquinho-da-índia e as células de Sertoli (Figura 7 e Tabela 1). Pré-púbere 19.80×10^6 (0,03), púbere 20.90×10^6 (0,02), adulto 20.06×10^6 (0,07) ($p = 0,42$) para a cutia (Figura 8 e Tabela 2).

8.5.3 Número total de células de Leydig

O número total de células de Leydig de: pré-púbere $0,15 \times 10^6$ (0,10), púbere $0,38 \times 10^6$ (0,19) e adulto $0,63 \times 10^6$ (0,23) ($p = 0,02$) para o porquinho-da-índia (Figura 7 e Tabela 1). Pré-púbere $5,02 \times 10^6$ (0,07), púbere $5,98 \times 10^6$ (0,20), adulto $5,76 \times 10^6$ (0,20) ($p = 0,05$) para a cutia (Figura 8 e Tabela 2).

8.5.4 Número total de espermatogônias

O número total de espermatogônias foi: pré-púbere $0,67 \times 10^6$ (0,16); púbere $0,87 \times 10^6$ (0,17); e adulto $1,14 \times 10^6$ (0,09) para o porquinho-da-índia (Figura 7 e Tabela 1). Pré-púbere $4,00 \times 10^6$ (0,07); púbere $4,10 \times 10^6$ (0,09); adulto $4,86 \times 10^6$ (0,06) para a cutia (Figura 8 e Tabela 2).

8.5.5 Número total de espermatócitos

O número total de espermatócitos foi: pré-púbere $3,54 \times 10^6$ (0,04), púbere $4,71 \times 10^6$ (0,06) e no adulto $4,41 \times 10^6$ (0,04) ($p = 0,03$) para o porquinho-da-índia (Figura 7 e Tabela 1). Pré-púbere $9,50 \times 10^6$ (0,12), púbere $12,25 \times 10^6$ (0,04), adulto $12,12 \times 10^6$ (0,03) ($p = 0,05$) para a cutia (Figura 8 e Tabela 2).

8.5.6 Número total de espermátides

O número total de espermátides foi: pré-púbere $0,95 \times 10^6$ (0,12), púbere $3,37 \times 10^6$ (0,10) e adulto $3,21 \times 10^6$ (0,09) ($p = 0,06$) para o porquinho-da-índia (Figura 7 e Tabela 1). Pré-púbere $3,40 \times 10^6$ (0,12), púbere $12,00 \times 10^6$ (0,10), adulto $11,42 \times 10^6$ (0,09) ($p = 0,06$) para a cutia (Figura 8 e Tabela 2).

8.5.7 O volume total do túbulo seminífero (ST) e o volume total de interstício (I)

O volume total do túbulo seminífero e o interstício foram: pré-púbere ST: 0,13 cm³ (0,20) e I: 0,03 cm³ (0,18). ST corresponde a 79% e a 21% do volume dos testículos; púbere ST: 0,23 cm³ (0,11) e I: 0,04 cm³ (0,08). ST corresponde a 86% e a 14% do volume dos testículos; adulto ST 0,50 cm³ (0,37) e I: 0,06 cm³ (0,23). ST corresponde a 89% e a 11% do volume dos testículos ($p = 0,02$) para a ST e ($P = 0,06$) para I para o porquinho-da índia. O volume total do túbulo seminífero e o interstício foram: pré-púbere ST: 1,15 cm³ (0,46) e I: 0,49 cm³ (0,59). ST corresponde a 70% e a 30% do volume dos testículos; púbere ST: 2,15 cm³ (0,15) e I: 0,52 cm³ (0,13). ST corresponde a 80% e a 20% do volume dos testículos; adulto ST 3,22 cm³ (0,07) e I: 0,41 cm³ (0,10). ST corresponde a 89% e a 11% do volume dos testículos ($p = 0,02$) para a ST e ($P = 0,06$) para I em cutia (Tabelas 3 e 4).

Figura 7 - Em A: Gráfico do número de células testiculares do guinea-pig x 10^6 . Em B Gráfico da distribuição das células testiculares em porcentagem. Em C figura, corte histológico das fases pré-púbere, púbere e adulto do porquinho-da índia.

Fonte: (SIMOES, L.S. 2016)

Legenda: Em A: Gráfico da distribuição das células testiculares do Porquinho-da-índia x 10^6

Em B: Distribuição em porcentagem das células de Sertoli, Espermatócitos, espermatogônias e espermátides nas fases pré-púbere, púbere e adulto do Porquinho-da-índia. Em C Corte Histológico do Porquinho-da-índia pré-púbere notar: epitélio germinativo em diferenciação, com luminação do túbulo seminífero (L), com presença de células de Sertoli (setas), espermatócitos (setas tracejadas); Em B corte histológico do porquinho-da-índia púbere, diferenciado com espermátides arredondadas (setas). Em C, corte histológico do porquinho-da-índia adulto, com o epitélio germinativo (Ep.G) diferenciado, com presença de espermatozoides (S) no lúmen do túbulo seminífero

Tabela 1 - Dado estatístico referente ao número de células testiculares do Porquinho-da-índia x 10⁶

Números de células (10 ⁶)	Pré-púbere	Púbere	Adulto
Células de Sertoli**	2.82 (0.06)	3.60 (0.05)	3.21 (0.09)
Espermatogônia*	0.67 (0.16)	0.87 (0.17)	1.14 (0.09)
Espermátide***	0.95 (0.12)	3.37 (0.10)	3.21 (0.09)
Espermatócitos**	3.54 (0.04)	4.71 (0.06)	4.41 (0.04)
Células de Leydig**	0.15 (0.10)	0.38 (0.19)	0.63 (0.23)

Diferença entre os grupos: * P<0.05; ** P<0.01; ***P<0.001 Diferença não detectada entre as células de Sertoli e células de Leydig.

Figura 8 - Em A: Gráfico Número das células testiculares da Cutia. Em B Gráfico da distribuição das células testiculares em porcentagem. Em C figura, corte histológico das fases pré-púbere, púbere e adulto da cutia

Fonte (SIMOES, L. S., 2016)

Legenda Em A: Distribuição de células testiculares da Cutia x 10⁶; Em B: Distribuição em porcentagem das células de Sertoli, Espermatócitos, espermatogônias e espermátides nas fases pré -púbere, púbere e adulto da Cutia; Em C: A: testículo de cutia pré-púbere notar: epitélio germinativo em diferenciação, com luminação do túbulo seminífero, com presença de células de Sertoli (setas), espermatócitos (setas tracejadas) e espermatogônia (sp); Em B corte histológico de cutia púbere, diferenciado com presença de espermátide arredondada (setas), espermátide alongada (setas tracejadas), espermatozoides (S) caracterizando a puberdade. Em C, corte histológico de cutia adulta, com o epitélio germinativo (Ep.G) diferenciado, com presença de espermatozoides (S) no lúmen do túbulo seminífero

Tabela 2 - Dados estatísticos referente ao número de células testiculares da Cutia x 10⁶

Números de células (10 ⁶)	Pré-púbere	Púbere	Adulto
Sertoli cells	19.80 (0.03)	20.90 (0.02)	20.06 (0.07)
Espermatogônia*	4.00 (0.07)	4.10 (0.09)	4.86 (0.06)
Espermátide***	3.40 (0.12)	12.00 (0.10)	11.42 (0.09)
Espermatócitos**	9.50 (0.12)	12.25 (0.04)	12.12 (0.03)
Células de Leydig	5.02 (0.07)	5.98 (0.20)	5.76 (0.20)

Diferenças entre os grupos: * P<0.05; ** P<0.01; ***P<0.001; Diferença não detectada entre as células de Sertoli e células de Leydig.

Tabela 3 - Volume do interstício e volume do túbulo seminífero do Porquinho-da-índia (*Cavia porcellus*)

	Pré-púbere	Púbere	Adulto
Volume do interstício*	0.03 (0.18)	0.04 (0.08)	0.06 (0.23)
Volume dos túbulos *	0.13 (0.20)	0.23 (0.11)	0.50 (0.37)

Diferença entre os grupos: * P<0.05; ** P<0.01.

Tabela 4 -Volume do testículo, volume do interstício e volume do seminífero da Cutia (*Dasyprocta leporina*)

	Pré-púbere	Púbere	Adulto
Volume do interstício	0.50 (0.60)	0.52 (0.13)	0.41 (0.10)
Volume dos túbulos**	1.15 (0.46)	2.15 (0.15)	3.22 (0.07)

Diferença entre os grupos: * P<0.05; ** P<0.01.

8.6 DISCUSSÃO

Os métodos estereológicos quantificam parâmetros, sem hipóteses de forma, tamanho, orientação ou distribuição das partículas contadas. O método estereológico para a cutia e porquinho-da-india permitiram quantificar parâmetros, das células testiculares de modo imparcial e confiável para ser aplicado em estudos de reprodução.

O volume total dos testículos da cutia e porquinho da índia está relacionado com o volume dos túbulos seminíferos, e volume intersticial. Ao comparar o testículo pré-púbere com o adulto, os túbulos seminíferos aumentaram em 74% e 65% no porquinho-da-índia e na cutia, respectivamente.

Estes dados foram pertinentes às espécies que apresentam alto percentual de túbulos seminíferos, ou seja, no caprino entre 70% a 90% do parênquima testicular do testículo são túbulos seminíferos. Já no bovino 75%, e no equino 65% (FRANÇA; HESS, 2005). Em outros roedores, a porcentagem de túbulos seminíferos são, na marmota 33%, sendo inferior ao do rato 81%, a do camundongo 85%, do hamster dourado 85%, do cobaio 90% e do degu 93% (RUSSEL et al., 1990). No roedor silvestre (*Hylaeamys megacephalus*), o volume testicular foi de 95% sendo este de porcentagem mais elevada, do que aquela observada em outros roedores tais como a Paca (*Cuniculus paca*) 91% (CARRETA JUNIOR, 2008); e Cutia (*Dasyprocta aguti*) 84,75% (ASSIS-NETO et al., 2003).

De acordo com Short (1997) a única maneira de aumentar a produção de espermatozoides é pelo aumento do volume do tecido tubular seminífero e tamanho dos testículos, porque a taxa de produção de espermatozoides por grama de tecido testicular é quase constante dentro de uma espécie. Zhengwei et al. (1997) mostraram que o número de células germinativas está fortemente relacionado com o volume dos testículos.

Em nosso estudo, o número de espermatogônias em guinea foi diferente entre os grupos pré-púbere, púbere e adulto. Ambos os tipos de espermatogônias aumentou 20% na comparação entre os animais pré-púberes e púberes. O número de espermatogônia em cutia pré-púbere, púbere e adulta foi diferente entre os grupos. Neste estudo, os valores médios das espermatogônias apresentaram-se constante após a puberdade, como observado em camundongos e caititus (CARDOSO, 2009). Em termos médios, os valores observados neste trabalho foram superiores ao número obtido por catetos (COSTA et al., 2004) e catetos (*Tayassu tayasu*) (CARDOSO, 2009) e inferiores aos de cutias (*Dasyprocta aguti*), (ASSIS-

NETO et al., 2003), ratos Wistar (ALMEIDA et al., 2000; MOURA et al., 2006), camundongos (MORAIS et al., 2009) e preás (SANTOS et al., 2012). Em estudo sobre a diferença sazonal na espermatogênese equina (JOHNSON et al., 1991), demonstrou que o testículo equino contém aproximadamente 100% de espermatogônias no verão do que no inverno.

A população espermátócito foi diferente entre os grupos da guinea, mas nenhuma diferença foi detectada em cutias, embora ocorresse um aumento da pré-puberdade para a puberdade, estabilizando na fase adulta, sendo dados compatíveis com (ASSIS-NETO et al., 2003); catetos (COSTA et al., 2004), caititus (*Tayassu tayasu*) (CARDOSO, 2009); ratos wistar (MOURA et al., 2006), camundongos (MORAIS et al., 2009) e preás (SANTOS et al., 2012). O número de espermátócito aumentou 26% em guineas na puberdade e o número mantido constante na fase adulta com redução de 3% em adultos. Bellvé et al. (1977) identificaram espermátócitos em diferentes fases de 31%, 21% e 89%, foram respectivamente em leptóteno, zigóteno e paquíteno. Rodrigues e Wettstein (2004) aplicando análise quantitativa semelhante relatou-se que os espermátócitos representaram 5,5% de espermátócito em leptóteno / zigóteno das células totais testicular em porquinho da índia.

O número de células de Sertoli no testículo da cutia e da guinea proliferou entre a pré-puberdade e a puberdade, os nossos resultados não mostraram diferença no número de células de Sertoli em ambos os roedores foi observada ligeira redução de 2% e 3%, nos grupos adultos do porquinho da índia e cutia respectivamente. Em um estudo sobre a análise sobre a duração da espermatogênese e a eficiência espermatogênica entre a Cutia (*Dasyprocta leporina*) e a Paca (*Agouti paca*) o número de células de Sertoli foram respectivamente 204 ± 30 ; 204 ± 13 (COSTA et al., 2010). Em roedor silvestre (*Hylaeamys megacephalus*) foi de $7,82 \times 10^6$ (MELO et al., 2013). Com 1 a 2 anos de idade há aproximadamente 1×10^9 células de Sertoli, já com 4 a 5 anos de idade há $3,6 \times 10^9$ e ficam neste número até os 13 a 20 anos de idade quando começam a diminuir (JOHNSON et al., 1997). Esse fato também foi notado em Cutias, na qual na pré-puberdade o número de células de Sertoli não foi expressivo, aumentando na puberdade e estabilizando na fase adulta. As células de Sertoli são estáveis no animal adulto, durante as diferentes fases da espermatogênese, estas células são utilizadas como ponto de referência para quantificar e avaliar o processo espermatogênico (FRANÇA; RUSSEL, 1998; FRANÇA; HESS, 2005).

O número de células de Leydig no Porquinho- da-índia aumentou em 56% na fase

pré-púbere comparando o mesmo na puberdade. No entanto para cutia, não se observou qualquer diferença demonstrou significativa entre as fases analisadas. Essas células importantes para o estudo quantitativo normal da espermatogênese e outros aspectos funcionais importantes tal como a função de glândulas acessórias do sexo masculino e do comportamento sexual (NUNES et al., 2013). Em estudo sobre a espermatogênese entre a Cutia e a Paca, verificou-se que a Cutia apresentou maior número de células de Leydig que as Pacas (COSTA et al., 2010). Em catetos (*Tayassu tajacu*) o número de células de Leydig foi de 12.8 ± 1.8 . O tamanho e o número de células de Leydig por grama de testículo também são conhecidos, por apresentar em notável variação entre as diferentes espécies de mamíferos (HESS; FRANCA, 2007). Estudos que comparam diferentes espécies de mamíferos demonstraram que a quantidade de testosterona produzida está fortemente correlacionada com a maior parte do retículo endoplasmático liso e mitocôndrias em células de Leydig (MORAIS et al., 2009).

Os dados obtidos, também permitiram observar as características do parênquima testicular através do estudo estereológico do testículo, bem como suas variações de acordo com as idades estabelecidas, sendo expressivo o número de espermátócitos para o Porquinho da índia, já os parâmetros para a cutia, estão dentro dos valores descritos para a maioria dos mamíferos, a quantificação do testículo pela estereologia tem papel fundamental para verificação da morfolgia normal ou de possíveis alterações morfológicas em testículo de humanos como para os animais.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR G.V.; ARAUJO, A. A.; MOURA, A. A. A. Desenvolvimento testicular, espermatogênese e concentrações hormonais em touros Angus. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1629-1638, 2006.
- ALMEIDA, L. M.; WEISS, R. R.; CASTRO, C. S.; BUCHELE, J. Quantificação histológica de ratos wistars tratados com dimetil sulfóxido. **Archive veterinarie Science**, v 5, p. 129-135, 2000.
- ARROYO, M. A. M.; OLIVEIRA, M. F.; SANTOS, P. R. S.; ASSIS NETO, A. C. Ultrastructure of the epididymis and vas deferens of agoutis at different stages of sexual development. **Animal Reproduction Science**, v. 149, p. 273-280, 2014.
- ASSIS NETO, A. C.; MELO, M. I. V.; CARVALHO, M. A. M.; MIGLINO, M. A.; OLIVEIRA, M. F.; MENEZES, D. J. A.; KFOURY JÚNIOR, J. R. Análise qualitativa do estabelecimento da espermatogênese em cutias (*Dasyprocta aguti*) criadas em cativeiros Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 40, p.180-184, 2003.
- BELLVÉ, A. R.; CAVICCHIA, J. C.; MILLETTE, C. F.; O'BRIEN, D. A.; BHATNAGAR, Y. M.; DYM, M. Spermatogenic cells of the prepuberal mouse. Isolation and morphological characterization. **Journal Cell Biology**, v. 74, n. 1, p. 68-85, 1977.
- BERNAL-MAÑAS, C. M.; BELTRÁN-FRUTOS, E.; FERRER, C.; SECO-ROVIRA, V.; PINART, E.; BRIZ, M. D.; BONET, S.; CANTERAS, M.; PASTOR, L. M. Cell proliferation in the seminiferous and epididymal epithelia of *Sus domesticus*. **Theriogenology**, v. 81, n. 5, p. 702-11, 2014.
- CARDOSO, D. L. **Puberdade em caítilus (*Tayassu tajacu*): estudo da espermatogênese em diferentes faixas etárias**. 2009. 73 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Pará, Bélem, PA. 2009.
- CARRETTA, JÚNIOR, M. Avaliação morfofuncional do processo espermatogênico de pacas (*Cuniculus paca* Linnaeus, 1766) adultas. 2008. 61 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. , 2008.
- CASTELO, T. S.; SILVA, A. M.; BEZERRA, L. G.; COSTA, C.Y.; LAGO, A. E.; BEZERRA, J. A.; CAMPOS, L. B.; PRAXEDES, E. C.; SILVA, A. R. Comparison among different cryoprotectants for cryopreservation of epididymal sperm from agouti (*Dasyprocta leporina*). **Cryobiology**, v. 71, n. 3, p. 442-7, 2015.
- COSTA, D. S.; HENRY, M.; PAULA, T. A. R. Espermatogênese de catetos (*Tayassu tajacu*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária**, v. 56, p. 46-51, 2004.

COSTA, D. S.; HENRY, M.; PAULA, T. A. R. Espermatogênese de catetos (*Tayassu tajacu*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária**, v. 56, p. 46-51, 2004.

COSTA, G. M.; LEAL, M. C.; FERREIRA, A. C.; GUIMARÃES, D. A.; FRANÇA, L. R. Duration of spermatogenesis and spermatogenic efficiency in two large neotropical rodent species: the agouti (*Dasyprocta leporina*) and paca (*Agouti paca*). **Journal of Andrology**, v. 31, n. 5, p. 489–499, 2010.

FRANÇA, L. R.; HESS, R. A. Structure of the Sertoli cell. In: SKINNER, M.; GRISWOLD, M. (Ed.). **Sertoli cell biology**. San Diego, CA: Elsevier Academic Press, 2005. p. 19–40.

FRANÇA, L. R.; RUSSELL, L. D. The testis of domestic animals. In: MARTYNEZ, F.; REGADERA, J. (Ed.). **Male reproduction: a multidisciplinary overview**. Madrid, Spain: Churchill Livingstone; 1998. p. 197–219.

GUNDERSEN, H. J. G. Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R Thompson. **Journal of Microscopy**, v. 143, p. 3-45, 1986.

GUNDERSEN, H. J. G. The smooth fractionator. **Journal of Microscopy**, v. 207, p. 191-210, 2002.

GUNDERSEN, H. J.; JENSEN, E. B.; KIÊU, K.; NIELSEN, J. The efficiency Of systematic sampling in stereology--reconsidered. **Journal of Microscopy**, v. 19, pt. 3, p. 199-211, 1999.

HESS, R. A.; FRANÇA, L. R. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: CHENG, C. Y. (Ed.). **(Molecular mechanisms in spermatogenesis.)** [S.l.]: Landes Biocience, 2007. p 1-15.

JOHNSON, L.; BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. Dom; SCRUTCFIELD, W. L. Factors affecting spermatogenesis in the stallion. **Theriogenology**, v. 48, p. 1199-1216, 1997.

JOHNSON, L.; VARNER, D. D.; ROBERT, M. E.; SMITH, T. L.; KEILLOR, G. E.; SCRUTCHFIELD, W. L. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. **Animal Reproduction Science**, v. 61, p. 471-480, 1991.

MACKENZIE, R. B. Public health importance of rodents in South America. **Bull World Health Organ**, v. 47, n. 2, p. 161-9, 1972.

MELO, F. C.; SOUSA, T. P.; COSTA, K. L.; MATTA.; S. L.; MELO.; F. R. Morphometry and stereology of the interstitial compartment in the wild rodent *hylaemys megacephalus* (Rodentia: cricetidae) from central brasil central. **Animal Reproduction Science**, v. 1-2, p. 110-7, 2013.

MORAIS, A. C.; BALARINI, M. K.; LOPES, E. O.; MENEZES, T.P.; QUINTELA, F. M.; MORAIS, D. B.; GOMES, M. D. E. L.; MATTA, S. L. The tubular compartment and the

spermatogenic dynamics of the wild rodent *Oxymycterus nasutus* (Rodentia: Cricetidae). **Animal Reproduction Science**, v.149, n 3-4, p. 249-58, 2009.

MORI, H.; CHRISTENSEN, A. K. Morphometric analysis of Leydig cells in the normal rat testis. **Journal Cell Biology**, v. 84, n. 2, p. 340-5, 1980.

MOURA, C. S.; GUERRA, M. M. P.; SILVA JÚNIOR, V. A.; SILVA, C. G. C.; CAJU, F. M.; ALVES, L. C. Avaliação histomorfométrica do parênquima testicular de ratos adultos tratados com diferentes doses de ivermectina. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v, 58, p. 799-808, 2006.

NUNES, A. K. R.; GOUVEIA, B. B.; MATOS M. H. T. Análise morfológica e funcional do processo espermatogênico em cobaios (*Cavia porcellus*) da pré-puberdade até a pós-puberdade. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, p. 1-7, 2013.

O'DONNELL, L.; ROBERTSON, K. M.; JONES, M. E.; SIMPSON, E. R. Estrogen and spermatogenesis. **Endocrinology Review**, v. 22, n. 3, p. 289-318, 2001.

PADILLA-CARLIN, D. J.; MCMURRAY, D. N.; HICKEY, A. J. The porquinho-da-índia as a model of infectious diseases. **Comparative Medicine**, v. 58, n. 4, p. 324-40, 2008.

RODRÍGUEZ, R. E.; WETTSTEIN, R. M. Quantitative study on porquinho-da-índia spermatogenesis shows a relative high percentage of early meiotic prophase stages. **Anatomic Record**, v. 278, p. 493-504, 2004.

RUSSEL, L. D.; ETTLIN, R. A.; SINHA HIKIN, A. P.; CLEGG, E. D. Mammalian spermatogenesis. In: LONNIE, D. R.; ETTLIN, R. **Histological evolution of the testis**. Clearwater: Cache River Press, 1990. p. 1-40.

SANTOS, R. S.; CARRARAS, T. V. B.; SILVA, C. L.; SILVA, A. R.; OLIVEIRA, M. F.; ASSIS-NETO, A. C. Caracterização morfológica e frequência dos estádios do ciclo do epitélio seminífero em preás (*Galea spixii* Wagler, 1831) criados em cativeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 1, p. 18-24, 2012.

SHORT, R. V. The testis: the witness of the mating system, the site of mutation and the engine of desire. **Acta Psediatric Supplement**, v. 1422, p. 3-7, 1997.

ZHENGWEL, Y.; ROBERT, I.; MCLACHLAN, W. J.; BREMNER, T.; WREFORD, N. G. Quantitative (Stereological) Study of Normal Spermatogenesis in the Adult Monkey (*Macaca fascicularis*). **Journal of Androlog**, v. 18, n. 6, p. 681-687, 1997.

9 ARTIGO 3: ASPECTOS QUALITATIVOS E QUANTITATIVOS DO EFEITO DO LETROZOL SOBRE A MORFOLOGIA TESTICULAR DA PACA (CUNICULUS PACA)

9.1 INTRODUÇÃO

As células de Sertoli apresentam relevantes aspectos na função testicular, a partir do desenvolvimento inicial, da gônada masculina. Apoiam o desenvolvimento das células germinativas e de espermatozóides nos testículos maduros. A capacidade de produção de esperma e volume testicular estão relacionadas com tamanho da população de células de Sertoli (BERNDTSON, 2003). O mecanismo e regulação do desenvolvimento de células de Sertoli em espécies nas quais o período de desenvolvimento testicular ocorre após o nascimento é separado por duas ondas: após o nascimento, uma neonatal e outra pré-púbere, cada uma delas contribuindo para o tamanho final do testículo e para a produção de espermatozóides. No entanto, pouco se sabe sobre a regulação da onda pré-púbere e pós-natal de proliferação de células de Sertoli (BERGER et al., 2014).

A proliferação das células de Sertoli é importante para a reprodução animal, bem como, no sentido de avaliar sua produção durante o desenvolvimento, e suas anormalidades, contribuindo para a Síndrome da disgenesia testicular em humanos (WOHFART-VEJE et al., 2009).

O crescimento testicular compensatório é conhecido por hemicastração. Em varrões o testículo remanescente é estimulado dependendo da idade. Embora quanto mais precoce a idade para se realizar a hemicastração, maior será o peso do testículo remanescente, sendo que este não excede o peso ou produção de esperma equivalente a dois testículos maduros (FORD et al., 2010).

Um mecanismo, que demonstra a proliferação de células de Sertoli envolve a redução de estrógenos testicular através da inibição da enzima aromatase que converte o estrógeno endógeno em estradiol (AT-TARAS et al., 2006).

O uso de inibidores farmacológicos da enzima aromatase que catalisa a síntese da mesma, em suínos, o tratamento contínuo com o inibidor da aromatase, Letrozol, ministrado durante a fase pré-púbere, proporcionou aumento do número das células de Sertoli, no tamanho do testículo e produção de espermatozóides (AT-TARAS et al., 2006; BERGER et al., 2014). O Letrozol é um inibidor da síntese de estrogênios, na qual administrado no

período neonatal em javalis promoveu um aumento aproximadamente de 25% de células de Sertoli e na produção espermática (BERGER et al., 2008).

Considerando a exigência de um modelo de um animal ideal para estudos referentes ao efeito do letrozol sobre a morfologia testicular as pacas são roedores que podem se tornar uma boa alternativa para a pesquisa, colaborando assim com o desenvolvimento de investigações vitais ao homem e aos próprios animais (FIEDLER, 1990; MOCKRIN et al., 2005). Devido a esses relatos nesta pesquisa, analisaremos o efeito do Letrozol na morfologia do testículo da paca (*Cuniculus paca*).

9.2 MATERIAIS E MÉTODOS

9.2.1 Animais

As 12 amostras do testículo de pacas (*Cuniculus paca*) são provenientes de criatório experimental de pacas do setor de animais silvestres da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária da Universidade Estadual Paulista (FCAV-UNESP).

9.2.2 Dosagem Hormonal

Os testículos foram fracionados em fragmentos de 0,1 a 0,2 mg e congelados imediatamente em gelo seco e mantidos em freezer -80°C. Estes fragmentos foram levados para o laboratório/ Universidade da Califórnia, Davis, USA em gelo seco. Foi realizada a homogeneização dos fragmentos testiculares em 0.1 M tampão de fosfato de potássio (PH 7,4) contendo 20% glicerol, 5mM mercaptoetanol e 0,5 mM 4-(2-aminoetil) benzenossulfonilo cloridrato de fluoreto (AEBSF) sobre gelo. As amostras foram sonicadas por três segundos e os debris removidos em centrífuga refrigerada a 4°C a 15.000x g por 10 minutos. As amostras foram alíquotas e armazenadas a -17°C. A concentração de proteína foi determinada em uma

alíquota de cada amostra usando o ensaio de proteína do ácido bicinconínico (BCA kit – Pierce).

ATIVIDADE DA AROMATASE

A atividade da enzima da aromatase foi feita de acordo com (CORBIN et al., 2003); CONLEY et al., 2002)

9.2.3 Letrozol

O Letrozol é vendido em farmácias como Femara- Novartis contendo em cada comprimido revestido 2,5mg de Letrozol, sendo este inviável para fragmentá-lo, e sua dosagem muito alta para os animais, Sendo assim a dosagem foi padronizada de acordo com o peso dos animais utilizados, o peso dos mesmos variou entre 6 – 10kg. Para ambas as dosagens utilizadas neste trabalho foram feitos em farmácia de manipulação em cápsulas transparentes, número-4 e gastrorresistentes equivalente ao comprimido revestido, para que absorção do medicamento ocorra através do estômago sem ser decomposto até chegar ao intestino. As cápsulas foram fornecidas aos animais através da alimentação, na qual foi colocada no interior de uma cápsula gelatinosa no interior de uma fatia de banana. Utilizou-se as seguintes dosagens de 0,15mg/kg nos animais pré-púberes e adultos, 1,0mg/kg para animais púberes e 0,30mg/kg para animais de 2 e 8 meses.

9.2.4 Hemicastração

As pacas foram submetidas à sedação prévia com meperidina (3mg/Kg) associada à midazolan (1mg/Kg) pela via intramuscular e anestesia geral com quetamina (25mg/Kg) e xilazina (0,5mg/Kg). Em seguida foi realizada a orquiectomia unilateral. Foi administrado antibióticos (15.000U/kg de benzilpenicilina benzatina, 7.500U/kg de benzilpenicilina procaína, 7.500U/kg de benzilpenicilina potássica, 6,25mg/kg de sulfato de diidroestreptomicina e 6,25mg/kg de sulfato de estreptomicina) e 0,020mg/kg de buprenorfina para analgesia (OLIVEIRA et al., 2003). Após a recuperação da anestesia foi administrado

comprimido de Letrozol, nas doses de 0,15 mg/kg e 1,0mg/kg, juntamente ao alimento. Após sete dias foi realizada a orquiectomia do testículo remanescente.

9.3 HISTOLOGIA E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Fragmentos testiculares foram coletados e fixados em glutaraldeído 2,5%, lavados em tampão fosfato 0,1M por três vezes durante 10 minutos e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1%. Em seguida foram imersos em solução aquosa de 5% de acetato de uranila à temperatura ambiente por uma hora. Após lavagens em tampão fosfato, os fragmentos foram desidratados em série crescente de álcoois e lavados em óxido de propileno. Por um tempo de 12 a 16 horas, os fragmentos permaneceram sob-rotação a 1:1 de óxido de propileno e resina. Em seguida esta mistura foi trocada por resina pura por 4 a 5 horas. Após este período, foram embebidas em resina pura para confecção dos moldes. Uma vez incluída, os fragmentos permanecem em estufa a 60°C por 72 horas para consolidar a resina. Os blocos foram cortados em ultramicrotomo LEICA ULTRACUT UCT®- cortes semifinos de 0,5µm foram colocados sob lâminas e corando a quente com solução de borato de sódio a 1% em água destilada, contendo 0,25% de azul de toluidina para observação ao microscópio de luz (Eclipse 80 i Nikon, do Centro Avançado em Diagnostico por Imagem- CADI-FMVZ-USP).

Nos blocos de resina foram realizados cortes ultrafinos cerca de 60nm de espessura colhidos em telas de cobre e contrastados com acetato de uranila 2% em água destilada por 5 minutos e nitrato de chumbo 0,5% em água destilada durante 10min. As análises foram obtidas em microscópio eletrônico de transmissão (Morgan 268D, do Centro Avançado em Diagnostico por Imagem- CADI-FMVZ-USP).

9.3.1 Microscopia eletrônica de varredura

Fragmentos fixados em glutaraldeído 2,5% foram lavados em PBS, criofaturados em nitrogênio líquido, desidratados em série crescente de álcoois e seco em ponto crítico. Na sequência, os fragmentos foram aderidos com cola de carbono em stubs metálicos e recobertos com ouro no metalizado EMITECH 550. As amostras foram analisadas em

microscópio eletrônico de varredura - Leo 435 VP do Centro Avançado em Diagnostico por Imagem- CADI-FMVZ-USP.

9.3.2 Imunohistoquímica

Foram realizadas reações imunohistoquímica em cortes histológicos de testículo de paca para PCNA-3-proliferating cell antigen (1:300, clone PC10, sigma, St Louis USA) para verificar as regiões do testículo da paca que apresentavam proliferação celular. Os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol e na segunda passagem de etanol 100% os cortes tiveram a peroxidase endógena bloqueada em 3% H_2O_2 em etanol, em seguida foram tratados com tampão citrato 0.1 M pH 6,0 e irradiados em microondas de uso caseiro, na potência máxima (700mhz) três vezes durante cinco minutos. Depois os cortes foram equilibrados em tampão fosfato salina (PBS) 0,1M pH7, 4 onde o bloqueio de proteínas foi realizado com Kit Dako Protein Block (x 0909, Dako Cytomation, Carpinteira, CA, USA) por 20 minutos.

As inclusões com anticorpos primários foram realizados em câmara úmida overnight à 4°C. Após esse período, os cortes foram lavados com PBS e incubados com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase Kit Dako LSAB (K 0690, Dako Cytomation, Carpinteira, CA, USA) por 45minutos, seguido de streptavidina do mesmo Kit também por 45min. A reação foi visualizada pela adição do revelador DAB (revelador líquido DAB + substrate chromogens system Dako Cytomation, Carpinteira CA, USA) por 5-7 minutos, seguido de contra coloração com hematoxilina e montagem em permomount (Dako Cytomation, Carpinteira CA, USA), observação ao microscópio de luz Eclipse 80 i Nikon, do Centro Avançado em Diagnostico por Imagem- CADI-FMVZ-USP.

GATA-4-Imunolocalização do fator de transcrição o GATA-4 foi realizado como escrito utilizando o kit Vectastain Elite ABC (VectorLaboratories, Burlingame, Calif) com ligeiras modificações. Secções espessas (25 μ m) foram desparafinadas, reidratadas e Incubadas num tampão de citrato de sódio (desmascaramento de antigénio, H-3300; Vector Laboratories) durante 15 minutos, seguidos por bloqueio da atividade de peroxidase endógena em 3% De peróxido de hidrogénio em metanol durante 10 minutos. As secções foram lavado 3 vezes (5 minutos cada vez) em tampão Tris 50 mM Com NaCl a 1,5% pH 7,6 (TB) antes do bloqueio com 1% de normal Soro de coelho (Vector Laboratories) durante 20 minutos na salaTemperatura (RT). As secções foram incubadas em anticorpo policlonal, GATA-4,

diluição 1: 200 em TB; Santa Cruz Biotecnologias, Santa Cruz, Calif a TA durante 2 horas, lavou-se em TB 3 vezes e incubou-se Com anticorpo secundário biotinilado de coelho anti-cabra. Seções foram lavadas novamente 3 vezes em TB antes da incubação com um complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC, Vector Laboratories) À temperatura ambiente durante mais 40 minutos. NovaRed (Vector Laboratories) foi utilizado para visualizar a imunorreactividade antes da lavagem em água, desidratação em Citri solv (Fisher HealthCare, Houston, Tex), e vedação com montagem Coversafe (American MasterTech Scientific, Inc, Lodi, Calif.).

9.3.3 Reação Ácido Periodico de Schiff (P.A.S)

As lâminas com cortes desparafinados foram desidratados em xilol I e II por 15 minutos, e em série decrescente de álcoois do 100% ao 70%, em seguida foram colocados na água por 10 minutos, no Ácido Periódico de Schiff por 25 minutos, lavados três vezes em água destilada e colocados no Reativo de Schiff por 30min, em seguida em água por 30 segundos e na água e na água sulforosa por dois minutos, por três vezes respectivamente, foram colocados hematoxilina por 1minuto, lavados em água por 5 minutos, diafanizados e montagem em permomount (Dako Cytomation, Carpinteira CA, USA).

10 ESTUDO QUANTITATIVO

10.1 ESTIMATIVA DO VOLUME TOTAL DO TESTÍCULO $V(T)$

O volume total dos testículos foi estimado dividindo-se o peso seco do órgão, em gramas, pela densidade média do tecido testicular: $1,04\text{g/cm}^3$ (MORI; CHRISTENSEN, 1980), de acordo com a fórmula: $V(t) := m(t) / 1,04$.

10.2 AMOSTRAGEM DO TESTÍCULO

A amostragem do testículo foi baseada no princípio do “Smooth fractionator” (GUNDERSEN, 2002). Posteriormente à estimativa do volume total dos testículos, as fatias foram seccionadas em barras, blocos e por fim em fragmentos de diferentes tamanhos e organizadas em ordem crescente de tamanho. Os fragmentos foram amostrados seguindo o princípio da amostragem sistemática, uniforme e aleatória (SURS) (Figura 9).

Figura 9 - Amostragem do testículo

Fonte: (SIMÕES, L. S., 2016)

Legenda: secções transversais ao longo do eixo do testículo, obtemos de 8-12 fatias e selecionamos randomicamente as fatias, barras e fragmentos (blocos), que são colocados em ordem crescente de tamanhos.

10.3 NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS DE SERTOLI, CÉLULAS DE LEYDIG, ESPERMATOGÔNIAS, ESPERMATÓCITOS E ESPERMÁTIDES

Os fragmentos escolhidos foram incorporados em Araldite 502 (Electron Microscopy Sciences) e cortados em 0,5 μm em ultramicrotomo (LEICA ULTRACUT UCT®). As secções foram recolhidas em lâminas e coradas com azul de toluidina. A fracção de amostragem de secções (sfsc) foi escolhida por SURS e a fracção de amplificação de área foi calculada como o comprimento / deslocamento da frame no eixo x e eixo y na área de interesse da secção (sfa). O princípio do fractionator físico (GUNDERSEN, 1986) foi utilizado para estimar o número total de células de Sertoli, Leydig, espermatogônia, espermatócitos e espermátides. Este princípio baseia-se na amostragem aleatória de uma prévia da fração conhecida de uma estrutura e, em seguida, contagem das partículas nesta fracção. Este método consiste em multiplicar o número de partículas (Q-) pelo inverso das fracções amostradas: sfs (fatias), sfb (barras), sff (fragmentos), sfsc (secções) e sfa (área). Foram utilizadas duas secções físicas paralelas, com uma distância conhecida. A primeira secção é a secção de referência ea segunda, a secção de look-up. A distância entre as secções "referência" e "look-up" foi de 4 μm (Figura 10).

Figura 10 - Imagem referência, look up e frames para contagem.

Fonte: (SIMÕES, L. S., 2016)

Legenda: Fotomontagem, em (A) de cortes semifinos seriados corados com azul de toluidina de testículo de paca, seta indica o núcleo das células de Sertoli, selecionados na área de inclusão, em (B), representa o desaparecimento do núcleo das células de Sertoli. Notam-se na figura dois sentidos do dissector e referência e look up

10.4 DENSIDADE DE VOLUME DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS $V_v(T)$ E DENSIDADE DE VOLUME DO INTERSTÍCIO $V_v(I)$

As secções foram amostradas de acordo com o princípio SURS. Em cada secção amostrada foi utilizado um sistema de pontos. Os pontos que tocavam os túbulos seminíferos e o interstício foram contados. O $V_v(T)$ foi estimado dividindo-se o total de pontos que tocaram o túbulo seminífero pelo total de pontos que tocavam todo o testículo. E o $V_v(I)$ foi estimado dividindo-se o total de pontos que tocavam o interstício pelo total de pontos que tocava todo o testículo. A fórmula para calcular a densidade de volumes será:

$$V_v(TS) := \sum p(TS) / \sum p(P)$$

$$V_v(TI) := \sum p(TI) / \sum p(P)$$

Onde: $\sum p(TS)$: somatório de pontos que tocarem o túbulo seminífero.

$\sum p(TI)$: somatório de pontos que tocarem o tecido intersticial.

$\sum p(P)$: somatório de pontos que tocaram todo o tecido testicular.

10.5 VOLUME DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS (TS) E DO TECIDO INTERSTICIAL (TI)

O volume total dos túbulos seminíferos será calculado multiplicando-se o $V_v(TS)$ pelo volume do testículo $V(T)$.

$$V(TS) := V_v(TS) \times V(T)$$

O volume total do tecido intersticial será calculado multiplicando-se $V_v(TI)$ pelo volume do testículo $V(T)$

$$V(TI) := V_v(TI) \times V(T)$$

11 ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi teste não paramétrico, Kruskal-Wallis. Os resultados quantitativos foram apresentados como média seguida pelo coeficiente de variação. Diferença entre os grupos foi considerada significativa para $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada no software estatístico Minitab Express

12 RESULTADOS QUALITATIVO

Os testículos de paca controle, dos animais pré-púbere e adulto que receberam 0,15mg/kg de Letrozol. O epitélio seminífero continha todas as gerações de células germinativas correspondentes às fases do mesmo nas fases pré-púbere, púbere e adulto da paca (Figura 11 A, B, C, D, E e F).

Nos animais pré-púberes observou-se na microscopia de luz, células de Sertoli, espermatócitos e espermátide arredondada (Figura 11 A). Na Microscopia eletrônica de transmissão notam-se células de Sertoli e espermatogônia (Figura 11 D).

No grupo de animal púbere os testículos eram semelhantes ao grupo anterior, com células em diferentes estágios de desenvolvimento. As espermatogônias entre as mesmas puderam ser observadas as células de Sertoli, que tinham extensões citoplasmáticas entremeando a linhagem espermatogênica, espermatócitos, espermatide na forma arredondada e alongada, com presença de espermatozoides, caracterizando a puberdade (Figura 11 B). À microscopia eletrônica de transmissão observa-se espermatócitos em paquíteno e diplóteno e espermatide em diferentes estágios de diferenciação (Figura 11 E).

Nos animais adultos apresentou o epitélio seminífero diferenciado com presença de células de Sertoli, espermatogônia, espermatócito e espermatide, caracterizando o epitélio germinativo diferenciado com presença de espermatozóides no lúmen dos túbulos seminíferos (Figura 11 C). Notou-se também, à microscopia de transmissão, processo de alongamento da espermátide e espermiação (Figura 11 F).

Em maior aumento nos observamos à integridade normal do testículo basal (controle) da paca púbere visto, observou-se o epitélio germinativo da paca púbere íntegro, diferenciado, com presença de célula de Sertoli, espermatócitos, espermatogônia, espermátide e espermatozoides no lúmen do túbulo seminífero (Figura 12 A e B). Nos testículos de paca púbere tratados com 1mg/kg, de Letrozol, observaram desorganização do epitélio germinativo, células com características apoptóticas com presença de vacuolização intraepitelial e núcleos em picnose (Figura 12 C e D).

Na análise imunohistoquímica pela marcação do PCNA para verificação de proliferação celular, ocorreu marcação das células germinativas (espermatogônia), em ambas as dosagens de Letrozol (figura 13 C e D) Na Microscopia eletrônica de transmissão pode-se comprovar este fato na qual nota-se a divisão celular ocorrendo em espermatócitos (Figura 13

E e D). Imunohistoquímica Gata-4 secções seriadas de 25 µm de testículo de paca (*Cuniculus paca*) aos 2 e 8 meses de idade para identificar células de Sertoli caracterizadas por núcleos alongados perpendiculares ou paralelos à membrana basal e dispostos na periferia do túbulo seminífero (Figura 13A: A e B) células germinativas caracterizadas, citoplasma significativo, não marcado pelo anticorpo GATA- 4 e freqüentemente localizado centralmente nesta idade (Figura 13A: D e E).

Foram observados que, as células apresentaram P.A.S positivo em ambos os testículos tanto no testículo basal (Controle) como no testículo tratado (Letrozol) nas fases pré-púbere, púbere e adulto. Porém a marcação de P.A.S positivas foram mais evidentes nos testículos tratados com Letrozol (Figura 14 A e B).

À microscopia eletrônica de varredura para o animal pré-púbere, nota-se o epitélio germinativo em diferenciação celular, e com luminação dos túbulos seminíferos (L) (Figura 15 A e B); No animal púbere o epitélio germinativo apresentou-se diferenciando com presença de espermatozoides, evidenciando a puberdade (Figura 15 B e C). Neste grupo, nos testículos tratados com 1mg/kg, observou-se uma desorganização do epitélio germinativo, e um aumento do tamanho das células, germinativas (Figura 15 D e E). No animal adulto, o epitélio germinativo mostrou-se diferenciado, com presença de espermatozoides (Figura 15 E e F).

Figura 11 - Aspecto histológico e da microscopia eletrônica de transmissão do testículo pré-púbere, púbere e adulto da paca.

Fonte: (SIMOES, L. S., 2016)

Legenda: Em A corte histológico de testículo de paca pré-púbere, notou-se epitélio germinativo em diferenciação celular com presença de espermatogônia (Esp), células de Sertoli (S), espermatócitos (Espe), espermátide arredondada (seta), célula de Leydig (L). Em B, paca púbere observou-se presença de espermatogônia (Esp), células de Sertoli (S), espermatócitos (Espe), espermátide arredondada (seta), espermátide alongada (seta tracejada). Em C, paca adulta, evidenciou-se células de Sertoli (S), espermátide alongada (seta tracejada) e espermatozoides (E). Coloração Azul de Toluidina. Em D microscopia eletrônica de transmissão de testículo de paca pré-púbere, F com células de Sertoli (S) e espermatogônia (Esp); Em B testículo de paca púbere notar presença da diferenciação de espermatócitos nas fases de diplóteno (DL) e paquíteno (PQ); Em F diferenciação das espermátide alongadas em espermatozóides no lúmen do túbulo seminífero.

Figura 12 - Microscopia de luz corte- semifino- paca púbere

Fonte (SIMOES, L.S., 2016)

Legenda: Em A e B morfologia normal testículo basal (controle), paca púbere, com o epitélio germinativo diferenciado em (A); e (B), diferenciação das espermatídes em espermatozóides. Em C e D morfologia do testículo tratado (Letrozol), em (C), células com vacúolos e núcleos em picnose, (seta) em (D) diferenciação das espermatídes em espermatozóides, com a diferenciação do epitélio germinativo alterada

Figura 13 Paca Púbere, Inunohistoquímica e microscopia eletrônica de transmissão.

Fonte (SIMOES, L. S., 2016)

Legenda: Em A e B imunohistoquímica em cortes de testículo de paca púbere marcado pelo anticorpo PCNA caracterizando proliferação celular (setas). Em E e F microscopia eletrônica de transmissão confirmando a proliferação celular com demonstrado a divisão celular das células germinativas.

Figura 13- A: Imunohistoquímica Gata-4

2

Fonte (SIMÕES, L.S., 2016)

Secções seriadas de paca de testículo de paca (*Cuniculus paca*) aos 2 meses de idade. (A e B) e testículo de paca de 8 meses de idade. Secções de imuno-histoquimicamente marcada por anticorpo contra GATA-4 para identificar células de Sertoli. As setas apontam para duas das muitas células de Sertoli nestas imagens, caracterizadas por núcleos alongados perpendiculares ou paralelos à membrana basal e dispostos na periferia do túbulo seminífero. Cabeças de seta apontam para células germinativas caracterizadas por núcleos redondos, citoplasma significativo, não marcado pelo anticorpo GATA- 4 e freqüentemente localizado centralmente nesta idade.

Figura 14 - Reação Ácido Periodico de Schiff(P.A.S)

Fonte (SIMOES, L. S., 2016)

Legenda: Em A imagem positiva do Reação Ácido Periodico de Schiff (P.A.S) em túbulos seminíferos de paca ausente de Letrozol e para aqueles que receberam 0,15mg\kg; Em B imagem positiva do reativo de schiff (P.A.S) nota-se marcação do P.A.S mais intenso para os animais que tomaram Letrozol de 1mg\kg.

Figura 15 - Imagem Microscopia eletrônica de varredura

Fonte (SIMOES, L. S., 2016)

Legenda Em A e B Paca pré--púbere observamos o epitélio germinativo (Ep. G) em diferenciação celular, e luminação dos túbulos seminíferos (L), em C e D Paca púbere controle, mostra a integridade do epitélio germinativo diferenciado (Ep. G), espermatozoides no lúmen do túbulo seminífero (E); em (C); em (D) podemos visualizar os tipos celulares como células de Sertoli (S) espermatocitos (ESP.) e espermatozoides (E), no lúmen do túbulo seminífero, em E Paca púbere tratada com 1mg/kg de Letrozol demonstrando uma desorganização celular do epitélio germinativo (Ep. G), e presença de espermatozoides (E) no lúmen do túbulo seminífero (L), em F aumento no tamanho das células germinativas, (setas) Em G e H Paca adulta epitélio germinativo diferenciado (Ep. G.) com a presença de espermatozoides no lúmen testicular (E).

13 RESULTADO QUANTITATIVO

13.1 DOSAGEM HORMONAL

A dosagem hormonal no testículo1 (Basal) adulto foi de 3,82 (pg\mg de proteína), no pré-púbere 2,07 (pg\mg de proteína), no testículo 2 (pós-Letrozol) foi no adulto 1,82 (pg\mg de proteína), no pré-púbere 1,03 (pg\mg de proteína), com a dosagem de 0,15mg durante sete dias respectivamente . Com redução de estradiol, para ambas as pacas foram de aproximadamente 50%. (Gráfico 1).

Fonte: (SIMÕES, L. S., 2016)

ATIVIDADE DA AROMATASE

A média da atividade da aromatase no testículo de paca de 2 meses controle foi 0,46 e o testículo 2 meses letrozol foi de 0,25; no testículo de paca de 8 meses controle foi 0,51 e o testículo de paca de 8 meses letrozol foi de 0,34 e o testículo letrozol de 16 meses foi de 0,47 (Gráfico 1A.).

Gráfico 1A: Média da atividade da aromatase em paca (*Cuniculus paca*)

Legenda: Testículo 2 C- 2meses controle; Testículo 2 L- 2meses letrozol; Testículo 8 C- 8 meses controle; Testículo 8 L- 8 meses letrozol; Testículo16 L 16 meses letrozol

Fonte (SIMÕES, I.S. 2016)

A distribuição da variação da enzima aromatase em paca (*Cuniculus paca*), os valores foram baixos, que não há diferença nos valores embora o testículo de paca de 8 meses letrozol e o testículo de paca de 16 meses letrozol demonstraram ter mais atividade da enzima aromatase do que o testículo de paca de 2 meses controle e o testículo de 2 meses letrozol esses demonstraram uma inibição de 50% (Gráfico 1B)

Gráfico 1B : Distribuição da variação da enzima aromatase em paca (*Cuniculus paca*)

Fonte (SIMÕES, I.S. 2016)

Legenda: Testículo 2 C- 2meses controle; Testículo 2 L- 2meses letrozol; Testículo 8 C- 8 meses controle; Testículo 8 L- 8 meses letrozol; Testículo 16 L 16 meses letrozol

13.2 VOLUME TESTICULAR

O volume testicular no testículo 1 (Basal) no pré-púbere foi de $6,74\text{cm}^3$ e $9,83\text{cm}^3$, no testículo 2 (pós-Letrozol), no púbere testículo 1 (basal) foi de $9,84\text{cm}^3$ e no testículo 2 (pós-Letrozol) $10,57\text{cm}^3$ e no adulto testículo 1 (basal) foi de $9,84\text{cm}^3$ e no testículo 2 (pós-Letrozol) foi de $11,76\text{cm}^3$ (Gráfico 2 A).

13.3 NÚMERO DE CÉLULAS DE SERTOLI

O número de células de Sertoli no testículo 1 (basal) adulto foi de $24,5 \times 10^6$, no testículo 2 (pós-Letrozol) foi no adulto $28,2 \times 10^6$; No púbere no testículo 1 (basal) foi de $24,3 \times 10^6$ no

testículo 2 (pós-Letrozol) foi de $28,6 \times 10^6$; No pré-púbere no testículo 1 (basal) foi de $21,5 \times 10^6$ no testículo 2 (pós-Letrozol) pré-púbere foi $31,2 \times 10^6$ (Gráfico 2 B).

13.4 NÚMERO DE CÉLULAS DE LEYDIG

O número de células de Leydig no testículo 1 (basal) adulto foi de $7,0 \times 10^6$, no testículo 2 (pós-Letrozol) foi no adulto $8,2 \times 10^6$; No púbere no testículo 1 (basal) foi de $6,5 \times 10^6$ no testículo 2 (pós-Letrozol) foi de $8,6 \times 10^6$; No pré-púbere no testículo 1 (basal) foi de $6,1 \times 10^6$ no testículo 2 (pós-Letrozol) pré-púbere foi $7,3 \times 10^6$ (Gráfico 2 C).

Gráfico 2 - Em A: volume do testículo (cm^3), Em B: Número de células de Sertoli $\times 10^6$, Em C: Número de células de Leydig $\times 10^6$.

Fonte (SIMOES, L. S., 2016)

13.5 NÚMERO DE ESPERMATOGÔNIAS

O número de espermatogônia no testículo1 (basal) adulto foi de $27,5 \times 10^6$, no testículo 2 (pós-Letrozol) foi no adulto $29,5 \times 10^6$; No púbere no testículo 1 (basal) foi de $28,9 \times 10^6$ no testículo 2 (pós-Letrozol) foi de $29,7 \times 10^6$; No pré-púbere no testículo 1 (basal) foi de $24,1 \times 10^6$ no testículo 2 (pós-Letrozol) pré-púbere foi $31,2 \times 10^6$ (Gráfico 3 A).

13.6 NÚMERO DE ESPERMATÓCITOS

O número de células de espermatócitos no testículo1 (basal) adulto foi de $33,3 \times 10^6$, no testículo 2 (pós-Letrozol) foi no adulto $40,4 \times 10^6$; No púbere no testículo 1 (basal) foi de

$32,1 \times 10^6$ no testículo 2 (pós-Letrozol) foi de $43,0 \times 10^6$; No pré-púbere no testículo 1 (basal) foi de $28,2 \times 10^6$ no testículo 2 (pós-Letrozol) pré-púbere foi $38,4 \times 10^6$ (Gráfico 3 B).

13.7 NÚMERO DE ESPERMÁTIDES

O número de espermátides no testículo1 (basal) adulto foi de $40,6 \times 10^6$, no testículo 2 (pós-Letrozol) foi no adulto $55,4 \times 10^6$; No púbere no testículo 1 (basal) foi de $39,9 \times 10^6$ no testículo 2 (pós-Letrozol) foi de $51,8 \times 10^6$; No pré-púbere no testículo 1 (basal) foi de $28,4 \times 10^6$ no testículo 2 (pós-Letrozol) pré-púbere foi $45,7 \times 10^6$ (Gráfico 3 C).

Gráfico 3 - Em A: Número de espermatogônia $\times 10^6$, em B: número de espermátocitos $\times 10^6$, em C: número de espermátides $\times 10^6$

A

B

C

Fonte: (SIMOES, L. S., 2016)

14 DISCUSSÃO

O estrógeno é essencial para a função da espermatogênese. A compreensão obtida neste trabalho sobre o efeito do Letrozol no testículo da paca (*Cuniculus paca*), sugeriu que a inibição da enzima aromatase com Letrozol na dosagem de 0,15mg/kg resultou em um aumento no número das células de Sertoli, refletindo sobre as demais células testiculares, comparando o testículo basal (controle) com o testículo tratado (Letrozol). O epitélio germinativo permaneceu íntegro, sendo este dado importante para a reprodução. Para o animal púbere, também ocorreu aumento no número de células de Sertoli, semelhante ao descrito anteriormente. O desenvolvimento do epitélio seminífero mostrou-se com alterações morfológicas, proliferação celular, com células germinativas com características apoptóticas, com presença de vacúolos e núcleos em picnose. Infere-se que estes dados possam ser úteis para o estudo da Síndrome da Disgenesia testicular em humanos. Nossos resultados corroboram com Wohfart-Veje et al. (2009), que relataram que a compreensão sobre a proliferação das células de Sertoli é importante para a reprodução animal, bem como, avaliar durante o desenvolvimento das anormalidades das células de Sertoli, contribuindo assim para a Síndrome da disgenesia testicular em humanos.

No atinente à distribuição da variação da enzima aromatase em paca (*Cuniculus paca*), os valores encontrados nesta pesquisa foram baixos, e demonstraram que não há diferença entre ela embora o testículo de paca de 8 meses tratadas com letrozol e o testículo de paca de 16 meses tratada com letrozol, tivessem demonstrado maior atividade da enzima aromatase, quando comparado ao testículo de paca de 2 meses de idade (controle) e o testículo da paca de 2 meses de idade tratada com letrozol. Esses demonstraram uma inibição de 50%. Em uma pesquisa sobre a inibição da atividade da aromatase testicular, foi observado durante 7 meses em javalis, que ocorreu aumento da aromatase aos 2 e 3 meses de idade (At-Taras et al., 2006.)

A coloração Ácido Periódico-Schiff ou coloração P.A.S é um método de coloração utilizado em histologia e patologia. Este método foi primariamente usado para identificar glicogênio em tecidos. A reação do ácido periódico seletivamente oxida os resíduos de glicose, produzindo aldeídos que reagem com o reagente de Schiff, e produz em uma cor púrpura-magenta. Em nosso trabalho ocorreu marcação de P.A.S positiva tanto para o testículo basal (controle) nas fases pré-púbere, púbere e adulto da paca. Porém para os

testículos tratados com Letrozol a marcação de P.A.S positivo foram mais evidentes. Assim tais resultados apoiam-se na pesquisa realizada em ratos tratados por um tempo prolongado com Letrozol, na qual grânulos de lipofucsina foram encontrados em maior número do que nos animais controle (KONDAREWICZ et al., 2011). Alterações similares foram observadas em testículo de camundongo e ratos após tratamento com agentes anti-espermatogênico (Ex nitrofurazona, ou gossipol ácido tetra-acético e baixas doses de cádmio) (HOFFER, 2003; SINGH et al., 2003). Estes dados corroboram com Kondarewicz et al. (2011), enquanto que nas pacas pré-púberes, e adultos que receberam 0,15mg/kg a integridade morfológica dos túbulos seminíferos foram mantidas.

A redução de estrogênio endógeno e hemicastração interagem sinergicamente para aumentar a proliferação de células de Sertoli (BERGER et al., 2014). Nossos resultados foram pertinentes. Em uma pesquisa realizada para investigar a influência de hemicastração no desenvolvimento de testículos de coelho, os autores verificaram que o desenvolvimento espermatogênico do testículo remanescente, não foi alterado devido à hemicastração (TERRY; BERNDTSON, 1993). No entanto o número de células de Sertoli aumentou e hipertrofia compensatória nos testículos de javalis, após a hemicastração em diferentes idades (LUNSTRA et al., 2003). Em outro estudo feito sobre a proliferação das células de Sertoli para definir o intervalo de resposta à um inibidor de estrógeno em javalis ao autores, relataram que o número de células de Sertoli aumentou durante 1, 3 e 5 semanas, quando ocorreu a primeira onda de proliferação das células de Sertoli (BERGER et al., 2013).

No nosso trabalho o aumento das células de Sertoli, foi evidente nas fases pré-púbere e púbere nos testículos tratado (Letrozol). A proliferação celular das células de Sertoli em javalis machos neonatais é potencialmente dependente de andrógenos. Com o emprego a partir de uma semana de idade de flutamida (um receptor de andrógenos) houve aumento das células de Sertoli, compatível com a hemicastração (BERGER et al., 2014). Tal resultado é condizente com os dados apresentados na presente pesquisa, pois a hemicastração juntamente com o emprego do Letrozol contribuíram para aumento do número de células de Sertoli. A redução de estrogênio endógeno e hemicastração interagem sinergicamente para aumentar o número de células de Sertoli no suíno (BERGER et al., 2014). Em uma pesquisa sobre a função estrógeno endógena na maturação de células de Sertoli na fase pré-púbere em javalis, os resultados foram consistentes com a hipótese de que a inibição da aromatase contínua provoca atraso na maturação das células de Sertoli em javalis (BERGER, 2012).

Os dados do presente trabalho, são pertinentes aos dados da literatura, sugerindo que estrógeno endógeno é essencial para a espermatogênese e que, a hemicastração com a redução de estrógeno aumentou o número de células de Sertoli. Houve porém diminuição severa de estrógeno, acompanhada da presença de células com características apoptóticas, sendo estes dados importantes para a reprodução animal.

Considerando os resultados da paca mostrou-se modelo eficiente para ser aplicada a futuros estudos sobre a Síndrome da disgenesia testicular em humanos.

REFERÊNCIAS

- AT-TARAS, E. E.; BERGER, T.; MC CARTHY, M. J.; CONLEY, A. J.; NITTA-ODA, B. J.; ROSER, J. F. Reducing estrogen synthesis in developing boars increases testis size and total sperm production. **Journal Andrology**, v. 27, p. 552–559, 2006.
- BERGER, T.; McCARTHY, M.; PEARL, C. A.; AT-TARAS, E.; ROSER, F. J.; CONLEY, A. Reducing endogenous estrogens periods affects reproductive tract development and sperm production in postpuberal boars. **Animal Reproduction Science**, v. 109, p. 218-235, 2008
- BERGER, A.; CONLEY, A. J.; KLOMPENBERG, M. V.; ROSER, J. F.; HOVEY, R. C. Increased testicular Sertoli cell population induced by an estrogen receptor antagonist. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 366, p. 53–58, 2013.
- BERGER, T.; CONLEY, A. Reduced endogenous estrogen and hemicastration Interact synergistically to increase porcine sertoli cell proliferation. **The Society for The Study of Reproduction**, v. 90, n. 5, p. 114, 2014.
- BERGER, T.; KENTFIELD, L.; ROSER, J. F.; CONLEY, A. Stimulation of sertoli cell proliferation: defining the response interval to an inhibitor of estrogen synthesis in the boar. **Reproduction**, v. 14, p. 523-529, 2012.
- BERNDTSON, W. E.; IGBOLI, G.; PARKER, W. G. The numbers of Sertoli cells in mature Hoestein bulls and their relationship to quantitative aspects of spermatogenesis. **Biology of Reproduction**, v. 37, p. 60-67, 2003.
- CONLEY, A.; MAPES, S.; CORBIN, C. J.; GREGER, D.; GRAHAM, S. Structural determinants of aromatase cytochrome p450 inhibition in substrate recognition. **Molecular Endocrinology**, v. 16, P. 1456-1468.
- CORBIN, C.J.; MORAN, FM.; VIDAL, J.D.; FORD, J.J.; WISE, T.; MAPES, S.M.; NJAR, V.C.; BRODIE, A. M.; CONLEY, A.J. Biochemical assessment of limits to estrogen synthesis in porcine follicles. **Biology of Reproduction**, v 81, p. 388-395.
- FIEDLER L. A. Rodents as a food source, In: DAVIS, L. R.; MARSH, R. E. (Ed.). **Vertebrate pest conference proceedings collection**. Davis: University of California Press, 1990. p. 148-155.
- FORD, J. J.; ROHRER, G. A.; NONNEMAN, D. J.; LUNSTRA, D. D.; WISE, T. H. Association of allelic variants of thyroid-binding globulin with puberty in boars and responses to hemicastration. **Animal Reproduction Science**, v. 119, p. 228-234, 2010.
- GUNDERSEN, H. J. G. Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R Thompson. **Journal Microscopy**, v. 143, p. 3-45, 1986.

GUNDERSEN, H. J. G. The smooth fractionator. **Journal of Microscopy**, v. 207, p. 191-210, 2002.

HOFFER, A. P. Effects of gossypol on the seminiferous epithelium in the rat: a light and electron microscope study. **Biology of Reproduction**, v. 28, n. 4, p. 1007–1020, 2003.

KONDAREWICZ, A.; KOLASA, A.; ZAWISLAK, B.; BARANOWSKA-BOSIACKA, I.; MARCHLEWICZ, M.; WENDA-ROZEWICKA, L.; WISZNIEWSKA, B. Testis morphology in rats chronically treated with Letrozole, an aromatase inhibitor. **Folia Histochem Cytobiol**, v. 49, p. 677–684, 2011.

LUNSTRA, D. D.; FORD, J. J.; CHRISTENSON, R. K.; ALLRICH, R. D. Changes in Leydig cell ultrastructure and function during pubertal development in the boar. **Biology of Reproduction**, v. 34, p. 145-58, 2003.

MOCKRIN, M. H.; BENNET, E. L.; LABRUNA, D. T. **Wildlife farming: viable alternative to hunting in tropical forests?** New York: Wildlife Conservation Society, 2005. (WCS Working Paper n. 23).

MORI, H.; CHRISTENSEN, A. K. Morphometric analysis of Leydig cells in the normal rat testis. **Journa Celular of Biology**, v. 84, n. 2, p. 340-5, 1980.

SINGH, S. K.; CHAKRAVARTY, S. K. S. Antispermatogetic and antifertility effects of 20,25-diazacholesterol dihydrochloride in mice. **Reproduction Toxicology**, v. 17, p. 37-44, 2003.

TERRY, L.T.; BERNDTSON, W. E. Peso testicular, número de células de Sertoli, produção diária de espermatozoide e esperma. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 952-957, 1993.

WOHLFAHRT-VEJE, C.; MAIN, K. M.; SHAKKEBAEK, N. E. Testicular syndrome of adult reproductive problems. **Clinical Endocrinology**, v. 71, p. 459-465, 2009

15 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os dados qualitativos das amostras testiculares do Porquinho-da-índia, Cutia e de Paca, não demonstraram diferenças, durante o desenvolvimento nas fases pré-púbere, púbere e adulto. Desta forma, tais resultados contribuem e agrega novos subsídios morfológicos para outras espécies, viabilizando a utilização do porquinho da índia, da cutia e da paca no campo de investigação da biologia reprodutiva masculina.
- Os métodos estereológicos permitiram quantificar parâmetros, sem hipóteses de forma, tamanho, orientação ou distribuição das partículas contadas. O método utilizado neste projeto provou ser imparcial e confiável para ser aplicado em outros estudos de reprodução.

À distribuição da variação da enzima aromatase em paca (*Cuniculus paca*), os valores encontrados nesta pesquisa foram baixos, e demonstraram que não há diferença entre elea embora o testículo de paca de 8 meses tratadas com letrozol e o testículo de paca de 16 meses tratada com letrozol, tivessem demonstrado maior atividade da enzima aromatase. Quando comparado ao testículo de paca de 2 meses de idade (controle) e o testículo da paca de 2 meses de idade tratada com letrozol demonstrou uma redução de 50%.

À Imunohistoquímica com marcação Gata-4 aos 2 e 8 meses de idade para identificar células de Sertoli foram caracterizadas por núcleos alongados perpendiculares ou paralelos à membrana basal e dispostos na periferia do túbulo seminífero e células germinativas caracterizadas, citoplasma significativo, não marcado pelo anticorpo GATA- 4 e freqüentemente localizado centralmente nesta idade .

~ O estrógeno é essencial para a função da espermatogênese. Assim os resultados obtidos neste trabalho sobre o efeito do Letrozol no testículo da paca (*Cuniculus paca*), sugerem que a inibição da enzima aromatase mediante a utilização do Letrozol na dosagens de 0,15mg/kg, resulta em um aumento no número das células de Sertoli, refletindo sobre as demais células testiculares, comparando o testículo basal (controle) com o testículo tratado (Letrozol). O epitélio germinativo permaneceu íntegro, sendo este dado importante para a

reprodução. Para o animal púbere, obteve-se um aumento no número de células de Sertoli. O desenvolvimento do epitélio seminífero mostrou-se com alterações morfológicas, proliferação celular, com células germinativas com características apoptóticas, com presença de vacúolos e núcleos em picnose infere-se que estes dados possam ser úteis para o estudo da Síndrome da Disgenesia testicular em humanos.

REFERÊNCIA

AS CURIOSAS RELAÇÕES ENTRE ANDROGÊNIOS E ESTROGÊNIOS NA MULHER. Disponível <[www. Nelsonginecologia.med.br/andrestrowomen.post.htm](http://www.Nelsonginecologia.med.br/andrestrowomen.post.htm)> acesso em 20 de outubro de 2016.

AMANN, R. P. Physiology and endocrinology. In: Mc KINKON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine reproduction**. Pennsylvania: Lea & Febier. 1993. cap. 77, p. 658-688.

ASSIS NETO, A. C.; MELO, M. I. V.; CARVALHO, M. A. M.; MIGLINO, M. A.; OLIVEIRA, M. F.; MENEZES, D. J. A.; KFOURY JÚNIOR, J. R. Análise qualitativa do estabelecimento da espermatogênese em cutias (*Dasyprocta aguti*) criadas em cativeiros. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 180-184, 2003.

AT-TARAS, E. E.; BERGER, T.; MC CARTHY, M. J.; CONLEY, A. J.; NITTA-ODA, B. J.; ROSER, J. F. Reducing estrogen synthesis in developing boars increases testis size and total sperm production. **Journal Andrology**, v. 27, p. 552–559, 2006.

BASCOM, K. F.; OSTERUD, H. L. Quantitative studies of the testicle. II. Pattern and total tubule length in the testicles of certain common mammals. **The Anatomical Record**, v. 31, p. 159–169, 1925.

BERGER, T.; CONLEY, A. Reduced endogenous estrogen and hemicastration Interact synergistically to increase porcine sertoli cell proliferation. **The Society for The Study of Reproduction**, v. 90, n. 5, p. 114, 2014.

BERGER, T.; MCCARTHY, M.; PEARL, C. A.; AT-TARAS, E.; ROSER, F. J.; CONLEY, A. Reducing endogenous estrogens periods affects reproductive tract development and sperm production in postpuberal boars. **Animal Reproduction Science**, v. 109, p. 218-235, 2008.

BEU, C. C. L.; ORSI, A. M.; STEFFANNI, M. A.; SILVA, M. P.; VICENTINI, C. A. A rede testicular da cobaia: Observações morfológicas e histoquímicas. **Revista Ciência Biomédica**, v. 18, p. 33-45, 1997.

BORGES, E. M.; BRANCO, E.; LIMA, A. R.; LEAL, M. L.; MARTINS, L. L.; REIS, G. C. A.; CRUZ, C.; MACHADO, F. R. M.; MIGLINO, M. A. Morfologia e topografia dos órgãos genitais masculinos externos da paca (*Cunicullus paca* Linnaeus, 1766). **Biotemas**, v. 26, n. 4, p. 209-220, 2013.

BRAUNSTEIN, G. D. Testículos. In: GREENSPAN, F. S.; GARDNER, D. G. Endocrinologia básica e clínica. Tradução de Carlos Henrique Cosendey et al.. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. p. 389-415.

CARRETA-JUNIOR, M. **Avaliação morfofuncional do processo espermático de pacas (*Cuniculus paca*, Linnaeus, 1799) adultos viçosa-MG**. 2008. 61 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2008.

CONLEY, A.; HINSHELWOOD, M. Mammalian aromatases. **Reproduction**, v. 121, p. 685-695, 2001.

COOPER, G.; SCHILLER, A. L. **Anatomy of porquinho-da-índia**. Cambridge Mass: Havard University Press, 1975. 417 p.

CREASY, D. M.; FOSTER, P. M. D. Male reproductive system. In: HASCHEK, W. M.; ROUSSEAU, C. G. (Ed.). **Handbook of toxicologic pathology**. San Diego: Academic Press, 2002. p. 829-889.

CUTIA, disponível < criadouro.oncapintada.org.br/animais/mamíferos/cutia > acesso em 20 de outubro de 2016

DADOUNE, J. E.; DEMOULIN, A. Reduced seminal parameters associated with environmental Structure and functions of testis. 1993. Esta referência trata-se do que? Um livro???? Falta dados para normalizar esta referências

DUNNUM, L. J.; JORGE SALAZAR-BRAVO. Molecular systematics, taxonomy and biogeography of the genus *Cavia* (Rodentia: Caviidae). **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 48, n. 4, p. 376-388, 2010.

FERREIRA, A. C. S.; GUIMARÃES, D. A. A.; LUIZ RAMOS, R. S.; SOUZA, P. C.; BATISTA, C. R.; OHASHI, O. M. Reproductive developmental phases of male agouti (*Dasyprocta* sp) raised in captivity determined by quantitative analysis of spermatogenesis cells. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 28, n. 4, p. 196-201, 2004

FRANÇA, L. R.; GARCIA, H. C. Célula de Sertoli. In: CARVALHO, H. F.; BUZATO, B. C. **Células**. Barueri, SP: Editora Manole, 2005. cap. 24, p. 302-325.

FRANÇA, L. R.; RUSSELL, L. D. The testis of domestic animals. In: MARTÍNEZ-GARCÍA, F.; REGADERA, J. (Ed.). **Male reproduction** : a multidisciplinary overview. Madrid: Churchillm livingstone, 1998. p. 197-219.

GRADELA, A.; MARTINS, L. F. T.; NUNES, A. K. R.; SANTOS, J. M.; LINS, T. L. B.; MENEZES, V. G.; FRANZO, V. S. Morphologic and morphometric aspects of the vesicular gland during development in porquinho-da-índias (*Cavia porcellus*). Anais 8th BIENNIAL MEETING ASSOCIATION APPLIED ANIMAL ANDROLOGY, 8., 2012. , Vancouver, Canada. Proceedings... Vancouver, Canada, 2012. "Quality Assurance and Biosecurity in the Globalized Andrology Lab" Disponível em <<http://www.ivis.org/proceedings/aaaa2012/GradeLA.pdf>>. Acesso em: inserir a data que você acessou o site por exemplo: 12 abr. 2016.

GUIMARÃES, D. A.; MOREIRA, D.; VALE, W. G. Determination of the reproductive cycle (*Dasyprocta prymnolopha*) through the smear diagnosis. **Acta Amazonica**, v. 27, p. 55-64, 1997.

GYTON, C. A.; HALL, J. E. Tratado de fisiologia médica. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. p. 998-999.

HUHTANIEMI, I.; TOPPARI, J. Endocrine, paracrine and autocrine regulation of testicular steroidogenesis. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 37, p. 35-54, 1995.

JOHNSON, L. Spermatogenesis. In: CUPPS, P. T. **Reproduction in domestic animals**. San Diego: Academic Press, 1991. cap. 5, p. 174 -220.

JUNQUEIRA, J. C.; CARNEIRO, J. Sistema reprodutor masculino. In: _____. **Histologia básica: texto e atlas**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. p. 323-334.

KEIMAN, D. G.; EISENBERG, J. F.; MALINIAK, E. Reproductive parameters and productivity of caviomorphs rodents. In: EISENBERG, J. F. **Vertebrate ecology in the northern neotropics**. Washington: Smithsonian institution, 1979. p. 173-1983.

KENAGY, G. J., TROMBULAK, S.C. Size of mammalian testes in relation to body size. **Journal Mammal**, v. 67, p. 1-22, 1986.

LUNENFELD, E.; HULEIHEL, M. Regulation of spermatogenesis by paracrine \autocrine testicular factors. **Asian Journal of Andrology**, v. 6, n. 3, p. 259-268, 2004.

MIRAND, E. ; SHADLE, A. Gross anatomy of the male reproductive system of the porpucine. **Jornal of Anatomy**, v. 34, n. 2, p. 210-220, 1953.

MOCKRIN, M. H.; BENNET, E. L.; LABRUNA, D. T. **Wildlife farming: a viable alternative to hunting in tropical forests?** New York: Wildlife Conservation Society, 2005. 32 p. (WCS Working Paper n. 23).

MOLINA, P. E. **Fisiologia endócrina**. 2. ed. São Paulo: Mc Graw Hill, 2007.

MOLLINEAU, W. N.; ADOGWA, A. O.; JASPER, N.; YOUNG, K.; GARCIA, G. W. The gross anatomy of the male reproductive system of a neotropical rodent: the agouti (*Dasyprota leporina*). **Anatomy, Histology e Embriology**, v. 35, p. 47- 52, 2006.

MONDOLFI, E. La laca o Paca. **Defensa de la Naturaleza**, v. 2, n. 5, p. 4-16, 1972.

MOREIRA, J. R.; MACDONALD, D. W. The testis of capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). **Journal of Mammalogy**, v. 78, n. 4, p. 1096-1100, 1997.

NORMAN, A. W.; LITWACK, G. Hormones of the adrenal medulla. In: _____. **Hormones**. 2. ed. San Diego: Academic, 1997. p. 319-339.

O'DONNELL, L.; ROBERTSON, K. M.; JONES, M. E.; SIMPSON, E. R. Estrogen and spermatogenesis. **Endocrinology Review**, v. 22, n. 3, p. 289-318, 2001.

OLIVEIRA, F. S. de. **Diagnóstico e acompanhamento ultra-ssonográficos da prenhez em pacas (Agouti paca, Linnaeus, 1766)**. 2002. 131 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal SP, 2002.

OLIVEIRA, F. S.; MACHADO, M. R. F.; CANOLA, J. C.; CAMARGO, M. H. B. 2007 Uniparidade em pacas criadas em cativeiro (Agouti paca, Linnaeus, 1766). **Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia**, v. 59, n. 2, p. 387-384, 2007.

OLIVEIRA, J. A.; BONVICINO, C. R. Ordem Rodentia, In: REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. (Ed.). **Mamíferos do Brasil**. Londrina: Imprensa da UEL, 2006. p. 347-406.

OSBORNE, C. K. Aromatase inhibitor in relation to other forms of endocrine therapy for breast câncer. **Endocrinology Related Câncer**, v. 6, p. 271-6, 1999.

PACA, disponível < animais. cultura.mix. com \informações\ roedores, paca > acesso em 20 de outubro de 2016.

PENTIKAINEN, V.; ERKKILÄ, K.; SUOMALAINEN, L.; PARVINEN, M.; DUNKEL, L. Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis in vitro. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 85, p. 2057-2067, 2000.

PIMENTA, C. A.; FERREIRA, J. M. M.; MORAES, J. C. F.; BENTO, C. L. R. Desenvolvimento testicular corporal em touros de corte. **Revista Brasileira de Reprodução animal**, v. 8, n. 1, p. 27-33, 1984.

PORQUINHO-DA-ÍNDIA, ORIGEM WIKIPÉDIA, a enciclopédia livre. Disponível < [https:// wikipedia. Org/wiki/porquinho-da-índia](https://wikipedia.org/wiki/porquinho-da-índia) > acesso em 20 de outubro, 2016

RANA, K. K.; BILASPURI, G. S. Growth and biometry of testicular traits in immature Murrah buffalo. **Indian Journal of Animal Science**, v. 69, n. 8, p. 583-584, 1999.

REGULAÇÃO HORMONAL DOS SISTEMAS REPRODUTORES. Disponível < Wikiciências. Casadas. Ciências.org\ wiki\ index.php\regulação_hormonal dos sistemas-reprodutores > acesso 20 de outubro de 2016.

ROBERTSON, K. M.; O'DONNELL, L.; JONES, M. E.; MEACHEM, S. J.; BOON, W. C.; FISHER, C. R.; GRAVES, K. H.; MCLACHLAN R. I.; SIMPSON, E. R. Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp 19) gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 96, p. 7986-7991, 1999.

ROOSEN-RUNGE, E. C.; GIESEL JR., L. O. Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. **American Journal of Anatomy**, v. 87, n. 1, p. 1- 30, 1977.

RUSSEL, L. D.; ETTLIN, R. A.; SINHA HIKIN, A. P.; CLEGG, E. D. Mammalian spermatogenesis. In: RUSSELL, L. D.; ETTLIN, R. A.; SINHA HIKIN, A. P.; CLEGG, E. D. **Histological evolution of the testis**. Clearwater Florida: Cache River Press, 1990.

SHARPE, R. M.; MCKINNELL, C.; KIVLIN, C.; FISHER, J. S. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. **Reproduction**, v. 125, p. 769-784, 2003.

SIMÕES, L. S.; RICCI, R. E. G.; FAVARON, P. O.; SASAHARA, T. H. C.; BARRETO, R. S. N.; BORGHESI, J.; MIGLINO, M. A. Análise ultraestrutural da espermatogênese do porquinho-da-Índia (*Cavia porcellus*), **Pesquisa veterinária Brasileira**, v. 36, n. 1, p. 89-94, 2016.

SPOTORNO, A. E.; MARIN, J. C.; MANRIQUEZ, G.; VALLADARES, J. P.; RICO, E.; RIVAS, C. Ancient and modern steps during the domestication of porquinho-da-índias (*Cavia porcellus* L.). **Journal of Zoology**, v. 270, p. 57-62, 2006.

STANBENFELD, G. H.; EDQVIST, L. Processos reprodutivos do macho. In: Falta autor do livros. **Dukes- fisiologia dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. cap. 35, p. 603-614, 1996.

THÜRLIMANN, M. D.; CHAIR, APARNA KESHAVIAH, SC.M., ALAN S. COATES, M.D., HENNING MOURIDSEN, M.D., LOUIS MAURIAC, M.D., JOHN F. FORBES, F.R.A.C.S., ROBERT PARIDAENS, M.D., PH.D., MONICA CASTIGLIONEGERTSCH, M.D., RICHARD D. GELBER, PH.D., MANUELA RABAGLIO, M.D., IAN SMITH, M.D., ANDREW WARDLY, M.D., KAREN N. PRICE, B.S., AND ARON GOLDBIRSH, M.D. falta título do artigo. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 26, p. 2747-2757, 2005.

WELLS, S. A.; SANTEN, R.T.; LIPTON, A.; HAAGENSEN JR., D. E.; RUBY, E. J.; HARVEY, H.; DILLEY, W. G. Adrenalectomy with aminoglutethimide clinical studies in post menopausal patients with metastatic breast câncer. **Annals Surgery**, v. 187, p. 187-475, 1978.

WILDT, D. E. Lions, Tigers, and Pandas, Oh My. **Journal of andrology**, v. 26, p. 452-454, 2005.

WOHEFAHRT-VEJE, C.; MAIN, K. M.; SHAKKEBARK, N. E. Testicular dysgenesis syndrome: foeta origem of adult reproductive problems clinical. **Endocrinology**, v. 71, p. 459-465, 2009.

ANEXO A

Análise ultraestrutural da Espermatogênese do Porquinho- da- Índia (*Cavia Porcellus*)²

Luciana S. Simões, Rose E.G. Rici, Phelipe O. Favaron *, Taís Harumi de Castro Sasahara, Rodrigo S.N. Barreto , Jessica Borghesi and Maria A. Miglino

1. INTRODUÇÃO

Os roedores, por sua diversidade, biologia e fisiologia, tornaram-se úteis para várias pesquisas. No presente tem sido utilizado como modelos homólogos ao homem para várias doenças, tais como: diabetes juvenil, tuberculose, escorbuto, assim como para o entendimento da biologia da reprodução e suas complicações durante a gravidez (MEYRS, 2000). Existem aproximadamente 235 espécies de roedores, distribuídas em 71 gêneros, correspondendo a 36% da fauna brasileira (OLIVEIRA; BONVICINO, 2006). Dados a cerca da biologia e fisiologia da reprodução em mamíferos ainda hoje são escassos, inclusive aqueles relacionados aos parâmetros reprodutivos mais elementares das espécies silvestres, cuja relevância comparativa e evolutiva torna-se essenciais para as políticas atuais de conservação (WILDT, 2005).

As implicações da caracterização das fases do desenvolvimento sexual, como os aspectos relacionados à atividade espermatogênica são essenciais para o conhecimento da biologia reprodutiva de qualquer espécie, independente do interesse econômico (ANANN; SCHANBACHER, 1983). A função reprodutiva é um fator de vital compreensão tanto para estabelecimento de sistemas apropriados de manejo quanto para o uso de espécies como modelo animal em estudos a cerca da fisiologia reprodutiva. Neste sentido, o conhecimento da espermatogênese, definido como um processo sincrônico e regular de diferenciação celular pelo qual uma espermatogônia tronco é gradativamente diferenciada numa célula haploide altamente especializada, o espermatozoide (FRANÇA; RUSSELL, 1998) é importante para a identificação das causas potenciais de infertilidade e subfertilidade e compreensão dos processos que definem a capacidade de produção espermática (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A espermatogênese ocorre nos túbulos seminíferos, os quais, na maioria das espécies, é o principal componente do parênquima testicular. Considerando-se que a massa testicular

² Trabalho publicado na Revista Pesq. Vet. Bras. 36(Supl.1):89-94, junho 2016 em anexo A

reflete diretamente a produção espermática, a variação na proporção de túbulos seminíferos entre as diversas espécies pode ser considerada como um dos principais fatores responsáveis pela diferença observada na eficiência da produção espermática. Embora a atividade espermatogênica seja relativamente constante em animais sexualmente maduros, não sazonais, ela apresenta variações expressivas entre as espécies e entre as linhagens ou raças (FRANÇA; RUSSELL, 1998).

Por ser extremamente sensível a tratamentos quimioterápicos, hormonais e à temperatura e pelo fato de que a recuperação da produção espermática é dependente da regeneração das células tronco, a espermatogênese tem sido estudada em diversas espécies, como os roedores, pois sua extraordinária capacidade reprodutiva em uma grande variedade de condições climáticas os torna modelos interessantes (MEYRS, 2000), garantindo-lhes significativa importância em pesquisas biomédicas e testes laboratoriais. Dentre elas, o guinea-pig tem sido utilizado para este propósito desde o final do século 18, com importância crescente nas pesquisas científicas, pois seu longo período de gestação (59-72 dias), ovulação espontânea e corpo lúteo ativo o tornam um excelente modelo animal para o estudo da reprodução humana (SUZUKI et al., 2003). A fisiologia do sistema reprodutor masculino do porquinho-da-índia é pouco estudada, destacando-se estudos voltados na quantificação dos tipos celulares nas diferentes fases sexuais (HESS; FRANÇA, 2007) e nas glândulas acessórias (VÁSQUEZ; DEL SOL, 2010, GRADELA et al., 2012), bem como os efeitos eletromagnéticos sobre o testículo (FARKHAD, et al., 2007) e mais recentemente os efeitos do flúor e alumínio na expressão Star e P450 no testículo (DONG et al., 2016).

Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar um estudo detalhado sobre a espermatogênese no guinea-pig com base em análises ultraestruturais do testículo de *C. porcellus* nas idades de 30, 45 e 90 dias de idade, a fim de gerar subsídios para um melhor entendimento dos parâmetros reprodutivos e viabilizar sua utilização como modelo animal em estudos reprodutivos.

2. 1 MATERIAL E MÉTODOS

2.1.1 ANIMAIS

Foram utilizados 12 testículos de porquinho-da-índia com idades de 30, 45 e 90 dias

pós- nascimento (n = 4 para cada idade), com peso médio de 248g, 262g e 582g, respectivamente. Os animais foram adquiridos em petshop comercial nas respectivas idades e mantidos na FMVZ-USP. Para coleta das amostras, os animais foram anestesiados nas seguintes dosagens: ketamina 75-100mg/kg intraperitoneal (IP) e xilazina 10mg/kg IP, para então serem realizadas as orquectomias. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP) (Protocolo número 8735070714)

2.1.2 HISTOLOGIA E MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Fragments testiculares foram coletados e fixados em glutaraldeído 2,5%, lavados em tampão fosfato 0,1M por três vezes durante 10 minutos e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1%. Em seguida foram imersos em solução aquosa de 5% de acetato de uranila à temperatura ambiente por uma hora. Após lavagens em tampão fosfato, os fragmentos foram desidratados em série crescente de álcoois e lavados em óxido de propileno. Por um tempo de 12 a 16 horas, os fragmentos permaneceram sob rotação a 1:1 de óxido de propileno e resina. Em seguida esta mistura foi trocada por resina pura por 4 a 5 horas. Após este período, foram embebidas em resina pura para confecção dos moldes. Uma vez incluída, os fragmentos permanecem em estufa a 60^oc por 72 horas para consolidar resina. Os blocos foram cortados em ultramicrotomo LEICA ULTRACUT UCT®- cortes semifinos de 0,5µm foram colocados sob lâminas e corando a quente com solução de borato de sódio a 1% em água destilada, contendo 0,25% de azul de toluidina para observação ao microscópio de luz (Eclipse 80 i Nikon, do Centro Avançado em Diagnostico por Imagem- CADI-FMVZ-USP).

Nos blocos de resina foram realizados cortes ultrafinos cerca de 60nm de espessura colhidos em telas de cobre e contrastados com acetato de uranila 2% em água destilada por 5 minutos e citrato de chumbo 0,5% em água destilada durante 10min. As análises foram obtidas em microscópio eletrônico de transmissão (Morgagni 268D, do Centro Avançado em Diagnostico por Imagem- CADI-FMVZ-USP).

2.1.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Fragmentos fixados em glutaraldeído 2,5% foram lavados em PBS, crioaturados em nitrogênio líquido, desidratados em série crescente de álcoois e secos em estufa 37°C. Na sequência, os fragmentos foram aderidos com cola de carbono em stubs metálicos e recobertos com ouro no metalizador emitech 550. As amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura - Leo 435 VP do Centro Avançado em Diagnostico por Imagem- CADI-FMVZ-USP.

3.0 RESULTADOS

Nos animais com 30 dias de idade, observou pela microscopia de luz a presença de que espermatogônias clara e escura no epitélio seminífero (Figura A e B) e iniciando a diferenciação de espermátócito em leptóteno, zigóteno e paquíteno (Fig. A e B) nas quais foram confirmadas pela microscopia eletrônica de transmissão (Figura C, D). Na microscopia eletrônica de varredura, observou-se proliferação do epitélio germinativo, (Figura 1E e F).

Nos animais de 45 dias de idade notou-se proliferação e diferenciação do epitélio germinativo, espermátócitos, espermatogônias e de células de Sertoli (Fig. 2A e B). Na microscopia eletrônica de varredura o epitélio germinativo em diferenciação celular pôde ser caracterizado (Figura 2C e D). Pela microscopia eletrônica de transmissão, visualizou-se espermátócitos em divisão meiótica (Figura 2E), em paquíteno e diplóteno (Fig. 2F), assim como a diferenciação da espermátide a partir da segunda divisão meiótica, a qual mostrou núcleo esférico e cromatina condensada próxima ao envelope nuclear evidenciando a formação do acrossoma e organização nuclear (Figura 3A). Foram visualizadas formação de vesículas pró acrossômicas (Figura 3B). Com o desenvolvimento da espermatogênese, o núcleo tornou-se ovalado e menor, e o citoplasma começou a se desprender do mesmo, nesta fase deu-se o início do alongamento da espermátide (Figura 3C).

Nos animais de 90 dias de idade na microscopia eletrônica de varredura o epitélio seminífero mostrou epitélio germinativo diferenciado (Ep. G), abertura luminal (L) dos túbulos seminíferos, com presença de espermatozóides (S) (Fig. 4A). Na microscopia de luz foi observado presença de espermátide (Sp) do túbulo seminífero, com presença de espermatozoides (S) (Fig. 4B). Na microscopia eletrônica de transmissão, constatou-se presença de espermátide (Sp) em diferenciação, abertura luminal (L) do túbulos seminífero, com presença de espermatozóides (S) (Fig.4C).

Figura: 1 Imagens do testículo de porquinho-da-índia (*Cavia porcellus*) aos 30 dias

Fonte: (SIMÕES, L. S. 2016)

Legenda: Em A e B: notar abertura luminal dos túbulos seminíferos (L), espermatócitos em diplóteno (Dp) e paquíteno (Pq), espermatogônia do tipo A (seta tracejada), espermatogônia do tipo B (cabeça de seta), células de Sertoli (S). Coloração: azul de toluidina. Em C e D: Microscopia eletrônica de transmissão evidenciando: espermatócito em leptóteno (setas), zigóteno (Zg), paquíteno (Pq), espermatogônia (setas tracejadas) e células de Sertoli (S). Em E e F: Microscopia eletrônica de varredura: Notar o epitélio germinativo (GEp) em diferenciação e abertura luminal dos túbulos seminíferos(L)

Figura 2: Imagens do testículo de porquinho-da-índia (*Cavia porcellus*) aos 45 dias.

Fonte: (SIMÕES, L. S. 2016)

Legenda: Em A e B: Em A e B: notar espermatogônia (setas) e espermatócitos em diploteno(Dp), paquíteno (Pq), células de Sertoli (S) e espermatíde arredondada (AR). Coloração: azul de toluidina. Em C e D: microscopia eletrônica de varredura mostrando túbulos seminíferos com luminação (L) e diferenciação do epitélio seminífero germinativo (GEp). Em E e F: microscopia eletrônica de transmissão. Notar: espermatócito em divisão meiótica (seta), espermatócito em paquíteno (Pq), diploteno (Dp) e pré-leptóteno (PL).

Figura: 3 Imagens: Microscopia eletrônica de transmissão caracterizando a divisão meiótica da espermátide do porquinho-da-índia aos 45 dias

Fonte: (SIMÕES, L. S. 2016)

Legenda: Em A: condensação e alongamento do acrossoma (A) e núcleo (N). Em B: notar vesículas pró acrossômicas (setas). Em C: espermátide em processo de alongamento. A = acrossoma e N = núcleo.

figura 1: Imagens do testículo de porquinho-da-índia (*Cavia porcellus*) aos 90 dias

Fonte: (SIMÕES, L.S. 2016)

Legenda: Em A: Microscopia eletrônica de varredura: Notar: epitélio germinativo diferenciado (Ep. G) abertura luminal (L) dos túbulos seminífero, com presença de espermatozóides (S). Em B: Microscopia de Luz: Observar presença de espermátide (Sp) em diferenciação, abertura luminal (L) do túbulos seminífero, com presença de espermatozóides (S). Coloração Hematoxilina- Eosina (HE). Em C: Microscopia eletrônica de transmissão: Notar presença de espermátide (Sp) em diferenciação, abertura luminal (L) do túbulos seminífero, com presença de espermatozóides (S).

4.0 DISCUSSÃO

Os resultados desta investigação sugerem que o porquinho-da-índia (*Cavia porcellus*) apresenta características de interesse experimental para estudos reprodutivos e moleculares, devido à representação dos estágios meióticos: leptóteno, zigóteno e paquíteno, assim como ocorre em outros roedores e no homem. Em humanos e camundongos, a maturação das células germinativas do testículo é subdividida em três fases: proliferativa (espermatogônias), meiótica (espermátocitos) e espermiogênica (espermátides), onde todas culminam na liberação de espermatozóides maduros (espermição) (SANTOS et al., 2013). Duas classes de espermatogônias têm sido identificadas, as do tipo A e B. Estas são submetidas a várias divisões mitóticas antes de entrarem na prófase da meiose como espermátocitos pré-leptótenos, que se maturam em leptóteno, zigóteno e paquíteno (fases da meiose). Ao final da prófase meiótica, estas células são submetidas a divisões finais para formar espermátides haplóides que farão parte da espermiogênese, durante a qual o núcleo das células germinativas é remodelado e compactado, como observado nos espermatozóides adultos (O'DONNELL et al., 2001).

Mediante análise qualitativa do progresso da espermatogênese em cutias (*Dasyprocta aguti*), foram avaliados os aspectos de luminação dos túbulos seminíferos, presença de espermátocitos primários, presença de espermátides e formação dos primeiros estágios do ciclo do epitélio seminífero. O período desde o nascimento até os cinco meses de idade correspondeu à fase impúbere; dos seis aos oito meses de idade a fase de transição da pré-puberdade a puberdade; dos nove aos dez meses de idade à fase da puberdade; e dos doze aos quatorze meses de idade à fase da pós-puberdade. A puberdade da cutia (*Dasyprocta aguti*) ocorreu em animais a partir dos sete meses de idade, e o estabelecimento da puberdade foi constatado em todos os animais estudados aos nove meses de idade (ASSIS-NETO et al., 2003). Em nossos estudos observou-se a diferenciação da espermátide em porquinho-da-índia a partir dos 45 dias e a presença de espermatozoides aos noventa 90 dias.

Foi investigado o desenvolvimento pós-natal do testículo em roedores da raça chinchilla (*Chinchilla chinchilla*) para determinação do período proliferativo e apoptose celular. Verificou-se que o período de diferenciação de gonócitos para espermatogônias foi aos 50 dias de idade e o período de proliferação e apoptose dessas células, bem como o início da espermatogênese aos 60 dias. O desenvolvimento testicular pós-natal nesta espécie foi

próximo ao descrito para o homem, evidenciando-se aos 50 dias, o que a favorece para uso como modelo em pesquisas no campo da biologia reprodutiva (VIGUERAS-VILASEÑOR et. al., 2013). No porquinho-da-índia aos 30 dias neste estudo, observou-se epitélio germinativo com células de sustentação constituído por espermatogônias: clara (tipo: A) e escura (tipo B), na microscopia de luz; porém a diferenciação dos espermatócitos foi visualizada na microscopia de transmissão em leptóteno e zigóteno, a partir dos 45 dias com o início da diferenciação do epitélio germinativo em espermatogônia, espermatócitos em divisão meiótica nas fases meióticas paquíteno e diplóteno. Aos 90 dias, constatou-se diferenciação completa do epitélio germinativo com a presença de espermatozóides no lúmen do túbulo seminífero.

Finalmente, tal como demonstrado por Nunes et al (2013), o *Cavia porcellus* em fase pós- púbere 2 são um modelo vantajoso para estudos sobre o processos de reconhecimento homólogo a prófase da meiose, bem como outros temas relacionados com características reprodutora masculina.

Nossos resultados reiteram os dados da literatura no que diz a respeito à relação e sequência das fases de diferenciação dos diferentes tipos celulares presentes no epitélio seminífero durante o desenvolvimento sexual no porquinho-da-índia. Dessa forma, podemos concluir que nos animais de 30 dias foi visualizada a diferenciação dos espermatócitos em leptóteno, zigóteno e paquíteno. Durante a puberdade ocorreu à diferenciação do epitélio germinativo e formação do acrossoma, porém não foram evidenciados espermatozóides, evidenciando que o início da puberdade ocorre a partir dos 45 dias de idade. O desenvolvimento e maturação das células de Sertoli e de Leydig caracterizaram a fase de puberdade e a maturidade sexual, a qual foi evidente aos 90 dias de idade. Desta forma, novos subsídios morfológicos são fornecidos e discutidos para o que é sabido para outras espécies, a fim de promover o entendimento dos parâmetros reprodutivos desta espécie, viabilizando sua utilização como modelo animal no campo da biologia reprodutiva masculina.

REFERÊNCIAS

- ASSIS NETO, A. C.; MELO, M. I. V.; CARVALHO, M. A. M.; MIGLINO, M. A.; OLIVEIRA, M. F.; MENEZES, D.J.A.; KFOURY JÚNIOR, J. R. Análise qualitativo estabelecimento da espermatogênese em cutias (*Dasyprocta aguti*) criadas em cativeiros Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, v. 40, p.180-184, 2003.
- AMANN, R. P.; SCHANBACHER, B. D. Physiology of male reproduction. **Journal of Animal Science**, v. 57, p. 380-403, 1983.
- DONG, C.; CAO, J.; CAO, C.; HAN, Y.; WU, S.; WANG, S.; WANG, J. Effects of fluoride and aluminum on 189 expressions of StAR and P450scc of related steroidogenesis in porquinho-da-índias' testis. *Chemosphere*, v.147, p.345-51, 2016.
- FARKHAD, S. A.; ZARE, S.; HAYATGEIBI, H.; QADIRI, A. Effects of extremely low frequency electromagnetic 191 fields on testes in porquinho-da-índia. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, v.10, p.4519-4522, 2007.
- FRANÇA, L. R.; RUSSELL, L. D. The testis of domestic animals. In: Marty´nez F, Regadera J, eds. *Male Reproduction: A Multidisciplinary Overview*. Madrid, Spain: Churchill Livingston; 1998, p.197–219.
- FRANÇA, L. R.; HESS, R. A. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium . In molecular mechanismsin spermatogenesis (ed. Cheng C. Y), Landes Biociencia, 2007, p. 1-15, 2007.
- JUNQUEIRA.; CARNEIRO. Sistema reprodutor masculino. *Histologia Básica*, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2013, p.323-334.
- GRADELA, A.; MARTINS, L. F. T.; NUNES, A. K. R.; SANTOS, J. M.; LINS, T. L. B.; MENEZES, V.G.; FRANZO, V. S. Morphologic and morphometric aspects of the vesicular gland during development in porquinho-da-índias (*Cavia porcellus*). *Anais 8th Assoc. applied to animal andrology*, 2012.
- MYERS, P. 2000.“Rodentia”. *Animal Diversity Web*.University of Michigan Museum of Zoology.Disponívelem<<http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Rodentia.html>> Acessado em 20 mar. 2015.
- NUNES, A. K. R.; GOUVEIA, M. H. T.; M.; PIRES, I.C.; FRANZO, V.S.; Faria, M. D.; GRADELA, A. Análise morfológica e funcional do processo espermatogênico em cobaios (*Cavia porcellus*) da pré- 187 puberdade até a pós-puberdade. *Pesquisa. Veterinária Brasileira*. v. 186, p. 33:1-7, 2013.
- OLIVEIRA, J. A.; BONVICINO, C. R. Ordem Rodentia, In: REIS, N.R.; PERACCHI, A.L.;PEDRO, W.A.; LIMA, I.P. (Eds.). *Mamíferos do Brasil*. Imprensa da UEL, Londrina, 2006, pp. 347-406.
- O'DONNELL, L.; ROBERTSON, K. M.; JONES, M. E.; SIMPSON, E. R. Estrogen and spermatogenesis. *Endocrine Reviews*, v. 22, n.3, p. 289-318, 2001.

SUZUKI, O.; KOURA, M.; NOGUCHI, Y.; TAKANO, K.; YAMAMOTO.; MATSUDA, J. Optimization of superovulation induction by human menopausal gonadotrophin in porquinho-da-índias based on follicular waves and FSH-receptor homologues. *Molecular Reproduction and Development*, v. 64, p. 219-225, 2003.

NUNES, A. K. R.; GOUVEIA, B. B.; MATOS M. H. T. Análise morfológica e funcional do processo espermatogênico em cobaios (*Cavia porcellus*) da pré-puberdade até a pós-puberdade. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v., n. 33 p.1-7, 2013.

SANTOS, R.S.; CARRARAS, T.V.B.; SILVA, C. L.; SILVA, A. R.; OLIVEIRA, M. F.; ASSIS-NETO, A. C. Caracterização morfológica e frequência dos estádios do ciclo do epitélio seminífero em preás (*Galea spixii* Wagler, 1831) criados em cativeiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 31, nº 1, p.18-24,2013.

VÁSQUEZ, B.; DEL SOL, M. Estudio morfológico de la próstata y glándulas vesiculares de Cobayo (*Cavia porcellus*). *Int. Journal of Morphology*, v. 28, p. 1301-1307, 2010.

VIGUERAS-VILASEÑOR, R. M.; MONTELONGO- SOLIS, P.; CHÁVEZ-SALDAÑA,M.D.; GUTIERREZ,O.; ARTEAGA-SILVA,M.; ROJAS-CASTAÑEDA, J.C. Post natal testicular development in the chinchilla rabbit. *Acta Histochemica*, v. 115, n 7, p. 677-85, 2013.