

Desenvolvimento do testículo de camundongo da fase fetal até a idade adulta

Rozangela de Lucca Martins Sachetim

Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina-Paraná, Brazil.

RESUMO. O desenvolvimento do testículo de camundongo foi estudado desde o 15º dia de gestação até a idade adulta. As lâminas preparadas para estudo histológico em microscópio óptico foram tratadas pela técnica do ácido periódico - Schiff e pela hematoxilina de Harris (PAS + H). Na fase fetal, os túbulos seminíferos estão constituídos por gonócitos e células de sustentação imaturas. No tecido intersticial, observam-se as células de Leydig. A espermatogênese inicia-se logo após o nascimento. O epitélio seminífero torna-se mais espesso aos 14 dias pós-natal, onde se observam espermátócitos em prófase meiótica. Aos 21 dias pós-natal, o epitélio seminífero contém espermatogônias, espermátócitos e células de Sertoli. As primeiras espermátides são observadas aos 28 dias pós-natal e, aos 42 dias, já ocorrem espermátides maduras. Desde os 49 dias pós-natal, são observados espermatozóides na luz dos túbulos seminíferos. A partir dos 56 dias pós-natal, o epitélio seminífero, bem como o tecido intersticial, apresentam aspecto e características típicos do testículo do camundongo adulto.

Palavras-chave: camundongo, testículo, desenvolvimento, túbulos seminíferos, células de Leydig, morfologia, microscopia de luz.

ABSTRACT. Development of the mouse testis from fetal period to adulthood. The development of mouse testis was studied from 15th day of fetal life up to adult age. The prepared slides for histological study in light microscopy were stained by periodic acid - Schiff and Haematoxylin of Harris (PAS + H). The results show that in fetal life the seminiferous tubules are constituted by gonocytes and immature sustentation cells. In the interstitial tissue, Leydig cells are found. Spermatogenesis begins soon after birth. The seminiferous epithelium becomes thicker at day 14 postnatal when spermatocytes in meiotic prophase are observed. At day 21 postnatal the seminiferous epithelium contains spermatogonia, spermatocytes and Sertoli cells. The first spermatids are observed at day 28 postnatal and at day 42 postnatal mature spermatids occur. From day 56 postnatal on the seminiferous epithelium, as well as the interstitial tissue, present the aspect and typical characteristic of the adult mouse.

Key words: mouse, testis, fetal, development, seminiferous tubules, Leydig cells, morphology, light microscopy.

Estudos histológicos sobre o ciclo do epitélio seminífero em ratos adultos normais, bem como sobre as mudanças ocorridas no epitélio seminífero desses animais, quando submetidos a condições especiais, têm sido desenvolvidos por vários autores. Entre eles, destacam-se aqueles realizados por Russel e Clermont (1977), Ekwall *et al.* (1984), Gaytan *et al.* (1986), Mendis-Handagama, Risbridger e de Kretser (1987), Miraglia, Hayashi e Goldfeder (1990).

Poucos trabalhos abordam aspectos histológicos comparativos sobre o desenvolvimento do testículo de camundongo em várias idades, especialmente no

período fetal (Kluin e de Rooij, 1981; Kluin, Kramer e de Rooij, 1984 e Vergouwen *et al.*, 1991), e poucos são os estudos específicos sobre o tecido intersticial durante o desenvolvimento do testículo.

Com o intuito de contribuir para uma melhor compreensão do desenvolvimento do testículo de camundongo, levando-se em conta as variações do epitélio seminífero e do tecido intersticial e estabelecendo a comparação entre as fases fetal e pós-natal, realizamos um estudo histológico dos testículos de camundongos desde 15 dias de vida fetal até 70 dias pós-natal, em intervalos de dias que

possibilitassem uma visão dinâmica do desenvolvimento.

Material e método

Foram utilizados 80 camundongos (*Mus musculus*), distribuídos em 16 grupos, de acordo com a idade. Fêmeas prenhes foram sacrificadas, e os testículos foram retirados de seus fetos, com o auxílio de uma lupa, nos dias 15, 16, 17, 18 e 19 pré-natal. Após o nascimento, os animais foram sacrificados nos dias 1, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 e 70. O dia do nascimento foi considerado o dia 1. Para cada idade, foram estudados os testículos de 5 animais.

Todos os animais foram sacrificados por inalação de éter sulfúrico.

Os testículos foram fixados em líquido de Bouin à temperatura ambiente. O tempo de fixação variou de 12 a 24 horas para os testículos fetais e, para os testículos dos animais, com até 7 dias pós-natal. A partir do dia 14 pós-natal, o tempo de fixação variou de 24 a 48 horas, de acordo com o tamanho da gônada.

Após a fixação, os testículos foram desidratados, diafanizados e incluídos em Paraplast plus. Os cortes histológicos, com 6 μm de espessura, foram tratados pela técnica do ácido periódico - Schiff e pela Hematoxilina de Harris. Posteriormente, os testículos foram analisados e fotografados com fotomicroscópio Zeiss.

Resultados

Nos testículos dos camundongos aos 15 dias de desenvolvimento pré-natal, os túbulos seminíferos apresentaram-se como cordões celulares sólidos, contendo apenas dois tipos de células: os gonócitos e as células de sustentação imaturas. Nessa época, os núcleos das células de Sertoli, variáveis em tamanho e forma, localizavam-se na periferia dos túbulos seminíferos, enquanto os gonócitos, facilmente distintos das células de Sertoli, por seus núcleos grandes e arredondados, apresentando um ou mais nucléolos, foram observados perto do centro dos túbulos seminíferos. As células de Leydig, nessa idade, estavam dispersas por todo o tecido intersticial, apresentando núcleo arredondado com um nucléolo (Figura 1).

A espermatogênese iniciou-se logo após o nascimento. Os gonócitos deslocaram-se para a região basal dos túbulos seminíferos, retomando a atividade mitótica e originando as espermatogônias.

Aos 7 dias pós-natal, os núcleos das células de Sertoli foram observados com a forma de gotas, e a

luz do túbulo seminífero começou a se definir (Figura 2B).

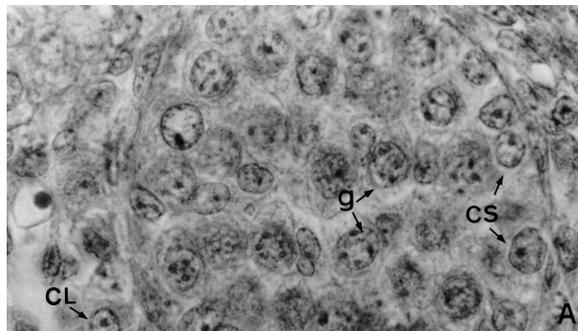


Figura 1. Fotomicrografia de testículo de feto de camundongo aos 15 dias de desenvolvimento pré-natal: os gonócitos (g) estão localizados no centro dos túbulos, e as células de Sertoli (CS), na periferia. No tecido intersticial, células de Leydig (CL) são observadas (PAS - Hematoxilina de Harris. 790X)

Com o aparecimento dos espermatócitos em prófase meiótica, aos 14 dias pós-natal, o epitélio dos túbulos seminíferos tornou-se mais espesso. A partir dessa idade, as células de Sertoli já apresentavam sua morfologia adulta típica, com núcleo de forma piramidal, palidamente corado e com um nucléolo evidente (Figura 2C).

Aos 21 dias pós-natal, observou-se um aumento da luz tubular e um epitélio seminífero mais desenvolvido, contendo espermatogônias, espermatócitos e células de Sertoli (Figura 2D).

O epitélio seminífero continuou seu processo de amadurecimento, e as primeiras espermátides jovens foram observadas nas seções dos túbulos seminíferos dos camundongos, aos 28 dias de desenvolvimento pós-natal (Figura 2E).

Aos 42 dias pós-natal, no epitélio seminífero estratificado, além dos tipos celulares já descritos, observaram-se espermátides maduras (Figura 2F).

Os testículos dos camundongos, aos 49 dias pós-natal, mostraram, nas várias seções analisadas, túbulos seminíferos em diferentes estádios do desenvolvimento, com uma luz tubular bem definida, e, em algumas delas, a presença de espermatozoides (Figura 2G).

A partir dos 56 dias pós-natal, o epitélio seminífero do camundongo mostrou seu aspecto adulto, incluindo todas as células da linhagem germinativa: espermatogônias, espermatócitos primários, espermatócitos secundários e espermátides em diferentes fases da espermiogênese. A luz tubular apresentou-se desenvolvida e, em algumas delas, observaram-se espermatozoides (Figura 2H).

A quantidade de tecido intersticial, examinada durante o período fetal e até 7 dias de

desenvolvimento pós-natal, consistindo em parte de células mesenquimais e abundante substância intercelular, diminui visivelmente, ao redor dos 14 dias de desenvolvimento pós-natal.

As células de Leydig foram encontradas em todas as idades estudadas. Por ocasião do início da puberdade, aos 21 dias de desenvolvimento pós-natal, as células de Leydig, com sua forma típica arredondada ou poligonal, núcleo redondo, central e citoplasma eosinófilo, formavam grupos no tecido intersticial (Figura 2D).

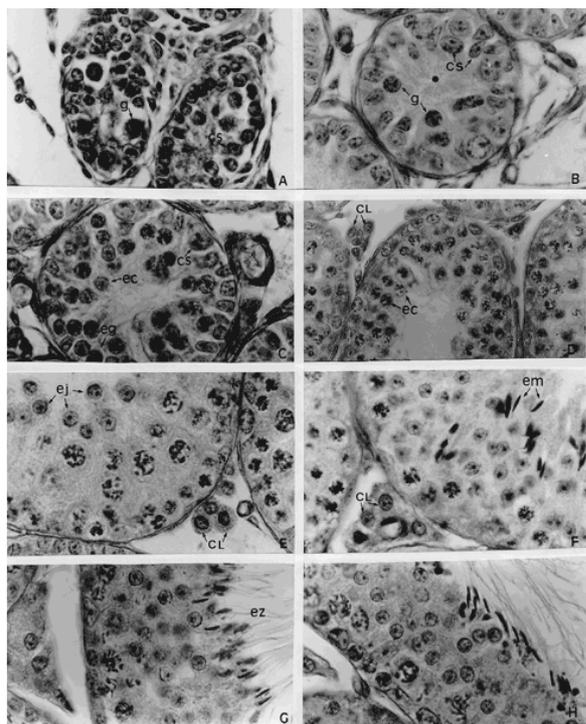


Figura 2. Fotomicrografias de testículos de camundongo durante o desenvolvimento pós-natal. PAS - Hematoxilina. (A) Dia 1 pós-natal, 790X: túbulos preenchidos com gonócitos (g) e células de Sertoli imaturas (CS); (B) 7 dias pós-natal, 790X: gonócitos (g); células de Sertoli (CS); a luz do túbulo seminífero (*) começa a se definir; (C) 14 dias pós-natal, 790X: espermatogônias (eg); células de Sertoli (CS) e espermatócitos (ec) já podem ser observados; (D) 21 dias pós-natal, 400X: espermatócitos (ec); células de Leydig (CL); (E) 28 dias pós-natal, 790X: células de Leydig (CL); espermátides jovens (ej) estão presentes no epitélio seminífero; (F) 42 dias pós-natal, 790X: células de Leydig (CL) no tecido intersticial; espermátides maduras (em) já são encontradas no epitélio seminífero; (G) 49 dias pós-natal, 790X: em alguns túbulos, espermatozóides (ez) podem ser observados; (H) 56 dias pós-natal, 790X: o epitélio seminífero apresenta características adultas

Discussão

Os testículos dos camundongos foram reconhecidos no interior da cavidade abdominal aos 15 dias de gestação, e, neles, os túbulos seminíferos

foram identificados nas secções histológicas, ainda como cordões sólidos, contendo apenas gonócitos e células de sustentação imaturas.

A identificação morfológica do testículo de camundongo é possível a partir do décimo terceiro dia de gestação. Mittwoch e Buehr (1973) descrevem a presença de cordões testiculares sólidos na gônada do camundongo dessa idade, quando examinada na microscopia óptica. Em ratos, no entanto, Mittwoch e Delhanty (1969) afirmam que a identificação do sexo gonadal não é possível até 13,5 dias de gestação, tornando-se visível a partir de 14,5 dias e está avançada aos 15,5 dias.

Vergouwen *et al.* (1991) descrevem um pico proliferativo dos gonócitos aos 15 dias de gestação. Esses autores demonstram, porém, que, a partir do 16º dia de gestação, os gonócitos, comumente chamados de pré-espermatogônias nesse estágio, interrompem a mitose na fase G1 do ciclo mitótico e só retomam a atividade proliferativa durante a primeira semana após o nascimento, originando as espermatogônias A. Fato que confirma as observações de alguns autores (Sapsford, 1962; Kluin e Rooij, 1981; Kluin, Kramer e de Rooij (1984).

Em nosso trabalho, pudemos constatar claramente o amadurecimento do epitélio seminífero do camundongo.

Os espermátides não estão presentes nos testículos de camundongos de 7 dias pós-natal, mas já são numerosos nos animais de 14 dias. O epitélio seminífero torna-se mais espesso, reiterando as observações de Kofman-Alfaro e Chandley (1970), que relatam o início da meiose entre 9 e 10 dias após o nascimento.

As primeiras espermátides jovens foram observadas no epitélio seminífero dos camundongos aos 28 dias pós-natal.

Aos 42 dias pós-natal, observaram-se espermátides maduras, mas os espermatozóides ainda não estavam presentes.

O epitélio seminífero, bem como o tecido intersticial, a partir dos 56 dias pós-natal, apresentou aspecto e características típicas do testículo do camundongo adulto.

No tecido intersticial, as células de Leydig foram encontradas desde os 15 dias de vida fetal até a idade adulta, porém, não distinguimos entre o tipo fetal e o adulto.

Russo e de Rosas (1971) descrevem, no testículo de camundongo, a diferenciação de células de Leydig fetais, a partir de células fusiformes.

A literatura é conflitante, no que diz respeito à persistência de células de Leydig fetais no testículo

adulto e à origem das células de Leydig adultas. Alguns autores propõem a sua origem a partir de células mesenquimais (Christensen, 1975; Chemes, Rivarola e Bergada, 1976; Chemes *et al.*, 1985; Kerr e Knell, 1988; Hardy *et al.*, 1989), enquanto outros (Fawcett e Burgos, 1960; de Kretser, 1967; Zaidi *et al.*, 1988) sugerem que as células mióides peritubulares sejam as precursoras das células de Leydig adultas.

Para Mancini *et al.* (1963), as células de Leydig no testículo humano derivam de fibroblastos, no feto e na puberdade.

Kuopio *et al.* (1989) sugerem três estádios de diferenciação de células de Leydig no testículo do rato: fetal, juvenil e juvenil-adulto.

Vários autores, no entanto, sugerem duas populações distintas de células de Leydig, durante a vida dos mamíferos. Uma população fetal, que desaparece após o nascimento, e uma adulta, que surge durante a puberdade, persistindo durante toda a vida adulta (Christensen, 1975; Prince, 1984; Vergouwen *et al.*, 1991; Huhtaniemi e Pelliniemi, 1992).

Por outro lado, Kerr e Knell (1988) demonstram a persistência de células de Leydig fetais no testículo do rato adulto e sugerem que as células de Leydig, fetais e adultas, são originárias de duas gerações distintas de células, de desenvolvimento não relacionado.

Nossos resultados histológicos reiteram os dados da literatura, no que diz respeito à seqüência da diferenciação dos tipos celulares presentes no epitélio seminífero durante o desenvolvimento normal do testículo de camundongo. No entanto, a diferenciação das células de Leydig adultas e o destino das células de Leydig fetais não estão bem esclarecidos e requerem novos estudos.

Referências bibliográficas

- Chemes, H.E.; Gottlieb, S.E.; Pasqualini, T.; Domenichini, E.; Rivarola, M.A.; Bergada, C. Response to acute hCG stimulation and steroidogenic potential of Leydig cell fibroblastic precursors in humans. *J. Androl.*, 6: 102-112, 1985.
- Chemes, H.E.; Rivarola, M.A.; Bergada, C. Effect of hCG on the interstitial cells and androgen production in the immature rat testis. *J. Reprod. Fert.*, 46:279-282, 1976.
- Christensen, A.K. Leydig cells. In: Hamilton, D.W.; Greep, R.O. (Ed.). Handbook of physiology: male reproductive system. Washington, *Amer. Phys. Soc.*, 1975. p. 57-94. v. 5.
- De Kretser, D.M. The fine structure of the testicular interstitial cells in men of normal androgenic status. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, 80:594-609, 1967.
- Ekwall, H.; Jansson, A.; Sjöberg, P.; Plöen, L. Differentiation of the rat testis between 20 and 120 days of age. *Arch. Androl.*, 13:27-36, 1984.
- Fawcett, D.W.; Burgos, M.H. Studies on the fine structure of the mammalian testis. II. The human interstitial tissue. *Am. J. Anat.*, 107:245-269, 1960.
- Gaytan, F.; Lucena, M.C.; Munoz, E.; Paniagua, R. Morphometric aspects of rat testis development. *J. Anat.*, 145:155-159, 1986.
- Hardy, M.P.; Zirkin, B.R.; Ewing, L.L. Kinetic studies on the development of the adult population of Leydig cells in testis of the pubertal rat. *Endocrinology*, 124:762-770, 1989.
- Huhtaniemi, I.; Pelliniemi, L.J. Fetal Leydig cells: cellular origin, morphology, life span, and special functional features. *P. S. E. B. M.*, 201:125-140, 1992.
- Kerr, J.B.; Knell, C.M. The fate of fetal Leydig cells during the development of the fetal and postnatal rat testis. *Development*, 103:535-544, 1988.
- Kluin, Ph.M.; De Rooij, D.G. A comparison between the morphology and cell kinetics of gonocytes and adult type undifferentiated spermatogonia in the mouse. *Int. J. Androl.*, 4:475-493, 1981.
- Kluin, Ph.M.; Kramer, M.F.; De Rooij, D.G. Proliferation of spermatogonia and Sertoli cells in maturing mice. *Anat. Embryol.*, 169:73-78, 1984.
- Kofman-Alfaro, S.; Chandley, A.C. Meiosis in the male mouse: an autoradiographic investigation. *Chromosoma*, 31:404-420, 1970.
- Kuopio, T.; Tapanainen, J.; Pelliniemi, L.J.; Huhtaniemi, I. Developmental stages of fetal-type Leydig cells in prepubertal rats. *Development*, 107:213-220, 1989.
- Mancini, R.E.; Vilar, O.; Lavieri, J.C.; Andrada, J.A.; Heinrich, J.J. development of Leydig cell in the normal human testis: a cytological, cytochemical and quantitative study. *Am. J. Anat.*, 112:203-214, 1963.
- Mendis-Handagama, S.M.L.C.; Risbridger, G.P.; De Kretser, D.M. Morphometric analysis of the neonatal and adult rat testis interstitium. *Int. J. Androl.*, 10:525-534, 1987.
- Miraglia, S.M.; Hayashi, H.; Goldfeder, E.M. Histomorfometria dos testículos de ratos albinos normais em várias idades. *Rev. Bras. Ciên. Morfol.*, 7:8-15, 1990.
- Mittwoch, U.; Buehr, M.L. Gonadal growth in embryos of sex reversed mice. *Differentiation*, 1:219-244, 1973.
- Mittwoch, U.; Delhanty, J.D.A. Growth of differentiating testis and ovaries. *Nature*, 224:1323-1325, 1969.
- Prince, F.P. Ultrastructure of immature Leydig cells in the human prepubertal testis. *Anat. Rec.*, 209:165-176, 1984.
- Russel, L.D.; Clermont, Y. Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats. *Anat. Rec.*, 187:347-366, 1977.
- Russo, J.; De Rosas, J.C. Differentiation of the Leydig cell of the mouse testis during the fetal period: an ultrastructural study. *Am. J. Anat.*, 130:461-480, 1971.

Sapsford, C.S. Changes of the cells of the sex cords and seminiferous tubules during the development of the testis of the rat and mouse. *Aust. J. Zool.*, 10:178-194, 1962.

Vergouwen, R.P.F.A.; Jacobs, S.G.P.M.; Huiskamp, R.; Davids, J.A.G.; De Rooij, D.G. Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *J. Reprod. Fert.*, 93:233-243, 1991.

Zaidi, A.; Lendon, R.G.; Dixon, J.S.; Moris, I.D. Abnormal development of the testis after administration of the Leydig cells cytotoxic ethylene – 1.2-dimethanesulphonate. *J. Reprod. Fert.*, 82:381-392, 1988.

Received on April 13, 1999.

Accepted on May 31, 1999.