

Morfogênese do testículo de embriões e fetos de vacas da raça nelore (*Bos taurus indicus*)

José Octavio JACOMINI¹
Cesar Roberto ESPER²
Elmo Gomes DINIZ¹
Rogerio Chaves VIEIRA¹
Marcelo Emilio BELETTI³

1 - Laboratório de Reprodução Animal da Faculdade Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia - MG
2 - Universidade do Estado de São Paulo, Jaboticabal - SP
3 - Laboratório de Histologia da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia - MG

Correspondência para:
JOSÉ OCTAVIO JACOMINI
Faculdade de Medicina Veterinária
Universidade Federal de Uberlândia
Av. Pará, 1720
38408-283 - Uberlândia - MG
jojacomini@ufu.br

Recebido para publicação: 12/04/2005
Aprovado para publicação: 07/02/2007

Resumo

Este estudo teve como objetivo acompanhar o processo de desenvolvimento testicular desde a fase indiferenciada até sua completa formação. Embriões e fetos de vacas da raça nelore (*Bos taurus indicus*) foram obtidos em frigoríficos próximos à cidade de Uberlândia, Minas Gerais. As gônadas dos fetos e os embriões foram fixados em bouin e processados para microscópica óptica convencional. A gônada foi observada primeiramente em um embrião de 1,0 cm de comprimento. Em embriões com 2,5 cm a presença da albugínea permite a identificação do sexo. A espessura média da albugínea variou de 29,08 a 558,46 μ m. Gradativamente, observou-se aumento da vascularização da albugínea e do parênquima. O mediastino encontrava-se localizado centralmente. Houve uma diminuição no espaço ocupado pelos cordões testiculares de 63,71 para 41,99% do volume total dos testículos. O seu diâmetro variou de 31,68 a 48,80 mm. O diâmetro das células germinativas (e dos seus núcleos) foi de 12,27(6,65) a 16,95 (14,21) μ m, respectivamente. A quantidade de células germinativas por corte transversal de cordão diminuiu de um máximo de 2,80 para 0,76. O número total de células germinativas foi de 16 no princípio da colonização da gônada para $18,32 \times 10^6$ no final do estudo. O número de células de Sertoli por corte transversal de cordão variou de 10,00 a 16,25. Os resultados obtidos mostram que a origem e a formação dos testículos nos embriões e fetos de vacas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) ocorre de forma muito semelhante ao do que é descrito para *Bos taurus taurus*.

Palavras-Chave:

Bovinos.
Nelore.
Gônada.
Células germinativas.
Células de Sertoli.

Introdução

O testículo desempenha importante papel no processo de diferenciação sexual. Fatores testiculares (testosterona, hormônio anti-Mülleriano) seriam os responsáveis pelas substanciais diferenças entre macho e fêmea quanto à anatomia, fisiologia e comportamento¹. Do ponto de vista deste autor, o evento crítico na diferenciação sexual dos mamíferos deve-se provavelmente à ação do gene determinante da formação dos testículos (SRY), ligado ao cromossomo Y, de tal modo que a sua expressão conduziria a não formação das gônadas femininas, mas

sim das masculinas.

Quando da ocorrência de gestação gemelar de sexos opostos, os ovários são bastante modificados pelos testículos, podendo ser formada uma gônada estéril, enquanto os testículos se tornam normalmente funcionais². Tal fato evidencia que o sexo genético, por si só, não é capaz de assegurar o desenvolvimento normal dos órgãos sexuais. Esse fenômeno é sustentado pela constatação do nascimento de uma potra XX de uma égua XY, positiva para o antígeno Hy³.

A diferenciação sexual do macho poderia ser dividida em duas etapas. Na

primeira, o sexo genético seria mediado pelos cromossomos, ao passo que na segunda o padrão cromossômico iniciaria uma série de eventos em cascata, levando ao desenvolvimento da gônada masculina⁴. Essa secretaria esteróides e peptídeos, os quais seriam essenciais para o desenvolvimento da genitália interna e externa, cabendo aos esteróides a mediação do sexo fenotípico.

Este trabalho objetivou caracterizar o desenvolvimento testicular pré-natal de embriões e fetos de vacas da raça Nelore, determinar a fase de migração das células germinativas (CG) para a gônada indiferenciada, o processo de colonização da gônada pelas células germinativas, sua diferenciação, e a consolidação desses eventos durante os diferentes períodos da gestação.

Material e Método

O material foi coletado em frigoríficos próximos à cidade de Uberlândia-MG, durante os anos de 1999, 2000 e 2001. Para tanto, embriões e fetos de vacas da raça Nelore foram medidos, no seu comprimento, da região cefálica (com a cabeça em ângulo de 90° em relação à coluna vertebral) até a transição sacrococcígea. A idade gestacional foi estimada aplicando-se as mensurações obtidas à fórmula $DG = 8,4 + 0,087C + 5,46\sqrt{C}$, onde DG = dias de gestação e C = comprimento do embrião ou feto⁵.

O sexo dos fetos foi determinado por observação macroscópica de suas estruturas, enquanto que o sexo dos embriões foi identificado por PCR (Polimerase Chain Reaction)⁶ realizada no Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia, utilizando-se fragmentos dos mesmos ou das membranas cório-alantoidianas.

Os embriões foram fixados *in totum*, enquanto que dos fetos apenas os testículos foram coletados. O material foi fixado em líquido de Bouin por 24 horas. Após a fixação os testículos foram medidos quanto ao comprimento, espessura e largura e,

posteriormente, preparados para microscopia óptica convencional em hematoxilina-eosina (HE). Após inclusão em parafina, foram feitos cortes seriados dos embriões de cinco μm de espessura e, a cada 250 μm de distância, cinco fragmentos foram avaliados, até obterem-se cortes sobre as gônadas. Os testículos foram seccionados no terço médio, transversalmente ao seu diâmetro maior, aproveitando-se um corte a cada 50 μm desprezados, num total de cinco.

A preparação e avaliação das lâminas foram executadas no Laboratório de Histologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), no sentido de se determinar: início da formação e colonização da gônada pelas células germinativas (CG), número e diâmetro das CG, diâmetro dos cordões testiculares, espessura da albugínea, e quantidade de células de Sertoli e de CG por corte transversal dos cordões nos seus vários estádios de desenvolvimento.

A quantificação e as mensurações foram feitas utilizando-se o software "HL-Image". Como a contagem das células foi efetuada por área (mm^2) do testículo, os valores obtidos foram multiplicados pela espessura do corte (5 mm) para se obter o total de células em mm^3 , posteriormente transformado em mm^3 . Por fim, o número de células obtido em mm^3 foi multiplicado pelo volume da gônada, calculado pela seguinte fórmula:

$V = 4/3\pi ABC$, onde V = volume do testículo em mm^3 , A = Comprimento/2, B = Largura/2 e C = Espessura/2. Uma vez que a espessura do corte foi menor que o diâmetro das estruturas medidas, e para evitar recontagem dessas, dividiu-se o seu diâmetro pela espessura do corte, sendo o número total de células encontrado dividido por este valor, obtendo-se assim o número de células da gônada.

Resultados e Discussão

As gônadas foram primeiramente observadas em um embrião de 1,0 cm de comprimento como um espessamento na face medial dos mesonefros, próximo à raiz

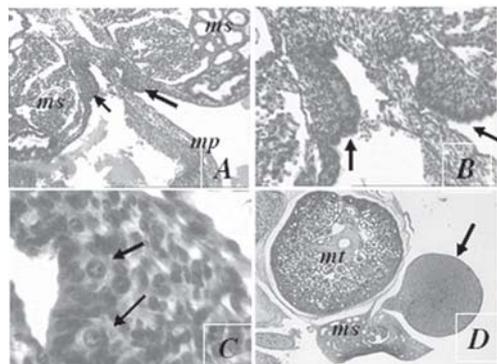


Figura 1 - Cortes transversais de embrião de 1 cm de comprimento (27 dias de gestação, A B e C) e de feto de 5 cm (51 dias de gestação, D) mostrando o início da formação da gônada (setas em A B e D). *ms*: mesonefron , *mp*: mesentério primitivo, *mt*: metanefron, setas em C indicam células germinativas. Coloração HE, aumento em A 40x, B 100x, C 400x e D 12,5x

do mesentério (Figuras 1 A e B). Gradativamente afastavam-se do mesmo enquanto este regredia (Figura 1D). A localização das gônadas junto ao mesonefro foi igualmente relatada em bovinos por vários autores^{7,8,9,10,11}.

A presença das gônadas em embrião de 1,0 cm (27 dias de gestação), aproximase da citação de Wrobel e Sub¹¹, os quais registraram sua presença entre 27 e 31 dias. Nessa fase, células germinativas (CG) já estavam presentes em pequeno número (Figura 1C), facilmente diferenciadas das outras células por serem maiores (12,27 a 16,95 μm), citoplasma abundante e pouco corado, com núcleo grande (7,38 a 8,91 μm) e esférico (Tabela 1). Houve um aumento consistente no diâmetro das CG, com pequena variação no diâmetro dos seus núcleos (Tabela 1).

Apresentavam-se soltas na periferia da gônada, próximo ao *mesogonadium*. Dois embriões, de 0,8 e de 1,0 cm, não mostraram sinais de formação da gônada. A partir de 2,5 a 3,0 cm, CG revelaram-se organizadas em cordões mal definidos, misturadas com células de sustentação de menor tamanho e com pouco citoplasma e núcleo geralmente menos esférico.

Em fetos a partir de 7,0 a 8,0 cm, os cordões foram gradativamente se definindo

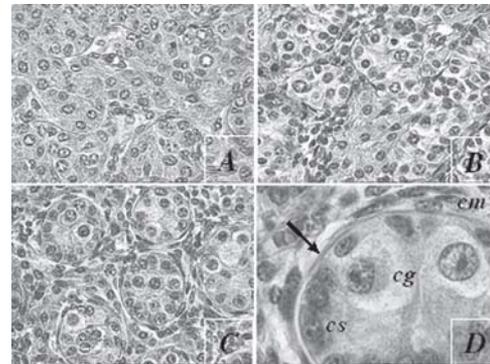


Figura 2 - Cordões testiculares em diferentes estádios de desenvolvimento. Em A corte de testículo de feto de 08 cm de comprimento (64 dias de gestação), em B de 10 cm (71 dias de gestação), em C de 16 cm (91 dias de gestação) e em D de 51 cm (176 dias de gestação). *cg*: célula germinativa, *cm*: células mioepiteliais, *cs*: célula de sustentação e *seta* lâmina própria. Coloração HE, aumento em A, B e C de 400x e D de 1000x

(Figura 2), delimitados externamente por uma lâmina própria e por uma camada de células com núcleo alongado (células mioepiteliais). No interior dos cordões ocorreram células pequenas (Figura 2D), de núcleo esférico ou oval, distribuídas próximo à lâmina própria, identificadas como precursoras das células de sustentação (células de Sertoli). Células grandes, arredondadas, de citoplasma amplo e levemente corado, bem delimitadas de outras células, foram localizadas mais interiormente, identificadas nesse caso como células germinativas (Figura 2D). Seu núcleo, relativamente grande e esférico, centralmente localizado, não apresentou variações substanciais de diâmetro.

Por sua vez, o diâmetro dos cordões aumentou 28,95 % (de 33,64 para 43,38 mm) durante o período estudado (Tabela 2), assim como o número de células de sustentação por corte transversal de cordão (de 10 para 16,25, Tabela 2). Conforme Santamarina e Reece¹², aos 90 dias o diâmetro dos cordões foi de 34,3 (27-59) μm , com 13 células de Sertoli/corte transversal. Aos 120 dias eles observaram diâmetro de 49,8 μm (27-59), com relação de 17 células por corte, aos 180 dias diâmetro de 43,5 μm (39,1-50), com relação de 14 células e aos

Tabela 1 - Número médio de células germinativas (cg), diâmetro médio das cg (diacg), diâmetro médio dos núcleos das cg (dianucg) e número de cg por corte transversal de cordão testicular em diferentes fases do desenvolvimento em função do comprimento em cm (comp) de embriões e fetos. Uberlândia, MG, 2001

comp	cg	diacg	dianucg	cgcot
0 - 1,0	16,00	12,27	7,38	-
1,1 - 2,0	3.251,00	12,69	6,65	-
2,1 - 3,0	41.225,00	13,46	7,40	-
3,1 - 7,0	340.730,00	14,03	7,29	1,00
7,1 -10,0	467.662,00	14,83	8,47	2,13
10,1 - 15,0	632.350,00	14,28	8,04	2,80
15,1 - 24,0	1.539.412,00	15,24	8,09	2,28
24,1 - 39,0	4.122.417,00	16,52	8,80	1,74
39,1 - 53,0	6.415.611,00	16,04	8,52	1,10
53,1 - 66,0	10.668.000,00	16,29	8,46	0,91
66,1 - 85,0	18.322.100,00	16,95	8,91	0,76

200 dias diâmetro de 30,6 μm (24,7-34,8) com relação de 15 células, portanto, com pouca variação no diâmetro dos cordões e no número de células Sertoli por corte transversal. Não obstante, Hochereau-De Reviers et al.¹³ registraram incremento de 27 % no diâmetro dos cordões entre 42 e 139-150 dias, que aumentaram de 29 para 37 μm .

Os cordões caracterizaram-se por apresentar células grandes, mas em pequeno número, localizadas mais no interior, e células pequenas e abundantes na periferia. Semelhantemente, essa estruturação morfológica foi descrita por diversos autores^{10,12,13,14,15,16}. Parte dos resultados deste estudo está em consonância com o observado por Cardoso¹⁴, também para a raça Nelore. Ele descreveu a estrutura do testículo como sendo formada por cordões compostos de dois tipos celulares: as CG e as células de sustentação, delimitados por uma túnica própria. Reportou também diminuição no espaço ocupado pelos cordões e no número de CG por corte transversal e que, praticamente, não ocorreu alteração no diâmetro dos cordões e no número de células de suporte por corte transversal.

O número de CG aumentou de 16 células no início de formação da gônada

para $18,3 \times 10^6$ no final da gestação (Tabela 1), mesmo havendo uma diminuição no número de células por corte transversal de cordão (de 2,8 para 0,8, Tabela 1). Este aumento deveu-se, provavelmente, pelo alongamento dos cordões, fato comprovado por Hochereau-De Reviers et al.¹³ que registraram cordões com 2,8 m de comprimento aos 42 dias e 550 m aos 139-150 dias de gestação. No trabalho de Wrobel e Süb¹¹ foi constatado que aos 27 dias a crista gonádica continha poucas CG e que aos 32 dias estas se encontravam distribuídas perifericamente na crista. Resultados semelhantes evidenciaram CG aos 32 dias, sendo que aos 39 dias a maioria dessas encontrava-se restrita aos cordões, cujo esboço mostrou-se caracterizado nesta fase¹⁰.

Em relato de Matschke e Erickson¹⁰, o número de CG aumentou de 44 aos 33 dias para 4,1 milhões aos 110 dias, permanecendo até os 200 dias, para alcançar aproximadamente $13,4 \times 10^6$ aos 270 dias. Hochereau-De Reviers et al.¹³, mostraram que as CG aumentam de $0,22 \times 10^6$ aos 42 dias para 27×10^6 aos 139-150 dias. Em cultivo, o número de CG dobra em 2 dias¹⁷. No presente trabalho, o número de CG por corte transversal dos cordões decresceu (Tabela 2). Observou-se também que a área

Tabela 2- Espessura média da albugínea (al), volume médio, em porcentagem, ocupado pelos cordões testiculares dentro dos testículos (vol), diâmetro médio dos cordões testiculares (diacord) e número médio de células de sustentação por corte transversal de cordão testicular (sus) em diferentes fases do desenvolvimento em função do comprimento em cm (comp) de embriões e fetos. Uberlândia, MG, 2001

comp	al	vol	diacord	sus
2,1 - 3,0	29,08	63,71	33,64	-
3,1 - 7,0	47,15	61,63	31,68	10,00
7,1 - 10,0	71,86	52,62	44,21	12,88
10,1 - 15,0	66,58	59,13	43,30	10,47
15,1 - 24,0	134,61	53,98	48,80	13,45
24,1 - 39,0	255,92	44,99	48,17	15,41
39,1 - 53,0	457,50	34,86	45,52	15,20
53,1 - 66,0	558,46	38,99	44,48	15,05
66,1 - 85,0	538,29	41,99	43,38	16,25

ocupada pelos cordões diminuiu em relação ao interstício, caindo de 63,3 % no início da formação da gônada para 42,3 % no final do estudo (Tabela 2). Entretanto, Hochereau-De Reviers et al.¹³ relataram que os cordões ocupavam 42 % dos testículos, não havendo variação durante a vida fetal.

A túnica albugínea apareceu em embriões de 2,5 cm, tornando-se mais espessa com o avançar da gestação (de 29,08 para 538,29 μ m, Tabela 2), composta de células com núcleo alongado, exceto aquelas da periferia que possuíam núcleo esférico. Sua parte mais profunda continha vasos sanguíneos que aumentaram em número e diâmetro. Este aumento na vascularização também foi citado por Gropp e Ohno⁷. A albugínea emitia tênues projeções (septos) na direção do mediastino, levando junto os vasos sanguíneos que se distribuíam pelo parênquima.

Neste estudo, os testículos foram histologicamente reconhecidos como tal em fetos de 2,5 cm (38 dias de gestação), evidenciados pela presença da albugínea e cordões, enquanto que Vigier, Prépin e Jost¹⁸ não reportaram nenhuma diferença até 39 dias, para somente entre 41-42 dias (embriões de 24 mm) surgirem os primeiros cordões e início de formação da albugínea. Aos 42 dias (embriões de 27 mm) a gônada se encontrava diferenciada¹⁵. Em embriões de até 30-35 mm não houve diferenciação entre testículo e

ovário, mas em embriões de 43-52 mm a formação da albugínea e a segregação celular dentro do blastema gonadal ocorreram rapidamente, permitindo sua caracterização⁷. A presença da albugínea aos 33 dias permitiu a diferenciação entre macho e fêmea¹⁰.

O mediastino começou a se formar em embriões a partir de 3,0 cm, ocupando a parte central do testículo e percorrendo seu eixo longitudinal. No seu interior, a partir de 7,0 cm, formou-se a *rete testis*, composta de canais, delimitados por células com núcleo alongado e diâmetro maior perpendicular à luz dos canais, mais tarde que o citado por Gropp e Ohno⁷, que a observaram em fetos de 43-52 mm.

Os testículos foram localizados no canal inguinal ou no escroto em fetos a partir de 20 cm de comprimento. A migração dos testículos em direção ao escroto não ocorreu antes dos 70 dias (embriões de 115 mm)³, e segundo Gier e Marion¹⁹, as gônadas atingiram o anel inguinal entre 100-105 dias, alcançando o escroto aos 140 dias.

Os resultados obtidos na presente investigação revelaram que a origem e a formação dos testículos nos embriões e fetos de vacas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) ocorre de forma semelhante ao descrito para embriões e fetos de fêmeas da subespécie *Bos taurus taurus*.

Morfogenesis of Testis From Embryos and Fetuses of Nelore Breed Cows (*Bos taurus Indicus*)

Abstract

The aim of this study was to accompany the process of testicular development from the non-differentiable phase to its complete formation. Embryos and fetuses of Nelore breed cows (*Bos Taurus indicus*) were obtained in slaughterhouses near the Uberlândia city, Minas Gerais. The gonads and the embryos were fixed in Bouin's fixative and afterwards processed for conventional optical microscopy. The gonadal was observed firstly in a 1.0 cm long embryo. In 2.5 cm long embryos the presence of the albuginea allows the sex identification. The mean thickness of the albuginea ranged from 29.08 to 558.45 mm. Gradually increase of vascularization of the albuginea and parenchyma is observed. The mediastinum is located centrally. There was a decrease in the space occupied by the testicular cords, from 63.71 to 41.99% of the total testes volume. Its diameter ranged from 31.68 to 48.80 mm. The diameter of germinal cells (and their nuclei) was from 12.27 (6.65) to 16.95 914.21) mm. The quantity of germinal cells by cross section of cord decreased from a maximum of 2.80 to 0.76. The total number of germinal cells was from 16 at the beginning of colonization of the gonad to 18.32×10^6 at the end of the study. The number of Sertoli's cells by cross section of cord ranged from 10.00 to 16.25. The results obtained show that the origin and formation of testes in embryos and fetuses from Nelore breed cows (*Bos taurus indicus*) does occur in a very similar way to what is described for *Bos taurus taurus*.

Key-words:

Bovines.
Gonad.
Germinal cells.
Sertoli's cells.
Albuginea.

Referências

1 LOVELL-BADGE, R. Sex determining gene expression during embryogenesis. **Philosophical Transactions Royal Society of London B**, v. 339, n. 1288, p. 159-164, 1993.

2 MITTWOCH, U. H-Y antigen and growth of the dominant gonad. **Journal of Medical Genetics**, v. 14, n. 5, p. 335-338, 1977.

3 SHARP, A. J.; WACHTEL, S. S.; BENIRSCHKE, K. H-Y antigen in a fertile XY female horse. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 58, n. 1, p. 157-160, 1980.

4 HIORT, O.; HOLTERHUS P-M. The molecular basis of male sexual differentiation. **European Journal of Endocrinology**, v. 142, n. 2, p. 101-110, 2000.

5 REXROAD, C. E.; CASIDA, L. E.; TYLER, W. J. Crown rump length of fetuses, in purebred Holstein-Friesian cows. **Journal Dairy Science**, v. 57, n. 3, p. 346-347, 1974.

6 NASCIMENTO, G. S. **Determinação do sexo de embriões bovinos pela técnica de PCR (polimerase Chain Reaction)**. 1997. 29 f. Monografia (Trabalho de Graduação em Medicina Veterinária) – Faculdade de

Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 1997.

7 GROPP, A.; OHNO, S. The presence of a common embryonic blastema for ovarian and testicular parenchymal (follicular, interstitial and tubular) cells in cattle, *Bos taurus*. **Zeitschrift für Zellforschung**, v. 74, n. 4, p. 505-528, 1966.

8 MACKAY, S. Gonadal development in mammals at the cellular and molecular levels. **International Review of Cytology**, v. 200, n. 53, p. 47-99, 2000.

9 McLAREN, A. Germ and somatic cell lineages in the developing gonad. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 163, n. 1-2, p. 3-9, 2000.

10 MATSCHKE, G. H.; ERICKSON, B. H. Development and radioresponse of the prenatal bovine testis. **Biology of Reproduction**, v. 1, n. 2, p. 207-214, 1969.

11 WROBEL, K-H.; SÜB, F. Identification and temporospatial distribution of bovine primordial germ cells prior to gonadal sexual differentiation. **Anatomy Embryology**, v. 197, n. 6, p. 451-467, 1998.

12 SANTAMARINA, E.; REECE, R. P. Normal development of the germinal epithelium and seminiferous tubules in the bull. **American Journal Veterinary Research**, v. 18, n. 67, p. 261-278, 1957.

13 HOCHEREAU-DE REVIERS, M. T. et al. Ontogenesis of somatic and germ cells in sheep fetal testis. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 103, n. 1, p. 41-46, 1995.

14 CARDOSO, F. M. **Desenvolvimento dos órgãos genitais masculinos de zebus (*Bos indicus*) da raça Nelore, do período fetal aos 36 meses de idade.** 1977. 113 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1977.

15 MOUSTAFA, L. A.; HAFEZ, E. S. E. Prenatal development of bovine reproductive system. **Journal of Reproductive Medicine**, v. 7, n. 3, p. 99-113, 1971.

16 WROBEL, K-H. et al. Immunohistochemical demonstration of nerve growth factor receptor in bovine testis. **Cell Tissue Research**, v. 285, n. 2, p. 189-197, 1996.

17 SHIM, H.; ANDERSON, G. B. In vitro survival and proliferation of porcine primordial germ cell. **Theriogenology**, v. 49, n. 3, p. 521-528, 1998.

18 VIGIER, B.; PRÉPIN, J.; JOST, A. Chronologie du développement de l'appareil génital du fœtus de veau. **Archives d'Anatomie et Microscopique et Morphologie Expérimentale**, v. 65, n. 2, p. 77-101, 1976.

19 GIER, H. T.; MARION, G. B. Development of mammalian testes and genital ducts. **Biology of Reproduction**, v. 1, p. 1-23, 1969. Supplement.