



**THAIS PREISSER PONTELO**

**DESENVOLVIMENTO GONADAL DE FETOS  
SUÍNOS E SUA RELAÇÃO COM MEDIDAS  
FETAIS**

**LAVRAS-MG  
2015**

**THAIS PREISSER PONTELO**

**DESENVOLVIMENTO GONADAL DE FETOS SUÍNOS E SUA  
RELAÇÃO COM MEDIDAS FETAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo

Coorientadores

Dr. José Rafael Miranda

Dr. Gregório Corrêa Miranda

**LAVRAS-MG**

**2015**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Pontelo, Thais Preisser.

Desenvolvimento gonadal de fetos suínos e sua relação com  
medidas fetais / Thais Preisser Pontelo. – Lavras : UFLA, 2015.

80 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de  
Lavras, 2015.

Orientador(a): Márcio Gilberto Zangerônimo.

Bibliografia.

1. Suinocultura. 2. Gestação. 3. Embriologia. 4. Células de  
Sertoli. 5. Folículos. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**THAIS PREISSER PONTELO**

**DESENVOLVIMENTO GONADAL DE FETOS SUÍNOS E SUA  
RELAÇÃO COM MEDIDAS FETAIS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Ciências Veterinárias, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 26 de Outubro de 2015.

Dr. José Rafael Miranda	UFLA
Dr. Luciano José Pereira	UFLA
Dr. Guilherme Oberlender	IFSULDEMINAS, Campus Muzambinho

Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo  
Orientador

**LAVRAS-MG**

**2015**

*Vocês são minha força, o meu norte*

*Sem vocês nada disso teria sentido*

*Amor maior não existe!*

*Papai e Mamãe*

*A vocês, ofereço e dedico!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo maravilhoso dom da vida e por ter me dado força em toda a minha trajetória.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias, pela oportunidade de realizar o mestrado.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos meus amados pais, Ana Paula Preisser Pontelo e Ricardo Geraldo Pontelo, pela dedicação, apoio, exemplo, e amor incondicional.

Ao meu orientador, Dr. Márcio Gilberto Zangeronimo, pela orientação durante todos esses anos, e pela confiança, oportunidades, apoio e incentivo.

Aos meus coorientadores, Dr. José Rafael Miranda e Dr. Gregório Corrêa Miranda, pelo apoio e auxílio na condução dos trabalhos.

Agradeço ao Dr. Guilherme Oberlender e ao Dr. Luciano José Pereira, e aos demais membros da banca, por todas as considerações e críticas feitas com o intuito de melhorar cada vez mais a qualidade do trabalho.

Aos amigos do Grupo de Estudos em Tecnologia de Sêmen e Embriões (GETESE), pela companhia, amizade, apoio, compreensão, e por todos os momentos que passamos juntos.

Às meninas da Pós-graduação, Bruna Resende Chaves, Carla Oliveira Resende e Stenia Severo Rabelo, pela amizade, carinho, apoio, e por estarem sempre ao meu lado nos momentos felizes e, principalmente, nas dificuldades.

À minha irmã de coração Bárbara Azevedo Pereira, que sempre foi um anjo na minha vida. Obrigada por essa irmandade incondicional. Sem você esse trabalho não teria se concretizado.

Meus sinceros agradecimentos a todos que direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho.

*Que os vossos esforços desafiem as  
impossibilidades, lembrai-vos de que as  
grandes coisas do homem foram  
conquistadas do que parecia impossível.*

*(Charles Chaplin)*

## RESUMO GERAL

Objetivou-se avaliar as características histomorfométricas dos testículos e ovários de suínos, em diferentes idades gestacionais, e correlacioná-las com o comprimento e perímetro cefálico, e perímetro torácico. Quarenta e quatro fetos provenientes de dezoito fêmeas gestantes DB-90 (DanBred) foram divididos por gênero e idade gestacional. As idades gestacionais foram 50, 80 e 106 dias de gestação, sendo que no primeiro e segundo grupos foram estudados 5 machos e 7 fêmeas, e no terceiro grupo, 5 machos e 9 fêmeas. Após o abate das mães, os fetos foram retirados e tiveram o comprimento cefálico e os perímetros cefálico e torácico determinados. Em seguida, as gônadas foram coletadas, pesadas e encaminhadas para análises histomorfométricas, como contagem de células e mensuração de estruturas que constituem as gônadas. Todas as características gonadais foram submetidas à ANOVA, e estatisticamente comparadas entre as diferentes idades gestacionais pelo teste SNK, com probabilidade de 5%. As variáveis histomorfométricas foram correlacionadas com as medidas fetais pela correlação de Pearson. O peso das gônadas aumentou ( $P < 0,05$ ) de forma expressiva ao longo da gestação, especialmente no terço final. Aos 106 dias de gestação houve maior ( $P < 0,05$ ) comprimento cordonal e número de células de Sertoli nos testículos, porém, menor diâmetro dessas células a partir dos 80 dias de gestação. O peso, o comprimento cefálico, perímetros cefálico e torácico, foram positivamente correlacionados ( $P < 0,01$ ) com o peso dos testículos, comprimento cordonal, e número total de células de Sertoli, e negativamente correlacionados ( $P < 0,02$ ) com o índice gonadossomático e diâmetro médio das células de Sertoli. Quanto às análises dos ovários, o número total de folículos foi maior aos 80 e 106 dias, enquanto que o número de ovogônias diminuiu ao longo da gestação. O peso e as medidas fetais foram positivamente correlacionados ( $P < 0,01$ ) com peso dos ovários, número total de folículos, número de folículos em crescimento, volume total das ovogônias, porém, foram negativamente correlacionados ( $P < 0,05$ ) com o índice gonadossomático, número total de ovogônias e porcentagem de núcleo das ovogônias. Conclui-se que a proliferação celular no testículo é mais acentuada no terço final da gestação, assim como o desenvolvimento dos ovários e sua organização. O peso e o tamanho fetal podem ser utilizados para prever o desenvolvimento das gônadas.

Palavras-chave: Células de Sertoli; Embriologia; Folículos; Morfometria; Ovogônias; Suinocultura



## ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the histomorphometric traits of the testes and ovaries at different gestational ages, and correlate them with the length and head circumference, and thoracic perimeter. We divided by gender and gestational age 44 fetuses obtained from DB-90 pregnant gilts (DanBred). The gestational ages were of 50, 80 and 106 days. In the first and second groups, 5 males and 7 females were studied, and in the third, 5 males and 9 females. After slaughtering the gilts, the fetuses were removed, determining the head length and head and thoracic perimeters. Subsequently, the gonads were collected, weighed and subjected to histomorphometric analyses, such as cell counts and measuring the gonad structures. All gonad traits were subjected to ANOVA, statistically comparing the different gestational ages using the SNK test at 5% probability. Histomorphometric variables were correlated with fetal measurements by means of Pearson correlation. The weight of the testes increased ( $P<0.05$ ) significantly during pregnancy, especially during the final third. The same occurred to the weight of the ovaries. After 106 days of gestation, the cordonal length and number of Sertoli cells increased ( $P<0.05$ ) in the testes, however, the diameter of these cells from 80 days gestation was smaller. The weight, head length, head circumference and girth were positively correlated ( $P<0.01$ ) with the weight of the testes, cordonal length and total number of Sertoli cells, however, were negatively correlated ( $P<0.02$ ) with GSI and the average diameter of the Sertoli cells. Ovary analysis and total number of follicles was higher at 80 and 106 days of gestation, whereas the number of oogonia decreasing during pregnancy. The weight of the fetus and fetal measures were positively correlated ( $P<0.01$ ) the weight of the ovaries, total number of follicles, an increase in number of follicles total volume of oogonia, however, were negatively correlated ( $P<0.05$ ) with GSI, total number of oogonia and percentage of core of oogonia. We concluded that most cell proliferation in the testicle development of the ovaries and its organization are more pronounced in the final third of gestation. Fetal weight and size can be used to predict the development of histological gonads.

Keywords: Embryology; Follicles; Morphology; Oogonia ; Sertoli Cells; Swine

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

Tabela 1	Características histológicas do testículo de fetos suínos machos em diferentes idades gestacionais (média $\pm$ desvio padrão).....	67
Tabela 2	Coefficientes de correlação de Pearson ( $R^2$ ) e dos índices de significância (P) entre as medidas fetais e o peso e características histológicas dos testículos de fetos suínos.....	68
Tabela 3	Características histológicas do ovário de fetos suínos em diferentes idades gestacionais (média $\pm$ desvio padrão).....	69
Tabela 4	Coefficientes de correlação de Pearson ( $R^2$ ) e dos índices de significância (P) entre as medidas fetais e o peso e características histológicas dos testículos e epidídimo de fetos suínos.....	70

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

Figura 1	Fases do desenvolvimento de um folículo ovariano.....	26
----------	---	----

### CAPÍTULO II

Figura 1	Peso das gônadas (médias $\pm$ desvio padrão) de fetos suínos machos e fêmeas em diferentes idades gestacionais.....	71
Figura 2	Parênquima testicular de fetos suínos aos 50 (A), 80 (B) e 106 (C) dias de gestação.....	72
Figura 3	Análise histológica do ovário fetal suíno aos 50, 80 e 106 dias de gestação.....	73

## SUMÁRIO

	<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>12</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>14</b>
<b>2.1</b>	<b>Desenvolvimento fetal das gônadas.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2</b>	<b>Testículo.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2.1</b>	<b>Túbulos seminíferos.....</b>	<b>18</b>
<b>2.2.2</b>	<b>Proliferação e regulação das células de Sertoli.....</b>	<b>19</b>
<b>2.3</b>	<b>Ovários.....</b>	<b>23</b>
<b>2.3.1</b>	<b>Oogênese.....</b>	<b>24</b>
<b>2.3.2</b>	<b>Foliculogênese.....</b>	<b>25</b>
<b>2.3.3</b>	<b>Ativação folicular.....</b>	<b>27</b>
<b>2.4</b>	<b>Desenvolvimento fetal e eficiência reprodutiva.....</b>	<b>28</b>
<b>3</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>30</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>31</b>
	<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>41</b>
	<b>Artigo: Características morfológicas das gônadas de fetos</b>	
	<b>suínos e suas relações com as medidas fetais em diferentes</b>	
	<b>idades gestacionais .....</b>	<b>43</b>

## CAPÍTULO I

### 1 INTRODUÇÃO

A carne suína é a mais consumida no mundo, e o crescimento de sua produção se deve aos avanços nas áreas de genética, sanidade, nutrição, reprodução e manejo. O Brasil tem se destacado pela elevada eficiência produtiva associada a excelente qualidade de carne, sendo considerado um grande exportador. Essa eficácia se deve às pesquisas realizadas nessa espécie e ao alto ganho genético pelos plantéis. Porém, para aumentar a produção, a fim de atender a demanda populacional mundial, os índices reprodutivos da espécie suína, como fertilização *in vitro* e transferência de embriões, ainda precisam ser melhorados.

Estudos sobre a origem e diferenciação tecidual dos órgãos sexuais são importantes, uma vez que é comprovado que qualquer interferência no desenvolvimento embrionário e fetal desses órgãos, pode influenciar a qualidade reprodutiva do animal na fase adulta. Além disso, entender a embriologia do trato reprodutivo, é de extrema importância para se compreender a patogenia de anomalias que ocorrem nas gônadas e estruturas acessórias.

Em suínos, assim como em muitas espécies de mamíferos, o início da foliculogênese, oogênese e formação das espermatogônias ocorre no período fetal. Nesse momento, fatores ambientais podem prejudicar eventos importantes da organogênese reprodutiva, como, migração celular, proliferação de células de Sertoli e Leydig, meiose das células germinativas, e a formação dos folículos ovarianos. Tais problemas podem ser decorrentes de alterações no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, que podem comprometer a produção de andrógenos e estrógenos e, conseqüentemente, o desenvolvimento corporal e as características sexuais secundárias dos fetos. Assim, a adequada ocorrência

desses processos é necessária, para que na vida adulta o animal tenha bons parâmetros reprodutivos.

As células de Sertoli são as primeiras células a se diferenciarem durante o desenvolvimento testicular. Possuem grande importância por serem elementos-chave do processo espermatogênico, e também para o desenvolvimento testicular e produção espermática em animais sexualmente maduros. Quanto ao desenvolvimento ovariano no período fetal, as oogônias passam por um processo de transformação até formarem os folículos primordiais que irão constituir a reserva de folículos pós-nascimento. Em outras palavras, o período fetal se torna importante para a capacidade reprodutiva da fêmea, pois, a quantidade de oócitos que será produzida na fase adulta, é estabelecida no período fetal.

Sendo assim, sabendo que eventos que ocorrem durante o desenvolvimento gonadal fetal podem influenciar na vida reprodutiva do animal adulto, e que parâmetros histológicos das gônadas podem prever a eficiência reprodutiva, a tentativa de correlacionar esses parâmetros com medidas fetais se torna importante. Atualmente, técnicas ultrassonográficas estão sendo usadas para mensurar medidas fetais *in vivo*, dessa forma, a correlação do desenvolvimento gonadal com o tamanho corporal dos fetos, pode representar uma forma de prever a qualidade dos reprodutores ainda no período pré-natal. Assim, objetivou-se caracterizar morfometricamente a proliferação de células de Sertoli e estruturas testiculares de fetos suínos, assim como a morfometria de ovogônias e contagem de folículos em diferentes idades gestacionais, e correlacioná-los com as medidas fetais de comprimento, e perímetro cefálico e torácico.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Desenvolvimento fetal das gônadas

O sistema reprodutivo fetal origina-se na parte dorsal da cavidade abdominal, a partir de duas cristas germinativas. Antes de sua diferenciação no trato reprodutor masculino ou feminino, o sistema é composto por duas gônadas indiferenciadas, dois pares de ductos, um seio urogenital, um tubérculo genital, e diversas pregas vestibulares (HAFEZ, 2004).

As células germinativas primordiais (CGP) têm origem extragonadal, sendo formadas a partir do saco vitelínico mesentérico. Essas células são móveis e altamente invasivas (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2001; HURK; ZHAO, 2005), sendo capazes de migrar do saco vitelino para as cristas genitais, dando origem aos cordões gonadais (COURROT; HOCHEREAU-DE-REVIERS; ORTAVANT, 1970). Nas fêmeas, esses cordões são chamados de cordões corticais, e nos machos, cordões medulares. As células mesenquimais também migram para a crista gonadal dando origem às células de Leydig nos machos, e às células da teca e estroma nas fêmeas. As células do epitélio celômico também migram dando origem às células de Sertoli nos machos, e ovogônias nas fêmeas (GILBERT, 2003; HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2012). Os cordões medulares, nos machos, continuam a proliferar formando uma rede interna de cordões sexuais, e uma outra rede mais distal e mais fina, denominada rede testicular (*rede testis*) (HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2012). Os ductos deferentes são remanescentes do rim mesonéfrico embrionário e ligam os testículos aos ductos de Wolff (GILBERT, 2003; HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2012).

Os ductos de Müller e os ductos de Wolff compoem o embrião sexualmente indiferenciado. Os ductos de Müller, durante seu desenvolvimento

embrionário nas fêmeas, se desenvolvem até formar um sistema de ducto gonadal, e os ductos de Wolff, nesse caso, sofrem atrofia. O útero, a cervix e a porção cranial da vagina, se originam então, da fusão dos ductos de Müller caudalmente. Já no feto masculino acontece o contrário. Os ductos de Wolff se desenvolvem controlados pelos andrógenos testiculares, e os ductos de Müller atrofiam sob influência do AMH produzido pelas células de Sertoli (PARK; JAMESON, 2005).

Nos testículos, as células de Sertoli originam-se, provavelmente, do epitélio celômico, e são as primeiras células somáticas a se diferenciarem (KARL; CAPEL, 1998). A migração das demais células somáticas do testículo, como as células de Leydig, a partir da região mesonéfrica para a crista genital, ocorre sob influência das células de Sertoli (KANAI; MINEMOTO; SAKAI, 2005; MERCHANT-LARIOS; MORENO-MENDOZA, 2001; SEKIDO et al., 2004; TILMANN; CAPEL, 2002; YAO et al., 2002), inclusive em suínos (KAMINSKI; CORBIN; CONLEY, 1999). Já as células mióides originam-se mais provavelmente do epitélio celômico ou do mesênquima, que constitui a crista genital (COMBES et al., 2009).

Nos suínos, a diferenciação testicular ocorre por volta do 26° até 56° dia de gestação, e se caracteriza pela formação dos cordões testiculares e diferenciação das células somáticas precursoras das células de Sertoli e células mióides peritubulares. Essa diferenciação é necessária para que ocorra o desenvolvimento normal da espermatogênese, e para inibição da progressão dos gonócitos para a fase de meiose, como acontece nas fêmeas (YAO et al., 2002). Durante o desenvolvimento testicular, as células de Sertoli também são responsáveis por secretar o hormônio anti-mülleriano (AMH), que inibe o desenvolvimento do trato reprodutivo feminino. Sendo assim, as células de Sertoli são responsáveis pela diferenciação e desenvolvimento dos testículos. Porém, as células de Leydig é que são responsáveis por conferir as



características secundárias masculinas e desenvolvimento do trato reprodutor masculino, pois são as que secretam a maior parte dos andrógenos durante a vida fetal (MERCHANT-LAIROS; MORENO-MENDOZA, 2001).

Já a diferenciação morfológica do ovário em suínos ocorre por volta do 33º dia de gestação e se caracteriza pela formação de cordões sexuais primitivos, os quais formam a *rete ovarii* rudimentar. Por volta do 44º dia gestacional, esses cordões se desintegram formando ninhos de gonócitos. Com essa degeneração, o córtex se estrutura através de novos cordões, denominados cordões corticais, os quais incorporam as células germinativas primordiais (MCCOARD et al., 2001). Essas células começam a se dividir por um intenso processo de mitose e se transformam em ovogônias. A partir de então, as ovogônias entram na fase de prófase da primeira divisão meiótica, mas param na fase de diplóteno e não progredem para outras fases da meiose (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Segundo Almeida (1999), as células foliculares secretam uma substância inibidora da meiose, fazendo com que os ovócitos primários não terminem a divisão meiótica antes da puberdade.

Quanto à foliculogênese em suínos, assim como em muitos mamíferos, esta se inicia durante desenvolvimento fetal e continua ao longo da vida adulta. Os folículos ovarianos começam a ser formados no 56º dia de gestação. O conjunto de folículos primordiais e sua subsequente transição para o estágio primário, cujo processo se denomina ativação folicular, ocorre no final da gestação (BIELAŃSKA-OSUCHOWSKA, 2006).

## 2.2 Testículo

O testículo é um órgão que apresenta tanto função endócrina quanto exócrina, endócrina pela produção de hormônios e exócrina pela produção de gametas. É envolto por uma cápsula de tecido conjuntivo denominada túnica

albugínea que, de acordo com cada espécie, emite septos para o interior do órgão até o mediastino testicular, permitindo assim, a divisão do testículo em lóbulos testiculares, que na maioria das vezes, não são aparentes (HAFEZ, 2004; RUSSELL et al., 1990).

O testículo é dividido em dois compartimentos, o tubular e o intertubular. O compartimento tubular, na maioria dos mamíferos adultos, ocupa cerca de 70 a 90% de todo o parênquima testicular (FRANÇA; RUSSELL, 1998). Esse compartimento, responsável pela produção de espermatozoides, compreende os túbulos seminíferos, os quais são constituídos pela túnica própria, epitélio seminífero e lume tubular. Na túnica própria são observadas células mióides ou peritubulares, membrana basal e fibras colágenas. No epitélio seminífero encontram-se as células de Sertoli e células germinativas ou espermatogênicas. O lúmen tubular é o local de secreção dos fluidos produzidos pelas células de Sertoli e os espermatozoides. O compartimento intertubular é constituído por vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, células e fibras de tecido conjuntivo, macrófagos, mastócitos e células de Leydig, essas produtoras de andrógenos (FRANÇA; RUSSELL, 1998; RUSSELL et al., 1990).

Os testículos se desenvolvem retroperitonealmente na parede dorsal da cavidade abdominal. Durante o desenvolvimento fetal ocorre a migração para a bolsa escrotal, ficando suspensos na extremidade do cordão espermático (HAFEZ, 2004). Em decorrência dessa migração, cada testículo arrasta consigo uma membrana serosa derivada do peritônio, denominada túnica vaginal. Essa túnica é composta por uma camada parietal exterior e uma camada visceral interna, que recobrem a túnica albugínea nas porções laterais e anteriores do testículo. O escroto tem a função de manter a temperatura dos testículos abaixo da temperatura corporal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

### 2.2.1 Túbulos seminíferos

Os túbulos seminíferos são estruturas enoveladas que compõem o compartimento tubular dos testículos, e se conectam através de duas extremidades à rede testicular ou *rede testis*, localizada na região do mediastino testicular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). O diâmetro e o comprimento dos túbulos seminíferos variam de acordo com as diferentes espécies de mamíferos (FRANÇA; RUSSELL, 1998). De maneira geral, entre 10 a 15 metros de túbulos seminíferos são encontrados por grama de testículo, em animais adultos (FRANÇA; RUSSELL, 1998; SETCHELL; MADDOCKS; BROOKS, 1994). Os túbulos retos juntamente com os túbulos seminíferos formam uma rede anastomosada de canais, constituindo a rede testicular no mediastino do testículo. Os ductos eferentes são responsáveis por interligar a rede testicular ao início da porção do epididímo (AMANN, 1981; ILIO; HESS, 1994).

Os túbulos seminíferos são constituídos de epitélio germinativo ou epitélio seminífero, no qual é envolvido por lâmina basal e por uma bainha de tecido conjuntivo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Esse tecido é formado por algumas camadas de fibroblastos e pelas células mióides na sua camada mais interna. Essas são contráteis, sendo consideradas como responsáveis pela movimentação de fluidos e propulsão dos espermatozóides através do lume dos túbulos seminíferos. Já as células de Leydig, estão dispostas entre os túbulos seminíferos e são as principais responsáveis pela produção de andrógenos fetal (DYM, 1994; RUSSELL et al., 1990).

O epitélio seminífero é composto por dois tipos celulares: as células de Sertoli, originárias do epitélio celomático, e as células germinativas, originárias do epiblasto adjacente ao mesoderma extra-embriônico (CAPEL, 2000; KARL; CAPEL, 1998). Essas últimas se dispõem em quatro a oito camadas de células, e

sua função é produzir espermatozóides. Esse processo é denominado espermatogênese e inclui a divisão celular por mitose e meiose, até a diferenciação final em espermatozóides (RUSSELL et al., 1990). Já as células de Sertoli junto com as células mióides sintetizam a membrana basal, que serve de suporte estrutural para a própria célula de Sertoli, e para as células germinativas que se encontram no compartimento basal dos túbulos seminíferos (DYM, 1994).

### **2.2.2 Proliferação e regulação das células de Sertoli**

As células de Sertoli são células somáticas que estão localizadas no epitélio dos túbulos seminíferos e se comunicam com células vizinhas por meio de junções intercelulares. Participam da formação da barreira hematotesticular, na qual separa o epitélio seminífero em compartimento basal e adluminal, e favorecem o desenvolvimento da espermatogênese, por fornecer suporte estrutural e nutricional às células germinativas (RUSSELL et al., 1990; SHARPE, 1994). As células de Sertoli também realizam a fagocitose das células germinativas em degeneração e do excesso de citoplasma remanescentes após a liberação das espermátides, secreção de fluido testicular, manutenção da integridade do epitélio, participa da espermiação liberando as espermátides no lume tubular, esteroidogênese e metabolismo de esteróides (FRANÇA; CHIARINI-GARCIA, 2005; RUSSELL et al., 1990).

Sabe-se que as células de Sertoli proliferam ativamente durante o período fetal. No entanto, os mecanismos responsáveis por essa proliferação ainda não estão esclarecidos (ORTH, 1984, 1993; MCCOARD; WISE; FORD, 2003). Segundo Baker e O'Shaughnessy (2001), essa proliferação fetal em camundongos é independente de gonadotrofinas. Já no período pós-natal, a literatura relata que o hormônio folículo estimulante (FSH) é o principal

hormônio responsável pela mitose dessas células nesse período (HECKERT; GRISWOLD, 2002; ORTH, 1984, 1993). Porém, ainda não se sabe corretamente, como ocorre esse mecanismo. A literatura sugere que, sob a influência desse hormônio, estrógenos produzidos pela aromatização de andrógenos em células de Sertoli imaturas poderiam exercer uma influência importante na divisão destas células, através da indução do fator de transformação do crescimento beta ( $TGF\beta$ ) (ORTH, 1984, 1993).

Na segunda metade da gestação em suínos, a partir do 75º dia de gestação, as gonadotrofinas FSH e hormônio luteinizante (LH) são identificados na adenohipófise fetal. As concentrações desses hormônios aumentam continuamente nessa glândula, e logo antes do nascimento exibem um pico (MCNAMARA et al., 1985). Já a quantidade de receptores de FSH no testículo, aumenta continuamente, do nascimento até a puberdade (VAN DALEM et al., 1986). Porém, vários estudos realizados em suínos sugerem que os níveis plasmáticos de FSH não estão rigorosamente correlacionados com a proliferação ativa das células de Sertoli, que ocorre durante os períodos finais de gestação e início do pós-natal (FORD et al., 2001; LUNSTRA; WISE; FORD, 2003; MCCOARD; WISE; FORD, 2003; WAGNER; CLAUS, 2009).

Ao contrário do FSH, o hormônio tireoidiano (T3) é responsável pela alteração do estado mitótico para não-mitótico dessas células, antes da puberdade (COOKE et al., 1994; FRANÇA et al., 1995). Através de estudos já publicados, pode-se perceber que esse hormônio está fortemente envolvido na regulação da função das células de Sertoli (CAUSSANEL et al., 1996; COOKE; HOLSEBERGER; FRANÇA, 2005; MCCOARD; WISE; FORD, 2003; SILVA JUNIOR, 2000) porém, ainda não se sabe como ele atua na proliferação e maturação dessas células (COOKE; HOLSEBERGER; FRANÇA, 2005; KLOBUCAR et al., 2003; SILVA JUNIOR, 2000; TARN et al., 1998). Em suínos, o hormônio estimulador da tireoide (TSH) foi detectado aos 75 dias de

gestação e teve sua concentração aumentada de maneira contínua até a 6ª semana após o nascimento (MCNAMARA et al., 1985). Nessa espécie, a proliferação das células de Sertoli pós-natal ocorre mais acentuadamente em dois momentos. O primeiro ocorre desde o nascimento até 1 mês de idade, já o segundo ocorre entre 3 a 4 meses de idade. Esses períodos de proliferação mais evidentes coincidem com os picos de FSH no plasma e também com um aumento do comprimento dos túbulos seminíferos (FRANÇA et al., 2000; KLOBUCAR et al., 2003; KOSCO; LOSETH; CRABO, 1989; TRAN; MEUSY-DESSOLLE; JOSSO, 1981). Já em ratos, essa proliferação ocorre de forma diferente. Ela se inicia após a diferenciação sexual e vai diminuindo após o nascimento. Nessa espécie, a mitose é interrompida com aproximadamente duas a três semanas após o nascimento (BAKER; O'SHAUGHNESSY, 2001; KLUIN; KRAMER; DE ROOIJ, 1984; ORTH; GUNSALUS; LAMPERTI, 1988; VERGOUWEN et al., 1991).

Em todas as espécies de mamíferos, a proliferação de células de Sertoli cessa antes da entrada da puberdade. Assim como também em todas as espécies, essa interrupção ocorre quando a barreira hemato-testicular está formada, o citoesqueleto de actina dentro da célula de Sertoli se desenvolve, e ocorre extensa proliferação de espermatogônias e formação de espermátocitos primários (FRANÇA et al., 2000; GONDOS; BERNDSTON; GOLDSTEIN, 1976; RUSSELL; BARTKE; GOH, 1989). Em suínos, isso ocorre por volta de três a quatro meses de idade (FRANÇA et al., 2000).

O número total de células de Sertoli no testículo vai determinar o tamanho deste, assim como sua produção espermática, visto que cada célula de Sertoli é capaz de suportar apenas um número relativamente fixo de células germinativas, de uma forma específica da espécie (FRANÇA; RUSSELL, 1998; RUSSELL; PETERSON, 1984; ORTH; GUNSALUS; LAMPERTI, 1988). Assim, todos os fatores que influenciam na proliferação de células de Sertoli,

mudanças nos níveis plasmáticos de FSH e seus receptores (ABEL et al., 2000; ORTH; GUNSALUS; LAMPERTI, 1988; SAIRAM; KRISHNAMURTHY, 2001; SHARPE, 1994), deficiência do receptor IIA da ativina (KUMAR et al., 2001), hipotireoidismo neonatal transitório (COOKE et al., 1994; COOKE; ZHAO; BUNICK, 1994) e hemicastração (FORD et al., 2001) irão afetar, conseqüentemente, o número de espermatozoides produzidos por testículo. Além disso, a partir de estudos *in vitro* em roedores, detectou-se que outros fatores também podem estar envolvidos na proliferação e regulação dessas células, como o ácido retinoico, testosterona, estrógenos, ativina, folistatina, inibina, interleucina-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), fator de crescimento tumoral  $\alpha$  e  $\beta$  (TGF $\alpha$  e  $\beta$ ), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento semelhante à insulina I e II (IGF-I e II), fator de célula tronco (SCF) e  $\beta$ -endorfina (BUZZARD et al., 2003; BUZZARD; WREFORD; MORRISON, 2003; KHAN et al., 2002; NAKAI et al., 2001; ORTH, 1986; ORTH; BOEHM, 1990; PETERSEN et al., 2001, 2002).

Assim como esses fatores atuam na proliferação das células de Sertoli, alguns também estão relacionados com o desenvolvimento corporal, como insulina, hormônios tireoideos, glucocorticoides, esteroides sexuais, eixo melanocortina-leptina, além de fatores de crescimento produzidos localmente (BREIER et al., 1998). Dentre os fatores de crescimento, o IGF-I e o IGF-II merecem destaque, pois têm papel importante no crescimento e desenvolvimento da musculatura.

Sabe-se que o IGF-I materno não pode difundir através das membranas placentárias e, portanto, não pode agir diretamente sobre o feto. Contudo, uma elevação na concentração de IGF-I materno, pode promover a transferência de nutrientes através da placenta, e assim melhorar o crescimento fetal (HALL et al., 1986; LASSARE et al., 1991). Hall et al. (1986) citam também que o aumento no IGF-I materno pode resultar num aumento da produção fetal de IGF-I. Dessa maneira, baseado em evidências, pode-se inferir que os IGFs têm

papel fundamental no desenvolvimento fetal. As bases dessas hipóteses são que, primeiramente, os pesos ao nascer de várias espécies estão correlacionados com a concentração de IGF-I, e que ambos, o crescimento fetal e a secreção de IGF-I pelo feto, são independentes do GH, mas dependentes da disponibilidade de substrato (GLUCKMANN, 1986). Em ovinos, o IGF-I e o IGF-II estão presentes nos fluidos uterinos entre os dias 10 e 16 (KO et al., 1991). A expressão de genes para o IGF-I, IGF-II e o TGF $\alpha$  em embriões ovinos no período de pré-implantação, foi descrita por Watson et al. (1994), evidenciando a natureza complexa das interações entre o conceito e os fatores de crescimento de origem uterina, durante o estabelecimento da gestação. É importante ressaltar que os IGFs, assim como todos os hormônios ligados ao crescimento, se relacionam de maneira complexa. Por exemplo, o IGF-II parece ser diretamente regulado pelo nível de glicose, mas não pode suportar o crescimento fetal se a insulina e o IGF-I se apresentarem baixos (GLUCKMANN, 1986).

Com base no exposto, é possível haver alguma relação entre o desenvolvimento gonadal e o desenvolvimento corporal dos conceitos. Essa característica, caso seja comprovada, poderia auxiliar na predição do desenvolvimento gonadal a partir das mensurações corporais dos animais ainda em sua vida uterina.

### **2.3 Ovários**

Assim como os testículos, os ovários também possuem função endócrina e exócrina: endócrina pela produção de hormônios esteróides e peptídeos, e exócrina pela produção de um ou mais oócitos maduros a cada ciclo (HAFEZ, 2004). Apresentam na superfície um epitélio pavimentoso ou cúbico simples, denominado epitélio germinativo. Abaixo desse epitélio fica disposta a túnica albugínea, que se caracteriza por uma camada de tecido conjuntivo denso, e é



responsável pela cor esbranquiçada do ovário. Abaixo dessa túnica há uma região chamada cortical, que contém corpo lúteo, corpos albicans e folículos ovarianos, em vários estágios de desenvolvimento. Já a parte mais interna do ovário, para a maioria das espécies, é a região medular que contém um tecido conjuntivo frouxo entremeado por um leito vascular. Porém, esse limite entre a região cortical e medular, não é muito visível (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

No ovário, cada ovócito associado a um folículo possui o potencial de gerar um novo indivíduo. Para que isso ocorra, uma sequência de eventos complexos e altamente controlados deve ocorrer de forma dinâmica e ordenada. Tais eventos incluem a formação do conjunto de folículos primordiais durante a vida fetal, que constituirão a reserva de folículos na vida adulta, início da ativação desses folículos, ainda no feto, para iniciarem o crescimento e o correto funcionamento na vida adulta, de forma a maximizar a chance do ovócito ser fertilizado (BINELLI; PORTELA; MURPHY, 2009).

### **2.3.1 Oogênese**

A oogênese pode ser definida como o conjunto de processos que compreende o desenvolvimento e diferenciação das células germinativas primordiais da fêmea, até a formação do ovócito haplóide apto a ser fecundado (MARTINS et al., 2008). Esse processo se inicia antes do nascimento, mas somente alguns oócitos conseguem completá-lo meses ou anos mais tarde no animal adulto, após a fecundação (WASSARMAN, 1988).

Durante a vida fetal, no momento em que as CGP colonizam a gônada indiferenciada, essas células perdem sua característica móvel e iniciam mitose, diferenciando-se em ovogônias. A partir de então, passam por sucessivas mitoses e entram na primeira divisão meiótica, quando passam a ser

denominadas de ovócitos primários ou imaturos. Esse processo de meiose é interrompido (primeira parada) no estágio de diplóteno ou dictióteno, ou de vesícula germinativa (VG), ficando nesse estado até que o animal atinja a puberdade (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2001; HURK; ZHAO, 2005).

### 2.3.2 Foliculogênese

É o processo de formação, crescimento e maturação folicular que se inicia com a formação do folículo primordial e termina com o estágio de folículo maduro, também conhecido como folículo de Graaf ou pré-ovulatório (HURK; ZHAO, 2005). A foliculogênese ocorre simultaneamente à oogênese, quando o oócito está entre as fases de prófase I e metáfase II, na maioria das espécies. Em outras palavras, a foliculogênese inicia-se após a oogênese e termina antes dessa última, e pode ser dividida em duas fases: 1) fase pré-antral, que é subdividida em ativação dos folículos primordiais e crescimento dos folículos primários e secundários e; 2) fase antral, subdividida em crescimento inicial e terminal dos folículos terciários (LEITÃO et al., 2009). Os folículos pré-antrais representam cerca de 90 a 95% de toda a população folicular (MACHADO et al., 2002). A figura 1 representa de forma esquemática as fases de desenvolvimentos dos folículos e suas respectivas classificações.

Através de estímulos ainda não completamente explicados, os folículos primordiais formados deixam o *pool* de folículos em repouso, ainda na vida fetal, iniciando o crescimento oocitário, ativando os folículos e passando a ser chamados de folículos primários (WANDJI et al., 1996). Essa ativação folicular acontece devido a uma série de fatores de crescimento como, IGF-I, TGF $\alpha$ , TGF $\beta$ , fator de crescimento epidermal (EGF) e fator de crescimento fibroblástico (FGF) (FIGUEIREDO; RODRIGUES; AMORIM, 2002).



Figura 1: Fases do desenvolvimento de um folículo ovariano. Folículo primordial apresentando uma única camada de células da granulosa com formato achatado. Folículo primário apresentando também uma só camada de células da granulosa, porém, já em formato cubóide e início da formação da zona pelúcida. Folículo secundário apresentando várias camadas de células da granulosa e zona pelúcida formada. Folículo pré-antral apresentando o início da formação do antro. Folículo terciário ou antral apresentando antro e células da teca. Adaptado de: Foliculogênese (2015)

É importante destacar que o aparecimento dos estágios pré-antrais dos folículos tem padrão temporal espécie-específico. Na maioria dos mamíferos, e inclusive nos seres humanos (HURK; ZHAO, 2005), a formação dos folículos se inicia na vida fetal, sendo detectados folículos primordiais, primários e secundários, respectivamente, aos 75, 100 e 120 dias de gestação em ovinos (MCNATTY et al., 1995) e aos 90, 140 e 210 em bovinos (RUSSE, 1983). Já em ratos e camundongos, a formação dos folículos primordiais se inicia somente após o nascimento (HIRSHFIELD, 1991).

Quando os folículos primordiais são ativados, tanto no período pré-natal quanto no pós-natal, ocorre uma série de alterações, como modificação do

formato das células da granulosa de achatado para cúbico, proliferação das células da granulosa e aumento do tamanho do oócito mudando a classificação do folículo, de primordial para primário (GOUGEON; BUSSO, 2000). Ocorre proliferação das células da granulosa, e quando o folículo começa a apresentar mais de duas camadas dessas células em volta do oócito, passa a ser chamado de secundário. No mesmo instante, outras alterações estão acontecendo, tais como: aumento do tamanho do oócito, mutiplicação das organelas, formação da zona pelúcida entre as células da granulosa e o oócito, acúmulo de lipídeos, aumento na síntese de RNA, e absorção de nutrientes. O antro, cavidade folicular, começa a ser formado com o desenvolvimento do folículo. O líquido folicular é sintetizado pelas células foliculares ou células da granulosa, e os folículos tornam-se então terciários ou antrais (FIGUEIREDO; RODRIGUES; AMORIM, 2002).

### **2.3.3 Ativação Folicular**

Entende-se por ativação folicular o processo irreversível pelo qual folículos primordiais entram em crescimento, e passam a ser chamados de folículos primários. Como visto anteriormente, com a ocorrência da ativação, o oócito aumenta de tamanho, e as células da granulosa passam de achatadas para cuboides. Os mecanismos responsáveis por essa ativação ainda não foram compreendidos. Porém, acredita-se que essa ativação inicial é pouco dependente de gonadotrofinas, sendo mais influenciada, provavelmente, por fatores intraovarianos (LEITÃO et al., 2009), como a ativina, EGF, FGF, TGF-  $\alpha$ , TGF-  $\beta$  e IGF-1.

O oócito tem papel ativo na coordenação da proliferação e diferenciação das células da granulosa ao seu redor (GILCHRIST; RITTER; ARMSTRONG, 2004). Comunicação intercelular é proporcionada por processos citoplasmáticos

trans-zonais (TZP), que são extensões das células da granulosa, que penetram através da zona pelúcida, e atingem a membrana do oócito, onde junções do tipo *gap* permitem transporte bidirecional de íons, metabólitos, aminoácidos e pequenas moléculas regulares (ALBERTINI et al., 2001).

A comunicação entre o oócito e as células somáticas também ocorre por sinalização parácrina. Dentre vários fatores de crescimento produzidos pelo oócito ou células da granulosa, o fator de células tronco (SCF; também conhecido como kit-ligante) e membros da família dos TGF- $\beta$ , particularmente o fator de crescimento diferencial-9 (GDF-9) e a proteína morfogenética óssea-15 (BMP-15, também conhecida como GDF-9B) têm recebido a maior parte da atenção (WEBB et al., 2003).

#### **2.4 Desenvolvimento fetal e eficiência reprodutiva**

O período gestacional é dividido em três fases: ovo ou zigoto, embrionária ou organogênese, e fetal. Em suínos, a gestação tem duração média de 114 dias (três meses, três semanas e três dias), podendo variar para mais ou menos quatro dias dependendo da genética, linhagem, ambiente e manejo (ALVARENGA et al., 2011). No 35º dia de gestação inicia-se o segundo terço da fase gestacional. Nessa fase se tem o início da organogênese, e ainda ocorre o processo de calcificação dos fetos, para que haja o término do desenvolvimento corporal (WU et al., 1999). Assim, muitos dos fatores que estão relacionados com a organogênese também podem influenciar no desenvolvimento do feto.

O desenvolvimento normal do ovário e testículo durante a embriogênese é a chave para a fertilidade e sucesso reprodutivo na vida adulta. Em suínos, o processo de foliculogênese tem início com a formação dos folículos durante a vida fetal, ou seja, no nascimento, as crias já têm estabelecido o número de folículos primordiais nas suas gônadas, os quais compõem o estoque de folículos

que vão se desenvolver durante a vida reprodutiva da fêmea (FIGUEIREDO; RODRIGUES; AMORIM, 2002). Sendo assim, a capacidade reprodutiva das fêmeas é determinada durante a vida fetal através da quantidade limitada de oócitos não renováveis.

Em machos, o desenvolvimento do trato reprodutivo durante a vida fetal é de extrema importância para sua vida reprodutiva adulta, uma vez que cada célula de Sertoli é capaz de suportar apenas um número relativamente fixo de células germinais (ABERCROMBIE, 1946; FRANÇA et al., 2000; WING; CHRISTENSEN, 1982). Dessa forma, o número total de células de Sertoli, estabelecido durante o desenvolvimento testicular, determina o tamanho dos testículos e sua produção espermática na vida adulta (ABERCROMBIE, 1946; CONNOLLY et al., 2013; ORTH, 1982). Além do mais, os eventos necessários para uma função normal do testículo na vida adulta, ocorrem durante a vida fetal e pós-natal precoce (NEF; PARADA, 2000; PARISOTTO et al., 2003; PELLINIEMI, 1975; SHARPE-TIMMS et al., 2000). Dentre esses, os mais importantes são a diferenciação das células de Sertoli e Leydig, formação do túbulo seminífero, proliferação de células de Sertoli, e desenvolvimento das gônadas, que ocorrem sob a regulação de andrógenos e estrógenos (PARISOTTO et al., 2003).

A ultrassonografia, também denominada ecografia, é atualmente um método de diagnóstico largamente utilizado na Medicina Veterinária, em todas as espécies. Através dessa técnica pode-se prever a idade do conceito pela existência de padrões biométricos fetais, nos diferentes estágios de gestação para grandes animais, pequenos ruminantes, e suínos (WOLF; GABALDI, 2002). Além do mais, Pieroni (2013) realizou avaliações ultrassonográficas de fêmeas suínas em diferentes idades gestacionais, avaliou as mensurações fetais, e elaborou uma equação que prevê o peso ao nascimento, demonstrando que é possível obter os tamanhos dos fetos através desse exame. Analisando a equação

elaborada pelos autores citados anteriormente, observa-se uma correlação positiva direta entre o comprimento e circunferências fetais, com o peso ao nascimento. Com isso, saber se há correlação dos parâmetros morfométricos dos órgãos reprodutivos durante a fase fetal, com mensurações fetais, ajudaria a prever a qualidade reprodutiva do animal ainda no útero.

### **3 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Sabe-se que eventos que ocorrem durante o desenvolvimento gonadal fetal podem influenciar na vida reprodutiva do animal adulto. Considerando que alguns parâmetros histológicos de testículo e ovário, como contagem de células e morfometria de estrutura das gônadas, podem prever a eficiência reprodutiva do animal, a tentativa de correlacionar esses parâmetros com medidas fetais se torna importante, uma vez que seria possível, durante a vida uterina, saber a capacidade reprodutiva do animal.

## REFERÊNCIAS

ABEL, M. H. et al. The effect of a null mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene on mouse reproduction. **Endocrinology**, Los Angeles, v. 141, n. 5, p. 1795-1803, May 2000.

ABERCROMBIE, M. Estimation of nuclear population from microtome sections. **The Anatomical Record**, New York, v. 94, p. 239-247, Feb. 1946.

ALBERTINI, D. F. et al. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction**, Cambridge, v. 121, n. 5, p. 647-653, May 2001.

ALMEIDA, J. M. **Embriologia veterinária comparada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 125 p.

ALVARENGA, A. L. N. et al. **Aspectos reprodutivos e estresse na espécie suína**. Lavras: UFLA, 2011. 40 p. (Boletim Técnico, 86).

AMANN, R. P. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 2, n. 1, p. 37-58, Jan. 1981.

BAKER, P. J.; O'SHAUGHNESSY, P. J. Role of gonadotrophins in regulating numbers of Leydig and Sertoli cells during fetal and postnatal development in mice. **Reproduction**, Cambridge, v. 122, n. 2, p. 227-234, Aug. 2001.

BIELAŃSKA-OSUCHOWSKA, Z. Oogenesis in pig ovaries during the prenatal period: ultrastructure and morphometry. **Reproduction Biology**, Olsztyn, v. 6, n. 2, p. 161-193, July 2006.

BINELLI, M.; PORTELA, V. M.; MURPHY, B. D. Dinâmica ovariana e eficiência reprodutiva: estado da arte. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 18., 2009, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 2009. 1 CD-ROM.



BREIER, B. H. et al. Therapy with growth hormone: major prospects for the treatment of male subfertility? **Endocrine Journal**, Tokyo, v. 45, p. S53-S60, 1998. Supplement.

BUZZARD, J. J. et al. Proliferative phase sertoli cells display a developmentally regulated response to activin in vitro. **Endocrinology**, Los Angeles, v. 144, n. 2, p. 474-483, Feb. 2003.

BUZZARD, J. J.; WREFORD, N. G.; MORRISON, J. R. Thyroid hormone, retinoic acid, and testosterone suppress proliferation and induce markers of differentiation in cultured rat Sertoli cells. **Endocrinology**, Los Angeles, v. 144, n. 9, p. 3722-3731, Sept. 2003.

CAPEL, B. The battle of the sexes. **Mechanisms of development**, New York, v. 92, n. 1, p. 89-103, Mar. 2000.

CAUSSANEL, V. et al. Cellular distribution of EGF, TGFalpha and their receptor during postnatal development and spermatogenesis of the boar testis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v. 123, n. 1, p. 61-69, Oct. 1996.

COMBES, A. N. et al. Three-dimensional visualization of testis cord morphogenesis, a novel tubulogenic mechanism in development. **Developmental Dynamics**, New York, v. 238, n. 5, p. 1033-1041, May 2009.

CONNOLLY, F. et al. Excess androgens in utero alters fetal testis development. **Endocrinology**, Los Angeles, v. 154, n. 5, p. 1921-1933, May 2013.

COOKE, P.; HOLSEBERGER, D. R.; FRANÇA, L. R. Thyroid hormone regulation of Sertoli cell development. In: SKINNER, M. K.; GRISWOLD, M. D. (Ed.). **Sertoli cell biology**. New York: Elsevier Academic, 2005. p. 217-226.

COOKE, P. S. et al. Neonatal propylthiouracil (PTU) treatment as a model system for studying factors controlling testis growth and sperm production. In: BARTKE, A. (Ed.). **Function of somatic cells in the testis**. New York: Springer-Verlag, 1994. p.400-407.

COOKE, P. S.; ZHAO, Y. D.; BUNICK, D. Triiodothyronine inhibits proliferation and stimulates differentiation of cultured neonatal Sertoli cells: possible mechanism for increased adult testis weight and sperm production induced by neonatal goitrogen treatment. **Biology of Reproduction**, New York, v. 51, n. 5, p. 1000-1005, Nov. 1994.

COUROT, M.; HOCHEREAU-DE-REVIERS, M. T.; ORTAVANT, R. Spermatogenesis. In: JOHNSON, A. D.; GOMES, W. R.; VANDEMARK, N. L. (Ed.). **The testis**. New York: Academic, 1970. v. 1, p. 339-432.

DYM, M. Spermatogonial stem cells of the testis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, n. 24, p. 11287-11289, Nov. 1994.

FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A. Manipulação de ovócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais – MOIFOPA. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. (Ed.). **Biotécnicas aplicadas á reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2002. p. 227-260.

FOLICULOGÊNESE. Disponível em:  
<<http://www.mcguido.com.br/foliculogenese.htm>>. Acesso em: 10 nov. 2015.

FORD, J. J. et al. Interrelationships of porcine X and Y chromosomes with pituitary gonadotropins and testicular size. **Biology of Reproduction**, New York, v. 65, n. 3, p. 906-912, Sept. 2001.

FRANÇA, L. R.; CHIARINI-GARCIA, H. Célula de Sertoli. In: CARVALHO, H. F.; BUZATO, C. B. (Ed.). **Células: uma abordagem multidisciplinar**. Barueri: Manole, 2005. p. 302-324.

FRANÇA, L. R. et al. Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. **Biology of Reproduction**, New York, v. 63, n. 6, p. 1629-1636, Dec. 2000.

FRANÇA, L. R. et al. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. **Biology of Reproduction**, New York, v. 59, n. 6, p. 1371-1377, Dec. 1998.

FRANÇA, L. R. et al. Neonatal hypothyroidism causes delayed Sertoli cell maturation in rats treated with propylthiouracil: evidence that the Sertoli cell controls testis growth. **The Anatomical Record**, New York, v. 242, n. 1, p. 57-69, May 1995.

GILBERT, S. F. **Biologia do desenvolvimento**. 5. ed. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2003. 994 p.

GILCHRIST, R. B.; RITTER, L. J.; ARMSTRONG, D. T. Oocyte–somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 82/83, p. 431-446, July 2004.

GLUCKMAN, P. D. The regulation of fetal growth. In: BUTTERY, P. J.; HAYNES, N. B.; LINDSAY, D. B. (Ed.). **Control and manipulation of animal growth**. London: Butterworth, 1986. p. 85-104.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas á reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2001. 340 p.

GONDOS, B.; RENSTON, R. H.; GOLDSTEIN, D. A. Postnatal differentiation of Leydig cells in the rabbit testis. **The American Journal of Anatomy**, Philadelphia, v. 145, n. 2, p. 167-182, Feb. 1976.

GOUGEON, A.; BUSSO, D. Morphologic and functional determinants of primordial and primary follicles in the monkey ovary. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v. 163, n. 1/2, p. 33-42, May 2000.

HAFEZ, E. S. E. Anatomia da reprodução feminina. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. (Ed.). **Reprodução animal**. 7. ed. Barueri: Manole, 2004. p. 13.

HALL, K. et al. Serum levels of somatomedins and somatomedins binding protein in pregnant women with type I or gestacional diabetes and their infants. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Chevy Chase, v. 63, n. 6, p. 1300-1306, Dec. 1986.

HECKERT, L. L.; GRISWOLD, M. D. The expression of the follicle-stimulating hormone receptor in spermatogenesis. **Recent Progress in Hormone Research**, New York, v. 57, p. 129-144, 2002.

HIRSHFIELD, A. N. Development of follicles in the mammalian ovarian. **International Review of Cytology**, New York, v. 124, p. 43-101, 1991.

HURK, R. van den; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, diferentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 63, n. 6, p. 1717-1751, Apr. 2005.

HYTTEL, P.; SINOWATZ, F.; VEJLSTED, M. **Embriologia veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2012. 472 p.

ILIO, K. Y.; HESS, R. A. Structure and function of the ductuli efferentes: a review. **Microscopy Research and Technique**, New York, v. 29, n. 6, p. 432-467, Dec. 1994.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. Aparelho reprodutor feminino. In: \_\_\_\_\_. **Histologia básica-texto e atlas**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2008. p. 431-448.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. Aparelho reprodutor masculino. In: \_\_\_\_\_. **Histologia básica-texto e atlas**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2008. p. 414-428.

KAMINSKI, M. A.; CORBIN, C. J.; CONLEY, A. J. Development and differentiation of the interstitial and tubular compartments of fetal porcine testes. **Biology of Reproduction**, New York, v. 60, n. 1, p. 119-127, Jan. 1999.

KANAI, T.; MINEMOTO, S.; SAKAI, H. Quantum interference during high-order harmonic generation from aligned molecules. **Nature**, London, v. 435, n. 7041, p. 470-474, May 2005.

KARL, J.; CAPEL, B. Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. **Developmental Biology**, New York, v. 203, n. 2, p. 323-333, Nov. 1998.

KHAN, S. A. et al. Follicle-stimulating hormone amplifies insulin-like growth factor I-mediated activation of AKT/protein kinase B signaling in immature rat Sertoli cells. **Endocrinology**, Los Angeles, v. 143, n. 6, p. 2259-2267, June 2002.

KLOBUCAR, I. et al. Postnatal hypothyroidism does not affect prepubertal testis development in boars. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 38, n. 3, p. 193-198, June 2003.

KLUIN, P. M.; KRAMER, M. F.; DE ROOIJ, D. G. Proliferation of spermatogonia and Sertoli cells in maturing mice. **Anatomy and Embryology**, Berlin, v. 169, n. 1, p. 73-78, 1984.

KO, K. et al. Insulin-like growth factors in sheep uterine fluids: concentrations and relationship to ovine trophoblast protein-1 production during early pregnancy. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 45, n. 1, p. 135-142, July 1991.

KOSCO, M. S.; LOSETH, K. J.; CRABO, B. G. Development of the testicular interstitium after neonatal hemicastration in the boar. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 87, n. 1, p. 13-21, Sept. 1989.

KUMAR, T. R. et al. Male reproductive phenotypes in double mutant mice lacking both FSH $\beta$  and activin receptor IIA. **Endocrinology**, Los Angeles, v. 142, n. 8, p. 3512-3518, Aug. 2001.

LASSARE, C. et al. Serum insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in the human fetus: relationships with growth in normal

subjects and is subjects with intrauterine growth retardation. **Pediatric Research**, New York, v. 29, n. 3, p. 219-225, Mar. 1991.

LEITÃO, C. C. F. et al. Importância dos fatores de crescimento locais na regulação da foliculogênese ovariana em mamíferos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 37, n. 3, p. 215-224, Jan. 2009.

LUNSTRA, D. D.; WISE, T. H.; FORD, J. J. Sertoli cells in the boar testis: changes during development and compensatory hypertrophy after hemicastration at different ages. **Biology of Reproduction**, New York, v. 68, n. 1, p. 140-150, Jan. 2003.

MACHADO, V. P. et al. Isolamento mecânico e enzimático de folículos ovarianos pré-antrais de fetos caprinos. **Ciência Animal**, Fortaleza, v. 12, n. 2, p. 83-91, 2002.

MARTINS, F. S et al. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 32, n. 1, p. 36-49, jan./mar. 2008.

MCCOARD, S. A. et al. Specific staining of Sertoli cell nuclei and evaluation of Sertoli cell number and proliferative activity in Meishan and White Composite boars during the neonatal period. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 64, n. 2, p. 689-695, Feb. 2001.

MCCOARD, S. A.; WISE, T. H.; FORD, J. J. Endocrine and molecular influences on testicular development in Meishan and White Composite boars. **Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 178, n. 3, p. 405-416, Sept. 2003.

MCNAMARA, M. et al. The ontogeny of hypothalamic pituitary function in the pig: I, pituitary LH and FSH in the fetus and neonate. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v. 39, n. 8, p. 119-124, Feb. 1985.

MCNATTY, K. P. et al. Development of the sheep ovary during fetal and early neonatal life and the effect of fecundity genes. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 49, p. 123-135, 1995.

MERCHANT-LARIOS, H.; MORENO-MENDOZA, N. Onset of sex differentiation: dialog between genes and cells. **Archives of Medical Research**, Mexico, v. 32, n. 6, p. 553-558, Nov./Dec. 2001.

NAKAI, M. et al. Morphological analysis of endocytosis in efferent ductules of estrogen receptor-alpha knockout male mouse. **The Anatomical Record**, New York, v. 263, n. 1, p. 10-18, May 2001.

NEF, S.; PARADA, L. F. Hormones in male sexual development. **Genes & Development**, Cold Spring Harbor, v. 14, n. 24, p. 3075-3086, 2000.

ORTH, J. M. Cell biology of testicular development in fetus and neonate. In: DESJARDINS, C.; EWING, L. L. (Ed.). **Cell and molecular biology of the testis**. New York: Oxford University, 1993. p. 3-42.

ORTH, J. M. FSH-induced Sertoli cell proliferation in the developing rat is modified by beta-endorphin produced in the testis. **Endocrinology**, Los Angeles, v. 119, n. 4, p. 1876-1878, Oct. 1986.

ORTH, J. M. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. **Anatomical Record**, New York, v. 203, n. 4, p. 485-492, Aug. 1982.

ORTH, J. M. The role of follicle-stimulating hormone in controlling Sertoli cell proliferation in testes of fetal rats. **Endocrinology**, Los Angeles, v. 115, n. 4, p. 1248-1255, Oct. 1984.

ORTH, J. M.; BOEHM, R. Endorphin suppresses FSH-stimulated proliferation of isolated neonatal Sertoli cells by a pertussis toxin-sensitive mechanism. **The Anatomic Record**, New York, v. 226, n. 3, p. 320-327, Mar. 1990.

ORTH, J. M.; GUNSALUS, G. L.; LAMPERTI, A. A. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers

of Sertoli cells produced during perinatal development. **Endocrinology**, Los Angeles, v. 122, n. 3, p. 787-794, Mar. 1988.

PARISOTTO, L. et al. Gender differences in sexual development: biologic, psychoanalytic and evolutionary paradigms integration. **Revista de Psiquiatria do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, v. 25, p. 75-87, Apr. 2003.

PARK, S. Y.; JAMESON, J. L. Minireview: transcriptional regulation of gonadal development and differentiation. **Endocrinology**, Los Angeles, v. 146, n. 3, p. 1035-1042, Dec. 2004.

PELLINIEMI, L. J. Ultrastructure of the early ovary and testis in pig embryos. **American Journal of Anatomy**, Philadelphia, v. 144, n. 1, p. 89-111 Sept. 1975.

PERTERSEN, C. et al. Transforming growth factor-alpha stimulates proliferation of rat Sertoli cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v. 181, n. 1/2, p. 221-227, July 2001.

PETERSEN, C. et al. Interleukin-1 is a potent growth factor for immature rat Sertoli cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v. 186, n. 1, p. 37-47, Jan. 2002.

PIERONI, P. M. R. L. **Estimativa do peso de fetos suínos por meio do exame ultrassonográfico**. 2013. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

RUSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliotheca Anatomica**, Hamburg, v. 24, p. 77-92, 1983.

RUSSELL, L. D.; BARTKE, A.; GOH, J. C. Postnatal development of the Sertoli cell barrier, tubular lumen, and cytoskeleton of Sertoli and myoid cells in the rat, and their relationship to tubular fluid secretion and flow. **The American Journal of Anatomy**, Philadelphia, v. 184, n. 3, p. 179-189, Mar. 1989.



RUSSELL, L. D. et al. A comparative study in 12 mammalian species of volume densities, volumes, and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell. **The American Journal of Anatomy**, Philadelphia, v. 188, n. 1, p. 21-30, May 1990.

RUSSELL, L. D.; PETERSON, R. N. Determination of the elongate spermatid-Sertoli cell ratio in various mammals. **Journal Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 70, n. 2, p. 635-641, Mar. 1984.

SAIRAM, M. R.; KRISHNAMURTHY, H. The role of follicle-stimulating hormone in spermatogenesis: lessons from knockout animal models. **Archives of Medical Research**, Mexico, v. 32, n. 6, p. 601-608, Nov./Dec. 2001.

SEKIDO, R. et al. SOX9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. **Developmental Biology**, New York, v. 274, n. 2, p. 271-279, Oct. 2004.

SETCHELL, B. P.; MADDOCKS, S.; BROOKS, D. E. Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. (Ed.). **The physiology of reproduction**. New York: Raven, 1994. p. 1063-1175.

SHARPE, R. M. Environmental/lifestyle effects on spermatogenesis. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, London, v. 365, n. 1546, p. 1697-16712, May 2010.

SHARPE, R. M. Regulation of spermatogenesis. **The Physiology of Reproduction**, New York, v. 1, p. 1363-1434, 1994.

SHARPE-TIMMS, K. L. et al. Differential in vivo expression and localization of endometriosis protein-I (ENDO-I), a haptoglobin homologue, in endometrium and endometriotic lesions. **Human Reproduction**, Oxford, v. 15, n. 1, p. 101-105, July 2000.

SILVA JÚNIOR, V. A. **Efeitos da indução do hipotireoidismo e hipertireoidismo pós-natal na proliferação das células de Sertoli e na função**

**testicular de suínos**. 2000. 191 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

TARN, C. Y. et al. Effects of 6-N-propyl-2-thiouracil on growth, hormonal profiles, carcass and reproductive traits of boars. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 50, n. 1/2, p. 81-94, Feb. 1998.

TILMANN, C.; CAPEL, B. Cellular and molecular pathways regulating mammalian sex determination. **Recent Progress in Hormone Research**, San Diego, v. 57, p. 1-18, 2002.

TRAN, D.; MEUSY-DESSOLLE, N.; JOSSO, N. Waning of anti-mullerian activity: an early sign of Sertoli cell maturation in the developing pig. **Biology of Reproduction**, New York, v. 24, n. 4, p. 923-931, May 1981.

VAN DALEM, J. L. et al. Developmental changes in gonadotrophins and testicular gonadotrophin receptors in the pig, from neonatal to adult life. **The Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 111, n. 2, p. 301-308, Nov. 1986.

VERGOUWEN, R. P. et al. Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. **Journal of Reproduction Fertility**, Colchester, v. 93, n. 1, p. 233-243, Sept. 1991.

WAGNER, A.; CLAUS, R. The effects of postnatal FSH substitution on Sertoli cell number and the sperm production capacity of the adult boar. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 110, n. 3/4, p. 269-282, Feb. 2009.

WANDJI, S. A. et al. Initiation in vitro of growth of bovine primordial follicles. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 55, n. 5, p. 942-948, Nov. 1996.

WASSARMAN, P. M. The mammalian ovum. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. (Ed.). **The physiology of reproduction**. New York: Raven, 1988. p. 69-101.

WATSON, A. J. et al. A growth factor phenotype map for ovine preimplantation development. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 50, n. 4, p. 725-733, Apr. 1994.

WEBB, R. et al. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. **Reproduction Supplement**, Cambridge, v. 61, p. 71-90, 2003.

WING, T. Y.; CHRISTENSEN, A. K. Morphometric studies on rat seminiferous tubules. **American Journal of Anatomy**, Philadelphia, v. 165, n. 1, p. 13-25, Sept. 1982.

WOLF, A.; GABALDI, S. H. Ultrasonographic accompaniment of gestation in large animals: part II. **Ciências Agrárias e Saúde**, Andradina, v. 2, n. 2, p. 84-89, jul./dez. 2002.

WU, G. et al. Amino acid composition of the fetal pig. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 129, n. 5, p. 1031-1038, May 1999.

YAO, H. H. et al. The battle of the sexes: opposing pathways in sex determination. **Novartis Foundation Symposium**, New York, v. 244, p. 187-198, 2002.

## **CAPITULO II - ARTIGO**

### **Características histológicas das gônadas de fetos suínos e suas relações com as medidas fetais**

Thais Preisser Pontelo<sup>a</sup>, José Rafael Miranda<sup>a</sup>, Márcio Gilberto Zangeronimo<sup>a</sup> et al.

<sup>a</sup>Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras,  
Lavras, Minas Gerais, 37200-000, Brasil

Artigo formatado segundo as normas da revista Theriogenology

## 1. Introdução

As gônadas, masculinas e femininas são órgãos com funções endócrina e exócrina responsáveis pela produção de hormônios reprodutivos e gametas, respectivamente. A eficiência desses órgãos na vida adulta está diretamente relacionada com a qualidade reprodutiva dos animais. Entretanto, inúmeros fatores que ocorrem não só na fase adulta [1] mas também durante o período de desenvolvimento fetal [2] podem influenciar a atividade gonadal e, conseqüentemente, a capacidade reprodutiva do animal [3,4]. Os fatores que influenciam o desenvolvimento gonadal do feto e sua relação com a atividade reprodutiva pós-natal têm sido estudados nas diferentes espécies animais [5,6].

Durante a vida fetal, os eventos relacionados à organogênese reprodutiva são regulados não só pela expressão gênica, mas também por fatores externos. A temperatura ambiente [7], nutrição [8] e até mesmo ruídos durante a gestação [2] podem influenciar o desenvolvimento gonadal nos fetos. Nesse sentido, estudos mostram, em humanos, que o baixo desenvolvimento gonadal *in utero* pode estar associado a distúrbios reprodutivos na vida adulta como atraso na puberdade [9] e reduzido tamanho do útero e ovários durante a vida reprodutiva [10]. Em cordeiros machos, a subnutrição a partir da segunda metade da gestação reduziu o número de células de Sertoli nos testículos no período pós-natal [5], sugerindo que a falta de nutrientes durante a gestação poderia comprometer os índices reprodutivos da prole.

Problemas na organogênese reprodutiva podem ser decorrentes de alterações no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal que reduziriam a produção de andrógenos e estrógenos e, conseqüentemente, o desenvolvimento corporal e as características sexuais secundárias dos fetos [11]. Além disso, outros eventos importantes seriam afetados como a migração, proliferação e meiose das células germinativas e a foliculogênese, que determina a população de folículos ao

nascimento e o número de folículos que podem ser recrutados durante a vida adulta [12]. Até mesmo o comportamento reprodutivo dos animais na vida poderia ser influenciado pelo baixo desenvolvimento gonadal, uma vez que os processos de diferenciação sexual de determinadas regiões do cérebro são dependentes de hormônios sexuais produzidos antes e após o nascimento [13,14]. Dessa forma, evidências mostram que o desenvolvimento gonadal durante a vida fetal pode estar diretamente relacionado à capacidade reprodutiva pós-natal.

Estudos que correlacionem o desenvolvimento histológico gonadal com o desenvolvimento corporal fetal de reprodutores suínos de elevado potencial genético para ganho de peso são escassos. Atualmente, a estimativa das medidas fetais *in vivo* por meio da ultrassonografia [15] poderia prever o desenvolvimento gonadal e, com isso, representar uma ferramenta para a escolha de futuros reprodutores ainda na vida uterina. Dessa forma, objetivou-se avaliar as características histomorfométricas dos testículos e ovários de suínos em diferentes idades gestacionais e correlacionar tais características com peso e comprimento fetal e perímetros cefálico e torácico dos fetos.

## **2. Material e Métodos**

### *2.1 Animais e procedimento experimental*

Os procedimentos descritos neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Lavras (número de protocolo 079/2014). Foram utilizados 21 fetos machos e 23 fetos fêmeas sendo os machos provenientes de dez marrãs e as fêmeas de oito. As marrãs eram da genética DB-90 (Genética Suína DB-DanBred, Patos de Minas, MG, Brazil), todas primíparas com peso de  $153,7 \pm 11,9$  kg no momento do abate e idade aproximada de 240 dias, alojadas em gaiolas individuais de gestação no Centro Experimental de Suínos da Universidade Federal de Lavras. Ao quarto cio

detectado, as marrãs foram submetidas à inseminação artificial com sêmen de um único reprodutor (Large White) de fertilidade comprovada. Três inseminações foram realizadas em cada marrã, sendo a primeira no momento em que a fêmea apresentou o reflexo de tolerância ao macho (0 horas), a segunda 12 horas após e a terceira 24 horas após a primeira inseminação. O dia da última inseminação foi considerado o dia 0 de gestação.

Durante o período experimental, os animais foram alimentados com ração específica para a fase, formulada a base de milho e farelo de soja para conter 300g/animal/dia de proteína bruta e 6.340kcal de energia metabolizável, adicionada de vitaminas e minerais seguindo as recomendações nutricionais para animais em crescimento e depois para animais em gestação [16]. As rações foram fornecidas duas vezes ao dia, sendo às 8:00 e às 16:00.

As fêmeas foram distribuídas aleatoriamente em três grupos definidos pela idade gestacional de abate: 50, 80 e 106 dias de gestação. Durante todo o experimento foi realizado o acompanhamento diário da temperatura do ambiente com auxílio de termômetros de máxima e mínima. A temperatura diária média registrada foi de  $23,2 \pm 2,0$  °C.

## *2.2 Abate e coleta de material*

Às 18:00 horas do dia anterior ao abate, as fêmeas foram transportadas para o frigorífico comercial Ipê, localizado em Lavras-MG, Brasil. Os animais permaneceram em baias de espera sem acesso a alimentos por 12 horas e foram abatidos no período da manhã (7:00) por meio de insensibilização elétrica seguida de sangria, seguindo as normas da Portaria Nº 711, de 1º de novembro de 1995 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento [17]. Após o abate, todo o trato reprodutivo da fêmea foi removido e imediatamente encaminhado ao Laboratório de Fisiologia e Farmacologia do Departamento de Medicina Veterinária (DMV) da UFLA. Inicialmente, foi feita uma incisão na

região da curvatura maior de cada corno uterino para retirada dos fetos. Os fetos que exibiram características morfológicas anormais como reduzida dimensão em comparação com os seus pares, esbranquiçados, esverdeados ou mesmo de cor enegrecida, friáveis ou de consistência amolecida, foram considerados não-viáveis [18] e não foram utilizados no experimento.

### *2.3 Coleta e preparação dos testículos e ovários*

Imediatamente após a retirada do útero, os fetos foram pesados e tiveram o comprimento fetal e os perímetros cefálico e torácico mensurados com auxílio de balança digital (Shimadzu, Shimadzu do Brasil Comércio Ltda, São Paulo, Brasil) e fita métrica, respectivamente. Em seguida, os testículos e ovários foram dissecados e pesados. O testículo direito de cada animal foi fixado em solução de glutaraldeído tamponado a 5% para análises histomorfométricas, enquanto o outro teve a túnica albugínea retirada e pesada para determinação do percentual do peso em relação à gônada. Os ovários foram fixados em solução Bouin para posterior confecção de lâminas histológicas de acordo com a metodologia adaptada de Straaten & Wensing [19]. As lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina e, em seguida, preparadas para análises histomorfométricas de acordo com a rotina do Laboratório de Histologia do DMV da UFLA.

### *2.4 Morfometria testicular*

As análises histomorfométricas foram realizadas a partir de fotomicrografia obtida por um sistema de captura de imagem que consiste em microscópio trinocular (CX31, Olympus Optical do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), câmera de captura de imagem digital (SC30, Olympus Optical do Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), *software* AnalySIS GetIT (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Múnster, Alemanha) e lentes oculares com aumento de 40x e



100x. As imagens obtidas por esse sistema foram analisadas com o *software* Image J (NIH, Research Services Branch, Bethesda, Maryland, EUA).

Para a avaliação testicular, as proporções volumétricas do compartimento tubular (lume, epitélio e túnica própria) e intertubular (células de Leydig, vasos sanguíneos e tecido conjuntivo) foram avaliados a partir da sobreposição das imagens obtidas com uma grátícula contendo 352 intersecções no *software* Image J. Para isso, 15 campos por testículo de cada animal foram analisados, perfazendo-se um total de 5.280 pontos. A padronização das avaliações de morfometria testicular seguiu a metodologia adaptada de França et al. [20].

Para determinação do diâmetro cordonal médio de cada animal foi realizada a mensuração ao acaso de 30 secções transversais de cordões seminíferos que apresentaram o contorno mais circular possível [21]. O comprimento cordonal total (CT) dos túbulos seminíferos de cada testículo foi estimado pela seguinte fórmula:  $CT = VTS/\pi R^2$ , onde VTS é igual ao volume total (mL) ocupado pelos túbulos seminíferos no testículo, R é o raio tubular e  $\pi R^2$  a área de secção transversal de túbulos seminíferos ( $R = \text{diâmetro tubular}/2$ ) [22, 23]. O volume total do túbulo seminífero (mL) foi estimado a partir do conhecimento do percentual ocupado pelos mesmos no testículo e do conhecimento do volume líquido do testículo, calculado pela diferença entre o peso bruto do testículo o peso da túnica albugínea. Como a densidade do testículo é muito próxima de 1 (1,03 a 1,04) [24], o peso do testículo foi considerado igual ao seu volume.

O número total de células de Sertoli por testículo foi estimado a partir da contagem corrigida (CC) do número de núcleos de células de Sertoli e espessura do corte histológico, seguindo a fórmula de Abercrombie [25] modificada por Amann [26], sendo que o DM é o diâmetro médio das células de Sertoli, conforme segue:

$$CC = \text{contagem obtida} \times \frac{\text{espessura do corte}}{\text{espessura do corte} + \sqrt{\left(\frac{DM}{2}\right)^2 - \left(\frac{DM}{4}\right)^2}}$$

O diâmetro nuclear médio das células de Sertoli foi obtido a partir da média da mensuração dos eixos nucleares maior e menor de 30 células [32]. O volume nuclear ( $\mu\text{m}^3$ ) foi então obtido pela seguinte fórmula:  $VN = 4/3 \pi R^3$ , onde VN = volume nuclear e R = diâmetro nuclear/2. A partir do número de células de Sertoli por testículo e do peso do testículo, o número de células de Sertoli por grama de testículo foi calculado.

### 2.5 Morfometria ovariana

Os programas usados para as análises histomorfométricas dos ovários foram os mesmos descritos no item 2.4. Para avaliar o diâmetro do núcleo de ovogônias, a média do diâmetro menor e maior foi calculada a partir de 30 núcleos. Para o cálculo da porcentagem de núcleo e citoplasma de ovogônias, foram avaliados 1.000 pontos sobre essas células. Para essa análise, uma grátula de 352 pontos foi sobreposta a fotomicrografias de nichos ovogônias obtidas pelo sistema de captura de imagem já descrito anteriormente em aumento de 1.000 vezes.

A contagem do número de ovogônias, folículos primordiais e folículos em crescimento foi feita utilizando um quadrado de área equivalente a  $10.000 \mu\text{m}^2$  e o número de cada uma dessas estruturas foi multiplicado pela espessura do corte ( $5 \mu\text{m}$ ) para se obter valores em  $\mu\text{m}^3$ , que foram convertidos em  $\text{mm}^3$  [27]. O volume total ( $\mu\text{m}^3$ ) de cada célula foi calculado utilizando-se a seguinte fórmula:  $V = 4/3 \pi R^3$ , sendo que R é o diâmetro médio da célula dividido por dois. Foram considerados como folículos primordiais aqueles folículos constituídos por um ovócito e uma camada de células foliculares achatadas, a maioria localizada na região cortical próximo da túnica albugínea. Folículos

primários e secundários foram considerados como folículos em crescimento, sendo que os folículos primários aqueles que apresentaram uma única camada de células cubóides e os secundários mais de uma camada de células cubóides ou com antro folicular presente [28].

### *2.6 Análise estatística*

Para comparar o desenvolvimento gonadal entre as diferentes idades gestacionais, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste SNK a 5%. Cada feto consistiu em uma unidade experimental. Para correlacionar as medidas histomorfométricas com as características fetais, o teste de correlação de Spearman foi utilizado. Toda análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico Action 2.5.

## **3. Resultados**

### *3.1. Avaliação gonadal em fetos suínos machos*

O peso dos testículos dos fetos suínos aumentou ( $P < 0,05$ ) de forma expressiva ao longo da gestação (Figura 1), especialmente entre o 80º e 106º dia, em que houve incremento de 322%, enquanto que, no período entre o 50º e o 80º dia, foi de 202%. Aos 106 dias de gestação o comprimento cordonal e número de células de Sertoli apresentaram-se maior em relação aos demais períodos (Tabela 1). Menor volume nuclear das células de Sertoli foi observado ( $P < 0,05$ ) nos dois últimos períodos gestacionais avaliados. Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) na proporção de compartimento tubular nem no número de células de Sertoli por

grama de testículo. Na figura 2 são ilustradas os parênquimas testiculares dos fetos suínos nas diferentes idades gestacionais avaliadas.

O peso das gônadas, o comprimento cordonal e o número de células de Sertoli foram positivamente correlacionadas ( $P < 0,01$ ) com o peso e comprimento dos fetos e com os perímetros cefálico e torácico (Tabela 2). Por outro lado, houve correlações negativas ( $P < 0,02$ ) entre o índice gonadossomático, porcentagem de compartimento tubular e volume nuclear das células de Sertoli com o peso e as medidas fetais. Nenhuma correlação ( $P > 0,05$ ) entre peso e medidas fetais foi observada com o diâmetro cordonal e número de células de Sertoli por grama de testículo.

### *3.2. Avaliação gonadal em fetos suínos fêmeas*

O peso dos ovários dos fetos suínos também aumentou ( $P < 0,05$ ) ao longo da gestação (Figura 1). O número total de folículos foi maior ( $P < 0,05$ ) aos 80 e 106 dias de gestação quando comparado aos 50 dias, sendo que os folículos em crescimento só foram visualizados aos 106 dias (Tabela 3). Enquanto o número total de ovogônias tenha diminuído ( $P < 0,05$ ) ao longo da gestação, observou-se aumento ( $P < 0,05$ ) do volume total dessas células, sendo que, aos 106 dias, observou-se ( $P < 0,05$ ) menor proporção de núcleo e maior proporção de citoplasma nessas células. O diâmetro nuclear das ovogônias foi maior ( $P < 0,05$ ) a partir dos 80 dias de gestação. Quanto aos folículos primordiais maiores diâmetro e volume folicular, bem como maior diâmetro celular e nuclear de seus oócitos foram observados ( $P < 0,05$ ) aos 80 e 106 dias de gestação. Na Figura 3 são ilustradas as estruturas histológicas dos ovários dos fetos suínos nas diferentes idades gestacionais. O peso das gônadas, o número total de folículos, a porcentagem de folículos em crescimento, o volume total das ovogônias, a proporção de citoplasma das ovogônias e diâmetro de núcleo das ovogônias foram positivamente correlacionados ( $P < 0,03$ ) com o peso e

comprimento dos fetos e com os perímetros cefálico e torácico (Tabela 4). Correlações negativas ( $P < 0,03$ ) entre o índice gonadossomático, número total de ovogônias e porcentagem de núcleo das ovogônias com o peso e as medidas fetais foram observadas.

Com relação aos folículos em seus diferentes estágios de desenvolvimento, houve correlações positivas ( $P < 0,01$ ) entre o diâmetro total dos folículos primordiais, diâmetro do oócito e diâmetro do núcleo do oócito desses folículos com o peso as medidas fetais. Também houve correlações positivas ( $P < 0,01$ ) entre o diâmetro e volume dos folículos em crescimento bem como diâmetro celular e nuclear de seus oócitos com o peso e as medidas fetais.

Não houve correlações ( $P > 0,05$ ) entre o peso e as medidas fetais com a proporção e volume dos folículos primordiais.

## **4. Discussão**

### *4.1. Avaliação gonadal em fetos suínos machos*

A descrição do desenvolvimento histológico gonadal em fetos suínos e sua relação com o tamanho fetal em diferentes idades gestacionais é importante na tentativa de se estimar a qualidade de um reprodutor ainda em sua vida *in utero*. Além disso, o conhecimento do período de maior desenvolvimento gestacional das células germinativas e demais estruturas celulares que compõe o eixo reprodutivo no feto se faz necessário para assegurar as condições ideais à fêmea gestante que garantam a boa qualidade reprodutiva da prole [3,4].

No presente trabalho, o maior desenvolvimento testicular, com maior proliferação das células de Sertoli ocorreu no terço final da gestação quando comparado ao terço médio, resultado similar ao observado por McCoard et al. [29]. Entretanto, Van Vorstenbosch et al. [30] observaram em suínos maior proliferação das células de Sertoli entre 35 e 52 dias pós-coito, seguido de um aumento gradual até o nascimento e por uma ligeira diminuição após esse período. Esse resultado demonstra que o período de maior proliferação das células de Sertoli ocorre durante o período gestacional.

Segundo Van Vorstenbosch et al. [31], o desenvolvimento tanto das células de Sertoli quanto das células de Leydig até 60 dias pós coito em suínos é independente da hipófise, diferente do que ocorre no período de 70 dias em diante. Resultados semelhantes foram observados por Colenbrander et al. [32], os quais observaram menor proliferação das células de Leydig e menor desenvolvimento histológico testicular em fetos suínos decaptados (sem influência da hipófise). Nesse caso, a diferença entre os períodos gestacionais de maior desenvolvimento das células de Sertoli observada entre diferentes estudos [29, 31, 32] pode estar relacionado às condições de ambiente e à presença de fatores externos que interferem no eixo hipotálamo-hipófise-gônada.

Durante a vida fetal, as células de Sertoli são importantes para o desenvolvimento dos cordões seminíferos, o que justifica, no presente estudo, o maior comprimento cordonal observado aos 106 dias de gestação. No animal adulto, o número de células de Sertoli é o principal determinante para o peso dos testículos, já que cada célula de Sertoli pode suportar um número limitado de células germinativas [33]. Além disso, as células de Sertoli são importantes para a manutenção dos gonócitos e também para a formação dos espermatozóides na vida adulta. Nesse caso, a maior proliferação das células de Sertoli no feto pode estar diretamente relacionada com a qualidade dos reprodutores [34]. Com isso,

a avaliação do desenvolvimento dessas células durante a vida fetal torna-se importante para a predição da produção espermática do animal adulto.

No presente estudo, correlações importantes entre as características histológicas das gônadas e o peso e as medidas fetais foram identificadas. Forte correlação positiva foi observada entre o número total de células de Sertoli e o comprimento dos túbulos seminíferos com as características anatômicas fetais. O desenvolvimento histológico dos testículos está relacionada à maior produção e liberação de testosterona pelas células de Leydig. Sabe-se que esse hormônio também está relacionado ao desenvolvimento corporal dos animais [35, 36], o que explica o fato dos fetos machos normalmente se desenvolverem mais do que as fêmeas [37]. Do ponto de vista reprodutivo, os resultados do presente estudo sugerem que a estimativa das medidas fetais *in vivo* pode representar também maior quantidade de células de Sertoli e maior desenvolvimento dos túbulos seminíferos, proporcionando a formação de um animal com maior potencial reprodutivo na vida adulta.

Correlações negativas também foram observadas, tais como do índice gonadossomático e proporção de compartimento tubular nos testículos com o peso e as medidas fetais. O índice gonadossomático representa a porcentagem das gônadas em relação ao restante do corpo. À medida em que o feto cresce, a porcentagem em que o testículo representa em relação ao corpo diminui. Esse resultado também pode ser observado em outros estudos [31, 32]. Por outro lado, a redução da porcentagem de compartimento tubular à medida em que o feto se desenvolve pode ser explicada pelo aumento do compartimento intertubular nesse período. De acordo com Orth [38], o aumento do compartimento intertubular no período fetal é necessário para sustentar o parênquima testicular pós-natal, ocupado nesse período em 70 a 90% pelo compartimento tubular.

#### *4.2. Avaliação gonadal em fetos suínos fêmeas*

Diferentemente do que ocorre com os testículos, em que se observa um crescimento exponencial durante a gestação, os ovários não apresentam um período gestacional de maior desenvolvimento. Embora tenha sido detectada diferenças significativas entre as diferentes idades gestacionais, o crescimento ovariano assumiu um comportamento linear.

Pela análise histológica, aos 50 dias de gestação foi possível observar que as ovogônias estavam mais concentradas na região cortical do ovário, dispostas em nichos e em maior número quando comparado com as outras idades gestacionais avaliadas. A partir dos 80 dias, os nichos começavam a se desfazer e maior número de folículos primordiais pode ser observado, como também relatado por Gondos et al. [39]. O número de ovogônias diminuiu com o avançar da gestação, principalmente no terço final da gestação, o que também foi descrito em bovinos [40], humanos [41] e equinos [42]. Além da diminuição das ovogônias em detrimento da formação dos folículos primordiais, pode-se também ressaltar como visto em outros estudos, a hipótese de que essa diminuição esteja relacionada à redução da atividade mitótica dessas ovogônias com o avançar da gestação e possível início de apoptose celular [43]. O diâmetro nuclear e o volume total das ovogônias aumentou a partir dos 80 dias de gestação até serem transformadas em oócitos [44, 45].

Os folículos primordiais foram visualizados em todas as idades gestacionais avaliadas, porém, houve significativa redução no terço final da gestação. Segundo Motta & Makabe [46], os folículos primordiais e ovócitos em diversas espécies de mamíferos sofrem redução em seu número a partir da segunda metade da gestação. Isso ocorre devido aos mecanismos de apoptose celular e atresia folicular [45,47,48].

O volume total dos folículos primordiais bem como o diâmetro do oócito e do seu núcleo foram maiores aos 80 e 106 dias de gestação quando ao



comparado com os 50 dias. Em bovinos, Diniz et al. [27] observaram que, embora o diâmetro dos folículos primordiais tenham aumentado a partir de 100 dias de gestação, os mesmos diminuíram próximo ao final desse período. A possível explicação para essa diminuição em bovinos é que os folículos primordiais restantes aos 240 dias de gestação provavelmente são aqueles em estágio dictióteno e que permanecem no ovário após o nascimento, compondo a população de folículos primordiais da fêmea até a puberdade, como sugerido por Noden e Lahunta [49] Sendo assim, pode ser que em suínos esse processo aconteça da mesma forma e que, os folículos, aumentam de tamanho até uma idade da gestação porém, posteriormente, reduzem de tamanho durante o processo de apoptose, antes do término da gestação.

Na maioria dos mamíferos e inclusive nos seres humanos [50] a formação dos folículos se inicia na vida fetal, sendo detectados folículos primordiais, primários e secundários em diferentes idades gestacionais [51, 52]. A partir desses estudos, nota-se que a maioria dos ovócitos em folículos primordiais ainda estão na fase de diplóteno da prófase I da meiose e que são ativados a partir do final da gestação [53]. A visualização de folículos em crescimento somente aos 106 dias de gestação no presente estudo sugere que a ativação desses folículos na espécie suína também se inicie no terço final da gestação.

Sabe-se que o desenvolvimento folicular durante a vida fetal é dependente de hormônios e que o padrão de concentração de estradiol durante a gestação pode estar envolvido na regulação da ativação do folículo primário e crescimento do folículo primordial [54]. De acordo com Kezele e Skinner [55] e Chen et al. [56], o estradiol, juntamente com a progesterona, têm efeito inibitório sobre o desenvolvimento folicular. Somente após a redução desses hormônios, aos 90 dias de gestação na vaca, começam a aparecer os primeiros folículos primários [54]. Além de regularem o desenvolvimento dos folículos presentes

nas gônadas, o estradiol e a progesterona também participam da regulação do crescimento corporal dos fetos [57]. Dessa forma, supõe-se que exista uma associação entre o desenvolvimento histológico gonadal e o crescimento corporal dos fetos.

De fato, observou-se que não só o peso dos ovários, mas também o número total de folículos e o número de folículos em crescimento foram positivamente correlacionados com as medidas fetais. Assim como ocorre em machos, à medida que a gestação avança, os ovários também se desenvolvem, aumentando de tamanho e peso. Além disso, o índice gonadossomático também correlacionou-se de forma negativa com peso e as medidas fetais. As correlações negativas apresentadas com o número de ovogônias podem ser explicadas pela redução dessas estruturas ao longo da gestação.

Correlações positivas entre o diâmetro dos folículos primordiais e em crescimento e também dimensões do oócito foram observadas com o peso e as medidas fetais, ou seja, quanto maior o peso e o tamanho dos fetos, maior a atividade reprodutiva das gônadas. Nesse caso, sabendo que o desenvolvimento fetal está fortemente relacionado com o desenvolvimento gonadal, a estimativa das medidas fetais *in vivo* nas fêmeas também poderia auxiliar na seleção dos futuros reprodutores [58].

Os resultados encontrados no presente estudo contribui para melhor compreensão do desenvolvimento histológico das gônadas fetais além de conseguir prever a idade gestacional de maior desenvolvimento gonadal em suínos. Essas informações podem auxiliar estudos com uso de substâncias que influenciem o desenvolvimento gonadal durante o período gestacional, visando melhorar as características reprodutivas dos futuros reprodutores. Além disso, a possibilidade de avaliar a característica reprodutiva de um feto a partir da estimativa do desenvolvimento gonadal é de extrema relevância, visto que, se

tratando de um animal de produção, prever a capacidade reprodutiva ainda no útero ajudaria na seleção dos futuros reprodutores.

## 5. Conclusão

A proliferação celular no testículo e ovário são mais acentuadas no terço final da gestação. O peso e tamanho fetal estão fortemente relacionados ao desenvolvimento histológico gonadal, tanto nos machos quanto nas fêmeas.

## Referências

- [1] Jie-ge W, Da-Gan M, Xiu-Cheng C. Effect of Heat Stress on sow Reproductive Performance. *Journal of Animal Science and Veterinary Medicine* 2007;1:017.
- [2] Jalali M, Hemadi M, Saki G, Sarkaki A. Study of spermatogenesis fetal testis exposed noise stress during and after natal period in rat. *Pakistan journal of biological sciences* 2013;16(19):1010-25.
- [3] Durlej M, Knapczyk-Stwora K, Slomczynska M. Prenatal and neonatal flutamide administration increases proliferation and reduces apoptosis in large antral follicles of adult pigs. *Animal Reproduction Science* 2012;132(1-2):58-65.
- [4] Hejmej A, Kopera I, Kotula-Balak M, Lydka M, Lenartowicz M, Bilinska B. Are expression and localization of tight and adherens junction proteins in testes of adult boar affected by foetal and neonatal exposure to flutamide? *International Journal of Andrology* 2012;35(3):340–52.
- [5] Bielli A, Perez R, Pedrana G, Milton JTB, Lopez A, Blackberry MA, Duncombe G, Rodriguez-Martinez H, Martin GB. Low maternal nutrition

during pregnancy reduces the number of Sertoli cells in the newborn lamb. *Reproduction, fertility, and development* 2002;14(5-6): 333–37.

[6] Connolly F, Rae MT, Bittner L, Hogg K, McNeilly AS, Duncan WC. Excess androgens in utero alters fetal testis development. *Endocrinology* 2013; 154(5):1921-33.

[7] Marco-Jiménez F, Naturil-Alfonso C, Jiménez-Trigos E, García-Diego F, Lavara R, Vicente JS. Foetal and postnatal exposure to high temperatures alter growth pattern but do not modify reproductive function in male rabbits. *International journal of hyperthermia : the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group* 2014;30(2):86-95.

[8] Rae MT, Rhind SM, Fowler PA, Miller DW, Kyle CE, Brooks AN. Effect of maternal undernutrition on fetal testicular steroidogenesis during the CNS androgen-responsive period in male sheep fetuses. *Reproduction* 2002;124(1):33-39.

[9] Ibáñez L, Ferrer A, Marcos MV, Hierro FR, de Zegher F. Early puberty: rapid progression and reduced final height in girls with low birth weight. *Pediatrics* 2000; 106(5):72a

[10] Ibáñez L, Potau N, Enriquez G, de Zegher F. Reduced uterine and ovarian size in adolescent girls born small for gestational age. *Pediatric Research* 2000; 47(5):575–77b

- [11] Brooks AN, Thomas GB. Ontogeny and function of the pituitary-gonadal axis during fetal development in sheep. *Reproduction in Domestic Animals* 1995; 30(4):158-162
- [12] Da Silva-Buttkus P, van den Hurk R, te Velde ER, Taverne MA. Ovarian development in intrauterine growth-retarded and normally developed piglets originating from the same litter. *Reproduction* 2003; 126(2):249–58.
- [13] Maclusky NJ, Naftolin F. Sexual differentiation of the central nervous system. *Science* 1981;211(4488):1294–1303.
- [14] Erhard HW, Boissy A, Rae MT, Rhind SM. Effects of prenatal undernutrition on emotional reactivity and cognitive flexibility in adult sheep. *Behavioural Brain Research* 2004;151(1-2):25–35.
- [15] Pieroni PMRL. Estimativa do peso de fetos suínos por meio do exame ultrassonográfico. 2013. 52 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais. 2013.
- [16] Rostagno. H. S. et al. Brazilian tables for poultry and swine: Composition of feedstuffs and nutritional requirements. 3<sup>rd</sup> ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2011.
- [17] MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 711 de 1º de novembro de 1995. Aprovação das normas técnicas de instalações e equipamentos para abate e industrialização de suínos. Brasília: Diário Oficial da União, 1995.

- [18] Okere C, Hacker RR, Werchola G. Regulationships between serum IGF-I concentrations and piglet development or neonatal viability following porcine somatotropin (pST) and insulin administration to gestating gilts. *Theriogenology* 1997;47(7):1403-12.
- [19] Straaten HWMV, Wensing CJG. Leydig cell development in the testis of the pig. *Biology of Reproduction* 1978;18(1):86-93.
- [20] França LR, Suescun MO, Miranda JR, Giovambattista A, Perello M, Spinedi E, Calandra RS. Testis structure and function in a nongenetic hyperadipose rat model at prepubertal and adult ages. *Endocrinology* 2006;147(3):1556-63.
- [21] Balarini MK, de Paula TA, da Matta SL, Peixoto JV, Guião-Leite FL, Rossi Júnior JL, Czermak Junior AC, Walker NJ. Stages and duration of the cycle of the seminiferous epithelium in oncilla (*Leopardus tigrinus*, Schreber, 1775). *Theriogenology* 2012;77(5):873-80.
- [22] Attal J, Courot M. Développement testiculaire et établissement de la spermatogénese chez le taureau. *Annales de biologie animale, biochimie, biophysique* 1963;3(3):219-41.
- [23] Dorts VJ, Sajonski H. Morphometrische untersuchunchen am tubulussystem des schweinehodens wahrend der postnatalen entwicklug. *Monatsh Veterinaer Med* 1974; 29(17):650-52.
- [24] França LR. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. Belo Horizonte. UFMG, 1991, 180p. Tese (Doutorado em

Morfologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 1991.

[25] Abercrombie M. Estimation of nuclear population from microtome sections. *The Anatomical record* 1946, 94: 239-47.

[26] Amann RP. Reproductive capacity of dairy bulls: III. The effect of ejaculation frequency, unilateral vasectomy, and age on spermatogenesis. *The American journal of anatomy* 1962, 110: 49-67.

[27] Diniz EG, Esper CR, Jacomini JO, Vieira RC. Desenvolvimento morfológico dos ovários em embriões e fetos bovinos da raça Nelore. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 2005; 57(1):70-6.

[28] Junqueira LCU, Carneiro J. *Aparelho Reprodutor Feminino. Histologia básica-texto e atlas*. 11a ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2008.

[29] McCoard SA, Wise TH, Lunstra DD, Ford JJ. Stereological evaluation of Sertoli cell ontogeny during fetal and neonatal life in two diverse breeds of swine. *The Journal of Endocrinology* 2003;178(3):395-403.

[30] Van Vorstenbosch CJ, Spek E, Colenbrander B, Wensing CJ. Sertoli Cell development of pig testis in the fetal and neonatal period. *Biology of Reproduction* 1984;31(3):565-77.

[31] Van Vorstenbosch C J, Colenbrander B, Wensing CJ. Leydig cell development of pig testis in the early fetal period: an ultrastructural study. *American Journal of Anatomy* 1982;165(3):305-18.

[32] Colenbrander B, van Rossum-Kok CM, van Straaten HW, Wensing CJ. The effect of fetal decapitation on the testis and other endocrine organs in the pig. *Biology of reproduction* 1979, 20(2):198-204.

[33] França LR, Russel LD. The testis of domestic animals. In: MARTÍNEZ-GARCIA, F.; REGADERA, J. (Eds.) *Male reproduction: a multidisciplinary overview* 1998:198-219.

[34] Petersen C, Söder O. The sertolli cell – A hormonal target and “super” nurse for germ cells that determines testicular size. *Hormone Research* 2006, 66:153-61.

[35] Gray JM, Nunez AA, Siegel LI, Wade GN. Effects of testosterone on body weight and adipose tissue: role of aromatization. *Physiology e Behavior* 1979;23(3):465-9.

[37] Guimarães GC, Betarelli RP, Zangeronimo MG, Abreu MLT, Almeida FCCL, Rosa MCB, Ferreira LG, Alves LA, Assis CK, Lopes GC. Vasculaization of broad ligament of uterus and its relationship with fetal and placentar development in gilts. *Theriogenology* 2014;82:232-7.

[38] Orth JM. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. *Anatomical Record* 1982;203(4):485–92.

[39] Gondos B, Bhiraleus P, Hobel CJ. Ultrastructural observations on germ cells in human fetal ovaries. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 1971, 110 (5): 644-52.



[40] Erickson, BH. Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. *Journal of Reproduction and Fertility* 1966;10:97-105.

[41] Fujimoto T, Yukihiro M, Masatoshi F. The origin, migration and fine morphology of human primordial germ cells. *The Anatomical Record* 1977;188(3):315-29.

[42] Naves CS, Vieira RC, Diniz EG, Jacomini JO, Belletti ME, Oliveira RC. Morphological development of ovaries in fetuses of cross-breed equines. *Ciência Rural* 2008;38(2):416-22.

[43] Coucouvanis EC, Sherwood SW, Carswell-Crumpton C, Spack EG, Jones PP. Evidence that the mechanism of prenatal germ cell in the mouse is apoptosis. *Experimental cell research* 1993;209(2):238-47.

[44] Mackay S. Gonadal development in mammals at the cellular and molecular levels. *International Review of Cytology* 2000;200(53):47-99.

[45] McLaren A. Germ and somatic cell lineages in fine developing gonad. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2000;163(1-2):3-9.

[46] Motta PM, Makabe S. Germ cells in the ovarian surface during fetal development in humans. A three dimensional microanatomical study by scanning and transmission electron microscopy. *Journal of submicroscopic cytology* 1986;18(2):271-6.

- [47] Peters H. Migration of gonocytes in to mammalian gonad and their differentiation. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 1970;259(828):91-101.
- [48] Packer C, Tatar M, Collins A. Reproductive cessation in female mammals. *Nature* 1998; 392(6678): 807-11.
- [49] Noden DM, De Lahunta A. *Embriología de los animales domésticos*. Zaragoza: Acribia , 1990.
- [50] Van Den Hurk R, Zhao J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* 2005;63(6):1717-51.
- [51] McNatty KP, Smith P, Hudson NL, Heath DA, Tisdall DJ, O WS, Braw-Tal R. Development of the sheep ovary during fetal and early neonatal life and the effect of fecundity genes. *Journal of reproduction and fertility* 1995;49:123–135.
- [52] Russe I. Oogenesis in cattle and sheep. *Bibliotheca anatomica* 1983;24:77–92.
- [53] Baker TG, Franchi LL. The fine structure of chromosomes in bovine primordial oocytes. *Journal of reproduction and fertility* 1967;14(3):511–13.
- [54] Yang MY, Fortune JE. The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth in vitro develops during mid-gestation and is associated with meiotic arrest of oocytes. *Biology of Reproduction* 2008;78(6):1153–61.

[55] Kezele P, Skinner MK. Regulation of ovarian primordial follicle assembly and development by estrogen and progesterone: endocrine model of follicle assembly. *Endocrinology* 2003;144(8):3329–37.

[56] Chen Y, Jefferson WN, Newbold RR, Padilla-Banks E, Pepling ME. Estradiol, progesterone, and genistein inhibit oocyte nest breakdown and primordial follicle assembly in the neonatal mouse ovary in vitro and in vivo. *Endocrinology* 2007;148(8):3580–90.

[57] Freitas ESD. Proliferação, apoptose e morfometria do útero e da placenta de ratas hipertíroides na gestação e no pós-parto associadas ao desenvolvimento fetal. 2006. 72p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

[58] Wolf A, Gabaldi SH. Ultra-sonographic accompaniment of gestation in large animals – part II. *Ciências Agrária e Saúde* 2002;2(2):84-9.

Tabela 1 – Características histológicas de testículos de fetos suínos machos (n=21) em diferentes idades gestacionais (média ± desvio padrão).

Variável	Idade Gestacional		
	50 dias	80 dias	106 dias
Diâmetro cordonal, $\mu\text{m}$	44,7 ± 3,3	52,7 ± 3,6	46,0 ± 6,8
Comprimento cordonal total, m	0,77 ± 0,12 <sup>a</sup>	2,69 ± 0,62 <sup>a</sup>	7,77 ± 2,93 <sup>b</sup>
Compartimento tubular, %	33,3 ± 5,8	27,9 ± 3,6	24,7 ± 5,6
Células de Sertoli			
Número total de células/testículo	2,02 ± 0,30 <sup>a</sup>	9,95 ± 2,45 <sup>a</sup>	26,47 ± 10,31 <sup>b</sup>
Número de células/g de testículo	138,3 ± 24,7	232,1 ± 68,6	150,6 ± 85,0
Volume nuclear, $\mu\text{m}^3$	29,1 ± 1,5 <sup>b</sup>	23,9 ± 2,0 <sup>a</sup>	21,4 ± 2,4 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Médias seguidas por diferentes letras na mesma linha diferem pelo teste SNK (P<0,05)

Tabela 2. Valores de correlação de Pearson ( $R^2$ ) e seus valores de probabilidade (P) entre o peso e as medidas fetais e características histológicas dos testículos de fetos suínos (n=21).

Variáveis	Peso do feto		Comprimento do feto		Perímetro cefálico		Perímetro torácico	
	$R^2$	P	$R^2$	P	$R^2$	P	$R^2$	P
Peso das gônadas	0,96	<0,01	0,88	<0,01	0,83	<0,01	0,86	<0,01
Índice gonadossomático	-0,50	0,07	-0,69	0,01	-0,73	<0,01	-0,71	<0,01
Testículo								
Diâmetro cordonal	-0,06	0,85	0,12	0,68	0,24	0,40	0,12	0,69
Comprimento cordonal	0,85	<0,01	0,83	<0,01	0,84	<0,01	0,80	<0,01
Compartimento tubular (%)	-0,65	0,01	-0,67	0,01	-0,60	0,02	-0,69	0,01
Células de Sertoli								
Número total	0,85	<0,01	0,84	<0,01	0,86	<0,01	0,81	<0,01
Células/g de testículo	-0,10	0,73	0,07	0,82	0,19	0,51	0,05	0,86
Volume Nuclear, $\mu\text{m}^3$	-0,85	<0,01	-0,91	<0,01	-0,87	<0,01	-0,91	<0,01

Tabela 3. Características histológicas dos ovários de fetos suínos (n=23) em diferentes idades gestacionais (média ± desvio padrão).

Variável	Idade gestacional		
	50 d	80 d	106 d
<b>Folículos</b>			
Número total, por mm <sup>3</sup>	2500 ± 2750 <sup>a</sup>	131250 ± 49500 <sup>b</sup>	140000 ± 33500 <sup>b</sup>
Folículos primordiais, %	100,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	100,0 ± 0,0 <sup>a</sup>	62,1 ± 22,8 <sup>b</sup>
Folículos em crescimento, %	-	-	37,9 ± 22,8
<b>Ovogônia</b>			
Número total, por mm <sup>3</sup>	389250 ± 164500 <sup>c</sup>	129000 ± 49500 <sup>b</sup>	17000 ± 27000 <sup>a</sup>
Volume total, μm <sup>3</sup>	626 ± 278 <sup>a</sup>	1933 ± 327 <sup>b</sup>	2631 ± 808 <sup>c</sup>
Núcleo, %	49,0 ± 6,4 <sup>b</sup>	51,1 ± 4,0 <sup>b</sup>	41,9 ± 3,8 <sup>a</sup>
Citoplasma, %	51,0 ± 6,4 <sup>a</sup>	48,9 ± 4,0 <sup>a</sup>	58,1 ± 3,8 <sup>b</sup>
Diâmetro nuclear, μm	8,47 ± 0,78 <sup>a</sup>	12,32 ± 0,58 <sup>b</sup>	12,66 ± 1,06 <sup>b</sup>
<b>Folículos primordiais</b>			
Diâmetro total, μm	12,1 ± 11,5 <sup>a</sup>	28,2 ± 2,0 <sup>b</sup>	27,2 ± 1,6 <sup>b</sup>
Volume total, μm <sup>3</sup>	2.980 ± 3.321 <sup>a</sup>	26.433 ± 39.760 <sup>b</sup>	10.568 ± 1.832 <sup>b</sup>
Diâmetro do oócito, μm	11,5 ± 11,0 <sup>a</sup>	26,4 ± 2,0 <sup>b</sup>	27,1 ± 1,6 <sup>b</sup>
Diâmetro do núcleo do oócito, μm	5,3 ± 5,2 <sup>a</sup>	14,8 ± 0,9 <sup>b</sup>	14,0 ± 1,4 <sup>b</sup>
<b>Folículos em crescimento</b>			
Diâmetro total, μm	-	-	37,7 ± 2,8
Volume total, μm <sup>3</sup>	-	-	28.478 ± 5.825
Diâmetro do oócito, μm	-	-	33,9 ± 3,2
Diâmetro do núcleo do oócito, μm	-	-	15,0 ± 1,3

<sup>a,b,c</sup> Médias seguidas por diferentes letras diferem pelo teste SNK (P<0,05)

Tabela 4. Valores de correlação de Pearson ( $R^2$ ) e seus valores de probabilidade (P) entre as medidas fetais e o peso e características histológicas dos ovários de fetos suínos.

Variável	Peso do feto		Comprimento do feto		Perímetro cefálico		Perímetro torácico	
	$R^2$	P	$R^2$	P	$R^2$	P	$R^2$	P
Peso das gônadas	0,77	<0,01	0,78	<0,01	0,80	<0,01	0,79	<0,01
Índice gonadosomático	-0,79	<0,01	-0,88	<0,01	-0,89	<0,01	-0,88	<0,01
Folículos								
Número total	0,67	<0,01	0,78	<0,01	0,80	<0,01	0,78	<0,01
Folículos primordiais, %	-0,27	0,21	-0,12	0,59	-0,12	0,59	-0,13	0,55
Folículos em crescimento, %	0,83	<0,01	0,71	<0,01	0,69	<0,01	0,70	<0,01
Ovogônia								
Número total	-0,79	<0,01	-0,85	<0,01	-0,85	<0,01	-0,85	<0,01
Volume total	0,79	<0,01	0,86	<0,01	0,87	<0,01	0,84	<0,01
Núcleo, %	-0,57	<0,01	-0,48	0,02	-0,46	0,03	-0,45	0,03
Citoplasma, %	0,57	<0,01	0,48	0,02	0,46	0,03	0,45	0,03
Diâmetro nuclear	0,75	<0,01	0,87	<0,01	0,88	<0,01	0,86	<0,01
Folículos primordiais								
Diâmetro total, $\mu\text{m}$	0,57	<0,01	0,67	<0,01	0,69	<0,01	0,68	<0,01
Volume total, $\mu\text{m}^3$	0,11	0,63	0,20	0,37	0,16	0,46	0,21	0,35
Diâmetro do oócito, $\mu\text{m}$	0,63	<0,01	0,71	<0,01	0,73	<0,01	0,72	<0,01
Diâmetro do núcleo do oócito, $\mu\text{m}$	0,62	<0,01	0,73	<0,01	0,74	<0,01	0,73	<0,01
Folículos em crescimento								
Diâmetro total, $\mu\text{m}$	0,91	<0,01	0,82	<0,01	0,81	<0,01	0,81	<0,01
Volume total, $\mu\text{m}^3$	0,89	<0,01	0,80	<0,01	0,79	<0,01	0,79	<0,01
Diâmetro do oócito, $\mu\text{m}$	0,91	<0,01	0,82	<0,01	0,81	<0,01	0,81	<0,01
Diâmetro do núcleo do oócito, $\mu\text{m}$	0,92	<0,01	0,81	<0,01	0,80	<0,01	0,81	<0,01

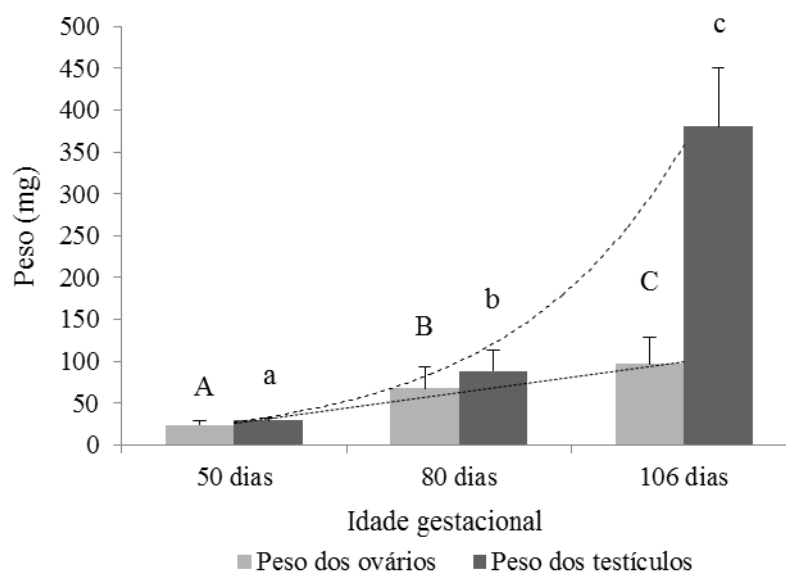


Figura 1. Peso das gônadas (médias  $\pm$  desvio padrão) de fetos suínos machos e fêmeas em diferentes idades gestacionais. Diferentes letras maiúsculas para ovários e minúsculas para testículos indicam diferenças pelo teste SNK ( $P < 0,05$ ).



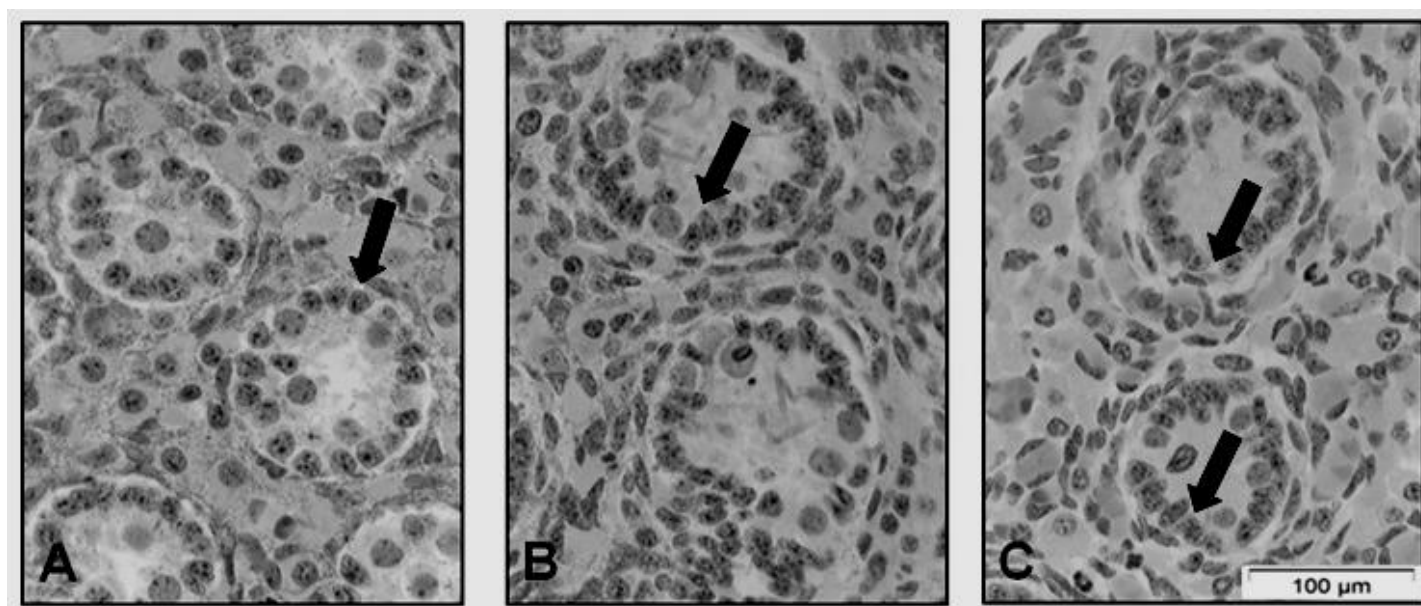


Figura 2. Parênquima testicular de fetos suínos aos 50 (A), 80 (B) e 106 (C) dias de gestação. As células de Sertoli estão indicadas pelas setas.

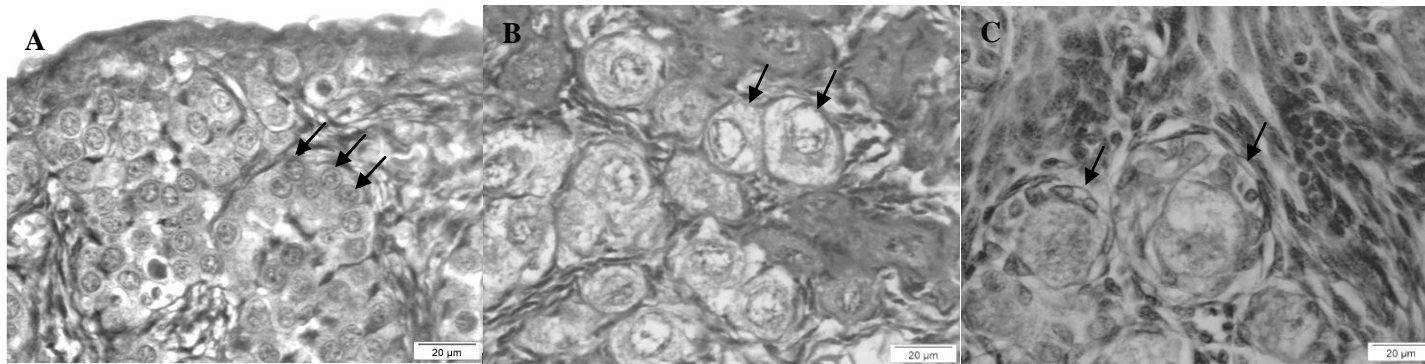


Figura 3. Análise histológica de ovário fetal suíno aos 50 (A), 80 (B) e 106 (C) dias de gestação. Na figura A as setas indicam as ovogônias. Na figura B as setas apontam os folículos primordiais, com uma camada de células achatadas circulando o oócito. Na figura C as setas indicam os folículos em crescimento com mais de uma camada de células cúbicas envolta do oócito.

## ANEXOS

Anexo 1. Análise de variância para peso dos testículos de fetos suínos em diferentes idades gestacionais (50, 80 e 106 dias). Opção de transformação = raiz quadrada.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	Fc	Pr>Fc
Idade	2	442,640372	221,320186	127,618	<0,0001
Erro	11	19,076636	1,734240		

CV (%) = 12,22

Anexo 2. Análise de variância para peso dos testículos de fetos suínos em diferentes idades gestacionais (50, 80 e 106 dias).

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	Fc	Pr>Fc
Idade	2	180,927386	90,463693	4,232	0,0433
Erro	11	235,152900	21,377536		

CV (%) = 9,65

Anexo 3. Análise de variância para comprimento cordonal em testículos de fetos suínos em diferentes idades gestacionais (50, 80 e 106 dias). Opção de transformação = raiz quadrada.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	Fc	Pr>Fc
Idade	2	7,861202	3,930601	47,232	<0,0001
Erro	11	0,915407	0,083219		

CV (%) = 17,15

Anexo 4. Análise de variância para porcentagem de compartimento tubular em testículos de fetos suínos em diferentes idades gestacionais (50, 80 e 106 dias).

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	Fc	Pr>Fc
Idade	2	169,028005	84,514002	3,293	0,0757
Erro	11	282,333995	25,666727		

CV (%) = 17,52

Anexo 5. Análise de variância para número total de células de Sertoli em testículos de fetos suínos em diferentes idades gestacionais (50, 80 e 106 dias). Opção de transformação = raiz quadrada.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	Fc	Pr>Fc
Idade	2	29,821135	14,910568	49,081	<0,0001
Erro	11	3,341740	0,303795		

CV (%) = 17,91

Anexo 6. Análise de variância para número de células de Sertoli por grama de testículo de fetos suínos em diferentes idades gestacionais (50, 80 e 106 dias). Opção de transformação = raiz quadrada.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	Fc	Pr>Fc
Idade	2	34,910281	17,455141	3,695	0,0592
Erro	11	51,965667	4,724152		

CV (%) = 16,72

Anexo 7. Análise de variância para volume nuclear das células de Sertoli de fetos suínos em diferentes idades gestacionais (50, 80 e 106 dias).

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	Fc	Pr>Fc
Idade	2	140,905371	70,452686	18,347	0,0003
Erro	11	42,241200	3,840109		

CV (%) = 7,83

Anexo 8. Análise de variância para peso das gônadas de fetos suínos fêmeas em diferentes idades gestacionais (50, 80 e 106 dias). Opção de transformação = raiz quadrada.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	Fc	Pr>Fc
Idade	2	93,769654	46,884827	26,588	<0,0001
Erro	20	35,267802	1,763390		

CV (%) = 17,09

Anexo 9. Análise de variância para número total de folículos em fetos suínos fêmeas em diferentes idades gestacionais (50, 80 e 106 dias). Opção de transformação = raiz quadrada.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	Fc	Pr>Fc
Idade	2	20,443305	10,221653	94,490	<0,0001
Erro	20	2,163545	0,108177		

CV (%) = 19,52

Anexo 10. Análise de variância para porcentagem de folículos primordiais em fetos suínos em diferentes idades gestacionais (50, 80 e 106 dias).

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	Fc	Pr>Fc
Idade	2	5915,748422	2957,874211	3,208	0,0619
Erro	20	18439,552108	921,977605		

CV (%) = 39,71

Anexo 11. Análise de variância para porcentagem de folículos em crescimento em fetos suínos em diferentes idades gestacionais (50, 80 e 106 dias). Opção de transformação = raiz quadrada.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	Fc	Pr>Fc
Idade	2	191,553322	95,776661	72,188	<0,0001
Erro	20	26,535256	1,326763		

CV (%) = 49,78

Anexo 12. Análise de variância para número total de ovogônias em fetos suínos em diferentes idades gestacionais (50, 80 e 106 dias). Opção de transformação = raiz quadrada.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	Fc	Pr>Fc
Idade	2	44,507824	22,253912	49,506	<0,0001
Erro	20	8,990417	0,449521		

CV (%) = 32,52

Anexo 13. Análise de variância para volume total das ovogônias em fetos suínos em diferentes idades gestacionais (50, 80 e 106 dias). Opção de transformação = raiz quadrada.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	Fc	Pr>Fc
Idade	2	2810,180643	1405,090321	36,425	<0,0001
Erro	20	771,488948	38,574447		

CV (%) = 15,28

Anexo 14. Análise de variância para porcentagem de núcleo em ovogônias de fetos suínos em diferentes idades gestacionais (50, 80 e 106 dias).

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	Fc	Pr>Fc
Idade	2	377,477322	188,738661	8,184	0,0025
Erro	20	461,257460	23,062873		

CV (%) = 10,25

Anexo 15. Análise de variância para porcentagem de citoplasma de ovogônias de fetos suínos em diferentes idades gestacionais (50, 80 e 106 dias).

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	Fc	Pr>Fc
Idade	2	377,477322	188,738661	8,184	0,0025
Erro	20	461,257460	23,062873		

CV (%) = 9,04

Anexo 16. Análise de variância para diâmetro nuclear de ovogônias de fetos suínos em diferentes idades gestacionais (50, 80 e 106 dias).

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	Fc	Pr>Fc
Idade	2	80,034067	40,017034	54,403	<0,0001
Erro	20	14,711229	0,735561		

CV (%) = 7,60

Anexo 17. Análise de variância para diâmetro total dos folículos primordiais de fetos suínos em diferentes idades gestacionais (50, 80 e 106 dias).

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	Fc	Pr>Fc
Idade	2	1179,424662	589,712331	13,973	0,0002
Erro	20	844,087486	42,204374		

CV (%) = 28,40

Anexo 18. Análise de variância para volume total dos folículos primordiais de fetos suínos em diferentes idades gestacionais (50, 80 e 106 dias).  
Opção de transformação = raiz quadrada.

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	Fc	Pr>Fc
Idade	2	35515,532042	17757,766021	6,121	0,0084
Erro	20	58019,022715	2900,951136		

CV (%) = 56,71



Anexo 19. Análise de variância para diâmetro de oócito dos folículos primordiais de fetos suínos em diferentes idades gestacionais (50, 80 e 106 dias).

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	Fc	Pr>Fc
Idade	2	1143,348011	571,674006	14,708	0,0001
Erro	20	777,385771	38,869289		

CV (%) = 28,14

Anexo 20. Análise de variância para diâmetro do núcleo dos oócitos dos folículos primordiais de fetos suínos em diferentes idades gestacionais (50, 80 e 106 dias).

Fonte de variação	Grau de liberdade	Soma de quadrados	Quadrado médio	Fc	Pr>Fc
Idade	2	404,878293	202,439146	21,919	<0,0001
Erro	20	184,716698	9,235835		

CV (%) = 26,22