

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

DESENVOLVIMENTO MORFOLÓGICO DOS
TESTÍCULOS EM EMBRIÕES E FETOS EQUINOS
SEM RAÇA DEFINIDA

Alexandre Granados Afonso de Faria
Médico Veterinário

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL
AGOSTO DE 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

DESENVOLVIMENTO MORFOLÓGICO DOS
TESTÍCULOS EM EMBRIÕES E FETOS EQUINOS
SEM RAÇA DEFINIDA

Autor: Alexandre Granados Afonso de Faria

Orientador: Prof. Dr. Rogério Chaves Vieira

Co-Orientador: Prof. Dr. José Octávio Jacomini

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – UFU, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.
(Produção animal)

UBERLÂNDIA – MINAS GERAIS – BRASIL

AGOSTO DE 2007

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERTURA.....	04
2.1. Aspectos histológicos e anatômicos.....	04
2.2. Diferenciação gonadal.....	05
2.3. Origem e desenvolvimento das gônadas.....	07
2.4. Interação celular e formação das gônadas.....	09
2.5. Origem e morfologia das células germinativas primordiais.....	11
2.6. Diferenciação gonadal no macho.....	12
2.7. Dimensões testiculares.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1. Coleta e processamento do material.....	14
3.2. Cálculo da idade gestacional dos embriões e fetos.....	15
3.3. Sexagem dos embriões e fetos.....	16
3.3.1. Extração de DNA.....	17
3.3.2. Técnica de PCR-RFLP.....	17
3.4. Análise histológica e determinação do número e diâmetro das células testiculares.....	21
3.5. Análise estatística.....	21
4. RESULTADOS.....	22
4.1. Localização e diferenciação gonadal.....	22
4.2. Células germinativas primordiais.....	23
4.3. Dimensões testiculares.....	26
4.4. Precursoras das células de Sertoli.....	26
4.5. Túnica albugínea.....	28
4.6. Cordões gonadais.....	30
5. DISCUSSÃO	34

6. CONCLUSÕES.....	38
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

HISTOLÓGICO DOS TESTÍCULOS EM EMBRIÕES E FETOS EQUINOS SEM RAÇA DEFINIDA

RESUMO – O objetivo deste trabalho foi caracterizar histologicamente o desenvolvimento testicular de embriões e fetos equinos sem raça definida. A pesquisa compreendeu: identificação das células germinativas primordiais (CGPs), aparecimento da crista gonádica e diferenciação gonadal, o surgimento das precursoras das células de Sertoli, túnica albugínea e cordões gonadais. Coletaram-se 17 embriões e 147 fetos em frigorífico, os quais foram mensurados quanto ao comprimento (cm) equivalente à distância cefalococcígea (DCC), antes das amostras testiculares serem fixadas em Bouin por 24 horas. As idades foram estimadas pela equação de regressão, na qual os dias de gestação variam em função da DCC. O sexo dos fetos foi determinado por observação macroscópica e o dos embriões pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase, associado com o Polimorfismo de Fragmentos de DNA obtidos por Enzimas de Restrição (RCP-PFER). Cortes histológicos de 5 µm de espessura foram corados com hematoxilina-eosina e analisados sob microscopia de luz. Para a quantificação das células e mensurações de seus núcleos e diâmetros utilizou-se o software HL Image⁺⁺ 97. As primeiras CGPs e a crista gonádica foram vistas nos embriões com 31 DG. A diferenciação gonadal, surgimento das células de Sertoli, túnica albugínea e cordões testiculares ocorreram nos fetos com 40; 43; 49; e 53, DG respectivamente. A crista gonádica foi vista em embriões entre 31 a 45 DG. As CGPs iniciam a colonização das gônadas de embriões com 31 DG. A diferenciação gonadal macroscópica ocorre em fetos a partir de 40 DG. As precursoras das células de Sertoli foram identificadas em fetos com DCC = 5,0 cm (43 DG). A túnica albugínea inicia sua formação em fetos com 49 DG, cordões gonadais são visualizados em fetos com 53 DG.

Palavras-chave: células germinativas, diferenciação sexual, embriologia, *Equus caballus*, gônadas, organogênese

DEVELOPMENT OF TESTES IN EMBRYOS AND FETUSES OF CROSS-BREED EQUINES

ABSTRACT i The aim of this work was to characterize the histological development of testes in embryos and fetuses of cross-breed equines. The research included: primordial germinative cells (PGCs) identification, gonadal ridge appearance and gonadal differentiation, forerunners of Sertoli cells, tunic albuginea and gonadal cords appearance. There were obtained testes from 17 embryos and 147 fetuses at a slaughter, whose length (crown-rump, CR) were measured in centimeters. Their age were estimated by the regression equation, in which the days of gestation (DG) varies with the CR. The embryos and fetuses sex were identified by PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism) and macroscopic observations, respectively. The testes were bisected at their point of greatest circumference, fixed for 24 hours in Bouin's fluid, sectioned at a thickness of 5 μ m and stained with haematoxylin and eosin. The histological analysis were made in a Pentium III 450 MHz computer using HImage⁺⁺ 97 software. Light microscopic examinations have showed that the first PGCs appeared at embryos with 31 DG, when the gonadal ridge was detected. The gonadal differentiation, forerunners of Sertoli cells, tunic albuginea, and gonadal cords appearance occurred in fetuses with 40; 43; 49; 53, DG respectively. The gonadal ridge was seen in embryos with 45 DG. The PGCs gonadal colonization starts in embryos with 31 DG. The macroscopical gonadal differentiation occurs in fetuses with 40 DG. The forerunners of Sertoli cells were identify in fetuses with 43 DG. The tunic albuginea formation starts in fetuses with 49 DG, gonadal cords was first seen in fetuses with 53 DG.

Key words: embryology, *Equus caballus*, germinative cells, gonads, organogenesis, sexual differentiation.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a população de eqüinos no Brasil atinge cerca de 6 milhões de animais, sendo 860 mil no Estado de Minas Gerais, os quais têm como principal função o trabalho. A indústria do cavalo movimentou no ano de 2006 aproximadamente 7,3 bilhões de reais e gerou 641 mil empregos diretos, que somados aos indiretos chegaram a 3,2 milhões (BARROS et al., 2006).

Ao se buscar incrementos na qualidade racial e desempenho dos animais destinados ao esporte e trabalho, faz-se mister atentar tanto para os fatores genéticos quanto àqueles relacionados à capacidade reprodutiva. Contudo, pouca ênfase tem sido dada ao desenvolvimento morfológico pré-natal da espécie eqüina, período crítico na determinação dessas características.

Conhecimentos sobre a embriologia dos órgãos reprodutivos são indispensáveis para se compreender a patogenia de muitas das anomalias das gônadas e estruturas acessórias (McENTEE, 1990). No caso do testículo eqüino, este difere daqueles de outras espécies de mamíferos domésticos por desenvolver notórias modificações ao longo da gestação, apresentar a parte central do parênquima clara e a periférica escura, estando a primeira associada à espermatogênese e a segunda à mudança de população das células intersticiais (CIs) (CLEMMONS et al., 1995).

O tamanho expressivo das gônadas fetais, resultante do número massivo de CIs, tem-se destacado como peculiaridade dos eqüinos. Sabe-se que há marcante semelhança entre células luteais, hepáticas e CIs de fetos dessa espécie e, também, que as gônadas fetais entre 7 e 8 meses de prenhez apresentam-se maiores do que os ovários da égua (GINTHER, 1992).

Cole et al. (1933) foram os primeiros a efetuar estudos e descrições histológicas das gônadas fetais eqüinas, e associaram o desenvolvimento das mesmas com a condição dos ovários maternos e concentrações hormonais plasmáticas nas éguas. Diversas pesquisas têm sido associadas com a morfologia das estruturas testiculares (GONZÁLEZ-ÂNGULO; HERNÁNDEZ-JÁUREGUI; MARTÍNEZ-ZEDILO, 1975; HAY; ALLEN, 1975; MERCHANT-LARIOS, 1979; ALMAHBOBI et al., 1988; CLEMONS et al., 1995; MURABAYASHI, et al., 1999), aspectos bioquímicos (GINTHER, 1987; HAY; ALLEN,

1975; ING et al. 2004) e desenvolvimento celular (DEANESLY, 1975; 1977; GINTHER, 1979; WALT et al., 1979; JOHNSON, 1985; JONES; BERNDTSON, 1986).

As gônadas originam-se de espessamentos conhecidos como cristas gonádicas, que se formam no terço médio do mesonéfro. No embrião, as células germinativas primordiais (CGPs) migram do endoderma do saco vitelino para a crista gonádica e, logo após o término dessa migração, inicia-se a diferenciação. Na espécie eqüina, o processo de diferenciação gonadal ocorre entre 39 e 45 dias de gestação (DG) (GONZALEZ-ÂNGULO; HERNÁNDEZ-JÁUREGUI; MÁRQUEZ-MONTER, 1971; MERCHANT-LARIOS, 1979), sendo este mais precoce nos embriões machos (JOST, 1971; QUATTROPANI; WISLOCKI, 1973; LEVINA; GYÉVI-HORVÁTH, 1975; MERCHANT-LARIOS, 1976).

Ao analisarem microscopicamente gônadas fetais eqüinas, González-Ângulo et al. (1971) encontraram uma evidente divisão entre as camadas cortical e medular apenas em fêmeas, independentemente da idade fetal. A cortical ou camada periférica (gonocítica ou germinativa) das fêmeas consiste de cordões de células redondas ou ovais, com citoplasma pálido, eosinofílico e uniforme, núcleo redondo e cromatina distribuída uniformemente. O estroma das gônadas masculinas e femininas é composto por células grandes e fusiformes de tecido conjuntivo. Nos testículos fetais, o parênquima está organizado em feixes e cordões, que se dispõem em várias direções por toda a glândula, porém predominantemente na camada medular ou central. Via de regra, os túbulos são compostos quase que exclusivamente por gonócitos, que se arranjam em cachos, deixando na área central um espaço livre e vazio, correspondente ao lúmen rudimentar (GONZÁLEZ-ÂNGULO; HERNÁNDEZ-JÁUREGUI; MÁRQUEZ-MONTER, 1971).

Fenômenos que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário e fetal terão seus efeitos, muitas vezes, observados apenas quando o animal alcança a puberdade, o que permite depreender a necessidade de se iniciar os estudos pela origem e diferenciação dos órgãos sexuais. Nesse sentido, são escassas as informações acerca do desenvolvimento morfológico pré-natal de eqüinos criados sob condições tropicais.

Face ao exposto, objetivou-se caracterizar histologicamente o desenvolvimento

morfológico testicular de embriões e fetos eqüinos sem raça defininida, ou seja, evidenciar o surgimento da crista gonádica e sua colonização pelas CGPs, a diferenciação gonadal e o surgimento das células de Sertoli, túnica albugínea e cordões gonadais, bem como quantificar e mensurar essas estruturas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos histológicos e anatômicos

Conhecimentos básicos sobre a morfo-fisiologia do desenvolvimento fetal eqüino têm progredido lentamente. Para isso tem contribuído, entre outros fatores, o fato de que o feto dessa espécie é relativamente inacessível, não podendo ser precisamente avaliado ao final da gestação devido seu grande tamanho e mobilidade. Contudo, várias técnicas são usadas na aferição clínica fetal, cada qual com sua limitação, incluindo palpação retal, coleta de sangue para análise hormonal, coleta de secreção mamária para avaliação da concentração de eletrólitos, eletrocardiograma fetal, ultra-sonografia e amniocentese (LeBLANC, 1996).

A localização do tubérculo genital (TG) pela ultra-sonografia, entre 50 e 90 DG, evidencia a diferença entre machos e fêmeas (CURRAN; GINTHER, 1989; FRANCK; MARTINOT, 1993; GREENWOOD, 1996). Entretanto, a localização do TG não é uma característica confiável na indicação do sexo até 55 DG (GINTHER, 1992). O TG é a única estrutura na região genital aos 30 DG com extensão de 1 mm, localizado entre os membros posteriores no terço médio entre o ânus e o cordão umbilical, sendo bem proeminente aos 36 DG. Com o alongamento do embrião, o TG permanece próximo ao ânus nas fêmeas e em direção ao umbigo nos machos. De acordo com Bergin et al. (1967), em torno de 40 DG a migração do TG se inicia na direção anterior ou posterior, dependendo do sexo do feto, sendo que aos 45 DG a determinação sexual por características externas torna-se possível.

Com o intuito de determinar a idade gestacional em eqüinos, Bergin et al. (1967) utilizaram como referenciais o contorno corporal, comprimento de tronco, cabeça, membros torácicos e pélvicos, peso e distância cefalococcígea (DCC), este último compreendendo o comprimento em linha reta que vai da extremidade da testa até a superfície posterior do fêmur, ventralmente à cauda. Tais referenciais, do ponto de vista dos autores, apresentam acurácia semelhante na determinação da idade fetal até 100 DG.

O parênquima testicular de eqüinos adultos é peculiar e difere daquele de outros mamíferos domésticos pela porcentagem de espaço intertubular. Os testículos de

garanhões são compostos aproximadamente por 58% a 72% de túbulos seminíferos, e por 28% a 42% de tecido intersticial. A média do espaço intratubular (39%) é alta quando comparada com touros (24%) ou varrões (26%). As células de Leydig somam de 21% a 54% do interstício variando com a idade, verificando-se maior concentração em garanhões erados, comparativamente com potros em início de atividade reprodutiva (THOMPSON, 1992).

2.2. Diferenciação gonadal

O sexo do indivíduo é determinado no momento da fertilização com o estabelecimento do sexo cromossômico do zigoto e é determinado pela interação de genes, fatores transcricionais, hormônios e receptores hormonais (SINCLAIR et al., 1990). Porém, o processo de diferenciação sexual ocorrerá apenas algum tempo depois. Esse período é variável entre as espécies animais, entretanto, bastante precisa dentro da mesma espécie. O processo de diferenciação gonadal nos equinos ocorre por volta do 40º dia *post coitum* (BYSKOV, 1986 ; JOST; MAGRES, 1993)

A diferenciação das gônadas, como na maioria de outros órgãos, resulta de uma série de eventos, por exemplo, interação célula-célula, proliferação celular, inibição de crescimento, morte celular programada (apoptose) e desenvolvimento de tipos celulares selecionados (BYSKOV; HOYER, 1994).

O novo indivíduo em formação, no estado indiferenciado, tem potencial para dar origem a órgãos genitais masculinos ou femininos. O caminho a ser seguido no processo de diferenciação sexual é bastante complexo, sendo determinado pela constituição cromossômica do feto. Determinados fenômenos desencadeiam a diferenciação, a qual pode ser dividida em etapas sucessivas. Inicialmente, observa-se o estabelecimento do sexo genético (XX ou XY), em segundo lugar o sexo gonádico (testículo ou ovário), em terceiro o sexo hormonal e, por último, o sexo fenotípico (SHORT, 1982). O sexo gonádico em mamíferos é normalmente determinado pelo sexo genético (POLANI, 1982), com a presença do cromossomo Y associado ao desenvolvimento testicular (BEATTY, 1970).

Jacobs e Ross (1966) revelaram que o cromossomo Y possui uma sequência de

DNA específica de testículo chamada de fator determinante testicular (FDT). Posteriormente, foi proposto que o FDT deveria ser identificado como antígeno HY, específico do macho (WACHTEL et al., 1975). A chave genética presente no cromossomo Y, gatilho para a gônada se diferenciar em testículos preferencialmente que em ovários, foi descoberta no início da década de 90, sendo então denominada Sry em ratos e SRY em humanos e demais mamíferos (GUBBAY et al., 1990; SINCLAIR et al., 1990).

Anomalias nos cromossomos sexuais, que podem aparecer nas CGPs no princípio das divisões mitóticas na embriogênese, possivelmente interferem na diferenciação gonadal (PATEK; KERR; GOSDEN, 1991). O testículo, que desempenha função primordial nesse processo, tem sua presença associada ao desenvolvimento dos órgãos anexos e genitália masculinos e bloqueio dos femininos, enquanto que sua ausência permite o aparecimento dos órgãos sexuais femininos. Falhas nas funções testiculares ou na ação das substâncias por eles secretadas resultam em inúmeras anormalidades reprodutivas (JOHNSON, 1983).

Nas gestações gêmeares com sexos opostos em bovinos, os ovários fetais são bastante modificados pelos testículos, podendo até mesmo tornarem-se estéreis, permanecendo as gônadas masculinas normalmente funcionais (MITTWOCH; DELHANTY; BECK, 1969). Desse fato, infere-se que somente o sexo genético não é capaz de assegurar o desenvolvimento normal dos órgãos sexuais (SHARP; WACHTEL; BERNIRSCHKE, 1980).

Wachtel (1977) relata que fatores genéticos e ambientais, ao afetarem a expressão e ação do antígeno HY, provavelmente interferem no desenvolvimento normal da gônada. Assim, apenas a expressão do antígeno HY nem sempre significa diferenciação testicular, e sua ausência nem sempre está ligada à diferenciação ovariana, que por sua vez é dependente da presença de dois cromossomos X.

Nos mamíferos, após o sexo genético ser estabelecido na fertilização, as etapas seguintes do desenvolvimento ocorrem durante o período da organogênese. Isto envolve a diferenciação da gônada primordial ou crista gonádica em testículos, mais do que em ovários, se o antígeno HY estiver presente (CAPEL; LOVELL-BADGE, 1993). Porém, não há informação direta indicando que SRY seja um ativador de genes envolvidos na determinação testicular, um repressor de genes na diferenciação ovariana ou ambos (LOVELL-BADGE, 1993).

2.3. Origem e desenvolvimento das gônadas

A gonadogênese, na maioria dos mamíferos, acontece na crista gonádica com a migração das CGPs a partir do intestino primitivo posterior (CHIQUELINE, 1954; MITTWOCH; DELHANTY; BECK, 1969). As cristas gonádicas são dois espessamentos longitudinais que surgem entre o mesonéfro e o mesentério dorsal. Esse espessamento é formado pela proliferação e condensação do epitélio celomático e do mesênquima. A partir dessa proliferação, surgem cordões digitiformes, os cordões sexuais primários, que servirão de sustentáculo às células que invadirão a gônada primitiva. De acordo com o sexo cromossômico do indivíduo, XX ou XY, as CGPs irão se dispor mais na zona cortical ou medular, respectivamente. Esse fenômeno parece estar ligado, pelo menos em parte, às substâncias quimiotáticas liberadas por regiões específicas da gônada em desenvolvimento. Por sua vez, a síntese e liberação dessas substâncias corresponderiam à expressão de genes associados aos cromossomos sexuais (GINTHER, 1992).

Pode-se verificar a diferenciação gonadal num estágio inicial da embriogênese, antes que o estabelecimento das CGPs tenha se completado. O cromossomo sexual complementar dessas células aparentemente não tem influência na determinação sexual e desenvolvimento das gônadas (OHNO, 1967). Alguns autores alteram a nomenclatura de embrião para feto ao final da organogênese, mas do ponto de vista de Ginther (1979), considera-se embrião até os 40 DG e feto após essa data, quando ocorre a diferenciação da genitália externa e torna-se possível a identificação do sexo com base nas características exteriores. Bergin et al. (1967) propuseram que a transição do desenvolvimento embrionário para fetal nos eqüinos ocorre aos 30 DG, ao constatarem evidências histológicas de diferenciação gonadal nesse momento da prenhez. Essa discordância entre autores evidencia que no útero o desenvolvimento do indivíduo é um processo contínuo, e não categorizado em estágios (GINTHER, 1992).

As primeiras investigações sobre o desenvolvimento dos órgãos reprodutivos de eqüinos aos 30 DG foram realizadas por Bergin et al. (1967). Estes afirmaram não ser possível determinar o sexo visualmente pelas características externas até o estágio fetal (> 40 DG). Eles estabeleceram que o sexo morfológico em eqüinos é determinado,

histologicamente, aos 30 DG, com base na presença de um conjunto de cordões corticais de Pflueger's ao longo da periferia das gônadas de fêmeas, mas não nas de machos. Nessa fase, as gônadas encontram-se na forma de cristas gonádicas na superfície do mesonéfro, cobertas pelo epitélio celômico. Essas cristas são cordões densos de aproximadamente 2,8 mm de extensão, contendo inúmeras células coradas fortemente, e células grandes dispersas com citoplasma claro (presumivelmente CGPs ou descendentes). O desenvolvimento gonadal liga-se estreitamente com o do mesonéfro, rim primitivo, que desenvolve-se a partir do não-segmentado mesoderma lateral intermediário. Nesse processo, está envolvido o ingresso das células mesenquimais do epitélio celômico e do mesonéfro. Numa fase inicial, a crista gonádica aumenta em volume, mas permanece indiferenciada, idêntica morfológicamente nos dois sexos (CAPEL; LOVELL-BADGE, 1993). A gônada fixada ao mesonéfro foi observada aos 36 DG por Deanesly (1977), na qual algumas CGPs foram encontradas em mitose.

Tanto a diferenciação quanto a função testicular dependem do envolvimento das CGPs nos cordões testiculares. A subsequente diferenciação das duas linhagens de células características, Leydig e Sertoli, sucede a formação do cordão gonadal. A produção de esteróides pelas células de Leydig dar-se-á fora do compartimento, e no seu interior a secreção de hormônio anti-mülleriano (AMH) pelas células de Sertoli. Essa compartimentalização aparenta ser a confirmação de um novo evento evolutivo. Em peixes primitivos, somente os espermatócitos secundários e as células de Sertoli são separadas pela formação de uma membrana basal, imediatamente antes do início da meiose. Em mamíferos, todas as CGPs e células de Sertoli são confinadas dentro do compartimento comum dos cordões testiculares (BYSKOV E HOYER, 1994).

Três eventos consecutivos caracterizam a diferenciação testicular: 1) CGPs e células de Sertoli começam a ser envolvidas nos cordões gonadais, criando assim um compartimento intracordal e outro extracordal de CGPs; 2) produção de esteróides pelas células de Leydig no compartimento extracordal diferenciado; 3) os testículos tornam-se envolvidos, minimizando os efeitos femininizantes do mesonéfron (BYSKOV, 1979).

O primeiro sinal morfológico de que uma gônada diferenciada pode ser reconhecida como testículo é um aglomerado de CGPs e células somáticas no cordão gonadal. Inicialmente, o diâmetro do cordão gonadal apresenta variação, mas logo torna-se regular e constante. As células somáticas que iniciam parte dos cordões são

presumivelmente as de Sertoli, enquanto as CGPs são as futuras espermatogônias. Parte das pré-espermatogônias diferenciar-se-á em espermatogônias adultas (BYSKOV, 1986). A meiose em CGPs testiculares é mantida em quiescência até a puberdade (STEINBERGER; STEINBERGER, 1975).

A gônada começa a separar-se em septos perpendiculares ao eixo maior, com CGPs e células somáticas sendo firmemente comprimidas e convertidas em arcos, os cordões gonadais primitivos. Durante a diferenciação, os cordões ficam em conexão com a parte basal da massa celular do mesonéfron. Essa massa de células gradualmente transforma-se numa rede de cordões, a rete testis. Os cordões gonadais, assim como a rete testis, são formados do tecido mesonéfrico gonadal pré-existente. A diferenciação dos cordões dá-se de modo rápido, levando em ratos cerca de 24 horas (BYSKOV, 1986).

2.4. Interação celular e formação das gônadas

Células somáticas de três diferentes tecidos, isto é, epitélio celômico, mesênquima e tecido mesonéfrico, em adição às CGPs, caracterizam a formação gonadal. Num estágio precoce do desenvolvimento, as diferentes células somáticas se misturam. O epitélio celômico e o tecido mesonéfrico se tornam claramente separados apenas após a diferenciação da gônada (BYSKOV, 1986).

Existem quatro linhagens celulares participantes do desenvolvimento gonadal de mamíferos, todas efetivamente bipotentes, incluindo as CGPs que migram para a crista gonádica e três tipos de células somáticas: 1) células precursoras de suporte que originam as células de Sertoli no macho e foliculares na fêmea; 2) células precursoras de produção esteroidal que originam as células de Leydig no macho e CIs na fêmea; 3) células do tecido conjuntivo e as precursoras do tecido vascular, células da túnica albugínea e mióides peritubulares nos testículos, e células da túnica e estromais no ovário (LOVELL-BADGE, 1992).

A área da crista gonádica, que se desenvolve entre a estrutura mesonéfrica e o epitélio celômico transforma-se gradualmente de tecido mesenquimal frouxo para uma

massa compacta de células derivadas do mesonéfro, células epiteliais celômicas e mesenquimais apresentando CGPs espalhadas entre elas. Durante estágios precoces da diferenciação é difícil distinguir morfologicamente os tipos de células somáticas. Porém nos estágios mais adiantados, quando as gônadas se tornam sexualmente diferenciadas, as células derivadas do mesonéfro apresentam-se mais densas que as outras células somáticas (BYSKOV, 1986).

Em mamíferos, a diferenciação gonadal se inicia com uma antecipada diferenciação testicular, em que células esteroidogênicas de Leydig são detectadas logo após a identificação histológica dos testículos (JOST, 1971). Por outro lado, a gônada feminina permanece indiferenciada por um período relativamente longo, não se encontrando tecido esteroidogênico antes do estabelecimento da foliculogênese (LEVINA; GYÈVI; HORVÁTH, 1975; MERCHANT-LARIOS, 1976; QUATROPANI; WISLOCKI, 1973).

Diversos autores (GONZÁLEZ-ÂNGULO; HERNANDÉZ-JÁUREGUI; MARQUES-MONTER, 1971; HAY; ALLEN, 1975) consideram que em eqüinos a diferenciação ocorre em estágios precoces, com presença massal de tecido esteroidogênico tanto nos testículos como nos ovários. A participação do epitélio germinativo no desenvolvimento gonadal restringe-se a um período curto e precoce, não parecendo estar envolvido na diferenciação sexual das gônadas (GROPP-OHNO, 1966) .

Por meio de técnicas histológicas de alta resolução, Merchant-Larios (1979) investigou o estabelecimento e a diferenciação gonadal em embriões eqüinos, sendo que a constatação mais patente foi a precoce citodiferenciação das células somáticas em células esteroidogênicas, que ocupam lugar nas gônadas mesmo antes do processo de diferenciação. Um único padrão morfogenético encontra-se estabelecido durante o processo, ou seja, os cordões gonadais dos testículos são completamente segregados do tecido esteroidogênico por uma lâmina basal, enquanto que na medula do ovário as células esteroidogênicas se diferenciam no interior dos cordões epiteliais e presença de CGPs. Ainda, segundo esse autor, essa diferença, notada precocemente na distribuição topográfica das células esteroidogênicas, favorece a hipótese de que a interação entre células somáticas e CGPs varia de acordo com o sexo genético do embrião.

2.5. Origem e morfologia das células germinativas primordiais

As CGPs são definidas como aquelas cujos descendentes sobreviventes formam gametas (McLAREN, 1992; WITSCH, 1948). O mecanismo envolvido na translocação das CGPs do epiblasto do saco vitelino extra-embrionário para a gônada em desenvolvimento é pouco conhecido. Em estudos ultra-estruturais, as CGPs foram reportadas por possuírem poucas e pequenas extensões citoplasmáticas ou pseudópodes, os quais permitem o movimento ativo (JEON; KENNEDY, 1973). Alguns autores sugerem que os tecidos nos quais as CGPs estão embebidas transportam as mesmas, como resultado das alterações morfogênicas (SNOW, 1981; SNOW; MONK, 1983). Witschi (1948) propôs que elas são guiadas e atraídas por substâncias quimiotáticas produzidas pela crista gonádica em desenvolvimento.

No momento da diferenciação sexual, as CGPs que não conseguem alcançar as gônadas desaparecem rapidamente (JIRASÉK, 1976; SNOW; MONK, 1983). Durante a migração e após o estabelecimento nas gônadas, se dividem por mitose e seu número aumenta rapidamente. Logo após se fixarem nas gônadas, são envolvidas em compartimentos específicos, nos quais a proliferação e diferenciação são reguladas pelas células somáticas que as rodeiam (BYSKOV, 1986).

As características das CGPs em migração incluem a forma irregular do citoplasma com extensões parecidas com pseudópodes e núcleo esférico contendo três ou mais nucléolos reticulados proeminentes. Organelas do citoplasma são todas típicas de células indiferenciadas (BYSKOV, 1986). Essas células apresentam uma inclusão citoplasmática, que consiste numa massa eletrodensa regular ou esférica de material fibroso a granular. Essa, por sua vez, tem sido descrita e avaliada numericamente nas CGPs de machos e fêmeas, nos vários estágios do desenvolvimento de diversas espécies de mamíferos (EDDY, 1975), não havendo sinais da existência de plasma germinativo. Seu número aumenta durante os estágios iniciais do desenvolvimento gonadal e é maior em CGPs de fêmeas. O aumento no conteúdo das inclusões tem sido relacionado com aumento da atividade mitótica das CGPs (KELLOKUMPU-LEHTINEN; SODERSTROM, 1978).

2.6. Diferenciação gonadal no macho

O evento inicial do processo de diferenciação sexual no macho é a formação dos testículos, que surgem a partir do desenvolvimento dos cordões gonadais. Os embriões do sexo masculino começam a apresentar uma série de modificações estruturais nos cordões sexuais primários, que nessa fase se encontram definidos e separados entre si pelo mesênquima. Os cordões que estão na região medular ramificam-se e anastomosam-se, formando a *rete testis* (BYSKOV e HOYER, 1994).

As células germinativas, que passam a ser chamadas de espermatogônias, precocemente são circundadas pelas células somáticas que formam o cordão testicular. Essas células são as precursoras das células de Sertoli. Abaixo do epitélio superficial desenvolve-se espessa camada de tecido fibroso, a túnica albugínea, formando uma cápsula ao redor do testículo. A cápsula albugínea emite trabéculas dividindo o órgão em lobos e dos cordões gonadais originam-se os túbulos seminíferos, os túbulos retos e a *rete testis* (BYSKOV, 1986).

2.7. Dimensões testiculares

DEANESLY (1975) observou que entre 40 e 45 DG as gônadas eqüinas estão implantadas na região ventro-medial do mesonéfro, medem 1,4 x 0,5 x 0,5 mm de comprimento (C), largura (L), e espessura (E), respectivamente, e apresentam-se cobertas por uma camada de epitélio germinativo superficial. Segundo esse autor, quando os ovários maternos alcançam o máximo de desenvolvimento, em torno de 60 DG, as gônadas fetais são ainda relativamente pequenas, pesam menos de 1 g e medem 5,0 x 4,0 x 4,0 mm de C, L e E, respectivamente.

Walt et al. (1979) relataram que um lento crescimento das gônadas fetais ocorre até aproximadamente 100 DG e que entre 100 e 200 DG elas desenvolvem-se rapidamente e alcançam o máximo do seu tamanho, pesando aproximadamente 70 g (peso de ambas gônadas). Entretanto, ao passo que as gônadas fetais aumentam em tamanho os ovários

maternos diminuem. Esses pesquisadores, ao estudarem gônadas de conceptos eqüinos, encontraram medidas de 14,0 x 8,0 x 10,0 mm equivalentes a C, L e E, respectivamente, entre 90 e 120 DG. Ainda, observaram que o peso das mesmas começa a exceder o dos ovários maternos por volta de 150 DG e que as dimensões médias das gônadas entre 120 e 180 DG são de 35,0 x 20,0 x 19,0 mm para C, L e E, respectivamente.

O peso das gônadas fetais decresce após 250 DG para aproximadamente 10 a 20 g, enquanto que no pós-parto pesam em média 1/10 do máximo do seu desenvolvimento na vida fetal (ALLEN, 1970; COLE et al., 1933). Em sua maioria, os aumentos e diminuições de peso se devem à hiperplasia, hipertrofia e degeneração das Cls da camada medular. Os elementos germinativos ficam limitados à zona cortical no ovário fetal e aos cordões gonadais espalhados nos testículos fetais (HAY; ALLEN, 1975).

Entre 30 e 60 DG as gônadas apresentam-se amarelo esbranquiçadas, contendo gonócitos mesclados com células do blastema na porção central da crista gonádica. A superfície dos cortes de gônadas de machos e fêmeas é homogeneamente marrom, e os ovários, mas não os testículos, têm uma fina camada de tecido branco periférico (córtex) contendo as CGPs ou gonócitos. Essa camada, por sua vez, contém CGPs em desenvolvimento, mas presentes apenas na porção ventral ovariana (GONZÁLEZ-ÂNGULO; HERNÁNDEZ-JÁUREGUI; MARTÍNEZ-ZEDILLO, 1975).

Face à hiperplasia e hipertrofia das Cls medulares, os ovários e testículos de fetos eqüinos aumentam tremendamente entre o terceiro e nono mês de gestação (HAY; ALLEN, 1975). A regressão é observada por volta dos 250 DG, em função de alterações degenerativas das Cls, que resultam em rápida diminuição na densidade volumétrica e tamanho das mesmas (TSUNODA et al., 1996). Transformações regressivas continuam ocorrendo com o avanço da gestação e também após o nascimento.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta e processamento do material

Foram utilizados 17 embriões e 147 fetos de éguas sem raça definida, colhidos no Frigorífico Pomar Ltda situado em Araguari, MG. Os embriões foram medidos em comprimento (cm), equivalente à distância cefalococcígea (DCC), seccionados no terço médio e as metades posteriores fixadas em Bouin por 24 horas. Nos fetos, efetuou-se a mensuração da DCC e das gônadas (comprimento (C), largura (L) e espessura (E)), retirando-se um fragmento do terço medio dessas, biseccionado no ponto de maior circunferência, seguido de fixação em Bouin por 24 horas.

Uma vez fixadas, as amostras foram transferidas para frascos contendo álcool a 50% por mais 24 horas e, posteriormente, para frascos contendo álcool a 70%, onde ficaram armazenadas por dois anos, até o momento de preparação para microscopia de luz, processo esse que consistiu em:

- Desidratação: os fragmentos foram colocados por 30 minutos em frascos contendo álcool em concentrações crescentes de 85%, 95%, absoluto I, absoluto II e absoluto III;
- Diafanização: os fragmentos do último frasco contendo álcool absoluto III foram transferidos para frascos com o solvente xilol por 30 minutos em três passagens, no sentido de que o álcool fosse substituído e permitisse a penetração da parafina;
- Inclusão: os fragmentos foram colocados em recipientes com parafina fundida (estufa a 56 °C), passando por três banhos de 30 minutos. Em seguida, fez-se a inclusão propriamente dita derramando-se a parafina numa forma de ferro, onde as peças foram mergulhadas devidamente orientadas;
- Corte: após inclusão em parafina, as metades posteriores dos embriões foram seccionadas com micrótomo em cortes de 5,0 µm de espessura, sendo que a cada 250 µm coletaram-se três cortes, conforme a técnica descrita por Vigier et al. (1976). Esse procedimento foi repetido até constatar-se o local de formação da crista gonádica. Para os testículos fetais a metodologia foi semelhante, efetuando-

se cortes transversais ao seu diâmetro maior, aproveitando-se três cortes do terço médio. Os cortes foram distendidos em banho-maria, retirados com lâminas para microscopia de luz e colocados em estufa para secagem e fusão da parafina;

- Coloração: utilizou-se a coloração com hematoxilina-eosina (HE) de acordo com;
- Montagem: pingou-se uma gota de resina Enthelan sobre o corte, seguido da colocação de uma lamínula, de modo que a gota se espalhasse em fina camada.
- Após, as lâminas foram novamente levadas à estufa para secagem da resina, e finalmente armazenadas até o momento das análises histológicas.

3.2. Cálculo da idade gestacional dos embriões e fetos

Devido à ausência de dados em relação ao período de gestação dos animais desembarcados no frigorífico, os comprimentos embrionários e fetais foram determinados previamente à fixação das amostras (Tabela 1). Diante dessas informações, para cálculo da idade gestacional foi utilizada a equação de regressão descrita por Naves (2005). Nessa equação, os dias de gestação (DG) variam em função do comprimento embrionário e fetal ou CR (cm), sendo a mesma representada pelo polinômio de 2º grau: $DG = 22,62 + 4,26CR - 0,01CR^2$ ($r^2 = 0,99$).

Tabela 1. Embriões e fetos eqüinos sem raça definida distribuídos em função do "crown-rump" (CR) e dias de gestação (DG).

	Número de amostras	CR (cm)	DG (Dias)
Embriões	07	2,0 ĩ 2,7	31 ĩ 34
	07	2,8 ĩ 3,6	35 ĩ 37
	03	3,7 ĩ 4,5	38 ĩ 41
Fetos	20	4,6 ĩ 8,4	42 ĩ 57
	14	8,5 ĩ 11,5	58 ĩ 70
	14	11,6 ĩ 15,0	71 ĩ 83
	13	15,1 ĩ 19,9	84 ĩ 99
	10	20,0 ĩ 23,5	100 ĩ 115
	31	23,6 ĩ 60,0	115 ĩ 233
	45	60,1 ĩ 95,0	234 ĩ 315

3.3. Sexagem dos embriões e fetos

O sexo dos fetos foi determinado por observação macroscópica dos órgãos genitais, enquanto que o dos embriões foi confirmado por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase, associado com o Polimorfismo de Fragmentos de DNA obtidos por Enzimas de Restrição (RCP-PFER), [Polimerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)], como preconizado por Peippo; Huhtinen; Kotilainen (1995). A distância anogenital auxiliou na definição do sexo, uma vez que esta é maior nos machos, ou seja, nesses o TG é mais próximo ao umbigo enquanto que nas fêmeas sua localização dá-se próximo ao ânus (GINTHER, 1992; INOMATA et al., 1982).

A técnica de PCR-RFLP, que consiste na amplificação da molécula de DNA seguido da digestão ou fragmentação do mesmo por enzimas de restrição, foi realizada no Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia. Foram utilizados fragmentos de embriões ou de membranas cório-alantoidianas, armazenados em microtubos a -5 °C do momento da coleta até o processamento do material.

3.3.1. Extração de DNA

Para o processamento da técnica de PCR-RFLP efetuou-se a extração do DNA de cada amostra, sendo o mesmo quantificado em espectrofotômetro GBC - UV/VIS, modelo Cintra, 911A (GBC Scientific Equipment Pty Ltd, Dandenong - Austrália), obtendo-se, em média, 100 ng de DNA por microlitro (μ L). O DNA das amostras foi extraído seguindo o protocolo do Laboratório de Genética Molecular para extração de DNA de tecido, utilizando-se tampão de lise nuclear (TLN).

3.3.2. Técnica de PCR-RFLP

A reação de PCR-RFLP foi desenvolvida de acordo com a metodologia preconizada por Peippo; Huhtinen e Kotilainen (1995), porém com algumas modificações. As sequências dos *primers* utilizados (Bioneer Oligo Synthesis Report, Munpyeong-dong - South Korea) para a amplificação do gene Y foram as seguintes:

Zf - F = 5' - ATA ATC ACA TGG AGA GCC ACA AGC T - 3'

Zf - R = 5'- GAG CGT CTT TGG TAT CTG AGA AAG T - 3'

As reações de PCR foram efetuadas num termociclador PTC-100 (MJ Research Inc, South San Francisco - USA), utilizando-se o protocolo contido na Tabela 2.

Tabela 2. Protocolo da Reação em Cadeia da Polimerase, utilizado na sexagem de embriões equinos sem raça definida.

		Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
35 Ciclos	Desnaturação inicial	94	3,00
	Desnaturação	94	1,00
	Anelamento	54	0,50
	Extensão	72	0,45
	Extensão final	72	5,00

Após otimização, utilizou-se nas reações de PCR 1,5 µL de DNA genômico extraído; 5 pmoles de cada *primer* (1 uL); 100 µM (0,25 µL) de cada dNTP (A, T, C, G); 1µL de *Taq* DNA Polimerase (0,2 µL); 1 mM de MgCl₂; tampão da enzima concentrado 1x e água ultrapura, completando o volume final para 25 µL.

Em seguida à reação de PCR, 5 µl dos produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% (120 volts durante 40 minutos). Utilizou-se brometo de etídio (10 µg/mL) para a coloração e visualização sob luz ultravioleta pelo sistema VDS® Image Master (Amersham Bioscience Corporation, Piscataway - USA), confirmando se houve a amplificação desejada de 450 pares de base (pb), conforme disposto na Figura 1.

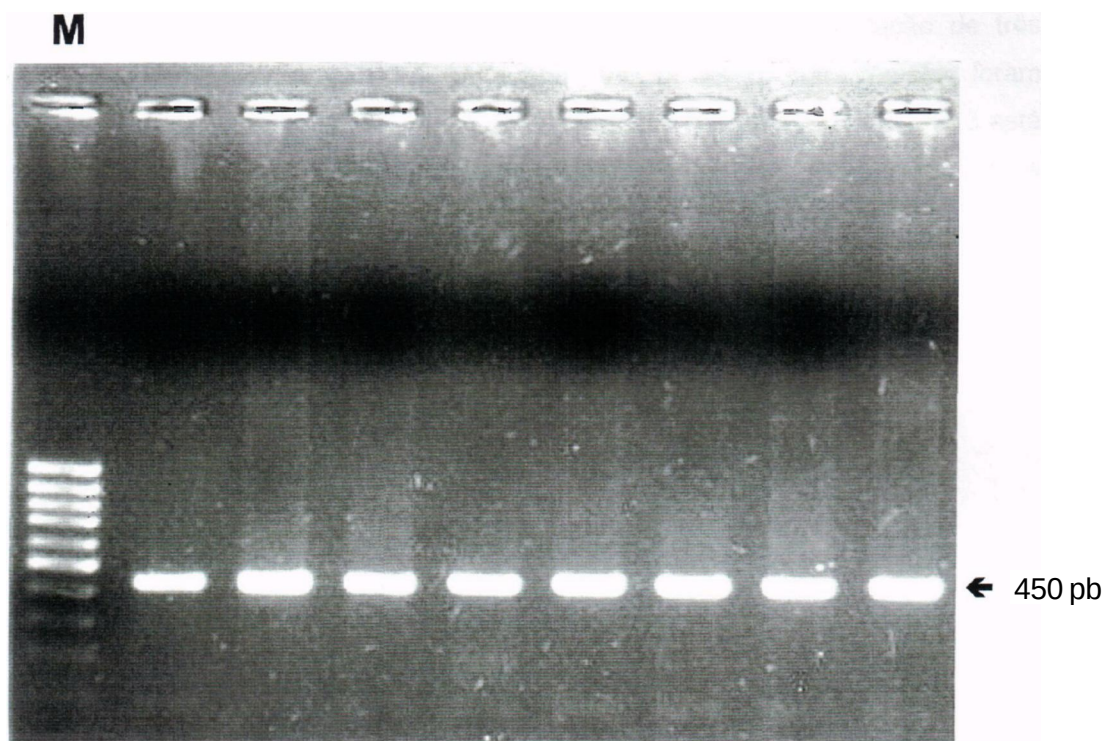


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose 1,5%, revelando a amplificação de 450 pares de base (pb) do gene Y, após Reação em Cadeia da Polimerase. A coluna "M" contém um marcador molecular de 100 pb.

O produto da amplificação pela PCR (15 μ L) foi posteriormente submetido à digestão enzimática a 37 °C "overnight", com a enzima de restrição *Mva* 1269 I (*Bsm* I) (Sinapse Biotecnologia Ltda, São Paulo - SP), utilizando 1U da enzima (0,1 μ L); tampão da enzima 1x (2 μ L); tango da enzima 1x (2 μ L) e água ultrapura, completando o volume para 5 μ L.

Um volume de 10 μ L do produto da restrição foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2,5%, utilizando-se 110 volts durante 1 hora, brometo de etídio (10 μ g/mL) para coloração e visualização sob luz ultravioleta pelo sistema VDS® Image Master (Amersham Bioscience Corporation, Piscataway - USA).

A digestão do produto de 450 pb, usando a enzima *Mva* 1269 I (*Bsm* I) (Sinapse Biotecnologia Ltda, São Paulo - SP), revelou para machos a visualização de três bandas: uma de 450 pb, uma de 250 pb e outra de 200 pb. Já para fêmeas, foram visualizadas apenas duas bandas, uma de 250 pb e outra de 200 pb. Na Figura 2 é apresentado o resultado da sexagem de seis embriões eqüinos, sendo quatro machos e duas fêmeas.

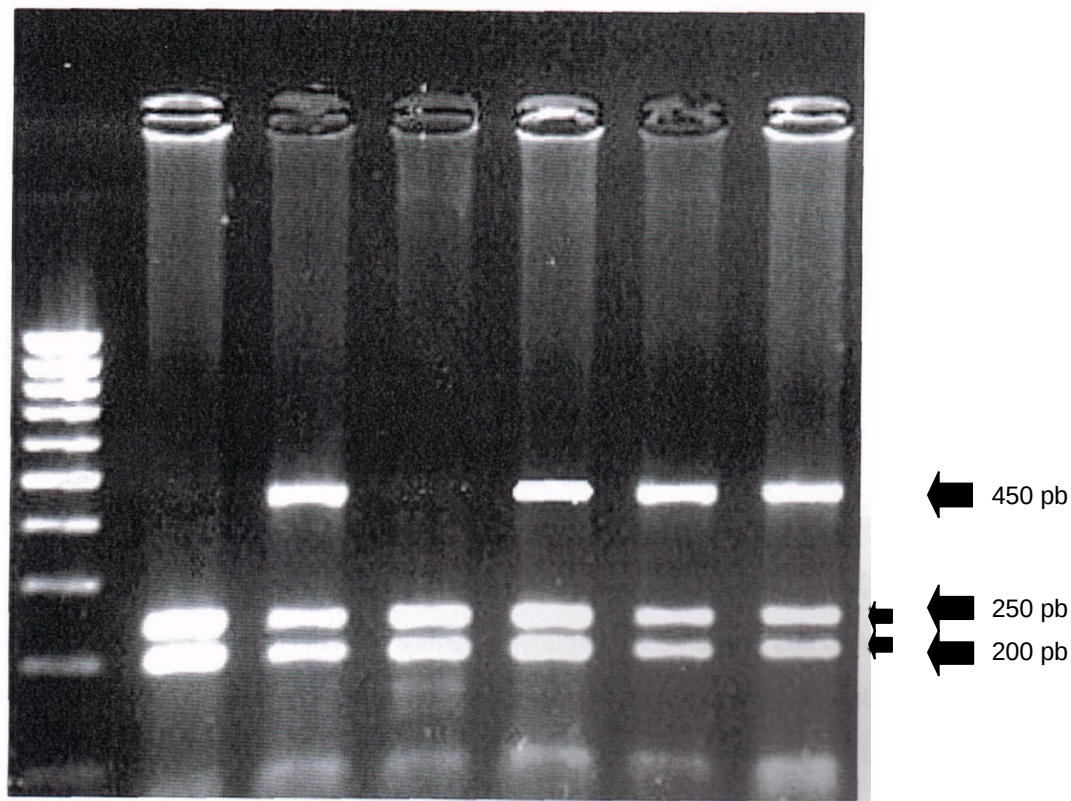


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose 2,5%, revelando as bandas formadas após a reação de Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) sobre o produto amplificado. As colunas 2, 4, 5 e 6 representam machos e as colunas 1 e 3 fêmeas. A coluna "M" contém um marcador molecular de 100 pares de base (pb). Setas largas indicam as bandas do cromossomo Y de 450, 250 e 200 pb, e setas estreitas o cromossomo X, com bandas de 250 e 200 pb.

3.4. Análise histológica e determinação do número e diâmetro das estruturas testiculares

Os cortes histológicos foram analisados em microscópio de luz Olympus BX40 e os resultados expressos por área testicular de $10.000 \mu\text{m}^2$. O testículo fetal da espécie eqüina, por apresentar características particulares, não possibilitou calcular o número dos vários tipos celulares por volume testicular total, devido ao fato das proporções da cortical e medular se modificarem constantemente durante o decorrer da gestação. A documentação fotográfica para tipificação, quantificação e determinação do diâmetro das CGPs, da crista gonádica, cordões testiculares, e de seus respectivos núcleos foi realizada por meio do software HImage⁺⁺⁹⁷ em microcomputador Pentium III 450 Mhz e monitor Samsung Sinmaster 450 b, sendo as imagens digitalizadas com aumento de 40, 80, 200 e 800x.

3.5. Análise estatística

Com intuito de analisar diferenças significativas entre as médias de cada variável, quantidade de CGPs, diâmetro dos núcleos das CGPs, quantidade de células de Sertoli, diâmetro dos cordões testiculares e espessura da albugínea, considerando-se as várias classes de CR ou períodos gestacionais, foi aplicado o teste "t" de Student (GRANER, 1966). O nível de significância foi estabelecido em 5% de probabilidade.

Os cálculos foram efetuados pelo software de análise estatística Splus 2000® para Windows®.

4. RESULTADOS

4.1 Localização e diferenciação gonadal

Referente à localização da crista gonádica, esta foi encontrada em cortes histológicos de embriões com DCC entre 2,0 e 5,5 cm (31 a 45 DG), quando se observou a separação entre a gônada e o mesonéfro (Figura 3). As gônadas apresentaram-se localizadas na face ventro-medial do mesonéfro, próximo à raiz do mesentério. Quanto à diferenciação gonadal, todas as amostras com CR a partir de 4,1 cm (40 DG) foram diferenciadas macroscopicamente a partir do sexo fenotípico.



Figura 3. Fotomicrografia de corte histológico de embrião eqüino sem raça definida com distância cefaloccígea = 2,3 cm (32 dias de gestação). Seta indica desprendimento da gônada em relação ao mesonéfro (ME). HE. Aumento 40x.

4.2 Células germinativas primordiais

Nos embriões com DCC = 2,0 cm (31 DG) a crista gonadal mostrou-se expandida e com presença de algumas CGPs. Essas foram visualizadas com nitidez e diferenciaram-se das células somáticas por serem maiores e possuírem núcleo grande e esférico, contendo 1 a 3 nucléolos acidófilos e citoplasma pouco corado. As CGPs apresentaram-se em grande quantidade nos embriões com DCC entre 2,0 e 2,7 cm (31 a 34 DG), fase em que foram contadas em média 5,36 células / 10.000 μm^2 , número este que diminuiu ao longo da gestação (Tabela 3; Figura 4). Os diâmetros médios dos núcleos das CGPs apresentaram crescimento descontínuo (Tabela 3).

Tabela 3. Valores médios do número de células germinativas primordiais (CGPs) por área de 10.000 μm^2 , e diâmetro de seus núcleos (μm) em função da distância cefalocccígea (DCC) e dias de gestação (DG), em embriões e fetos eqüinos sem raça definida.

DCC (cm)	DG (dias)	Número de amostras	Células contadas	Diâmetro dos núcleos (μm)
2,0 ĩ 2,7	31 ĩ 34	7	5,36	7,25
2,8 ĩ 3,6	35 ĩ 37	7	4,97	7,84
3,7 ĩ 4,5	38 ĩ 41	3	5,32	8,13
8,5 ĩ 11,5	58 ĩ 70	3	3,39	7,28
11,6 ĩ 15,0	71 ĩ 83	5	3,11	7,42
15,1 ĩ 19,9	84 ĩ 99	6	2,91	7,78
20,0 ĩ 23,5	100 ĩ 115	4	2,40	7,62
23,6 ĩ 60,0	116 ĩ 233	1	1,81	6,87

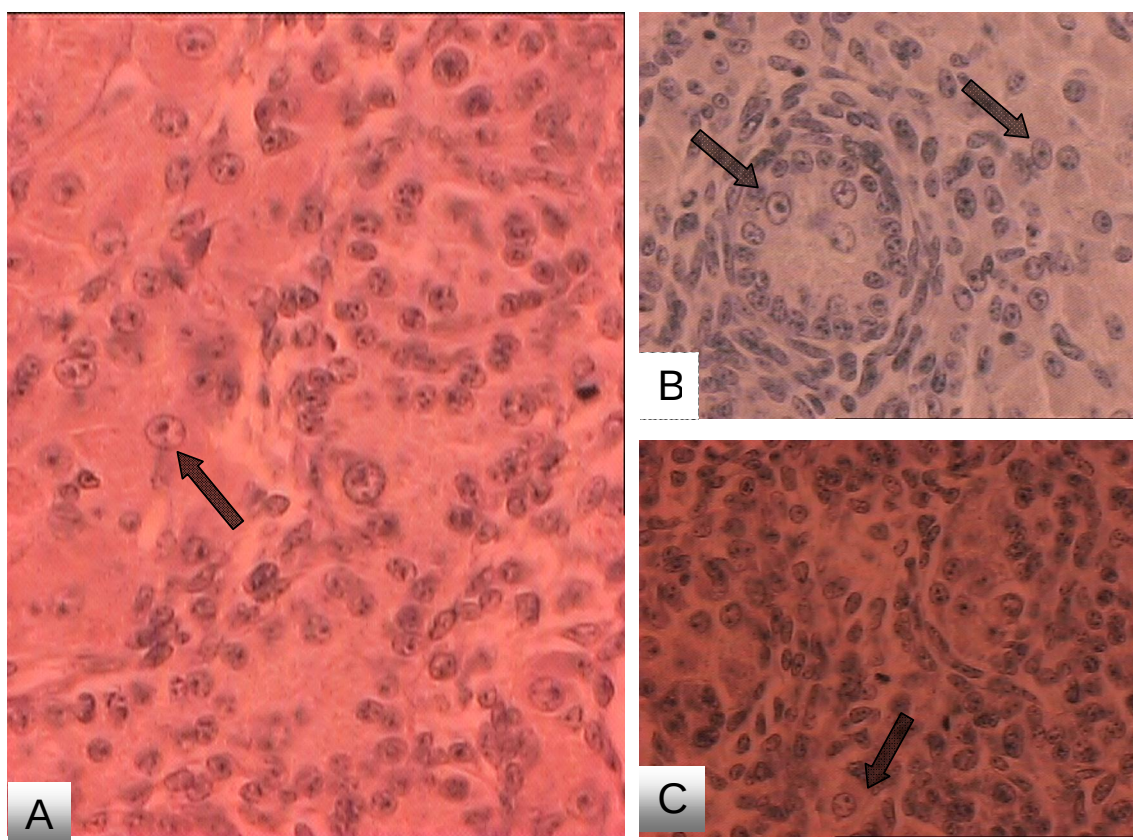


Figura 4. Fotomicrografia de cortes histológicos de testículos de fetos eqüinos sem raça definida. A. com distância cefalocácea = 6,7 cm (50 dias de gestação); B, C. com distância cefalocácea = 5,0 cm (43 dias de gestação). Setas indicam células germinativas primordiais. HE. Aumento 800x.

Observou-se a organização das CGPs em cordões testiculares nos fetos com CR = 6,0 cm (47 DG) (Figura 5).

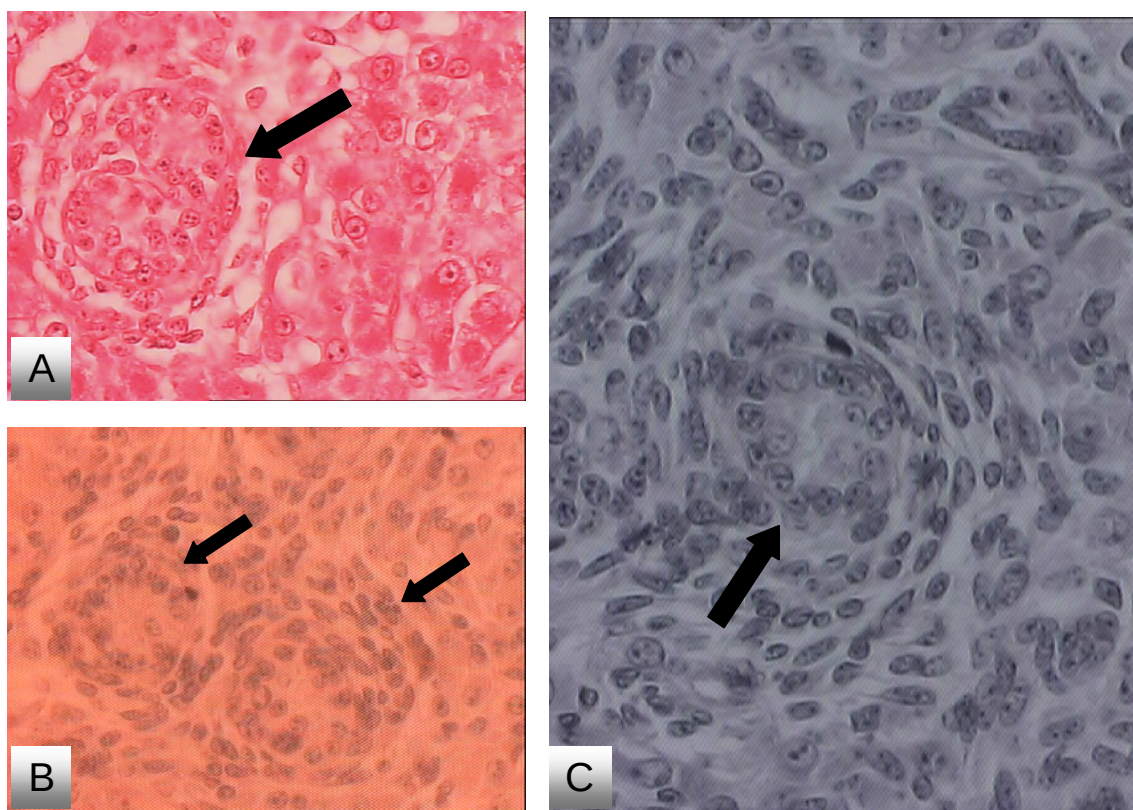


Figura 5. Fotomicrografia de cortes histológicos de testículos de fetos eqüinos sem raça definida. A. com distância cefalocícea = 8,5 cm (57 dias de gestação); B. com distância cefalocícea = 10,5 cm (77 dias de gestação); C. com distância cefalocícea = 15,5 cm (85 dias de gestação). Setas indicam formação de cordões de células germinativas primordiais. HE. Aumento 800x.

4.3 Dimensões testiculares

As dimensões médias das gônadas em embriões e fetos com CR entre 2,0 e 95,0 cm estão expressos na Tabela 4.

Tabela 4. Dimensões testiculares (comprimento, largura e espessura) em função da distância cefalococcígea (DCC) e dias de gestação (DG) em embriões e fetos eqüinos sem raça definida.

DCC (cm)	DG (dias)	Número de amostras	Comprimento (cm)	Largura (cm)	Espessura (cm)
2,0 ĩ 2,7	31 ĩ 34	7	0,3	0,2	0,2
2,8 ĩ 3,6	35 ĩ 37	7	0,3	0,1	0,1
3,7 ĩ 4,5	38 ĩ 41	3	0,4	0,2	0,2
4,6 ĩ 8,4	42 ĩ 57	19	0,5	0,3	0,3
8,5 ĩ 11,5	58 ĩ 70	14	0,8	0,4	0,4
11,6 ĩ 15,0	71 ĩ 83	14	1,1	0,7	0,7
15,1 ĩ 19,9	84 ĩ 99	13	1,6	1,0	1,0
20,0 ĩ 23,5	100 ĩ 115	10	2,3	1,4	1,3
23,6 ĩ 60,0	115 ĩ 233	31	5,0	3,1	2,9
60,1 ĩ 95,0	234 ĩ 315	14	4,9	2,9	2,7

Foi constatado substancial aumento da dimensão gonadal nos fetos com DCC até 60 cm, e dessa fase até próximo ao nascimento pequena diminuição de tamanho. Durante essa idade fetal iniciou-se nas gônadas a diferenciação entre largura e espessura.

4.4 Precursoras das células de Sertoli

As precursoras das células de Sertoli foram detectadas inicialmente em fetos com DCC = 5,0 cm (43 DG), porém foram mensuradas células de Sertoli nos fetos com DCC a partir 8,5 cm (57 DG). A quantidade de células de Sertoli aumentou até os 115 DG, praticamente dobrando o observado no período inicial, mostrando a seguir pequeno decréscimo até o final do período em questão (Tabela 5; Figura 6).

Tabela 5. Valores médios do número de precursoras de células de Sertoli por área de $10.000 \mu\text{m}^2$, em função da distância cefalocólica (DCC) e dias de gestação (DG) em embriões e fetos eqüinos sem raça definida.

DCC (cm)	DG (dias)	Número de amostras	Número de células
8,5 ÷ 11,5	58 ÷ 70	3	6,45
11,6 ÷ 15,0	71 ÷ 83	5	10,80
15,1 ÷ 19,9	84 ÷ 99	6	11,93
20,0 ÷ 23,5	100 ÷ 115	4	12,78
23,6 ÷ 60,0	116 ÷ 233	1	11,93

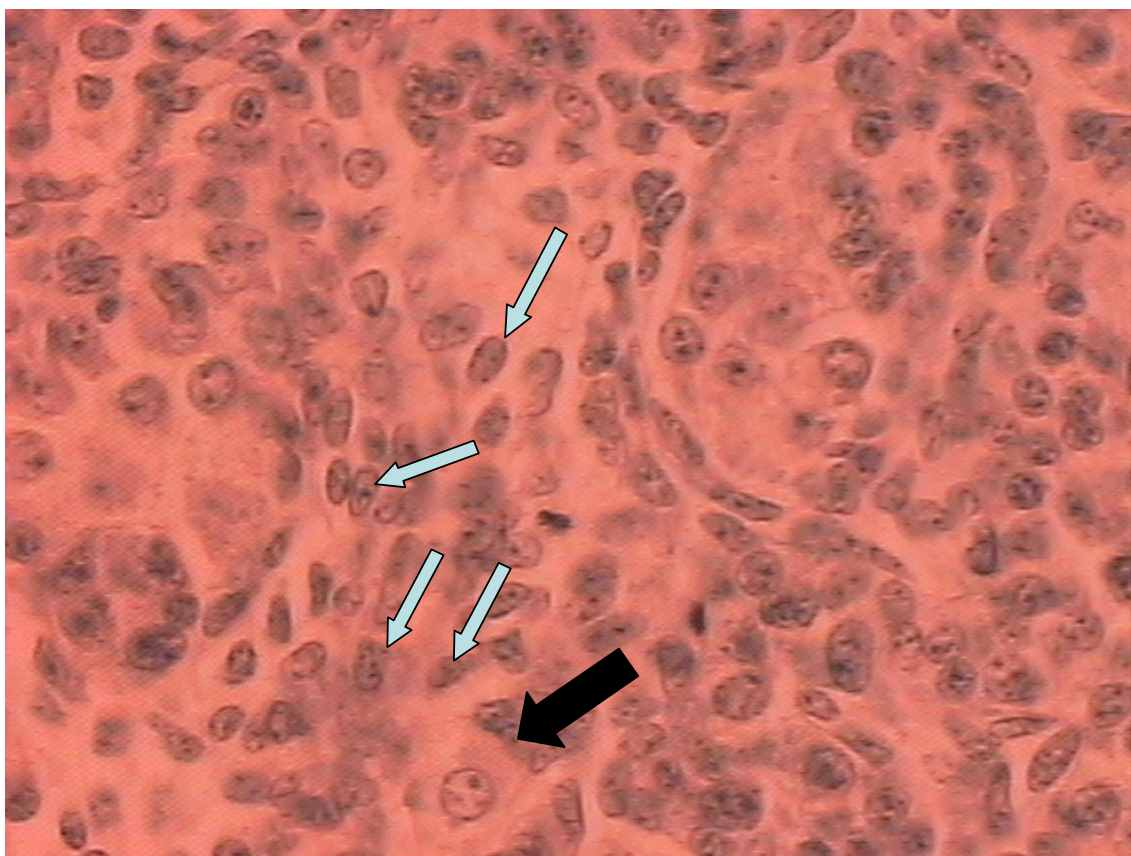


Figura 6. Fotomicrografia de corte histológico de testículo de feto eqüino sem raça definida, com distância cefalococcígea = 5,0 cm (43 dias de gestação). Seta larga indica célula germinativa e setas estreitas precursoras das células de Sertoli. HE. Aumento 800x.

4.5 Túnica albugínea

A primeira visualização da túnica albugínea deu-se nos fetos com CR = 6,5 cm (49 DG), a qual se tornou mais espessa com o avançar da gestação. São visualizados vasos sanguíneos em fetos com CR = 10,5 cm (Tabela 7; Figura 7).

Tabela 7. Valores médios da altura da albugínea (μm), em função da distância cefalococcígea (DCC) e dias de gestação (DG), em fetos eqüinos sem raça definida.

DCC (cm)	DG (dias)	Número de Amostras	Altura da albugínea (μm)
8,5 ÷ 11,5	58 ÷ 70	3	68,80
11,6 ÷ 15,0	71 ÷ 83	5	78,45
15,1 ÷ 19,9	84 ÷ 99	6	72,79
20,0 ÷ 23,5	100 ÷ 115	4	95,10

A partir de 115 DG, foi observado nas lâminas, o desprendimento da túnica albugínea do o testículo, fato este que impossibilitou precisar suas medidas.

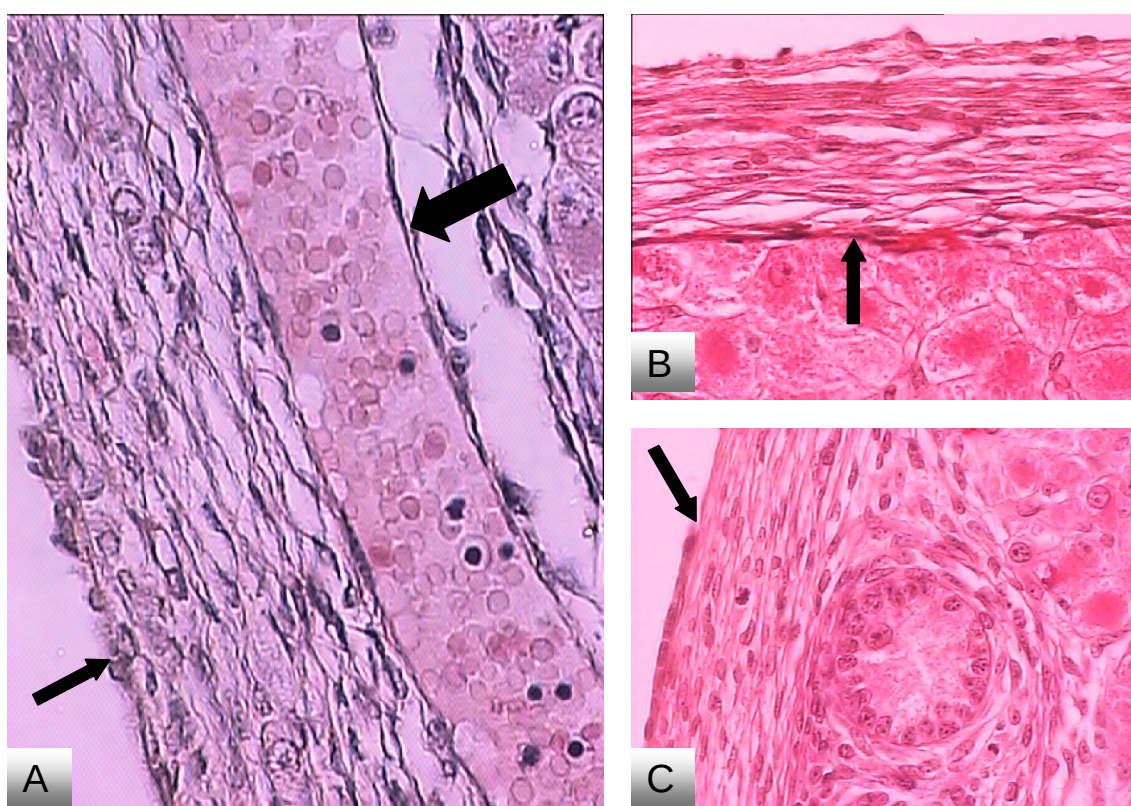


Figura 7. Fotomicrografia de cortes histológicos de testículos de fetos eqüinos sem raça definida. A. feto com distância cefalococcígea = 15,0 cm (83 dias de gestação); B. C. feto com distância cefalococcígea = 13,5 cm (77 dias de gestação) apresentando túnica albugínea. Seta larga indica vaso sangüíneo e setas estreitas túnica albugínea. HE. Aumento 800x.

4.6. Cordões gonadais

Os primeiros cordões de células germinativas foram observados nos fetos com DCC = 7,5 cm (53 DG) (Figura 8).

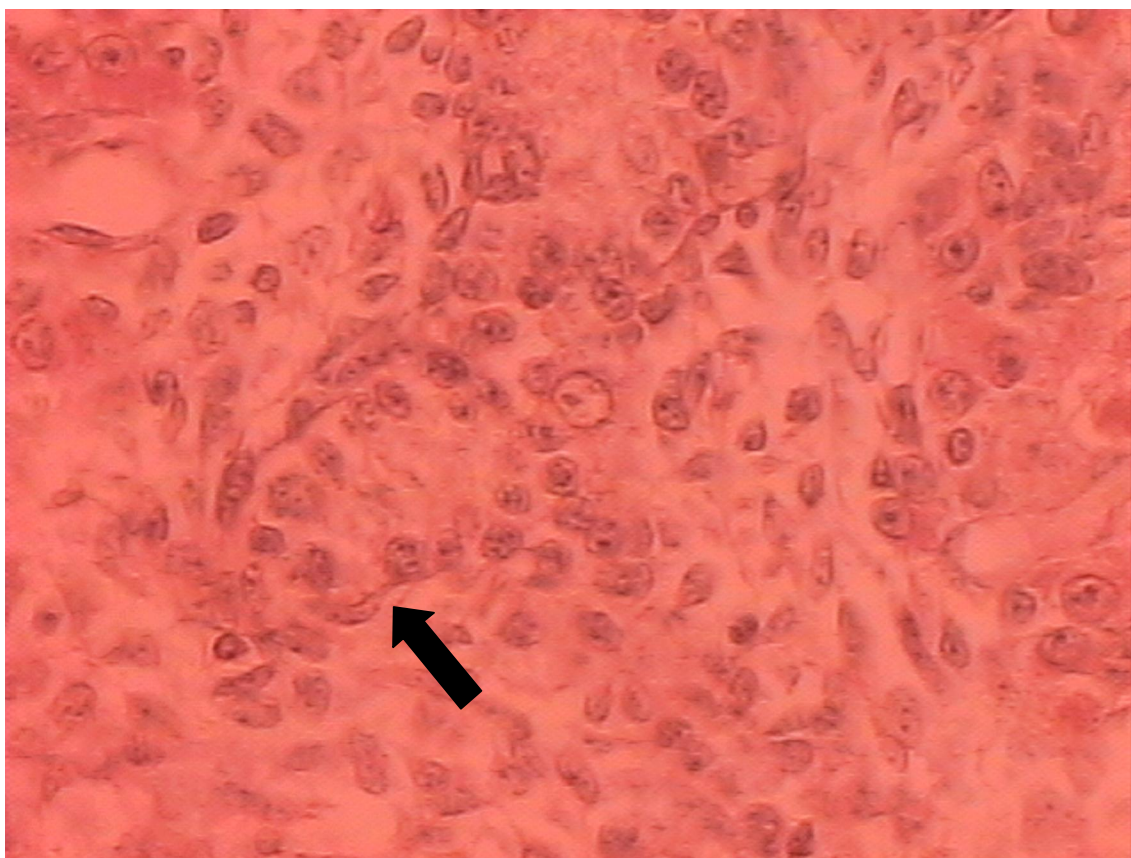


Figura 8. Fotomicrografia de corte histológicos de testículo de feto eqüino sem raça definida, com distância cefalococcígea = 7,5 cm (53 dias de gestação). Seta indica formação de cordão gonadal. HE. Aumento 800x.

Os cordões gonadais, posteriormente chamados de túbulos seminíferos, apresentaram maior crescimento entre CR 8,5 e 15,0 cm (58 a 83 DG) (Tabela 8). Observou-se no início dessa fase acentuada presença de cordões gonadais formados por células germinativas e de Sertoli. Os contornos tornam-se definidos, delimitados por uma lâmina própria e uma camada de células mioepiteliais, com núcleo alongado (Figura 9).

No interior dos cordões gonadais observam-se células menores que as CGPs, com núcleos ovais ou arredondados distribuídas próximo à lâmina própria.

Tabela 8. Valores médios dos diâmetros dos cordões gonadais (μm), em função da distância cefalococcígea (DCC) e dias de gestação (DG) em embriões e fetos eqüinos sem raça definida.

DCC (cm)	DG (dias)	Número de amostras	Diâmetro dos Cordões (μm)
8,5 ĩ 11,5	58 ĩ 70	3	36,18
11,6 ĩ 15,0	71 ĩ 83	5	47,35
15,1 ĩ 19,9	84 ĩ 99	6	47,21
20,0 ĩ 23,5	100 ĩ 115	4	49,33
23,6 ĩ 60,0	116 ĩ 233	1	51,32

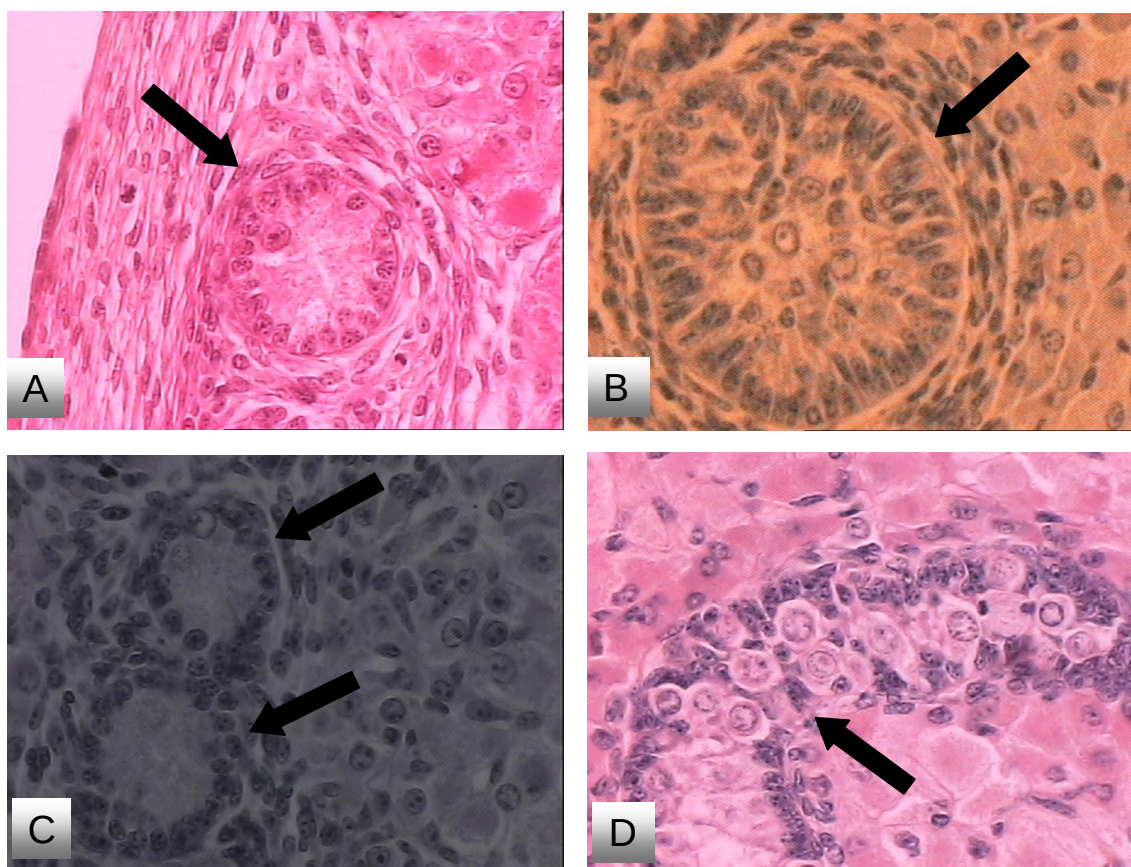


Figura 9. Fotomicrografia de cortes histológicos de testículos de fetos eqüinos sem raça definida. A. feto com distância cefalococcígea = 13,5 cm (77 dias de gestação); B. feto com distância cefalococcígea = 53,0 cm (213 dias de gestação); C. feto com distância cefalococcígea = 15,5 cm (85 dias de gestação); D. feto com distância cefalococcígea = 91,0 cm (306 dias de gestação). Setas indicam cordões gonadais em cortes transversais (A,B e C) e corte longitudinal em D. HE. Aumento 800x.

5. DISCUSSÃO

As CGPs originam tanto espermatozóides como ovócitos e são consideradas as ancestrais dos gametas. Tal como todas as outras células somáticas, elas são diplóides e nas primeiras semanas de formação do embrião já podem ser encontradas no ectoderma primário (epiblasto). Após cruzarem o mesentério dorsal e colonizarem a crista gonádica, as CGPs multiplicam-se por divisões mitóticas (MITTWOCH; DELHANTY; BECK, 1969).

Neste trabalho, as CGPs foram identificadas nos embriões com CR entre 2,0 e 2,7 cm (31 a 34 DG), período esse inferior ao descrito por Bergin et al. (1967) e Ginther (1992), que encontraram CGPs pela primeira vez em embriões com 36 DG. Comparativamente, apesar da pequena diferença em dias, deduz-se que neste experimento o aporte das CGPs à crista gonádica deu-se de modo mais rápido e iniciaram antecipadamente a colonização da crista gonádica e multiplicação celular. A quantidade dessas células diminuiu de 5,36 nos embriões apresentando CR entre 2,0 e 2,7 cm para 1,81 em fetos com CR entre 23,6 e 60,0 cm, com os diâmetros dos seus núcleos apresentando variação descontínua no crescimento, indicando a existência de dois períodos de maior divisão celular.

Para ambos os sexos, as gônadas surgem das cristas gonádicas, que são protusões bilaterais que aparecem ventromedialmente ao cordão nefrogênico. Elas são geradas por volta da quinta semana de prenhez por proliferação do epitélio celômico e espessamento do mesênquima subjacente. Nessa fase, as cristas gonadais representam os primórdios gonadais (BERGIN et al., 1967). Neste trabalho, a crista gonádica foi detectada apresentando-se nitidamente destacada do mesonéfro e não apenas como um espessamento do mesmo, fenômeno que ocorre no início do desenvolvimento embrionário. Essa observação concorda com Merchant-Larios (1979), que afirmou que o contato entre o mesonéfro e a gônada em desenvolvimento tende a diminuir rapidamente.

A crista gonádica foi primeiramente observada na porção ventro-medial do mesonéfro, o que está de acordo com relatos de vários autores (BERGIN et al., 1967; DEANESLY, 1975; WALT et al., 1979). Enquanto neste trabalho a crista gonádica foi identificada em embriões com CR entre 2,0 e 5,5 cm (31 a 45 DG), Merchant-Larios (1979) localizou-a num embrião com CR > 1,0 cm, Deanesly (1975) e Walt et al. (1979) em embriões com CR = 2,5 cm e Ginther (1992) num embrião com 36 DG.

Entre cinco e seis semanas de prenhez, as gônadas ainda encontram-se indiferenciadas e consistem de CGPs, células de suporte e células esteroidogênicas. No macho, SRY e outros genes induzem a diferenciação de células de suporte em células de Sertoli e células esteroidogênicas em células de Leydig. Por sua vez, as CGPs originarão as espermatogônias (OHNO, 1967; CAPEL; LOVELL-BADGE, 1993).

Neste trabalho, a diferenciação gonadal ocorreu em embriões com CR > 4,1 cm (> 40 DG), corroborando dados de Bergin et al. (1967) no sentido de que a determinação sexual baseada em características externas nos eqüinos é possível entre 38 e 60 DG. Ainda, Walt et al. (1979) afirmaram que o momento exato da diferenciação sexual em eqüinos não é precisamente conhecido, porém parece ocorrer entre 39 e 45 DG. Ginther (1992) cita que a diferenciação sexual baseada em características externas não pode ser feita antes de 40 a 45 DG.

Como exposto na Tabela 3, verificou-se que as dimensões testiculares aumentaram consideravelmente em fetos com CR entre 8,4 e 60,0 cm (57 a 233 DG), e diminuíram a partir daí até próximo ao nascimento. Esses resultados concordam com relatos encontrados na literatura, informando que o crescimento das gônadas é lento até 100 DG e rápido entre 100 e 200 DG. O tamanho máximo é alcançado aproximadamente aos 250 DG, diminuindo gradativamente a partir daí devido à degeneração das CIs (ALLEN, 1970; COLE et al., 1933). Em contrapartida, os dados obtidos neste trabalho discordam em parte das citações de Hay e Allen (1975), os quais relataram que os testículos de fetos eqüinos se desenvolvem acentuadamente entre 90 e 270 DG, e que a partir de 300 DG os mesmos diminuem em tamanho. Ainda sobre esse aspecto, McEntee (1990) relatou que um rápido crescimento dá-se aproximadamente entre 80 e 100 DG, alcançando o tamanho máximo por volta de 200 DG. Tsunoda et al. (1996), em análise morfométrica de fetos eqüinos entre 120 e 330 DG, relataram que o crescimento

testicular ocorre progressivamente por hiperplasia das Cls, atingindo dimensões máximas por volta de 250 DG. Da mesma forma, González-Ângulo; Hernández-Jáuregui; Márquez-Monter (1971) e González-Ângulo; Hernández-Jáuregui; Martínez-Zedillo (1975), ao investigarem fetos entre 90 e 300 DG, notaram que o desenvolvimento testicular é expressivo entre 120 e 300 DG devido à hiperplasia das mesmas.

Considerando-se fetos com CR entre 20,0 e 95,0 cm (100 a 315 DG), encontraram-se medidas testiculares que variaram de 2,3 x 1,4 x 1,3 cm a 5,0 x 3,1 x 2,9 cm para C, L e E, respectivamente (Tabela 4). Esses valores são inferiores aos obtidos por González-Ângulo; Hernández-Jáuregui; Martínez-Zedillo (1975), que descreveram testículos de fetos eqüinos com medidas de 2,5 x 1,5 x 1,5 cm a 7,0 x 5,0 x 3,5 cm para C, L e E, respectivamente, no mesmo período gestacional.

Murabayashi (1999) relata que o peso dos testículos de fetos com 215 DG chega a 80 g, e que decresce para 10 a 20 g em potros recém nascidos. Segundo o mesmo, esses fatos ocorrem devido à hiperplasia e hipertrofia do interstício, causadas por altas concentrações de gonadotropina coriônica da égua (eCG). Tanto o peso das gônadas quanto as concentrações hormonais durante a prenhez não foram objeto de investigação no presente trabalho.

Células de Sertoli foram observadas primeiramente em fetos com CR = 5,0 cm (43 DG), porém as mensurações somente foram efetuadas naqueles com CR a partir de 8,5 cm. Byskov (1986) relata que as células de Sertoli proliferam-se durante o desenvolvimento fetal e neonatal, mas que ao iniciar-se a espermatogênese na puberdade do potro o processo de mitose das mesmas não mais ocorreria. Neste trabalho, foi verificado um aumento de 6,45 células / 10.000 μm^2 em fetos com CR entre 6,5 e 11,5 cm, para 12,78 células em fetos com CR entre 20,0 e 23,5 cm.

A túnica albugínea em formação foi detectada neste trabalho nos fetos com CR = 6,5 cm (49 DG), enquanto Gropp e Ohno (1966) relataram a formação dessa estrutura em fetos de idade mais precoce, com CR entre 4,3 e 5,2 cm, (40 a 44 DG), o que pode ser explicado, entre outros fatores, por diferenças na metodologia utilizada. Nos embriões com CR = 10,5 cm (65 DG) foram observados vasos sangüíneos, achado também relatado por Gropp e Ohno (1966). No período em que a túnica albugínea foi mensurada, observou-se variação na espessura de 68,80 μm em fetos com CR = 6,5 cm (49 DG) para 95 μm em

fetos com CR = 23,5 (115 DG). Ginther (1992) descreve a túnica albugínea nos fetos com 150 DG como sendo uma densa e fibrosa cápsula.

A organização de ninhos celulares, formação primitiva dos cordões gonadais, foi inicialmente observada nos fetos com CR = 6,0 cm (47 DG), e os subseqüentes cordões gonadais completamente formados naqueles com CR = 7,5 cm (53 DG). Essa observação contrasta com Ginther (1992) e Gropp e Ohno (1966), que relataram esses achados no período entre 40 e 44 DG e aos 60 DG, respectivamente. González-Ângulo (1971) descreve cordões de gonócitos distribuídos pelo tecido, em áreas com tendência à formação de pequenas estruturas tubulares, especialmente no início da fase fetal.

Os cordões testiculares foram nitidamente visualizados nos embriões com CR a partir de 8,5 cm (57 DG), à semelhança do registrado por Ginther (1992). Esse mesmo autor descreve uma fina coluna celular, com núcleos aparentemente inativos, e ocasionalmente células grandes com núcleo pró-cromossomal. Tais células foram também observadas dentro dos cordões, e descritas como células menores que as CGPs, com núcleos ovais ou arredondados distribuídas próximo à lâmina própria. Cita ainda que por volta de 150 DG, o parênquima testicular é associado a uma tortuosa rede de túbulos distribuídos pela massa intersticial. Entre 150 e 180 DG os túbulos são envolvidos por fibroblastos, e uma bainha que envolve os poucos vasos sangüíneos nessa região.

6. CONCLUSÕES

A crista gonádica é visualizada em embriões eqüinos SRD com distância cefalococcígea entre 2,0 e 5,5 cm (31 a 45 dias de gestação);

As células germinativas primordiais iniciam a colonização das gônadas de embriões eqüinos com distância cefalococcígea entre e 2,0 cm (31 dias de gestação);

A diferenciação gonadal macroscópica ocorre em fetos com distância cefalococcígea a partir de 4,1 cm (40 dias de gestação);

As precursoras das células de Sertoli são identificadas em fetos com DCC = 5,0 cm (43 dias de gestação);

A túnica albugínea inicia sua formação em fetos com DCC = 6,5 cm (49 dias de gestação);

Cordões gonadais são visualizados em fetos com CR = 7,5 cm (53 dias de gestação).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, W. R. **Equine gonadotrophins**. 1970. 107 f. Tese (Pós-Doutorado) - University of Cambridge, Cambridge, 1970.

ALMAHBOBI, G.; PAPADOPOULOS, V.; CARREU, S.; SILBERZAHN, P. Age-Related Morphological and Funcional Changes in the Leydig Cells of the Horse. **Biology of Reproduction**, v. 38, p. 653-665, Universite Caem, France,1988.

BARROS, G.S.C.; LIMA R.A.S.; SHIROTA R.; XAVIER J. Estudo do Complexo do Agronegócio Cavalo no Brasil, **Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil**, Brasília, 2006.

BEATTY, R. A. Genetic basis for the determination of sex. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, London, v. 259, p. 3-13, 1970.

BERGIN, W. C.; GIER, H. T.; FREY, R. A.; MARION, G. B. Developmental horizons and measurements useful for age determination of equine embryos and fetuses. In: ANNUAL CONVENTION, 1967. **Proceedings...** Lexington: American Association of Equine Practitioners, 1967. p. 179-196.

BYSKOV, A. G. Regulation of meiosis in mammals. **Annals Biology of Animal Biochemistry and Biophysical**, Atlanta, v. 19, p. 1251-1261, 1979.

BYSKOV, A. G. Differentiation of mammalian embryonic gonad. **Physiological**

Reviews, Bethesda, v. 66, p. 71-117, 1986.

BYSKOV, A. G.; HOYER, P. E. Embryology of mammalian gonads and ducts. In: KNOBIL, E., NEILL, J. D. (Ed.). **The physiology of reproduction**. 2. ed. New York: Raven Press, 1994. p. 487-540.

CAPEL, B.; LOVELL-BADGE, R. The Sry gene and sex determination in mammals. **Advances in Developmental Biology**, Stamford, v. 2, p. 15-23, 1993.

CHIQUOINE, A. D. The identification, origin and migration of primordial germ cell in the mouse embryo. **The Anatomical Record**, New York, v. 118, p. 135-145, 1954.

CLEMMONS, A. J.; THOMPSON, D. L.; JOHNSON, L. Local initiation of spermatogenesis in the horse. **Biology of Reproduction**, New York, v. 52, p. 1258-1267, 1995.

COLE, H. H.; HART, G. H.; LYONS, W. R.; CATCHPOLE, H. R. The development and hormonal content of fetal horse gonads. **The Anatomical Record**, New York, v. 56, p. 275-293, 1933.

CURRAN, S.; GINTHER, O. J. Ultrasonic diagnosis of equine fetal sex by location of the genital tubercle. **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar, v. 9, p. 77-83, 1989.

DEANESLY, R. Germ cell development and the meiotic prophase in the fetal horse ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, p. 547-552, 1975. Supplement 23.

DEANESLY, R. Germ cell proliferations in the fetal horse ovary. **Cell and Tissue Research**, Heidelberg, v. 185, p. 361-371, 1977.

DONALD, L.; THOMPSON, J. R. Reproductive physiology of stallion and jack. In: **Production-system approach**. Elsevier, Hardbound, 1992, chapter 8, p. 237- 257.

EDDY, E. M. Germ plasm and the differentiation of the germ cell line. **International Review of Cytology**, San Diego, v. 43, p. 229-280, 1975.

FRANCK, M.; MARTINOT, S. Diagnosis du sexe du foetus par ecographie. **Science Veterinaires Medecine Comparee**, Marcy l'Etoile, v. 95, p. 201-208, 1993.

GINTHER, O. J. **Reproductive biology of the mare**: basic and applied aspects. Cross Plains: Equiservices, 1979. 413 p.

GINTHER, O. J.; DOUGLAS, R. H.; LAWRENCE, J. R. Twinning in mares: A survey of veterinarians and analyses of theriogenology records. Department of Veterinary Science, University of Wisconsin, Madison, **Theriogenology**, 1982.

GINTHER, O. J. Relationships among number of days between multiple ovulations, number of embryos, and type of embryo fixation in mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, Wildomar, v. 7, p. 82-88, 1987.

GINTHER, O. J. **Reproductive biology of the mare**: basic and applied aspects, 2. ed. Cross Plaines: Equiservices, 1992. p. 392-405.

GONZÁLEZ-ÂNGULO, A.; HERNANDEZ-JAUREGUI, P.; MÁRQUEZ-MONTER, H. Fine structure of gonads of the fetus of the horse (*Equus caballus*). **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 32, p. 1665-1676, 1971.

GONZÁLEZ-ÂNGULO, A.; HERNANDEZ-JAUREGUI, P.; MARTÍNEZ-ZEDILO, G. Fine structure of the gonads of the horse and its functional implications. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, p. 563-567, 1975, Supplement 23.

GRANER, E. A. **Estatística**. São Paulo: Melhoramentos, 1966. 184 p.

GREENWOOD, E. Discriminating the sexes. **Pacemaker and Thoroughbred Breeder**, Teddington, v. 1, p. 14-15, 1996.

GROPP, A.; OHNO, S. Presence of a common embryonic blastema for ovarian and testicular parenchymal (follicular, interstitial and tubular) cells in cattle, *Bos taurus*. **Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie**, Heidelberg, v. 74, p. 505-528, 1966.

GUBBAY, J.; COLLIGNON, J.; KOOPMAN, P.; CAPEL, B.; ECONOMOU, A.; MÜNSTERBERG, A.; VÍVIAN, N.; GOODFELLOW, P.; LOVELL-BADGE, R. 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**, London, v. 346, p. 245-250, 1990.

HAY, M. F.; ALLEN, W. R. An ultrastructural and histochemical study of the interstitial cells in the gonads of the fetal horse. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, p. 557-561, 1975. Supplement 23.

ING, N. H. ; LAUGHGLIN, A. M. ; VARNER, D. D. ; WELSH, T. H. ; FOREST, D. W. ; BLANHARD, T. L. ; JOHNSON, L. Gene expression in the spermatogenically inactive and maturing testicular tissues of the prepubertal colt. **Journal of Andrology**, Issue, v. 25 p. 535-544, 2004.

INOMATA, T.; EGUCHI, Y.; YAMAMOTO, M.; KANO, Y. Development of the external genitalia in bovine fetuses. **Japanese Journal of Veterinary Research**, Sapporo, v. 44, p. 489-496, 1982.

JACOBS, P. A.; ROSS, A. Structural abnormalities of the Y chromosome in man. **Nature**, London, v. 210, p. 352-354, 1966.

JEON, U. W.; KENNEDY, J. R. The primordial germ cells in early mouse embryos: light and electron microscopic studies. **Developmental Biology**, San Diego, v. 31, p. 275-284, 1973.

JIRASÉK, J. E. Principles of reproductive embryology. In: SIMPSON, J. L. (Ed.). **Disorders of sexual differentiation etiology and clinical delineation**. New York: Academic Press, 1976. p. 51-72.

JOHNSON, C. A. The role of fetal testicle in sexual differentiation. **Comparative Compendium of Continuing Education in Veterinarians Practitioners**, Jamesburg, v. 5, p. 129-132, 1983.

JOHNSON, L. Increased daily sperm production in the breeding season of stallions is explained by elevated population of spermatogonia. **Biology of Reproduction**, New York, v. 32, p. 1181-1190, 1985.

JONES, L. S.; BERNDTSON, W. E. A quantitative study of sertoli cell and germ cell populations as related to sexual development and aging in the stallion. **Biology of Reproduction**, New York, v. 35, p. 138-148, 1986.

JOST, A. Embryonic sexual differentiation (morphology, physiology, abnormalities). In: JONES, H.; WALLACE, W. (Ed.). **Hermaphroditism, genital anomalies and related disorders**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1971. p. 16-64.

JOST, A.; MAGRES, S. Sexual differentiation. In : Thibault, C; Levassuer, M. C.; Hunter, R. H. F. **Reproduction in mammals and man**. Paris: Ellipses. 1993. 450 p.

KELLOKUMPU-LEHTINEN, P.; SODERSTROM, K. Occurrence of nuage in fetal human germ cells. **Cell and Tissue Research**, Heidelberg, v. 194, p. 171-177, 1978.

Le BLANC, M. M. Equine perinatology: what we know and what we need to know.

Animal Reproduction Science, Amsterdam, v. 42, p. 189-196, 1996.

LEVINA, S. E.; GYÉVI, A.; HORVÁTH, E. Responsiveness of the ovary to gonadotrophins in pre and perinatal life: oestrogen secretion in tissue and organ cultures. **Journal of Endocrinology**, Bristol, v. 65, p. 219-223, 1975.

LOVELL-BADGE, R. The role of Sry in mammalian sex determination. In:____. **Postimplantation development in the mouse (Ciba Foundation Symposium)**. Chichester: Wiley, 1992. v. 165, p. 162-182.

LOVELL-BADGE, R. Sex determining gene expression during embryogenesis. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, London, v. 339, p. 159-164, 1993.

McENTEE, K. Embryology of the reproductive organs. In:____. **Reproductive pathology of domestic mammals**. New York: Academic Press, 1990. chapter 1, p. 1.-.7.

McLAREN, A. Development of primordial germ cells in the mouse. **Andrologia**, Berlin, v. 24, p. 243-247, 1992.

MERCHANT-LARIOS, H. The role of germ cells in the morphogenesis and cytodifferentiation of the rat ovary. In: MÜLLER-BERAT, N. (Ed.). **Progress in differentiation research**. Amsterdam: North-Holland Publishing Co., 1976. p. 453-462.

MERCHANT-LARIOS, H. Ultrastructural events in horse gonadal morphogenesis. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, p. 479-485, 1979. Supplement 27.

MITTWOCH, U.; DELHANTY, J. D. A.; BECK, F. Growth of differentiating testes and ovaries. **Nature**, London, v. 224, p. 1323-1325, 1969.

MÜLLER, U.; ASCHMONEIT, L.; ZENSES, M. T.; WOLF, U. Binding studies of H-Y antigen in rat tissues. Indications for a gonad-specific receptor. **Human Genetics**, Heidelberg, v. 43, p. 151-157, 1978.

MURABAYASHI, H. ; HONDO, E. ; KITAMURA, N. ; FURUOKA, F. ; TAGUCHI, K. ; NAMBO, Y. ; YAMADA, J. Morphological study on pigmented cells in the horse testis. **Japanese Journal of Veterinary Research**. v. 6, p. 1183-1186, 1999.

NAGAI, Y.; CICCARESE, S.; OHNO, S. The identification of human H-Y antigen and testicular transformation induced by its interaction with the receptor site of bovine fetal ovarian cells. **Differentiation**, Berlin, v. 13, p. 155-164, 1979.

NAVES C. S. Desenvolvimento morfológico dos ovários em embriões e fetos eqüinos sem raça definida. 2005. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

OHNO, S. **Sex chromosomes and sex-linked genes**. Berlin: Springer Verlag, 1967. p. 149-174.

PATEK, C. E.; KERR, J. B.; GOSDEN, R. G. Sex chimaerism, fertility and sex determination in the mouse. **Development**, Hull, v. 113, p. 311-325, 1991.

PEIPPO, J.; HUHTINEN, M.; KOTILAINEN, T. Sex diagnosis of equine preimplantation embryos using the Polymerase Chain Reaction. **Theriogenology**, New York, v. 44, p. 619-627, 1995.

PETERS, H. Migration of gonocytes into the mammalian gonad and their differentiation. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, London, v. 259, p. 91-101, 1970.

POLANI, P. E. Pairing of X and Y chromosomes, non-inactivation of X-linked genes, and the maleness factor. **Human Genetics**, Heidelberg, v. 60, p. 207-211, 1982.

QUATTROPANI, L. S.; WISLOCKI, J. Conversion of progesterone to estrone and estradiol in vitro by the ovary of the infantile rat in relation to the development of its interstitial tissue.

Endocrinology, Bethesda, v. 6, p. 1269-1276, 1973.

SHORT, R. V. Sex determination and differentiation. In: AUSTIN, C.R.; SHORT, R.V. (Ed.).

Reproduction in mammals: embryonic and fetal development. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1982. p. 70-113.

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

SINCLAIR, A. H.; BERTA, P.; PALMER, M. S.; HAWKINS, J. R.; GRIFFITHS, B. L.; SMITH, M. J.; FOSTER, J. W.; FRISCHAUF, A. M.; LOVELL-BADGE, R.; GOODFELLOW, P. N. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. **Nature**, London, v. 346, p. 240-244, 1990.

SNOW, M. H. I. Autonomous development of parts isolated from primitive streak stage mouse embryos. Is development clonal? **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, Cambridge, v. 65, p. 269-287, 1981.

SNOW, M. H. I.; MONK, M. Emergence and migration of mouse primordial germ cells. In: McLAREN, A.; WYLIE, C. C. (Ed.). **Current problems in germ cell differentiation** Cambridge: Cambridge University Press, 1983, p. 115-135.

STEINBERGER, E.; STEINBERGER, A. Spermatogenic function of the testis. In: GREEP, R. O.; AATWOOD, E. B. (Ed.). **Handbook of physiology and endocrinology**. Washington: American Physiological Society, 1975. v. 5, p. 1-19.

THOMPSON, D. L. JR. Reproductive physiology of the stallion and jack. In: EVANS, J. W. (Ed.) **Horse breeding and management**. 1 ed. Texas: Elsevier, 1992. p. 237-257.

TSUNODA, N.; NOBORU, M.; NAGATA, S., NAGAMINE, N.; NAMBO, Y.; OIKAWA, M.; TANIYAMA, H.; WATANABE, G.; TAYA, K. A morphometric study of interstitial cells in equine fetal gonads. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v. 42, p. 91-95, 1996.

VIGIER, B.; PREPIN, J.; JOST, A. Chronologie du développement de l'appareil genital du foetus de veau. **Archives D'anatomie, Microscopy, Morphology and Experiment**, Dijon, v. 65, p. 77-101, 1976.

WACHTEL, S. S. H-Y antigen and genetics of sex determination. **Science**, Washington, v. 198, p. 797-799, 1977.

WACHTEL, S. S.; OHNO, S.; KOO, G. C.; BOYSE, E. A. H-Y antigen and male development. In: TROEN, P.; NANKIN, H. R. (Ed.). **The testis in normal and infertile men**. New York: Raven, 1975. p. 35-43.

WALT, M. L.; STABENFELDT, G. H.; HUGHES, J. P.; NEELY, D. P.; BRADBURY, R. Development of the equine ovary and ovulation fossa. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, p. 471-477, 1979. Supplement 27.

WELSHONS, W. J.; RUSSEL, L. B. The Y chromosome as the bearer of male determining factor in the mouse. **National Academy of Sciences. United States of America Proceedings**, Washington, v. 45, p. 560-566, 1959.

WITSCHI, E. Migration of the germ cells of human embryos from the yolk sac to the primitive gonadal fold. **Contributions to Embryology**, Washington, v. 32, p. 67-80, 1948.