

# DIFERENÇAS ULTRA-ESTRUTURAIS ENTRE AS CÉLULAS DE LEYDIG DE CAVALO, JUMENTO E SEU HÍBRIDO

FERNANDA DA CRUZ LANDIM E ALVARENGA

Professor Assistente

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP

Campus de Botucatu

ALVARENGA, F.C.L. Diferenças ultra-estruturais entre as células de Leydig de cavalo, jumento e seu híbrido. *Braz. J. vet. Res. aním. Sci.*, São Paulo, v.29, n.2, p.173-80, 1992.

**RESUMO:** A ultra-estrutura das células de Leydig de cavalos, jumentos e burros foi comparada com o intuito de se estudar as diferenças morfológicas existentes. Todas as células estudadas apresentam um retículo endoplasmático liso bem desenvolvido, característico das células produtoras de hormônios esteróides. No cavalo, no entanto, esta organela aparentemente se apresenta mais abundante. As mitocôndrias encontradas são pequenas, redondas e numerosas. Nos jumentos e burros uma grande quantidade de microfilamentos aparece próximo ao núcleo. A função destes filamentos é ainda desconhecida pois parece não existir razão para a presença de um citoesqueleto tão desenvolvido em células intersticiais, imóveis e sem função de sustentação, exceto, talvez, a relação com o transporte de substâncias precursoras de esteróides e/ou organelas intracelulares.

**UNITERMOS:** Células de Leydig, ultra-estrutura; Cavalos; Jumentos

## INTRODUÇÃO

A regulação da espermatogênese nos mamíferos é mediada por hormônios do hipotálamo, hipófise e tecido endócrino testicular. No testículo, a secreção dos hormônios é realizada pelas células intersticiais, também denominadas células de Leydig. Estas células, sob o estímulo da gonadotrofina hipofisária (LH), secretam andrógenos que irão estimular o desenvolvimento dos gametas. Assim como as demais células produtoras de hormônios esteróides, as células de Leydig apresentam um retículo endoplasmático liso (REL) muito desenvolvido e mitocôndrias com cristas tubulares.

A ultra-estrutura das células intersticiais tem sido descrita em diversos animais: homens (FAWCETT; BURGOS

<sup>5</sup>, 1960), ratos (LEESON <sup>8</sup>, 1963; MORI; CHRISTENSEN <sup>10</sup>, 1980), cobaias (CHRISTENSEN <sup>4</sup>, 1965), porcos (BELT; CAVAZOS <sup>3</sup> 1967; LUNSTRA et al. <sup>9</sup> 1986) e cavalos (GONZALEZ-ANGULO et al. <sup>6</sup>, 1975; ALMAHBOBI et al. <sup>2</sup>, 1988). Embora estas células possuam características gerais comuns nas diferentes espécies, podem diferir em alguns detalhes estruturais.

HERNANDEZ-JAUREGUI e MARQUEZ MONTER <sup>7</sup> (1977) ao compararem a ultra-estrutura do testículo de cavalos, jumentos e burros constataram que embora o número de células de Leydig nos burros estivesse diminuído, estas apresentavam um aspecto semelhante ao de outras espécies; no entanto, tal trabalho atém-se basicamente às alterações que ocorrem a nível de células germinativas e não ao tecido intersticial.

Como as células de Leydig tanto de jumento como de burros não estão descritas na literatura consultada, este trabalho tem por objetivo a realização de um estudo estrutural comparativo entre células de Leydig de cavalos, jumentos e burros.

## MATERIAL E MÉTODO

O presente estudo foi realizado no laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto de Biociências da UNESP, campus de Botucatu.

Foram utilizados 4 burros (*Equus asinus* X *Equus caballus*), 2 jumentos (*Equus asinus*) e 2 cavalos (*Equus caballus*), com idade entre 2,5 e 3 anos. Os animais foram submetidos à castração e pequenos fragmentos de tecido testicular foram retirados e fixados em glutaraldeído 2,5%, em tampão cacodilato de sódio 0,1M, a 4 °C. Após o tempo de fixação o material foi lavado em mesmo tampão. A pós-fixação foi feita em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão durante 3 horas à temperatura de 4 °C. Após esse tempo, foi efetuada a lavagem por três vezes em água bidestilada. Procedeu-se então à desidratação, a qual foi realizada em séries de acetona com concentrações crescentes (30, 50, 70, 90, 100%) durante 5 minutos cada. A inclusão foi então realizada em Epon 812.

Os cortes ultrafinos foram obtidos com navalha de diamante e colhidos em grades de cobre, corados com acetato de uranila e citrato de chumbo (REYNOLDS <sup>11</sup>, 1963) e examinados ao microscópio eletrônico de transmissão, modelo Phillips EM 301.

As fotografias foram obtidas utilizando-se filme Eastman Kodak 35 mm 5302, revelado com D-19 e copiado em papel Kodabromide F2 ou F3.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As células de Leydig de cavalos, jumentos e burros apresentam núcleo arredondado, muitas vezes de contornos

irregulares, com massas de heterocromatina distribuída irregularmente e nucléolos proeminentes.

No cavalo, o retículo endoplasmático liso aparece extremamente desenvolvido (Fig. 1A) e constituído por pequenas vesículas compactadas, distribuídas por todo o citoplasma, com exceção de áreas onde estão presentes agrupamentos de mitocôndrias (Fig. 1B). Estas mitocôndrias apresentam forma oval ou arredondada, matriz de média densidade eletrônica e cristas pouco numerosas. Algumas mitocôndrias apresentam-se dilatadas e outras aparentemente em divisão (Fig 1B - setas). O retículo endoplasmático rugoso aparece em pequena quantidade, sendo constituído por perfis isolados de cisternas localizadas principalmente na região perinuclear, enquanto polirribossomos livres apresentam-se espalhados por entre o retículo liso (Fig. 1A e 1B). O complexo de Golgi apresenta-se sob a forma de vários dictiossomas de tamanho reduzido espalhados pela célula (Fig. 1B). Na região perinuclear observa-se pequena quantidade de microfilamentos distribuídos irregularmente. Existe ainda no citoplasma, abundância de grãos de elevada electrodensidade, provavelmente estruturas de natureza lisossômica.

No caso dos jumentos as células de Leydig apresentam características ultra-estruturais ligeiramente diferentes. O retículo endoplasmático liso, embora abundante, ocorre aparentemente em menor quantidade, constituído por estruturas tubulares dispersas pelo citoplasma (Fig. 2). Entre os túbulos do retículo endoplasmático liso são vistas mitocôndrias pequenas de forma arredondada, matriz de elevada electrodensidade e cristas mais abundantes. Aparentemente possuem um maior número de mitocôndrias quando comparadas às do cavalo, sendo que algumas das mitocôndrias apresentam sinais de degeneração (Fig. 2 - setas) caracterizados por figuras mielínicas em seu interior. Esta característica das mitocôndrias é frequentemente observada em células produtoras de hormônios esteróides e parece ser devida ao desgaste que ocorre nestas organelas por estarem elas envolvidas diretamente na síntese de esteróides. Da mesma maneira, o grande número de mitocôndrias em divisão observado nos cavalos, assim como a morfologia vacuolizada destas, a qual é característica de organelas jovens, aparentemente está relacionado à reposição de tais organelas (ALBERTS et al. <sup>1</sup>, 1983). Assim, a diferença existente na morfologia das mitocôndrias de cavalos e jumentos parece ser, simplesmente, devida a estarem estas células em diferentes fases de seu ciclo.

Na região perinuclear das células de Leydig de jumentos observa-se depósito de grande quantidade de microfilamentos, dispostos sem arranjo preferencial (Fig. 2). O complexo de Golgi, como no cavalo, é bem evidente e desenvolvido, sem no entanto assumir grandes dimensões. No citoplasma das células de jumento também são vistos grânulos de elevada densidade eletrônica provavelmente de natureza lisossômica (Fig. 2).

As células de Leydig de burros apresentam características intermediárias quando comparadas às espécies parentais. O retículo endoplasmático liso, embora apresente um aspecto vesicular semelhante ao das células de cavalo, distribui-se pelo citoplasma de maneira semelhante à observada nos jumentos (Fig. 3B). As mitocôndrias encontram-se distribuídas por entre o retículo endoplasmático liso, são pequenas, com matriz de elevada densidade eletrônica e cristas evidentes as quais eventualmente assumem um aspecto vesicular (Fig. 3 - setas). Em alguns casos estas organelas aparecem com um aspecto alongado (Fig. 3B). Como o material testicular utilizado foi coletado de diferentes animais em diversas épocas do ano e a morfologia das células de Leydig se manteve constante, foi descartada a hipótese da diferente quantidade de retículo endoplasmático liso estar ligada à atividade metabólica da célula, parecendo ser uma característica da espécie.

A quantidade de microfilamentos encontrada nas células de Leydig de burros é bem maior que a presente nas células de cavalos, porém menor que a presente em jumentos. Aparentemente a presença destes filamentos é responsável pela menor quantidade de retículo endoplasmático liso observada nas células de Leydig dos jumentos e burros, uma vez que estes ocupam boa parte do citoplasma. Frequentemente os filamentos se dispõem sem arranjo preferencial (Fig. 3A e 3B), mas em pelo menos uma célula estes se apresentam com arranjo concêntrico (Fig. 4B). A quantidade e distribuição deste material também varia de célula para célula em um mesmo animal. Na maioria das células aparece em grandes quantidades, distribuído ao redor do núcleo (Fig. 3A), podendo, no entanto, se encontrar isolado em porções do citoplasma mais afastadas (Fig. 4B). Outras células, entretanto, apresentam pequena quantidade deste material disposto ao redor do núcleo (Fig. 3B e 4A). O mesmo tipo de estruturas filamentosas foi visto em células de Sertoli, as quais têm em comum com as células de Leydig o contorno irregular do núcleo e a síntese de hormônios esteróides.

A função de tais filamentos nas células de Leydig é obscura, pois não existe razão aparente para a presença de um citoesqueleto tão desenvolvido e evidente em células intersticiais, imóveis e sem função de sustentação, exceto, talvez, a sua relação com o transporte de precursores de esteróides e/ou organelas intracelulares.

Diferentemente das células de cavalo e de jumento, nas células de Leydig de burros encontram-se depósitos de material lipídico, possivelmente colesterol, os quais podem estar localizados no interior da massa de microfilamentos (Fig. 4B) ou esparsos pelo citoplasma (Fig. 3 e 4B). As gotas de lipídio apresentam electrodensidade média e com frequência apresentam uma zona de baixa electrodensidade em seu interior (Fig. 3 e 4B). Este aspecto pode ser devido à presença de material lipídico de natureza diferente dentro da mesma gota, pois o lipídio apresenta maior

electrodensidade quanto maior for a quantidade de ácidos graxos insaturados. Outra explicação para as diferentes tonalidades do lipídio seria o processo de mobilização deste, sendo que neste caso é mais característico o aspecto lamelar dos bordos dos grânulos (Fig. 4A).

Nos burros, os grânulos de origem lisossômica aparecem em menor quantidade quando comparado as espécies parentais. No entanto, a mobilização do lipídio pode contribuir para a formação de resíduos formando grânulos electrodensos, os quais são de natureza lisossômica. Estes grânulos podem também se originar devido à degeneração de material estocado que não foi totalmente digerido ou eliminado.

Desta maneira, a diferença quanto à quantidade e tipo de grânulos observados entre cavalos, jumentos e burros parece ser devida a diferenças quanto ao momento metabólico em que se encontra a célula.

As células de Leydig de burros, apesar de apresentarem pequenas diferenças quando comparadas às das espécies parentais, possuem um aspecto geral de célula esteroidogênica normal, estando, portanto, aptas a desempenharem sua função de produção hormonal.

ALVARENGA, F.C.L. Ultrastructural differences between Leydig cells of horses: asses and hinnies. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, São Paulo, v.29, n.2, p.173-80, 1992.

**SUMMARY:** The ultrastructure of Leydig cells of horses, asses and hinnies was compared to show the morphological differences among them. These cells have a well developed smooth endoplasmic reticulum, indicating a normal steroidogenic activity, but in the horse, this organelle seems to be a little more abundant. The mitochondria was round, small and numerous. In asses and hinnies a great amount of microfilaments appear mainly near the nuclei. The function of these filaments is unknown, because there is no aparent reason for these cells to have a well developed cytoskeletal since they are imobile and don't have a supporting function, except, by, the steroids precursors and intracellular organelles transport.

**UNITERMS:** Leydig cells, ultrastructure; Horse; Donkey

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01-ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATDON, J.D. *Molecular biology of the cell*, Garland Publishing, 1983. p.9, 259: The biogenesis of mitochondria and chloroplasts.

02-ALMAHBOBI, G.; PAPADOPOULOS, V.; CARREAU, S.; SILBERZAHN, P. Age related morphological and functional changes in the Leydig cells of the horse. *Biol. Reprod.*, v.38, p.653-65, 1988.

03-BELT, W.D.; CAVAZOS, L.F. Fine structure of the interstitial cells of Leydig in the boar. *Anat. Rec.*, v.158, p.333-50, 1967.

04-CHRISTENSEN, A.K. The fine structure of the testicular interstitial cells in guinea pigs. *J. cell Biol.*, v.26, p.911-35, 1965.

05-FAWCETT, D.W.; BURGOS, M.H. Studies on the fine structure of the mammalian testis. II. The human interstitial tissue. *Amer. J. Anat.*, v.107, p.245-69, 1960.

06-GONZALEZ-ANGULO, A.; HERNANDEZ-JAUREGUI, P.; MARTINEZ-ZEDILLO, G. Fine structure of the gonads of the horse and its functional implications. *J. Reprod. Fertil.*, p.563-7, 1975. Supplement 23. /Apresentado ao 1º International Symposium on Equine Reproduction, Cambridge, 1974/

07-HERNANDEZ-JAUREGUI, P.; MARQUEZ MONTER, H. Fine structure of mule testis: light and electron microscopy study. *Amer. J. vet. Res.*, v.38, p.443-7, 1977.

08-LEESON, C.R. Observations on the fine structure of rat interstitial tissue. *Acta anat. (Basel)*, v.52, p.34-48, 1963.

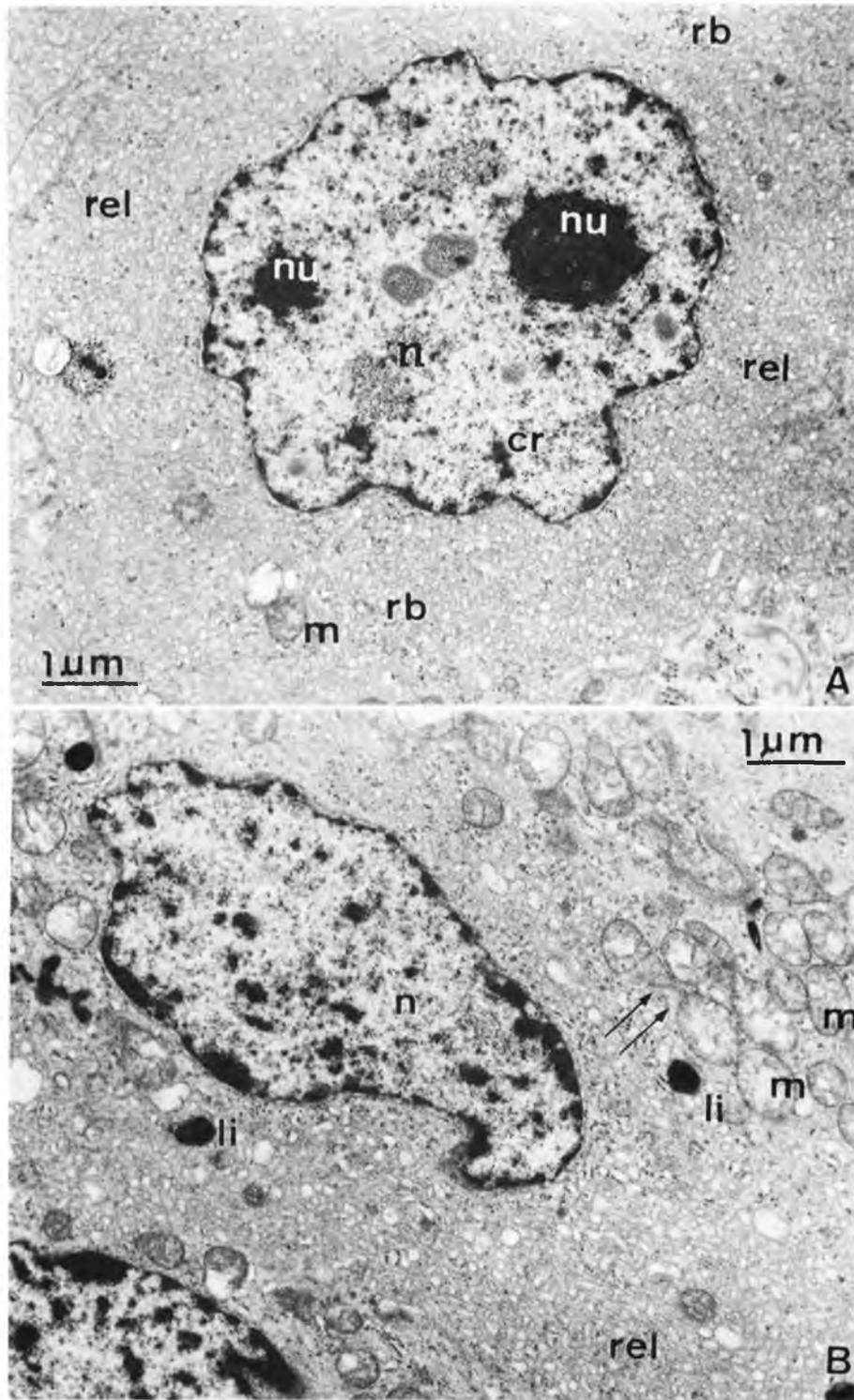
09-LUNSTRA, D.D.; FORD, J.J.; CHRISTENSON, R.K.; ALLRICH, R.D. Changes in Leydig cell ultrastructure and function during pubertal development in the boar. *Biol. Reprod.*, v.34, p.145-58, 1986.

10-MORI, H.; CHRISTENSEN, A.K. Morphometric analysis of Leydig cells in the normal rat testis. *J. cell. Biol.*, v.84, p.340-54, 1980.

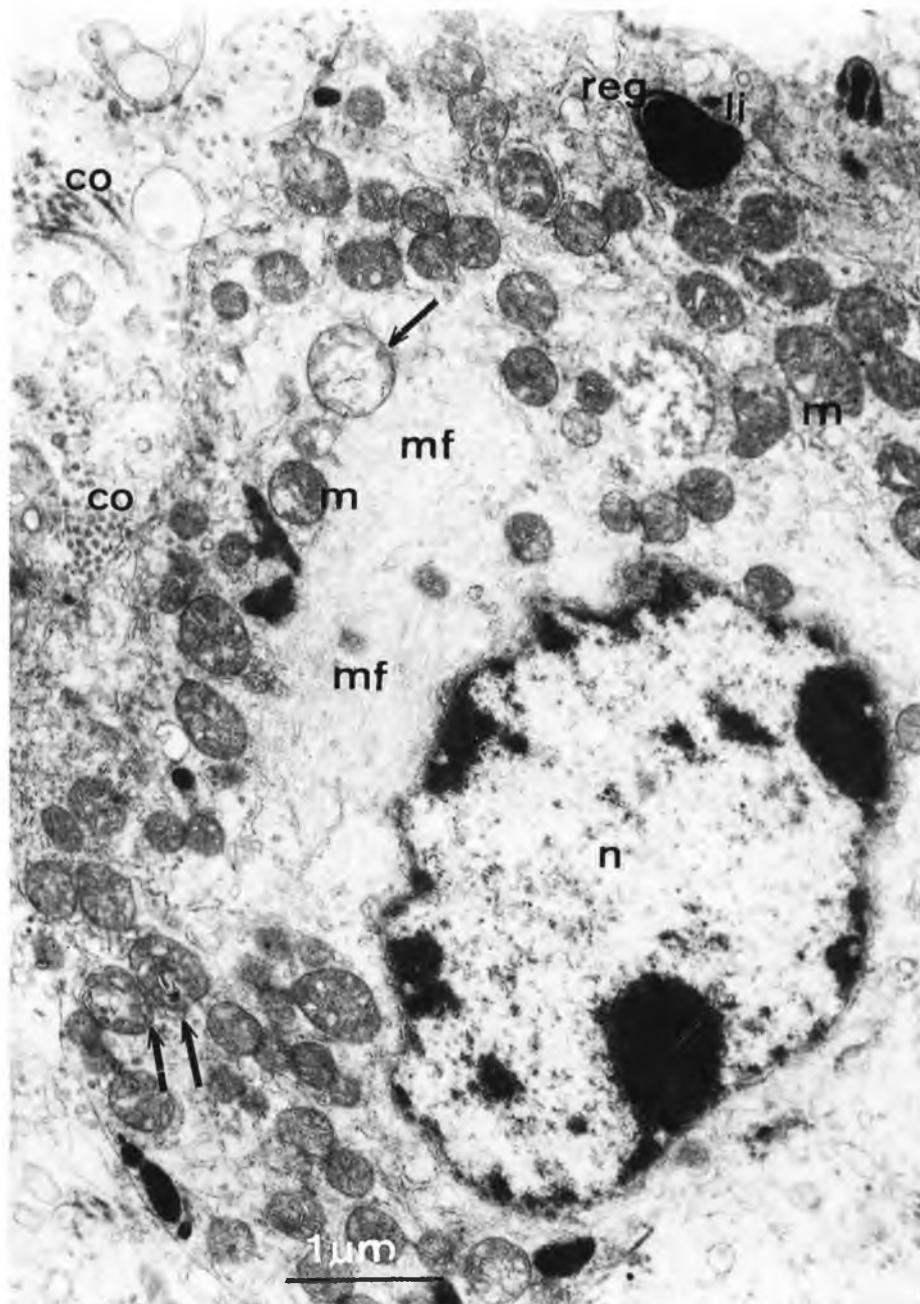
11-REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. cell Biol.*, v.17, p.208-13, 1963.

Recebido para publicação em 16/01/92

Aprovado para publicação em 21/05/92



**FIGURA 1** - Células de Leydig de cavalos. A) Micrografia mostrando características do retículo endoplasmático liso (rel) e do núcleo (n). B) Aspectos das mitocôndrias (m) e lisossomos (li) em célula de Leydig. (rb = ribossomos; nu = nucléolo; cr = cromatina)



**FIGURA 2** - Célula de Leydig de jumento, mostrando grande quantidade de microfilamentos (mf) ao redor do núcleo (n). Setas indicam mitocôndrias (m) em degeneração. (co = colágeno; reg = retículo endoplasmático rugoso; li = lisossomos)