



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

MARIA ETELVINA PINTO

**“DESENVOLVIMENTO TESTICULAR NO GERBILO DA
MONGÓLIA: DIFERENCIAÇÃO PÓS-NATAL DAS CÉLULAS
GERMINATIVAS E DE LEYDIG”**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato (a) <u>Maria Etelvina Pinto</u> <u>Rejane Maira Góes</u> e aprovada pela Comissão Julgadora.
--

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Doutor em Biologia Celular e Estrutural
na área de Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Rejane Maira Góes

Campinas, 2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

P658d

Pinto, Maria Etelvina

Desenvolvimento testicular no gerbilo da Mongólia: diferenciação pós-natal das células germinativas e de Leydig / Maria Etelvina Pinto. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientadora: Rejane Maira Góes.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Testículos. 2. Células - Diferenciação. 3. Gonócitos. 4. Leydig, Células de. 5. Gerbilo da Mongólia. I. Góes, Rejane Maira. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

Título em inglês: Testicular development of the Mongolian gerbil: postnatal differentiation of germ and Leydig cells.

Palavras-chave em inglês: Testis; Cell differentiation; Gonocytes; Leydig cells; Mongolian gerbil.

Área de concentração: Biologia Celular.

Titulação: Doutora em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Rejane Maira Góes, Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira, Wilma de Grava Kempinas, Marcelo Emílio Beletti, Cristina Pontes Vicente.

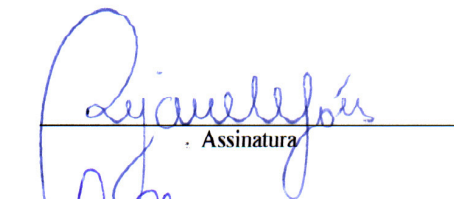
Data da defesa: 31/08/2009.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 31 de julho de 2009.

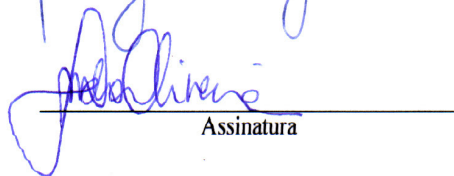
BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Rejane Maira Góes (Orientadora)



Assinatura

Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira

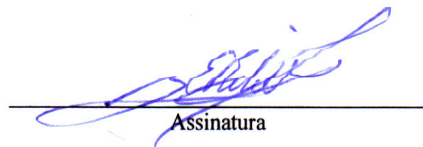


Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Martinez

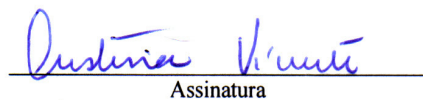
Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti



Assinatura

Profa. Dra. Cristina Pontes Vicente

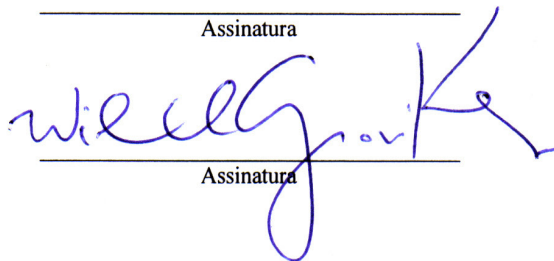


Assinatura

Profa. Dra. Carla Beatriz Collares Buzato

Assinatura

Profa. Dra. Wilma De Grava Kempinas



Assinatura

Prof. Dr. Wellerson Rodrigo Scarano

Assinatura

Dedico

À minha família

Meu porto seguro...

Agradecimentos

À professora Dra. Rejane Maira Góes, pela sua orientação, ética e confiança. Obrigada por ter contribuído imensamente para o meu amadurecimento profissional e pessoal.

Ao professor Dr. Sebastião Roberto Taboga pela sua atenção e auxílio durante a realização deste trabalho.

Aos professores: Dr. Luís António Violin Dias Pereira, Dra. Maria Tercília Vilêla de Azeredo Oliveira e Dra. Mary Anne Heidi Dolder pelo cuidado e atenção na análise prévia da tese e pelas valiosas sugestões.

Aos professores: Dra. Maria Tercília Vilêla de Azeredo Oliveira, Dr. Marcelo Emílio Beletti, Dra. Cristina Pontes Vicente e Dra. Wílma De Grava Kempinas pela atenção dispensada e sugestões para o aprimoramento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural e a todos os docentes que dele participa, principalmente àqueles que batalham para que esse curso seja reconhecido como um dos melhores do país.

A secretária Líliam Alves Senne Panagió, pela presteza, eficiência e auxílio concedido durante esses anos de UNICAMP, principalmente nos momentos de mais correria.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo imprescindível suporte financeiro.

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, IBILCE-UNESP, por ter disponibilizado espaço físico para a realização da parte experimental deste trabalho.

Ao técnico Luiz Roberto Falleiros Júnior do Laboratório de Microscopia e Microanálise, IBILCE-UNESP, pela assistência técnica e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Microscopia e Microanálise, IBILCE-UNESP: Fernanda Alcântara, Lara Corradí, Sérgio de Oliveira, Bianca Gonçalves, Ana Paula Perez, Manoel Biancardi, Marina Gobbo, Cíntia Puga, Fanny Arcolino, Flávia Cabral e Samanta Maeda, e todos que por ali passaram durante todos esses anos.

À querida amiga Daniele Ribeiro, pelas inúmeras e preciosas contribuições na rotina laboratorial e na minha vida pessoal.

À amiga Sabrina Rochel pelos vários auxílios, carinho e amizade.

À Livia Botta pelo carinho e amizade.

Aos meus grandes e inesquecíveis amigos Ana Amélia, Ana Lúcia, Grazielle, Leandro, Ednéia e Meire pelo carinho, incentivo e apoio em tantos momentos.

“AMIZADES VERDADEIRAS VAI MUITO ALÉM DO QUE CONSEGUIMOS
ENTENDER... CADA PESSOA QUE PASSA EM NOSSA VIDA É ÚNICA, SEMPRE
DEIXA UM POUCO DE SI E LEVA UM POUCO DE NÓS”.

Agradecimentos especiais

A Deus, pai de infinita bondade, por me guiar e fortalecer, me fazendo acreditar que posso ir além.

"TUDO POSSO NAQUELE QUE ME FORTALECE."

Aos meus pais, pelo exemplo de vida e pelos sacrifícios que fizeram para me proporcionar todas as oportunidades, possibilitando a realização de inúmeros sonhos. Meu carinho e gratidão serão eternos.

À minha irmã Elenice e ao meu cunhado José Antônio por todo apoio, carinho e amizade.

À minhas queridas sobrinhas Beatriz e Ana Clara, pelo imenso carinho e alegria que me trazem.

*"JUNTOS OS OBSTÁCULOS PARECEM MENORES, OS MEDOS SÃO VENCIDOS E AS VITÓRIAS, ALÉM DE INESQUECÍVEIS, TÊM SIGNIFICADOS MUITO MAIORES.
AMO VOCÊS!"*

Ao Ricardo, meu amor. Obrigada por me completar, ser meu companheiro em todos os momentos e fazer meus dias mais felizes.

"ESTRANHO SERIA SE EU NÃO ME APAIXONASSE POR VOCÊ. TE AMO!"

SUMÁRIO

I - LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
II – RESUMO.....	12
III – ABSTRACT.....	14
IV – INTRODUÇÃO.....	16
1. <i>Desenvolvimento embrionário do testículo</i>	16
2. <i>Células da linhagem germinativa</i>	18
3. <i>Células de Leydig</i>	24
4. <i>O gerbilo como modelo experimental</i>	30
V – OBJETIVO.....	33
VI – ARTIGO 1.....	34
<i>Neonatal gonocyte differentiation in Mongolian gerbil Meriones unguiculatus involves asynchronous maturation of seminiferous cords and rapid formation of transitional cell stage</i>	
VII – ARTIGO 2.....	63
<i>Differentiation of Leydig cells in the Mongolian gerbil</i>	
VIII – ARTIGO 3.....	73
<i>Dinâmica das populações de células de Leydig e maturação testicular do gerbilo da Mongólia Meriones unguiculatus</i>	
IX – CONCLUSÕES GERAIS.....	103
X – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105
XI- DECLARAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	122
XII - PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL.....	123

LISTA DE ABREVIATURAS

3 β -HSD – enzima 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase
11 β -HSD1 – enzima 11 β -hidroxiesteróide esteróide desidrogenase 1
17 β -HSD - 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase
AMH - hormônio Anti-Mülleriano
AR- receptor de andrógeno
CG – gonócito central
CGP – célula germinativa primordial
CLA – célula de Leydig adulta
CLF – célula de Leydig fetal
DHEA - desidroepiandrosterona
DHT - diidrotestosterona
dpc – dias pós-concepção
dpp – dias pós-parto
EDS - etano dimetano sulfonato
FSH – hormônio folículo estimulante
GCAP – fosfatase alcalina de células germinativas
GDNF – fator neurotrófico derivado da linhagem de células gliais
Gn - gonócitos
IGF-I - fator de crescimento semelhante à insulina tipo I
LIF – fator inibidor da leucemia
LH- hormônio luteinizante
MAGE-A4 – antígeno Melanoma-A4
PCNA – antígeno nuclear de proliferação celular
PDGF – fator de crescimento derivado das plaquetas
pS- proespermatogonia
RA – ácido retinóico
RgG – gonócito em migração
RG - gonócito na base do epitélio

StAR - proteína reguladora aguda da esteroidogênese

TGF - fator de crescimento transformante

TH- hormônio da tireóide

Tmf – camundongos feminilizados (síndrome da feminização testicular)

TUNEL – técnica para marcação de células apoptóticas

VASA- proteína específica de células da linhagem germinativa (marcador de células germinativas)

O gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*) tem sido utilizado de maneira crescente em estudos sobre o sistema genital masculino. Alguns aspectos da espermatogênese e o ciclo do epitélio seminífero dessa espécie são conhecidos, mas investigações sobre o desenvolvimento pós-natal do testículo e diferenciação das suas principais populações celulares são incipientes. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar os eventos envolvidos com a diferenciação das células germinativas e de Leydig durante o desenvolvimento pós-natal, estabelecer o período de maturação testicular, e descrever a dinâmica das populações de células de Leydig do nascimento à senilidade. Foram utilizados gerbilos machos com 1-6 dias, 1-8 semanas, 3 e 18 meses de idade. Os diferentes tipos celulares foram identificados com base em microscopia de luz de alta resolução, microscopia eletrônica de transmissão e imunocitoquímica para marcadores específicos da linhagem germinativa (VASA) e das células de Leydig adultas (enzimas 3β -hidroxiesteróide desidrogenase - 3β -HSD e 11β -hidroxiesteróide esteróide desidrogenase 1 - 11β -HSD1). Reações imunocitoquímicas para o receptor de andrógeno (AR), para o marcador de células em proliferação (PCNA) e técnica para marcação de células apoptóticas (TUNEL), bem como análises estereológicas dos componentes testiculares e determinação dos níveis séricos de testosterona e estrógeno também foram efetuadas. O processo de migração dos gonócitos para a membrana basal no gerbilo se estende até a segunda semana pós-natal, sendo seguido da sua rápida diferenciação em proespermatogonias. Diferentemente de outros roedores, os eventos relativos à maturação dos gonócitos e sua diferenciação em células da linhagem espermatogonial é mais longo, ocorrem assincronicamente entre os cordões seminíferos e estão associados à perda de sensibilidade ao andrógeno. O desenvolvimento da população de células de Leydig adultas (CLA) envolve quatro estágios progressivos de maturação: as células de Leydig adultas progenitoras, as recém-formadas, as imaturas e as maduras, as quais surgiram, respectivamente com duas, quatro, cinco e seis semanas de idade. As células de Leydig adultas maduras exibem núcleo excêntrico e irregular e um canalículo citoplasmático perinuclear. Também apresentam heterogeneidade funcional em relação à expressão do AR

e da enzima 11β -HSD1. As mudanças que ocorrem no interstício testicular do gerbilo durante o desenvolvimento pós-natal são muito similares às encontradas em outros roedores, no entanto, o número de células de Leydig fetais permanece constante até a senilidade. Adicionalmente, o surgimento e aumento da população de células de Leydig adultas ocorrem mais tardiamente em relação a outros roedores. A análise histológica indicou que a maturidade testicular no gerbilo ocorre por volta da décima segunda semana de idade. Os níveis séricos de testosterona aumentaram expressivamente a partir da sexta semana de idade, enquanto os de estrógeno permaneceram constantes até a décima segunda semana de idade. Nos animais senis houve uma queda acentuada de ambos os hormônios. O comprometimento da síntese de esteróides nesse último período decorre do prejuízo funcional das CLA. O presente estudo fornece um panorama abrangente do desenvolvimento testicular do gerbilo da Mongólia, ampliando o conhecimento sobre a biologia reprodutiva dessa espécie e proporcionando os fundamentos para o desenvolvimento de estudos experimentais.

The Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) has been increasingly used with studies on the male genital system. Some aspects of spermatogenesis and the seminiferous epithelium cycle of this species are known, but investigations about the postnatal development of testis and differentiation of the main cell populations are incipient. The objective of this study was to evaluate the events involved in differentiation of germ cells and Leydig cells during postnatal development, establish the period of testicular maturation, and describe the dynamics of Leydig cells population from birth to senility. Male gerbils were used with 1-6 days, 1-8 weeks, 3 and 18 months of age. The different cell types were identified based on light microscopy, high-resolution transmission electron microscopy and immunocytochemistry for specific markers of germ line (VASA) and adult Leydig cells (enzyme 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase - 3 β -HSD and 11 β -hydroxysteroid steroid dehydrogenase 1 - 11 β -HSD1). Reactions observed for the androgen receptor (AR), for cell proliferation marker (PCNA), technique for marking apoptotic cells (TUNEL), stereological analysis of testicular components and determination of serum levels of testosterone and estrogen were also made. The process of gonocytes migration to the basement membrane in the gerbil extends to the second postnatal week, being followed by their rapid differentiation to proespermatozoa. Unlike other rodents, the events on the gonocytes maturation and differentiation into espermatozoal cell lineage are longer, occur asynchronously between the seminiferous cords and are associated with loss of sensitivity to androgen. The development of the adult Leydig cells (ALC) population involves four progressive stages of maturation: the adult Leydig cell progenitor, newly formed, immature and mature, which appeared respectively with two, four, five and six weeks of age. Mature ALC exhibit irregular and eccentric nuclei and a perinuclear cytoplasmic canaliculus. Also present functional heterogeneity in expression of AR and the enzyme 11 β -HSD1. The changes occurring in gerbil testicular interstitium during postnatal development are very similar to those found in other rodents, however, the number of fetal Leydig cells remains constant until senility. Additionally, the emergence and increase of ALC population occur later in relation to other rodents. Histological

analysis indicated that the testicular maturity in the gerbil occurs around the twelfth week of age. Serum levels of testosterone significantly increased from the sixth week of age, while the estrogen remained constant until the twelfth week of age. In senile animals there were a sharp fall of both hormones. The impairment of the steroid synthesis in this last period comes from the functional injury of the CLA. This study provides a comprehensive overview of the testicular development of the Mongolian gerbil, expanding knowledge about the reproductive biology of this species and providing the foundation for the development of experimental studies.

1. Desenvolvimento embrionário do testículo

O desenvolvimento embrionário das gônadas de mamíferos é único em comparação com os demais órgãos, pois apresenta, na fase inicial, um estágio indiferenciado bipotencial que pode se desenvolver em testículo ou ovário (Lovell-Badge e Robertson, 1990; Koopman et al., 1991). Esse desenvolvimento ocorre em íntima associação com os componentes do aparelho urinário. Assim, os conductos genitais internos masculinos e femininos são derivados de estruturas tubulares mesodérmicas, os ductos mesonéfricos ou de Wolf e os ductos paramesonéfricos ou de Muller, respectivamente (Staack et al., 2003). Por sua vez, os primórdios gonadais se desenvolvem em regiões do mesoderma situadas ventro-medialmente ao mesonefro, originando uma saliência conhecida como crista gonadal. Tal desenvolvimento inicia-se com o espessamento do epitélio celômico que as recobre, sendo seguida pela proliferação do mesmo em direção ao interior do mesoderma para estruturas tubulares, os cordões sexuais primitivos (Moore e Persaud, 2008). As células da linhagem germinativas ou células germinativas primordiais (CGP), derivadas de células do endoderma do saco vitelínico, migram via mesentério dorsal, até as cristas gonadais (Magre e Jost, 1980). Esse processo de migração é regulado pelos genes *estella*, *fragilis* e *BMP-4* (Tres et al., 2004) e mediado pelo fator de crescimento “steel”, via ligação com os receptores tirosino-quinases c-Kit (Gu et al., 2009). Ao serem incorporadas no interior dos cordões sexuais primários elas passam a ser designadas de gonócitos (Clermont e Perey, 1957; Magre e Jost, 1980).

Nos mamíferos, o sexo é determinado pela herança dos cromossomos X e Y, enquanto as fêmeas herdam dois cromossomos X (XX), os machos herdam um X e um Y (XY) (Charlesworth, 1991; Kocer et al., 2009). A presença ou ausência do gene *Sry* (*Sex-Determining Region of Y Chromosome*), ligado ao cromossomo Y (Gubbay et al., 1990; Brennan e Capel, 2004), direciona o desenvolvimento gonadal (Lovell-Badge e Robertson, 1990; Koopman et al., 1991). A expressão do *Sry*, nas células de sustentação dos cordões sexuais primitivos, induz a síntese do fator de transcrição *Sox9* nas gônadas XY (Sekido et

al., 2004; Sekido e Lovell-Badge, 2008). Na presença do Sry e do Sox9, o primeiro evento observável na gônada indiferenciada é a diferenciação das células de sustentação dos cordões sexuais primários em células de Sertoli (Lovell-Badge e Robertson, 1990; Koopman et al., 1991; Vidal et al., 2001; Chaboissier et al., 2004). As células de Sertoli induzem a diferenciação do testículo, produzindo fatores que levam a masculinização dos outros tipos celulares da gônada e do mesonefro adjacente (Palmer e Burgoyne, 1991; Ross e Capel, 2005). Além disso, as células de Sertoli expressam a molécula de sinalização Fgf9, a qual regula a expressão do Sox9 (Colvin et al., 2001; Kim et al., 2006). No entanto, ainda não está claro como as células de Sertoli masculinizam os tipos celulares no testículo em desenvolvimento. Em embriões XX, células da linhagem de suporte dos cordões sexuais primários diferenciam-se em células da granulosa quando não ocorre a expressão do Sry. As células somáticas gonadais expressam moléculas de sinalização Wnt, como a Rspo1 e a Wnt4, necessárias para a determinação do sexo feminino (Vainio et al., 1999; Chassot et al., 2008). A Rspo1 e Wnt4 parecem induzir a diferenciação do sexo feminino diminuindo a expressão do Sox9 nas células da linhagem de suporte (Kim et al., 2006; Chassot et al., 2008). Assim, os efeitos antagonistas das moléculas de sinalização Wnt e Fgf9, dependente do Sry/Sox9 direcionam a diferenciação das células da linhagem de suporte e o desenvolvimento gonadal (Kocer et al., 2009) (Fig. 1).

As células de Leydig são formadas a partir de células mesenquimais indiferenciadas do mesoderma das cristas gonadais que envolve os cordões sexuais primitivos e não apresentam nenhum papel na diferenciação sexual primária das gônadas (Byskov, 1986; Benton et al., 1995; Haider, 2004).

Uma vez iniciada a diferenciação do testículo, este determinará o restante da diferenciação masculina por meio dos hormônios por ele produzidos (Moore e Persaud, 2008). O hormônio Anti-Mülleriano (AMH), produzido pelas células de Sertoli, suprime o desenvolvimento dos ductos paramesonéfricos, que iriam formar o útero e as tubas uterinas. As células de Leydig passam a secretar testosterona, a qual evita a morte celular programada dos ductos mesonéfricos e estimula o seu desenvolvimento para formar o epidídimo e o ducto deferente (Pointis et al., 1980). Os cordões sexuais primitivos

desenvolvem-se para formar os túbulos seminíferos, túbulos retos e a rede testis (Pointis et al., 1980).

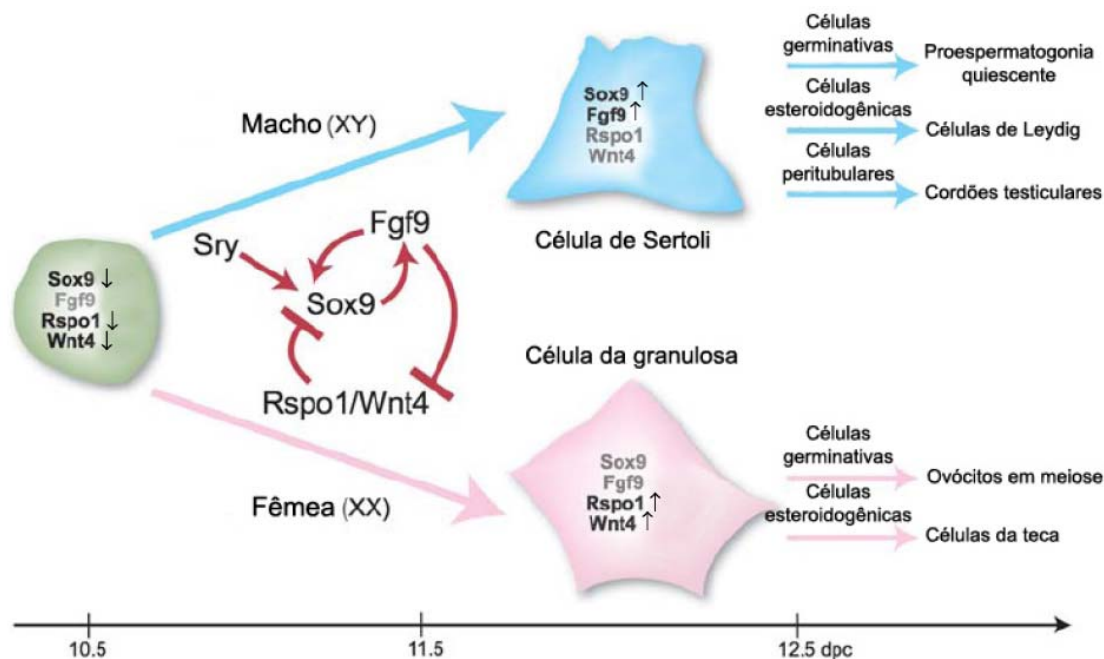


Figura 1 – Determinação sexual somática em camundongos. Diagrama esquemático mostrando a diferenciação das células da linhagem de sustentação (verde) em célula de Sertoli (azul) nos machos ou célula da granulosa (rosa) nas fêmeas. Mudanças na expressão de genes direcionam a diferenciação das células de suporte e dos outros tipos celulares das gônadas. A legenda em cinza indica inatividade gênica. Modificado de Kocer et al. (2009).

2. Células da linhagem germinativa testicular

O desenvolvimento das células germinativas testicular compreende duas etapas principais – a fase pré-espermatogênica, que envolve a formação das células-tronco espermatogoniais, e a fase espermatogênica, relacionada à produção de espermatozóides. Conforme mencionado acima, a primeira delas envolve a formação, no período fetal, das CGP, uma população de células migratórias de alta capacidade proliferativa que colonizam

as gônadas. Essa fase também engloba a transformação das CGP em gonócitos os quais se diferenciam para formar as células-tronco espermatogoniais ou espermatogônias A_{single} (Clermont e Perey, 1957; Magre e Jost, 1980; de Rooij e Russell, 2000; Brennan e Capel, 2004).

Existe muita confusão com relação à terminologia aplicada para definição dos diferentes tipos celulares encontrados na fase pré-espermatogênica, bem como sobre o comportamento e mecanismos envolvidos com a sua diferenciação. Em geral, as células presentes na etapa do desenvolvimento entre as fases de CGP e espermatogônias A_{single} , são simplesmente designadas gonócitos. No entanto, diversos estudos têm indicado que os gonócitos humanos e de roedores envolvem diferentes fases de desenvolvimento, descritos como proespermatogônia mitótica (M) e de transição (T), sendo que essas últimas ainda são subdivididas em T1 e T2 (Fukuda et al., 1975; Wartenberg, 1976; Hilscher, 1991; Vergouwen et al., 1991; Olaso et al., 1998; Boulogne et al., 1999; Livera et al., 2000). Recentemente, vários pesquisadores chegaram à mesma conclusão, pois observaram que as pré/proespermatogonia M, T1 e T2 expressam diferentes níveis e combinações de genes, como o antígeno Melanoma-A4 (MAGE-A4), um gene da família de antígenos de câncer testicular encontrado em espermatogônias, espermatócitos primário e tumores de células germinativas (De Plaen et al., 1999; Aubry et al., 2001), e fosfatase alcalina de células germinativas (GCAP) (Franke et al., 2004; Gaskell et al., 2004; Pauls et al., 2006). Embora Pauls et al. (2006) sugeriram que as células germinativas humanas fetais incluem dois tipos de células, o grupo de Gaskell (Gaskell et al., 2004) e Franke (Franke et al., 2004) identificaram três populações distintas. Essas foram nomeadas gonócitos, células intermediárias e pré-espermatogônias pelo primeiro grupo (Gaskell et al., 2004) e pré-espermatogônia M, T1 e T2 pelo segundo grupo (Franke et al., 2004). Vários estudos têm relatado a expressão de genes encontrados nas células-tronco embrionárias pluripotentes e células-tronco da linhagem germinativa adulta nos gonócitos, já que eles correspondem a etapas intermediárias entre essas células-tronco. Notavelmente, observou-se que os gonócitos apresentam diferenças na expressão desses genes, confirmando a heterogeneidade desse tipo celular (Tabela 1).

Tabela 1 – Resumo da expressão de marcadores específicos de células tronco e da linhagem germinativa em gonócitos comparado às CGP e espermatogônias. Modificado de Culty, 2009.

Estágio das células Germinativas				Referências
PGC	Gonócito			Espermatogônia
	Mitose na fase fetal	Quiescente	Mitose na fase pós-natal	
	13,5-16 dpc (c) 13-18 dpc (r)	16 dpc-1dpp (c) 18 dpc-3 dpp (r)	1-5 dpp (c) 3-5 dpp (r)	
Marcadores de células tronco				
Oct4 ⁺ /c-kit+ ALCAM ⁻		Oct4 ⁺ /c-kit- α6 Intg ⁺ β1 ⁺ Intg (75% of α6 ⁺) EE-2 Ag ⁺ ; ALCAM ⁺ Oct4/Tra98 (98%) Ret ⁺ (55%)	Oct4 ⁺ /c-kit ⁻ ALCAM ⁺	Ohbo et al., 2003
PLZF ⁺	GFRα1 ⁺ /RET ⁺	GFRα1- RET ⁻ PLZF ⁺	Oct4/Tra98 (54%)	Oct4/Tra98 (30%) Ret ⁺ (25%) Ohmura et al., 2004
			RET ⁺ /PLZF ⁺ /c-kit ⁺ (80%)	50% RET ⁺ are KIT ⁺ ; 10% PLZF ⁺ are KIT ⁺ Golden et al., 1999 Costoya et al., 2004 Naughton et al., 2006
		c-kit ⁺ (10%)	c-kit ⁻ c-kit ⁺ (30%) Thy-1 ⁺ /Ep-CAM ⁺ 75% are β3 Intg ⁺	c-kit ⁺ c-kit ⁺ (60%) Tajima et al., 1994 Orth et al., 1997 Ryu et al., 2004
Nanog ⁺ (89%)	Nanog ⁺ (13%)	Nanog ⁺ (1%)	?	Nanog ⁻ Yamaguchi et al., 2005
PGC Humano NANOG ⁺	NANOG ⁺ em gonócitos fetais humanos até a 20ª semana e em poucas células até o 3º mês pós-natal			Nanog ⁻ Hoei-Hansen et al., 2005; Rajpert-De Myets, 2006 Poucas Nanog ⁺ Ezeh et al., 2005
AP-2γ ⁺				Chazaud et al., 1996
AP-2γ ⁺	AP-2γ ⁺ em gonócitos fetais humanos (12 - 20 semanas) AP-2γ ⁺ /OCT4 ⁺ /NANOG ⁺ em gonócitos fetais humanos			AP-2γ ⁻ Pauls et al., 2005 Mitchell et al., 2008
Sox2 ⁺ (c)				Western et al., 2005; Perrett et al., 2008
SOX2 ⁻ Humano Stella ⁺				Perrett et al., 2008 Sato et al., 2002 Saitou et al., 2002 Clark et al., 2004
Stella ⁺	STELLA em células germinativas fetais humanas (20 - 29 semanas)			Stella ⁻
	Baixa GDF3 em testículos fetais humanos (20 - 29 semanas)			Baixa GDF3 Payer et al., 2006 Clark et al., 2004
Marcadores específicos de células da linhagem germinativa				
Dazl ⁺	Dazl ⁺	Dazl ⁺	Dazl ⁺	Dazl ⁺ Reijo et al., 2000
VASA ⁺ Humano Mvh ⁺	Mvh ⁺	VASA ⁺ Humano Mvh ⁺	Mvh ⁺	VASA ⁺ Humano Mvh ⁺ Castrillon et al., 2000; Tanaka et al., 2000
Mili ⁺	Mili ⁺	Mili ⁺	Mili ⁺	Mili ⁺ Kuramochi-Miyagawa et al., 2001; Deng and Lin, 2002

Os dados apresentados referem-se a camundongos (c) ou ratos (r), exceto quando aplicado a humanos como indicado. (+) = presente; (-) = ausente; (%) = porcentagem das células que expressam o gene em questão.

A segunda fase do desenvolvimento das células germinativas, correspondente ao ciclo espermatogênico, inicia-se com a diferenciação de espermatogônias e termina com a produção de espermatozóides. Essa sucessão de eventos é altamente regulada e inclui divisão celular, por mitose e meiose, e complexos processos de diferenciação, tais como a espermiogênese. As espermatogônias são as células germinativas mais imaturas do testículo e encontram-se no compartimento basal do epitélio seminífero. Em roedores, vários estágios espermatogoniais têm sido descritos: espermatogônias do tipo A, A_{single} (A_s), A_{paired} (A_{pr}), A_{aligned} (A_{al}), A_1 , A_2 , A_3 e A_4 , espermatogônias do tipo intermediário (In) e espermatogônias do tipo B (de Rooij, 2001). De Rooij e Russell (2000) propuseram que somente as A_s são pluripotentes e devem ser chamadas indiferenciadas, sendo as únicas com propriedades de células-tronco como a auto-renovação e diferenciação. As A_{pr} já estão comprometidas com a diferenciação e originam as A_{al} , assim designadas por permanecerem conectadas por pontes citoplasmáticas. Essas últimas podem se dividir novamente formando cadeias de 8, 16 e, raramente, 32 células. Todas as A_{al} resultantes da proliferação diferenciam-se em A_1 , e essas se dividem em A_2 . Depois há divisões subsequentes em A_3 , A_4 , In e B. Portanto, um total de 9-11 divisões mitóticas ocorre durante o desenvolvimento espermatogonial (de Rooij, 2001). A coordenação entre a auto-renovação e diferenciação das células-tronco espermatogoniais é regulada pelo fator neurotrófico derivado da linhagem de células gliais (GDNF), o qual é produzido pelas células de Sertoli (Meng et al., 2000). Várias moléculas estão envolvidas no controle da diferenciação das A_1 , incluindo o c-kit (de Rooij et al., 1999), o gene Dazl (Ruggiu et al., 1997; Cooke, 1999), a ciclina D₂ (Beumer et al., 2000a) e o ácido retinóico (RA) (Van Pelt e De Rooij, 1990a, 1990b; van Pelt et al., 1995). Não há uma regulação muito acurada da densidade de células-tronco espermatogoniais, conseqüentemente, em algumas áreas são formadas muitas A_1 enquanto em outras, formam-se poucas. Então, a igualdade na densidade de espermátócitos é obtida pela apoptose das A_2 , A_3 ou A_4 para remover o excesso de células. Membros da família de genes Bcl-2, como Bax e Bcl-x_L estão envolvidos nesse processo (Beumer et al., 2000b; Russell et al., 2002).

A diferenciação dos gonócitos em espermatogônias no período neonatal é crucial para o estabelecimento da fertilidade e ocorre por uma sucessão de eventos de proliferação,

morte e relocação celulares bem estabelecidos para alguns roedores como o rato e o camundongo (Clermont e Perey, 1957; Magre e Jost, 1980; McGuinness e Orth, 1992a, 1992b; De Miguel et al., 1996; Boulogne et al., 1999; Nagano et al., 2000; Sakai et al., 2004). Esses estudos mostram que a proliferação dos gonócitos ocorre em duas fases: no período fetal e neonatal, sendo separadas por um período de quiescência (Magre e Jost, 1980; McGuinness e Orth, 1992b). A primeira fase inicia-se quando as células germinativas são aprisionadas nos cordões sexuais primários, entre 13,5 e 16 dias pós-concepção (dpc) no camundongo e entre 13-18 dpc, no rato. A segunda ocorre logo após o nascimento, entre 1-4 dias pós-parto (dpp) no camundongo e entre 3-4 dpp no rato, quando começa a sua diferenciação em espermatogônias A (Clermont e Perey, 1957; McGuinness e Orth, 1992b; De Miguel et al., 1996; Boulogne et al., 1999). A atividade proliferativa dos gonócitos nessas duas fases do desenvolvimento testicular é regulada por diferentes fatores. O RA é um fator crítico no desenvolvimento embrionário e na organogênese de diversos sistemas (Duester, 2008), e recentemente foi descoberto que ele parece ser importante na determinação do destino das células germinativas fetais (Bowles et al., 2006). O RA mantém o gonócito fetal em mitose, impedindo assim a sua diferenciação, e, além disso, ele pode induzir a apoptose dessa célula (Livera et al., 2000). Assim, foi proposto que a dupla ação do RA, estimulação da proliferação e apoptose, corresponde a um processo fisiológico que permite a eliminação de células germinativas indevidas (Livera et al., 2000; Boulogne et al., 2003). Em conjunto, estes estudos sugerem que o RA exerce um efeito positivo sobre a proliferação dos gonócitos fetais, que é dependente da idade, tanto em ratos como em camundongos, embora simultaneamente induza a apoptose (Culty, 2009). Já, a proliferação pós-natal dos gonócitos também é regulada por outros fatores como o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF)-BB, 17 β -estradiol (E2), fator inibidor da leucemia (LIF) (Culty, 2009) e andrógenos (Merlet et al., 2007). Os andrógenos não eram considerados importantes para o desenvolvimento das células germinativas, pois não era conhecida a expressão de receptores androgênicos nessas células durante a vida fetal e neonatal (Williams et al., 2001). Entretanto, recentemente Merlet et al. (2007) demonstraram em seus estudos com camundongos feminilizados (*Tmf*) que os andrógenos endógenos podem agir diretamente sobre os gonócitos inibindo sua proliferação.

Outro evento indispensável para a diferenciação neonatal das células germinativas é a migração dos gonócitos do centro para a base dos cordões seminíferos (Roosen-Runge e Leik, 1968; McGuinness e Orth, 1992b; Tres e Kierszenbaum, 2005). Vários estudos têm investigado os fatores que controlam esse comportamento migratório. A comparação da expressão do c-kit indicou que ele está ausente em gonócitos quiescentes não-migratórios, presente nos subtipos de gonócitos em migração e, sua expressão é diminuída nas células-tronco espermatogoniais, que residem na membrana basal e não migram. Sua posterior re-expressão na espermatogônia tipo A_{pr} está relacionada à sobrevivência da célula (Orth et al., 1997). Esse padrão de expressão o aponta como um importante mediador da migração dos Gn. O complexo protéico ADAM-Integrina-Tetraspanina identificado em células germinativas pós-natal (prespermatogonia/gonócitos) também foi postulado como mediador potencial da migração dos Gn (Tres e Kierszenbaum, 2005). Esse complexo protéico é formado pelas proteínas ADAM (domínio A Disintegrina e A metaloprotease) 1 e 2, as integrinas $\alpha 3\beta 1$ e $\alpha 6\beta 1$, e as tetraspaninas (superfamília de proteínas transmembrana) CD9 e CD81. Recentemente, Basciani et al. (2008) propôs que o receptor do fator de crescimento derivado das plaquetas β (PDGFR- β) também desempenha um papel na regulação da migração dos gonócitos (Basciani et al., 2008).

A migração dos gonócitos do centro para a base dos cordões seminíferos e sua aderência à membrana basal são eventos necessários para a sua diferenciação em espermatogônias (Roosen-Runge e Leik, 1968; McGuinness e Orth, 1992b; Tres e Kierszenbaum, 2005). O PDGFR- β , além de regular a migração dos gonócitos parece participar da diferenciação dessas células também (Wang e Culty, 2007). Diversos estudos sugerem que o RA induz a diferenciação dos Gn, em ratos (Wang e Culty, 2007) e camundongos (Zhou et al., 2008), pois ele regula a expressão de dois genes utilizados como indicadores da transição gonócito/espermatogônia, o Stra8 (Bouillet et al., 1995) e o c-kit. O RA induz um aumento na transcrição do Stra8 (Wang e Culty, 2007) e simultaneamente há um aumento na expressão do c-kit, resultando na redução de células-tronco espermatogoniais e aumento das espermatogônias tipo A.

Os gonócitos desaparecem totalmente por volta do 10 dpp no rato (Clermont e Perey, 1957) e aqueles que não migraram são alvos da apoptose (Tres e Kierszenbaum, 2005). A

apoptose ou morte celular programada é definida por eventos bioquímicos e morfológicos que resultam em uma maneira eficiente de eliminar as células de um tecido, sem levar ao comprometimento das células vizinhas (Kerr et al., 1972). Trata-se de um processo essencial para o desenvolvimento embrionário e organogênese da maioria dos órgãos, e o testículo não é exceção (Wang et al., 1998; Boulogne et al., 1999). Estudos quantitativos realizados no rato mostram que um número grande de gonócitos morre por apoptose no período neonatal, alcançando taxas de 25-30% no 7 dpp (Boulogne et al., 1999). Esse padrão de incidência de apoptose também ocorre para o hamster dourado (Miething, 1992), mas não é comum a todos os roedores, visto que no camundongo os gonócitos degeneram por necrose (Wang et al., 1998). Além disso, Sakai e colaboradores (2004) reexaminaram a cinética da diferenciação dos gonócitos com base na expressão da proteína VASA, um marcador específico de células germinativas, e na expressão de PCNA, sugerindo que não ocorre degeneração dos gonócitos no camundongo.

3. Células de Leydig

As células de Leydig estão localizadas no interstício dos testículos, constituindo o componente endócrino deste órgão. Morfologicamente, elas se caracterizam pela abundância de organelas envolvidas com biossíntese de hormônios esteróides, como o retículo endoplasmático liso e mitocôndrias. Possuem complexo de Golgi bem desenvolvido e grande quantidade de peroxissomos e lisossomos (Haider, 2004). Elas sintetizam e liberam os andrógenos ou hormônios sexuais masculinos, requeridos em altas concentrações no interior dos túbulos seminíferos, a fim de sustentar a espermatogênese. Além da ação parácrina em nível testicular, os andrógenos circulantes na corrente sanguínea são essenciais para a manutenção das funções das glândulas acessórias do sistema genital masculino – vesícula seminal, próstata e glândulas bulbouretrais – e também para a manutenção das características sexuais secundárias (Payne e Youngblood, 1995).

Os andrógenos são uma classe de hormônios sexuais derivados do colesterol, encontrados em múltiplas formas nos mamíferos (Davison e Bell, 2006; Roy et al., 2008).

Pertencem, portanto, ao grupo de esteróide androstano, os quais são compostos de 19 átomos de carbono (Roy et al., 2008). O principal andrógeno produzido pelo testículo é a testosterona, correspondendo a 95% dos andrógenos totais encontrados na circulação sanguínea. Entretanto, outros compostos de menor atividade androgênica também podem ser secretados pelo testículo como a diidrotestosterona (DHT), desidroepiandrosterona (DHEA), androstenediona e a androstenodiol. A DHT é formada a partir da testosterona, sob a ação da enzima 5α -redutase, sendo a forma de andrógeno mais potente metabolicamente. A DHEA, androstenediona e a androstenodiol são precursores da testosterona e metabolicamente mais fracos (Davison e Bell, 2006; Roy et al., 2008).

A biossíntese dos andrógenos envolve alteração progressiva do colesterol pela ação de várias enzimas específicas (Payne e Youngblood, 1995). Na fase biossintética inicial, o colesterol é transportado para a membrana interna da mitocôndria pela proteína reguladora aguda da esteroidogênese (StAR), sendo irreversivelmente convertido em pregnenolona pelo citocromo P450_{scc}, que cliva sua cadeia lateral (Miller e Strauss, 1999). Então, a pregnenolona é direcionada para o REL e convertida em diferentes formas moleculares devido à ação de enzimas específicas. A 3β -hidroxiesteróide desidrogenase (3β -HSD) promove a conversão da pregnenolona em progesterona; a 17α -hidroxilase/C $17,20$ -liase (17 -OHase/C $17,20$ -liase – citocromo P450_{c17}) ativa a conversão da progesterona em 17 -hidroxiprogesterona e androstenediona, respectivamente. Finalmente, a 17β -hidroxiesteróide desidrogenase (17β -HSD) catalisa a conversão da androstenediona em testosterona (Payne e Youngblood, 1995).

Além da síntese de testosterona, as células de Leydig também produzem estrógenos, pois elas expressam a enzima P450 aromatase (P450_{arom}), a qual catalisa a aromatização da testosterona em estrógeno (Carreau et al., 1999; O'Donnell et al., 2001). Outras enzimas como a 11β -hidroxiesteróide esteróide desidrogenase (11β -HSD), 3α -HSD e a 5α -redutase também estão envolvidas na síntese, bem como no metabolismo dos esteróides. A 11β -HSD catalisa a oxidação da corticosterona para o metabólico inativo 11 -dehidrocorticosterona em células de Leydig de ratos (Phillips et al., 1989; Monder et al., 1994a; Monder et al., 1994b; Ge et al., 1997a; Ge et al., 1997b; Ge e Hardy, 2000). Existem duas isoformas da 11β -HSD: tipo 1 (Seckl e Walker, 2001) e tipo 2 (Yang e Yu, 1994), e

muitos estudos mostram que as células de Leydig de ratos contêm a 11 β -HSD1 (Ge et al., 1997b; Leckie et al., 1998; Brereton et al., 2001). O surgimento das 11 β -HSD1 está correlacionado com o aumento pós-natal no número de células de Leydig, peso testicular, superfície total da área de membranas intracelular, e conteúdo e secreção de testosterona dessas células (Phillips et al., 1989). Com base nessas e outras evidências ela tem sido usada como um marcador da maturidade funcional das células de Leydig (Phillips et al., 1989; Haider et al., 1990; Monder et al., 1994a; Monder et al., 1994b).

No testículo de mamíferos são reconhecidas duas populações de células de Leydig distintas morfológica e fisiologicamente: as células de Leydig fetais (CLF) e as adultas (CLA) (Mendis-Handagama e Ariyaratne, 2001; Haider, 2004; Wu et al., 2007). A existência das duas populações foi relatada primeiramente, em 1959, para o rato (Roosen-Runge e Anderson, 1959), sendo posteriormente confirmada para outros roedores (Baillie, 1964; Lording e De Kretser, 1972; Gondos et al., 1974) e humanos (Mancini RE, 1963). Ambas as populações são formadas a partir de células mesenquimais indiferenciadas, mas diferem morfológicamente e quanto à expressão de enzimas e receptores que funcionam como marcadores de seu grau de maturação e funcionalidade (Byskov, 1986; Mendis-Handagama e Ariyaratne, 2001; Haider, 2004; Wu et al., 2007).

As CLF aparecem no testículo por volta do 13º dia de gestação no camundongo e do 16º dia de gestação do rato (Mendis-Handagama et al., 1987; Kerr e Knell, 1988). Por este motivo, lhes tem sido atribuída uma importância para o testículo neonatal e púbere relacionada à produção de testosterona e ativação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (Mendis-Handagama e Ariyaratne, 2001; Haider, 2004; Wu et al., 2007). As CLF são arredondadas, formam aglomerados com uma pequena quantidade de células, rodeados pela membrana basal e por fibroblastos e são facilmente reconhecidas devido à abundância de gotículas lipídicas de grande tamanho no citoplasma (Haider, 2004). Estas células expressam receptores de LH e sintetizam 3 β -HSD (Ziegler et al., 1983; Haider et al., 1986; Huhtaniemi e Pelliniemi, 1992; Majdic et al., 1998), contudo, não contêm atividade da enzima 11 β -HSD1 (Ariyaratne e Mendis-Handagama, 2000) (Phillips et al., 1989).

Estudos a respeito da morfologia das células e expressão de enzimas envolvidas com a síntese de hormônios esteróides têm trazido contribuições importantes em relação à

dinâmica do processo de diferenciação das CLA ao longo do desenvolvimento pós-natal de roedores (Mendis-Handagama e Ariyaratne, 2001; Haider, 2004). Desta maneira, quatro estádios progressivos de maturação têm sido descritos para esta linhagem celular em mamíferos (Fig. 2), designados de células progenitoras, CLA recém formadas, CLA imaturas e CLA maduras (Roosen-Runge e Anderson, 1959; Lording e De Kretser, 1972; Mendis-Handagama et al., 1987; Mendis-Handagama e Ariyaratne, 2001) .

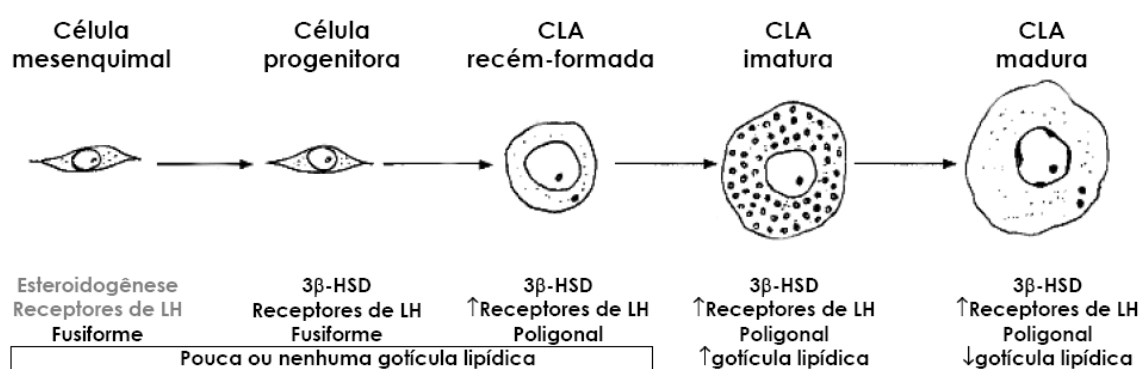


Figura 2 – Linhagem das células de Leydig. CLA = célula de Leydig adulta. A legenda em cinza indica ausência. Modificado de Mendis-Handagama e Ariyaratne (2001).

As células precursoras são fusiformes, não possuem receptores de LH e também não tem atividade esteroidogênica (Mendis-Handagama e Ariyaratne, 2001; Haider, 2004). Embora as células progenitoras sejam morfológicamente indistinguíveis das células precursoras indiferenciadas, elas foram definitivamente recrutadas em direção a linhagem das células de Leydig, visto que expressam enzimas esteroidogênicas (Haider et al., 1986; Haider e Servos, 1998; Teerds et al., 1999; Ariyaratne et al., 2000a; Mendis-Handagama e Ariyaratne, 2001; Haider, 2004), e, portanto, são capazes de produzir andrógenos (Hardy et al., 1990; Shan e Hardy, 1992). Possuem receptores de LH (Huhtaniemi et al., 1986; Shan e Hardy, 1992; Ariyaratne et al., 2000a) os quais, entretanto, encontram-se na forma não

funcional (Mendis-Handagama e Ariyaratne, 2001; Haider, 2004). A diferença mais óbvia entre as progenitoras e as CLA recém formadas é a mudança da forma fusiforme para poligonal, respectivamente (Mendis-Handagama e Ariyaratne, 2001). As CLA recém-formadas correspondem a primeira fase de diferenciação a exibir as características típicas dessa linhagem celular, apresentando núcleo esférico ou ligeiramente ovalado e citoplasma bastante escasso e acidófilo, devido a presença de enzimas esteroidogênicas (Teerds et al., 1999; Mendis-Handagama e Ariyaratne, 2001), possuem poucas ou nenhuma gotículas lipídicas (Mendis-Handagama et al., 1987; Mendis-Handagama e Ariyaratne, 2001) e possuem receptor de LH funcional (Bortolussi et al., 1990). Além disso, a princípio elas não contêm a enzima 11β -HSD1, mas à medida que vão diferenciando-se em CLA imaturas passam a expressar gradualmente esta enzima. Devido ao aumento do citoplasma, as CLA recém formadas crescem e tornam-se CLA imaturas (Mendis-Handagama e Ariyaratne, 2001). Estas possuem núcleo volumoso, cromatina descompactada, nucléolo evidente e citoplasma abundante, repleto de gotículas lipídicas (Zirkin e Ewing, 1987; Mendis-Handagama e Ariyaratne, 2001). O número total de gotículas, bem como o tamanho individual destas gotículas é menor do que as observadas nas CLF (Kerr et al., 1987; Haider e Servos, 1998). As CLA imaturas são positivas para 11β -HSD1, no entanto, a atividade da 17β -HSD é menor, e a sua capacidade de produzir testosterona é considerada inferior em relação às CLA maduras (Eckstein et al., 1987). A transição das CLA imaturas para maduras é caracterizada pelo aumento significativo no tamanho médio da célula e o desaparecimento das gotículas lipídicas do citoplasma. A capacidade de secretar testosterona aumenta consideravelmente porque elas adquirem mais organelas necessárias para a produção de esteróides (Mendis-Handagama e Ariyaratne, 2001; Haider, 2004), e conseqüentemente mais enzimas relacionadas com atividade esteroidogênica, particularmente a 17β -HSD que catalisa a etapa final da biosíntese da testosterona (Eckstein et al., 1987). A resposta ao LH também aumenta, e isto se deve a aquisição de um alto número de receptores para esta gonadotrofina (Shan e Hardy, 1992).

Os mecanismos envolvidos no início da diferenciação das células de Leydig e na manutenção das diferentes populações celulares no adulto ainda são controversos (Mendis-Handagama e Ariyaratne, 2001; Haider, 2004; Wu et al., 2007). O Hormônio Luteinizante

(LH) tem sido sugerido como o principal regulador da diferenciação das células de Leydig, uma vez que a maioria das etapas de diferenciação é criticamente dependente de seu estímulo. O LH induz a proliferação, a hipertrofia celular, e a formação de organelas e enzimas requeridas para a função esteroidogênica (Mendis-Handagama e Ariyaratne, 2001; Huhtaniemi et al., 2002; Haider, 2004; Wu et al., 2007). Entretanto, a constatação de que as células progenitoras adquirem seu potencial esteroidogênico antes de exibirem os receptores de LH indica que o primeiro passo da diferenciação das células de Leydig, isto é, a transformação das células precursoras não esteroidogênicas em células progenitoras esteroidogênicas, é independente de LH (Majdic et al., 1998; Mendis-Handagama et al., 1998; Ariyaratne et al., 2000a; Baker et al., 2003). Sabe-se, também, que a testosterona e o estrógeno inibem o início da diferenciação das células precursoras, mas desempenham um papel importante no testículo adulto, pois inibem a diferenciação das células precursoras mantendo um número constante de células de Leydig (Bremner et al., 1994; Abney, 1999; Mendis-Handagama e Ariyaratne, 2001; Haider, 2004; Wu et al., 2007). Depois que as células progenitoras são formadas, os andrógenos tornam-se essenciais para sua diferenciação em CLA. A expressão de receptores de andrógenos em todas as fases de diferenciação sugere que estes hormônios sejam necessários para a aquisição das enzimas responsáveis pela síntese de esteróides e conseqüente maturação funcional destas células (Buzek e Sanborn, 1988; Shan e Hardy, 1992; Bremner et al., 1994; O'Shaughnessy et al., 2002). O papel do hormônio folículo estimulante (FSH) no desenvolvimento das células Leydig tem sido um assunto controverso. Estudos realizados em ratos imaturos hipofisectomizados (Teerds et al., 1989a), ratos adultos hipofisectomizados tratados com etano dimetano sulfonato (EDS) (Molenaar et al., 1986) e camundongos com hipogonadismo (O'Shaughnessy et al., 1992) revelaram que FSH não é exigido para o desenvolvimento de células de Leydig. Em contraste, estudos mais recentes têm sugerido uma função estágio-específica do FSH na regulação do desenvolvimento de células Leydig, modulando a resposta ao LH e a esteroidogênese (Sriraman e Jagannadha Rao, 2004). O AMH sustenta um complexo e essencial papel no balanço entre proliferação e diferenciação das células de Leydig durante a maturação puberal (Lyet et al., 1995; Racine et al., 1998; Wu et al., 2005), no entanto, este conceito precisa ser melhor explorado. O fator de

crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I) estimula a proliferação das células de Leydig imaturas (Khan et al., 1992) e promove a maturação das CLA imaturas em maduras (Chatelain et al., 1991). O fator de crescimento transformante α e β (TGF- α e TGF- β) também controla as funções das células de Leydig. TGF- α é um mitógeno para as células precursoras mesenquimais. Além disso, ambos TGF- α e TGF- β (em menor proporção que TGF α) estimulam a mitose das células de Leydig na presença de LH (Khan et al., 1992). Além disso, outros estudos têm mostrado que TGF- β age como um potente inibidor sobre a funcionalidade das células Leydig (Skinner, 1991; Saez, 1994), embora os dados sobre este assunto sejam inconclusivos e não tem sido corroborados por estudos com camundongos knock-out para o TGF- β (Habert et al., 2001). O PDGF é um fator essencial para a diferenciação das CLA. Recentes investigações demonstraram que a expressão de PDGF nas células progenitoras pode induzir a proliferação celular e a migração dessas células a partir da região peritubular durante a diferenciação das células de Leydig (Fecteau et al., 2006). Os fatores que regulam a diferenciação das CLA no testículo pós-natal estão resumidos na Figura 3.

4. O gerbilo como modelo experimental

O gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*), também conhecido como esquilo da Mongólia ou “clawed jirds”, é um roedor murídeo da subfamília Gerbillinae provenientes das regiões áridas da China e da Mongólia (Schwentker, 1963). Introduzidos nas Américas como nova proposta de animal experimental nos anos cinquenta por Victor Schwentker, os gerbilos, durante muito tempo, ficaram limitados aos Estados Unidos como animais de excelência para a pesquisa biomédica (Robinson, 1974). Nas últimas décadas, vêm sendo gradativamente introduzidos nos biotérios das universidades brasileiras e têm assumido importante papel nos experimentos biológicos e biomédicos juntamente com outras espécies clássicas como *Rattus rattus norvegicus* (rato), *Mus musculus* (camundongo) e *Mesocricetus auratus* (hamster).

De anatomia similar à do rato e do camundongo, os gerbilos adultos de ambos os sexos variam entre 11,5 e 14,5cm de comprimento corpóreo. Os machos pesam em torno de 100 gramas enquanto as fêmeas pesam cerca de 85 gramas (Kramer, 1964).

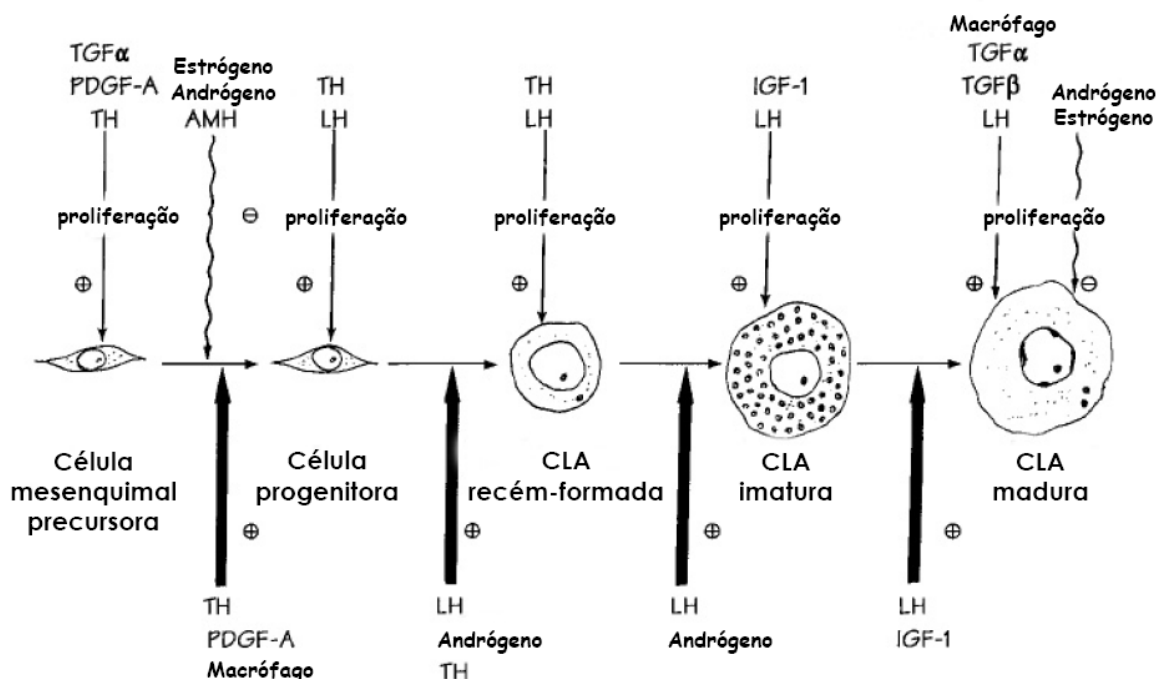


Figura 3 - Resumo dos fatores envolvidos no controle da diferenciação das células de Leydig no testículo pós-natal. CLA: célula de Leydig adulta; TH: hormônio da tireóide; (+): estimulação; (-): inibição. (Modificado de Mendis-Handagama e Ariyaratne, 2001).

A grande vantagem desses animais para estudos experimentais reside no fato deles serem consideravelmente menores que os ratos, mas essencialmente maiores que os camundongos e hamsters (Williams, 1974). Estes animais têm sido amplamente utilizados para estudos de natureza didático-científica principalmente pelo fato de terem comportamento extremamente dócil em cativeiro. Outra característica importante a ser considerada é que apresentam comportamento de micção pouco freqüente e, por serem de origem desértica, consomem pouca quantidade de líquido, o que agiliza muito a limpeza das gaiolas no processo de manutenção desses animais em cativeiro, promovendo grande asseio nas salas de manutenção dos animais nos biotérios.

Esse roedor tem sido amplamente utilizado nas mais diversas áreas da pesquisa biomédica (Cao et al., 2005; Ter-Mikaelian et al., 2007; Wiedemann et al., 2009). No que se refere ao aparelho reprodutor masculino, um número crescente de estudos tem sido publicado nos anos recentes. Estudos realizados em nosso laboratório o apontam como um interessante modelo animal para o estudo da próstata masculina (Pegorin de Campos et al., 2006; Scarano et al., 2006; Goes et al., 2007; Oliveira et al., 2007; Rochel et al., 2007) e feminina (dos Santos et al., 2003; 2008; Custodio et al., 2008; Fochi et al., 2008). Ninomiya e Nakamura (1987) evidenciaram aspectos gerais do desenvolvimento pós-natal testicular. Segatelli e colaboradores descreveram as características estruturais do testículo adulto, a duração da espermatogênese e aspectos da diferenciação das espermátides relacionados à formação do acrossomo (Segatelli et al., 2000; Segatelli et al., 2002; Segatelli et al., 2004). Entretanto, existe uma lacuna a respeito das fases iniciais da diferenciação testicular neste roedor, não sendo do nosso conhecimento as descrições detalhadas sobre o desenvolvimento pós-natal do testículo nem tampouco sobre a diferenciação das células germinativas e de Leydig. Com o objetivo de ampliar o conhecimento sobre os fatores envolvidos na maturação e regulação da atividade metabólica dessas células, torna-se interessante caracterizar estas populações em outros modelos de roedores ainda não estudados e comparar o processo de diferenciação com o descrito para roedores intensivamente estudados.

OBJETIVOS

Este estudo teve como proposta caracterizar o desenvolvimento pós-natal do testículo do gerbilo da Mongólia (*Meriones unguiculatus*), com ênfase para os processos que levam ao estabelecimento da linhagem de células germinativas e de células de Leydig. Assim, nossos objetivos foram:

1. Descrever a diferenciação das células da linhagem germinativa testicular durante o período neonatal e púbere, com ênfase para os eventos envolvidos na diferenciação dos gonócitos;
2. Caracterizar os principais estágios de diferenciação das células de Leydig adultas, com base nas características estruturais e na expressão de enzimas esteroidogênicas e à cronologia do seu surgimento;
3. Traçar um panorama da cinética populacional das células de Leydig fetais e adultas, desde o nascimento até a senilidade.

**NEONATAL GONOCYTE DIFFERENTIATION IN MONGOLIAN GERBIL
Meriones unguiculatus INVOLVES ASYNCHRONOUS MATURATION OF
SEMINIFEROUS CORDS AND RAPID FORMATION
OF TRANSITIONAL CELL STAGE**

Aceito pela revista The Anatomical Record

Neonatal gonocyte differentiation in Mongolian gerbil *Meriones unguiculatus* involves asynchronous maturation of seminiferous cords and rapid formation of transitional cell stage

Maria Etelvina Pinto^{1#}, Livia Silva Botta^{2#}, Sebastião Roberto Taboga² and Rejane Maira Góes^{2*}

¹Department of Cell Biology, Institute of Biology, State University of Campinas – UNICAMP, P.O. Box 190, 13084-971, Campinas, SP, Brazil.

²Department of Biology, São Paulo State University – IBILCE/UNESP, Rua Cristóvão Colombo, 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Running Title: Gonocyte differentiation in Mongolian gerbil

Summary sentence: The Mongolian gerbil gonocyte relocation commences prenatally and continues until the second week of life, and involves asynchronous maturation of seminiferous cords and rapid formation of prospermatogonia.

Keywords: Gonocytes, testis, proliferation, androgen receptor, Mongolian gerbil

These authors contributed equally to this work

*** Corresponding author**

Prof. Dr. Rejane Maira Góes

Rua Cristóvão Colombo nº 2265. CEP 15054–000. São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Telephone: +55 17 32212391. Fax +55 17 32212390.

E-mail: remagoes@ibilce.unesp.br

This study was funded by Coordinating Body for Training University-Level Personnel (CAPES, fellowship to M.E.P.), Brazilian National Research and Development Council (CNPq, fellowship to L.S.B. PIBIC – 12/069/2008-7), and FAPESP – Sao Paulo State Research Foundation (2006-07008).

ABSTRACT

This study describes the neonatal differentiation of the Mongolian gerbil gonocytes, focusing on the relationship between its relocation to the basement membrane, apoptosis and post-relocation changes and also the distribution of androgen receptors (AR). Testes of gerbils from 1 to 35 days of age (d) were examined by high resolution light microscopy and immunocytochemistry for proteins PCNA, VASA and AR as well as by the TUNEL method. Gonocytes were quantified according to degree of relocation into non-relocated, relocating and relocated. Most of them were found in the center of seminiferous cords at 1d but a small number of relocating and relocated gonocytes were already visible in the first postnatal day. After relocation, gonocytes change phenotypically to a transitional stage designated herein prospermatogonia. Both gonocyte relocation and transformation into spermatogonial lineage occur asynchronously in the seminiferous cords, mainly after 7d. Gonocyte proliferation began before but peak after their relocation to basement membrane at the prospermatogonia stage. Higher levels of gonocyte apoptosis were found at 7d and 21d. From this time onward gonocytes were not found. Gonocytes and prospermatogonia showed high amounts of AR in their cytoplasm contrary to spermatogonial subtypes, indicating a possible AR inactivation in these cells. In conclusion, the process of gonocyte relocation in the gerbil extends until the second postnatal week, leads to their rapid differentiation into prospermatogonia and occurs simultaneously with the loss of androgen sensitivity. Differently from other laboratory rodents, the events regarding gonocyte maturation in the gerbil last longer and occur asynchronously in seminiferous cords.

INTRODUCTION

The Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*), also known as the laboratory gerbil, is a small rodent from China and Mongolia that has been increasingly used in biomedical research, especially in studies on the reproductive system. This gerbil has proved to be a useful animal model for investigations of both the male prostate complex (Rochel et al., 2007) and female prostate (Santos et al., 2008). In the Mongolian gerbil, spermatogenesis begins at week two of life and sexual maturity occurs at week ten (Ninomiya and Nakamura et al., 1987). The development of spermatogonia into spermatozoa in this species lasts approximately 42.5 days and the seminiferous epithelial cycle comprises 12 stages (Segatelli et al., 2002; 2004). Whereas some aspects of testicular histophysiology of gerbil are well known, others remain poorly studied including the neonatal differentiation of male germ cells.

Gonocytes (Gn) are the fetal/neonatal precursors of germline cells. Their neonatal differentiation is an essential process for the development and maturation of mammalian testes and requires their proliferation, relocation to the basement membrane of seminiferous epithelium and apoptosis (Clermont and Perey, 1957; Magre and Jost, 1980; McGuinness and Orth, 1992a, b; Brennan and Capel, 2004; Sakai et al., 2004). Two phases of Gn proliferation occur in some rodents such as rat, the first in the embryonic period and the second at 4 days of age (Miething, 1992; Wang et al., 1998; Boulogne et al., 1999). Between these mitotic phases Gn remain quiescent (Clermont and Perey, 1957; Magre and Jost, 1980; McGuinness and Orth, 1992b). In rats and hamsters, the periods of Gn mitotic activity coincide with the highest apoptotic rate (Miething, 1992; Boulogne et al., 1999). This pattern, however, does not seem to be common to all rodents, since mice lack a neonatal apoptosis peak and Gn degenerate by necrosis (Wang et al., 1998). The Gn relocation to the basement membrane of seminiferous epithelium, during the neonatal period, is critical for its survival, because Gn that remain within the tubule center

degenerate (Roosen-Runge and Leik, 1968; Rodriguez et al., 1997). In rats, the relocation begins one day after neonatal proliferation which suggests that these events are independent and probably regulated by different mechanisms (McGuinness and Orth, 1992a). Even though the neonatal Gn differentiation is essential for spermatogenesis and consequently for fertility in adulthood, the relationship among the proliferation, relocation and apoptosis processes is still unclear. Thus, there are many gaps regarding the mechanisms that are responsible for the differentiation of these pluripotent germ cells, not only those concerning migrations and re proliferation, but also the ones related to their post-relocation changes and differentiation into spermatogonia. The present study evaluated the differentiation of germ line cells in the male Mongolian gerbil, during the neonatal and prepubertal periods with emphasis on gonocyte relocation, apoptosis and transition to spermatogonia.

MATERIAL AND METHODS

1. Animals

Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) were kept in the Animal Breeding Center at the Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences, São Paulo State University – UNESP. Their reproduction and maintenance occurred at controlled temperature (23–25° C) and humidity (40–60%) under a 12 h light/dark cycle. Gerbils were given free access to water and food (Labina, Purina, Paulínia, Brazil). The experimental procedures were approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Experimentation of UNESP no. 31/07 based on the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH publication no. 85–23, revised 1996). The families were evaluated daily in the

morning and the birth date was considered day 0. Male gerbils aged 1, 2, 3, 5, 7, 14, 21, 28 and 35 days (d) were used (n=8 animals per age).

2. *Light and transmission electron microscopy*

Gerbils up to 14d were killed by CO₂ inhalation and the testes were fixed by immersion. The older animals were anesthetized with Ketamine (800 µl/kg) and Xylazine (200 µl/kg); then, perfusion was performed, via the aorta, using heparinized saline solution (Sprando, 1977) followed by Bouin's fixative or 2.5% glutaraldehyde, 1% tannic acid, 3.5% sucrose and 5mM calcium chloride solution in 0.1M cacodylate buffer pH 7.4.

The testes were fixed for 6h in Bouin's fluid and sectioned 1h after immersion. The testicular fragments were submitted to a series of baths in 70% alcohol over several days and then embedded in Paraplast (Merck, Darmstadt, Germany). Paraffin sections (4µm thickness) were used for histological and immunocytochemical analyses and for detection of apoptotic cells. The analyses were performed in an Olympus BX60 photomicroscope (Olympus, Hamburg, Germany) and the images were digitalized using the software Image-Pro Plus 6.0 for Windows (Copyright© 1993-2006 Media Cybernetics, Inc., Bethesda, MD, USA).

For transmission electron microscopy analyses, the testes were fixed in 2.5% glutaraldehyde, 1% tannic acid, 3.5% sucrose and 5mM calcium chloride solution in 0.1M cacodylate buffer pH 7.4, for 2 h at 4°C and cut into approximately 1mm cubes 30 min after immersion. Testicular fragments were post-fixed in 1% osmium tetroxide in cacodylate buffer for 2 h and embedded in Araldite 502 (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA).

123 *3. Germ and Sertoli cell counting and spermatogonial identification*

124 Thick sections (1µm thickness) stained with Toluidine blue were digitalized at 1000x and
125 employed to estimate gonocyte and Sertoli cell numbers. The gerbil testes up to 14d were
126 scanned in their entirety and the images of contiguous microscopic fields were digitalized. For
127 higher ages, thick sections from four different testicular fragments were employed and all
128 seminiferous tubules of each section were examined. The gonocytes were classified, according to
129 their position in the seminiferous tubules, into: 1) central gonocyte (CG) - localized in the central
130 region of seminiferous tubules; 2) relocating gonocytes (RgG) - those presenting cytoplasmic
131 projections toward the basement membrane of the seminiferous epithelium and 3) relocated
132 gonocyte (RG) – those adhering to the basement membrane. The total numbers of gonocytes and
133 Sertoli cells per animal were expressed as percentages.

134 The recognition of spermatogonial generations was based on high-resolution light
135 microscopic features for studying mice described by de Rooij and Russel (2000) and Chiarini-
136 Garcia and Meistrich (2008) and by the expression of VASA protein.

137
138 *4. Immunocytochemistry*

139 Immunocytochemistry was performed for the PCNA protein, a marker of cell proliferation
140 and for VASA, a specific protein of germ cells. The histological sections were subjected to
141 antigen retrieval using citrate buffer pH 6.0, at 96-98°C for 60 min followed by incubation with
142 “Background Sniper” solution (Biocare Medical, Concord, CA, USA), for 15 min, to block non
143 specific protein interactions. Next, they were incubated with primary antibodies: mouse IgG2a
144 anti-human PCNA (sc-56/Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) or with rabbit IgG
145 anti-human VASA (sc-67185/Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), diluted 1:50 in

BSA 1%, and maintained overnight at 4°C. Sequential blockade of endogenous peroxidases was accomplished with 3% H₂O₂ in TBS, protected from light, for 30 min. The sections subjected to anti-PCNA were incubated with Post Primary Block followed by a new incubation with Polymer (Novocastra, Newcastle Upon Tyne, UK), for 45 min at 37°C. For immunodetection of androgen receptor (AR), the histological sections were subjected to antigen retrieval using citrate buffer pH 6.0, at 96-98°C for 45 min. The blockade of endogenous peroxidases was obtained by covering the slides with 3% H₂O₂ in methanol, for 15 min, followed by incubation with “Background Sniper” solution (Biocare Medical, Concord, CA, USA), for 15 min, to block nonspecific protein linkage. Sequentially, sections were incubated with rabbit IgG anti-human primary antibody (sc-816/Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) at 4°C overnight. The slides were then incubated with the biotinylated anti-rabbit followed by avidin-biotin complex (ABC) kit (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) for 45 min at 37°C. The reactions were revealed with diaminobenzidine (DAB). Those sections incubated with anti-VASA were treated with Polymer Kit conjugated with alkaline phosphatase (Rat and mouse double-stain kit - Biocare Medical, Concord, CA, USA), for 60 min and the reaction was revealed with Vulcan Fast Red for 20 min. The sections were counterstained with hematoxylin. The negative controls for all immunocytochemical reactions were obtained by omitting the primary antibody.

5. Apoptotic and mitotic indexes

The apoptotic cells were identified using the TUNEL test for detection of DNA fragmentation associated with apoptosis (TdT-mediated dUTP Nick End Labeling) performed according to the manufacturer’s instructions (Oncogene Research Products, Boston, USA). Briefly, the paraffin tissue sections were immersed in TBS (20 mM, 140mM NaCl, pH 7.6) and treated with Proteinase K (1:100 in 10mM Tris pH 8.0) for 20 min at room temperature.

Endogenous peroxidase activity was blocked using 30% H_2O_2 1:10 in methanol for 5 min. Sequentially, the histological sections were incubated with biotin-TdT and with the deoxynucleotidyl terminal transferase enzyme (TdT) for 90 min at 37° C. After the conclusion of the reaction, the biotin nucleotides were detected using the peroxidase streptoavidin conjugate, and the labeling was detected by diaminobenzidine/ H_2O_2 (0.5 mg/ml faucet H_2O) substrate, in the dark, for 13 min. Then, sections were washed in water and counterstained with hematoxylin. Negative controls did not receive the TdT enzyme.

Apoptotic and mitotic indexes were defined, respectively, by determining the percentage of TUNEL-positive cells and mitotic figures in paraffin HE-stained sections. The methodology employed one hundred seminiferous cord cross-sections per animal older than 14d or fifty cross-sections for the younger ones.

RESULTS

Gn in neonatal gerbil testes were easily differentiated from the immature Sertoli cells due to their large size, clear voluminous cytoplasm, round nucleus with decondensed chromatin and prominent nucleolus (Fig. 1). During the first postnatal days, the majority of Gn was observed in the central region of the seminiferous tubules (Figs. 1; 3A) but, some of them exhibited cytoplasmic extensions toward the basement membrane (Fig. 1A) or were already relocated to the basement compartment (Fig. 1G). The amount of RgG was low throughout the first two weeks of age with a peak at 7d (Fig. 3A). The number of Gn centrally positioned in seminiferous cords decreased exponentially over the first two postnatal weeks (Figs. 1; 2A, B; 3A). The RG number was also low during the first week, but at 14d had risen to 90% of total Gn (Figs. 1, 2A, B; 3A). Gn were not visible from day 21 onward (Figs. 2C, D).

After relocation, Gn acquires a phenotype intermediate between RG and type A spermatogonia, herein designated prospermatogonia (pS). These cells were already observed in the base of seminiferous epithelium in the first postnatal days (Fig. 1B, C). The pS differ from Gn due to their small size and nuclear features, including spherical or oval shape and less developed nucleoli, although they were recognized as germ cells by their lightly stained cytoplasm and abundance of decondensed nuclear chromatin (Fig. 1B, C, E, F, H, I; 2B, C). Furthermore, pS, like Gn, exhibited cytoplasmic immunoreactions to VASA protein (Fig. 4A-E). Close contact between pS and centrally positioned Gn was observed throughout the first postnatal weeks (Fig. 1E, F). As shown in figure 3B, the total number of Gn decreased gradually over the first two postnatal weeks as they transformed into pS whereas the Sertoli cell population increased 16% in the first and 3% in the second week of life.

It was verified in all seminiferous cords at all ages that neither the relocation of Gn toward the basement membrane nor their differentiation into pS occurs synchronously. Therefore, as illustrated in Figures 1 and 2, it was possible to find, within the same testis, seminiferous cords containing initial and more advanced phases of germ cell differentiation. The testes of 7d gerbils, for example, presented seminiferous cords exhibiting CG and RG (Fig. 1G) or CG and pS (Fig. 1H) while more differentiated ones exhibited only pS (Fig. 1I).

The results of immunocytochemical staining with PCNA are shown in Figure 4 (F-J). The cell proliferation rate in the seminiferous epithelium, which was about 4% during the first postnatal week, arose sharply in the second week (Fig. 3C). The thick sections and VASA-positive reaction indicated that the proliferation peak occurring at 14d is attributable mainly to the proliferation of pS, which appeared in the form of cell clusters (Fig. 2B; 4C). The high levels of TUNEL-positive cells were detected at 7d and 21d (Fig. 3C; 4L, N). At 1d of age, apoptotic cells occurred at the base of the seminiferous epithelium (Fig. 4K), but at other ages they were

centrally positioned in the seminiferous cord (Fig. 4L-O). Ultrastructural analysis indicated that up to 7d apoptotic cells were represented by Gn within Sertoli cell cytoplasm (Fig. 5). At later ages, particularly at 21 d, it was not possible to discriminate between apoptosis of non-relocated Gn or other germ cell subtypes.

The immunolocalization of AR varied among the different cell populations in testis. AR was positive in the cytoplasm of Gn (Fig. 6A, B) and pS (Fig. 6D, E), but negative in other spermatogonial phases (Fig. 6E). In contrast with Gn and pS, the Sertoli cells exhibited AR immunoreactivity restricted to the nucleus; this was weak through the second postnatal week (Fig. 6A, B, D), becoming intense only from day 21 (Fig. 6E). The nuclei of interstitial cells exhibited strong labeling (Fig. 6).

The type A single (As) and B (B) spermatogonia were observed from day 21 onward (Fig. 2D-H; 4D), whereas leptotene, zygotene and pachytene primary spermatocytes were detected respectively at days 28 (Fig. 2F) and 35 (Fig. 2H). Thus, in 35 d animals three generations of germ cells were identified in the seminiferous epithelium (Fig. 2H). Figure 7 displays the appearance of the main spermatogonial subtypes chronologically and summarizes the main events of Gn maturation in the gerbil.

DISCUSSION

The present study describes the neonatal differentiation of germ cells in the rodent *Meriones unguiculatus* and focuses on cell migration, proliferation and apoptosis. Our data revealed that a small percentage of Gn had already relocated or shown signals of migration to the basement membrane within 1-2 postnatal days. However, the rates of Gn relocation were very low in the first postnatal days and peaked at 14d, coinciding with the highest cell proliferation level. Mitotic and PCNA-positive Gn were found near or in the basement of the seminiferous

241 cords even before the relocation peak, indicating that relocation to the epithelial base is not a
242 requirement for Gn to resume the mitotic cycle. Then, similarly to other rodents, neonatal Gn
243 proliferation in gerbils is not dependent on adhesion to basement membrane (McGuinness and
244 Orth 1992a; Nagano et al., 2000). Whereas in mice and rats Gn disappear during the first week of
245 age (Clermont and Perey, 1957; Sakai et al., 2004), in gerbils they were observed up 14d. In
246 addition, cells with a transitional phenotype between Gn and spermatogonia, namely the
247 prospermatogonia, were also found adhering to the basement membrane early into the postnatal
248 period. This suggests that Gn relocation to the basement membrane is followed by a rapid
249 transition to the spermatogonial lineage.

250 Two peculiarities were observed during neonatal testis development in gerbils compared
251 to other rodents, namely, the asynchronous maturation of germ cells among the cords within the
252 same testis and longer duration of Gn phase. The asynchronous maturation of germ cells
253 becomes clear, especially after 7d, when more highly differentiated seminiferous cords
254 containing prospermatogonia were found along with others containing CG, histologically
255 equivalent to the first postnatal week. To the best of our knowledge, such asynchrony has not
256 been described in other rodents and it can explain, at least in part, the greater duration of the Gn
257 maturation process in gerbils. This difference in maturation is not readily recognized in routine
258 histological sections and it was elucidated herein by using high resolution light microscopy. Thus
259 it is possible that such developmental asynchrony also occurs in other rodents but was not
260 identified. The putative mechanisms implicated in this differential maturation of male germ cells
261 among cords during neonatal development of the gerbil testis were not examined herein but
262 extracellular matrix or paracrine factors are probably involved. Furthermore, this finding evokes
263 the hypothesis that within more mature cord regions germ cells are induced to enter into meiosis

first and, if true, this asynchrony may be implicated in the wave of seminiferous epithelium that characterizes mammalian spermatogenesis.

Our observations indicated that Gn relocation in Mongolian gerbils is already seen on the first postnatal day but it extends at least up to 14 d. Then, Gn differ as to their migratory behavior in this rodent. This finding corroborates previous studies indicating that pre-spermatogenic germ cells are a heterogeneous population differing not only in their localization in seminiferous epithelium and morphology but also in their expression of specific molecular markers such as transcription factor OCT-4, tyrosine kinase receptor c-KIT and Melanoma antigen – A4 (MAGE-A4) (Fukuda et al., 1975; Gaskell et al., 2004; Yoshida et al., 2006; Ohmura et al., 2008).

Gn apoptosis ensures a critical degree of selection in providing an appropriate germ cell population and its mechanisms have been partially elucidated (Rodriguez et al., 1997; Boulogne et al., 1999; Wu et al., 2005; Basciani et al., 2008). Apoptotic peaks were detected in gerbils before (7d) and after (21d), when the bulk of Gn relocation and levels were one third those found in rats (Boulogne et al., 1999). The biphasic apoptotic response reflects the asynchrony in germ cell maturation among seminiferous cords within the same testis.

After relocation, Gn change phenotypically into a transitional phase, herein denominated prospermatogonia. These prospermatogonia differentiate morphologically and probably functionally either from Gn, stem cells (A_{single}) or differentiating spermatogonia. There is much disagreement about the behavior, properties and nomenclature of pre-spermatogenic germ cell populations. The term gonocyte was originally proposed by Clermont and Perey (1957) and it currently refers to the fetal germ cells derived from primordial germ cells that exhibit distinctive morphological characteristics as well as stages of quiescence and mitotic activity (de Rooij and Russell, 2000; Nagano et al., 2000; Culty 2009). Other authors employed the terms prospermatogonia and pre-spermatogonia to define the cells derived from primordial germ cells

(Hilscher et al., 1974; Wartenberg, 1976; Byskov, 1986). Wartenberg (1976) differentiated two subpopulations of fetal germ cells in humans – the gonocytes, which reside in testicular cords, and prospermatogonia, that are subsequently divided into the subtypes M (mitotically active), T1 (resting) and T2 (those that had resumed mitotic activity). A detailed study performed by Gaskell et al., (2004) confirmed, on the basis of morphology and the pattern of protein expression, the existence of different pre-spermatogenic germ populations in the human testis at the second trimester of pregnancy which were designated germ cells, intermediate cells and pre-spermatogonia. This loss of Gn morphology also has been observed in mice (Sakai et al., 2004) but the term gonocyte is applied indistinctly. Here, the term prospermatogonia was considered more appropriate to describe the transitional phases between gonocytes and stem spermatogonia, as has been adopted by Ohbo et al. (2003). Probably, the loss of the gonocyte phenotype reported herein reflects physiological differences and the activation of specific genes from the spermatogenic lineage such as MAGE-4 (Yakirevich et al., 2003) and loss of stemness factor OCT-4 (Pesce et al., 1999; Gaskell et al., 2004). It is important to mention the extreme difficulty in distinguishing, via paraffin sections or ultrastructural analysis, the prospermatogonia from undifferentiated Sertoli cells. Thus, the accurate identification of both cell types was enabled by the association of high resolution light microscopy and immunocytochemical analyses for VASA-protein, a marker of germ cells (Castrillon et al., 2000).

It is known that androgens and their cognate receptors are critical in determining the male phenotype and their roles in spermatogenesis have been widely investigated (Ghosh et al., 1991; O'Shaughnessy et al., 2002; Yeh et al., 2002; Tsai et al., 2006; Wang et al., 2009). On the other hand, there is little information concerning the influence of androgen/AR signaling on germ cell differentiation during the fetal and neonatal periods. Conclusive data on this issue were provided by Merlet et al. (2007). These authors reported an increase in the number of Gn in Tfm as well as

the presence of functional AR in Gn extracts, thus demonstrating that direct action of androgen on these cells inhibits their proliferation. We found in gerbils a high intensity of AR immunoreactivity in cytoplasm of Gn and prospermatogonia whereas all the subsequent stages of spermatogonial differentiation were AR-negative. Strong AR immunoreactivity was also observed in interstitial cells already on the first postnatal day and in Sertoli cells from 21 d onward, parallel to findings in other rodents (Kimura et al., 1993; Bremner et al., 1994; Zhou et al., 1996). The lack of AR immunoreaction for spermatogonial subtypes is also consistent with previous reports (Bremner et al., 1994; Vornberger et al., 1994; Matsumiya et al., 1999). AR functions as a ligand-dependent transcription factor, since ligand binding is a prerequisite for its transport to the nucleus where it accesses and regulates an array of androgen-responsive genes (Georget et al., 1997; Wang et al., 2009). The regulation of AR functionality is far from being understood but their cytoplasmic localization has been usually interpreted as an inactivated state (Tyagi et al., 2000). Thus, it is possible that high AR immunoreactivity found in cytoplasm of gerbil Gn reflects both AR inactivation and the loss of androgen sensitivity in these cells during the neonatal period. The molecular mechanisms underlying AR inactivation are complex and deserve further investigation in this species. In many cases, especially in prostate cells, the exportation of AR from the nucleus to the cytoplasm and their inactivation has been related to androgen withdrawal (Tyagi et al., 2000, Gregory et al., 2001, Peng et al., 2008). Given that previous gerbil hormonal data evidenced a decline in serum androgen levels only around 14d (Siegford et al., 2003), it is probable that other cofactors might be involved in neonatal AR-inactivation.

In conclusion, the neonatal gonocyte differentiation in Mongolian gerbils occurs in an asynchronous manner among seminiferous cords, lasts longer than in other laboratory rodents and is associated with loss of androgen sensitivity. Relocation of gonocytes is already observed at

one day of age but continues until the second postnatal week, and is followed by their rapid differentiation into the prospermatogonial transition phase. As recently emphasized by Culty (2009), gonocytes can be considered “the forgotten cells of the germ cell lineage”, since they are surely the least investigated germ cell type (only 100 to 200 papers versus several thousand directed at mature types of germ cells). Furthermore, most articles focus on rats and mice (Culty, 2009). The establishment of main morphological and temporal events during Gn maturation in gerbils is essential for investigating the differentiation of and unanswered questions about this germ cell. Since in Mongolian gerbils the processes involved in gonocyte maturation last longer than in other rodents, it can be a useful mammal model for research on the biology of this pluripotent cell and its transition to a spermatogonium, which is still poorly understood.

ACKNOWLEDGEMENTS

This paper is part of the thesis presented by M.E.P. to the Institute of Biology, UNICAMP, in partial fulfillment of the requirement for a PhD degree. The authors thank Mr. Luis Roberto Falleiros Júnior and Rosana Silistino de Souza, as well as all other researchers at the Microscopy and Microanalysis Laboratory.

REFERENCES

- Basciani S, De Luca G, Dolci S, Brama M, Arizzi M, Mariani S, Rosano G, Spera G, Gnessi L. 2008. Platelet-derived growth factor receptor beta-subtype regulates proliferation and migration of gonocytes. *Endocrinology* 149:6226-6235.
- Boulogne B, Olaso RT, Levacher C, Durand P, Habert R. 1999. Apoptosis and mitosis in gonocytes of the rat testis during foetal and neonatal development. *Int J Androl* 22:356-365.
- Bremner WJ, Millar MR, Sharpe RM, Saunders PT. 1994. Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens. *Endocrinology* 135:1227-1234.
- Brennan J, Capel B. 2004. One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nature* 5:509-521.
- Byskov AG. 1986. Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Physiol Rev* 66:71-117.
- Castrillon DH, Quase BJ, Wang TY, Quigley CA, Crum CP. 2000. The human VASA gene specifically expressed in the germ cell lineage. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:9585-9590.
- Chiarini-Garcia H, Meistrich ML. 2008. High-resolution light microscopic characterization of spermatogonia. *Methods Mol Biol* 450:495-107.
- Clermont Y, Perey B. 1957. Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. *Amer J Anat* 100:241-260.
- Culty M. 2009. Gonocytes, the forgotten cell of the germ cell lineage. *Birth Defects Res* 87:1-26.
- de Rooij DG, Russell LD. 2000. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl* 21:776-798.
- Fukuda T, Hedinger C, Groscurth P. 1975. Ultrastructure of developing germ cells in the human fetal testis. *Cell Tissue Res* 161:55-70.
- Gaskell TL, Esnal A, Robinson LL, Anderson RA, Saunders PT. 2004. Immunohistochemical profiling of germ cells within the human fetal testis: identification of three subpopulations. *Biol Reprod* 71:2012-2021.
- Georget V, Lobaccaro JM, Terouanne B, Mangeat P, Nicolas JC, Sultan C. 1997. Trafficking of the androgen receptor in living cells with fused green fluorescent protein-androgen receptor. *Mol Cell Endocrinol* 129:17-26.
- Ghosh S, Sinha-Hikim AP, Russell LD. 1991. Further observations of stage-specific effects seen after short-term hypophysectomy in the rat. *Tissue Cell* 23:613-630.

- Gregory CW, He B, Johnson RT, Ford OH, Mohler JL, French FS, Wilson EM. 2001. A mechanism for androgen receptor-mediated prostate cancer recurrence after androgen deprivation therapy. *Cancer Res* 61:4315-4319.
- Hilscher B, Hilscher W, Bühlhoff-Ohnolz B, Krämer U, Birke A, Pelzer H, Gauss G. 1974. Kinetics of gametogenesis. I Comparative histological and autoradiographic studies of oocytes and transitional prospermatogonia during oogenesis and prespermatogenesis. *Cell Tissue Res* 154:443-470.
- Kimura N, Mizokami A, Oonuma T, Sasano H, Nagura H. 1993. Immunocytochemical localization of androgen receptor with polyclonal antibody in paraffin-embedded human tissues. *J Histochem Cytochem* 41:671-678.
- Magre S, Jost A. 1980. The initial phases of testicular organogenesis in the rat. An electron microscopy study. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 69:297-318.
- Matsumiya K, Meistrich ML, Shetty G, Dohmae K, Tohda A, Okuyama A, Nishimune Y. 1999. Stimulation of spermatogonial differentiation in juvenile spermatogonial depletion (jsd) mutant mice by gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. *Endocrinology* 140:4912-4915.
- McGuinness P, Orth JM. 1992a. Gonocytes of male rats resume migratory activity postnatally. *Eur J Cell Biol* 59:196-210.
- McGuinness P, Orth JM. 1992b. Reiniciation of Gonocyte Mitosis and Movement of Gonocytes to the Basement Membrane in Testes of Newborn Rats In Vivo and In Vitro. *Anat Rec* 233:527-537.
- Merlet J, Racine C, Moreau E, Moreno SG, Habert R. 2007. Male fetal germ cells are targets for androgens that physiologically inhibit their proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:3615-3620.
- Miething A. 1992. Germ cell death during prespermatogenesis in the testis of the goldem hamster. *Cell Tissue Res* 267:583-590.
- Nagano R, Tabata S, Yoshihiko N, Ohsako S, Kurohmaru M, Hayashi Y. 2000. Reproliferation and relocation of mouse male germ cells (gonocytes) during prespermatogenesis. *Anat Rec* 258:210-220.
- Ninomiya H, Nakamura T. 1987. Postnatal development of the testis in the Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. *Jikken Dobutsu* 36:65-72.
- Ohbo K, Yoshida S, Ohmura M, Ohneda O, Ogawa T, Tsuchiya H, Kuwana T, Kehler J, Abe K, Schöler HR, Suda T. 2003. Identification and characterization of stem cells in prepubertal spermatogenesis in mice. *Dev Biol* 258:209-225.
- Ohmura M, Naka K, Hoshii T, Muraguchi T, Shugo H, Tamase A, Uema N, Ooshio T, Arai F, Takubo K, Nagamatsu G, Hamaguchi I, Takagi M, Ishihara M, Sakurada K, Miyaji H, Suda T,

- 444 Hirao A. 2008. Identification of stem cells during prepubertal spermatogenesis via monitoring of
445 nucleostemin promoter activity. *Stem Cells* 26: 3237-3246.
- 446
- 447 O'Shaughnessy PJ, Johnston H, Willerton L, Baker PJ. 2002. Failure of normal adult Leydig cell
448 development in androgen-receptor-deficient mice. *J Cell Sci* 115:3491–3496.
- 449
- 450 Peng Y, Chen F, Melamed J, Chiriboga L, Wei J, Kong X, McLeod M, Li Y, Li CX, Feng A,
451 Garabedian MJ, Wang Z, Roeder RG, Lee P. 2008. Distinct nuclear and cytoplasmic functions of
452 androgen receptor cofactor p44 and association with androgen-independent prostate cancer. *Proc*
453 *Natl Acad Sci USA* 105:5236-5241.
- 454
- 455 Pesce M, Anastassiadis K, Scholer HR. 1999. Oct-4: lessons of totipotency from embryonic stem
456 cells. *Cells Tissues Organs* 165:144–152.
- 457
- 458 Rochel SS, Cardoso AB, Taboga SR, Góes RM. 2007. Lobe Identity in the Mongolian Gerbil
459 prostatic complex: A current rodent model for prostate study. *Anat Rec* 290:1233-1247.
- 460
- 461 Rodriguez I, Ody C, Araki K, Garcia I, Vassalli P. 1997. An early and massive wave of germinal
462 cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *Embo J* 16:2262-
463 2270.
- 464
- 465 Roosen-Runge EC, Leik J. 1968. Gonocyte degeneration in postnatal male rat. *Amer J Anat*
466 122:275-300.
- 467
- 468 Sakai Y, Noce T, Yamashina S. 2004. Cleavage- like cell division and explosive increase in cell
469 number of neonatal gonocytes. *Dev Growth Differ* 46:15-21.
- 470
- 471 Santos FC, Custodio AM, Campos SG, Vilamaior PS, Góes RM, Taboga SR. 2008. Antiestrogen
472 therapies affect tissue homeostasis of the gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate and
473 ovaries. *Biol Reprod* 79:674-685.
- 474
- 475 Segatelli TM, Almeida CC, Pinheiro PF, Martinez M, Padovani CR, Martinez FE. 2002. Kinetics
476 of spermatogenesis in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Tissue Cell* 34:7-13.
- 477
- 478 Segatelli TM, França LR, Pinheiro PFF, Almeida CCD, Martinez M, Martinez FE. 2004.
479 Spermatogenic Cycle Length and Spermatogenic Efficiency in the Gerbil (*Meriones*
480 *unguiculatus*). *J Androl* 25:872-880.
- 481
- 482 Siegford JM, Hadi Mansouri S, Ulibarri C. 2003. Normal ontogeny of perineal muscles and
483 testosterone levels in Mongolian gerbil: response in testosterone in developing females. *Anat Rec*
484 *A Discov Mol Cell Evol Biol* 275:997-1008.
- 485
- 486 Sprando RL. 1977. Perfusion rat testis through the heart using heparin. In: Russel LD, Ettlin
487 APS, Cleeg ED, editors. *Histological and Histopathological evaluation of the testis*. Clearwater:
488 Cache River Press. p 277-280.
- 489

- 490 Tsai MY, Yeh SD, Wang RS, Yeh S, Zhang C, Lin HY, Tzeng CR, Chang C. 2006. Differential
491 effects of spermatogenesis and fertility in mice lacking androgen receptor in individual testis
492 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:18975-18980.
- 493
- 494 Tyagi RK, Lavrovsky Y, Ahn SC, Song CS, Chatterjee B, Roy AK. 2000. Dynamics of
495 intracellular movement and nucleocytoplasmic recycling of the ligand-activated androgen
496 receptor in living cells. *Mol Endocrinol* 14:1162-1174.
- 497
- 498 Vornberger W, Prins G, Musto NA, Suarez-Quian CA. 1994. Androgen receptor distribution in
499 rat testis: new implications for androgen regulation of spermatogenesis. *Endocrinology*
500 134:2307-2316.
- 501
- 502 Wang Q, Nakane P, Koji T. 1998. Autonomous cell death of mouse male germ cells during fetal
503 and postnatal period. *Biol Reprod* 58:1250-1256.
- 504
- 505 Wang RS, Yeh S, Tzeng CR, Chang C. 2009. Androgen receptor roles in spermatogenesis and
506 fertility: lessons from testicular cell-specific androgen receptor knockout mice. *Endocr Rev*
507 30:119-32.
- 508
- 509 Wartenberg H. 1976. Comparative cytomorphologic aspects of the male germ cells, especially of
510 the “Gonia”. *Andrologia* 8:117-130.
- 511
- 512 Wu J, Jester WF, Orth JM. 2005. Short-type PB-cadherin promotes survival of gonocytes and
513 activates JAK-STAT signaling. *Dev Biol* 284:1633-1644.
- 514
- 515 Yakirevich E, Sabo E, Dirnfeld M, Sova Y, Spagnoli GC, Resnick MB. 2003. Morphometric
516 quantitation of spermatogonial germ cells with the 57B anti-MAGE-A4 antibody in the
517 evaluation of testicular biopsies for azoospermia. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 11:37-
518 44.
- 519
- 520 Yeh S, Tsai MY, Xu Q, Mu XM, Lardy H, Huang KE, Lin H, Yeh SD, Altuwaijri S, Zhou X,
521 Xing L, Boyce BF, Hung MC, Zhang S, Gan L, Chang C. 2002. Generation and characterization
522 of androgen receptor knockout (ARKO) mice: an in vivo model for the study of androgen
523 functions in selective tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:13498–13503.
- 524
- 525 Yoshida S, Sukeno M, Nakagawa T, Ohbo K, Nagamatsu G, Suda T, Nabeshima Y. 2006. The
526 first round of mouse spermatogenesis is a distinctive program that lacks the self-renewing
527 spermatogonia stage. *Development* 133:1495-1505.
- 528
- 529 Zhou X, Kudo A, Kawakami H, Hirano H. 1996. Immunohistochemical localization of androgen
530 receptor in mouse testicular germ cells during fetal and postnatal development. *Anat Rec*
531 245:509–518.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Thick sections, stained with Toluidine Blue, of seminiferous cords from gerbils at 1 (A), 2 (B, C), 3 (D), 5 (E, F) and 7 (G-I) days of age. Gonocytes during first postnatal week are abundant in central region (CG). Relocating gonocytes (RgG) and prospermatogonia (pS) occurred from day 2 onward. Apoptotic bodies (a) are frequent at 7d. The arrows indicate the contact between central region and prospermatogonia. The testis of 7d - gerbils contained less mature seminiferous cords exhibiting gonocytes (G) and more numerous mature ones containing pS (H, I). Legend: RG – *relocated gonocytes*, S – *Sertoli cell*. Bars = 20 µm.

Figure 2: Toluidine Blue-stained sections of seminiferous cords from gerbils at 14 (A, B), 21 (C, D), 28 (E, F), and 35 (G, H) days of age. Relocated gonocytes (RG) were seen up to 14d (A), when proliferating prospermatogonia (pS) were also abundant (B). Prospermatogonia were found up to 21d (C) and then, single (As) and B spermatogonia (B) were recognized (D). Progressive steps of spermatogenesis were observed as follows: leptotene primary spermatocyte (L) at 28d (F); zygotene (Z) and pachytene (P) primary spermatocytes at 35d (H). Less mature seminiferous cords shown at left were identified in the same testis at all ages (A, C, E, G). Legend: S - *Sertoli cell*. Bars = 20 µm.

Figure 3: Changes in frequency of gonocyte subtypes (A), total germ cells and Sertoli cells (B), apoptotic and mitotic cells (C) in gerbil testes through three weeks of postnatal development. The results are expressed as means ± SEM.

Figure 4: Identification of VASA- (**A–E**), PCNA-positive (**F–J**) and apoptotic cells (**K–O**) in the seminiferous epithelium of gerbils at 1, 7, 14 and 21 days of age. VASA reacted intensely to gonocytes (*CG*, *RgG*), prospermatogonia (*pS*) and, single (*As*) and B spermatogonia (*B*). PCNA immunocytochemistry revealed proliferative activity at all ages (arrows). Apoptotic cells (arrowheads), detected by TUNEL method were centrally positioned except for 1d animals in which were located in the basal compartment. The figures **E**, **J** and **O** show negative control in gerbil testis at 7, 14 and 21 days of age, respectively. Legend: *S* – Sertoli cells, *RG* – relocated gonocytes, * - mitotic figures. Bars = 20 µm.

Figure 5: Ultrastructure of seminiferous epithelium in 7-day-old gerbil showing apoptotic bodies from gonocytes within the Sertoli cell cytoplasm. A detail of the apoptotic body (**B**) is shown in (**C**). Legend: *arrow* – apoptotic body; *S* – Sertoli cell. A = 4646x; B= 12930x; C = 16464x.

Figure 6: Immunolocalization of androgen receptor (AR) in testes of male gerbils at 7, 14 and 21 days of age. The cytoplasm of gonocytes (*CG*, *RG*) (**A**, **B**) and prospermatogonia (*pS*) (**D**, **E**) were AR-positive. No signal was detected in spermatogonia (*As*) (**E**). The nuclei of Sertoli cells (*arrowhead*) presented weak (**A**, **B**, **D**) and intense labeling (**E**). The immunocytochemical staining of AR was also detected in interstitial cells (*arrow*). Note that in the negative control (**C**) the cytoplasm of gonocytes (*CG*) does not appear immunolabeled. Bars = 20 µm.

Figure 7: Summary of main events in the postnatal development of gerbil testes. (**A**) Schematic illustration of histological changes in the seminiferous epithelium. The shaded structures represent the germ line cells, while the non-shaded structures represent the Sertoli cells. (**B**) The durations of the events concerning gonocytes and spermatogonia are indicated by bars.

Figure 1

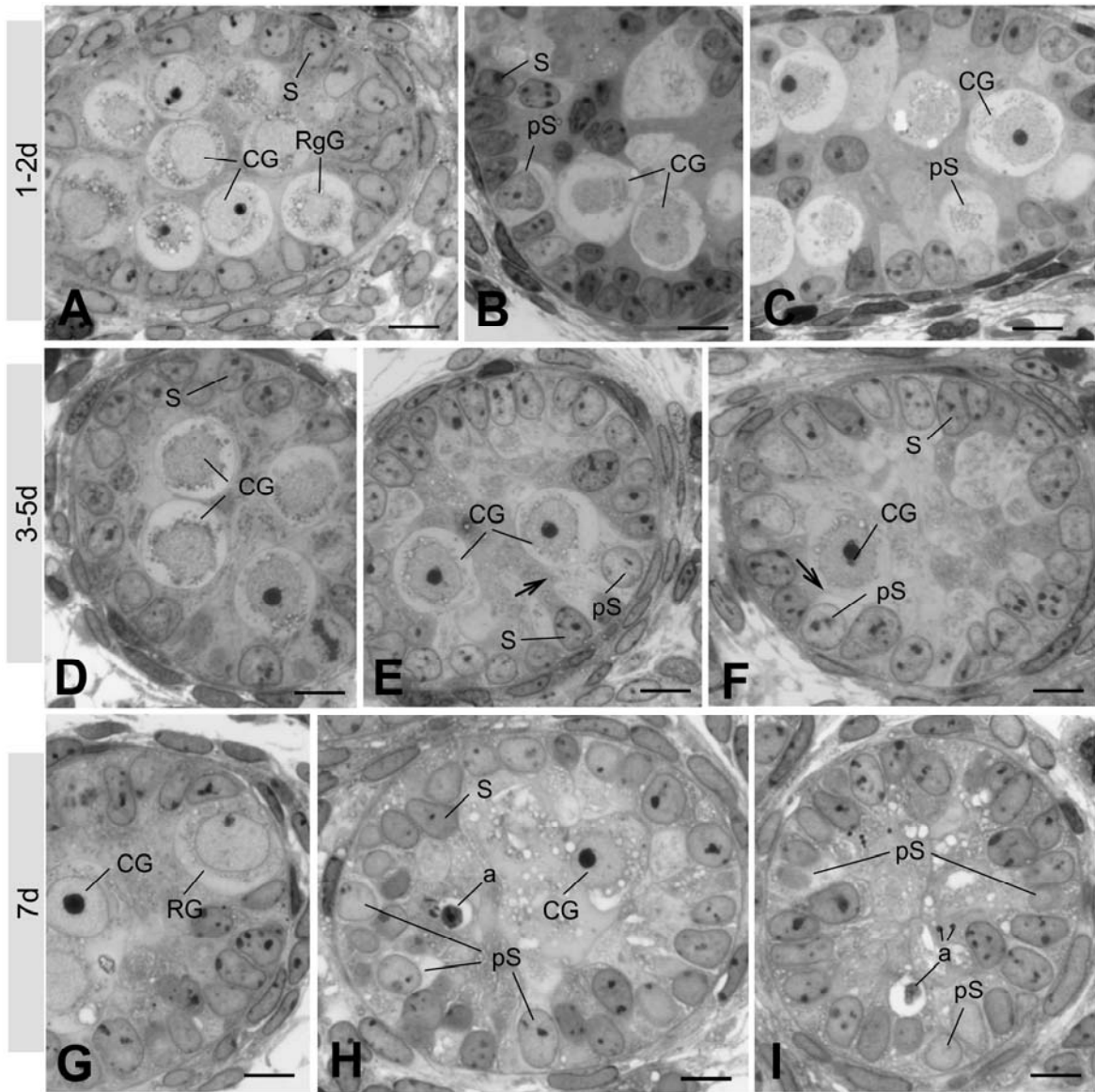


Figure 2

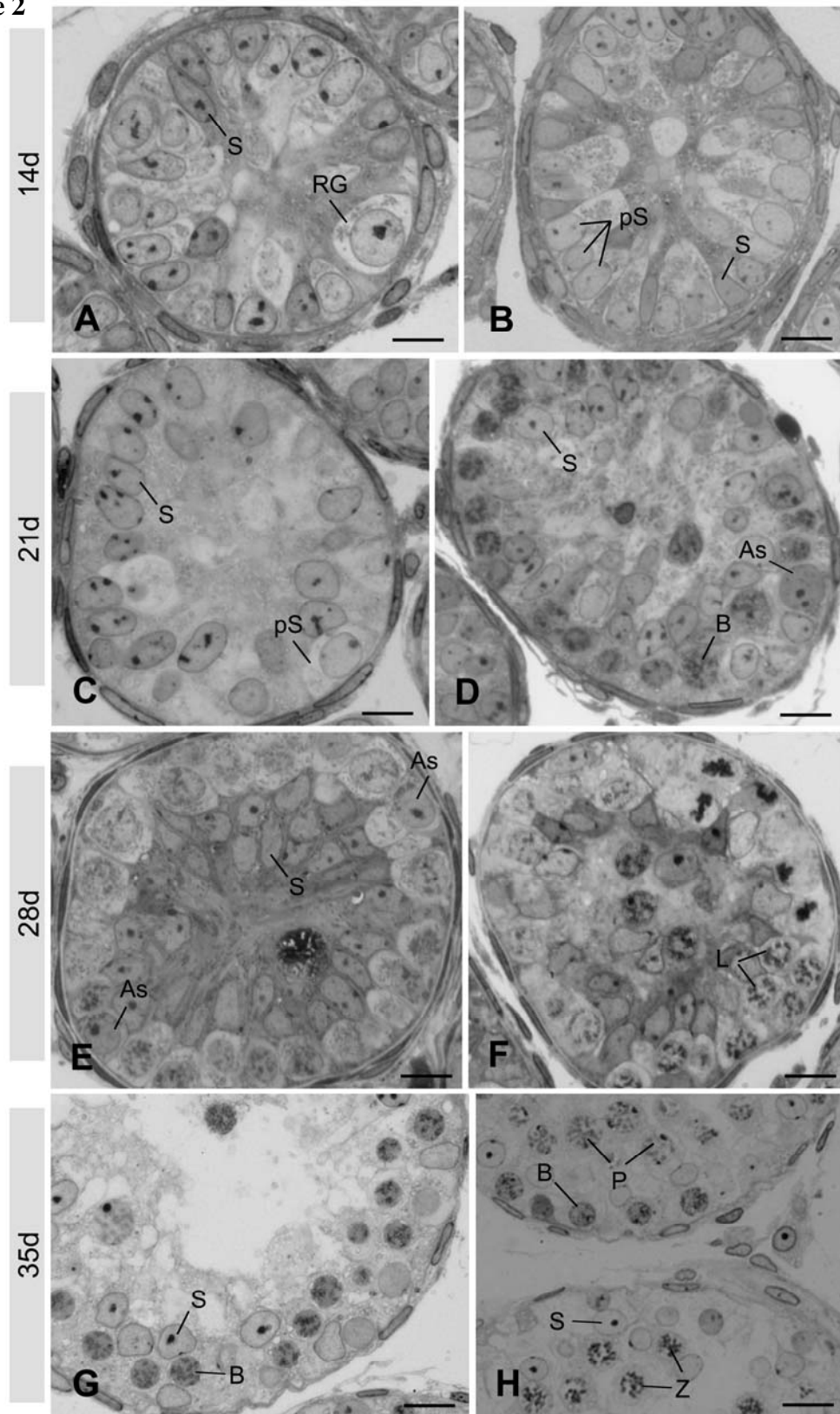


Figure 3

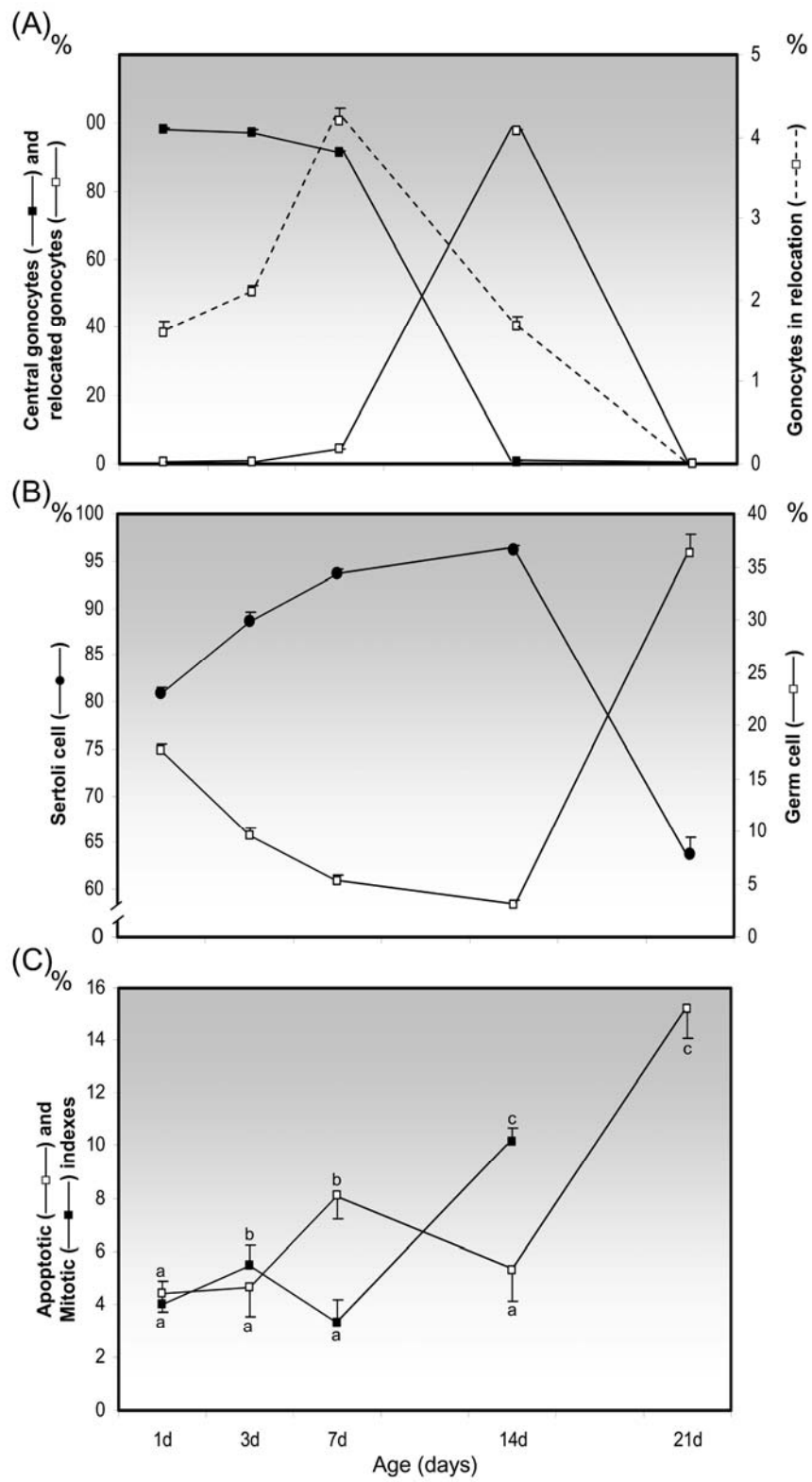


Figure 4

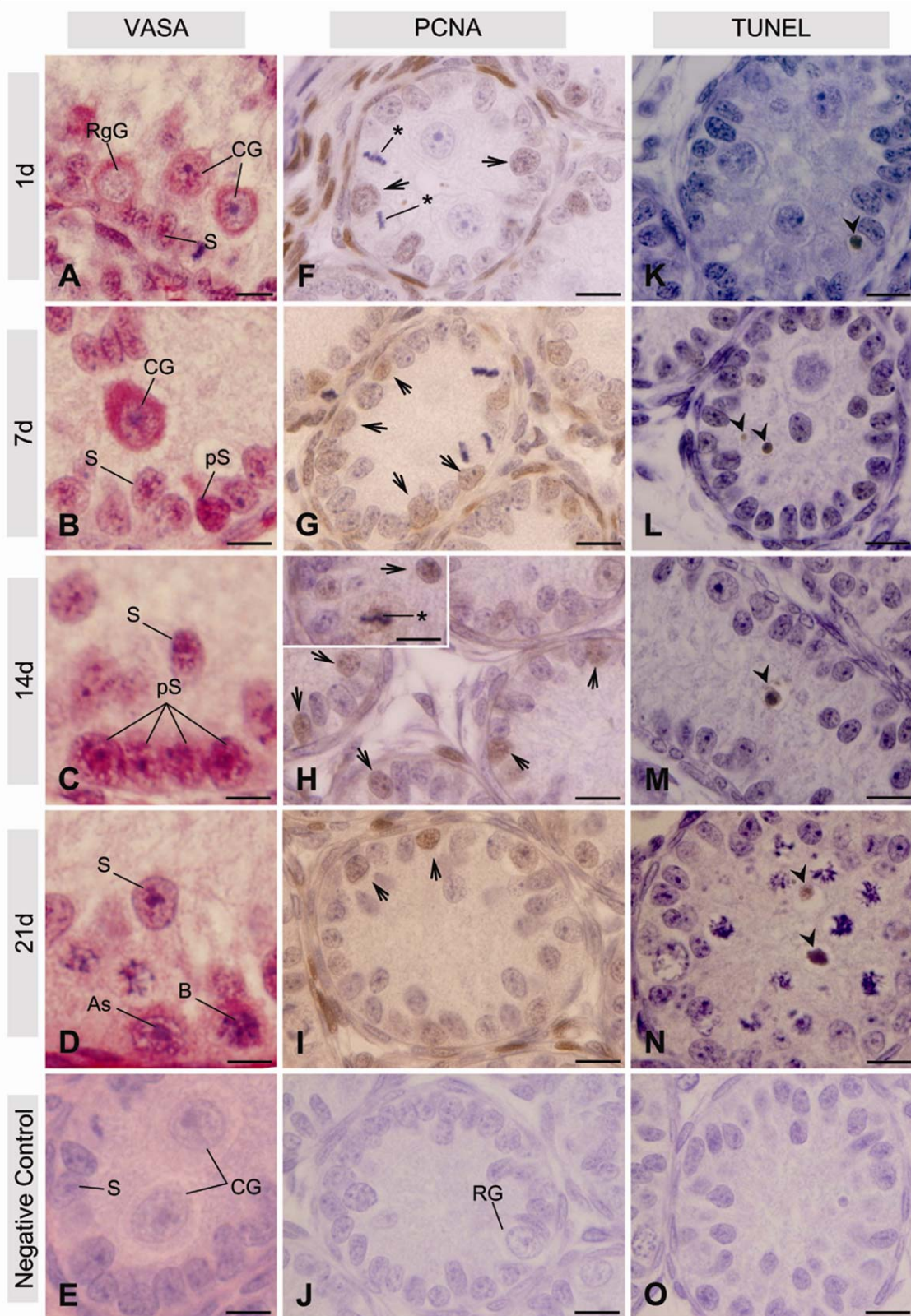


Figure 5

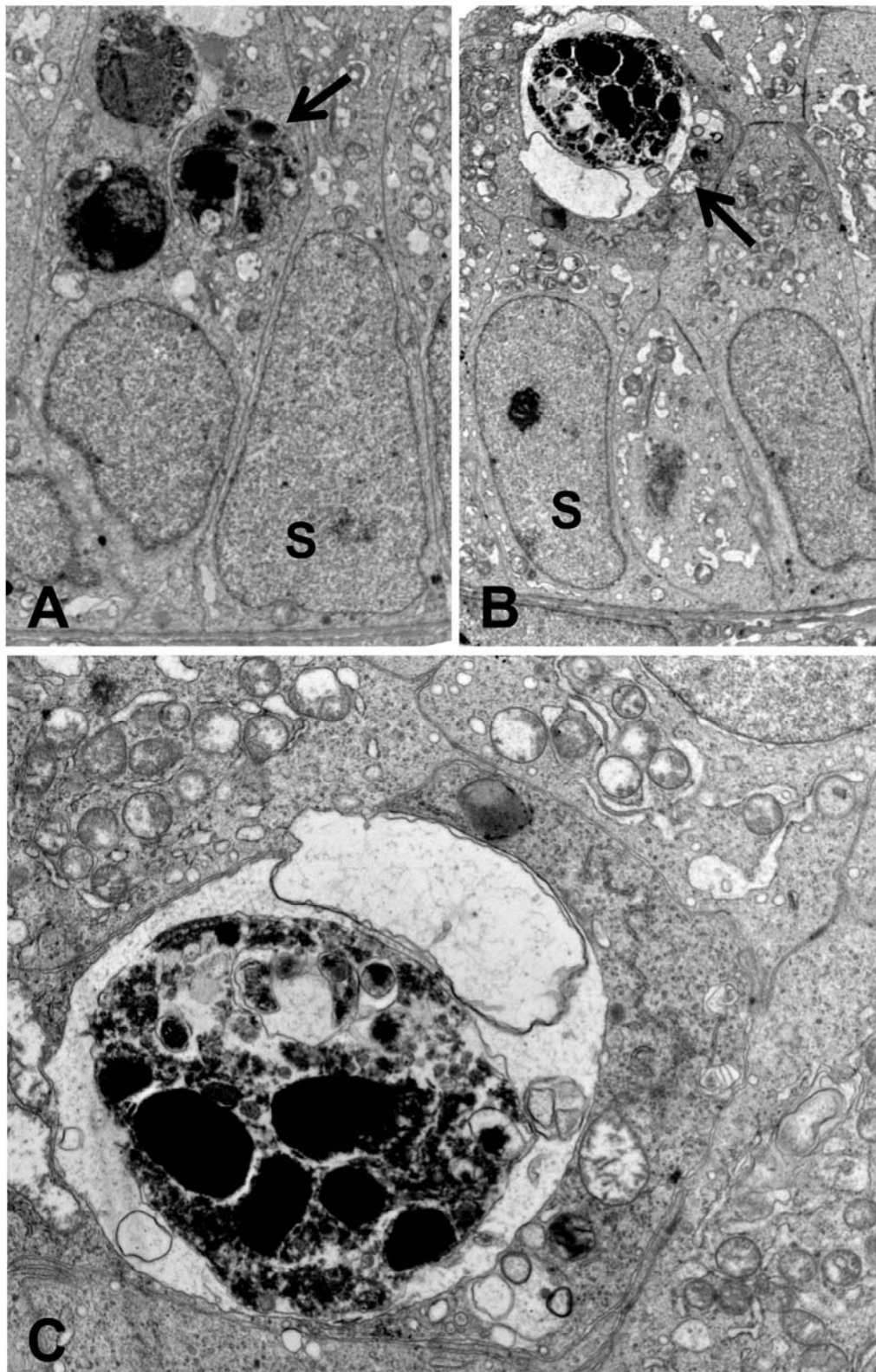


Figure 6

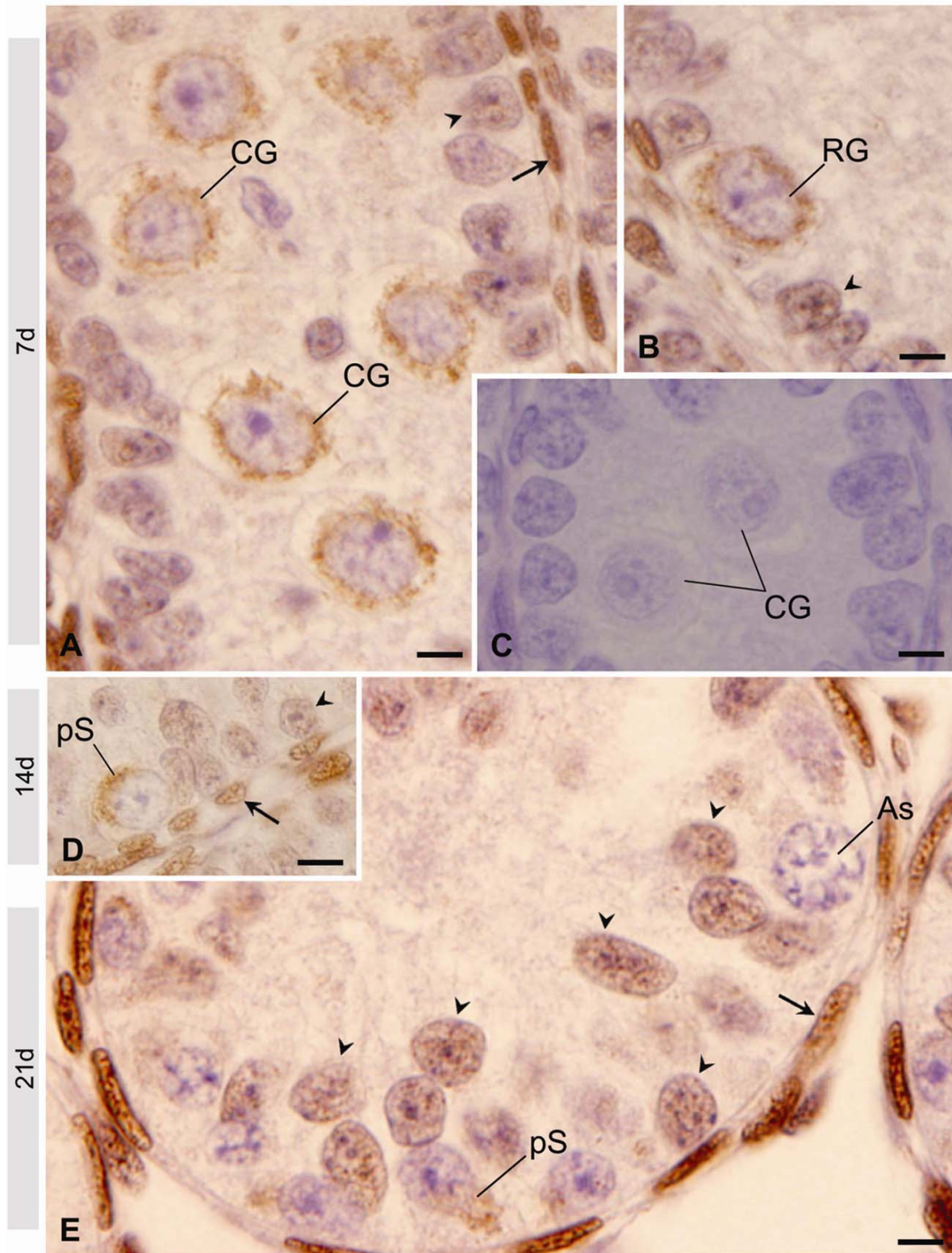
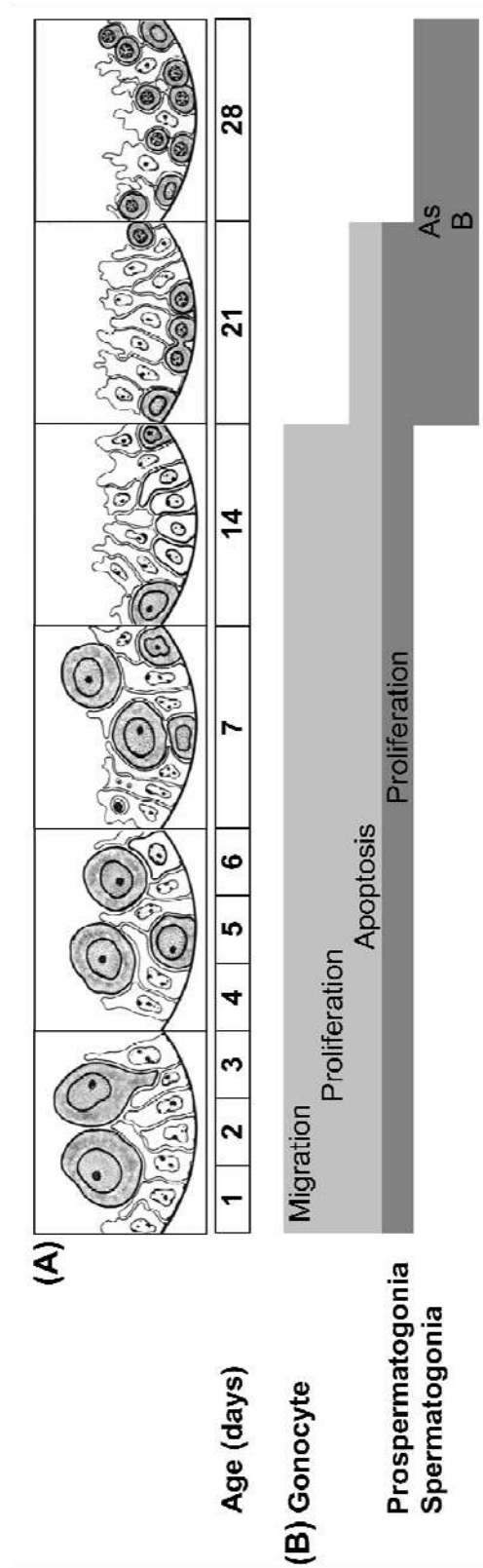


Figure 7



DIFFERENTIATION OF LEYDIG CELLS IN THE MONGOLIAN GERBIL

Publicado na revista Microscopy Research and Technique

Differentiation of Leydig Cells in the Mongolian Gerbil

MARIA ETELVINA PINTO,¹ FERNANDA DE MATTOS EGYDIO,² SEBASTIÃO ROBERTO TABOGA,² S.M.L. CHAMINDRANI MENDIS-HANDAGAMA,³ AND REJANE MAIRA GÓES^{2*}

¹Department of Cell Biology, Institute of Biology, State University of Campinas—UNICAMP, 13083-970, Campinas, SP, Brazil

²Department of Biology, São Paulo State University—IBILCE/UNESP, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil

³Department of Comparative Medicine, The University of Tennessee, College of Veterinary Medicine, Knoxville, Tennessee 37996

KEY WORDS Leydig cells; Mongolian gerbil; differentiation; ultrastructure; mature adult Leydig cells

ABSTRACT Information on postnatal Leydig cell (LC) differentiation in the Mongolian gerbil has been unavailable. Therefore, current investigation was designed to examine LC lineage differentiation in this rodent, from birth to adulthood. Gerbil testes at 1 day, 1–7 weeks (w), 2 and 3 months of age were conventionally processed by light and transmission electron microscopy. Immunocytochemistry for specific markers of steroidogenic enzymes, namely 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD) and 11 β -hydroxysteroid steroid dehydrogenase 1 (11 β -HSD1) and also for androgen receptor (AR) was performed. The establishment of adult Leydig cell populations (ALC) during testis maturation in the gerbil follows the pattern previously described in other mammalian species, with the four progressive stages of differentiation. The LC progenitors were identified at second w by 3 β -HSD expression; the first newly formed ALC were recognized at fourth w whereas immature ALC appeared at fifth w. The latter were recognized by abundance of cytoplasmic lipid, in addition to expression of 11 β -HSD1 and intense nuclear AR immunoreaction. Mature ALC in gerbil exhibited irregular eccentric nuclei and a cytoplasmic canaliculus in the perinuclear area. Only one third of mature ALC in adult gerbils showed a high expression of 11 β -HSD1 and AR expression was highly variable among them. In conclusion, the process of differentiation of ALC population in gerbil follows the pattern previously established for other rodents. However, the resulting mature ALC are strikingly different due their singular asymmetric morphology and presence of a cytoplasmic canaliculus and as well as their functional heterogeneity. *Microsc. Res. Tech.* 00:000–000, 2009. © 2009 Wiley-Liss, Inc.

INTRODUCTION

Because Leydig cells are the primary source of androgens in males, they are essential during embryonic development for sexual differentiation and at adulthood for sexual maturation, gametogenesis, and sexual activity. Most information about postnatal differentiation of Leydig cells is derived from established models of laboratory rodents widely studied such as rats (Ariyaratne and Mendis-Handagama, 2000; Ariyaratne et al., 2000; Benton et al., 1995; Haider, 2004; Hardy et al., 1989; Kerr and Knell, 1988; Mendis-Handagama and Ariyaratne, 2001; Mendis-Handagama et al., 1987; Wu et al., 2007) and mice (Baillie, 1964; Benton et al., 1995; Haider, 2004; Kerr et al., 1985; Mendis-Handagama and Ariyaratne, 2001; Mendis-Handagama and de Kretser, 1992; Wu et al., 2007). Two morphologically and functionally distinct populations of Leydig cells are involved in the above-mentioned process—the fetal and adult ones, which arise respectively, in the prenatal and prepubertal period (Ariyaratne and Mendis-Handagama, 2000; Haider, 2004; Mendis-Handagama and Ariyaratne, 2001; Roosen-Runge and Anderson, 1959). The occurrence of these two temporally distinct populations was first established in rats (Roosen-Runge and Anderson, 1959) and subsequently confirmed in other rodents (Baillie, 1964; Gondos et al., 1974) and humans (Mancini et al., 1963). The fetal Leydig cells (FLC) are

formed from mesenchymal precursor cells of embryonic tissue surrounding sexual cords, around day 14 of gestation in the rat (Majdic et al., 1998). Studies in this rodent revealed that FLC are present at birth and do not decline in number up to adulthood, although they were rarely visualized in adult testes due to the increase in other testicular components (Ariyaratne and Mendis-Handagama, 2000; Kerr and Knell, 1988; Mendis-Handagama et al., 1987).

Morphological and immunocytochemical data associated with accurate quantitative analysis have provided important contributions concerning the differentiation of adult Leydig cell (ALC) lineage. The ontogeny of ALC populations involves the commitment of undifferentiated mesenchymal cells or precursor mesenchymal cells into Leydig cell progenitors, around the 10th postnatal day in the rat, and their gradual transformation into newly formed, immature and finally, mature adult

This article is part of the thesis presented by M.E.P. to the Institute of Biology, UNICAMP, in partial fulfillment of the requirement for a PhD degree.

*Correspondence to: Prof. Dr. Rejane Maira Góes, Rua Cristóvão Colombo no. 2265, CEP 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil. E-mail: remagoes@ibilce.unesp.br

Received 10 June 2009; accepted in revised form 17 July 2009

Contract grant sponsor: São Paulo State Research Foundation (FAPESP); Contract grant number: 2006-07008; Contract grant sponsor: Coordinating Body for Training University-Level Personnel (CAPES—fellowship to M.E.P.).

DOI 10.1002/jemt.20763

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

Leydig cells (Ariyaratne and Mendis-Handagama, 2000; Mendis-Handagama and Ariyaratne, 2001; Mendis-Handagama et al., 1987). The newly formed ALC are the first stage exhibiting the Leydig cell phenotype whereas immature ALC differ from the mature form as to the pattern of androgenic production since they produce less androgens, mainly in the form of androstenedione (Ariyaratne and Mendis-Handagama, 2000; Haider, 2004; Mendis-Handagama et al., 1987; Misro et al., 1993). Then, these maturation stages are functionally differentiated based on expression of enzymes involved in the synthesis of steroid hormones such as 3β -hydroxysteroid dehydrogenase (3β -HSD) and 11β -hydroxysteroid steroid dehydrogenase 1 (11β -HSD1) (Mendis-Handagama and Ariyaratne, 2001). The 3β -HSD is a universal marker for all cells that secrete steroids, being expressed by FLC starting from the progenitor cell stage (Haider et al., 1986; Majdic et al., 1998). The 11β -HSD1 is considered a marker for ALC (Ariyaratne and Mendis-Handagama, 2000; Haider et al., 1990; Mendis-Handagama et al., 1998; Phillips et al., 1989) and is first expressed in rat in newly formed ALC at day 21 being very abundant in mature ALC (Mendis-Handagama et al., 1998).

The Mongolian gerbil *Meriones unguiculatus* has been widely used in several areas of biomedical research (Cao et al., 2005; Ter-Mikaelian et al., 2007; Wiedemann et al., 2009) with an increasing interest on morphophysiology of genital system (Fochi et al., 2008; Rochel et al., 2007; dos Santos et al., 2003; Segatelli et al., 2004). The gerbil has been adopted in our laboratory as an excellent rodent model for studies on female prostate gland due the high incidence of this organ in comparison with other rodents (dos Santos et al., 2003). Additionally, hormonal variations on estrous cycle indicate peculiarities in the control of reproductive functions in gerbil (Fochi et al., 2008). Analysis of male prostatic complex in this specie revealed that the most voluminous component is the dorsolateral lobe whereas in rat and mouse is the ventral one (Rochel et al., 2007). Whereas some aspects of reproductive biology of gerbil have been well exploited in literature, others remain unknown, such as the ones concerning postnatal testicular development. Thus, there is a lack of information concerning the differentiation of FLC and ALC populations in this rodent. The analysis of morphological modifications during the differentiation of this cell lineage and possible correlations with expression of the aforementioned specific markers can help to clarify the mechanisms underlying the physiological status of each cell subtype. The present study aimed to integrate high resolution light microscopy and ultrastructural analysis with the use of specific markers to describe the development of ALC lineage in the Mongolian gerbil, from birth until three months of age.

MATERIALS AND METHODS

Animals

The Mongolian gerbils were kept in the Animal Breeding Center of São Paulo State University—UNESP, Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences—IBILCE. The animals were maintained at controlled temperature (23–25°C) and humidity (40–60%) under 12h light/dark cycle. All animals

were given free access to water and food (Labina-Purina, Paulínia, SP, Brazil) and the experimentation procedures were performed in accordance with Brazilian College of Animal Experimentation approved by Ethical Committee for Animal Research of Bioscience Institute/ UNESP (Protocol CEEA n° 31/07). Gerbil pairs were monitored daily in the morning and the birth date of pups was defined as day 0 of postnatal life. Ten groups of male gerbils ($n = 8$) aged 1 day say, 1–7 weeks, 2 and 3 months of age were used.

Light Microscopy

Until 2 weeks of age the gerbils were killed by CO₂ inhalation and the testes were fixed by immersion. The vascular perfusion with heparinized saline solution (Sprando, 1977) followed by Bouin's fixative was performed for testis processing in the remaining animals. Perfused or immersion-fixed testes were maintained for 6 h in Bouin fluid, and cut into pieces after 1h of immersion. The testicular pieces were washed in 70% alcohol over several days and, then, embedded in either historesin (Historesin embedding kit, Leica, Nussloch, Germany) or Paraplast (Histosec, Merck, Darmstadt, Germany). Paraffin sections (4 μ m thickness) were used for immunocytochemistry whereas historesin sections (3 μ m thickness) were stained with Hematoxylin-Eosin and AgNOR technique for regular microscopy.

Histological analyses were carried out with an Olympus BX60 photomicroscope (Olympus, Hamburg, Germany) and the images were digitized using the software Image-Pro Plus 6.0 for Windows (Copyright© 1993-2006 Media Cybernetics, Inc., Bethesda, MD). The stages of gerbil Leydig cell lineage were identified morphologically according to previously published descriptions (Mendis-Handagama and Ariyaratne, 2001; Mendis-Handagama et al., 1987).

The dimensions of mature ALC were determined in historesin sections of adult gerbil testis stained with HE. Contiguous microscopic areas containing interstitial tissue were digitalized at 1000x and subsequently examined. At least 20 different areas containing Leydig cells were employed per animal. Then, the width and thickness were estimated using Image-Pro Plus 6.0 for Windows (Copyright© 1993-2006 Media Cybernetics, Inc., Bethesda, MD).

TEM

Testes from at least four animals of each age were processed by TEM. Testes from gerbils up to 2 weeks old were fixed by immersion, and those from older animals were fixed by vascular perfusion followed by immersion. In both cases the first fixative contained 2.5% glutaraldehyde, 1% tannic acid, 3.5% sucrose, and 5 mM calcium chloride in 0.1M cacodylate buffer pH 7.4. Testes were cut into small cubes and fixed, for 2 h, at 4°C, following the postfixation in 1% osmium tetroxide in 0.1M cacodylate buffer pH 7.4 for 2 h, and embedded in Araldite 502 (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA). One- μ m-thick sections were stained with a solution of 1% Toluidine blue and 1% Borax in water for light microscopy analyses. Ultra-thin sections were contrasted with 2% alcoholic uranyl acetate (Watson, 1958) for 20 min and 2% lead citrate in sodium hydroxide solution (Venable and Coggeshall,

1965) for 6 min. The samples were evaluated with a LEO-Zeiss 906 (Zeiss, Cambridge, UK) transmission electron microscope operated at 80 kV.

Immunocytochemistry

The sections were deparaffinized and rehydrated; then antigen retrieval was performed in citrate buffer pH 6.0, at 92°C, for 45 min. The blockade of endogenous peroxidases was obtained by covering the slides with 3% H₂O₂ in methanol, for 20 min.

To detect 3 β -HSD and 11 β -HSD1 immunoreactivity, the tissue sections were treated with Background Sniper solution (Biocare Medical, Concord, CA) for 15 min, to block nonspecific protein-linkage. Sequentially, sections were incubated overnight at 4°C with primary antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA): rabbit IgG antihuman 11 β -HSD1 (sc-20175) or with goat IgG antihuman 3 β -HSD (sc-30820), diluted 1:100 in BSA 1%. The incubation with biotinylated secondary antibody proceeded for 30 min, followed by an incubation with Streptavidin-HRP complex (Dako-Cytomation LSAB + System-HRP, Dako, Carpinteria, CA), for 45 min.

For immunodetection of androgen receptor (AR) the sections were incubated overnight at 4°C with 1:100 primary antibody rabbit IgG antihuman AR (sc-816—Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). The sections were then incubated with the biotinylated antirabbit followed by avidin-biotin complex ABC kit (Santa Cruz Biotechnology) for 45 min., at 37°C.

Abovementioned reactions were revealed with diaminobenzidine (DAB) for 3 min and the sections were counterstained with hematoxylin. The washes were accomplished with 0.05% Tween 20 in PBS pH 7.6. The negative control was obtained by omission of the primary antibody.

The ALC ratio in adult animals was determined by using two histological sections from different testis fragment per animal which were systematically counted for 11 β -HSD1 negative/positive cells in their entirety.

RESULTS

Differentiation of the Adult Leydig Cell Lineage

Undifferentiated mesenchymal cells of the interstitial tissue were abundant during the first week of age of gerbil (Figs. 1A and 1B). A portion of them which was associated with germinative epithelium changed into myoide cells throughout the first 3 weeks of age (Figs. 1B–1D). The myoide cells were slender and exhibited a more stained and fusiform nucleus in comparison with the undifferentiated mesenchymal cells (Figs. 1B–1D).

Leydig cell progenitors were recognized by expression of 3 β -HSD at 14 days of age (Fig. 2B). Similarly to undifferentiated mesenchymal cells, they show high positivity for AR (Fig. 2D) and negativity for 11 β -HSD1 (Fig. 2C) but have a more voluminous nucleus and cytoplasm (Fig. 2A). The first step of differentiation that began to exhibit morphological features of steroidogenic cell were designated newly formed ALC. In addition to 3 β -HSD-positivity (Fig. 2F), they exhibited more abundant and acidophile cytoplasm and nuclei with peripheral heterochromatin clusters in comparison with Leydig cell progenitors (Figs. 1E, 1F, and 2E).

The newly formed ALC were first detected at 4 weeks (Figs. 1E and 2E–2h) and observed occasionally in 90-day-old animals (Fig. 2R). The immature ALC differ from previously mentioned stages by labeling for 11 β -HSD1 (Fig. 2K). They showed the typical features of Leydig cells such as large nuclei with decondensed chromatin, nucleoli and also abundant cytoplasm, immunoreactive to steroidogenic enzymes (Figs. 1G–1I, 1L, and 2I–2k). In addition, immature ALC showed an intense nuclear immunoreaction for AR (Fig. 2L) and abundance of cytoplasmic lipid droplets (Figs. 1G–1I, 1L, 2I, and 2L). The immature ALC were identified in gerbil testes starting from the age of 5 weeks (Figs. 1G, 2J, and 2K). The immunocytochemical properties of Leydig cells subtypes are demonstrated in Figure 2 and summarized in Table 1.

Mature Adult Leydig Cells

The mature ALC were seen beginning at 6 weeks of age (Fig. 1H). They have an atypical flat polyhedral shape with width of 27.3 ± 2.1 μ m and thickness of 9.1 ± 1.1 μ m. Thus, the polyhedral shape is evident in longitudinal sections of this cell (Fig. 2I), but in transverse sections they appear flat (Fig. 2M). Mature ALC nuclear phenotype was similar to Leydig cells in other species by virtue of presenting high amounts of euchromatin, peripheral points of heterochromatin and prominent nucleolus (Figs. 1H–1L, 2I, and 2M–2Q). However, its nuclei appeared eccentric (Fig. 3), oval with many peripheral invaginations, easily identified in historesin sections submitted to the silver impregnation technique (Figs. 3A and inset). Longitudinal sections of this cell in HE-stained historesin sections indicate clear perinuclear and peripherally scattered basophile cytoplasmic areas (Fig. 2M) which at TEM analysis contained, respectively, a prominent Golgi complex, (Fig. 4A) and regions rich in mitochondria and endoplasmic reticulum (Fig. 4B). These latter organelles showed close association and frequent concentric arrangements (Fig. 4C). A remarkable feature of this cell, indicated by light microscopy (Fig. 3 insets) and confirmed by TEM (Fig. 3), was the occurrence of a cytoplasmic canaliculus containing microvilli near the perinuclear area of the Golgi complex. Taken together, the abovementioned features caused mature ALC to present a very distinct morphology depending on the section plane, as illustrated in Figure 3. Figure 5 is a representative illustration of mature ALC and its relationship with different planar sections of Figure 3.

The ALC population exhibited variable expression of the androgen receptor, since cells were observed with low (Fig. 2L), intermediate (Fig. 2P) or intense (Fig. 2Q) immunoreactivity. Interestingly, only about one third of mature ALC ($28\% \pm 0.2$) showed high 11 β -HSD1 expression (Figs. 2O and 2T).

The macrophages differed from ALC due to their variable number of vacuoles and clear cytoplasm observed in thick sections (Figs. 1C, 1D, and 1L).

Fetal Leydig Cells

The FLC are very frequent in testes of gerbils up to 35 days of age (Figs. 1A, 1B, 1D, and 1F) but are rare in the adult ones (Figs. 1K, 2R, and 2T). In the former, FLC were organized in spherical or cord clusters

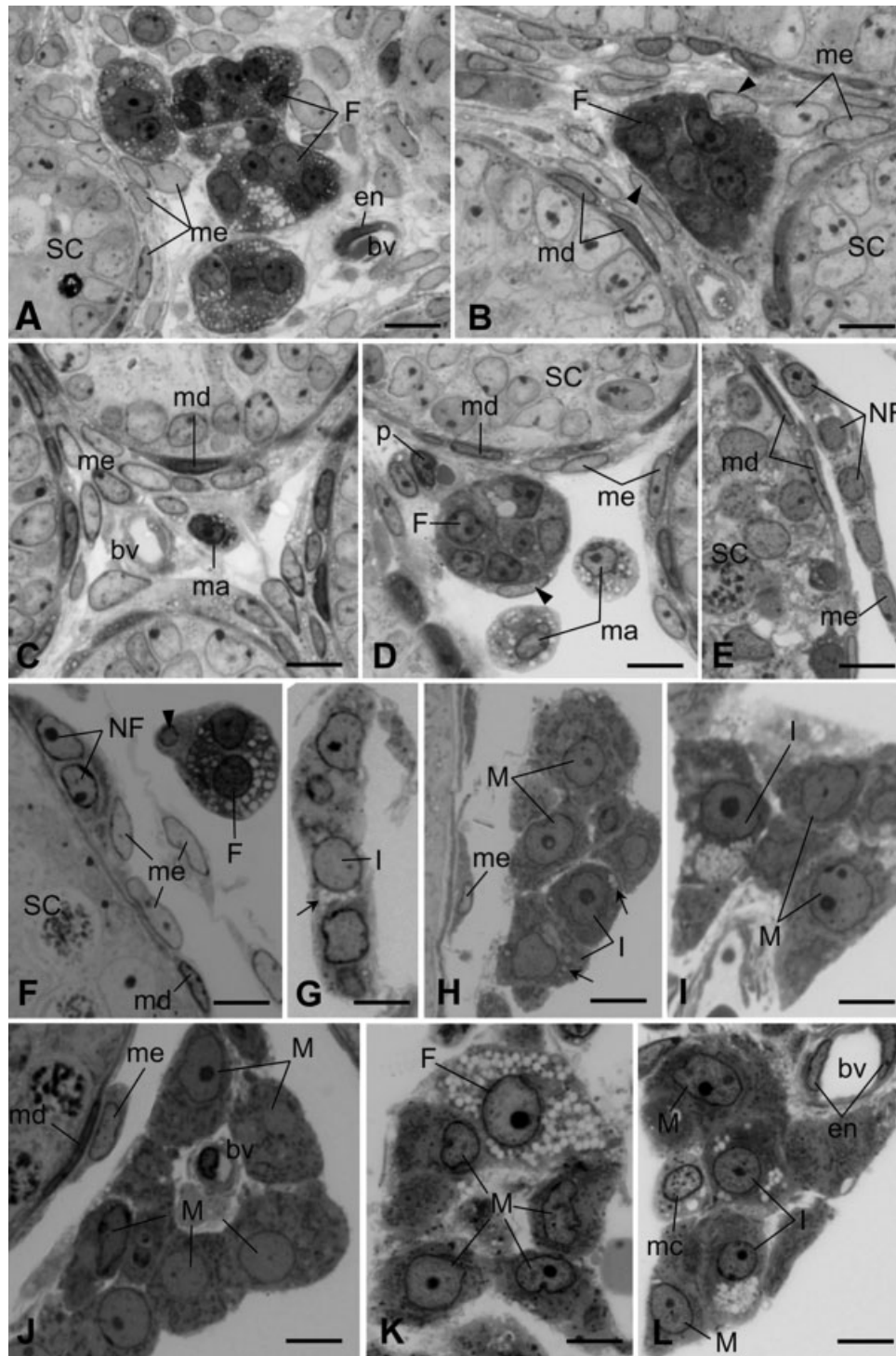


Fig. 1. Light micrographs in high resolution showing testes of gerbils at: 1 (A), 7 (B), 14 (C), 21 (D), 28 (E), 35 (F, G), 42 (H, I), 49 (J), and 90 (K, L) days old. F, fetal Leydig cells; NF, newly formed adult Leydig cells; I, immature adult Leydig cells; M, mature adult Leydig

cells; me, mesenchymal cells; md, myoid cells; en, endothelial cells; p, pericytes; ma, macrophages; arrow, lipid droplets; arrowheads, components of the basement membrane surrounding fetal Leydig cells; bv, blood vessels; SC, seminiferous cords. Bars = 10 μ m.

surrounded by fibroblasts, being easily recognized due to the abundance of large lipid droplets in their cytoplasm (Figs. 1A, 1B, 1D, and 1F). In adult animals, these cells are very similar to those found in younger

specimens (Figs. 1K, 2R, and 2T). These cells are positive for the steroidogenic enzyme 3 β -HSD (Fig. 2S) and negative for 11 β -HSD1 (Fig. 2T) and androgen receptor (Fig. 2U).

DIFFERENTIATION OF LEYDIG CELLS IN THE GERBIL

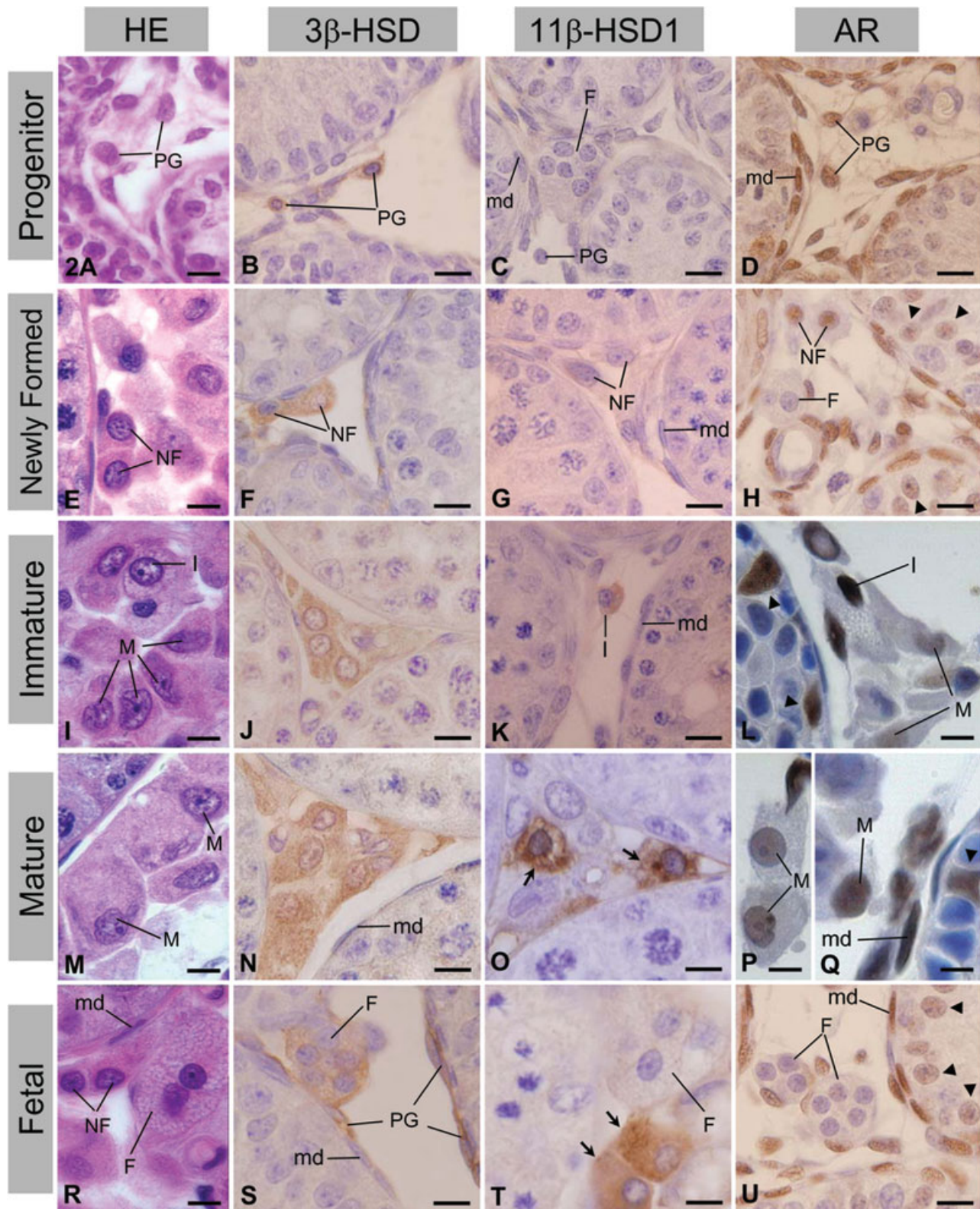


Fig. 2. Characterization of Leydig cell subtypes in gerbils at 14 (A–D), 21 (S, U), 28 (E–H), 35 (J, K), and 90 (I, L, M–R, T) days old after HE-stained historesin sections and immunocytochemistry for 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD), 11 β -hydroxysteroid steroid dehydrogenase 1 (11 β -HSD1), and androgen receptor (AR). The following cell types are shown: F, fetal Leydig cells; progenitor (PG), newly

formed (NF), immature (I), and mature (M) adult Leydig cells; myoid cells (md). Note that all Leydig cell subtypes are positive for 3 β -HSD. Arrows point Leydig cells immunolabeled for 11 β -HSD1 and arrowheads indicate Sertoli cells AR-positive. Bars = A, E, I, L, M, P, Q, R: 5 μ m; B–D, F–H, J, K, N, O, S–U: 10 μ m.

TABLE 1. Summary of immunoreactivity to androgen receptor (AR), 3β -hydroxysteroid dehydrogenase (3β -HSD), and 11β -hydroxysteroid steroid dehydrogenase 1 (11β -HSD1) enzymes in Leydig cell subtypes of gerbil testis

Cell types	3β -HSD	11β -HSD1	AR
Fetal Leydig cells	+	–	–
Undifferentiated mesenchymal cells	–	–	++
Progenitor Leydig cells	+	–	++
Newly formed adult Leydig cells	+	–	++
Immature Leydig cells	+	+	+++
Mature Leydig cells	+	+	+/+/++++

Immunopositive and immunonegative cells are indicated by (+) and (–), respectively. Intensity of immunoreactivity for AR ranged from weak (+), medium (++), to intensely (+++) positive.

DISCUSSION

The present study is a comprehensive description of subtypes of ALC in the Mongolian gerbil and their

temporal development from birth until adulthood. The progressive stages of maturation of ALC were characterized based on criteria previously established for rats (Ariyaratne and Mendis-Handagama, 2000; Ariyaratne et al., 2000; Benton et al., 1995; Haider, 2004; Hardy et al., 1989; Kerr and Knell, 1988; Mendis-Handagama and Ariyaratne, 2001; Mendis-Handagama et al., 1987; Wu et al., 2007) and mice (Baillie, 1964; Kerr et al., 1985; Wu et al., 2007). Some of these criteria are morphological, such as the distribution in the interstitial tissue, cellular shape and size, nuclear characteristics, abundance of cytoplasmic droplets whereas others concern functional activity such as the expression of AR and the enzymes 3β -HSD and 11β -HSD1. Our analysis indicated that ALC differentiation in the gerbil follows the pattern previously reported in other rodents and reinforces the notion that this process requires the progressive transformation of four morphological and functionally distinct subtypes—the

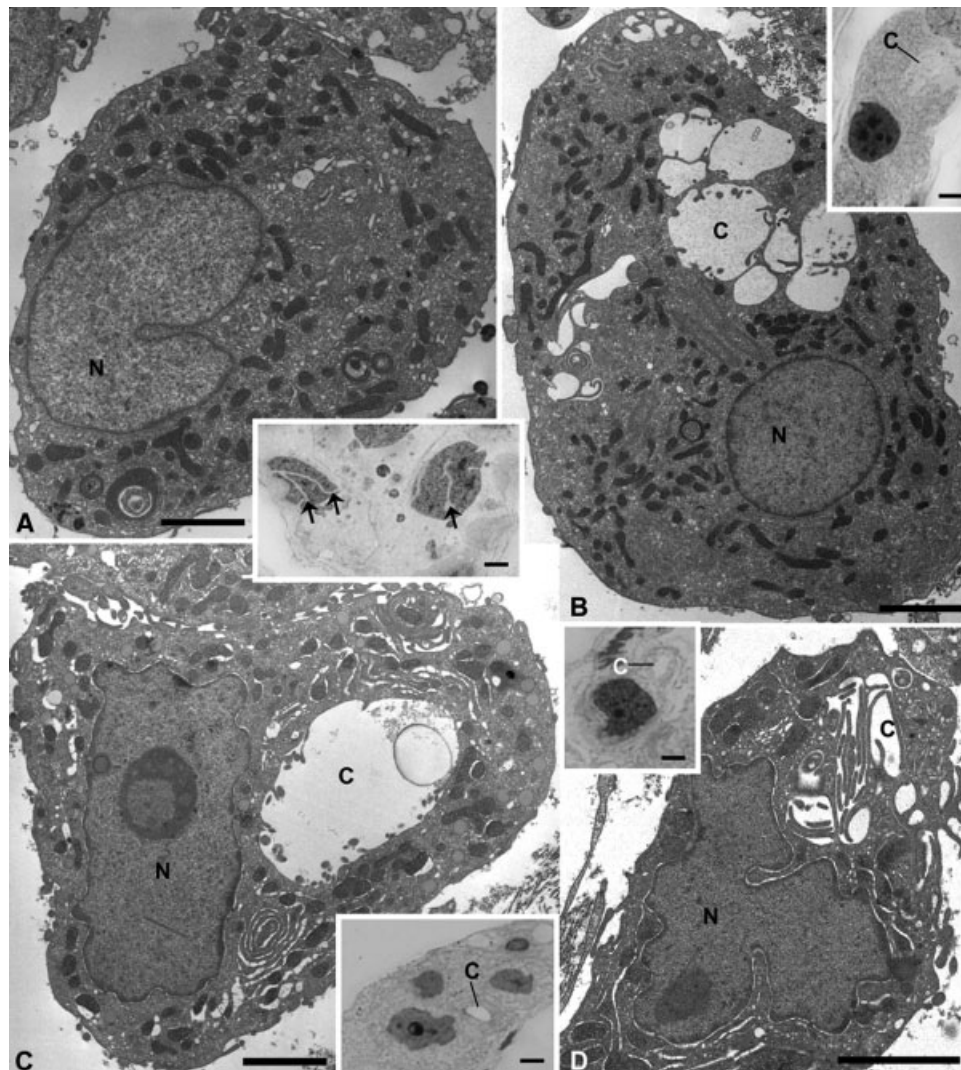


Fig. 3. The mature adult Leydig cells in different section planes. Thin sections (A–D) and historesin histological sections stained with AgNOR (insets) of gerbil testis at 90 days old. N, nuclei; C, canaliculus lined by microvilli; arrow, invagination in the nuclei periphery. Bars = A, B: 11.2 μ m; C: 13 μ m; D: 15 μ m; insets: 10 μ m.

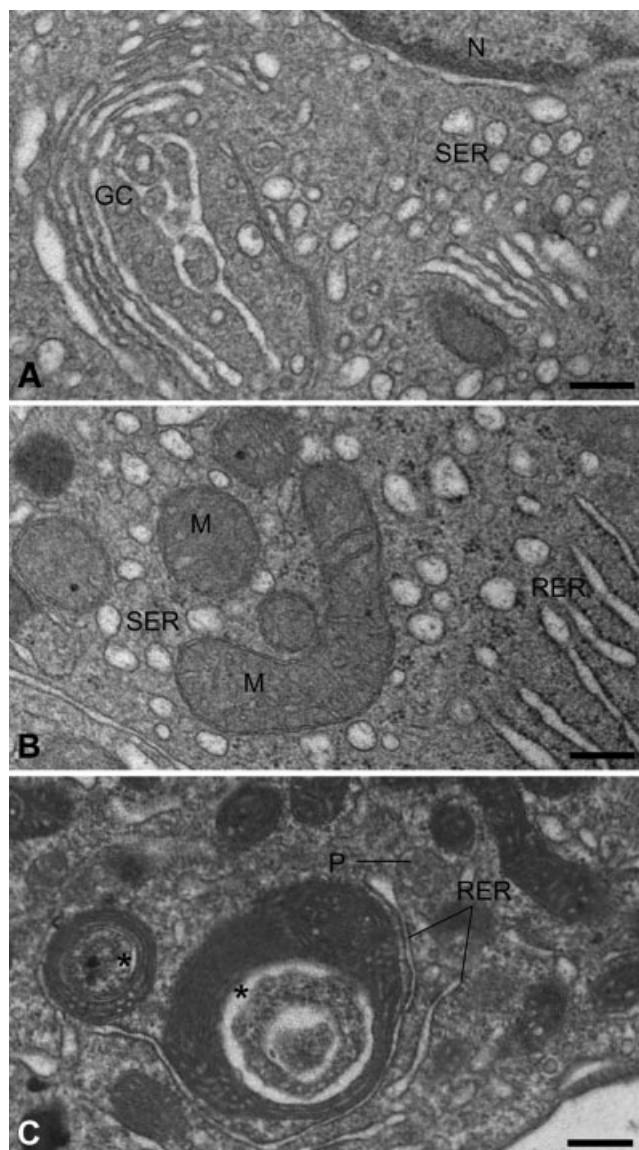


Fig. 4. Ultrastructural details of the cytoplasm of mature adult Leydig cells of 90 day-old gerbils. Nuclei (N); Golgi complex (GC); smooth endoplasmic reticulum (SER); rough endoplasmic reticulum (RER); mitochondria (M); peroxisomes (P). Note in C the concentric arrangement of mitochondria and endoplasmic reticulum (*). Bars = A, B: 0.65 μ m; C: 2 μ m.

Leydig cell progenitors, newly formed, immature, and mature adult Leydig cells (Mendis-Handagama and Ariyaratne, 2001). In addition, it was verified that, except for mature ALC, the other subtypes were phenotypically similar to those described in other laboratory rodents corroborating the criteria previously adopted to differentiate these cell subtypes.

The immunolocalization of 3β -HSD evidenced that Leydig cell progenitors were found 2 weeks after birth. Although these cells are morphologically very similar to undifferentiated mesenchymal precursor cells from the peritubular region, the expression of this steroidogenic enzyme indicates that they were definitely

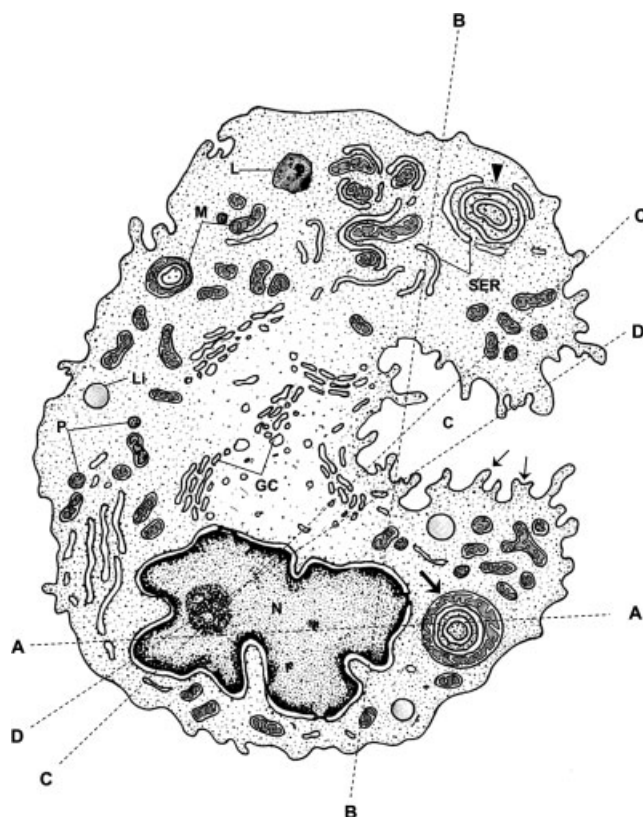


Fig. 5. Summary of the general characteristics in gerbil mature adult Leydig cells. The illustration shows the possible section planes that lead to the different morphology of these cells observed in Figure 3. Plane A: Figure 3A; Plane B: Figure 3B; Plane C: Figure 3C; Plane D: Figure 3D. N, nuclei; M, mitochondria; SER, cisternae of smooth endoplasmic reticulum; GC, Golgi complex; P, peroxisomes; L, lysosome; Li, lipid; arrowhead, concentric arrangement of cisternae of smooth endoplasmic reticulum; thick arrow, concentric arrangement of mitochondria; C, canalculus lined by microvilli; Thin arrows, microvilli.

recruited towards the Leydig cell lineage (Ariyaratne et al., 2000; Haider et al., 1986). After this recruitment, their morphological differentiation is delayed at least 2 weeks, since newly formed ALC were seen just 4 weeks subsequently. The newly formed ALC is the first stage to exhibit morphology close to that of an ALC, displaying polygonal shape and lack of lipid droplets, but they are still small. Additionally, they do not show 11β -HSD1 immediately after they differentiate from progenitors but express it gradually while they are differentiating into immature ALC (Mendis-Handagama and Ariyaratne, 2001). The immature ALC is an intermediate stage between newly formed ALC and mature ALC. In the gerbil, immature ALC were only identified from 5 weeks of age onward. This differentiation stage already presents a large volume of cytoplasm and abundant organelles involved in steroid hormone synthesis as well as the maturation marker 11β -HSD1. However, it is distinguished by the presence of cytoplasmic lipid droplets, which do not occur in newly formed ALC or mature ALC (Haider, 2004; Haider et al., 1995; Mendis-Handagama and Ariyaratne, 2001). The immature ALC are also different from FLC

which are surrounded by fibroblasts and have a higher number of lipid droplets with larger diameters (Haider, 2004; Mendis-Handagama and Ariyaratne, 2001). Our morphological observation indicated that the immature ALC are not very frequent even at their arising and they are still found in adult testis. Therefore, they are probably a transitional stage of short duration. Mature ALC were found from the sixth week onward indicating that the differentiation of the gerbil ALC population is complete at that time. In conclusion, the differentiation of the gerbil ALC lineage began in a period similar (second week) to that in other laboratory rodents (Haider, 2004; Haider et al., 1995; Kerr et al., 1985; Mendis-Handagama and Ariyaratne, 2001; Mendis-Handagama and de Kretser, 1992; O'Shaughnessy et al., 2002; Wu et al., 2007), but the emergence of subsequent phases is delayed. On the other hand, the Leydig cell population in adult animals shows strikingly particular phenotypical features and functional heterogeneity.

The mature ALC in gerbils exhibit a peculiar morphology with several atypical characteristics and higher structural complexity than found in other species (Fig. 5) resulting in variable aspects depending on the section plane, which, interestingly, affects the distribution of organelles in the nonuniform cytoplasm. Thus, quantitative studies on the ultrastructural changes in these components should consider these sectional differences. The structure of gerbil mature ALC is intriguing, since they simultaneously present several morphological adaptations: polyhedral flat cell shape, eccentric nuclei with multiple peripheral channels and a cytoplasmic canaliculus rich in microvilli close to the Golgi complex area. The presence of microvilli on the surface of poorly differentiated Leydig cells was described previously in other species (Haider, 2004; Haider et al., 1995). However, to our knowledge, the occurrence of this canaliculus is a new finding for mature ALC of this rodent. It is possible that such morphological adaptations reflect a high cellular metabolism which requires increased membrane surface to capture androgen precursor molecules and also for androgen secretion. The clusters of mature ALC in gerbils are organized into cords in which cells are firmly adhered. The occurrence of canaliculus and consequent increase of membrane area may also be associated with a certain degree of cell polarization in relation to the synthesis and secretion of steroids. The relationship of these morphological adaptations with the degree of steroidogenic activity would be examined in the future by means of *in vivo* experiments using LHRH agonist analogues and antiandrogens (Gray et al., 2006; Linde et al., 1981).

There is a lot of evidence that different maturation steps of the ALC population are regulated by circulatory hormones such as Luteinizing hormone (Ariyaratne et al., 2000; Huhtaniemi et al., 2002) and follicle-stimulating hormone (Sriraman and Jagannadha Rao, 2004), and also by locally produced growth factors such as transforming growth factor α and β (Khan et al., 1992; Le Roy et al., 1999), insulin-like growth factor I (Khan et al., 1992; Le Roy et al., 1999), and platelet-derived growth factor-A (Fecteau et al., 2006). As regards the sexual steroids, available data indicate that testosterone (Haider, 2004; Mendis-Handagama and Ariyaratne, 2001) and estrogen

(Abney, 1999) are inhibitory to some stages of Leydig cell development. In the adult testis the constant number of Leydig cells is maintained by the inhibitory action of these hormones on the differentiation of precursors to Leydig cells (Abney, 1999; Mendis-Handagama and Ariyaratne, 2001). On the other hand, androgens are required by Leydig cell progenitors to differentiate into mature ALC (Bremner et al., 1994; Buzek and Sanborn, 1988; O'Shaughnessy et al., 2002). In the gerbils up 14 days age AR staining was detected in most cells of interstitial tissue indicating the androgenic influence on proliferation of mesenchymal precursor cells and their differentiation into Leydig cell progenitors. Immature ALC presents high nuclear labeling for AR, which has also been reported in other species (Bremner et al., 1994; Buzek and Sanborn, 1988; O'Shaughnessy et al., 2002). This information is consistent since androgen plays a key role in the maturation of ALC, because it seems essential for the acquisition of steroidogenic enzymes in later stages of the Leydig cell lineage (Bremner et al., 1994; Buzek and Sanborn, 1988; Mendis-Handagama and Ariyaratne, 2001; O'Shaughnessy et al., 2002). Interestingly, the amount of AR detected in immunocytochemistry varied drastically in the mature ALC population, so that these cells could be classified into low, medium or strong AR-staining. In addition, only about one third of three-month-old animals showed large amounts of the enzyme 11 β -HSD1, in contrast to the adult rats, where all ALC were positive for this enzyme (Ariyaratne and Mendis-Handagama, 2000; Phillips et al., 1989). The variation in AR expression and the 11 β -HSD1 immunocytochemical data suggest marked differences in the activity of steroid synthesis within the population of mature ALC in this species, indicating that some of them are more active than others. Although some degree of functional activity had been previously described for mature ALC in mice (Mendis-Handagama and de Kretser, 1992), it was very sharp, pointing to a marked heterogeneity in gerbils.

In summary, ALC differentiation in the Mongolian gerbil follows the pattern found in other laboratory rodents involving the main progressive stages of maturation, as well as their phenotypic and immunocytochemical characteristics. However, the population of mature ALC found in adult animals exhibits a singular phenotype and it is heterogeneous in relation to the specific functional marker 11 β -HSD1 and androgen sensitivity.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Luiz Roberto Falleiros Júnior and Rosana Silistino de Souza for technical assistance. Special acknowledgment is also due to Mrs. Daniele Lisboa Ribeiro and Mr. James Welsh for English-language revision of this article.

REFERENCES

- Abney TO. 1999. The potential roles of estrogens in regulating Leydig cell development and function: A review. *Steroids* 64:610–617.
- Ariyaratne HB, Mendis-Handagama SM. 2000. Changes in the testis interstitium of Sprague Dawley rats from birth to sexual maturity. *Biol Reprod* 62:680–690.
- Ariyaratne HB, Mendis-Handagama SLMC, Buchanan Hales D, Ian Mason J. 2000. Studies on the onset of Leydig precursor cell differentiation in the prepubertal rat testis. *Biol Reprod* 63:165–171.

DIFFERENTIATION OF LEYDIG CELLS IN THE GERBIL

- Baillie AH. 1964. Further observations on the growth and histochemistry of Leydig tissue in the postnatal prepubertal mouse testis. *J Anat* 98:403–418.
- Benton L, Shan LX, Hardy MP. 1995. Differentiation of adult Leydig cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 53:61–68.
- Bremner WJ, Millar MR, Sharpe RM, Saunders PT. 1994. Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: Evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens. *Endocrinology* 135:1227–1234.
- Buzek SW, Sanborn BM. 1988. Increase in testicular androgen receptor during sexual maturation in the rat. *Biol Reprod* 39:39–49.
- Cao D, Li M, Xue R, Zheng W, Liu Z, Wang X. 2005. Chronic administration of ethyl docosahexaenoate decreases mortality and cerebral edema in ischemic gerbils. *Life Sci* 78:74–81.
- dos Santos FC, Carvalho HF, Góes RM, Taboga SR. 2003. Structure, histochemistry, and ultrastructure of the epithelium and stroma in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate. *Tissue Cell* 35:447–457.
- Fecteau KA, Mrkonjich L, Mason JI, Mendis-Handagama SM. 2006. Detection of platelet-derived growth factor- α (PDGF- α) protein in cells of Leydig lineage in the postnatal rat testis. *Histol Histopathol* 21:1295–1302.
- Fochi RA, Perez AP, Bianchi CV, Rochel SS, Goes RM, Vilamaior PS, Taboga SR, Santos FC. 2008. Hormonal oscillations during the estrous cycle influence the morphophysiology of the gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate (skene paraurethral glands). *Biol Reprod* 79:1084–1091.
- Gondos B, Paup DC, Ross J, Gorski RA. 1974. Ultrastructural differentiation of Leydig cells in the fetal and postnatal hamster testis. *Anat Rec* 178:551–565.
- Gray LE Jr, Wilson VS, Stoker T, Lambright C, Furr J, Noriega N, Howdeshell K, Ankley GT, Guille L. 2006. Adverse effects of environmental antiandrogens and androgens on reproductive development in mammals. *Int J Androl* 29:96–108.
- Haider SG. 2004. Cell biology of Leydig cells in the testis. *Int Rev Cytol* 233:181–241.
- Haider SG, Laue D, Schwochau G, Hilscher B. 1995. Morphological studies on the origin of adult-type Leydig cells in rat testis. *Ital J Anat Embryol* 100 (Suppl 1):535–541.
- Haider SG, Passia D, Overmeyer G. 1986. Studies on the fetal and postnatal development of rat Leydig cells employing 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity. *Acta Histochem Suppl* 32: 197–202.
- Haider SG, Passia D, Rommert FF. 1990. Histochemical demonstration of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase as a marker for Leydig cell maturation in rat. *Acta Histochem Suppl* 38:203–207.
- Hardy MP, Zirkin BR, Ewing LL. 1989. Kinetic studies on the development of the adult population of Leydig cells in testes of the pubertal rat. *Endocrinology* 124:762–770.
- Huhtaniemi I, Zhang FP, Kero J, Hamalainen T, Poutanen M. 2002. Transgenic and knockout mouse models for the study of luteinizing hormone and luteinizing hormone receptor function. *Mol Cell Endocrinol* 187:49–56.
- Kerr JB, Knell CM. 1988. The fate of fetal Leydig cells during the development of the fetal and postnatal rat testis. *Development* 103:535–544.
- Kerr JB, Robertson DM, de Kretser DM. 1985. Morphological and functional characterization of interstitial cells from mouse testes fractionated on Percoll density gradients. *Endocrinology* 116:1030–1043.
- Khan S, Teerds K, Dorrington J. 1992. Growth factor requirements for DNA synthesis by Leydig cells from the immature rat. *Biol Reprod* 46:335–341.
- Le Roy C, Lejeune H, Chuzel F, Saez JM, Langlois D. 1999. Autocrine regulation of Leydig cell differentiated functions by insulin-like growth factor I and transforming growth factor β . *J Steroid Biochem Mol Biol* 69:379–384.
- Linde R, Doelle GC, Alexander N, Kirchner F, Vale W, Rivier J, Rabin D. 1981. Reversible inhibition of testicular steroidogenesis and spermatogenesis by a potent gonadotropin-releasing hormone agonist in normal men: An approach toward the development of a male contraceptive. *N Engl J Med* 305:663–667.
- Majdic G, Saunders PT, Teerds KJ. 1998. Immunoeexpression of the steroidogenic enzymes 3- β hydroxysteroid dehydrogenase and 17 α -hydroxylase, C17,20 lyase and the receptor for luteinizing hormone (LH) in the fetal rat testis suggests that the onset of Leydig cell steroid production is independent of LH action. *Biol Reprod* 58:520–525.
- Mancini RE, Vilar O, Lavieri JC, Andrada JA, Heinrich JJ. 1963. Development of Leydig cells in the normal human testis. A cytological, cytochemical and quantitative study. *Am J Anat* 112: 203–214.
- Mendis-Handagama SM, Ariyaratne HB. 2001. Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biol Reprod* 65:660–671.
- Mendis-Handagama SM, Ariyaratne HB, Teunissen van Manen KR, Haupt RL. 1998. Differentiation of adult Leydig cells in the neonatal rat testis is arrested by hypothyroidism. *Biol Reprod* 59:351–357.
- Mendis-Handagama SM, de Kretser DM. 1992. Heterogeneity of adult mouse Leydig cells with different buoyant densities. *J Androl* 13(3):274–82.
- Mendis-Handagama SM, Risbridger GP, de Kretser DM. 1987. Morphometric analysis of the components of the neonatal and the adult rat testis interstitium. *Int J Androl* 10(3):525–34.
- Misro MM, Ganguly A, Das RP. 1993. Is testosterone essential for maintenance of normal morphology in immature rat Leydig cells?. *Int J Androl* 16(3):221–6.
- O'Shaughnessy PJ, Johnston H, Willerton L, Baker PJ. 2002. Failure of normal adult Leydig cell development in androgen-receptor-deficient mice. *J Cell Sci* 115(Pt 17):3491–6.
- Phillips DM, Lakshmi V, Monder C. 1989. Corticosteroid 11 β -dehydrogenase in rat testis. *Endocrinology* 125:209–16.
- Rochel SS, Bruni-Cardoso A, Taboga SR, Vilamaior PS, Goes RM. 2007. Lobe identity in the Mongolian gerbil prostatic complex: A new rodent model for prostate study. *Anat Rec (Hoboken)* 290:1233–1247.
- Roosen-Runge EC, Anderson D. 1959. The development of the interstitial cells in the testis of the albino rat. *Acta Anat (Basel)* 37:125–37.
- Segatelli TM, Franca LR, Pinheiro PF, Alemida CC, Martinez M, Martinez FE. 2004. Spermatogenic cycle length and spermatogenic efficiency in the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *J Androl* 25:872–880.
- Sprando RL. 1977. Perfusion rat testis through the heart using heparin. In: Russel LD, Ettlin APS, Cleeg ED, editors. *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Clearwater: Cache River Press. pp. 277–288.
- Sriraman V, Jagannadha Rao A. 2004. Evaluation of the role of FSH in regulation of Leydig cell function during different stages of its differentiation. *Mol Cell Endocrinol* 224:73–82.
- Ter-Mikaelian M, Sanes DH, Semple MN. 2007. Transformation of temporal properties between auditory midbrain and cortex in the awake Mongolian gerbil. *J Neurosci* 27:6091–6102.
- Venable JH, Coggeshall R. 1965. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 25:407–408.
- Watson ML. 1958. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J Biophys Biochem Cytol* 4:475–478.
- Wiedemann T, Loell E, Mueller S, Stoesselhuber M, Stoltz M, Haas R, Rieder G. 2009. Helicobacter pylori cag-Pathogenicity island-dependent early immunological response triggers later precancerous gastric changes in Mongolian gerbils. *PLoS ONE* 4:e4754.
- Wu X, Wan S, Lee MM. 2007. Key factors in the regulation of fetal and postnatal Leydig cell development. *J Cell Physiol* 213:429–433.

**DINÂMICA DAS POPULAÇÕES DE CÉLULAS DE LEYDIG E MATURAÇÃO
TESTICULAR DO GERBILO DA MONGÓLIA *Meriones unguiculatus***

Maria Etelvina Pinto¹, Sebastião Roberto Taboga², Rejane Maira Góes²

¹ Department of Cell Biology, Institute of Biology, State University of Campinas – UNICAMP, P.O. Box 6109, 13083-970, Campinas, SP, Brazil.

² Department of Biology, São Paulo State University – IBILCE/UNESP, Rua Cristóvão Colombo, 2265, 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

*** Corresponding author**

Prof. Dr. Rejane Maira Góes

Rua Cristóvão Colombo no. 2265, CEP 15054–000, São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Telephone +55 17 32212391, Fax +55 17 32212390. E-mail remagoes@ibilce.unesp.br

Resumo

O presente estudo descreve as mudanças populacionais dos principais tipos celulares do tecido intersticial do gerbilo da Mongólia, do nascimento até a senilidade, com ênfase para as células de Leydig adultas (CLA) e fetais (CLF). Também é determinada a maturação testicular nesse roedor. Análises histológicas e imunocitoquímicas associadas a métodos quantitativos foram realizadas em testículos de gerbilos com 1 dia, 1-8, 12 e 72 semanas de idade (si). O número de CLF não variou do nascimento até a senilidade. Em contraste, tanto o volume absoluto quanto o número total dos demais tipos celulares do tecido intersticial aumentaram continuamente com a idade. Os níveis séricos de testosterona aumentaram expressivamente a partir da 6ª si, diminuindo drasticamente nos animais senis. A razão macrófagos:CLA passou de 1:8 na 4ª e 5ª si para 1:4 entre a 6ª e 12ª si, e cai para 1:2 nos animais senis. As primeiras células mesenquimais positivas para a 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase foram observadas na 2ª si, enquanto as células 11 β -hidroxiesteróide esteróide desidrogenase 1-positivas começam a ser notadas nos animais com 5 si. As transformações no interstício testicular do gerbilo são semelhantes àqueles encontrados para outros roedores, contudo o surgimento das CLA e aumento no número total dessas células ocorrem mais tardiamente e continuam acontecendo até a senilidade. Além disso, o número de CLF permanece constante nos animais senis. A padronização dos principais períodos do desenvolvimento testicular no gerbilo indica que a maturidade testicular ocorre por volta da 12ª si. A síntese de esteróides nos animais senis é comprometida devido ao prejuízo funcional das CLA.

Palavras-chave: células de Leydig, tecido intersticial, gerbilo, testosterona, senil

Introdução

Duas populações morfológica e funcionalmente distintas de células de Leydig são reconhecidas no testículo de mamíferos: as células de Leydig fetais (CLF) e as células de Leydig adultas (CLA) (Lording e De Kretser, 1972; Mendis-Handagama et al., 1987; Haider e Servos, 1998; Majdic et al., 1998; Ariyaratne et al., 2000). Ambas são importantes para a síntese e secreção de andrógeno, em períodos distintos do desenvolvimento. A primeira é formada a partir de células mesenquimais precursoras, por volta do 14º dia de gestação no rato (Majdic et al., 1998). Inicialmente, considerou-se que seu número diminuía durante a vida pós-natal devido à degeneração (Lording e De Kretser, 1972; Mendis-Handagama et al., 1987) ou desdiferenciação (Gondos et al., 1974), levando ao seu desaparecimento. No entanto, estudos posteriores revelaram não apenas a presença de CLF em testículo de ratos adultos (Kerr e Knell, 1988; Ariyaratne e Mendis-Handagama, 2000), mas também que seu número permanece constante até a maturidade sexual (Ariyaratne e Mendis-Handagama, 2000).

Em roedores sexualmente maduros, a população de CLA é a mais abundante e a principal fonte de andrógenos (Mendis-Handagama e Ariyaratne, 2001; Haider, 2004; Wu et al., 2007). A diferenciação das CLA inicia-se por volta do 10º dia pós-natal, no rato, a partir também de células precursoras mesenquimais não esteroidogênicas (Mendis-Handagama e Ariyaratne, 2001; Haider, 2004). Tão logo as células precursoras tornam-se comprometidas com a linhagem de células de Leydig, elas passam a expressar enzimas esteroidogênicas, como a 3β-hidroxiesteróide desidrogenase (3β-HSD) (Haider et al., 1986; Teerds et al., 1999; Ariyaratne et al., 2000; Mendis-Handagama e Ariyaratne, 2001). Além

das progenitoras, sabe-se que o processo de diferenciação das CLA envolve várias mudanças morfológicas e funcionais com a formação de tipos intermediários como as CLA recém-formadas, imaturas e maduras (Mendis-Handagama e Ariyaratne, 2001; Haider, 2004; Wu et al., 2007). A diferenciação e atividade secretora dessa linhagem de células endócrinas são reguladas pelo LH (Mendis-Handagama e Ariyaratne, 2001; Haider, 2004; Wu et al., 2007). Contudo, os fatores parácrinos secretados por outros tipos celulares presentes no interstício, tais como os macrófagos, as células endoteliais e peritubulares têm assumido um papel fundamental nesses processos (Skinner, 1991; Ergun et al., 1997; Hales, 2002; Anand et al., 2003). Por esse motivo, as análises quantitativas das populações de células de Leydig e todos os outros componentes do tecido intersticial tornam-se muito importante para se entender melhor a dinâmica que envolve a diferenciação dessas células.

O gerbilo (*Meriones unguiculatus*) é um roedor nativo das regiões áridas da Mongólia e da China e representa um interessante modelo experimental na investigação biomédica (Rich, 1968; Cao et al., 2005; Ter-Mikaelian et al., 2007; Wiedemann et al., 2009). Embora existam alguns relatos na literatura que incluem descrições do desenvolvimento pós-natal do testículo (Ninomiya e Nakamura, 1987), aspectos da diferenciação das espermatídes relacionados à formação do acrossomo e duração da espermatogênese (Segatelli *et al.* 2000, 2002, 2004), pouco é conhecido sobre a biologia reprodutiva dessa espécie. Muitos estudos abordam as alterações no tecido intersticial de diferentes roedores durante o desenvolvimento pós-natal (Lording e De Kretser, 1972; Mendis-Handagama et al., 1987; Zirkin e Ewing, 1987; Kerr e Knell, 1988; Ariyaratne e Mendis-Handagama, 2000), mas poucos o fazem de maneira qualitativa e contemplando os principais estágios de maturação (Ariyaratne e Mendis-Handagama, 2000). Esse panorama

é essencial para a interpretação dos eventos envolvidos com a maturação sexual bem como para o estabelecimento de comparações entre os roedores. Não são do nosso conhecimento estudos que contenham informações quantitativas dos tipos celulares que compõe o tecido intersticial do gerbilo, nem tampouco abordem as alterações na função esteroidogênica durante os períodos neonatal, púbere e adulto. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar as mudanças nas principais populações celulares do tecido intersticial do gerbilo da Mongólia do nascimento até a senilidade e as repercussões nos níveis séricos de esteróides sexuais e na diferenciação do epitélio germinativo.

Material e Métodos

Animais

Os gerbilos foram mantidos no biotério do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP, campus de São José do Rio Preto (SP). A reprodução e manutenção dos animais foram realizadas em condições controladas de luminosidade e temperatura controlada (23-25°C) e umidade (40-60%), sendo fornecidas água filtrada e ração Purina® na forma de grãos (Labina-Purina, Paulínia, SP, Brazil) “*ad libitum*”. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal da UNESP, (Protocolo CEEA nº. 31/07). As famílias foram avaliadas diariamente no período da manhã e o dia do nascimento dos filhotes foi considerado o dia 0 de vida pós-natal. Foram utilizados gerbilos machos com 1 dia, 1-8, 12 e 72 semanas de idade (si) (n=8).

Processamento dos testículos

Os animais foram anestesiados com Ketamina (800 µl/kg) e Xilazina (200 µl/kg) e os testículos direitos foram removidos, separados do epidídimo e pesados para obter o peso do testículo fresco. A gravidade específica de cada testículo foi determinada pela técnica da flutuação usando uma série de soluções de sacarose de concentração conhecida e variável, como descrito previamente (Mori e Christensen, 1980; Mendis-Handagama e Ewing, 1990), para determinar o peso do testículo fresco. Os gerbilos até 2si foram mortos por inalação de CO₂ e os testículos esquerdos foram fixados por imersão. A perfusão vascular com solução salina heparinizada (Sprando, 1977), seguida pela solução fixadora, foi realizada nos animais mais velhos. Logo após a perfusão, os testículos esquerdos foram retirados e imersos em solução fixadora. Para análises imunocitoquímicas os testículos foram fixados por 6h em fluido de Bouin, lavados por vários dias em álcool 70% para remoção do ácido pícrico e, então, processados para inclusão em Paraplast (Merck, Darmstadt, Alemanha). Cortes de 4µm de espessura foram aderidos em lâminas previamente silanizadas. Para as análises em microscopia de luz de alta resolução, os testículos foram fixados em solução de glutaraldeído 2,5%, ácido tânico 1%, sacarose 3,5% e cloreto de cálcio 5mM em tampão cacodilato 0,1M pH 7,4, à 4°C. Após 1h nesta solução, foram seccionados em fragmentos menores e fixados por mais 1h em solução semelhante. Os fragmentos de 1-2mm de espessura, após lavagem em tampão, foram pós-fixados em solução aquosa de tetróxido de ósmio a 1%, desidratados em acetona e incluídos em araldite 502 (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA). Cortes semifinos com 1µm de espessura foram corados com Azul de Toluidina. As análises histológicas foram

feitas em fotomicroscópio (Olympus, Hamburg, Germany), e as imagens digitalizadas usando-se o software Image Pro-plus 6.0 for Windows (Copyright© 1993-2006 Media Cybernetics, Inc., Bethesda, MD, USA).

Fases do desenvolvimento testicular

Os cordões/túbulos seminíferos foram analisados em cortes de parafina corados com HE para determinar as diferentes fases do desenvolvimento pós-natal testicular: impúbere, pré-púbere, púbere e adulto. Tal determinação foi efetuada com base no processo de formação do lúmen e presença ou ausência de gonócitos, espermatogônias, espermátócitos primários e espermátides finais e espermatozóides, segundo Courot et al. (1970) e Segatelli et al. (2002).

Análises histológicas e estereológicas

Os diferentes tipos celulares do parênquima testicular do gerbilo – células de Leydig fetais e adultas, macrófagos, células mesenquimais, peritubulares, endoteliais e pericitos - foram identificados em cortes semifinos, de acordo com as descrições publicadas anteriormente (Mendis-Handagama e Ariyaratne, 2001; Pinto et al., 2009) e os seguintes parâmetros foram determinados:

1. *Volume absoluto*: o volume absoluto (mm^3) ocupado por cada tipo celular foi calculado pela multiplicação da densidade de volume (Dv) de cada tipo celular pelo volume (mm^3) do testículo fresco. A Dv, definida como volume de cada tipo celular por unidade de volume testicular, foi obtida pelo método de contagem de pontos (Weibel, 1963), usando uma gride ocular com 130 pontos. Quatro campos de cada corte foram escolhidos com a

objetiva de 100x e foram empregados 20 blocos/grupo para os animais com 1 dia de idade, 40 blocos/grupo para os animais com 1 si e 50 blocos/grupo para os animais das demais idades. O volume do testículo fresco (mm^3) foi determinado pela divisão do peso (g) do testículo fresco pela sua densidade (densidade = gravidade específica em unidades métricas) (Mori e Christensen, 1980; Mendis-Handagama e Ewing, 1990).

2. *Número total de células por testículo*: o número total de cada tipo celular do tecido intersticial por testículo foi calculado pela multiplicação da densidade numérica (Nv) pelo volume do testículo fresco (Mendis-Handagama et al., 1988). A Nv (número de células por unidade de volume testicular) de cada tipo de célula intersticial (células de Leydig fetal e adulta, macrófagos, células mesenquimais, peritubulares, endoteliais e pericitos) foi quantificada pelo método do dissector (Sterio, 1984), com modificações descritas por Mendis-Handagama e Ewing (1990).

Imunocitoquímica 3 β -HSD e 11 β -HSD1

A imunocitoquímica para as enzimas 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase (3 β -HSD - sc-30820/Santa Cruz Biotechnology, INC) e 11 β -hidroxiesteróide esteróide desidrogenase 1 (11 β -HSD1 - sc-20175/Santa Cruz Biotechnology, INC) foi realizada de acordo com os procedimentos descritos previamente (Pinto et al., 2009).

Dosagem hormonal

O sangue foi coletado por punção cardíaca, o soro foi separado por centrifugação e armazenado a -20°C para subseqüentes ensaios. A determinação dos níveis séricos de

testosterona e estrógeno foi realizada em aparelho automatizado de análise quimioluminescente ultra-sensível (Johnson & Johnson, Langhorne, PA, USA) em um laboratório de análises clínicas de referência. Oito animais por grupo foram usados e os testes foram realizados em triplicata. A sensibilidade do método foi de 1-1500 pg/mL para testosterona e 0,1-3814 pg/mL para estradiol.

Análises Estatísticas

Os dados quantitativos obtidos foram analisados pela Análise de Variância (One-way ANOVA) e pelo teste de Tukey para comparações múltiplas com nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$), usando o programa Statistica 7.0 (Copyright©StatSoft, Inc. 1984-2004, Tulsa, OK, EUA).

Resultados

Dados biométricos

O aumento médio do peso corporal e testicular dos animais foi contínuo do nascimento até velhice (Fig. 1).

Fases do desenvolvimento testicular

A fase impúbere, caracterizada pela predominante presença de gonócitos e ausência de lúmen nos cordões seminíferos, se estendeu até a 2ª. si (Fig. 2A) . O período pré-púbere acontece da 3ª. a 5ª. si. No início desse período (3ª si) os gonócitos já não são mais vistos e

verifica-se uma intensa atividade mitótica, correspondente à proliferação das espermatogônias (Fig. 2B). Na semana subsequente, aparecem os espermátócitos primários e inicia-se a formação do lúmen (Fig. 2C). A puberdade vai da 6^a. a 8^a. si, quando ocorre um considerável aumento do diâmetro tubular e surgimento das espermátides alongadas (Fig. 2D, E). Os gerbilos com 12 si apresentaram o testículo maduro, exibindo o ciclo do epitélio seminífero completo e inúmeros túbulos contendo espermatozóides livres (Fig. 2F).

Caracterização dos tipos de células intersticiais

As CLF são facilmente reconhecidas nos animais jovens devido à abundância de gotículas lipídicas de grande tamanho no citoplasma, e núcleo grande e esférico (Fig. 3C, D, F). Independentemente da idade, as CLF formam aglomerados compactos contendo uma pequena quantidade de células, rodeados por fibroblastos (Fig. 3C, D, F, J, K). Essas células são positivas para a enzima 3 β -HSD (Fig. 3C) e negativas para a 11 β -HSD1 (Fig. 3K). A identificação das células de Leydig progenitoras na 2^a si foi possível devido à expressão da enzima 3 β -HSD (Fig. 3B). As CLA recém-formadas apresentam formato aproximadamente poligonal, núcleo esférico ou ligeiramente ovalado e citoplasma escasso sem gotículas lipídicas (Fig. 3D). Elas foram identificadas não somente com base na morfologia, mas também pela expressão da 3 β -HSD (Fig. 3E). Já, as CLA imaturas possuem núcleo volumoso, cromatina descompactada, nucléolo evidente e citoplasma com várias gotículas lipídicas. Tais gotículas possuem um tamanho menor do que as observadas nas CLF (Fig. 3F, H). As CLA maduras apresentam estrutura bastante peculiar, descrita em pormenores por Pinto et al. (2009). Em resumo, exibem formato poliédrico achatado,

apresentam núcleo esférico ou levemente oval, com cromatina extremamente descompactada e nucléolo muito proeminente e um canalículo citoplasmático perinuclear. O citoplasma contém nenhuma ou poucas gotículas lipídicas (Fig. 3H, J). As CLA imaturas e maduras são positivas para a enzima 11 β -HSD1 (Fig. 3G, I, K).

Os macrófagos se diferenciam das células de Leydig, pois são células grandes, com núcleo esférico e proeminente contendo vários grumos de heterocromatina. O citoplasma é pouco corado e contém vacúolos de tamanhos variados e grânulos fortemente corados (Fig. 3A, H, J). As células mióides foram reconhecidas pelo íntimo contato com os cordões/túbulos seminíferos, exibindo, quando diferenciadas, formato fusiforme e núcleo alongado e fortemente corado. As células endoteliais dos vasos sanguíneos foram diferenciadas pelo formato pavimentoso e núcleo elíptico. Os pericitos foram facilmente distinguíveis dos outros tipos celulares devido à íntima associação com a parede externa dos vasos sanguíneos, pelo núcleo intensamente corado em formato de meia-lua e escassez de citoplasma (Fig. 2). Os demais tipos de células do tecido intersticial, com formato fusiforme e características de fibroblastos, foram coletivamente designados de células mesenquimais.

Esterologia

Os volumes absolutos dos principais componentes testiculares são mostrados na Tabela 1. O volume absoluto do epitélio seminífero e do tecido intersticial aumentaram expressivamente com a idade. O volume absoluto das CLF não variou até a 3ª si, mas diminuiu significativamente a partir da 4ª si, quando surgem as primeiras CLA. O volume

absoluto das CLA, inicialmente baixo (4ª si), aumentou exponencialmente com a idade. Já, o volume absoluto das células mesenquimais não variou na 1ª si, mas aumentou significativamente nas demais idades. Os demais tipos celulares, os vasos sanguíneos e espaços linfáticos seguiram o mesmo padrão de aumento das células mesenquimais.

O número de CLF não variou do nascimento até a senilidade, enquanto o número total dos demais tipos celulares do tecido intersticial aumentou com a idade (Tabela 2). A razão macrófagos/células de Leydig adultas (M/CLA) aumentou até a 3ª si, caindo para cerca de 1:8, na 4ª e 5ª si. Entre a 6ª e 12ª si a relação M/CLA foi 1:4 e nos animais senis ela aumentou para 1:2, tendo em vista que o número de macrófagos praticamente dobrou em relação aos animais de 12 si. Conforme revelado pelo número total de células, a frequência relativa das células mesenquimais e CLF diminui progressivamente, enquanto para as CLA ocorre o contrário, especialmente a partir da 5ª si (Fig. 4A). Quanto aos demais tipos celulares, verificou-se um aumento da frequência relativa de macrófagos e das células endoteliais, enquanto a frequência relativa de células mióides e dos pericitos manteve-se aproximadamente constante nas diferentes idades (Fig. 4B).

Níveis séricos hormonais

Os níveis séricos de testosterona não variaram até a 5ª si, aumentando drasticamente na 6ª si, e em menor grau na 12ª si. Enquanto os níveis séricos de estrógeno apresentaram pequenas variações durante o desenvolvimento pós-natal. Nos animais senis verificou-se uma diminuição acentuada nos níveis séricos desses dois hormônios (Fig. 5).

Discussão

Recentemente, as características fenotípicas dos principais estágios de diferenciação das células de Leydig e o respectivo tempo de surgimento, foram descritos para o gerbilo da Mongólia, com destaque para morfologia atípica das células adultas e funcionalmente maduras (Pinto et al., 2009). Em continuidade a esse estudo e visando fornecer um panorama mais completo sobre o desenvolvimento testicular nesse roedor, as variações numéricas nas duas principais populações de células de Leydig (CLF e CLA) e dos demais tipos celulares do tecido intersticial foram determinadas, desde o nascimento até a idade senil. E esses dados foram confrontados com o desenvolvimento do epitélio seminífero e os níveis séricos de esteróides sexuais.

As análises do número total de células indicaram que as CLF de gerbilos apresentam exatamente o mesmo comportamento identificado previamente para outros roedores, persistindo em quantidade no período pós-natal (Ariyaratne e Mendis-Handagama, 2000). Como não houve mudança no número das CLF e o peso testicular aumentou consideravelmente não apenas durante a puberdade, mas também durante a idade adulta, o volume absoluto dessas células diminuiu. É conhecido que existe uma possível relação inibitória recíproca entre as CLF e as CLA em diferenciação (O'Shaughnessy et al., 2006), sendo que os mesmos fatores que estimulam a diferenciação das CLA agem causando hipotrofia das CLF.

O surgimento da população de CLA no testículo de rato tem início entre o 10º e 14º dia e as mesmas aumentam significativamente em número e volume após 21º dia (Mendis-Handagama et al., 1987; Ariyaratne e Mendis-Handagama, 2000). No gerbilo, a transformação das células indiferenciadas em CLA também ocorre por volta do 14º dia,

quando são observadas algumas células mesenquimais positivas para a enzima 3β -HSD, as células de Leydig progenitoras. No entanto, as CLA recém formadas, as primeiras a exibirem morfologia típica de CLA, só foram observadas com 4 si (Pinto et al., 2009), enquanto no rato essas são observadas com 3 si (Ariyaratne e Mendis-Handagama, 2000; Mendis-Handagama e Ariyaratne, 2001). Embora com 4 si o testículo do gerbilo já apresente CLA, CLA recém formadas, essas ainda não expressam a enzima 11β -HSD1, um marcador da maturidade funcional das células de Leydig, mas à medida que vão diferenciando-se em CLA imaturas vão adquirindo gradualmente essa enzima (Mendis-Handagama e Ariyaratne, 2001). Um pequeno número de células positivas para a 11β -HSD1 foi observado nos animais com 5 si, no entanto, elas tornam-se abundantes após 6 si. Nesse período, a população de CLA aumenta drasticamente, conforme indicado pelos valores de volume absoluto e número total de células.

O aumento do volume absoluto e do número das células mesenquimais, peritubulares, endoteliais e pericitos foram progressivos com o avanço da idade. Esse fato é necessário porque o aumento do número dessas células torna-se essencial para acompanhar o aumento de volume do órgão e a expansão do tecido intersticial. Os resultados demonstrados neste trabalho estão de acordo com outros descritos previamente para o rato para todos esses tipos celulares (Ariyaratne e Mendis-Handagama, 2000).

Os níveis séricos de testosterona não foram diferentes entre a 2ª e 5ª si. Isso é explicado pela constância das CLF visto que essas tem sido implicadas na produção de andrógenos em roedores nos períodos fetal e neonatal (O'Shaughnessy et al., 2006). Embora a partir da 4ª si as CLA recém-formadas já sejam observadas, estudos com o rato

apontam para uma menor capacidade secretória em relação às CLA maduras (Eckstein et al., 1987). O aumento abrupto nos níveis de testosterona sérica na 6ª. si confirma os achados imunocitoquímicos e reforça que as CLA se tornam funcionais nesse período. Adicionalmente, os aumentos progressivos nos níveis de testosterona, que ocorrem a partir da 6ª. até a 12ª. si, refletem tanto o aumento populacional das CLA como a maior capacidade esteroideogênica.

Nos animais velhos os níveis séricos de testosterona decaem, mesmo com o aumento do volume absoluto e do número de CLA, o que aponta para um comprometimento da atividade funcional destas células com a idade. Outros autores têm sugerido que o aumento desta população celular ocorra na tentativa de manutenção dos níveis androgênicos normais (Mendis-Handagama e Gelber, 1995). Análises específicas para determinar os possíveis mecanismos responsáveis pelo prejuízo funcional das CLA com a idade estão em andamento e dados ultra-estruturais apontam para significativas alterações degenerativas (dados não mostrados). Estudos prévios demonstraram que todas as etapas, desde a ligação do LH ao seu receptor até a última reação enzimática da via biosintética da testosterona, são alteradas devido ao envelhecimento das células de Leydig (Luo et al., 2005). Sabe-se também que as espécies reativas ao oxigênio são um subproduto da esteroidogênese, então a supressão da esteroidogênese nos animais velhos evitaria que os radicais livres causassem danos às células de Leydig (Chen e Zirkin, 1999; Zirkin e Chen, 2000; Hanugoklu, 2006).

É conhecido que várias fases do desenvolvimento testicular precedem a maturidade testicular em mamíferos (Courot et al., 1970) e as mesmas foram estabelecidas para o gerbilo. Ninomiya e Nakamura (1987) relataram que com 10 semanas os espermatozóides

estão presentes na maioria dos túbulos seminíferos e na cauda do epidídimo, mas somente com 12 si ocupam consistentemente esse último órgão. Nosso estudo está de acordo com os achados de Ninomiya e Nakamura (1987) em relação à presença de espermatozóides nos túbulos seminíferos com 12 si, e, além disso, verificamos que nesse período os níveis de testosterona são os maiores em relação às demais idades. Juntas, essas evidências indicam que o gerbilo atinge a maturidade testicular com 12 si, diferindo do rato e do camundongo, os quais se tornam sexualmente maduros mais cedo, por volta da 8ª si (Courot et al., 1970).

Os macrófagos estão presentes no testículo de roedores durante e após o desenvolvimento pós-natal e a sua estreita associação física com as células de Leydig sugere que ambos estão funcionalmente conectados (Gaytan et al., 1996; Gaytan et al., 1997; Hales, 2002). O número de macrófagos aumenta drasticamente desde o nascimento até a maturidade sexual. No testículo imaturo, os macrófagos são encontrados tanto livres como próximo às células de Leydig, enquanto na puberdade eles são incorporados aos aglomerados de células de Leydig formando íntimas associações (Hales, 2002; Tran et al., 2006). De acordo com estudos prévios há cerca de um macrófago para cada quatro células de Leydig no testículo de roedor (Hutson, 1994), proporção confirmada para o gerbilo adulto. O papel dos macrófagos varia nas diferentes fases do desenvolvimento da vida pós-natal do rato. Sob condições fisiológicas normais e não-inflamatórias, eles secretam vários fatores de crescimento que levam a proliferação e diferenciação das células de Leydig (Hales, 2002; Bornstein et al., 2004). Os macrófagos também desempenham uma função importante na regeneração de muitos tipos celulares após lesão tecidual, pois secretam fatores de crescimento essenciais para a resposta antiinflamatória. A droga citotóxica etano 1,2-dimetano sulfonato (EDS) causa destruição das células de Leydig e, por isso, tem sido

extensivamente usada para estudar a regeneração desse tipo celular. Após o tratamento com EDS ocorre uma intensa fagocitose de células de Leydig mortas por macrófagos testiculares e um subsequente aumento na atividade proliferativa, assim que uma nova população de células de Leydig ocupa o interstício. Um aumento no número de macrófagos e os primeiros sinais morfológicos de inflamação ocorrem ao mesmo tempo (Teerds et al., 1989). É provável que a fagocitose das células de Leydig necróticas ou apoptóticas, e/ou outros sinais, ative a secreção de fatores de crescimento pelos macrófagos, os quais estimulam a atividade proliferativa das células intersticiais. Se os macrófagos estão ausentes no interstício testicular, as células de Leydig não se desenvolvem normalmente. Esses estudos sugerem que os macrófagos forneçam elementos essenciais para a diferenciação e crescimento dessas células (Hales, 2002; Bornstein et al., 2004). Em contrapartida, quando os macrófagos são ativados e passam a produzir mediadores inflamatórios, a esteroidogênese é inibida nas células de Leydig. Os macrófagos ativados produzem citocinas, como interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), que parecem atuar como repressores transcricionais da expressão gênica de enzimas envolvidas na esteroidogênese (Hales, 2002; Bornstein et al., 2004). Neste trabalho observamos que o número de macrófagos por CLA aumenta exatamente no período em que o número de CLA aumenta significativamente. Além disso, nos animais senis essa razão dobra. Esses achados corroboram a participação dos macrófagos na diferenciação das CLA durante o desenvolvimento pós-natal e, sobretudo, indicam um papel inibitório dos macrófagos sobre a esteroidogênese nos animais senis.

As mudanças que ocorrem no interstício testicular do gerbilo são bastante similares àqueles encontrados para outros roedores, com a persistência do número de CLF até a

senilidade. Entretanto, a maturação das CLA e o aumento no número total dessas células ocorrem mais tardiamente e continuam acontecendo nos animais senis. O comprometimento da síntese de esteróides nesse último período decorre do prejuízo funcional das CLA. Nossos dados padronizam os principais períodos do desenvolvimento testicular no gerbilo e indicam que sua maturidade testicular ocorre por volta da 12^a.si.

Referências Bibliográficas

Anand RJ, Paust HJ, Altenpohl K, Mukhopadhyay AK. 2003. Regulation of vascular endothelial growth factor production by Leydig cells in vitro: the role of protein kinase A and mitogen-activated protein kinase cascade. *Biol Reprod* 68:1663-1673.

Ariyaratne HB, Mendis-Handagama SM. 2000. Changes in the testis interstitium of Sprague Dawley rats from birth to sexual maturity. *Biol Reprod* 62:680-690.

Ariyaratne HB, Mendis-Handagama SLMC, Buchanan Hales D, Ian Mason J. 2000. Studies on the onset of Leydig precursor cell differentiation in the prepubertal rat testis. *Biol Reprod* 63:165-171.

Bornstein SR, Rutkowski H, Vrezas I. 2004. Cytokines and steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 215:135-141.

Cao D, Li M, Xue R, Zheng W, Liu Z, Wang X. 2005. Chronic administration of ethyl docosahexaenoate decreases mortality and cerebral edema in ischemic gerbils. *Life Sci* 78:74-81.

Courot M. 1970. Spermatogenesis. In: Johnson AD, Gomes WR, Vandemark NL (eds), *The testis*. New York: Academic Press. v. 1, p 339–431.

Eckstein B, Borut A, Cohen S. 1987. Metabolic pathways for androstanediol formation in immature rat testis microsomes. *Biochim Biophys Acta* 924:1-6.

Ergun S, Kilic N, Fiedler W, Mukhopadhyay AK. 1997. Vascular endothelial growth factor and its receptors in normal human testicular tissue. *Mol Cell Endocrinol* 131:9-20.

Gaytan F, Bellido C, Morales C, Garcia M, van Rooijen N, Aguilar E. 1996. In vivo manipulation (depletion versus activation) of testicular macrophages: central and local effects. *J Endocrinol* 150:57-65.

Gaytan F, Bellido C, Aguilar R, Morales C, van Rooijen N, Aguilar E. 1997. Role of the testis in the response of the pituitary-testicular axis to nitric oxide-related agents. *Eur J Endocrinol* 137:301-308.

Gondos B, Paup DC, Ross J, Gorski RA. 1974. Ultrastructural differentiation of Leydig cells in the fetal and postnatal hamster testis. *Anat Rec* 178:551-565.

Haider SG, Passia D, Overmeyer G. 1986. Studies on the fetal and postnatal development of rat Leydig cells employing 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity. *Acta Histochem Suppl* 32:197-202.

Haider SG, Servos G. 1998. Ultracytochemistry of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase in Leydig cell precursors and vascular endothelial cells of the postnatal rat testis. *Anat Embryol (Berl)* 198:101-110.

Haider SG. 2004. Cell biology of Leydig cells in the testis. *Int Rev Cytol* 233:181-241.

Hales DB. 2002. Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. *J Reprod Immunol* 57:3-18.

Hutson JC. 1994. Testicular macrophages. *Int Rev Cytol* 149:99-143.

Kerr JB, Knell CM. 1988. The fate of fetal Leydig cells during the development of the fetal and postnatal rat testis. *Development* 103:535-544.

Lording DW, De Kretser DM. 1972. Comparative ultrastructural and histochemical studies of the interstitial cells of the rat testis during fetal and postnatal development. *J Reprod Fertil* 29:261-269.

Luo L, Chen H, Zirkin BR. 2005. Temporal relationships among testosterone production, steroidogenic acute regulatory protein (StAR), and P450 side-chain cleavage enzyme (P450scc) during Leydig cell aging. *J Androl* 26:25-31.

Majdic G, Saunders PT, Teerds KJ. 1998. Immunoexpression of the steroidogenic enzymes 3-beta hydroxysteroid dehydrogenase and 17 alpha-hydroxylase, C17,20 lyase and the receptor for luteinizing hormone (LH) in the fetal rat testis suggests that the onset of Leydig cell steroid production is independent of LH action. *Biol Reprod* 58:520-525.

Mendis-Handagama SM, Risbridger GP, de Kretser DM. 1987. Morphometric analysis of the components of the neonatal and the adult rat testis interstitium. *Int J Androl* 10:525-534.

Mendis-Handagama SM, Zirkin BR, Ewing LL. 1988. Comparison of components of the testis interstitium with testosterone secretion in hamster, rat, and guinea pig testes perfused in vitro. *Am J Anat* 181:12-22.

Mendis-Handagama SM, Ewing LL. 1990. Sources of error in the estimation of Leydig cell numbers in control and atrophied mammalian testes. *J Microsc* 159:73-82.

Mendis-Handagama SM, Gelber SJ. 1995. Signs of aging are apparent in the testis interstitium of Sprague Dawley rats at 6 months of age. *Tissue Cell* 27:689-699.

Mendis-Handagama SM, Ariyaratne HB. 2001. Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biol Reprod* 65:660-671.

Mori H, Christensen AK. 1980. Morphometric analysis of Leydig cells in the normal rat testis. *J Cell Biol* 84:340-354.

Ninomiya H, Nakamura T. 1987. Postnatal development of the testis in the Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. *Jikken Dobutsu* 36:65-72.

O'Shaughnessy PJ, Baker PJ, Johnston H. 2006. The foetal Leydig cell - differentiation, function and regulation. *Int J Androl* 29:90-95; discussion 105-108.

Pinto ME, Egydio FD, Taboga SR, Mendis-Handagama SM, Góes RM. 2009. Differentiation of Leydig cells in the Mongolian gerbil. *Microsc Res Tech* *in press*.

Rich ST. 1968. The Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) in research. *Lab Anim Care* 18(2):235-243.

Segatelli TM, Almedia CC, Pinheiro PF, Martinez M, Padovani CR, Martinez FE. 2000. Ultrastructural study of acrosome formation in mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Tissue Cell* 32:508-517.

Segatelli TM, Almeida CC, Pinheiro PF, Martinez M, Padovani CR, Martinez FE. 2002. Kinetics of spermatogenesis in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Tissue Cell* 34:7-13.

Segatelli TM, Franca LR, Pinheiro PF, Almeida CC, Martinez M, Martinez FE. 2004. Spermatogenic cycle length and spermatogenic efficiency in the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *J Androl* 25:872-880.

Skinner MK. 1991. Cell-cell interactions in the testis. *Endocr Rev* 12:45-77.

Sprando RL. 1977. Perfusion rat testis through the heart using heparin. In: Russel LD, Ettlin APS, Cleeg ED (eds.), *Histological and histopatological evaluation of the testis*. Clearwater: Cache River Press. p 277-288.

Sterio DC. 1984. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc* 134:127-136.

Teerds KJ, De Rooij DG, Rommerts FF, van den Hurk R, Wensing CJ. 1989. Stimulation of the proliferation and differentiation of Leydig cell precursors after the destruction of existing Leydig cells with ethane dimethyl sulphonate (EDS) can take place in the absence of LH. *J Androl* 10:472-477.

Teerds KJ, de Boer-Brouwer M, Dorrington JH, Balvers M, Ivell R. 1999. Identification of markers for precursor and leydig cell differentiation in the adult rat testis following ethane dimethyl sulphonate administration. *Biol Reprod* 60:1437-1445.

Ter-Mikaelian M, Sanes DH, Semple MN. 2007. Transformation of temporal properties between auditory midbrain and cortex in the awake Mongolian gerbil. *J Neurosci* 27:6091-6102.

Tran N, Servos G, Haider SG. 2006. Ultrastructure of cell contacts of fetal and adult Leydig cells in the rat: a systematic study from birth to senium. *Anat Embryol (Berl)* 211:273-282.

Weibel ER. 1963. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab Invest* 12:131-155.

Wiedemann T, Loell E, Mueller S, Stoeckelhuber M, Stolte M, Haas R, Rieder G. 2009. *Helicobacter pylori* cag-Pathogenicity island-dependent early immunological response triggers later precancerous gastric changes in Mongolian gerbils. *PLoS ONE* 4:e4754.

Wu X, Wan S, Lee MM. 2007. Key factors in the regulation of fetal and postnatal Leydig cell development. *J Cell Physiol* 213:429-433.

Zirkin BR, Ewing LL. 1987. Leydig cell differentiation during maturation of the rat testis: a stereological study of cell number and ultrastructure. *Anat Rec* 219:157-163.

Legenda das figuras

Figura 1 – Peso corporal (g) e testicular (mg) de gerbilos do nascimento até a senilidade.

Os valores representam a média $\pm$ desvio padrão. a, b, c, d, e, f, g = diferença estatística entre os grupos.

Figura 2 – Cortes histológicos em parafina corados com HE de testículo de gerbilos em diferentes fases do desenvolvimento pós-natal, mostrando os túbulos seminíferos (inset) ou detalhe do epitélio seminífero. A – 2; B – 3; C – 4; D – 6; E – 8; F – 12 semanas de idade.

Legenda: G – gonócito; m – mitose; ap – células apoptóticas; P - espermatócito em Paquíteno; St - espermátide esférica; St15- espermátide alongada na fase 15 de diferenciação. Aumento: 400x; inset – 200x.

Figura 3 – Cortes semifinos corados com azul de toluidina e imunolocalização das enzimas 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase (3 β -HSD) e 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase 1 (11 β -HSD1) no tecido intersticial de gerbilos com 2 (A, B, C), 4 (D, E), 5 (F, G), 12 (H, I) e 72 (J, K) semanas de idade. As células de Leydig fetais (CLF) são vistas formando aglomerados (C, D, F, J, K). A linhagem de células de Leydig adultas distingue-se quanto à morfologia e expressão de enzimas nas diferentes etapas do desenvolvimento pós-natal: PG - células de Leydig progenitoras (A, B); NF - células de Leydig adultas recém-formadas (D, E); I - células de Leydig imaturas (F, G, H); M - células de Leydig maduras (H, J). Ambas as células de Leydig imaturas e maduras são 11 β -HSD1-positivas

(G, I, K). As células peritubulares (md) são alongadas com formato fusiforme e encontra-se em íntimo contato com os túbulos seminíferos. Já as células mesenquimais (me) são vistas ao redor dos túbulos seminíferos ou dispersas pelo citoplasma. Ainda são mostrados macrófagos (ma), células endoteliais (en), pericitos (pc), componentes da membrana basal que circunda as CLF (cabeça de seta) e vasos sanguíneos (bv). Barras = 20 μ m.

Figura 4 – Porcentagem do número total por testículo de células mesenquimais, células de Leydig fetais e células de Leydig adultas (A) e dos demais tipos celulares intersticiais (B) de gerbilo em todas as idades estudadas.

Figura 5 – Níveis séricos de testosterona e estrógeno de gerbilos 2 a 72 semanas de idade. Os valores apresentados representam a média $\pm$ desvio padrão. a, b, c, d, e = diferença estatística entre os grupos.

Table 1 – Absolute volume (mm³) of interstitial components of postnatal gerbil testis (mean $\pm$ SEM).

	<i>Weeks after birth</i>																	
	0.15	1	2	3	4	5	6	7	8	12	18							
Seminiferous epithelium	1.14 $\pm 0.01^a$	2.69 $\pm 0.01^a$	9.23 $\pm 0.04^b$	15.00 $\pm 0.04^c$	17.39 $\pm 0.05^c$	31.63 $\pm 0.07^d$	160.57 $\pm 0.35^e$	193.60 $\pm 0.32^e$	198.50 $\pm 0.54^e$	349.71 $\pm 0.88^f$	502.79 $\pm 1.27^g$							
Interstitial	1.23 $\pm 0.03^a$	1.52 $\pm 0.04^a$	2.10 $\pm 0.09^b$	2.54 $\pm 0.14^b$	4.02 $\pm 0.21^c$	5.81 $\pm 0.31^c$	12.32 $\pm 1.47^d$	13.51 $\pm 2.56^d$	17.58 $\pm 2.31^d$	38.89 $\pm 3.64^e$	63.20 $\pm 4.7^f$							
Blood vessels	0.04 $\pm 0.01^a$	0.03 $\pm 0.01^a$	0.19 $\pm 0.02^b$	0.27 $\pm 0.01^b$	0.48 $\pm 0.2^c$	0.54 $\pm 0.01^c$	2.44 $\pm 0.01^d$	2.31 $\pm 0.09^d$	3.01 $\pm 0.09^d$	6.80 $\pm 0.57^e$	11.04 $\pm 0.73^f$							
Lymphatic spaces	0.78 $\pm 0.02^a$	0.91 $\pm 0.05^a$	1.16 $\pm 0.07^{ab}$	1.32 $\pm 0.06^b$	1.81 $\pm 0.12^b$	2.80 $\pm 0.21^c$	2.96 $\pm 0.53^c$	3.11 $\pm 0.48^c$	5.77 $\pm 0.57^d$	12.84 $\pm 0.73^e$	20.86 $\pm 0.79^f$							
FLC	0.04 $\pm 0.04^a$	0.038 $\pm 0.03^a$	0.039 $\pm 0.02^a$	0.04 $\pm 0.01^a$	0.019 $\pm 0.2^b$	0.015 $\pm 0.01^b$	0.006 $\pm 0.01^c$	0.003 $\pm 0.01^d$	0.002 $\pm 0.01^{de}$	0.001 $\pm 0.01^e$	0.001 $\pm 0.01^e$							
ALC	a	a	a	a	0.56 $\pm 0.01^a$	1.12 $\pm 0.09^b$	4.42 $\pm 0.19^c$	5.04 $\pm 0.41^{cd}$	5.31 $\pm 0.59^d$	12.43 $\pm 0.79^e$	20.20 $\pm 1.13^f$							
Mesenchymal cells	0.27 $\pm 0.01^a$	0.35 $\pm 0.02^a$	0.47 $\pm 0.02^b$	0.50 $\pm 0.03^b$	0.70 $\pm 0.03^c$	0.70 $\pm 0.04^c$	0.85 $\pm 0.03^d$	0.99 $\pm 0.04^e$	1.04 $\pm 0.05^e$	1.63 $\pm 0.05^f$	2.64 $\pm 0.05^g$							
Macrophages	0.006 $\pm 0.001^a$	0.02 $\pm 0.001^b$	0.03 $\pm 0.002^b$	0.05 $\pm 0.003^b$	0.06 $\pm 0.004^b$	0.12 $\pm 0.003^c$	0.66 $\pm 0.03^d$	0.74 $\pm 0.04^d$	0.78 $\pm 0.06^d$	1.92 $\pm 0.11^e$	3.12 $\pm 0.25^f$							
Myoid cells	0.07 $\pm 0.01^a$	0.14 $\pm 0.03^b$	0.18 $\pm 0.001^b$	0.28 $\pm 0.0^c$	0.31 $\pm 0.02^c$	0.35 $\pm 0.03^c$	0.51 $\pm 0.04^d$	0.54 $\pm 0.06^d$	0.85 $\pm 0.09^e$	1.32 $\pm 0.14^f$	2.14 $\pm 0.17^g$							
Endothelial cells	0.017 $\pm 0.001^a$	0.012 $\pm 0.001^a$	0.03 $\pm 0.002^b$	0.05 $\pm 0.002^b$	0.06 $\pm 0.001^b$	0.11 $\pm 0.002^c$	0.43 $\pm 0.03^d$	0.71 $\pm 0.04^e$	0.75 $\pm 0.05^e$	1.83 $\pm 0.08^f$	2.97 $\pm 0.16^g$							
Pericytes	0.009 $\pm 0.001^a$	0.012 $\pm 0.0^a$	0.012 $\pm 0.001^a$	0.024 $\pm 0.001^b$	0.024 $\pm 0.001^b$	0.044 $\pm 0.003^c$	0.058 $\pm 0.02^c$	0.061 $\pm 0.03^c$	0.084 $\pm 0.03^{cd}$	0.144 $\pm 0.04^d$	0.233 $\pm 0.06^e$							

a, b, c, d, e, f, g = values significantly different ($P \leq 0.05$); a = absent.

Table 2 – Total number (10^6 cell/testis) of interstitial cell types (mean $\pm$ SEM) and ratio macrophages/ALC in the postnatal gerbil testis.

Cell type	<i>Weeks after birth</i>										
	0,15	1	2	3	4	5	6	7	8	12	72
FLC	0.017 $\pm 0.004^a$	0.015 $\pm 0.003^a$	0.016 $\pm 0.003^a$	0.017 $\pm 0.004^a$	0.017 $\pm 0.003^a$	0.015 $\pm 0.002^a$	0.014 $\pm 0.003^a$	0.015 $\pm 0.002^a$	0.014 $\pm 0.001^a$	0.018 $\pm 0.005^a$	0.017 $\pm 0.004^a$
ALC	a	a	a	a	0.58 $\pm 0.11^a$	0.98 $\pm 0.19^b$	1.94 $\pm 0.6^c$	2.64 $\pm 0.57^d$	2.81 $\pm 0.82^d$	5.19 $\pm 0.35^e$	7.48 $\pm 0.98^f$
Mesenchymal cells	0.19 $\pm 0.02^a$	0.28 $\pm 0.03^a$	0.39 $\pm 0.05^b$	0.46 $\pm 0.09^{bc}$	0.52 $\pm 0.11^c$	0.88 $\pm 0.17^d$	1.39 $\pm 0.44^e$	1.82 $\pm 0.5^{ef}$	1.93 $\pm 0.58^f$	3.58 $\pm 0.31^g$	5.14 $\pm 0.82^g$
Macrophages	0.014 $\pm 0.002^a$	0.026 $\pm 0.002^b$	0.051 $\pm 0.002^c$	0.061 $\pm 0.003^c$	0.077 $\pm 0.004^{cd}$	0.13 $\pm 0.02^d$	0.55 $\pm 0.009^e$	0.66 $\pm 0.02^e$	0.70 $\pm 0.03^e$	1.47 $\pm 0.06^f$	3.12 $\pm 0.08^g$
Myoid cells	0.18 $\pm 0.03^a$	0.33 $\pm 0.06^b$	0.50 $\pm 0.07^c$	0.53 $\pm 0.09^c$	0.55 $\pm 0.09^c$	0.74 $\pm 0.08^d$	0.83 $\pm 0.07^e$	0.83 $\pm 0.09^e$	1.05 $\pm 0.11^f$	2.14 $\pm 0.23^g$	2.8 $\pm 0.38^g$
Endothelial cells	0.055 $\pm 0.006^a$	0.070 $\pm 0.01^a$	0.092 $\pm 0.009^b$	0.17 $\pm 0.05^c$	0.21 $\pm 0.07^{cd}$	0.29 $\pm 0.05^d$	0.83 $\pm 0.08^e$	0.83 $\pm 0.09^e$	0.88 $\pm 0.1^e$	2.25 $\pm 0.3^f$	3.27 $\pm 0.5^g$
Pericytes	0.044 $\pm 0.003^a$	0.066 $\pm 0.008^a$	0.082 $\pm 0.02^b$	0.14 $\pm 0.03^c$	0.17 $\pm 0.03^c$	0.20 $\pm 0.02^{cd}$	0.28 $\pm 0.03^d$	0.33 $\pm 0.05^d$	0.53 $\pm 0.04^e$	0.63 $\pm 0.07^e$	0.93 $\pm 0.1^f$
Macrophages/ALC					1:8	1:8	1:4	1:4	1:4	1:4	1:2

^{a, b, c, d, e, f, g} = values significantly different ($P \leq 0.05$); a = absent.

Figura 1

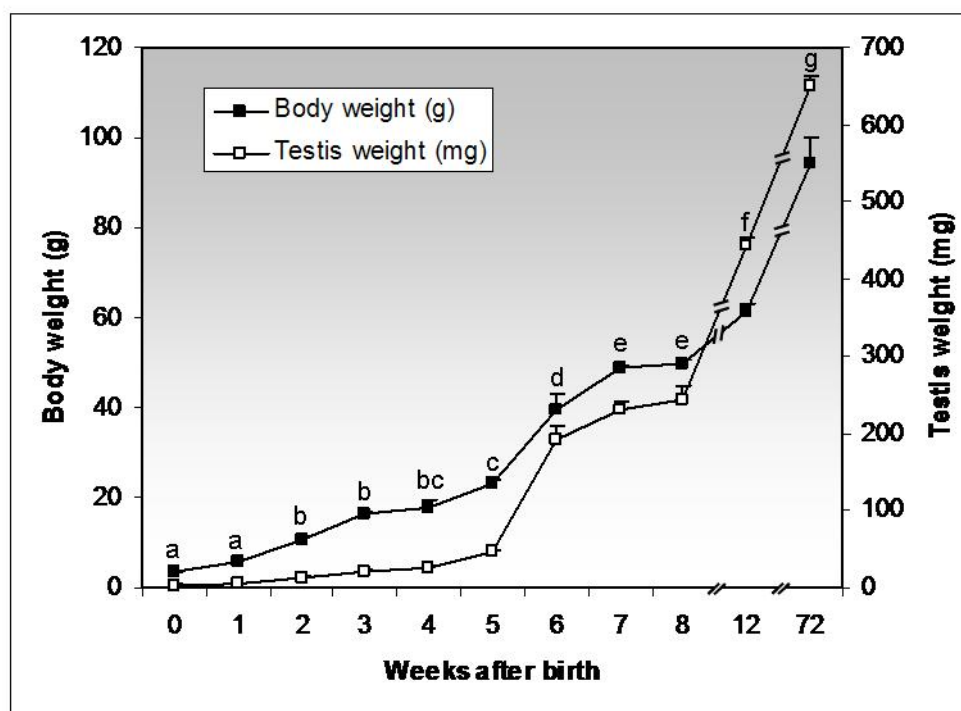


Figura 2

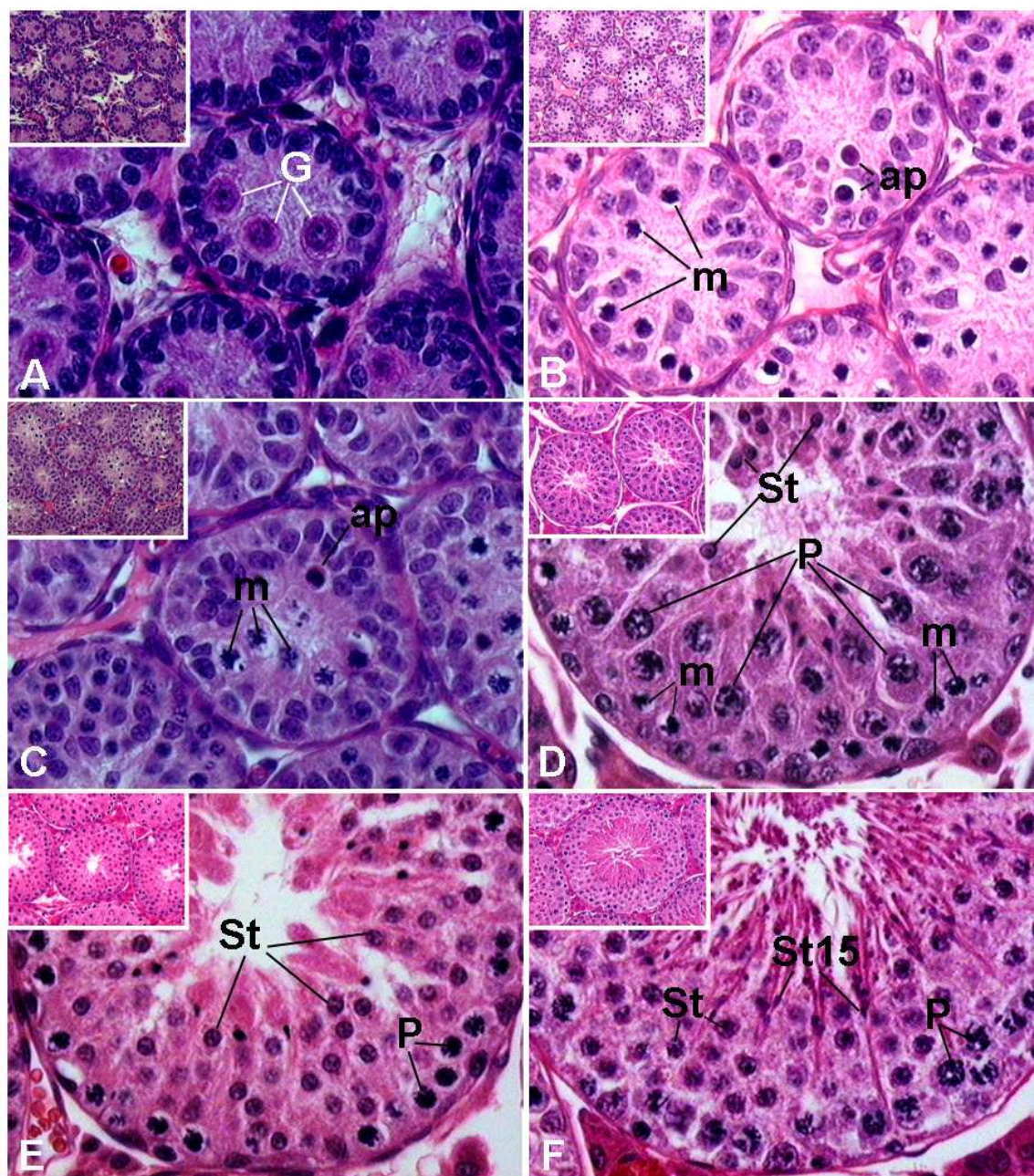


Figura 3

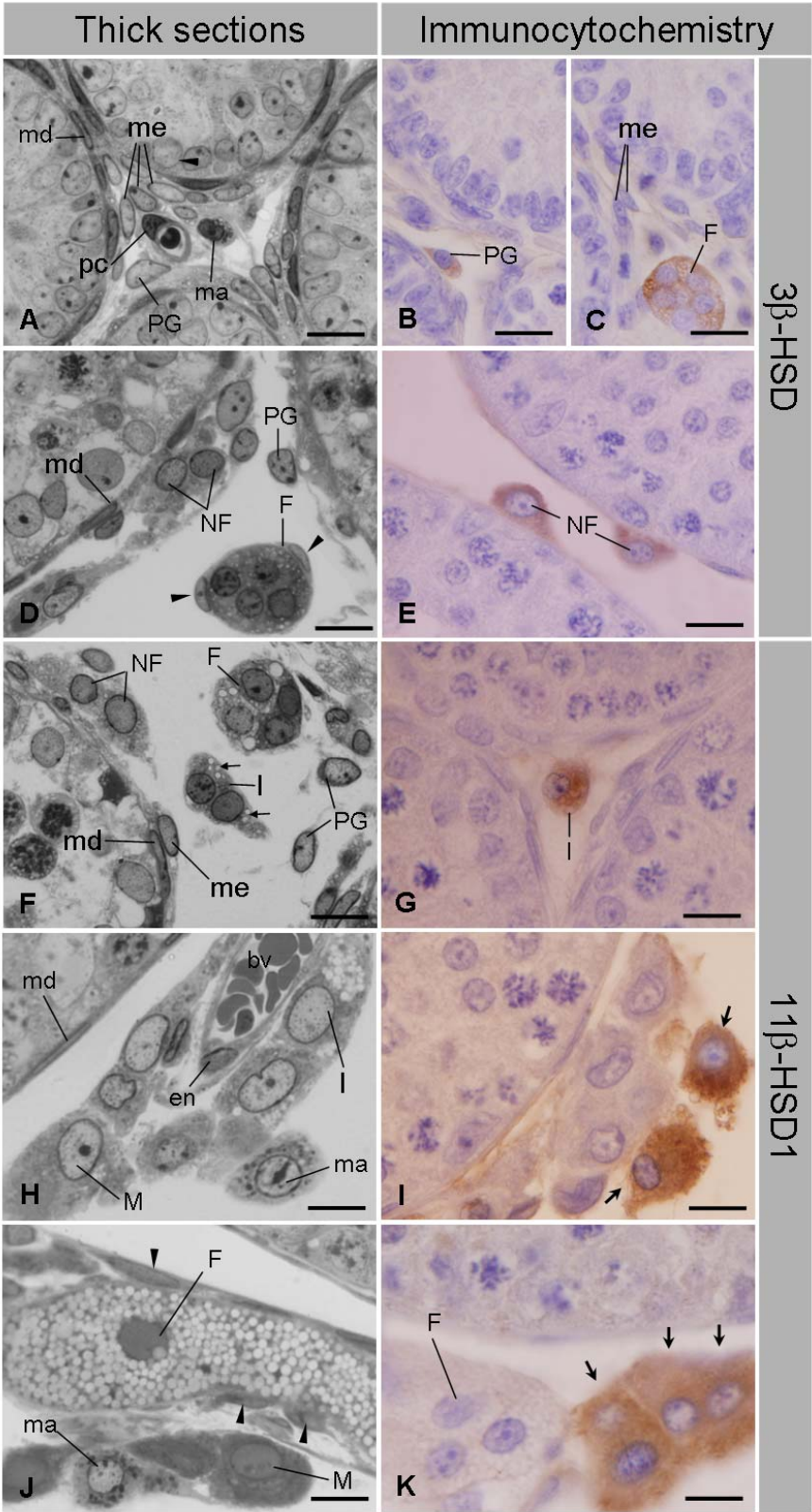


Figura 4

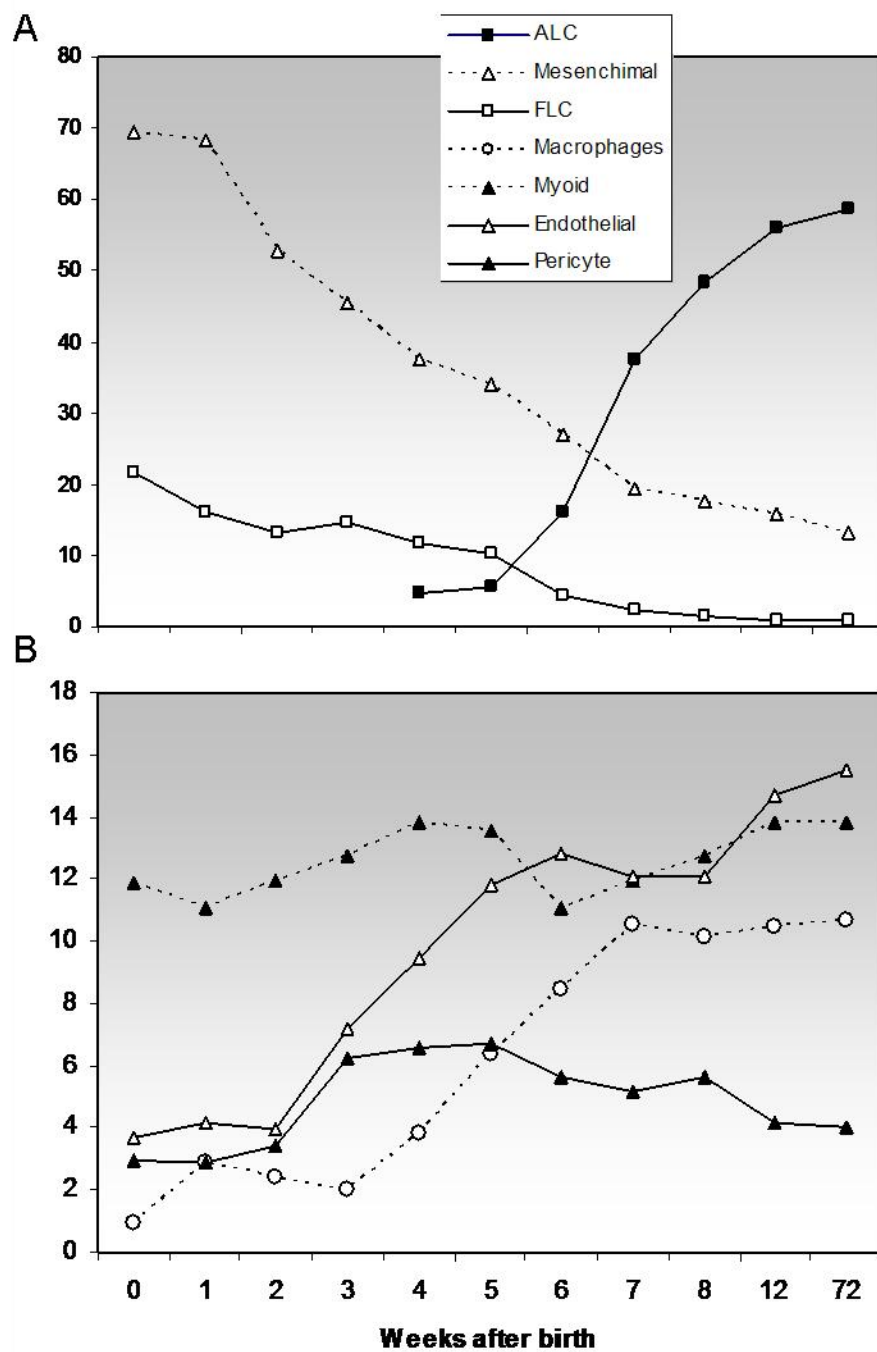
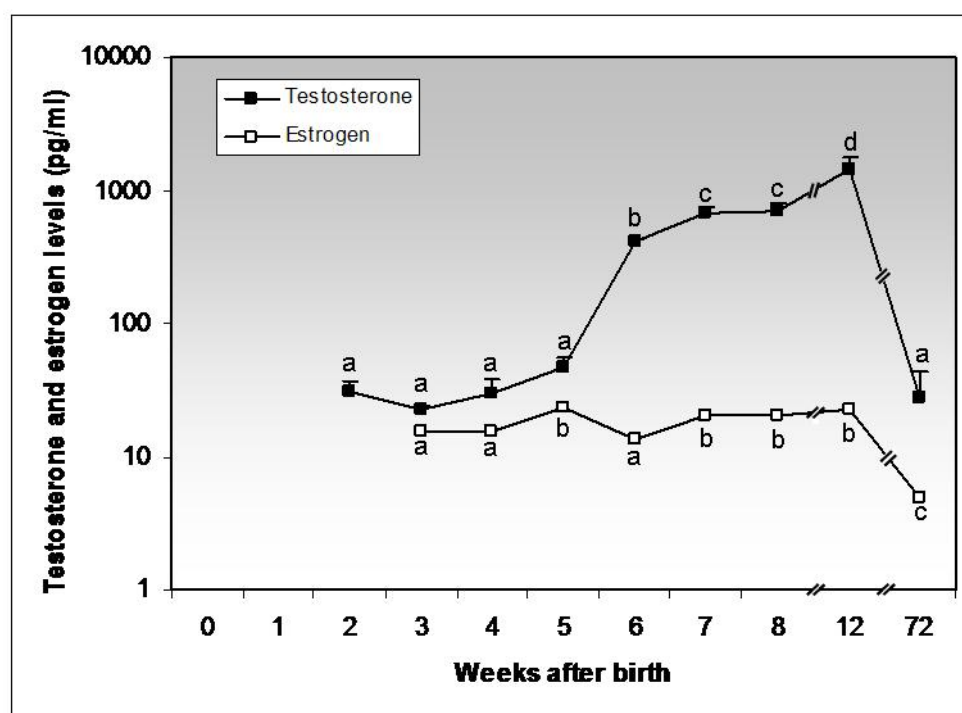


Figura 5



1. A diferenciação neonatal dos gonócitos, no gerbilo da Mongólia, ocorre de maneira assíncrona entre os cordões seminíferos, se estende por um período de tempo maior em relação a outros roedores e está associada à perda de sensibilidade ao andrógeno pelas células germinativas. A migração dos gonócitos para a membrana basal é observada logo no primeiro dia de idade, continua até a segunda semana pós-natal e esse processo é seguido pela rápida diferenciação em proespermatogonias. A existência de gonócitos por período de tempo maior em comparação com outros roedores aponta o gerbilo como um modelo útil em investigações sobre a biologia dessas células pluripotentes e sua transição para espermatogônias, as quais são ainda pouco compreendidas.

2. O processo de diferenciação das células de Leydig adultas, no gerbilo, segue em linhas gerais o estabelecido para outros roedores, mas apresentam algumas particularidades. Tal processo envolve a formação de estágios progressivos de maturação, correspondentes às progenitoras, recém formadas, imaturas e maduras, que surgem respectivamente com 2, 4, 5 e 6 semanas de idade. Em sua maioria, esses estágios são fenotípica e imunocitoquimicamente semelhantes aos de outros roedores. As células de Leydig maduras, contudo, apresentam morfologia singular, com um canalículo citoplasmático perinuclear e exibem uma heterogeneidade funcional, conforme evidenciado pela expressão do marcador da maturidade funcional 11 β -HSD1 e de receptores de andrógeno.

3. As transformações do tecido intersticial, em termos do volume absoluto e número total de células e secreção de testosterona, são similares àqueles encontrados para outros roedores. No entanto, o surgimento das CLA e o aumento no número total dessas células ocorrem mais tardiamente em relação a outros roedores e continuam acontecendo até a senilidade. O número de CLF persiste nos animais senis. A síntese de esteróides nos animais senis é comprometida pelo prejuízo funcional das CLA. A análise dos períodos do desenvolvimento pós-natal do testículo indica que a maturidade testicular no gerbilo ocorre por volta da décima segunda semana de idade.

4. Esse estudo fornece um panorama abrangente do desenvolvimento testicular do gerbilo da Mongólia, ampliando o conhecimento sobre a biologia reprodutiva dessa espécie e proporcionando os fundamentos para o desenvolvimento de estudos experimentais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abney TO. 1999. The potential roles of estrogens in regulating Leydig cell development and function: a review. *Steroids* 64:610-617.
- Anand RJ, Paust HJ, Altenpohl K, Mukhopadhyay AK. 2003. Regulation of vascular endothelial growth factor production by Leydig cells in vitro: the role of protein kinase A and mitogen-activated protein kinase cascade. *Biol Reprod* 68:1663-1673.
- Ariyaratne HB, Mendis-Handagama SM. 2000. Changes in the testis interstitium of Sprague Dawley rats from birth to sexual maturity. *Biol Reprod* 62:680-690.
- Ariyaratne HB, Mendis-Handagama SLMC, Buchanan Hales D, Ian Mason J. 2000. Studies on the onset of Leydig precursor cell differentiation in the prepubertal rat testis. *Biol Reprod* 63:165-171.
- Aubry F, Satie AP, Rioux-Leclercq N, Rajpert-De Meyts E, Spagnoli GC, Chomez P, De Backer O, Jegou B, Samson M. 2001. MAGE-A4, a germ cell specific marker, is expressed differentially in testicular tumors. *Cancer* 92:2778-2785.
- Baillie AH. 1964. Further Observations on the Growth and Histochemistry of Leydig Tissue in the Postnatal Prepubertal Mouse Testis. *J Anat* 98:403-418.
- Baker PJ, Johnston H, Abel M, Charlton HM, O'Shaughnessy PJ. 2003. Differentiation of adult-type Leydig cells occurs in gonadotrophin-deficient mice. *Reprod Biol Endocrinol* 1:4.
- Basciani S, De Luca G, Dolci S, Brama M, Arizzi M, Mariani S, Rosano G, Spera G, Gnassi L. 2008. Platelet-derived growth factor receptor beta-subtype regulates proliferation and migration of gonocytes. *Endocrinology* 149:6226-6235.
- Benton L, Shan LX, Hardy MP. 1995. Differentiation of adult Leydig cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 53:61-68.
- Beumer TL, Roepers-Gajadien HL, Gademan IS, Kal HB, de Rooij DG. 2000a. Involvement of the D-type cyclins in germ cell proliferation and differentiation in the mouse. *Biol Reprod* 63:1893-1898.
- Beumer TL, Roepers-Gajadien HL, Gademan IS, Lock TM, Kal HB, De Rooij DG. 2000b. Apoptosis regulation in the testis: involvement of Bcl-2 family members. *Mol Reprod Dev* 56:353-359.
- Bornstein SR, Rutkowski H, Vrezas I. 2004. Cytokines and steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 215:135-141.

Bortolussi M, Zanchetta R, Belvedere P, Colombo L. 1990. Sertoli and Leydig cell numbers and gonadotropin receptors in rat testis from birth to puberty. *Cell Tissue Res* 260:185-191.

Bouillet P, Oulad-Abdelghani M, Vicaire S, Garnier JM, Schuhbaur B, Dolle P, Chambon P. 1995. Efficient cloning of cDNAs of retinoic acid-responsive genes in P19 embryonal carcinoma cells and characterization of a novel mouse gene, *Stral* (mouse LERK-2/*Eplg2*). *Dev Biol* 170:420-433.

Boulogne B, Olaso R, Levacher C, Durand P, Habert R. 1999. Apoptosis and mitosis in gonocytes of the rat testis during foetal and neonatal development. *Int J Androl* 22:356-365.

Boulogne B, Habert R, Levacher C. 2003. Regulation of the proliferation of cocultured gonocytes and Sertoli cells by retinoids, triiodothyronine, and intracellular signaling factors: differences between fetal and neonatal cells. *Mol Reprod Dev* 65:194-203.

Bowles J, Knight D, Smith C, Wilhelm D, Richman J, Mamiya S, Yashiro K, Chawengsaksophak K, Wilson MJ, Rossant J, Hamada H, Koopman P. 2006. Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science* 312:596-600.

Bremner WJ, Millar MR, Sharpe RM, Saunders PT. 1994. Immunohistochemical localization of androgen receptors in the rat testis: evidence for stage-dependent expression and regulation by androgens. *Endocrinology* 135:1227-1234.

Brennan J, Capel B. 2004. One tissue, two fates: molecular genetic events that underlie testis versus ovary development. *Nat Rev Genet* 5:509-521.

Brereton PS, van Driel RR, Suhaimi F, Koyama K, Dilley R, Krozowski Z. 2001. Light and electron microscopy localization of the 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type I enzyme in the rat. *Endocrinology* 142:1644-1651.

Buzek SW, Sanborn BM. 1988. Increase in testicular androgen receptor during sexual maturation in the rat. *Biol Reprod* 39:39-49.

Byskov AG. 1986. Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Physiol Rev* 66:71-117.

Cao D, Li M, Xue R, Zheng W, Liu Z, Wang X. 2005. Chronic administration of ethyl docosahexaenoate decreases mortality and cerebral edema in ischemic gerbils. *Life Sci* 78:74-81.

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

Castrillon DH, Quase BJ, Wang TY, Quigley CA, Crum CP. 2000. The human VASA gene specifically expressed in the germ cell lineage. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:9585-9590.

Chaboissier MC, Kobayashi A, Vidal VIP, Lutzkendorf S, van de Kant HJG, Wegner M, de Rooij DG, Behringer RR, Schedl A. 2004. Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse. *Development* 131:1891–1901.

Charlesworth B. 1991. The evolution of sex chromosomes. *Science* 251(4997):1030-3.

Chassot AA, Ranc F, Gregoire EP, Roepers-Gajadien HL, Taketo MM, Camerino G, de Rooij DG, Schedl A, Chaboissier MC. 2008. Activation of b-catenin signaling by Rspo1 controls differentiation of the mammalian ovary. *Hum Mol Genet* 17:1264–1277.

Chatelain PG, Sanchez P, Saez JM. 1991. Growth hormone and insulin-like growth factor I treatment increase testicular luteinizing hormone receptors and steroidogenic responsiveness of growth hormone deficient dwarf mice. *Endocrinology* 128:1857-1862.

Chiarini-Garcia H, Meistrich ML. 2008. High-resolution light microscopic characterization of spermatogonia. *Methods Mol Biol* 450:495-107.

Clermont Y, Perey B. 1957. Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules in immature rats. *Am J Anat* 100:241-267.

Colvin JS, Green RP, Schmahl J, Capel B, Ornitz DM. 2001. Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9. *Cell* 104:875–889.

Cooke HJ. 1999. Y chromosome and male infertility. *Rev Reprod* 4:5-10.

Courot M. 1970. Spermatogenesis. In: Johnson AD, Gomes WR, Vandemark NL (eds), *The testis*. New York: Academic Press. v. 1, p 339–431.

Culty M. 2009. Gonocytes, the forgotten cells of the germ cell lineage. *Birth Defects Res C Embryo Today* 87:1-26.

Custodio AM, Santos FC, Campos SG, Vilamaior PS, Goes RM, Taboga SR. 2008. Aging effects on the mongolian gerbil female prostate (Skene's paraurethral glands): structural, ultrastructural, quantitative, and hormonal evaluations. *Anat Rec (Hoboken)* 291:463-474.

Davison SL, Bell R. 2006. Androgen physiology. *Semin Reprod Med* 24:71-77.

De Miguel MP, De Boer-Brouwer M, Paniagua R, van den Hurk R, De Rooij DG, Van Dissel-Emiliani FM. 1996. Leukemia inhibitory factor and ciliary neurotropic factor promote the survival of Sertoli cells and gonocytes in coculture system. *Endocrinology* 137:1885-1893.

De Plaen E, De Backer O, Arnaud D, Bonjean B, Chomez P, Martelange V, Avner P, Baldacci P, Babinet C, Hwang SY, Knowles B, Boon T. 1999. A new family of mouse genes homologous to the human MAGE genes. *Genomics* 55:176-184.

de Rooij DG, Okabe M, Nishimune Y. 1999. Arrest of spermatogonial differentiation in jsd/jsd, Sl17H/Sl17H, and cryptorchid mice. *Biol Reprod* 61:842-847.

de Rooij DG, Russell LD. 2000. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl* 21:776-798.

de Rooij DG. 2001. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction* 121:347-354.

dos Santos FC, Carvalho HF, Goes RM, Taboga SR. 2003. Structure, histochemistry, and ultrastructure of the epithelium and stroma in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate. *Tissue Cell* 35:447-457.

Duester G. 2008. Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. *Cell* 134:921-931.

Eckstein B, Borut A, Cohen S. 1987. Metabolic pathways for androstanediol formation in immature rat testis microsomes. *Biochim Biophys Acta* 924:1-6.

Ergun S, Kilic N, Fiedler W, Mukhopadhyay AK. 1997. Vascular endothelial growth factor and its receptors in normal human testicular tissue. *Mol Cell Endocrinol* 131:9-20.

Fecteau KA, Mrkonjich L, Mason JJ, Mendis-Handagama SM. 2006. Detection of platelet-derived growth factor- α (PDGF- α) protein in cells of Leydig lineage in the postnatal rat testis. *Histol Histopathol* 21:1295-1302.

Fleming A, Vilain E. 2004. The endless quest for sex determination genes. *Clin Genet* 67:15-25.

Fochi RA, Perez AP, Bianchi CV, Rochel SS, Goes RM, Vilamaior PS, Taboga SR, Santos FC. 2008. Hormonal oscillations during the estrous cycle influence the morphophysiology of the gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate (skene paraurethral glands). *Biol Reprod* 79:1084-1091.

Franke FE, Pauls K, Rey R, Marks A, Bergmann M, Steger K. 2004. Differentiation markers of Sertoli cells and germ cells in fetal and early postnatal human testis. *Anat Embryol (Berl)* 209:169-177.

Fukuda T, Hedinger C, Groscurth P. 1975. Ultrastructure of developing germ cells in the fetal human testis. *Cell Tissue Res* 161:55-70.

Gaskell TL, Esnal A, Robinson LL, Anderson RA, Saunders PT. 2004. Immunohistochemical profiling of germ cells within the human fetal testis: identification of three subpopulations. *Biol Reprod* 71:2012-2021.

Gaytan F, Bellido C, Morales C, Garcia M, van Rooijen N, Aguilar E. 1996. In vivo manipulation (depletion versus activation) of testicular macrophages: central and local effects. *J Endocrinol* 150:57-65.

Gaytan F, Bellido C, Aguilar R, Morales C, van Rooijen N, Aguilar E. 1997. Role of the testis in the response of the pituitary-testicular axis to nitric oxide-related agents. *Eur J Endocrinol* 137:301-308.

Ge RS, Gao HB, Nacharaju VL, Gunsalus GL, Hardy MP. 1997a. Identification of a kinetically distinct activity of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in rat Leydig cells. *Endocrinology* 138:2435-2442.

Ge RS, Hardy DO, Catterall JF, Hardy MP. 1997b. Developmental changes in glucocorticoid receptor and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase oxidative and reductive activities in rat Leydig cells. *Endocrinology* 138:5089-5095.

Ge RS, Hardy MP. 2000. Initial predominance of the oxidative activity of type I 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase in primary rat Leydig cells and transfected cell lines. *J Androl* 21:303-310.

Georget V, Lobaccaro JM, Terouanne B, Mangeat P, Nicolas JC, Sultan C. 1997. Trafficking of the androgen receptor in living cells with fused green fluorescent protein-androgen receptor. *Mol Cell Endocrinol* 129:17-26.

Ghosh S, Sinha-Hikim AP, Russell LD. 1991. Further observations of stage-specific effects seen after short-term hypophysectomy in the rat. *Tissue Cell* 23:613-630.

Gregory CW, He B, Johnson RT, Ford OH, Mohler JL, French FS, Wilson EM. 2001. A mechanism for androgen receptor-mediated prostate cancer recurrence after androgen deprivation therapy. *Cancer Res* 61:4315-4319.

Góes RM, Zanetoni C, Tomiosso TC, Ribeiro DL, Taboga SR. 2007. Surgical and chemical castration induce differential histological response in prostate lobes of Mongolian gerbil. *Micron* 38:231-236.

Gondos B, Paup DC, Ross J, Gorski RA. 1974. Ultrastructural differentiation of Leydig cells in the fetal and postnatal hamster testis. *Anat Rec* 178:551-565.

Gray LE Jr, Wilson VS, Stoker T, Lambright C, Furr J, Noriega N, Howdeshell K, Ankley GT, Guillelte L. 2006. Adverse effects of environmental antiandrogens and androgens on reproductive development in mammals. *Int J Androl* 29(1):96-108.

Gu Y, Runyan C, Shoemaker A, Surani A, Wylie C. 2009. Steel factor controls primordial germ cell survival and motility from the time of their specification in the allantois, and provides a continuous niche throughout their migration. *Development* 136:1295-1303.

Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Munsterberg A, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. 1990. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 346:245-250.

Habert R, Lejeune H, Saez JM. 2001. Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol* 179:47-74.

Haider SG, Passia D, Overmeyer G. 1986. Studies on the fetal and postnatal development of rat Leydig cells employing 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity. *Acta Histochem Suppl* 32:197-202.

Haider SG, Passia D, Rommert FF. 1990. Histochemical demonstration of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase as a marker for Leydig cell maturation in rat. *Acta Histochem Suppl* 38:203-207.

Haider SG, Laue D, Schwochau G, Hilscher B. 1995. Morphological studies on the origin of adult-type Leydig cells in rat testis. *Ital J Anat Embryol* 100 Suppl 1:535-541.

Haider SG, Servos G. 1998. Ultracytochemistry of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase in Leydig cell precursors and vascular endothelial cells of the postnatal rat testis. *Anat Embryol (Berl)* 198:101-110.

Haider SG. 2004. Cell biology of Leydig cells in the testis. *Int Rev Cytol* 233:181-241.

Hales DB. 2002. Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. *J Reprod Immunol* 57:3-18.

Hardy MP, Zirkin BR, Ewing LL. 1989. Kinetic studies on the development of the adult population of Leydig cells in testes of the pubertal rat. *Endocrinology* 124:762-770.

Hardy MP, Kelce WR, Klinefelter GR, Ewing LL. 1990. Differentiation of Leydig cell precursors in vitro: a role for androgen. *Endocrinology* 127:488-490.

Hawkins JR, Taylor A, Berta P, Levilliers J, Van der Auwera B, Goodfellow PN. 1992. Mutational analysis of SRY: nonsense and missense mutations in XY sex reversal. *Hum Genet* 88:471-474.

Hilscher B, Hilscher W, Bülthoff-Ohnolz B, Krämer U, Birke A, Pelzer H, Gauss G. 1974. Kinetics of gametogenesis. I Comparative histological and autoradiographic studies of

oocytes and transitional prospermatogonia during oogenesis and prespermatogenesis. *Cell Tissue Res* 154:443-470.

Hilscher W. 1991. The genetic control and germ cell kinetics of the female and male germ line in mammals including man. *Hum Reprod* 6:1416-1425.

Huhtaniemi IT, Rajaniemi HJ, Catt KJ. 1986. Kinetic and autoradiographic studies on binding of hCG to the testicular LH receptors of neonatal rats. *J Reprod Fertil* 78:73-82.

Huhtaniemi I, Pelliniemi LJ. 1992. Fetal Leydig cells: cellular origin, morphology, life span, and special functional features. *Proc Soc Exp Biol Med* 201:125-140.

Huhtaniemi I, Zhang FP, Kero J, Hamalainen T, Poutanen M. 2002. Transgenic and knockout mouse models for the study of luteinizing hormone and luteinizing hormone receptor function. *Mol Cell Endocrinol* 187:49-56.

Hutson JC. 1994. Testicular macrophages. *Int Rev Cytol* 149:99-143.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26:239-257.

Kerr JB, Robertson DM, de Kretser DM. 1985. Morphological and functional characterization of interstitial cells from mouse testes fractionated on Percoll density gradients. *Endocrinology* 116:1030-1043.

Kerr JB, Bartlett JM, Donachie K, Sharpe RM. 1987. Origin of regenerating Leydig cells in the testis of the adult rat. An ultrastructural, morphometric and hormonal assay study. *Cell Tissue Res* 249:367-377.

Kerr JB, Knell CM. 1988. The fate of fetal Leydig cells during the development of the fetal and postnatal rat testis. *Development* 103:535-544.

Khan S, Teerds K, Dorrington J. 1992. Growth factor requirements for DNA synthesis by Leydig cells from the immature rat. *Biol Reprod* 46:335-341.

Kim Y, Kobayashi A, Sekido R, DiNapoli L, Brennan J, Chaboissier MC, Poulat F, Behringer RR, Lovell-Badge R, Capel B. 2006. Fgf9 and Wnt4 act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. *PLoS Biol* 4:e187.

Kimura N, Mizokami A, Oonuma T, Sasano H, Nagura H. 1993. Immunocytochemical localization of androgen receptor with polyclonal antibody in paraffin-embedded human tissues. *J Histochem Cytochem* 41:671-678.

Kocer A, Reichmann J, Best D, Adams IR. 2009. Germ cell sex determination in mammals. *Mol Hum Reprod* 15(4):205-13.

Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. 1991. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature* 351(6322):117-21.

Kramer AW Jr. 1964. Body and organ weights and linear measurements of the adult Mongolian gerbil. *Anat Rec* 150:343-348.

Lawson KA, Dunn NR, Roelen BA, Zeinstra LM, Davis AM, Wright CV, Korving JP, Hogan BL. 1999. Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev* 13:424-436.

Le Roy C, Lejeune H, Chuzel F, Saez JM, Langlois D. 1999. Autocrine regulation of Leydig cell differentiated functions by insulin-like growth factor I and transforming growth factor beta. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69:379-384.

Leckie CM, Welberg LA, Seckl JR. 1998. 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase is a predominant reductase in intact rat Leydig cells. *J Endocrinol* 159:233-238.

Linde R, Doelle GC, Alexander N, Kirchner F, Vale W, Rivier J, Rabin D. 1981. Reversible inhibition of testicular steroidogenesis and spermatogenesis by a potent gonadotropin-releasing hormone agonist in normal men: an approach toward the development of a male contraceptive. *N Engl J Med* 305(12):663-7.

Livera G, Rouiller-Fabre V, Durand P, Habert R. 2000. Multiple effects of retinoids on the development of Sertoli, germ, and Leydig cells of fetal and neonatal rat testis in culture. *Biol Reprod* 62:1303-1314.

Lording DW, De Kretser DM. 1972. Comparative ultrastructural and histochemical studies of the interstitial cells of the rat testis during fetal and postnatal development. *J Reprod Fertil* 29:261-269.

Lovell-Badge R, Robertson E. 1990. XY female mice resulting from a heritable mutation in the primary testis-determining gene, Tdy. *Development* 109:635-646.

Luo L, Chen H, Zirkin BR. 2005. Temporal relationships among testosterone production, steroidogenic acute regulatory protein (StAR), and P450 side-chain cleavage enzyme (P450scc) during Leydig cell aging. *J Androl* 26:25-31.

Lyet L, Louis F, Forest MG, Josso N, Behringer RR, Vigier B. 1995. Ontogeny of reproductive abnormalities induced by deregulation of anti-mullerian hormone expression in transgenic mice. *Biol Reprod* 52:444-454.

Magre S, Jost A. 1980. The initial phases of testicular organogenesis in the rat. An electron microscopy study. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* 69:297-318.

Majdic G, Saunders PT, Teerds KJ. 1998. Immunoexpression of the steroidogenic enzymes 3-beta hydroxysteroid dehydrogenase and 17 alpha-hydroxylase, C17,20 lyase and the receptor for luteinizing hormone (LH) in the fetal rat testis suggests that the onset of Leydig cell steroid production is independent of LH action. *Biol Reprod* 58:520-525.

Mancini RE, Vilar O, Lavieri JC, Andrada JA, Heinrich JJ. 1963. Development of Leydig cells in the normal human testis. A cytological, cytochemical and quantitative study. *Am J Anat* 112:203-214.

Matsumiya K, Meistrich ML, Shetty G, Dohmae K, Tohda A, Okuyama A, Nishimune Y. 1999. Stimulation of spermatogonial differentiation in juvenile spermatogonial depletion (jsd) mutant mice by gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. *Endocrinology* 140:4912-4915.

Matzuk MM, Lamb DJ. 2008. The biology of infertility: research advances and clinical challenges. *Nat Med* 14:1197-1213.

McGuinness MP, Orth JM. 1992a. Gonocytes of male rats resume migratory activity postnatally. *Eur J Cell Biol* 59:196-210.

McGuinness MP, Orth JM. 1992b. Reinitiation of gonocyte mitosis and movement of gonocytes to the basement membrane in testes of newborn rats in vivo and in vitro. *Anat Rec* 233:527-537.

Mendis-Handagama SM, Risbridger GP, de Kretser DM. 1987. Morphometric analysis of the components of the neonatal and the adult rat testis interstitium. *Int J Androl* 10:525-534.

Mendis-Handagama SM, Zirkin BR, Ewing LL. 1988. Comparison of components of the testis interstitium with testosterone secretion in hamster, rat, and guinea pig testes perfused in vitro. *Am J Anat* 181:12-22.

Mendis-Handagama SM, Ewing LL. 1990. Sources of error in the estimation of Leydig cell numbers in control and atrophied mammalian testes. *J Microsc* 159:73-82.

Mendis-Handagama SM, De Kretser DM. 1992. Heterogeneity of adult mouse Leydig cells with different buoyant densities. *J Androl* 13:274-282.

Mendis-Handagama SM, Gelber SJ. 1995. Signs of aging are apparent in the testis interstitium of Sprague Dawley rats at 6 months of age. *Tissue Cell* 27:689-699.

Mendis-Handagama SM, Ariyaratne HB, Teunissen van Manen KR, Haupt RL. 1998. Differentiation of adult Leydig cells in the neonatal rat testis is arrested by hypothyroidism. *Biol Reprod* 59:351-357.

Mendis-Handagama SM, Ariyaratne HB. 2001. Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biol Reprod* 65:660-671.

Meng X, Lindahl M, Hyvonen ME, Parvinen M, de Rooij DG, Hess MW, Raatikainen-Ahokas A, Sainio K, Rauvala H, Lakso M, Pichel JG, Westphal H, Saarma M, Sariola H. 2000. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science* 287:1489-1493.

Merlet J, Racine C, Moreau E, Moreno SG, Habert R. 2007. Male fetal germ cells are targets for androgens that physiologically inhibit their proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(9):3615-20.

Miething A. 1992. Germ-cell death during spermatogenesis in the testis of the golden hamster. *Cell Tissue Res* 267:583-590.

Miller WL, Strauss JF, 3rd. 1999. Molecular pathology and mechanism of action of the steroidogenic acute regulatory protein, StAR. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69:131-141.

Misro MM, Ganguly A, Das RP. 1993. Is testosterone essential for maintenance of normal morphology in immature rat Leydig cells? *Int J Androl* 16:221-226.

Molenaar R, de Rooij DG, Rommerts FF, van der Molen HJ. 1986. Repopulation of Leydig cells in mature rats after selective destruction of the existent Leydig cells with ethylene dimethane sulfonate is dependent on luteinizing hormone and not follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 118:2546-2554.

Monder C, Miroff Y, Marandici A, Hardy MP. 1994a. 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase alleviates glucocorticoid-mediated inhibition of steroidogenesis in rat Leydig cells. *Endocrinology* 134:1199-1204.

Monder C, Sakai RR, Miroff Y, Blanchard DC, Blanchard RJ. 1994b. Reciprocal changes in plasma corticosterone and testosterone in stressed male rats maintained in a visible burrow system: evidence for a mediating role of testicular 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology* 134:1193-1198.

Moore KL, Persaud TVN. 2008. *Embriologia Clínica*. Rio de Janeiro: Elsevier.

Mori H, Christensen AK. 1980. Morphometric analysis of Leydig cells in the normal rat testis. *J Cell Biol* 84:340-354.

Nagano R, Tabata S, Yoshihiko N, Ohsako S, Kurohmaru M, Hayashi Y. 2000. Reproliferation and relocation of mouse male germ cells (gonocytes) during spermatogenesis. *Anat Rec* 258:210-220.

Ninomiya H, Nakamura T. 1987. Postnatal development of the testis in the Mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. Jikken Dobutsu 36:65-72.

O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER. 2001. Estrogen and spermatogenesis. Endocr Rev 22:289-318.

O'Shaughnessy PJ, Bennett MK, Scott IS, Charlton HM. 1992. Effects of FSH on Leydig cell morphology and function in the hypogonadal mouse. J Endocrinol 135:517-525.

O'Shaughnessy PJ, Johnston H, Willerton L, Baker PJ. 2002. Failure of normal adult Leydig cell development in androgen-receptor-deficient mice. J Cell Sci 115:3491-3496.

O'Shaughnessy PJ, Baker PJ, Johnston H. 2006. The foetal Leydig cell-- differentiation, function and regulation. Int J Androl 29:90-95; discussion 105-108.

Ohbo K, Yoshida S, Ohmura M, Ohneda O, Ogawa T, Tsuchiya H, Kuwana T, Kehler J, Abe K, Schöler HR, Suda T. 2003. Identification and characterization of stem cells in prepubertal spermatogenesis in mice. Dev Biol 258:209-225.

Ohmura M, Naka K, Hoshii T, Muraguchi T, Shugo H, Tamase A, Uema N, Ooshio T, Arai F, Takubo K, Nagamatsu G, Hamaguchi I, Takagi M, Ishihara M, Sakurada K, Miyaji H, Suda T, Hirao A. 2008. Identification of stem cells during prepubertal spermatogenesis via monitoring of nucleostemin promoter activity. Stem Cells 26: 3237-3246.

Olaso R, Pairault C, Boulogne B, Durand P, Habert R. 1998. Transforming growth factor beta1 and beta2 reduce the number of gonocytes by increasing apoptosis. Endocrinology 139:733-740.

Oliveira SM, Leite Vilamaior PS, Corradi LS, Goes RM, Taboga SR. 2007. Cellular and extracellular behavior in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) ventral prostate following different types of castration and the consequences of testosterone replacement. Cell Biol Int 31:235-245.

Orth JM, Qiu J, Jester WF, Jr., Pilder S. 1997. Expression of the c-kit gene is critical for migration of neonatal rat gonocytes in vitro. Biol Reprod 57:676-683.

Page DC, Fisher EM, McGillivray B, Brown LG. 1990. Additional deletion in sex-determining region of human Y chromosome resolves paradox of X,t(Y;22) female. Nature 346:279-281.

Palmer SJ, Burgoyne PS. 1991. In situ analysis of fetal, prepubertal and adult XX-XY chimaeric mouse testes: Sertoli cells are predominantly, but not exclusively, XY. Development 112:265-268.

Pauls K, Schorle H, Jeske W, Brehm R, Steger K, Wernert N, Buttner R, Zhou H. 2006. Spatial expression of germ cell markers during maturation of human fetal male gonads: an immunohistochemical study. *Hum Reprod* 21:397-404.

Payne AH, Youngblood GL. 1995. Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells. *Biol Reprod* 52:217-225.

Pegorin de Campos SG, Zanetoni C, Goes RM, Taboga SR. 2006. Biological behavior of the gerbil ventral prostate in three phases of postnatal development. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 288:723-733.

Peng Y, Chen F, Melamed J, Chiriboga L, Wei J, Kong X, McLeod M, Li Y, Li CX, Feng A, Garabedian MJ, Wang Z, Roeder RG, Lee P. 2008. Distinct nuclear and cytoplasmic functions of androgen receptor cofactor p44 and association with androgen-independent prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:5236-5241.

Pesce M, Anastassiadis K, Scholer HR. 1999. Oct-4: lessons of totipotency from embryonic stem cells. *Cells Tissues Organs* 165:144–152.

Phillips DM, Lakshmi V, Monder C. 1989. Corticosteroid 11 beta-dehydrogenase in rat testis. *Endocrinology* 125:209-216.

Pinto ME, Egydio FD, Taboga SR, Mendis-Handagama SM, Góes RM. 2009. Differentiation of Leydig cells in the Mongolian gerbil. *Microsc Res Tech* *in press*.

Pointis G, Latreille MT, Cedard L. 1980. Gonado-pituitary relationships in the fetal mouse at various times during sexual differentiation. *J Endocrinol* 86:483-488.

Racine C, Rey R, Forest MG, Louis F, Ferre A, Huhtaniemi I, Josso N, di Clemente N. 1998. Receptors for anti-mullerian hormone on Leydig cells are responsible for its effects on steroidogenesis and cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:594-599.

Rich ST. 1968. The Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) in research. *Lab Anim Care* 18(2):235-243.

Robinson DG. 1974. The anatomy of the Mongolian Gerbil. Publishe's Foreword, USA, p.V.

Rochel SS, Bruni-Cardoso A, Taboga SR, Vilamaior PS, Goes RM. 2007. Lobe identity in the Mongolian gerbil prostatic complex: a new rodent model for prostate study. *Anat Rec (Hoboken)* 290:1233-1247.

Rodriguez I, Ody C, Araki K, Garcia I, Vassalli P. 1997. An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *Embo J* 16:2262-2270.

- Roosen-Runge EC, Anderson D. 1959. The development of the interstitial cells in the testis of the albino rat. *Acta Anat (Basel)* 37:125-137.
- Roosen-Runge EC, Leik J. 1968. Gonocyte degeneration in the postnatal male rat. *Am J Anat* 122:275-299.
- Ross AJ, Capel B. 2005. Signaling at the crossroads of gonad development. *Trends Endocrinol Metab* 16:19–25.
- Roy P, Alevizaki M, Huhtaniemi I. 2008. In vitro bioassays for androgens and their diagnostic applications. *Hum Reprod Update* 14:73-82.
- Ruggiu M, Speed R, Taggart M, McKay SJ, Kilanowski F, Saunders P, Dorin J, Cooke HJ. 1997. The mouse *Dazl* gene encodes a cytoplasmic protein essential for gametogenesis. *Nature* 389:73-77.
- Russell LD, Chiarini-Garcia H, Korsmeyer SJ, Knudson CM. 2002. Bax-dependent spermatogonia apoptosis is required for testicular development and spermatogenesis. *Biol Reprod* 66:950-958.
- Saez JM. 1994. Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation. *Endocr Rev* 15:574-626.
- Sakai Y, Noce T, Yamashina S. 2004. Cleavage-like cell division and explosive increase in cell number of neonatal gonocytes. *Dev Growth Differ* 46:15-21.
- Santos FC, Custodio AM, Campos SG, Vilamaior PS, Góes RM, Taboga SR. 2008. Antiestrogen therapies affect tissue homeostasis of the gerbil (*Meriones unguiculatus*) female prostate and ovaries. *Biol Reprod* 79:674-685.
- Scarano WR, Vilamaior PS, Taboga SR. 2006. Tissue evidence of the testosterone role on the abnormal growth and aging effects reversion in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) prostate. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 288:1190-1200.
- Seckl JR, Walker BR. 2001. Minireview: 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1- a tissue-specific amplifier of glucocorticoid action. *Endocrinology* 142:1371-1376.
- Segatelli TM, Almedia CC, Pinheiro PF, Martinez M, Padovani CR, Martinez FE. 2000. Ultrastructural study of acrosome formation in mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Tissue Cell* 32:508-517.
- Segatelli TM, Almeida CC, Pinheiro PF, Martinez M, Padovani CR, Martinez FE. 2002. Kinetics of spermatogenesis in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Tissue Cell* 34:7-13.

Segatelli TM, Franca LR, Pinheiro PF, Alemida CC, Martinez M, Martinez FE. 2004. Spermatogenic cycle length and spermatogenic efficiency in the gerbil (*Meriones unguiculatus*). J Androl 25:872-880.

Sekido R, Bar I, Narvaez V, Penny G, Lovell-Badge R. 2004. SOX9 is up-regulated by the transient expression of SRY specifically in Sertoli cell precursors. Dev Biol 274:271–279.

Sekido R, Lovell-Badge R. 2008. Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer. Nature 453:930–934.

Schwentker V. 1963. The gerbil - a new laboratory animal. Veterinarian 6: 5-9.

Shan LX, Hardy MP. 1992. Developmental changes in levels of luteinizing hormone receptor and androgen receptor in rat Leydig cells. Endocrinology 131:1107-1114.

Siegford JM, Hadi Mansouri S, Ulibarri C. 2003. Normal ontogeny of perineal muscles and testosterone levels in Mongolian gerbil: response in testosterone in developing females. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol 275:997-1008.

Skinner MK. 1991. Cell-cell interactions in the testis. Endocr Rev 12:45-77.

Sprando RL. 1977. Perfusion rat testis through the heart using heparin. In: Russel LD, Ettlin APS, Cleeg ED (eds.), Histological and histopathological evaluation of the testis. Clearwater: Cache River Press. p 277-288.

Sriraman V, Jagannadha Rao A. 2004. Evaluation of the role of FSH in regulation of Leydig cell function during different stages of its differentiation. Mol Cell Endocrinol 224:73-82.

Staack A, Donjacour AA, Brody J, Cunha GR, Carrol P. 2003. Mouse urogenital development: a practical approach. Differentiation 71:402-413.

Sterio DC. 1984. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. J Microsc 134:127-136.

Teerds KJ, Closset J, Rommerts FF, de Rooij DG, Stocco DM, Colenbrander B, Wensing CJ, Hennen G. 1989. Effects of pure FSH and LH preparations on the number and function of Leydig cells in immature hypophysectomized rats. J Endocrinol 120:97-106.

Teerds KJ, De Rooij DG, Rommerts FF, van den Hurk R, Wensing CJ. 1989. Stimulation of the proliferation and differentiation of Leydig cell precursors after the destruction of existing Leydig cells with ethane dimethyl sulphonate (EDS) can take place in the absence of LH. J Androl 10:472-477.

Teerds KJ, de Boer-Brouwer M, Dorrington JH, Balvers M, Ivell R. 1999. Identification of markers for precursor and leydig cell differentiation in the adult rat testis following ethane dimethyl sulphonate administration. *Biol Reprod* 60:1437-1445.

Ter-Mikaelian M, Sanes DH, Semple MN. 2007. Transformation of temporal properties between auditory midbrain and cortex in the awake Mongolian gerbil. *J Neurosci* 27:6091-6102.

Tran N, Servos G, Haider SG. 2006. Ultrastructure of cell contacts of fetal and adult Leydig cells in the rat: a systematic study from birth to senium. *Anat Embryol (Berl)* 211:273-282.

Tres LL, Rosselot C, Kierszenbaum AL. 2004. Primordial germ cells: what does it take to be alive? *Mol Reprod Dev* 68(1):1-4.

Tres LL, Kierszenbaum AL. 2005. The ADAM-integrin-tetraspanin complex in fetal and postnatal testicular cords. *Birth Defects Res C Embryo Today* 75:130-141.

Tsai MY, Yeh SD, Wang RS, Yeh S, Zhang C, Lin HY, Tzeng CR, Chang C. 2006. Differential effects of spermatogenesis and fertility in mice lacking androgen receptor in individual testis cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:18975-18980.

Tyagi RK, Lavrovsky Y, Ahn SC, Song CS, Chatterjee B, Roy AK. 2000. Dynamics of intracellular movement and nucleocytoplasmic recycling of the ligand-activated androgen receptor in living cells. *Mol Endocrinol* 14:1162-1174.

Vainio S, Heikkila M, Kispert A, Chin N, McMahon AP. 1999. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 397:405-409.

van Pelt AM, De Rooij DG. 1990a. The origin of the synchronization of the seminiferous epithelium in vitamin A-deficient rats after vitamin A replacement. *Biol Reprod* 42:677-682.

van Pelt AM, de Rooij DG. 1990b. Synchronization of the seminiferous epithelium after vitamin A replacement in vitamin A-deficient mice. *Biol Reprod* 43:363-367.

van Pelt AM, van Dissel-Emiliani FM, Gaemers IC, van der Burg MJ, Tanke HJ, de Rooij DG. 1995. Characteristics of A spermatogonia and preleptotene spermatocytes in the vitamin A-deficient rat testis. *Biol Reprod* 53:570-578.

Venable JH, Coggeshall R. 1965. A Simplified Lead Citrate Stain for Use in Electron Microscopy. *J Cell Biol* 25:407-408.

Vergouwen RP, Jacobs SG, Huiskamp R, Davids JA, de Rooij DG. 1991. Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *J Reprod Fertil* 93:233-243.

Vidal VPI, Chaboissier MC, de Rooij DG, Schedl A. 2001. Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nat Genet* 28:216–217.

Vornberger W, Prins G, Musto NA, Suarez-Quian CA. 1994. Androgen receptor distribution in rat testis: new implications for androgen regulation of spermatogenesis. *Endocrinology* 134:2307-2316.

Wang RA, Nakane PK, Koji T. 1998. Autonomous cell death of mouse male germ cells during fetal and postnatal period. *Biol Reprod* 58:1250-1256.

Wang Y, Culty M. 2007. Identification and distribution of a novel platelet-derived growth factor receptor beta variant: effect of retinoic acid and involvement in cell differentiation. *Endocrinology* 148:2233-2250.

Wang RS, Yeh S, Tzeng CR, Chang C. 2009. Androgen receptor roles in spermatogenesis and fertility: lessons from testicular cell-specific androgen receptor knockout mice. *Endocr Rev* 30:119-32.

Wartenberg H. 1976. Comparative cytomorphologic aspects of the male germ cells, especially of the "Gonia". *Andrologia* 8:117-130.

Watson ML. 1958. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J Biophys Biochem Cytol* 4:475-478.

Weibel ER. 1963. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab Invest* 12:131-155.

Wiedemann T, Loell E, Mueller S, Stoeckelhuber M, Stolte M, Haas R, Rieder G. 2009. *Helicobacter pylori* cag-Pathogenicity island-dependent early immunological response triggers later precancerous gastric changes in Mongolian gerbils. *PLoS ONE* 4:e4754.

Wilhelm D, Palmer S, Koopman P. 2007. Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol Rev* 87:1–28.

Williams WM. 1974. The anatomy of Mongolian gerbil. Tumblebrook Fram, Inc., USA. 107p.

Wu X, Arumugam R, Baker SP, Lee MM. 2005. Pubertal and adult Leydig cell function in Mullerian inhibiting substance-deficient mice. *Endocrinology* 146:589-595.

Wu X, Wan S, Lee MM. 2007. Key factors in the regulation of fetal and postnatal Leydig cell development. *J Cell Physiol* 213:429-433.

Yakirevich E, Sabo E, Dirnfeld M, Sova Y, Spagnoli GC, Resnick MB. 2003. Morphometric quantitation of spermatogonial germ cells with the 57B anti-MAGE-A4

antibody in the evaluation of testicular biopsies for azoospermia. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 11:37-44.

Yang K, Yu M. 1994. Evidence for distinct isoforms of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the ovine liver and kidney. *J Steroid Biochem Mol Biol* 49:245-250.

Yao HH, Capel B. 2002. Disruption of testis cords by cyclopamine or forskolin reveals independent cellular pathways in testis organogenesis. *Dev Biol* 246:356-365.

Yeh S, Tsai MY, Xu Q, Mu XM, Lardy H, Huang KE, Lin H, Yeh SD, Altuwaijri S, Zhou X, Xing L, Boyce BF, Hung MC, Zhang S, Gan L, Chang C. 2002. Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: an in vivo model for the study of androgen functions in selective tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:13498–13503.

Yoshida S, Sukeno M, Nakagawa T, Ohbo K, Nagamatsu G, Suda T, Nabeshima Y. 2006. The first round of mouse spermatogenesis is a distinctive program that lacks the self-renewing spermatogonia stage. *Development* 133:1495-1505.

Zhou X, Kudo A, Kawakami H, Hirano H. 1996. Immunohistochemical localization of androgen receptor in mouse testicular germ cells during fetal and postnatal development. *Anat Rec* 245:509–518.

Zhou Q, Li Y, Nie R, Friel P, Mitchell D, Evanoff RM, Pouchnik D, Banasik B, McCarrey JR, Small C, Griswold MD. 2008. Expression of stimulated by retinoic acid gene 8 (Stra8) and maturation of murine gonocytes and spermatogonia induced by retinoic acid in vitro. *Biol Reprod* 78:537-545.

Ziegler HG, Haider SG, Passia D, Hilscher W. 1983. Enzymehistochemical and morphometrical studies on delta 5-3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase during the fetal and neonatal development of rat Leydig cells. *Andrologia* 15:392-397.

Zirkin BR, Ewing LL. 1987. Leydig cell differentiation during maturation of the rat testis: a stereological study of cell number and ultrastructure. *Anat Rec* 219:157-163.

DECLARAÇÃO

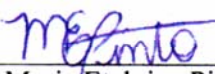
Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha **Tese de Doutorado** intitulada **“DESENVOLVIMENTO TESTICULAR NO GERBILO DA MONGÓLIA: DIFERENCIAÇÃO PÓS-NATAL DAS CÉLULAS GERMINATIVAS E DE LEYDIG”**.

() não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 01/2008, referente a bioética e biossegurança.

() está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº _____), intitulado _____

(X) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 31/07-CEEA).

() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (?) (Protocolo nº _____).



Aluno(a): Maria Etelvina Pinto



Orientador(a): Profª. Drª Rejane Maíra Góes

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido


Nome:

Função:

Profª. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO
Presidente
Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/IB - UNICAMP

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 31/07-CEEA, sobre "DESENVOLVIMENTO TESTICULAR DO GERBILO DA MONGOLIA: DIFERENCIAÇÃO PÓS-NATAL DAS CÉLULAS DE LEYDIG", sob a responsabilidade de **REJANE MAIRA GÓES**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL** (CEEA), em reunião de 27/04/2007.

Botucatu, 27 de abril de 2007.



Prof. Dr. **MARCELO RAZERA BARUFFI**
Presidente - CEEA



NADIA JOVÊNCIO COTRIM
Secretária - CEEA