

KÁTERIN ELENA BOHORQUEZ GRONDONA

**MORFOMETRIA DO ÓRGÃO VOMERONASAL E DO TESTÍCULO,
COMPORTAMENTO SEXUAL DE COELHOS E PERFIS DE
TESTOSTERONA E ANDROSTENEDIONA APÓS CAUTERIZAÇÃO DO
DUCTO INCISIVO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

G873m
2012

Grondona, Káterin Elena Bohorquez, 1979-
Morfometria do órgão vomeronasal e do testículo,
comportamento sexual de coelhos e perfis de testosterona
e androstenediona após cauterização do ducto incisivo /
Káterin Elena Bohorquez Grondona. – Viçosa, MG, 2012.
xi, 91f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Laércio dos Anjos Benjamin.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f. 79-91.

1. Coelho. 2. Órgão vômer-nasal. 3. Testículos.
4. Testosterona. 5. Feromonas. 6. Leydig, Células de.
7. Sertoli, Células de. 8. Coelho - Comportamento sexual.
9. Hormônios. 10. Puberdade. I. Universidade Federal de
Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 636.9322

KÁTERIN ELENA BOHORQUEZ GRONDONA

**MORFOMETRIA DO ÓRGÃO VOMERONASAL E DO TESTÍCULO,
COMPORTAMENTO SEXUAL DE COELHOS E PERFIS DE
TESTOSTERONA E ANDROSTENEDIONA APÓS CAUTERIZAÇÃO DO
DUCTO INCISIVO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 19 de julho de 2012

Prof^a. Gleide Fernandes de Avelar

Prof. Eduardo Paulino da Costa

Prof. Cláudio José Borela Espescht

Prof. Germán Arturo Bohórquez Maheha
(Co-orientador)

Prof. Laércio dos Anjos Benjamin
(Orientador)

Aos meus pais Germán e Luz Helena
por dedicarem sua vida a mim.

Ao meu marido Túlio, pelo amor
incondicional.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença e cuidado constante.

Ao professor Laércio dos Anjos Benjamin pela amizade, ensinamentos, paciência, e principalmente, por ter me acolhido e aceitado me orientar.

Ao meu pai, meu maior exemplo de profissional e ser humano. Obrigada por me ensinar tanto, por ser minha referência.

À minha mãe Luz Helena que sempre fez dos meus sonhos também seus sonhos. Obrigada por não me deixar desistir, nunca.

Ao meu marido Túlio por todo amor, paciência, companheirismo e renúncia.

Às minhas irmãs Karen, Carolina e Graciela por todo carinho e compreensão. Obrigada por trazerem alegria à minha vida.

À minha família colombiana que mesmo de longe sempre me apoiaram.

Ao professor Luiz Renato França, por ter cedido seu laboratório para as fotografias.

Ao prof. José Carlos por todo o carinho e ensinamentos.

Aos amigos Joaquin e Marlene por terem me acolhido com tanto carinho em sua casa.

Às amigas e Profas. Gleide e Sarah, pela amizade e pelos valiosos ensinamentos.

Aos amigos Sanely, Polyana, Ana Luzia, Valeska, Vanessa, Angélica, Ana Paula, Daniela, Tima, George e Lucas pela amizade, companheirismo e incentivo.

A meu orientado, Neto, pela colaboração e apoio.

Aos colegas da UFPB, pelo apoio.

À secretária do programa de Pós-graduação do Departamento de Veterinária da UFV, Rosi, por toda paciência e carinho.

Aos demais professores, colegas e funcionários do Departamento de Veterinária que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste curso.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), particularmente ao Departamento de Veterinária, pela oportunidade de realização do curso.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa de estudo.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante dos meus olhos”

Isaac Newton

BIOGRAFIA

Káterin Elena Bohorquez Grondona, filha de Germán Arturo Bohórquez Mahecha e Luz Helena Grondona de Bohórquez nasceu em Belo Horizonte-MG, em 22 de agosto de 1979.

Ingressou em março de 1997 no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, graduando-se em 09 de maio de 2002. Em março de 2004, iniciou o curso de Mestrado em Ciências, na Universidade de São Paulo-SP, no programa de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres, obtendo título em 14 de dezembro de 2005. Em agosto de 2007, iniciou o curso de Doutorado em Medicina Veterinária, na Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de morfologia, submetendo-se aos exames finais de defesa de tese em julho de 2012.

Atualmente é professora assistente I na Universidade Federal da Paraíba, sendo professora responsável pela disciplina de Anatomia dos Animais Domésticos.

RESUMO

GRONDONA, Káterin Elena Bohórquez, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2012. **Morfometria do órgão vomeronasal e do testículo, comportamento sexual de coelhos e perfis de testosterona e androstenediona após cauterização do ducto incisivo.** Orientador: Laércio dos Anjos Benjamin. Coorientadores: Germán Arturo Bohórquez Mahecha e Cláudio César Fonseca.

No coelho doméstico (*Oryctolagus cuniculus*) o órgão vomeronasal desemboca na parte rostral do palato duro através do ducto incisivo. Este ducto permite que os feromônios alcancem e estimulem este órgão. A obstrução do ducto incisivo, induzida pela cauterização, ocasiona alterações morfológicas no órgão vomeronasal e no testículo. Para desenvolver o presente estudo, 16 coelhos da raça Nova Zelândia machos saudáveis, aos 60 dias de idade, tiveram seus ductos incisivos cauterizados após anestesia. Outros 16 coelhos da mesma raça e idade foram utilizados como grupo controle. Posteriormente, oito animais de cada grupo (controle e cauterizado) foram sacrificados em dois momentos diferentes: aos 120 e 180 dias de idade. Para a retirada do órgão vomeronasal, testículos, músculo esquelético e osso, os animais também foram anestesiados e a seguir, foram perfundidos com solução fixadora. Os órgãos foram coletados e submetidos a procedimentos de rotina para estudos histológicos, ultraestruturais e por meio de técnicas estereológicas e morfométricas. Para estudos biométricos, morfometria testicular e dosagens de testosterona, os animais com 180 dias foram divididos em subgrupos com baixas e altas concentrações de testosterona, devido às variações nas concentrações desse hormônio. Os animais com 120 dias não apresentaram esse comportamento. Apesar de não haver diferenças importantes nos percentuais dos componentes do órgão vomeronasal e nos valores de altura do epitélio sensitivo, observou-se na histologia que houve morte de neurônios evidenciados por espaços na porção apical do epitélio sensorial e núcleos das células de sustentação alongados, densos e com bordas irregulares. A morfometria testicular apontou que houve alteração no diâmetro tubular nos animais do grupo

tratado com 120 dias e nos animais do subgrupo com altas concentrações de testosterona, onde foi menor, em relação aos animais do grupo controle. Em relação ao número de células de Leydig nos animais adultos tratados do subgrupo com baixa testosterona, os animais tratados tiveram valores maiores, mas nos animais jovens tratados os parâmetros volumétricos da célula e o número de células foi menor em relação aos animais do grupo controle. Os animais tratados dos grupos de 120 dias e de 180 dias com baixa testosterona apresentaram diminuição no percentual ocupado pelas células de Sertoli no parênquima testicular. Os animais tratados com 120 dias e os animais do subgrupo com baixa testosterona tiveram suas concentrações de testosterona sérica menores. O tratamento não afetou a densidade óssea da epífise do fêmur, nem a massa e a composição do músculo reto femoral. Os resultados do presente estudo abrem portas para novas áreas do conhecimento da morfofisiologia da reprodução, uma vez que indica que a cauterização do ducto incisivo atrasa a puberdade e afeta a espermatogênese. Esses resultados demonstram que ainda há muito a ser elucidado nas diferentes espécies de mamíferos, onde o OVN pode atuar de diferente forma, como no suíno, onde os feromônios são essenciais para a estimulação sexual de machos e fêmeas.

ABSTRACT

GRONDONA, Káterin Elena Bohórquez, D.Sc., Federal University of Viçosa, July, 2012. **Morphometry of the vomeronasal organ and testis, sexual behavior of rabbits and profiles of testosterone and androstenedione after cauterization of the incisive duct.** Adviser: Laércio dos Anjos Benjamin. Co-advisers: Germán Arturo Bohórquez Mahecha and Cláudio César Fonseca.

In the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), the vomeronasal organ ends in the rostral part of the palate through the incisive duct. This duct allows pheromones to enrich and stimulate this organ. The obstruction (cauterization) of the incisive duct causes morphological alteration in the vomeronasal organ and in the testis. In order to develop the present study, incisive ducts of 16 New Zealand male rabbits (60 days of age) were cauterized under anesthesia. Sixteen rabbits from the same breed and age were used as a control group. Hence, 8 animals of each group (control and cauterized) were sacrificed at two different time points: 120 and 180 days of age (d). Before sacrifice, the animals were anesthetized and perfused through the aortic artery with bicarbonate Ringer's solution, followed by a 2.5% glutaraldehyde solution and testes, vomeronasal organ, skeletal muscle and bone were collected. These tissues were submitted to routine procedures for histological studies, transmission electron microscopy, also stereological and morphometrical techniques. Based on the serum testosterone dosages, it was found that the 120d group presented no difference in androgen levels; however, the 180d group showed a variation on levels of serum testosterone. Hence, in order to better understand the results, the 180d group was subdivided in low (180d-LT) and high (180d-HT) testosterone concentration. Apparently, the cauterization procedure did not affect the volume density of the components as well as the epithelium height of vomeronasal organ. However there are some evidence of neuronal loss, based on spaces in the apical portion the sensorial epithelium and elongated, dense, and irregular borders of nuclei of the supporting cells. The tubular

diameter was lower in 120d and 180d-HT when compared with the control group. In comparison to the control, Leydig cell number was higher in the 180d-LT and lower in the 120d group. Also, the volume densities of the testicular parameters were lower in the 120d when compared with control. Regarding to Sertoli cell, it was observed a decrease in the percentage occupied in the testis parenchyma in 120d and 180d-LT groups. . Considering the muscle skeletal system, there are no differences in the bone density of the femoral epiphyses and also in the mass and composition of the femoral muscle. These results demonstrate that much about the VNO remains to be elucidated in the different species of mammals, in which the VNO can act in a different form, as in the pig, which pheromones are essential for sexual stimulation of both males and females.

ÍNDICE

1. Introdução.....	01
2. Revisão Bibliográfica.....	03
2.1. Ocorrência e estrutura do OVN.....	05
2.1.1. Ocorrência.....	05
2.1.2. Estrutura do OVN.....	05
2.1.3. O OVN do coelho.....	09
2.2. Funções do OVN.....	10
2.3 Anatomia dos testículos, epidídimo, ductos deferentes e glândulas anexas em coelhos.....	14
2.4. Androstenediona e testosterona.....	23
2.5. Puberdade e maturidade sexual.....	26
2.6. Comportamento sexual.....	27
2.7. Efeitos dos andrógenos no tecido ósseo do fêmur e no músculo reto femoral.....	29
3. Material e métodos.....	31
3.1. Aspectos éticos.....	31
3.2. Animais.....	31
3.3. Coleta e processamento do material.....	32
3.4. Histologia quantitativa do OVN.....	34
3.4.1. Composição percentual dos componentes do OVN.....	34
3.4.2. Diâmetro do lume do OVN.....	34
3.4.3. Altura do epitélio vomeronasal.....	35
3.5 Dosagem das concentrações séricas de androstenediona e testosterona.....	35
3.6. Histologia quantitativa dos testículos.....	35
3.6.1. Proporções volumétricas (%) e volume dos componentes testiculares.....	35
3.6.2. Diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero.....	37
3.6.3. Comprimento total dos túbulos seminíferos.....	37
3.6.4. Volume e número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo.....	37
3.6.5 Volume nuclear e número de células de Sertoli por testículo e por grama de testículo.....	38
3.6.6. Índice gonadossomático.....	39
3.7. Análise ultraestrutural do OVN.....	40
3.8. Densidade da região epifisária do osso fêmur, quantidade de água e de gordura no músculo reto femoral.....	40
3.9. Análise estatística.....	41
4 . Resultados.....	42

4.1. Comportamento social dos coelhos.....	42
4.2. Descrição histológica do órgão vomeronasal.....	42
4.3. Morfometria do órgão vomeronasal.....	44
4.4. Concentrações de androstenediona e testosterona.....	46
4.5. Correlação entre horário de coleta de sangue e concentração de testosterona sérica.....	47
4.6. Peso corporal, peso testicular e índice gonadossomático.....	47
4.7. Morfometria do testículo.....	49
4.8. Morfometria e população das células de Leydig.....	53
4.9. Morfometria e população das células de Sertoli.....	54
4.10. Densidade da epífise do osso fêmur e composição do músculo reto femoral.....	56
5. Discussão.....	65
6. Conclusões.....	78
7. Referências bibliográficas.....	79

1. INTRODUÇÃO

Em 1813, o anatomista dinamarquês Ludwig Jacobson (1783-1843) descreveu pela primeira vez um órgão localizado na cavidade nasal de mamíferos. Posteriormente, em 1895, este órgão foi nomeado órgão vomeronasal (OVN) de Jacobson pela *Der Anatomische Gesellschaft*. Naquela época, Jacobson assumiu que o órgão por ele descrito tinha função essencialmente secretora, uma vez que este órgão apresentava glândulas serosas abundantes, inervação bilateral e suprimento sanguíneo característico. O próprio Jacobson suspeitou que o OVN também pudesse apresentar propriedades sensoriais (Doving e Trotier, 1998a). Foi somente com o advento de novas técnicas histológicas, no século XIX, que se demonstrou a capacidade sensorial deste órgão. Estudos conduzidos em embriões de cobras tornaram evidente a função quimiorreceptora do órgão quando Retzius, em 1894, demonstrou a semelhança morfológica entre os neurônios receptores da mucosa olfatória e aqueles do OVN (Doving e Trotier, 1998b).

Os primeiros experimentos indicavam que o OVN exercia um papel preponderante na reprodução dos mamíferos (Planel, 1953). É sabido que na maioria destes animais, o OVN é especializado na recepção de feromônios e está envolvido na comunicação química, particularmente em relação à atração sexual e reprodução (Wysocki, 1979; Wysoky e Meredith, 1987). Em répteis, o OVN está envolvido também no controle de respostas de ataque e luta (Halpern, 1987), assim como na perseguição da presa (Crosby e Hunprey, 1939; Halpern, 1987), no reconhecimento territorial e dos pais (Stephan *et al.*, 1982).

Atualmente, os estudos da morfofisiologia do OVN têm recebido especial atenção, uma vez que estudos recentes, porém, controversos, abordam sua existência, morfologia e funcionalidade em humanos (Casas *et al.*, 1998; Doving e Trotier, 1998b; Rolinsky *et al.*, 2000) Em vertebrados, os conhecimentos deste órgão ainda são incipientes no campo da evolução e da anatomia comparativa.

Nesse sentido, o presente estudo tem como objetivos, descrever o local onde desemboca o OVN em coelhos assim como suas características

histológicas, e verificar o grau de lesão e alterações do OVN após a cauterização do ducto incisivo, quantificar os diferentes componentes que constituem o parênquima dos testículos de coelhos jovens e adultos após cauterização do ducto incisivo, averiguar se há alterações de densidade óssea na região epifisária do osso fêmur e no percentual de água e gordura do músculo reto femoral, relacionando com possíveis alterações hormonais ou de comportamento.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A percepção sensorial do ambiente nos vertebrados requer órgãos especializados para que se tenha acesso ao estímulo externo (Ogura *et al.*, 2010). A olfação está altamente relacionada ao comportamento, e é responsável pela detecção de odores. Sua recepção se dá na cavidade nasal que é separada em dois subsistemas distintos que incluem o epitélio olfatório principal (EOP) e o órgão vomeronasal (OVN). Os neurônios encontrados no EOP tem projeção de seus axônios para o bulbo olfatório principal (BOP) (Scalia e Winans, 1976; Lisa e Logan, 2010), que possui circuitos primários que se projetam para o córtex olfatório. Já os axônios dos neurônios do OVN, formam o nervo vomeronasal que passa pela lâmina crivosa do osso etmóide e se projeta para o bulbo olfatório acessório (BOA) e faz conexão com o sistema límbico. A nítida separação anatômica desses subsistemas olfatórios e a população distinta de neurônios sensitivos levam à teoria que cada porção está especializada para diferentes funções. Assim, tem-se que o EOP é responsável pela detecção de odores relacionados ao sentido da olfação, enquanto o OVN está relacionado com a detecção de feromônios (Lisa e Logan, 2010).

A atividade do OVN não é necessária para a ocorrência de alguns comportamentos instintivos mediados pela olfação (Stowers e Marton, 2005). Estes achados sugerem a existência de um circuito olfatório sensorial relacionado com comportamentos além do OVN. (Stowers e Logan 2010). Circunstâncias indicam que alguns comportamentos são mediados exclusivamente por um desses sistemas ou pela ação complementar dos dois. Por exemplo, quando uma rata que foi recentemente inseminada é exposta à urina de um macho com o qual ela não copulou, a gestação é interrompida, há abortamento, e a fêmea retorna ao cio. Esse efeito depende de um órgão vomeronasal funcional. Entretanto, a procura do mamilo por filhotes de coelhos é um típico exemplo do comportamento estritamente dependente de um sistema olfatório principal intacto. Em outras circunstâncias, algumas respostas de comportamento são mediadas por ambos os sistemas (olfatório principal e vomeronasal), como por exemplo, as fêmeas de hamsters, que durante o estro emitem um chamado

ultrassônico e nelas, se os dois sistemas são inativados, esse comportamento cessa. Portanto, é possível que os dois sistemas tenham se desenvolvido independentemente para a detecção de feromônios. Somente o epitélio olfatório principal foi posteriormente desenvolvido para a percepção de odores convencionais (Tirindelli *et al.*, 2009).

Pieper *et al.* (1989) citam também o nervo terminal, que contém e pode secretar hormônio liberador de gonadotropina (GnRH), transmitindo informação da área do órgão vomeronasal para estruturas mediais da parte rostral do cérebro.

Recentemente, um acúmulo de neurônios localizados fora do EOP foi relacionado ao comportamento mediado por feromônios (Fuss *et al.*, 2005). Essa estrutura, conhecida como gânglio de Grueneberg (GG), está localizado bilateralmente na área crânio-dorsal da cavidade nasal, na extremidade formada pelo septo e o teto da cavidade nasal em várias espécies de mamíferos domésticos (Tirindelli *et al.*, 2009). Pensava-se que o GG constituía um segmento do nervo terminal até ser redescoberta sua relação com o subsistema olfatório (Fuss *et al.*, 2005). Este gânglio possui projeções para a região caudal do bulbo olfatório principal, região ativada durante a lactação, levando à hipótese de estar relacionado com a detecção de feromônios de aleitamento (Koos e Fraser, 2005; Tirindelli *et al.*, 2009). Outra função encontrada para os neurônios do GG está relacionada com a termorregulação, funcionando como um termo sensor e atraindo o filhote para o calor materno (Mamasuew *et al.*, 2005). O GG também parece atuar mediando uma resposta inata para feromônios emitidos por ratos estressados (Brechbuhl *et al.*, 2008). Tirindelli *et al.* (2009) sugeriram que as moléculas voláteis liberadas por animais para alertarem seus parceiros sobre perigo são substratos para os neurônios do GG.

O órgão septal de Masera (OS), que é uma pequena ilha de epitélio olfatório na mucosa nasal, está localizado a cada lado do septo nasal, caudal ao ducto nasopalatino (incisivo). Os neurônios sensitivos desse órgão se projetam para as regiões caudal e ventromedial do bulbo olfatório principal. Sua ampla distribuição em muitas espécies de mamíferos sugere que esse órgão é funcionalmente especializado para a detecção precoce de

moléculas biologicamente relevantes como, por exemplo, aquelas resultantes do comportamento de lambedura (Tirindelli *et al.*, 2009).

2.1 Ocorrência e estrutura do OVN

2.1.1 Ocorrência

Em 1813, Jacobson descreveu as relações topográficas e inervação do OVN em cervo, gato, vaca, cão, ovelha, cavalo, porco, cabrito, tigre, camelo, búfalo e leão marinho (Doving e Trotier, 1998a). A presença desse órgão foi posteriormente confirmada na maioria dos mamíferos eutérios (Pearlman, 1934) e nos marsupiais (Wohmann-Repenning, 1984). O OVN encontra-se bem desenvolvido na maioria dos primatas, mas é reduzido ou ausente em alguns (Jordan, 1972; Stark, 1975). O OVN também está presente na maioria dos tetrápodos e em peixes coanados. Nos répteis, este órgão não é encontrado em crocodilos e camaleões, mas está presente em cobras, lagartos e tuataras, onde encontra-se bem desenvolvido (Doving e Trotier, 1998a). Nas aves, nas quais a comunicação química é menos utilizada, este órgão regride durante o desenvolvimento embrionário (Barone *et al.*, 1966; Keverne, 1999; Liman *et al.*, 1999; Menco *et al.*, 2001).

A presença e funcionalidade do OVN em humanos apresentam controvérsias (Doving e Trotier, 1998b). Este órgão é encontrado em forma rudimentar nos humanos neonatos, segundo estudos de Kolliker em 1877 (Doving e Trotier, 1998b). Entretanto, Casas *et al.* (1998) observaram a presença direta do OVN em 53,84% dos cadáveres humanos analisados. A funcionalidade do OVN em humanos continua duvidosa, uma vez que nenhuma via nervosa entre o OVN e o encéfalo foi descrita. Além disso, nos humanos não existe bulbo olfatório acessório (Halpern e Marcos, 2003).

2.1.2 Estrutura do OVN

Nos mamíferos, o OVN consiste de um par de divertículos tubulares, revestidos internamente por mucosa, e situados no assoalho da cavidade nasal em ambos os lados da base do septo nasal (Barone *et al.*, 1966; Hare,

1986; Keverne, 1999). Ele encontra-se relacionando com o vômer e os processos palatinos dos ossos incisivos e maxilares (Hare, 1986). Nos roedores, comunica-se sem linha de demarcação com a cavidade nasal através do orifício rostral (Grondona, 2005, Mucignat-Caretta, 2010). Em lagomorfos, cada OVN abre-se rostralmente no ducto incisivo. Em carnívoros, ungulados, insetívoros e primatas neotropicais, este órgão desemboca no ducto incisivo, que por sua vez se abre na cavidade bucal através de um estreito forame (Barone *et al.*, 1966; Keverne, 1999). Esta comunicação com a cavidade bucal permite a passagem do estímulo tanto pelo nariz quanto pela boca, o que pode ocorrer durante o reflexo de “flehmen” (palavra que se origina do alemão e significa enrugar o lábio superior) em alguns mamíferos (Mucignat-Caretta, 2010).

Os túbulos que formam o OVN estão separados do resto da mucosa olfatória por uma cápsula formada por uma cartilagem hialina ou pelo próprio osso vômer (Doving e Trotier, 1998b; Keverne, 1999; Liman *et al.*, 1999; Menco *et al.*, 2001). No tecido subcapsular, geralmente é encontrado um estroma preenchido por um plexo vascular (Barone *et al.*, 1966).

O OVN contém um epitélio sensorial que não está diretamente exposto ao fluxo de ar. Ele também possui um mecanismo de bombeamento que preenche o lume do órgão com o muco onde os odores ficam dissolvidos. Em corte transversal observa-se um lume com formato de meia lua revestido por um epitélio sensorial medialmente, e um epitélio tipo respiratório não sensorial lateralmente (Doving e Trotier, 1998b, Keverne, 1999, Mucignat-Caretta, 2010), formado por uma fileira de células ciliadas não sensoriais (Doving e Trotier, 1998b).

No rato, o tamanho e o contorno interno do tubo vomeronasal variam ao longo de seu eixo longitudinal. Em sua porção rostral, o lume é limitado por duas paredes achatadas, aparecendo como um sulco oblíquo contínuo com o epitélio do vestíbulo nasal, do qual a porção tubular não apresenta diferenças evidentes. Na sua região média, a parede lateral se torna convexa e a medial se torna côncava. Em secção transversal, o órgão mostra um lume de forma tipicamente de meia lua. Caudalmente, o tubo gira aproximadamente 90 graus e mostra a parede dorsal achatada e a

ventral côncava. O lume se estreita na sua porção mais caudal e termina em fundo cego (Vaccarezza *et al.*, 1980; Grondona, 2005).

Na organização histológica do OVN, o epitélio sensorial consiste de neurônios bipolares glutamatérgicos I (Dudley e Moss, 1995) que apresentam axônios longos. Estes axônios formam dois nervos que emergem da extremidade caudal do OVN, situam-se na submucosa do septo e, após penetrar na cavidade craniana através dos forames da lâmina crivosa do etmóide, terminam no bulbo olfatório acessório, localizado dorsocaudalmente ao bulbo olfatório principal (Doving e Trotier, 1998b). O epitélio sensorial do OVN apresenta dois subtipos de neurônios: neurônios apicais e neurônios basais (Tirindelli *et al.*, 2009). Os dendritos apicais dos neurônios sensoriais se projetam em direção ao lume (Mucignat-Caretta, 2010). O epitélio sensorial também contém células de sustentação que ocupam toda a espessura do epitélio, além de células tronco que se diferenciam em novos neurônios sensoriais durante toda a vida do animal e que estão localizadas nos limites entre o epitélio sensorial e o epitélio olfatório ciliado (Barber e Raisman, 1978). Quando o neuroepitélio se degenera, as células tronco migram até sua posição final, se diferenciam, e seus axônios prolongam até o bulbo olfatório acessório, que está localizado dorsolateralmente ao bulbo olfatório principal (De La Rosa-Prieto *et al.*, 2009).

De acordo com sua localização no epitélio, a expressão de proteína G e seu alvo de projeção no bulbo olfatório acessório, as células receptoras do OVN podem ser classificadas em dois tipos. Receptores que possuem corpos localizados na porção mais superficial do epitélio expressam $G\alpha$ subunidade $Gi2\alpha$ e seus axônios se projetam para a porção rostral do BOA. Os receptores localizados na porção profunda do epitélio expressam a subunidade $G\alpha$ e seus axônios se projetam para a porção caudal do BOA (Weseka e Anhol, 1999). A proteína G também está presente nos microvilos dos neurônios receptores que possuem um mecanismo intrínseco necessário para a transdução do estímulo químico (Menco *et al.*, 2001). Alguns neurônios expressam uma proteína G α -gustaducina relacionada ao sabor, sugerindo a similaridade de processamento do estímulo semelhante ao dos receptores dos botões gustativos (Zancanaro *et al.*, 1999). Esses

neurônios sensoriais possuem a mesma origem no placóidio olfatório juntamente com os neurônios liberadores de hormônios gonadotróficos. Desta forma, ambos encontram-se relacionados com áreas do hipotálamo e, por isso, estão relacionados com funções neuroendócrinas e comportamentais (Tirindelli *et al.*, 2009).

A quimiorrecepção de certos constituintes químicos regula o acesso dos fluídos químicos ao OVN. Existem muitas células quimiosensoriais solitárias (SQS) ao longo da entrada para o órgão vomeronasal (ducto incisivo) e elas são capazes de responder a uma grande variedade de odores irritantes e componentes de sabor amargo. Em ensaios colorimétricos, observou-se que a quantidade de fluidos estimulantes que entram no OVN de ratos é inversamente correlacionada à concentração de odores e substâncias amargas presentes no fluido (Ogura *et al.*, 2010).

O lume geralmente encontra-se preenchido por secreções provenientes das glândulas vomeronasais, as quais se encontram nas paredes dorsal e ventral do lume (Keverne, 1999). As glândulas vomeronasais consistem em séries de complexos glandulares ao longo do eixo do OVN com curtos ductos excretores. Os produtos de secreção dessas glândulas entram no lume do OVN na região de transição entre o neuroepitélio e o epitélio não sensorial. Os ácinos apresentam características morfológicas típicas de glândulas serosas. As células secretoras desses ácinos são caracterizadas por possuírem núcleo arredondado a oval e retículo endoplasmático rugoso bem desenvolvido, ambos localizados na porção basal da célula. A região supranuclear é ocupada pelo aparelho de Golgi e grânulos de secreção que variam em tamanho e densidade eletrônica. Esses grânulos se acumulam em direção à porção apical da célula. Axônios terminais contendo vesículas claras e vesículas densamente coradas são frequentemente observados entre as células secretoras. Esses axônios estão diretamente relacionados à lâmina basal do ácino. Células mioepiteliais não estão presentes. Na lâmina própria, numerosas células musculares lisas, vasos sanguíneos e feixes nervosos contendo axônios mielínicos e amielínicos podem ser observados (Mendoza, 1986).

Lateralmente ao lume dos túbulos, são encontrados vasos e seios sanguíneos, os quais são inervados por fibras do sistema nervoso autônomo

que controlam a vasoconstrição (Keverne, 1999), formando um tecido cavernoso que foi chamado de “corpo de cogumelo” ou eminência fungiforme (Doving e Trotier, 1998b). O tecido altamente vascularizado que constitui a maior parte do tecido do OVN tem função de bomba, que é crucial para permitir o acesso do estímulo ao lume. No hamster, a bomba funciona por ativação dos nervos simpáticos que contraem a parede das veias em qualquer situação que atrai a atenção do animal (Meredith, 1998).

O OVN é irrigado pela artéria esfenopalatina que também irriga a mucosa das conchas nasais. Esta artéria é ramo da artéria maxilar. A drenagem é feita por meio de uma veia satélite calibrosa, que se encontra lateralmente ao ducto vomeronasal. Ao longo do órgão, encontra-se essa veia volumosa com parede espessa rodeada por veias menores que formam uma rede, assim como arteríolas, capilares, vasos linfáticos e nervos, formando um plexo vasculo-nervoso (Salazar *et al.*, 1997; Salazar e Sanchez Quinteiro, 1998). Portanto, os achados sobre o suprimento sanguíneo, associados ao ducto vomeronasal preenchido por secreção e o revestimento que envolve o tecido conjuntivo (cápsula), indicam que o tecido que rodeia a porção epitelial do órgão tem um importante papel nos mecanismos de funcionamento do OVN como uma bomba vascular. Por sua vez, essa cápsula impede um colapso quando a pressão interna é diminuída seguida da expulsão dos conteúdos. A cápsula também é responsável por impedir a expansão do órgão no momento do aumento da pressão interna (Salazar *et al.*, 1997; Salazar e Sanchez Quinteiro, 1998).

2.1.3 O OVN do coelho

O OVN do coelho é levemente elíptico ou oval em secção transversal, envolto por uma cápsula cartilaginosa hialina. Seu lume é crescente de sua porção média até sua porção caudal. O seio venoso é notavelmente desenvolvido em volta do lume e ocupa a maior parte do órgão. As glândulas tendem a se agregar na porção mais dorsal do órgão (Taniguchi e Mochizuki, 1982).

A ultraestrutura das células do epitélio sensorial do OVN do coelho é semelhante à do hamster, rato e camundongo. Porém, o retículo

endoplasmático liso não é desenvolvido no citoplasma supranuclear das células sensoriais, e corpos granulares nos dendritos não são tão evidentes quanto no hamster. Esses corpos granulares estão envolvidos com a secreção de neurotransmissores. Pequenas células basais amorfas são ocasionalmente observadas na base do epitélio sensorial (Taniguchi e Mochizuki, 1982).

O epitélio respiratório do coelho contém células ciliadas, não ciliadas e células basais. As células não ciliadas são escuras e delgadas, possuindo núcleo escuro, sugerindo condensação de heterocromatina, alongado, com mitocôndrias dispersas no citoplasma, ribossomas livres e retículo endoplasmático rugoso. Células ciliadas e basais são similares às observadas no epitélio respiratório do hamster. Células com prolongamentos indicativas de neurônios são frequentemente observadas penetrando na porção basal do epitélio (Taniguchi e Mochizuki, 1982).

2.2 Funções do OVN

Desde a década de 1980, já se tem como amplamente aceito que o sistema vomeronasal encontra-se envolvido em respostas quimiosensoriais mediadas por feromônios, ou regulação endócrina, e comportamento sexual (Halpern e Marcos, 2003). Além disso, foi demonstrado em cobras, que o sistema vomeronasal (SVN) era crítico na resposta a substâncias químicas da presa e odores usados no agrupamento e cômte (Halpern,1987; Wysocky e Meredith,1987).

O significado preciso das funções do SVN não está totalmente entendido, particularmente considerando as funções comuns a todos os grupos de animais. Quando se enfoca os mamíferos, as evidências sugerem que o SVN tem um papel importante no comportamento reprodutivo e sexual (Powers e Winans, 1975; Wysocki, 1979), embora isso não descarte a possibilidade de outras funções.

Antigamente, era aceito que o SVN fosse especializado na detecção de certos tipos de substâncias odoríferas, caracterizadas por baixa volatilidade e peso molecular maior que 66 kDa (Salazar *et al.*, 1998). Atualmente, já é sabido que da mesma maneira que o epitélio olfatório

principal, o OVN é sensível tanto a odores comuns quanto a feromônios que se dissolvem no muco produzido no órgão para alcançar o epitélio sensorial. Desta forma, o sistema olfatório principal associado ao sistema vomeronasal originam um complexo integrado de percepção quimiosensorial (Mucignat-Caretta, 2010). Nem todas as substâncias que estimulam o OVN devem ser classificadas como feromônios. Da mesma forma, nem tudo que atua como um feromônio necessita estimular o OVN (Meredith, 1998).

Feromônios são substâncias que carregam mensagens químicas que são secretadas por indivíduos e são recebidas por indivíduos da mesma espécie, os quais causam uma reação comportamental específica. Eles podem ser divididos em feromônios liberadores ou iniciadores. Feromônios liberadores levam ao reconhecimento individual e provocam respostas comportamentais de baixa latência em animais do mesmo grupo, como ataques agressivos, cio ou demarcação territorial. Ao contrário, feromônios iniciadores induzem respostas tardias que são comumente mediadas pela ativação do sistema neuroendócrino, com a emissão de sinais químicos que forçam o balanço hormonal modulando seu estado reprodutivo (Tirindelli *et al.*, 2009).

As funções dos sistemas vomeronasal e olfatório estão evoluindo no amplo contexto da comunicação química em mamíferos. São três os pontos mais importantes. Primeiro, há uma variedade de tipos de sinais químicos que incluem os feromônios clássicos à qualidade dos sinais de odor, os quais são todos importantes para comunicação. Segundo, o OVN é primariamente responsável pela mediação de respostas a alguns, mas não a todos, sinais dos feromônios. Terceiro, os sistemas vomeronasal e olfatório principal geralmente interagem para mediar respostas de sinais odoríferos (Johnston, 1998).

Segundo Johnston (2000 e 2001), “sinais químicos” são compostos ou misturas de compostos liberados por um indivíduo que afetam um segundo indivíduo da mesma espécie, e sugerem que esse termo deva ser usado como um termo genérico para odores envolvidos em comunicação. Subcategorias de sinais químicos incluem: 1) feromônios: compostos químicos simples que têm efeitos de sinais químicos; 2) mistura de feromônios: misturas de pequenos números de compostos que são efetivos

somente em proporções relativamente precisas; 3) grupos mosaico ou mosaico de odores: misturas de um grande número de compostos que têm efeitos de sinais químicos.

Numerosos modelos animais, como hamsters, ratos, camundongos, mamíferos domésticos e répteis, comprovaram-se especialmente úteis para elucidação de papéis funcionais do SVN. Hamsters foram os primeiros animais nos quais as alterações do nervo vomeronasal demonstraram afetar o comportamento reprodutivo (Powers e Winans, 1975). Segundo esses mesmos autores, uma lesão periférica do sistema vomeronasal produz déficits severos no comportamento sexual em hamsters machos e fêmeas. Esses autores observaram que os efeitos da remoção ou privação da função normal do OVN foram agudos quando o animal não tinha tido atividade sexual. Mas quando o animal já havia copulado, o efeito da remoção do OVN foi menos severa. Entretanto, a injeção de GnRH (hormônio liberador do gonadotrofina) em animais experimentais sem OVN restabeleceu o comportamento sexual.

No comportamento sexual parece que a cadeia de eventos é a seguinte: para a estimulação do OVN é necessária a liberação de GnRH, que promove um aumento no nível de hormônio luteinizante (LH), o qual, por sua vez induz as manifestações do comportamento sexual, devido à sua influência na produção de testosterona (Coquelin *et al.*, 1984; Clancy *et al.*, 1988; Meredith e Fernandez-Fewell, 1994).

Bruce (1959) demonstrou que ratas com ovócitos fertilizados tiveram falha na implantação destes se o macho copulador fosse substituído por um macho estranho na gaiola da fêmea nos quatro primeiros dias após a cópula. Esse efeito é mediado por estímulo químico e é dependente de um OVN funcional (Bellringer *et al.*, 1980). O modelo para explicar esse fenômeno inclui a memória do odor do macho copulador. Isso demonstra que a memorização e o reconhecimento do macho copulador se dão no bulbo olfatório acessório, e que os receptores metabotrópico de glutamato estão envolvidos no processo (Kaba *et al.*, 1994). A estimulação subsequente com feromônios de um macho estranho aumenta a atividade nos neurônios dopaminérgicos, que liberam seu transmissor para o plexo portal da eminência mediana. A dopamina atua na hipófise para suprimir a liberação

de prolactina. A prolactina, por sua vez, é luteotrópica; portanto, o corpo lúteo ovariano não é sustentado por muito tempo, os níveis de progesterona caem e os de estrógeno aumentam. É esse decréscimo do nível de progesterona que permite o nível de LHRH aumentar, e isso sustenta o desenvolvimento folicular e o aumento dos níveis de estrógeno (Brennan e Keverne, 1997; Keverne, 1982).

Wysocki e Lepri,(1991) removeram o OVN em ratos domésticos e ratos da pradaria (*Microtus orchragaster*) machos, e observaram déficits no aumento de testosterona induzido por odores, na vocalização ultrassônica para fêmeas, no comportamento sexual, na marcação territorial e na agressão entre machos. A remoção do OVN em grupos de fêmeas de ratos domésticos resultou na perda da secreção de feromônios que promovem a puberdade. Em ratas, a indução da ativação da reprodução pela presença do macho caiu ou foi eliminada pela remoção do OVN. Agressão maternal também foi reduzida em fêmeas que passaram pela retirada do órgão.

Segundo Dluzen e Ramirez (1983), no bulbo olfatório acessório, alguns neurônios são imunorreativos a alguns fatores de liberação hipotalâmicos, como LHRH (hormônio liberador do hormônio luteinizante), TRH (hormônio liberador de tireotropina) e somatostatina. Desta forma, eles podem estar relacionados ao envolvimento do bulbo olfatório acessório na resposta a feromônios pela modulação neuroendócrina e comportamental.

Atualmente, foi descoberta uma nova classe de receptor olfatório que é expresso em uma subpopulação de neurônios sensitivos vomeronasais chamados de receptores de formil peptídeo (*FPR* e *FPR-like*) que são responsáveis pelo estímulo quimiosensorial de danos celulares, doenças e inflamação, semelhante ao que ocorre nas células do sistema imunológico (Rivière *et al.*, 2009).

Ratos vomeronasalectomizados (com secção bilateral dos nervos vomeronasais em seu trajeto no septo nasal) apresentaram atraso no crescimento das glândulas sexuais anexas, embora não apresentem diferenças no peso testicular. Apesar disso, estes animais apresentam níveis plasmáticos de LH e testosterona mais baixos. Tanto a anosmia completa de ambos os sistemas (olfatório e vomeronasal), como a ausência de fêmeas adultas, repercutem sobre o desenvolvimento sexual. Incrementos de

testosterona plasmática em machos submetidos à presença de fêmeas foram demonstrados em ratos (Sanchez-Criado *et al.*, 1984). Esses animais também apresentam a agressividade diminuída (Stowers *et al.*, 2002).

Desta forma, existe uma importante relação entre o OVN e os órgãos genitais masculino e feminino. Entretanto, as informações disponíveis na literatura citam as alterações dos níveis de testosterona sem descrever as modificações morfofuncionais dos testículos e das vias espermáticas decorrentes da ablação do OVN. Por outro lado, permanece não solucionada a pergunta: a perda funcional do OVN é substituída pela ação do sistema olfatório principal?

2.3 Anatomia dos testículos, epidídimo, ductos deferentes e glândulas anexas em coelhos

Os testículos são órgãos glandulares, formados por uma porção exócrina e uma porção endócrina. A porção exócrina é constituída por túbulos seminíferos e ductos intratesticulares, e a endócrina, pelas células intersticiais de Leydig. Os testículos dos coelhos são alongados, com até 4 cm de comprimento e um cm de diâmetro (Amann, 1970a).

Como nos demais mamíferos, os testículos dos coelhos estão envolvidos por uma cápsula conjuntiva, a túnica albugínea, da qual partem septos para o interior do órgão, formando os lóbulos testiculares. Dentro dos lóbulos encontram-se os túbulos seminíferos, de trajeto sinuoso, enovelados e extensos. A parede dos túbulos seminíferos é constituída de uma túnica conjuntiva externa, uma membrana basal intermediária onde estão as células de Sertoli, e as células germinativas em diferentes etapas do desenvolvimento. Parâmetros quantitativos diretamente relacionados aos túbulos seminíferos, como diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero, e comprimento total dos túbulos seminíferos, apresentam relação positiva com a atividade espermatogênica, fornecendo informações para o estabelecimento da mesma em uma determinada espécie (França & Russell, 1998). Mali *et al.* (2002) e Gupta *et al.* (2001) associam o comprimento e diâmetro dos túbulos seminíferos à redução na produção de testosterona e ao peso testicular e, conseqüentemente, diminuição da fertilidade.

A *rete testis* no coelho é um prolongamento da *rete testis* para o epidídimo. Por se apresentar desta maneira, ela é chamada de *rete testis* extratesticular. Esta estrutura consiste em uma camada única de células epiteliais achatadas envolvendo um lume extenso. Essas células possuem núcleo heterocromático irregular que ocupam de 1/3 até metade da célula. Seu citoplasma é caracterizado por uma escassez de organelas. Espermatozoides raramente são vistos nas secções devido à baixa concentração de fluido testicular. Essa região possui uma lâmina basal relativamente espessa, interdigitações complexas na membrana plasmática das células adjacentes e uma fina rede de material filamentososo encontrado na face citoplasmática da membrana celular na superfície basal das células. Profundamente à lâmina basal encontra-se um feixe de fibras colágenas, fibroblastos e músculo liso. Na junção da *rete testis* e dos ductos eferentes observam-se vasos sanguíneos próximos à lâmina basal (Jones *et al.*, 1979).

Um outro tipo celular presente nos túbulos seminíferos é a célula de Sertoli. Ela é uma célula somática que se encontra entre as células germinativas, sendo essenciais na espermatogênese, já que sustentam e nutrem as células germinativas e controlam o desenvolvimento da espermatogênese, entre outras funções. As células espermatogênicas (células germinativas em desenvolvimento) são as células que darão origem aos espermatozoides após divisões sucessivas das mesmas, sustentadas ao longo de todo o processo pela célula de Sertoli (Castro, 1995).

Nos túbulos seminíferos, as células de Sertoli criam duas regiões: o compartimento basal, contendo as células germinativas mais iniciais (espermatogônias, e espermatócitos primários em pré-leptóteno) em contato direto com vasos sanguíneos e o compartimento adluminal, contendo as células germinativas mais avançadas (demais espermatócitos primários, espermatócitos secundários e espermátides em desenvolvimento) separados dos vasos sanguíneos por uma barreira de permeabilidade (Russell *et al.*, 1990a).

Durante o desenvolvimento puberal, as células de Sertoli cessam sua divisão. As células de Sertoli adultas se mantêm relativamente estáveis durante a vida do animal e possuem uma estrutura extremamente complexa.

Na microscopia de luz, observa-se que os limites desta célula estão indefinidos. Possuem formato piramidal, núcleo ovóide, com base fixada na membrana basal do túbulo e com ápice projetando-se livre para a luz. São células que estão unidas entre si por junções de oclusão e são encontradas na membrana basal. O núcleo é visível, apresenta nucléolo tripartido. Na microscopia eletrônica de transmissão, essa célula se estende da base do túbulo ao lume, por meio de suas extensões citoplasmáticas (Russell, 1980).

A célula de Sertoli possui um papel estrutural e está envolvida na relação das células de germinativas com o ambiente interno (Russell, 1980). Seu citoplasma possui muitos ribossomas, mitocôndrias alongadas, abundante retículo endoplasmático liso, aparelho de Golgi proeminente e gotículas lipídicas espalhadas. Muitas das células contêm material fagocitado, presumivelmente derivado das células germinativas degeneradas (Gondos, 1973). Ela é considerada como uma célula que possui uma morfologia cíclica, um fenômeno essencial para a interação e controle das diferentes fases do desenvolvimento das células germinativas, que ocorrem simultaneamente.

Muitas funções são atribuídas às células de Sertoli, entre elas a manutenção da integridade do epitélio seminífero, via adesão a outras células e elementos não celulares (Russell, 1980), formação da barreira de célula de Sertoli (hematotesticular) pela presença de junções de oclusão ou “tight junctions”, ou secreção de fluido tanto na porção basal quanto apical para formar o lume tubular, participação na espermição (Fawcett e Philips, 1969), fagocitose das células germinativas durante a espermatogênese, fornecimento de nutrientes às células germinativas, envolvimento na esteroidogênese e metabolismo de esteroides, movimentos de células no epitélio por facilitação da translocação das células do compartimento basal entre os compartimentos intermediários e adluminal do testículo (Russell, 1977); secreção de proteínas assim como intermediação hormonal no testículo para regulação das células germinativas; envolvimento na regulação da sincronização do ciclo espermatogênico via formação de junções tipo “gap” com elas mesmas ou com células germinativas; alvo para hormônios no testículo e mediador de efeitos hormonais, além de possuírem

receptores para o hormônio folículo estimulante (FSH) e testosterona (Castro, 1995 e 1997).

As células de Leydig são células especializadas na secreção de esteroides. Elas são derivadas de células mesenquimais do interstício testicular. A maioria dos mamíferos apresenta um padrão bifásico de diferenciação dessas células: um estágio fetal e um estágio adulto (Gondos e Conner, 1972).

O processo de diferenciação celular no coelho está associado com o crescimento celular, extensa proliferação do retículo endoplasmático liso em torno de gotículas lipídicas, surgimento de mitocôndrias largas e arredondadas com cristas tubulares e desenvolvimento do complexo de Golgi (Gondos *et al.*, 1976). No coelho, as células de Leydig se diferenciam no feto durante a terceira semana de gestação, com a formação de uma grande quantidade de retículo endoplasmático liso. São encontradas em agregados celulares ao redor dos vasos sanguíneos (Gondos e Conner, 1972). Estas células são esteroidogenicamente ativas, sintetizam preferivelmente andrógenos 5α reduzidos (dihidrotestosterona, 5α -androstene- 3α , 17β -diol (3α -diol) e o 5α -androstene- 3β , 17β -diol (3α -diol). Após a gestação essa conformação permanece, apesar de haver alguma redução no retículo endoplasmático liso nos dias próximos ao nascimento (Gondos *et al.*, 1976).

As células mesenquimais do interstício do testículo, que são células precursoras, se diferenciam em células de Leydig fetais e em outras células intersticiais deste órgão durante a gestação. Entretanto, algumas dessas células mesenquimais mantêm sua característica de indiferenciação e servem como células precursoras para as células de Leydig adultas no testículo, no período pós-natal (Byscove, 1986).

Após o nascimento, há uma diminuição expressiva no número de células de Leydig e estas são encontradas dispersas. No fim da primeira semana, células de Leydig completamente desenvolvidas não são mais encontradas. Entre a primeira e a quinta semanas após o nascimento, o tecido intersticial no testículo de coelhos é composto principalmente por células mesenquimais indiferenciadas, que se apresentam como células alongadas com núcleo ovóide irregular. Seu citoplasma inclui ribossomos

dispersos, mitocôndrias alongadas e uma quantidade moderada de retículo endoplasmático rugoso. Retículo endoplasmático liso está normalmente ausente e há raras gotículas de lipídeo. Essas células estão isoladas, sem contato juncional entre elas. Durante esse período encontram-se, de forma dispersa, células parcialmente diferenciadas com núcleo ovóide, nucléolo proeminente e abundante citoplasma. Essas células exibem algumas características citoplasmáticas de células secretoras de esteroides, apesar de não apresentarem o total desenvolvimento do retículo endoplasmático liso (REL) e o arranjo perivascular observado nas células de Leydig completamente desenvolvidas (Gondos *et al.*, 1976). Neste momento inicia-se a primeira etapa do processo de diferenciação onde ocorre a transformação das células precursoras em células progenitoras. Estes dois tipos celulares são morfologicamente semelhantes, mas estão comprometidos com a linhagem das células de Leydig por já expressarem enzimas esteroidogênicas além de serem capazes de produzir andrógenos (Ariyaratne *et al.*, 2000). Na segunda etapa da diferenciação, as células progenitoras se transformam em células morfologicamente identificadas como células de Leydig adultas recém-formadas (Mendis-Handagama e Ariyaratne, 2001), caracterizadas pelo arranjo perivascular e total desenvolvimento do REL. Essas células surgem, no coelho, na quinta semana de idade (Gondos *et al.*, 1976). Posteriormente, as células maduras recém-formadas se diferenciam em células de Leydig imaturas e então, células de Leydig maduras, que se caracterizam pelo aumento do tamanho da célula, ausência de grânulos de lipídeos e um aumento na capacidade de secreção de testosterona (Mendis-Handagama e Ariyaratne, 2001). Na sétima semana, a maior parte do tecido intersticial consiste de agregados de células de Leydig típicas do testículo adulto. Essa característica corrobora o surgimento das primeiras mitoses espermatogoniais que ocorrem entre sete e oito semanas de vida, indicando que a diferenciação das células de Leydig precede o evento da espermatogênese (Gondos *et al.*, 1976).

A testosterona e o estradiol são inibitórios no início de diferenciação da célula de Leydig precursora, sendo, portanto, importantes para manter a concentração constante das células de Leydig adultas. Os andrógenos são

essenciais para as células progenitoras de diferenciarem em células adultas maduras (Mendis-Handagama e Ariyarante, 2001).

O LH é essencial no estágio avançado de diferenciação (célula de Leydig adulta) promovendo proliferação, hipertrofia e estabelecendo a organização de organelas celulares necessárias para a regulação da função esteroidogênica, assim como o aumento no número de receptores de LH (Gondos *et al.*, 1990; Mendis-Handagama e Ariyarante, 2001).

O hormônio anti-müleriano tem sido sugerido como regulador negativo na diferenciação da célula de Leydig. O fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) atua na proliferação e transformação das células de Leydig imaturas nas adultas (Hardy, 1990; Mendis-Handagama e Ariyarante, 2001). Agentes mitogênicos como o fator de crescimento transformador alfa e beta também estimulam as células precursoras mesenquimais e as células de Leydig, respectivamente (Hardy, 1990).

Nos mamíferos machos, o fator semelhante a insulina 3 (INSL3) é o principal produto das células de Leydig testiculares, estando relacionado com o desenvolvimento da funcionalidade pós-natal destas células, inclusive durante a primeira onda da espermatogênese. O gene do INSL3 é expresso também nas células de Leydig fetais, sendo responsável pela primeira fase transabdominal do descenso testicular. Além disso, o INSL3 regula a espermatogênese e o metabolismo ósseo no adulto (Anand-Ivell *et al.*, 2009).

O epitélio dos ductos eferentes consiste de dois tipos celulares, as células principais e as células ciliadas. As células principais são altas e colunares e são o tipo celular mais numeroso nos ductos. Sua superfície luminal apresenta microvilos irregulares. Na base desses microvilos observam-se numerosas vesículas de tamanhos variáveis. A lâmina basal não é tão proeminente como à da *rete testis* e encontram-se interdigitações complexas nas membranas laterais das células. Um núcleo heterocromático e irregular é encontrado na metade basal das células. As células ciliares estão em menor número e podem ser identificadas pelos tufo de cílios e pela posição do núcleo em sua metade apical (Jones *et al.*, 1979).

O epidídimo é uma estrutura que armazena os espermatozoides produzidos pelo testículo. O epidídimo é longo, em forma de "C" achatado, junto a um dos lados do testículo (Jones, 2004).

O epidídimo dos mamíferos é tradicionalmente dividido em segmento inicial, cabeça, corpo e cauda. A região epididimária que compreende a *rete testis* extratesticular, ductulos eferentes proximal e distal, um pequeno ducto conector e um ducto epididimário está demarcada por uma lâmina fibrosa e camadas concêntricas de fibras musculares lisas (Abd-Elmaksoud, 2009).

No concernente à sua morfologia, o epidídimo de um mamífero adulto é um ducto longo e enovelado, revestido por epitélio pseudoestratificado prismático com estereocílios, como observado para o coelho (Nicander, 1957). As células basais contêm lipídeos, e as células prismáticas são longas e finas. A lâmina própria é formada por tecido conjuntivo frouxo com alta vascularização. A túnica muscular é circular e se espessa à medida que se aproxima da cauda do epidídimo (Banks, 1992). No ducto epididimário, as células basais substituem as células ciliadas como o segundo tipo celular, mas são encontradas diferenças histológicas e de coloração entre os vários segmentos do epidídimo, desde as estruturas mais delicadas até as células principais. Assim, pode-se dividir o órgão, nos coelhos, em 8 subregiões que estão relacionadas com o papel do epidídimo na maturação e sobrevivência dos espermatozoides (Jones *et al.*, 1979).

O epidídimo dos mamíferos possui duas funções principais. Inicialmente, cria um microambiente único que permite a transformação de espermatozoides testiculares imóveis e imaturos em células competentes, férteis e com capacidade de fertilizar o ovócito. Além disso, é responsável pelo armazenamento dos espermatozoides maduros em estado viável, nas regiões da cauda do epidídimo e ducto deferente até que sejam ejaculados (Jones, 2004).

Sabe-se que numerosas mudanças ocorrem com o espermatozoide durante o trânsito epididimário. Entre estas mudanças, cita-se, por exemplo, migração e perda da gota citoplasmática, modificações das suas dimensões, alterações na quantidade de lipídeos e proteínas (Schimming *et al.*, 2002).

Ainda em termos morfofuncionais, os espermatozoides contidos na luz do epidídimo atingem a sua maturação devido à baixa oxigenação e baixo

pH intraluminais, que os manteriam estáticos e, portanto, com baixíssimo (ou mínimo) consumo de energia própria. Tal fato possibilita o amadurecimento dos espermatozoides, promovido pela passagem de macromoléculas do citoplasma apical das células principais ao lume tubular. Estudos ultraestruturais corroboram as afirmações citadas anteriormente. A presença de um sistema organela-vesicular ou vacuolar complexo nas células principais do ducto pressupõem a ocorrência de absorção ou secreção celular ativa (Schimming *et al.*, 2002).

Durante o trânsito do espermatozoide pelo epidídimo, os gametas entram em contato com as secreções epididimárias, sendo estas fundamentais para a sua maturação celular. Neste processo acontece a redução do acrossoma, e o espermatozoide adquire a capacidade de motilidade. Nos coelhos, o percurso dos espermatozoides pelo epidídimo dura de 8 a 10 dias. É um importante sítio de armazenamento de espermatozoides (Jones, 2004).

O ducto deferente é uma estrutura musculomembranosa que se segue à cauda do epidídimo cuja função é impulsionar os espermatozoides para que cheguem à uretra no momento da ejaculação (Jones, 2004). No coelho, possui uma túnica adventícia de tecido conjuntivo denso contendo vasos e nervos. Apresenta uma parede muscular espessa formada por uma camada externa de fibras longitudinais, uma camada média de fibras espiraladas e uma camada circular interna. Podem-se distinguir quatro segmentos anatômicos: funicular, pélvico, epididimário, e ampular. O epitélio dos segmentos funicular e pélvico do tipo pseudoestratificado colunar com presença de estereocílios em sua porção apical. A parede do segmento pélvico é formada pelo mesmo tipo de epitélio. Entretanto, esse segmento é mais largo e possui uma mucosa irregular.

O segmento epididimário é formado por um epitélio pseudoestratificado cilíndrico, enquanto que no segmento ampular observa-se um epitélio simples cúbico. A mucosa forma pregas longitudinais ao longo do ducto deferente, desde a região epididimária até a pélvica, determinando um lume irregular, quando observada em corte transversal. Os três primeiros segmentos do ducto deferente apresentam estereocílios. Ao longo do conduto, observa-se secreção que é consideravelmente aumentada na

ampola. Estudos histoquímicos revelaram reação PAS positiva, especificamente na zona apical das células epiteliais, ao longo de todo o ducto. Na ampola, a mucosa forma vários compartimentos formando câmaras. No tecido que reveste a mucosa dessas câmaras observa-se quantidade abundante de fibras reticulares. O tecido conjuntivo que circunda cada glândula ampular é rico em fibras elásticas distribuídas de forma irregular, formando verdadeiras redes (Schencke, 2003). Posteriormente, o ducto deferente passa pelo anel inguinal juntamente com vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos, formando o cordão espermático (Jones, 2004).

Apesar de fornecer um veículo líquido para o transporte dos espermatozoides, a função das glândulas anexas não está totalmente esclarecida, embora muito se saiba sobre os agentes químicos específicos com que elas contribuem para as ejaculações. Estas glândulas desempenham um papel importante na produção de plasma seminal e é importante para a sobrevivência espermática no ejaculado (Hafez, 1995). A remoção de glândulas sexuais anexas, particularmente as vesículas seminais, é prejudicial à fertilidade in vivo em ratos, camundongos e hamsters (Henault *et al.*, 1995). Quase todas as glândulas sexuais anexas dos coelhos situam-se, exceto parte da próstata, ao longo da região dorsal do colo da bexiga urinária e da uretra (Orti *et al.*, 2004)

As glândulas vesiculares estão situadas lateralmente às porções terminais de cada ducto deferente. O ducto da glândula vesicular e os ductos deferentes podem participar de um orifício ejaculatório comum que se abre dentro da uretra (Hafez, 1995). As glândulas vesiculares são bastante volumosas, envolvendo, parcialmente, a glândula de coagulação (Popesko *et al.*, 1992). Os coelhos apresentam uma glândula vesicular volumosa e bilobulada, situada entre os dois ductos deferentes (Orti *et al.*, 2004).

A glândula prostática possui uma parte distinta lobulada externa ou corpo que se situa externamente ao espesso músculo uretral, e uma segunda parte interna disseminada que circunda a uretra pélvica profundamente ao músculo uretral. A próstata disseminada estende-se caudalmente tanto quanto os ductos das glândulas bulbouretrais. (Hafez, 1995). No coelho, a próstata é formada por um conjunto de pequenas glândulas, a maioria das quais se dispõem na parede dorsal da uretra (Orti

et al., 2004). Nestes animais esta glândula é externamente lisa e possui uma porção dorsal e uma porção ventral (Barone *et al.*, 1973).

As glândulas bulbouretrais são dorsais à uretra, próximas à extremidade de sua porção pélvica (Hafez). No coelho, essas glândulas são externamente homogêneas e, parcialmente, cobertas por um estrato muscular do músculo bulbo-esponjoso e ocupam quase toda a parede dorsal da uretra membranosa (Orti *et al.*, 2004).

As glândulas prepuciais e ampulares não são encontradas em coelhos, embora, estes autores tenham descrito a presença da ampola do ducto deferente no coelho, onde normalmente se encontram as glândulas ampulares (Barone *et al.*, 1973).

2.4 Androstenediona e testosterona

Deihidroepiandrosterona (DHEA), sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS) e androstenediona ou androstenodiona são esteroides C19 secretados pelo córtex da glândula adrenal. Esses hormônios possuem uma atividade androgênica fraca e são precursores de estrógenos e andrógenos. Em coelhos, a androstenediona sérica é insignificante nos animais jovens ($0,060 \pm 0,01$ ng/ml), encontra-se baixa na fase pré-puberal ($0,152 \pm 0,03$ ng/ml) e atinge valores séricos mais elevados ($0,263 \pm 0,03$ ng/ml) em animais adultos (Kandsi-Bouhadad e Hadj-Bekkouche, 2010). Pode-se observar aumento desse hormônio em condições patológicas, como tumores de adrenal, hiperplasia adrenal congênita e em fêmeas com doença do ovário policístico (Thomson *et al.*, 1989).

Os principais andrógenos incluem além do DHEAS, DHEA e da androstenediona, a testosterona e di-hidrotestosterona (DHT). Sua biossíntese inicia-se a partir da clivagem e hidroxilação do colesterol pela enzima P450 SCC (*side chain cleavage*) que promove hidroxilação nas posições 20 e 22 e clivagem da cadeia lateral do colesterol, levando à formação da pregnenolona. A pregnenolona por sua vez pode gerar androstenediona por duas vias: pela formação de progesterona (via 3β -hidróxi-esteróide-desidrogenase) com posterior ação da P450 c17, ou pela formação de DHEA (via formação de 17-hidroxi-pregnenolona mediada pela

P450 c17) com posterior hidroxilação pela 3β -hidróxi-esteroide-desidrogenase. Uma vez formada, a androstenediona é convertida em 17β -hidróxi-esteroide-desidrogenase. A testosterona pode então sofrer a ação de duas enzimas: a P450 aromatase, presente no fígado, tecido adiposo, pele, testículo (nos túbulos seminíferos pelas espermátides), responsável pela conversão de testosterona a 17β -estradiol, na membrana mitocondrial; e 5α -redutase, presente na pele, ossos (osteoblastos), córtex cerebral e vasos sanguíneos, que promove a conversão de testosterona em DHT (Bourget *et al.*, 1984).

A produção adrenal dos andrógenos está sob o controle da corticotropina. Já a produção das células testiculares está sob o controle indireto do GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas) hipotalâmico. O GnRH estimula a hipófise anterior promovendo liberação de FSH (hormônio folículo estimulante), que estimula a gametogênese, bem como a liberação de LH (hormônio luteinizante) que estimula a secreção de andrógenos pelas células de Leydig (Hardman *et al.*, 1996; Rang *et al.*, 1997)

O hormônio testosterona é um esteroide produzido nas células de Leydig, localizadas no interstício testicular entre os túbulos seminíferos, constituindo cerca de 20% da gônada, com limitada quantidade produzida pelo córtex da adrenal (Hafez, 1995). É essencial à função reprodutiva dos machos, atua estimulando os estádios finais da espermatogênese, prolongando a vida útil dos espermatozoides no epidídimo. Estimula o crescimento, o desenvolvimento e a atividade secretora dos órgãos sexuais do macho, como próstata, glândulas vesiculares e bulbo uretrais, ductos deferentes e a genitália externa, assim como a manutenção das características sexuais secundárias e o comportamento sexual do macho (Guyton, 1992).

A testosterona, após ser secretada pelos testículos, liga-se frouxamente à albumina plasmática ou mais fortemente a uma beta-globulina e circula na corrente sanguínea por cerca de 30 minutos a uma hora. Portanto, sua atividade biológica é realizada pelo menos a 2% de testosterona-livre. A enzima 5α -redutase, presente nos tecidos-alvo, metaboliza a testosterona para diidrotestosterona, que é o andrógeno ativo nos tecidos alvo. Nesse período, liga-se aos tecidos ou sofre degradação a

produtos inativos que são subsequentemente excretados. De outro modo, esse hormônio se liga à proteína ligadora de andrógenos (produzida pelas células de Sertoli), penetrando nos túbulos seminíferos, regulando a espermatogênese. As secreções da célula de Sertoli são reguladas pelo FSH (Hafez, 1995).

O colesterol é o precursor da testosterona, e quando presente na corrente sanguínea atravessa com facilidade a parede da célula até chegar ao citoplasma. Exerce sua influência sobre as células ou tecidos alvo específicos por meio da interação exclusiva entre o hormônio e os receptores específicos do hormônio localizados no interior da célula, formando o complexo testosterona-receptor androgênico, que entra no núcleo onde está o DNA da célula (Hafez, 1995).

Em coelhos da raça Nova Zelândia, Castro (1995) observou valores de testosterona plasmática que variavam de 0,51ng/ml a 9,16ng/ml com média de 4,97ng/ml e coeficientes de variabilidade intra e entre amostras de 6,9 a 12,6%. Essa variação se torna óbvia pelo fato de que aproximadamente metade dos animais mostraram valores que estavam muito próximos aos valores extremos mais baixos ou mais altos do intervalo. Já Arteaga *et al.*, (2008) encontraram valores que variavam de 0,35ng/ml a 4,56ng/ml. Embora outros andrógenos (diidrotestosterona, dehidroepiandrosterona e androstenediona) sejam produzidos em pequenas quantidades pelo testículo de coelhos, a testosterona parece ser o principal andrógeno no sangue de várias espécies de mamíferos (Gustafson e Shemesh, 1976).

A maioria das enzimas envolvidas na produção de testosterona em mamíferos se localiza no retículo endoplasmático liso e mitocôndrias das células de Leydig. Portanto, mudanças nos níveis de testosterona estão relacionadas com mudanças na morfologia dessas células. Pode-se observar que os níveis de testosterona estão positivamente correlacionados com a densidade de superfície e densidade volumétrica do retículo endoplasmático liso, embora não haja correlação positiva entre a secreção de testosterona e a densidade volumétrica de outras organelas das células de Leydig, como por exemplo, as mitocôndrias (Zirkin *et al.*, 1980).

2.5 Puberdade e maturidade sexual

Para um entendimento das fases da infância, puberdade e maturidade sexual, é necessário determinar vários eventos relacionados a fenômenos fisiológicos. Estes episódios incluem comportamento, níveis de hormônios gonadotrópicos circulantes e hormônios gonadais, além de parâmetros morfológicos, como tamanho testicular e epididimário (Berger *et al.*, 1982). Também podem ser citados a presença de lume dos túbulos seminíferos, presença de espermátides e espermatozoides e parâmetros moleculares, como marcadores de DNA, proteínas marcadoras como clusterina, que está envolvida na regulação da espermatogênese e na proteção dos espermatozoides, e parâmetros de estresse oxidativo (García-Tomás *et al.*, 2009).

Nos coelhos, a infância se inicia no nascimento e se prolonga até os 40 dias de idade e está caracterizada por concentrações baixas de testosterona e FSH, concentrações decrescentes de LH (até os 20 dias) e por um crescimento lento dos testículos e vias espermáticas (Berger *et al.*, 1982). O período pré-puberal tem um início abrupto por volta dos 40 dias e é marcado pelo aparecimento de células de Leydig maduras no testículo, além de notável aumento nas concentrações de testosterona e FSH, e uma pequena elevação nas concentrações de LH e aceleração no crescimento testicular. A fase de rápido crescimento da vesícula seminal e as primeiras divisões mitóticas começam por volta do dia 70, na presença de altas concentrações de FSH e testosterona na circulação (Berger *et al.*, 1982; Ulloa-Aguirre *et al.*, 2004). O comportamento agressivo (90 dias) e o comportamento de monta (146 ± 13 dias) ocorrem depois de um longo período de circulação de altas concentrações de testosterona sérica (Berger *et al.*, 1982; Cardoso e Bão, 2007).

Berger *et al.* (1982) observaram em um experimento com coelhos que os mesmos apresentaram ganho de peso linear do nascimento aos 180 dias, quando atingiram 3,9kg, com diferenças de magnitude e tempo variáveis. Já o ganho de peso testicular teve um crescimento lento até os 40 dias, seguido de uma fase um crescimento mais rápido até os 210 dias de idade. Esse peso testicular encontrou-se relacionado com os concentrações de FSH

entre 1 e 120 dias de idade e com as concentrações de LH na fase entre 40 e 90 dias.

Concentrações séricas de testosterona circulantes são baixas ao nascimento (279 ± 62 pg/ml) e variam até os 40 dias (375 ± 127 pg/ml). Um aumento significativo ocorre entre os 40 e 60 dias e ficam estáveis até os 90 dias, decrescendo significativamente dos 90 aos 120 dias de idade quando finalmente se estabilizam nas concentrações de animais adultos. As concentrações de testosterona são positivamente correlacionadas com as concentrações de FSH e LH até os 90 dias (Berger *et al.*, 1976; Berger *et al.*, 1982).

Os concentrações de LH são altos ao nascimento, decrescendo drasticamente até os 20 dias e aumentando lenta, mas significativamente, dos 40 aos 70 dias de idade, concomitante ao rápido aumento dos níveis de testosterona. (Berger *et al.*, 1976; Berger *et al.*, 1982). Os menores concentrações de FSH são observados ao nascimento, crescendo rapidamente até os 20 dias, e dos 40 aos 60 dias de idade alcançam os níveis encontrados nos indivíduos adultos (Berger *et al.*, 1982).

Ao nascimento, o testículo é formado por cordões seminíferos que contém células de Sertoli e gonócitos. Espermatócitos com numerosas meioses são vistos entre 70 e 80 dias. Aos 70-80 dias, o espaço peritubular já possui as características dos animais adultos. A formação de lume ocorre entre 90 e 100 dias, enquanto espermátides alongadas são observadas entre 100 e 120 dias. Espermatozoides estão presentes no lume tubular entre 120 e 150 dias. Até os 40 dias, células de Leydig não podem ser identificadas e somente células mesenquimais alongadas indiferenciadas estão presentes nos espaços peritubulares. (Berger *et al.*, 1982; Cardoso e Bão, 2007).

2.6 Comportamento sexual

O comportamento sexual é muito complexo, tanto em machos quanto em fêmeas. Em machos, a testosterona é um dos hormônios que modulam o comportamento sexual. Para estabelecer um padrão de comportamento sexual, pode-se diferenciar as atitudes relacionadas com a movimentação e

disposição do macho na procura pela fêmea daquelas atitudes relacionadas com a execução dos coitos com a proposta de monta. A monta propriamente dita consiste na habilidade e capacidade do macho de montar, introduzir o pênis e ejacular na fêmea (Fuentes *et al.*, 2004). Em coelhos criados em sistemas comerciais de produção, o comportamento de cômte é restrito a rápidos movimentos de cauda e enurese, com certo grau de agressividade sexual seguida de um andar circular na gaiola (Hagen, 1982 em Fuentes *et al.*, 2004). Esses animais, na presença de fêmeas, podem apresentar o comportamento de cheirar a região perineal e friccionar o queixo sobre a fêmea ou objetos para deposição da secreção das glândulas mentuais (Heath, 1972).

Coelhos machos quando colocados em pares em uma arena demonstraram comportamento de friccionar o queixo em seus companheiros depositando secreção das glândulas mentuais. Quase que imediatamente após serem colocados juntos, os animais começaram a circular, mantendo estreito contato corporal e tentando montar o outro, mas ao mesmo tempo evitando ser montado. Caso um conseguisse montar, o animal assumiria posição típica de copulação segurando o flanco do outro animal com as patas traseiras e realizando vigoroso e repetido movimento pélvico. O animal montado, geralmente resiste realizando movimentos abruptos para sair da posição. Outros comportamentos agressivos, como morder e arranhar, são menos comuns. Entretanto, às vezes eles urinam uns nos outros (Arteaga *et al.*, 2008).

Diferenças individuais nos níveis de testosterona estão positivamente correlacionadas com a frequência de fricção do queixo, embora não seja significativa. Esses resultados são consistentes com estudos que reportam que a castração reduz ou elimina o comportamento de fricção do queixo em coelhos enquanto os níveis plasmáticos de testosterona estão baixos (Briganti *et al.*, 2003; Arteaga *et al.*, 2008). A alta variabilidade nos níveis de testosterona nos mesmos indivíduos feita em três amostras sugere que os fatores que influenciam os níveis de testosterona são complexos. Um deles é a influência das relações sociais incluindo o efeito de encontros sociais recentes, indicando que os níveis de testosterona são resultado e causa de interações de dominância e agressividade (Arteaga *et al.*, 2008).

Durante a última etapa do período puberal, o evento do comportamento de monta aparece simultaneamente com os primeiros espermatozoides nos túbulos seminíferos. O comportamento sexual surge repentinamente, mas um longo tempo após os maiores picos de testosterona circulantes, sugerindo que a ativação dos centros nervosos que regulam o comportamento de monta requer um longo período de estimulação. O comportamento de luta ocorre na presença de altos níveis de testosterona e precede o comportamento de monta (Berger *et al.*, 1982).

O comportamento sexual em hamsters machos está totalmente ausente quando há remoção bilateral dos bulbos olfatórios, cirurgia que elimina o estímulo sensorial nos sistemas olfatório e vomeronasal. A destruição do epitélio olfatório principal não cessa o comportamento de monta do hamster, enquanto a lesão do SVN produz alterações importantes no comportamento sexual em um terço desses animais. A lesão completa dos dois sistemas olfatórios faz com que esses animais não apresentem comportamento de cópula (Powers e Winans, 1975). A remoção do OVN ocasiona uma diminuição da intensidade das manifestações do comportamento sexual, indicando que as respostas comportamentais são influenciadas tanto pela remoção do OVN quanto pela experiência sexual (Tirindelli *et al.*, 2009).

2.7 Efeitos dos andrógenos no tecido ósseo do fêmur e no músculo reto femoral

A saúde e a força dos ossos dependem do equilíbrio entre reabsorção e formação óssea. Esse processo é comandado pela interação de osteoclastos e osteoblastos, além da influência de modulação das células mecanossensoriais ósseas, os osteócitos. Ambos os esteroides sexuais (estrógeno e testosterona) possuem receptores em todas as células ósseas, com dominância de andrógenos nos osteoblastos e osteócitos (Notelovitz, 2002).

Andrógenos causam efeitos benéficos no desenvolvimento e manutenção do esqueleto. A detecção e caracterização funcional dos receptores de andrógenos em células ósseas mostram que o tecido ósseo é

um alvo em potencial para esses hormônios. Andrógenos gonadais e adrenais regulam diretamente vários aspectos da linhagem de células osteoblásticas, incluindo proliferação, diferenciação, mineralização, expressão gênica (Hofbauer e Khosla, 1999), produção de matriz e organização, além de agirem também na superfície do osso. Andrógenos também regulam o recrutamento e atividade dos osteoclastos (Notelovitz, 2002). Esses efeitos podem diferir de acordo com o estágio de diferenciação, o número de receptores androgênicos e outras características inerentes (espécie, local, biologia celular) das células do sistema osteoblástico. Além disso, alguns estudos sugerem que os efeitos anabólicos e anti-reabsorção dos andrógenos nos ossos podem ser mediados pela regulação de fatores autócrinos e parácrinos no microambiente ósseo, como alguns fatores de crescimento (Hofbauer e Khosla, 1999).

Andrógenos aumentam tanto a massa quanto a força muscular devido à clara existência da associação entre massa muscular, força muscular e densidade óssea (Notelovitz, 2002). Quando roedores machos de laboratório são castrados, uma marcante depressão no crescimento e perda de desenvolvimento muscular é observada. Entretanto, com a administração de testosterona exógena um desenvolvimento normal é reiniciado (Kochakian, 1966). Músculos alvos, como o elevador anal, é mais responsivo à testosterona do que músculos não alvos, como o diafragma (Buresova e Gutman, 1971). Implantes de testosterona em coelhos intactos aumentam o ganho de peso e a eficiência alimentar, elevam os níveis de insulina e aumentam o conteúdo de RNA no músculo semitendíneo. Acredita-se que a testosterona promove síntese de RNA e aumenta a atividade do DNA na cromatina do músculo (Grigsby *et al.*, 1976).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

O presente experimento foi realizado sob responsabilidade do médico veterinário Laércio dos Anjos Benjamin, CRMV-MG 3387.

Ao final do período experimental, todos os animais foram eutanasiados de acordo com os procedimentos éticos do Biotério da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais e do protocolo CETEA (UFMG) N° 159/2009.

3.2 Animais

Foram utilizados 32 coelhos machos, púberes e jovens, separados em quatro grupos. Os animais foram mantidos aos pares até os 90 dias e, posteriormente, em gaiolas individuais. Os animais foram alimentados com ração comercial para coelhos (Purina ®) e água fresca *ad libitum* com períodos de luminosidade de 12 horas diários (Melo e Silva, 2003).

Os ductos incisivos de 16 coelhos com 60 dias de idade foram obstruídos mediante cauterização com termocautério. Outros 16 animais da mesma idade tiveram seus ductos incisivos injetados com solução salina fisiológica, para simular a manipulação semelhante à do grupo tratado. O primeiro grupo foi formado por oito coelhos jovens, eutanasiados na puberdade (120 dias de idade). Esses animais formaram o grupo tratado de animais jovens. Outros oito animais da mesma idade formaram o grupo controle de animais jovens. O terceiro grupo foi formado por oito coelhos adultos jovens, eutanasiados em fase reprodutiva (180 dias de idade). Esses animais formaram o grupo tratado de animais adultos. O quarto grupo foi utilizado também como grupo controle (180 dias de idade).

Para as análises biométricas, dos componentes testiculares e concentrações de testosterona, os grupos dos animais de 180 dias foram divididos em subgrupos com baixas (entre 0,09 e 0,79ng/mL) e altas (entre 3,12 e 8,35ng/mL) concentrações séricas de testosterona por apresentarem distribuição bimodal (Castro, 1995).

Antes do procedimento foi realizada antissepsia. Todos os animais foram anestesiados com uma mistura de quetamina (Agener®) - xilazina (Agener®), nas doses de 50 e 30 mg/kg de peso respectivamente, pela via intraperitoneal e, logo após, lidocaína 2% sem vasoconstrictor (Bravet®) ao redor do ducto. Após a cauterização do ducto incisivo, os coelhos foram tratados com flunixin meglumine (Shering-Plough®) na dose de 1mg/Kg (via subcutânea) a cada 12 horas durante três dias, e dose única de benzilpenicilina benzatina, procaína e potássica e estreptomicina (Fort Dodge®) na dose de 0,2mL/animal (via intramuscular).

Durante os meses subsequentes do início do experimento (agosto a dezembro), o comportamento sexual e de agressividade foi acompanhado e registrado durante a limpeza das gaiolas, quando dois animais eram colocados em recinto comum. Foi realizada uma pesagem inicial antes do procedimento de cauterização e pesagens subsequentes realizadas semanalmente. O ganho de peso dos coelhos foi calculado subtraindo-se o peso individual inicial aos 60 dias do peso individual final, no momento da eutanásia.

3.3 Coleta e processamento do material

Os coelhos foram anestesiados com tiopental sódico (Cristália®) na dose de 10mg/Kg, via intraperitoneal e, após anestesia profunda, foi coletado sangue diretamente do coração de cada animal. O sangue foi centrifugado a 300g por 10 minutos para separação do soro da porção sólida do sangue. O soro foi colocado em tubos *Eppendorf* devidamente identificados e congelado a -20°C para posteriores avaliações das concentrações de androstenediona e testosterona. A coleta de sangue foi realizada aleatoriamente, em dois dias consecutivos, em um período de seis horas a cada dia, procedimento realizado entre as oito e as 14h, para cada idade. Desta forma, o pico de secreção de testosterona matinal foi distribuído aleatoriamente nos grupos, minimizando a interferência nos resultados. Após a coleta de sangue, os coelhos foram perfundidos via ventrículo esquerdo, com solução de Ringer bicarbonato seguido de solução de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio (pH 7,4 0,1M).

A seguir, os testículos foram coletados e examinados macroscopicamente, evidenciando forma e tamanho. Foi observado se havia alteração indicativa de patologias e imediatamente estes órgãos foram pesados. Os testículos direito e esquerdo foram seccionados transversalmente para obtenção de fragmentos para estudo histológico. Foram coletados de cada testículo, fragmentos de parênquima da extremidade *capitata*, do terço médio e da extremidade *caudata* do testículo que obteve melhor fixação.

Os OVNs e septos nasais também foram removidos da cabeça. A seguir, os OVNs foram seccionados transversalmente ao nível da quarta ruga palatina caudal à papila incisiva e imersos em solução contendo 10% de ácido etileno-diamino-tetra-acético (EDTA) para descalcificação da cápsula óssea.

Posteriormente, todos os fragmentos testiculares e dos OVNs foram desidratados em séries de soluções crescentes de etanol (70% até 100%), sendo então incluídos em resina plástica à base de glicol metacrilato (Technovit®). Os fragmentos incluídos foram cortados em micrótomo na espessura de 4µm, e corados em azul de toluidina 0,5% e borato de sódio 1%, montadas com Entellan Merck® para análises histológicas e estimativa de dimensões utilizando técnicas morfométricas de rotina aplicadas à microscopia de luz (microscópio Olympus® BX 41). Alguns fragmentos dos OVNs foram incluídos em parafina e foram realizadas colorações de hematoxilina-eosina e impregnação argêntica de Gomori (Humason, 1995) para evidenciar o neuroepitélio.

Amostras do OVN foram preparadas para estudo em microscopia eletrônica de transmissão (MET). Depois de fixados com solução de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio (pH 7,4 0,1M), os fragmentos foram lavados em tampão fosfato a 0,1M e pH 7,4 e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% por uma hora. Após lavagens em tampão fosfato, os fragmentos foram desidratados em concentrações crescentes de soluções de etanol (70% a 100%), finalizando a última passagem em óxido de propileno. Durante 12-16 horas, as amostras foram mantidas sob agitação com óxido de propileno e resina Epon. Em seguida, essa mistura foi substituída por resina pura por quatro horas. Os cortes semifinos foram

obtidos com espessura de 1µm e os cortes ultrafinos com 90nm, utilizando-se ultramicrotomo Leica®.

O material foi contrastado com citrato de chumbo e acetato de uranila para análise (Souza, 2007) e obtenção de imagens digitais em microscópio eletrônico de transmissão EM-9 Zeiss. Tanto a ultramicrotomia quanto a análise em MET foram realizadas no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa (NMM/CCB/UFV).

3.4 Histologia quantitativa do OVN

3.4.1 Composição percentual do OVN

Os percentuais de cada elemento presente no parênquima dos OVNs foram estimados utilizando um retículo com 441 intersecções posicionados sobre fotomicrografias, utilizando-se aumento de 40x de acordo com Russell *et al.*(1990b). Para cada animal foram analisados 20 campos, escolhidos ao acaso, perfazendo um total de 8820 pontos.

Os seguintes elementos tiveram seu percentual estimado:

- Epitélio vomeronasal (neuroepitélio)
- Epitélio respiratório
- Lume
- Cápsula óssea
- Cápsula cartilaginosa
- Vasos sanguíneos
- Glândulas
- Outros (nervos, células do tecido conjuntivo, fibras do tecido conjuntivo e vasos linfáticos)

3.4.2 Diâmetro do lume do OVN

O diâmetro do lume do OVN foi obtido pela mensuração de secções transversais em diâmetro maior e menor a partir de fotomicrografias obtidas ao acaso, com aumento final de 40x, alternando entre os OVNs direito e esquerdo. Foram utilizados 12 campos do órgão por animal, tanto daqueles

que tiveram o ducto cauterizado como nos animais controle. Para isso, foi utilizada régua graduada de 20 cm.

3.4.3 Altura do epitélio vomeronasal

Nas mesmas fotomicrografias em que se mensurou o diâmetro do lume do órgão, foi calculada também a altura do epitélio sensorial (vomeronasal) e do epitélio respiratório, desde a membrana basal até a borda luminal, utilizando-se régua graduada de 20 cm.

3.5 Dosagem das concentrações séricas de androstenediona e testosterona

As dosagens da androstenediona e testosterona foram realizadas por meio da técnica de radioimunoensaio utilizando *kits* comerciais (Count-A-Count da Siemens Medical Solutions Diagnostics.), em triplicata. Os resultados foram fornecidos pelo Instituto Genese de Análises Científicas (IgSc) - Serviço de Dosagens, em São Paulo (SP). Foram fornecidos dados sobre a média, a maior e a menor concentração hormonal, para cada animal.

3.6 Histologia quantitativa dos testículos

A análise histológica quantitativa dos testículos foi realizada considerando-se os seguintes parâmetros:

3.6.1 Proporções volumétricas (%) e volume dos componentes testiculares

Estas proporções, que expressam o volume percentual de cada elemento presente no testículo, foram determinadas por método estereométrico, segundo o qual é utilizado um retículo acoplado à ocular de microscópio. O retículo apresenta 441 intersecções (pontos) por campo em aumento final de 400x. Foram utilizados 20 campos aleatórios por animal, perfazendo um total de 8820 pontos. Foram contabilizados os pontos que coincidiam com as estruturas testiculares (Russell *et al.*, 1990b), tomando-se cuidado com túbulos próximos, para que não houvesse contagem repetida.

Os seguintes elementos tiveram sua proporção e volume estimados:

Compartimento tubular:

- Túnica própria
- Epitélio seminífero
- Lume tubular

Espaço intertubular ou intersticial:

- Células de Leydig
- Vasos sanguíneos
- Outros (vasos linfáticos, células como fibroblastos, mastócitos e macrófagos, e fibras do tecido conjuntivo)

Artefatos

Células de Sertoli

Os cálculos do volume ocupado por cada componente testicular, expresso em μL , foram estimados a partir do peso líquido do testículo. Este valor foi obtido subtraindo-se do peso bruto do testículo o peso da túnica albugínea e do mediastino, estimado em 5% do peso testicular (França e Russell, 1998). Como a densidade do testículo é muito próxima de 1 (1,038; Amann, 1970b; França, 1991), o peso do testículo foi considerado igual ao seu volume.

O volume de cada um destes componentes foi calculado de acordo com a fórmula:

$$V = V_T \cdot X/100$$

Onde:

V = volume de um componente testicular (μL)

V_T = volume total do parênquima testicular (μL)

X = porcentagem ocupada pelo componente no testículo (%)

3.6.2 Diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero

O diâmetro tubular médio por animal foi obtido a partir da mensuração ao acaso de 30 secções transversais de túbulos seminíferos que apresentavam contorno o mais circular possível, utilizando-se ocular micrométrica de 10x, com aumento final 400x. Foram realizadas medições dos diâmetros maior e menor do túbulo e calculadas as médias e erros padrões.

Nas mesmas secções em que se obteve o diâmetro tubular foi medida também a altura do epitélio seminífero, desde a membrana basal até a borda luminal. O valor encontrado para a altura do epitélio em cada túbulo representou a média de duas medidas tomadas diametralmente opostas.

3.6.3 Comprimento total dos túbulos seminíferos

O comprimento total dos túbulos seminíferos (metros) foi determinado dividindo-se o volume ocupado pelos túbulos seminíferos no parênquima testicular, pelos raios (diâmetros divididos por dois) do túbulo, multiplicado pelo valor de π , segundo Dorst e Sajonski (1974).

3.6.4 Volume e número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo

O percentual ocupado pelas células de Leydig no parênquima testicular foi estimado pela contagem de células de Leydig em secções transversais aleatórias de túbulo seminífero, utilizando retículo com 441 intersecções. Foram utilizados 20 campos por animal em um aumento de 400x, totalizando 8820 pontos.

Como o núcleo das células de Leydig possui forma normalmente ovóide, as mesmas tiveram o diâmetro maior e menor mensurados, calculando-se assim o valor do diâmetro médio.

Foi realizada a mensuração do diâmetro maior e menor dos núcleos de 30 células de Leydig que se apresentavam arredondados e com cromatina perinuclear e nucléolos evidentes, com auxílio de régua

micrométrica acoplada à ocular de 10x, utilizando-se objetiva de 100x, resultando em aumento final de 1000x.

A fim de calcular a proporção entre núcleo e citoplasma, um retículo com 441 pontos foi colocado sobre o material seccionado no aumento de 1000x (imersão) e 1000 pontos que incidiram sobre as células de Leydig foram contados para cada animal.

Em seguida estimou-se o volume nuclear, volume citoplasmático e o volume de cada célula de Leydig por animal em μm^3 (França e Russell, 1998).

$$\text{Volume nuclear} = 4/3(\pi.r^3)$$

Onde:

R = raio nuclear (diâmetro nuclear/2)

$\pi = 3,1416$

Volume citoplasmático = % citoplasma x volume nuclear/% núcleo

Volume celular = volume nuclear + volume citoplasmático

O número de células de Leydig por testículo pode ser calculado dividindo o volume total ocupado por essas células, estimado anteriormente pela proporção volumétrica, pelo volume total de uma célula. O número de células de Leydig por grama de testículo pode ser calculado pela razão entre o número de células de Leydig por testículo e o peso testicular individual.

3.6.5 Volume nuclear e número de células de Sertoli por testículo e por grama de testículo

O volume nuclear (μm^3) das células de Sertoli foi mensurado utilizando-se a seguinte fórmula (França, 1991):

$$\text{Volume nuclear} = 4/3(\pi.r^3)$$

Onde:

r = raio nuclear (diâmetro nuclear / 2)

$\pi = 3,1416$

O diâmetro nuclear médio representa o valor médio dos diâmetros de 30 núcleos de células de Sertoli, por animal, nas diferentes idades investigadas. Como o núcleo das células de Sertoli possui forma normalmente ovoide, as mesmas tiveram o diâmetro maior e menor mensurados e o valor médio calculado. Neste tipo de avaliação, somente as células de Sertoli com nucléolo evidente foram consideradas. Estes diâmetros foram medidos com o auxílio de ocular micrométrica de 10x, acoplada à objetiva de 100x, resultando em aumento final de 1000x.

De posse do volume nuclear (μm^3) das células de Sertoli, da proporção volumétrica (%) das mesmas no testículo, e do volume total (μL) ocupado por estas células no testículo, foi estimado o número de células de Sertoli por testículo, conforme fórmula abaixo:

$$\text{NCs} = V/V_n$$

Onde:

NCs = número de células de Sertoli no testículo ($\times 10^6$)

V = volume total de células de Sertoli no parênquima testicular (μL)

V_n = volume nuclear da célula de Sertoli (μm^3)

O número de células de Sertoli por grama de testículo pode ser calculado pela razão entre o número de células de Sertoli por testículo e o peso testicular individual.

3.6.6 Índice gonadossomático

Para cada animal investigado, o índice gonadossomático (IGS) foi estimado de acordo com a fórmula:

$$\text{IGS} = \text{PG}/\text{PC} \times 100 \text{ onde:}$$

PG = Peso total das gônadas (peso total dos testículos esquerdo e direito)

PC = Peso corporal

3.7 Análise ultraestrutural do OVN

Foi realizada análise ultraestrutural comparativa das eletromicrografias dos órgãos vomeronasais lesados e dos órgãos intactos

3.8 Densidade óssea da região epifisária do osso fêmur, quantidade de água e de gordura no músculo reto femoral

Para a estimativa da densidade óssea, após a eutanásia dos animais, foram obtidas secções de aproximadamente 0,5g da epífise proximal do fêmur esquerdo de cada animal, na altura do forame nutrício. O osso fêmur é um osso longo, com epífises bem delimitadas e seu forame nutrício pode ser facilmente localizado. Fragmentos de aproximadamente 2g do terço médio do músculo reto femoral do membro pélvico esquerdo de cada animal foram retirados para obtenção dos dados de percentual de água e gordura do músculo. O músculo reto femoral é um músculo volumoso, superficial, bem delimitado, de fácil acesso e possível de ser isolado completamente.

Os segmentos foram identificados e pesados (gramas). Posteriormente os segmentos de epífise do osso e do músculo foram colocados em estufa a 60°C, durante 30 dias.

Para calcular a densidade óssea, os segmentos ósseos desidratados foram imersos individualmente em um recipiente com água e com seu peso conhecido. Após a imersão do osso, o recipiente foi novamente pesado, calculando-se a diferença entre o peso inicial e peso final do recipiente. Como a densidade da água é igual a 1g/cm³, podemos considerar que a massa óssea é igual ao volume deslocado de acordo com a fórmula: D (densidade) = massa/volume).

A quantidade de água do músculo reto femoral foi calculada a partir da diferença na massa muscular final e inicial, após a desidratação em estufa.

Após o procedimento de desidratação, os segmentos do músculo reto femoral foram imersos em xilol em vidro fechado onde ficaram por 15 dias em estufa a 60°C. Após esse processo, foi retirado o xilol e os fragmentos de músculo foram novamente colocados durante 15 dias em estufa a 60°C,

Finalmente, os fragmentos musculares foram novamente pesados e a diferença de massa foi considerada a quantidade de gordura contida nesses tecidos (Mandarim-de-Lacerda, 1995).

3.9 Análise estatística

Inicialmente foi realizado teste de normalidade e homocedasticidade para avaliar se as variáveis são paramétricas. Todos os dados obtidos são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) e foram analisados através de Teste t de Student. O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$. Foi realizado teste de correlação linear simples entre a concentração sérica de testosterona e horário da coleta.

4. RESULTADOS

4.1 Comportamento social dos coelhos

No presente trabalho observou-se que quando os animais jovens e adultos não tratados eram colocados juntos, estes animais apresentavam comportamento agressivo, por meio de mordidas, patadas e arranhões. Os coelhos circundavam o outro animal, mantendo contato corporal e realizando movimentos de monta, além de urinarem ou friccionarem o queixo uns nos outros. Os animais tratados, tanto jovens como adultos, apresentavam comportamento dócil, não se aproximavam dos outros animais e quando o faziam, não realizavam nenhum comportamento de agressividade ou sexual. O manejo desses animais também era facilitado pelo comportamento calmo e tranquilo.

4.2 Descrição histológica do órgão vomeronasal

O órgão vomeronasal (OVN) dos coelhos estudados apresenta comprimento de $12,2 \pm 0,42\text{mm}$, é uma estrutura par, de conformação tubular situado a cada lado da base do septo nasal (Figuras 1 e 2). No interior do OVN encontra-se a porção tubular, de secção transversal elíptica (Figura 3), formada pelos epitélios sensorial e respiratório (Figuras 3 e 5). Esta porção tubular estende-se desde o ducto incisivo rostralmente até o fundo cego, que está localizado caudalmente. Logo após, o fundo da porção tubular do OVN estreita-se abruptamente. Desta forma, a parte caudal do órgão não apresenta os epitélios sensorial e respiratório. O OVN encontra-se envolvido por uma cápsula cartilaginosa hialina, a cartilagem vomeronasal, a qual está protegida externamente por uma fina cápsula óssea (Figura 4). Entre a parte tubular do OVN e a cápsula cartilaginosa encontra-se a lâmina própria, formada por uma espessa camada de tecido conjuntivo. As cápsulas ósseas e cartilaginosas sofrem uma interrupção na porção dorsal do órgão onde a lâmina própria se continua com o tecido conjuntivo do septo nasal. Este órgão se comunica rostralmente com o ducto incisivo, que desemboca

ventralmente ao lado da papila incisiva, na cavidade oral. Dorsalmente, o ducto incisivo desemboca sob a prega basal, no assoalho da cavidade nasal.

A porção tubular do OVN apresenta o lume central também de formato elíptico (Figura 2 e 3). Este lume está revestido medialmente por um epitélio neurosensorial. Ele é formado por células de suporte, células basais e células sensoriais (neurônio bipolares) que ocupam toda a espessura do epitélio (Figuras 5 e 6), embora possuam núcleos dispostos de forma estratificada (Figuras 7, 8 e 9). As células de suporte possuem núcleos próximos da luz do órgão e as células sensitivas possuem núcleos no terço médio do epitélio, enquanto que as células basais indiferenciadas situam-se mais distantes do lume. Lateralmente, o lume da porção tubular encontra-se revestido por um epitélio colunar pseudoestratificado ciliado com células caliciformes. Este epitélio não é sensorial e comumente é denominado epitélio respiratório (Figuras 3, 5 e 6). Glândulas túbulo-acinosas com aspecto de glândulas secretoras de muco são encontradas em abundância na porção não tubular, dorsal e ventralmente ao lume (Figuras 4 e 5). As glândulas do OVN secretam o muco no lume tubular por meio de curtos ductos.

O órgão vomeronasal do coelho é uma estrutura bastante vascularizada e os vasos sanguíneos ocupam a maior parte do órgão. Esses vasos localizam-se principalmente subjacentes ao epitélio sensorial em sua porção lateral. Devido à abundância de vasos encontrados, com mesmo calibre, é difícil definir uma artéria principal. Também foram identificadas arteríolas, veias e vênulas ao longo do órgão. Além disso, o plexo sanguíneo palatino encontra-se externamente à cápsula óssea, na porção periférica lateral e ventral do órgão (Figuras 3 e 4).

O epitélio sensitivo do OVN dos animais tratados apresenta espaços intercelulares na região onde se encontram os núcleos das células nervosas e os núcleos das células de sustentação encontram-se alongados, densos e com bordas irregulares (Figuras 7 e 8). Na microscopia eletrônica de transmissão, os espaços claros encontrados entre as células nervosas, observados na histologia, foram também observados nos animais adultos do grupo tratado (Figura 10).

4.3 Morfometria do órgão vomeronasal

Em relação ao percentual dos componentes do OVN, não foram encontradas diferenças ($p>0,05$) entre os animais jovens dos grupos controle e tratados (Tabela 1). Esses animais foram denominados assim por serem sacrificados ainda jovens, aos 120 dias de idade. Entretanto, nos animais adultos do grupo tratado, assim denominados por serem sacrificados aos 180 dias de idade, os percentuais de glândula e de epitélio respiratório apresentaram diminuição ($p<0,05$). Nestes animais, os demais componentes do órgão não apresentaram diferenças ($p>0,05$).

O órgão não apresentou diferenças ($p>0,05$) nas mensurações de lume e epitélios e sensorial em nenhum dos grupos. Nos animais jovens do grupo controle as medidas do lume maior e menor foram $0,17 \pm 0,01\text{mm}$ e $0,03 \pm 0,003\text{mm}$, respectivamente. O epitélio respiratório apresentou altura de $0,01 \pm 0,01\text{mm}$, enquanto para o epitélio sensorial o valor foi de $0,02 \pm 0,002\text{mm}$. Os animais do grupo tratado (denominados assim por terem sido submetidos à cauterização do ducto incisivo) apresentaram média de $0,16 \pm 0,01\text{mm}$ para o lume maior e $0,03 \pm 0,004\text{mm}$ para o lume menor. Para o epitélio respiratório o valor foi de $0,01 \pm 0,0001\text{mm}$; para o epitélio sensorial, de $0,02 \pm 0,001\text{mm}$.

Nos animais adultos do grupo controle as medidas do lume maior e menor foram $0,19 \pm 0,01\text{mm}$ e $0,03 \pm 0,003\text{mm}$, respectivamente. A altura do epitélio respiratório foi de $0,01 \pm 0,001\text{mm}$ e do epitélio sensorial foi de $0,03 \pm 0,001\text{mm}$. Os animais tratados apresentaram média de $0,17 \pm 0,01\text{mm}$ para o lume maior e $0,02 \pm 0,003\text{mm}$ para o lume menor. No epitélio respiratório, a altura foi de $0,01 \pm 0,001\text{mm}$; no epitélio sensorial, $0,03 \pm 0,001\text{mm}$.

Tabela 1. Componentes do órgão vomeronasal, expressados em percentual (%) em coelhos da raça Nova Zelândia, obtidos de animais dos grupos controle e tratado (média ± erro padrão médio)

Grupos	Componentes do órgão vomeronasal							
	Lume	Epitélio respiratório	Epitélio sensorial	Vasos sanguíneos	Glândulas	Cápsula óssea	Cápsula cartilaginosa	Outros
Jovens controle	3,48±0,73 ^a	3,67±0,88 ^a	2,33±0,37 ^a	33,18±1,62 ^a	6,84±1,28 ^a	13,59±1,43 ^a	28,82±1,52 ^a	8,07±0,67 ^a
Jovens tratados	2,92±0,85 ^a	3,38±0,53 ^a	3,41±1,08 ^a	33,35±3,1 ^a	7,00±1,54 ^a	12,04±0,92 ^a	27,78±1,16 ^a	10,1±1,73 ^a
Adultos controle	3,01±0,65 ^A	5,41±0,54 ^A	2,50±0,33 ^A	30,54±1,58 ^A	8,39±0,71 ^A	12,48±2,2 ^A	28,36±0,76 ^A	9,30±1,25 ^A
Adultos tratados	2,21±0,48 ^A	3,79±0,52 ^B	2,40±0,46 ^A	29,99±2,64 ^A	6,16±0,82 ^B	15,37±1,32 ^A	28,38±1,55 ^A	11,7±1,88 ^A

*outros = nervos, células, fibras do tecido conjuntivo e vasos linfáticos.

** valores na mesma linha com letras diferentes sobrescritas indicam ($p < 0,05$) pelo teste t de Student; letras minúsculas são referentes aos animais jovens; letras maiúsculas são referentes aos animais adultos; parâmetros dos animais jovens não foram comparados com os parâmetros dos animais adultos.

***n=8 para cada grupo

4.4 Concentrações de androstenediona e testosterona

Não houve diferenças entre as concentrações de androstenediona entre os animais jovens dos grupos controle e tratado ($p>0,05$). Entre os grupos controle e tratados, quando considerados os animais adultos, também não foram observadas diferenças ($p>0,05$) na concentração desse hormônio (Tabela 2).

Tabela 2. Concentrações séricas de androstenediona (ng/mL) de coelhos da raça Nova Zelândia obtidos de animais dos grupos controle e tratados (média \pm erro padrão médio).

Animais	Média	Amplitude
Jovens controle	0,30 \pm 0,10 ^a	0,002-0,76
Jovens tratados	0,12 \pm 0,03 ^a	0,03-0,30
Adultos controle	0,09 \pm 0,02 ^A	0,016-0,19
Adultos tratados	0,16 \pm 0,02 ^A	0,03-0,50

* valores na mesma linha com letras diferentes sobrescritas indicam ($p<0,05$) pelo teste t de Student; letras minúsculas são referentes aos animais jovens; letras maiúsculas são referentes aos animais adultos; parâmetros dos animais jovens não foram comparados com os parâmetros dos animais adultos.

**n=8 para cada grupo

Nos animais jovens e adultos do subgrupo 1, as concentrações de testosterona sérica foram menores nos animais do grupo tratado em relação aos animais do grupo controle ($p<0,05$). Não houve diferenças ($p>0,05$) entre as concentrações de testosterona sérica entre os animais dos grupos controle e tratado (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3. Concentrações séricas de testosterona (ng/mL) em coelhos da raça Nova Zelândia, com 120 dias obtidos de animais dos grupos controle e tratado (média \pm erro padrão médio).

Animais	Média	Amplitude
Jovens controle	5,02 \pm 0,80 ^a	0,64-12,34
Jovens tratado	1,83 \pm 0,2 ^b	0,81-3,6

*n=8 para cada grupo

** valores na mesma linha com letras diferentes sobrescritas indicam ($p<0,05$) pelo teste t de student

Tabela 4. Concentrações séricas de testosterona (ng/mL) em coelhos da raça Nova Zelândia, com 180 dias, obtidos de animais dos grupos controle e tratado (média \pm erro padrão médio).

Animais	Média	Amplitude
Adultos controle subgrupo 1*	0,579 \pm 0,90 ^a	0,09-0,87
Adultos tratados subgrupo 1*	0,248 \pm 0,087 ^b	0,02-0,79
Adultos controle subgrupo 2**	3,899 \pm 0,153 ^A	3,24-4,98
Adultos tratados subgrupo 2**	4,783 \pm 0,589 ^A	3,12-8,35

*Subgrupo 1: animais com baixas concentrações de testosterona sérica; subgrupo 2: animais com altas concentrações de testosterona.

** valores na mesma linha com letras diferentes sobrescritas indicam ($p < 0,05$) pelo teste t de Student; letras minúsculas são referentes aos animais do subgrupo 1; letras maiúsculas são referentes aos animais do subgrupo 2; não houve comparação entre os subgrupos.

***n=4 para cada subgrupo

4.5 Correlação entre horário de coleta de sangue e concentração de testosterona sérica

Foi realizado o teste de correlação linear simples e os valores apresentados indicam baixa correlação entre o horário da coleta de sangue cardíaca e as concentrações séricas da testosterona ($r=0,065$).

4.6 Peso corporal, peso testicular e índice gonadossomático

O peso vivo dos animais aos 60 dias variou entre 2030g e 3300g, com média de 2566,40 \pm 57,80g. Os animais jovens, eutanasiados aos 120 dias de idade e apresentaram pesos entre 2540 e 3420g, com média de 2917,50 \pm 102,06g (grupo controle) e entre 2455g e 3870g, com média de 3226,87 \pm 165,54g (grupo tratado), sem diferenças (Tabela 5) entre os grupos ($p > 0,05$). Os animais adultos foram eutanasiados aos 180 dias de idade. No subgrupo 1, os animais apresentaram pesos entre 2800g e 3450g com média de 3145 \pm 147,45g (subgrupo 1 controle), menor ($p < 0,05$) que os animais do subgrupo 1 tratado que o peso oscilou entre 3510g e 4260g com média de 3865 \pm 154,19g. Nos animais do subgrupo 2 o peso corporal variou entre 3100g e 4170g com média 3465 \pm 244,01g de (grupo controle) e de 3550g a 4030g com média 3727,5 \pm 111,38g (grupo tratado), não havendo diferenças significativas no peso corporal final, entre os grupos (Tabela 6).

Conforme observado na Tabela 6, houve um ganho de peso ($p < 0,05$) aos 180 dias dos animais do grupo adulto (subgrupo 1) tratado em relação

aos animais do grupo controle. Entre os animais jovens e os animais adultos do subgrupo 2 não houve diferença de ganho de peso ($p>0,05$).

O peso testicular dos animais jovens aos 120 dias de idade variava entre 1,64g e 2,44g com média de $1,96 \pm 0,04$ (grupo controle), e entre 0,55g e 2,65g com média de $1,81g \pm 0,21g$ (grupo tratado), sem diferença ($p>0,05$) entre os grupos (Tabela 5). Os animais adultos do subgrupo 1 apresentaram peso testicular aos 180 dias variando entre 1,74g e 3,03g com média de $2,41 \pm 0,34g$ (grupo controle) e entre 2,09 e 3,71g com média de $2,85 \pm 0,40g$ (grupo tratado), sem diferença ($p>0,05$). O grupo tratado do subgrupo 2 apresentou peso testicular maior ($p<0,05$) que o grupo controle variando entre 2,82g e 3,02 com média de $2,91 \pm 0,4g$ e 1,70g e 2,62g com média de $2,08 \pm 0,21g$, respectivamente (Tabela 6).

O IGS (Tabelas 5 e 6) foi calculado pela razão do peso total dois testículos pelo peso corporal. O IGS calculado para os animais jovens variou entre 0,11% e 0,16% com média de $0,13 \pm 0,005\%$ (grupo controle) e entre 0,05% e 0,15% com média de $0,11 \pm 0,01\%$ (grupo tratado). O grupo tratado apresentou IGS menor que o grupo controle ($p<0,05$). Os animais adultos do subgrupo 1 apresentaram, aos 180 dias, IGS variando entre 0,12% e 0,19% com média de $0,16\% \pm 0,02\%$ (grupo controle) e entre 0,12% e 0,18% com média de $0,15\% \pm 0,02\%$ (grupo tratado) sem diferenças ($p>0,05$). Os animais adultos do subgrupo 2 apresentaram, aos 180 dias, IGS variando entre 0,10% e 0,15% com média de $0,13\% \pm 0,01\%$ (grupo controle) e entre 0,16% e 0,17% com média de $0,16\% \pm 0,004\%$ (grupo tratado). Os animais adultos do subgrupo 2 do grupo tratado apresentaram IGS maior (Tabela 6) em relação ao grupo controle ($p<0,05$).

Tabela 5. Peso corporal, ganho de peso, peso testicular e índice gonadossomático (IGS) de coelhos da raça Nova Zelândia, aos 120 dias de idade, obtidos de animais dos grupos controle e tratado (média \pm erro padrão médio).

Parâmetros	Grupos de animais	
	Jovens controle	Jovens tratados
Peso corporal (g)	2917,5 \pm 102,06 ^a	3226,87 \pm 165,54 ^a
Ganho de peso (g)	523,75 \pm 42,13 ^a	554,38 \pm 66,34 ^a
Peso testicular (g)	1,96 \pm 0,04 ^a	1,81 \pm 0,21 ^a
ÍGS* (%)	0,13 \pm 0,005 ^a	0,11 \pm 0,01 ^b

* valores na mesma linha com letras diferentes sobrescritas indicam ($p<0,05$) pelo teste t de Student

**n=8 para cada grupo;

Tabela 6. Peso corporal, ganho de peso, peso testicular e índice gonadossomático (IGS) de coelhos da raça Nova Zelândia, aos 180 dias de idade, obtidos de animais dos grupos controle e tratado (média ± erro padrão médio).

Parâmetros	Grupos de animais			
	Subgrupo 1		Subgrupo 2	
	Adultos controle	Adultos tratados	Adultos controle	Adultos tratados
Peso corporal (g)	3145±147,45 ^a	3865±154,19 ^b	3465±244,01 ^A	3727,5±111,38 ^A
Ganho de peso (g)	806,25±116,75 ^a	1167,5±137,80 ^b	922,5±104,59 ^A	1080±40,82 ^A
Peso testicular (g)	2,41±0,34 ^a	2,85±0,4 ^a	2,08±0,21 ^A	2,91±0,04 ^B
ÍGS* (%)	0,16± 0,02 ^a	0,15± 0,02 ^a	0,13 ± 0,01 ^A	0,16± 0,004^B

*Subgrupo 1: animais com baixas concentrações de testosterona sérica; subgrupo 2: animais com altas concentrações de testosterona.

** valores na mesma linha com letras diferentes sobrescritas indicam ($p < 0,05$) pelo teste t de Student letras minúsculas são referentes aos animais do subgrupo 1; letras maiúsculas são referentes aos animais do subgrupo 2; não houve comparação entre os subgrupos.

***n=4 para cada subgrupo

4.7 Morfometria do testículo

As análises morfométricas dos testículos dos animais dos grupos controle e tratados são apresentadas nas Tabelas 7 e 8.

A maior parte do parênquima testicular consiste de túbulos seminíferos (Figuras 11 e 12) sendo $69,67 \pm 1,17$ em animais jovens do grupo controle, e $68,45 \pm 0,76\%$ nos animais jovens do grupo tratado, sem diferença ($p > 0,05$) entre os grupos. Nos animais adultos do subgrupo 1 do grupo controle o valor de $69,07 \pm 0,98\%$ também não apresentou diferença ($p > 0,05$) em relação aos animais adultos do grupo tratado, com ducto incisivo cauterizado ($71,70 \pm 1,95\%$), assim como os animais adultos do subgrupo 2 que apresentaram $71,29 \pm 1,72\%$ (grupo controle) do parênquima composto por túbulos seminíferos e $70,65 \pm 1,23\%$ (grupo tratado), sem diferenças significativas.

Os percentuais para as células de Leydig foram diferentes ($p < 0,05$) com 120 dias e 180 dias de idade (subgrupo 2), como observado nas Tabelas 7 e 8. Para os animais jovens do grupo controle a proporção de células de Leydig ($3,01 \pm 0,26\%$) foi maior ($p < 0,05$) que dos animais tratados ($1,60 \pm 0,16\%$). Os animais do subgrupo 1 com 180 dias de idade não apresentaram diferenças para esse parâmetro ($p > 0,05$). Já nos animais adultos do subgrupo 2, o grupo controle apresentou menor proporção

($p < 0,05$) de células de Leydig ($2,16 \pm 0,18\%$) em relação aos animais tratados ($2,92\% \pm 0,18\%$).

Em relação aos outros componentes testiculares nos animais jovens somente os vasos sanguíneos (Figura 13) não apresentaram diferença ($p > 0,05$) entre os animais jovens. Já nos animais adultos, em ambos os subgrupos 1 e 2, nenhuma dessas estruturas apresentou diferença ($p > 0,05$).

Nos animais jovens do grupo controle, o diâmetro tubular esteve entre $45\mu\text{m}$ e $90\mu\text{m}$ com média de $66,19 \pm 0,700 \mu\text{m}$ sendo estatisticamente semelhante aos animais jovens tratados, onde o diâmetro tubular esteve entre $40\mu\text{m}$ e $100 \mu\text{m}$ com média de $64,7 \pm 0,84\mu\text{m}$. Já o diâmetro tubular nos animais adultos do subgrupo 1 do grupo controle (entre $46\mu\text{m}$ e $87\mu\text{m}$, e média de $64,12 \pm 0,97\mu\text{m}$), apresentou diferença significativa em relação aos animais tratados (entre $55\mu\text{m}$ e $99 \mu\text{m}$, e média de $73,45 \pm 1,01\mu\text{m}$). Os animais adultos controle do subgrupo 2 (entre $43\mu\text{m}$ e $95\mu\text{m}$ com média $74,52 \pm 1,25\mu\text{m}$) também apresentaram valores dos diâmetros tubulares menores ($p < 0,05$) que os animais do grupo tratado (entre $52\mu\text{m}$ e $92\mu\text{m}$ com média de $71,27 \pm 0,99 \mu\text{m}$). Nas tabelas 7 e 8 também podem ser observados, ainda, os valores da altura do epitélio seminífero, que também não apresentaram diferença significativa.

Em relação ao comprimento tubular por testículo (Tabela 7) os animais jovens do grupo de animais controle apresentaram valores maiores ($p < 0,05$) em relação ao grupo de animais tratados, embora não haja diferença no comprimento tubular por grama de testículo ($p > 0,05$). Já nos animais adultos do subgrupo 1 (Tabela 8) o valor do comprimento tubular por grama de testículo foi menor no grupo tratado ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle, apesar dos valores do comprimento tubular por testículo não apresentarem diferenças ($p > 0,05$). Entretanto, nos animais adultos tratados do subgrupo 2, foram encontrados valores maiores que os animais do grupo controle em relação ao comprimento tubular por testículo ($p < 0,05$), embora o comprimento tubular por grama de testículo não apresente diferenças ($p > 0,05$).

Nos animais jovens do grupo controle os volumes da túnica própria, células de Leydig e lume foram maiores ($p < 0,05$) que os valores obtidos nos animais tratados. Já os valores de outros componentes testiculares foram

menores ($p < 0,05$). Nos animais do subgrupo 1 do grupo adulto, os volumes de todos os componentes testiculares não apresentaram diferença ($p > 0,05$). Entretanto, nos animais subgrupo 2 do grupo adulto tratado apresentaram valores para o volume da túnica própria, epitélio seminífero, células de Leydig e outras estruturas do compartimento intertubular maiores ($p < 0,05$) em relação aos animais do controle do mesmo grupo (Tabelas 9 e 10).

Tabela 7. Morfometria do testículo de coelhos da raça Nova Zelândia, com 120 dias de idade, obtidos de animais dos grupos controle e tratado (média \pm erro padrão médio).

Parâmetros	Grupos de animais	
	Jovens controle	Jovens tratados
Proporção volumétrica(%)		
Compartimento tubular	84,55 \pm 0,73 ^a	79,74 \pm 0,82 ^b
Túnica própria	6,03 \pm 0,22 ^a	4,79 \pm 0,25 ^b
Epitélio seminífero	69,67 \pm 1,17 ^a	68,45 \pm 0,76 ^a
Lume	8,85 \pm 0,73 ^a	6,50 \pm 0,66 ^b
Compartimento intertubular	15,45 \pm 0,73 ^a	20,26 \pm 0,82 ^b
Células de Leydig	3,01 \pm 0,26 ^a	1,60 \pm 0,16 ^b
Vasos sanguíneos	1,46 \pm 0,25 ^a	1,33 \pm 0,13 ^a
Outros	10,99 \pm 0,80 ^a	17,32 \pm 0,93 ^b
Diâmetro tubular (μ m)	66,19 \pm 0,70 ^a	64,7 \pm 0,84 ^a
Altura do epitélio seminífero (μ m)	22,28 \pm 0,33 ^a	21,56 \pm 0,45 ^a
CTS/g testículo (m)*	214,07 \pm 4,91 ^a	224,67 \pm 5,70 ^a
CTS/testículo (m)**	397,05 \pm 8,65 ^a	366,96 \pm 10,56 ^b

* Comprimento dos túbulos seminíferos por grama de testículo.

** Comprimento total dos túbulos seminíferos por testículo.

***n=8 para cada grupo

**** valores na mesma linha com letras diferentes sobrescritas indicam ($p < 0,05$) pelo teste t de Student

Tabela 8. Morfometria do testículo de coelhos da raça Nova Zelândia, com 180 dias de idade, obtidos de animais dos grupos controle e tratado (média ± erro padrão médio).

Parâmetros	Grupos de animais			
	Subgrupo 1		Subgrupo 2	
	Adultos controle	Adultos tratados	Adultos controle	Adultos tratados
Proporção volumétrica(%)				
Compartimento tubular	80,89±1,31 ^a	83,54±1,95 ^a	83,16±1,25 ^A	82,20±0,74 ^A
Túnica própria	5,07±0,32 ^a	4,47±0,47 ^a	3,93±0,34 ^A	4,68±0,23 ^A
Epitélio seminífero	69,07±0,98 ^a	71,70±1,95 ^a	71,29±1,72 ^A	70,65±1,23 ^A
Lume	6,76±0,85 ^a	7,37±0,87 ^a	7,95±0,83 ^A	6,87±1,26 ^A
Compartimento intertubular	19,10±1,31 ^a	16,46±1,95 ^a	16,84±1,25 ^A	17,79±0,74 ^A
Células de Leydig	2,35±0,25 ^a	2,78±0,40 ^a	2,16±0,18 ^A	2,92±0,18 ^B
Vasos sanguíneos	1,52±0,25 ^a	1,61±0,27 ^a	1,76±0,18 ^A	1,35±0,11 ^A
Outros	15,23±1,18 ^a	18,07±1,96 ^a	12,92±0,97 ^A	13,52±0,94 ^A
Diâmetro tubular (µm)	64,12±0,97 ^a	73,14±1,01 ^b	74,52±1,25 ^A	71,27±0,99 ^B
Altura do epitélio seminífero (µm)	19,57±0,55 ^a	25,14±0,61 ^b	23,99±0,62 ^A	22,73±0,57 ^A
CTS/g testículo (m)*	224,91±6,54 ^a	178,79±4,80 ^b	175,48±6,81 ^A	185,34±5,30 ^A
CTS/testículo (m)**	530,79±17,99 ^a	509,61±19,93 ^a	366,04±16,34 ^A	539,99±15,38 ^B

* Comprimento dos túbulos seminíferos por grama de testículo.

** Comprimento total dos túbulos seminíferos por testículo.

***Subgrupo 1: animais com baixas concentrações de testosterona sérica; subgrupo 2: animais com altas concentrações de testosterona.

**** valores na mesma linha com letras diferentes sobrescritas indicam (p<0,05) pelo teste t de Student; letras minúsculas são referentes aos animais do subgrupo 1; letras maiúsculas são referentes aos animais do subgrupo 2; não houve comparação entre os subgrupos.

*****n=4 para cada subgrupo

Tabela 9. Volume dos principais componentes do testículo de coelhos da raça Nova Zelândia, com 120 dias de idade, obtidos de animais dos grupos controle e tratado (média ± erro padrão médio).

Parâmetros	Grupos de animais	
	Jovens controle	Jovens tratados
Volume 10 ⁹ (µm ³)		
Compartimento tubular	1574,35±27,55 ^a	1382,60±16,90 ^a
Túnica própria	112,23±4,28 ^a	81,43±9,91 ^b
Epitélio seminífero	1264,57±22,7 ^a	1185,61±145,0 ^a
Lume	165,65±15,02 ^a	115,56±17,99 ^b
Compartimento intertubular	288,24±15,96 ^a	337,73±31,55 ^a
Células de Leydig	56,02±5,07 ^a	28,43±3,86 ^b
Vasos sanguíneos	26,95±4,49 ^a	23,70±3,92 ^a
Outros	205,27±17,12 ^a	285,59±25,09 ^b

*n=8 para cada grupo

** valores na mesma linha com letras diferentes sobrescritas indicam (p<0,05) pelo teste t de Student

Tabela 10. Volume dos principais componentes do testículo de coelhos da raça Nova Zelândia, com 180 dias de idade, obtidos de animais dos grupos controle e tratado (média ± erro padrão médio).

Parâmetros	Grupos de animais			
	Subgrupo 1		Subgrupo 2	
	Adultos controle	Adultos tratados	Adultos controle	Adultos tratados
Volume 10 ⁹ (µm ³)				
Compartimento tubular	1960,7±301,5 ^A	2400,6±309,7 ^A	1723,3±158,4 ^A	2395,26±23,09 ^B
Túnica própria	121,99±19,51 ^a	121,87±6,28 ^a	82,06±11,14 ^A	136,28±6,24 ^B
Epitélio seminífero	1670,86±250,3 ^a	2063,57±250,3 ^a	1474,90±130,8 ^A	2058,19±24,52 ^B
Lume	164,85±38,92 ^a	215,14±38,92 ^a	166,28±25,44 ^A	200,79±38,13 ^A
Compartimento intertubular	447,44±35,67 ^a	445,61±1,95 ^a	354,52±53,24 ^A	519,34±27,25 ^B
Células de Leydig	54,18±2,33 ^a	79,61±17,61 ^a	45,21±6,4 ^A	84,98±6,39 ^B
Vasos sanguíneos	38,25±9,88 ^a	45,81±10,91 ^a	37,59±7,65 ^A	39,34±7,65 ^A
Outros	354,99±24,38 ^a	320,19±8,84 ^a	271,71±40,07 ^A	395,02±31,95 ^A

*Subgrupo 1: animais com baixas concentrações de testosterona sérica; subgrupo 2: animais com altas concentrações de testosterona.

** valores na mesma linha com letras diferentes sobrescritas indicam ($p < 0,05$) pelo teste t de Student; letras minúsculas são referentes aos animais do subgrupo 1; letras maiúsculas são referentes aos animais do subgrupo 2; não houve comparação entre os subgrupos.

***n=4 para cada subgrupo

4.8 Morfometria e população das células de Leydig

Os dados relativos às células de Leydig (Tabelas 11 e 12) foram obtidos a partir da análise morfométrica dos testículos, tomando-se como principais pontos de referência o volume ocupado por estas células no compartimento intertubular e o volume individual das mesmas. Nos animais jovens, o volume nuclear, citoplasmático, celular e o número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo apresentaram-se menores ($p < 0,05$) nos animais jovens do grupo tratado em relação aos animais do grupo controle. Já os animais adultos do subgrupo 1, aqueles que tiveram o ducto incisivo cauterizado, apresentaram valores de número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo maiores ($p < 0,05$). Os animais adultos controle do subgrupo 2 apresentaram valores de volume citoplasmático e número de células por grama de testículo maiores ($p < 0,05$), embora apresentassem valores para o número de células por testículo e por grama de testículo menores ($p < 0,05$).

Tabela 11. Morfometria da célula de Leydig do testículo de coelhos da raça Nova Zelândia, com 120 dias de idade, obtidos de animais dos grupos controle e tratado (média \pm erro padrão médio).

Parâmetros	Grupos de animais	
	Jovens controle	Jovens tratados
Percentual de célula de Leydig (%)	3,01 \pm 0,26 ^a	1,60 \pm 0,16 ^b
Volume nuclear (μm^3)	261,50 \pm 5,83 ^a	207,67 \pm 4,88 ^b
Volume citoplasmático (μm^3)	588,93 \pm 16,07 ^a	514,09 \pm 13,33 ^b
Volume da célula de Leydig (μm^3)	850,43 \pm 21,93 ^a	721,78 \pm 17,94 ^b
Células de Leydig/g testículo (10^6)	41,69 \pm 1,39 ^a	26,33 \pm 0,93 ^b
Células de Leydig/testículo (10^6)	78,04 \pm 2,66 ^a	45,85 \pm 1,63 ^b

*n=8 para cada grupo

** valores na mesma linha com letras diferentes sobrescritas indicam ($p < 0,05$) pelo teste t de Student

Tabela 12. Morfometria da célula de Leydig do testículo de coelhos da raça Nova Zelândia, com 180 dias de idade, obtidos de animais dos grupos controle e tratado (média \pm erro padrão médio).

Parâmetros	Grupos de animais			
	Subgrupo 1		Subgrupo 2	
	Adultos controle	Adultos tratados	Adultos controle	Adultos tratados
Percentual de célula de Leydig (%)	2,35 \pm 0,25 ^a	2,78 \pm 0,40 ^a	2,16 \pm 0,18 ^A	2,92 \pm 0,18 ^B
Volume nuclear (μm^3)	228,75 \pm 5,9 ^a	260,72 \pm 16,96 ^a	229,09 \pm 7,07 ^A	231,84 \pm 7,2 ^{A 1}
Volume citoplasmático (μm^3)	527,67 \pm 14,0 ^{a 6}	571,44 \pm 40,15 ^a	567,55 \pm 17,18 ^A	495,68 \pm 15,13 ^B
Volume da célula de Leydig (μm^3)	756,42 \pm 19,88 ^a	832,16 \pm 57,07 ^a	796,64 \pm 24,14 ^A	727,52 \pm 22,20 ^A
Células de Leydig/g testículo (10^6)	34,10 \pm 1,16 ^a	39,53 \pm 1,65 ^b	29,9 \pm 0,91 ^A	44,63 \pm 1,43 ^B
Células de Leydig/testículo (10^6)	76,78 \pm 1,79 ^a	115,34 \pm 6,08 ^b	62,59 \pm 2,27 ^A	129,67 \pm 4,05 ^B

*Subgrupo 1: animais com baixas concentrações de testosterona sérica; subgrupo 2: animais com altas concentrações de testosterona.

** valores na mesma linha com letras diferentes sobrescritas indicam ($p < 0,05$) pelo teste t de Student; letras minúsculas são referentes aos animais do subgrupo 1; letras maiúsculas são referentes aos animais do subgrupo 2; não houve comparação entre os subgrupos.

***n=4 para cada subgrupo

4.9 Morfometria e população das células de Sertoli

Nos animais jovens as células de Sertoli (Figura 13) representam 13,46 \pm 0,69% do parênquima testicular dos animais do grupo controle, enquanto nos animais jovens do grupo tratado representam apenas 7,75 \pm 0,93 %. Esses valores diferem ($p < 0,05$), assim como nos animais adultos dos subgrupo 1, onde nos animais do grupo controle as células de Sertoli representam 14,77 \pm 1,28% e nos animais do grupo tratado representam 9,81 \pm 1,44% (Tabelas 13 e 14). Já nos animais adultos do subgrupo 2 não houve diferença significativa entre os percentuais ocupados pelas células de

Sertoli no parênquima testicular, sendo $7,64 \pm 0,27\%$ nos animais do grupo controle e $9,19 \pm 0,91\%$ nos animais do grupo tratado.

Nos animais jovens e nos animais adultos do subgrupo 1, o volume celular, o número de células de Sertoli por testículo e por grama de testículo apresentaram-se menores ($p < 0,05$) nos animais jovens do grupo tratado em relação aos animais do grupo controle. Os animais adultos tratados do subgrupo 2 apresentaram valores de número de células por grama de testículo menores ($p < 0,05$), embora não apresentassem diferenças nos valores de número de células por testículo, em relação aos animais do grupo controle ($p < 0,05$).

Tabela 13. Morfometria da célula de Sertoli do testículo de coelhos da raça Nova Zelândia com 120 dias de idade, obtido de animais dos grupos controle e tratado (média \pm erro padrão médio).

Parâmetros	Grupos de animais	
	Jovens controle	Jovens tratados
Percentual de célula de Sertoli (%)	$13,46 \pm 0,69^a$	$7,75 \pm 0,93^b$
Volume nuclear (μm^3)	$399,63 \pm 7,47^a$	$382,61 \pm 7,53^a$
Volume da célula de Sertoli (μm^3)	$2512,7 \pm 25,5^a$	$1353,7 \pm 38,9^b$
Células de Sertoli/g testículo (10^6)	$36,72 \pm 0,77^a$	$22,25 \pm 0,64^b$
Células de Sertoli/testículo (10^6)	$68,54 \pm 1,49^a$	$38,81 \pm 1,38^b$

*n=8 para cada grupo

** valores na mesma linha com letras diferentes sobrescritas indicam ($p < 0,05$) pelo teste t de Student

Tabela 14. Morfometria da célula de Sertoli do testículo de coelhos da raça Nova Zelândia com 180 dias de idade, obtido de animais dos grupos controle e tratados (média \pm erro padrão médio).

Parâmetros	Grupos de animais			
	Subgrupo 1		Subgrupo 2	
	Adultos controle	Adultos tratados	Adultos controle	Adultos tratados
Percentual de célula de Sertoli (%)	$14,77 \pm 1,28^a$	$9,81 \pm 1,44^b$	$7,64 \pm 0,27^A$	$9,19 \pm 0,91^A$
Volume nuclear (μm^3)	$433,83 \pm 10,89^a$	$428 \pm 10,20^a$	$427,96 \pm 11,21^A$	$440,49 \pm 10,91^A$
Volume da célula de Sertoli (μm^3)	$3491,29 \pm 71,55^a$	$2744,84 \pm 13,87^b$	$2636,75 \pm 25,35^A$	$2672,87 \pm 38,81^A$
Células de Sertoli/g testículo (10^6)	$37,09 \pm 1,17^a$	$22,80 \pm 1,04^b$	$32,90 \pm 0,97^A$	$22,61 \pm 0,68^B$
Células de Sertoli/testículo (10^6)	$87,78 \pm 2,95^a$	$68,50 \pm 4,03^b$	$67,18 \pm 1,94^A$	$65,58 \pm 1,35^A$

*Subgrupo 1: animais com baixas concentrações de testosterona sérica; subgrupo 2: animais com altas concentrações de testosterona.

** valores na mesma linha com letras diferentes sobrescritas indicam ($p < 0,05$) pelo teste t de Student; letras minúsculas são referentes aos animais do subgrupo 1; letras maiúsculas são referentes aos animais do subgrupo 2; não houve comparação entre os subgrupos.

***n=4 para cada subgrupo

4.10 Densidade da epífise do osso fêmur e composição do músculo reto femoral

A densidade óssea não apresentou diferença ($p>0,05$) entre os valores médios para os animais dos grupos controle e tratados nas diferentes idades e subgrupos (Tabela 15 e 16). O tratamento não afetou de forma ($p>0,05$) a massa do músculo processado e *in natura* e a composição do músculo em relação à quantidade de água nos animais jovens e nos adultos. Entre os animais jovens e adultos dos grupos controle e tratados não foi observada diferença ($p>0,05$) no percentual de gordura no músculo reto femoral. A composição do músculo em relação à água não apresentou diferença significativa entre os valores médios para os animais dos subgrupos 1 e 2 dos grupos controle e tratado. Já nos animais jovens a água encontrada nos coelhos do grupo tratado apresentou menores valores ($p<0,05$).

Tabela 15. Densidade da epífise do osso fêmur e composição do músculo reto femoral de coelhos da raça Nova Zelândia obtidos de animais dos grupos controle e tratado (média \pm erro padrão médio).

Parâmetros	Grupos de Animais	
	Jovens controle	Jovens tratados
Densidade óssea (g/ml)	1,44 \pm 0,09 ^a	1,72 \pm 0,15 ^a
Músculo <i>in natura</i> (g)*	1,87 \pm 0,19 ^a	2,03 \pm 0,08 ^a
Músculo processado (g)**	0,43 \pm 0,05 ^a	0,47 \pm 0,02 ^a
Gordura %	0,54 \pm 0,04 ^a	0,63 \pm 0,04 ^a
Água %	76,57 \pm 0,43 ^a	76,01 \pm 0,18 ^b

* Peso inicial do músculo.

**Peso da músculo após desidratação e tratamento com xilol.

***n=8 para cada grupo

**** valores na mesma linha com letras diferentes sobrescritas indicam ($p<0,05$) pelo teste t de Student

Tabela 16. Densidade da epífise do osso fêmur e composição do músculo reto femoral de coelhos da raça Nova Zelândia obtidos de animais dos grupos controle e tratado (média ± erro padrão médio).

Parâmetros	Grupos de Animais			
	Subgrupo 1		Subgrupo 2	
	Adultos controle	Adultos tratados	Adultos controle	Adultos tratado
Densidade óssea (g/ml)	1,61±0,04 ^a	1,58±0,02 ^a	1,56±0,04 ^A	1,68±0,11 ^A
Músculo <i>in natura</i> (g)*	2,33±0,22 ^a	2,93±0,27 ^a	2,29±0,28 ^A	2,75±0,30 ^A
Músculo processado (g)**	0,55±0,05 ^a	0,53±0,03 ^a	0,69±0,07 ^A	0,66±0,07 ^A
Gordura %	0,59±0,05 ^a	0,39±0,11 ^a	0,93±0,18 ^A	0,58±0,15 ^A
Água %	75,53±0,19 ^a	76,26±0,14 ^b	75,39±0,32 ^A	75,54±0,40 ^A

* Peso inicial do músculo.

**Peso da músculo após desidratação e tratamento com xilol.

***Subgrupo 1: animais com baixas concentrações de testosterona sérica; subgrupo 2: animais com altas concentrações de testosterona.

**** valores na mesma linha com letras diferentes sobrescritas indicam ($p < 0,05$) pelo teste t de Student; letras minúsculas são referentes aos animais do subgrupo 1; letras maiúsculas são referentes aos animais do subgrupo 2; não houve comparação entre os subgrupos.

***** $n=4$ para cada subgrupo

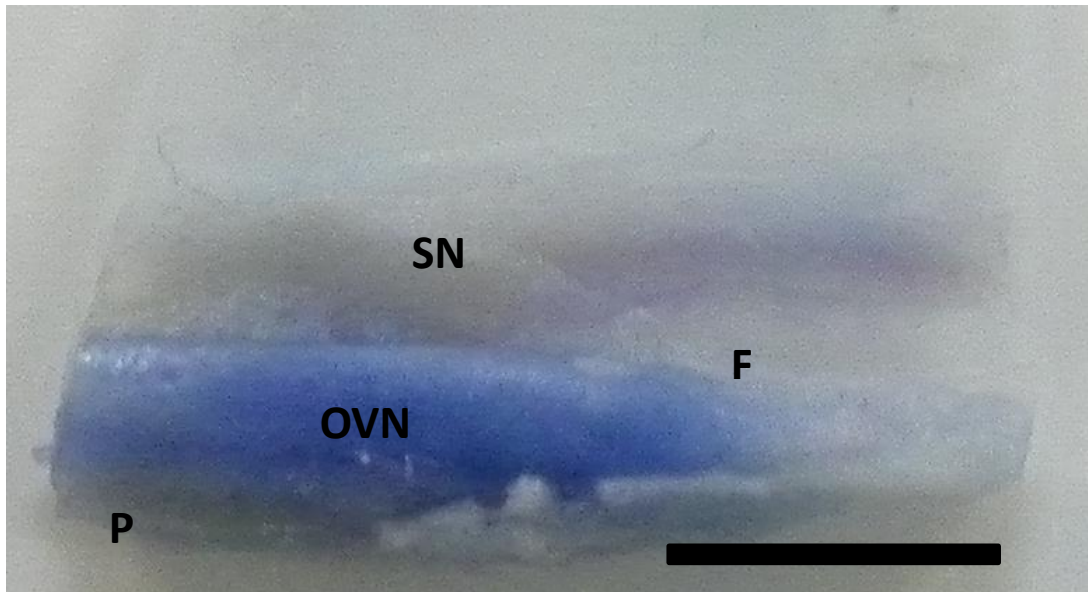


Figura 1: Preparado anatômico do órgão vomeronasal esquerdo de coelho adulto do grupo controle, evidenciado por injeção de azul de toluidina. Extremidade caudal em fundo cego (F); septo nasal (SN); órgão vomeronasal (OVN); palato (P). Barra: 7mm.

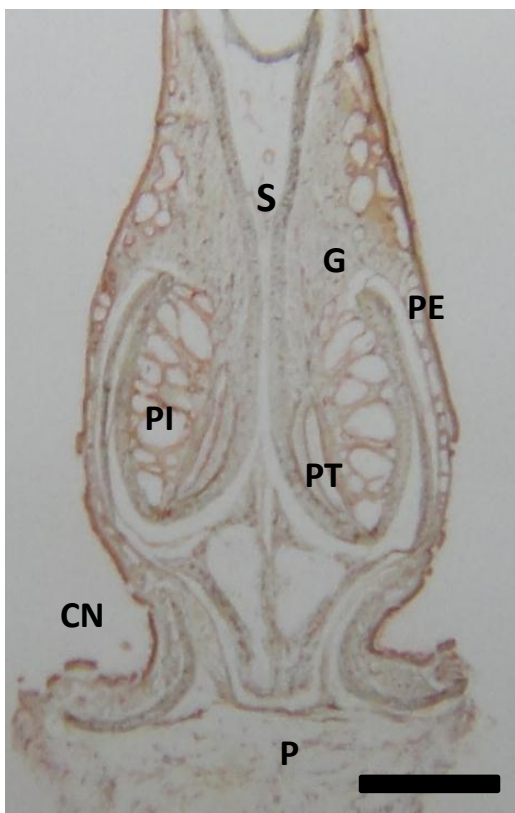


Figura 2: Secção transversal da região nasal de coelho adulto do grupo controle, ao nível da quarta ruga palatina evidenciando a porção média do OVN. Septo nasal (S); glândulas túbulo-acinosas (G); plexo vascular externo (PE); plexo vascular interno (PI); porção tubular (PT); cavidade nasal (CN); palato (P). Impregnação argêntica. Barra: 3,5µm.

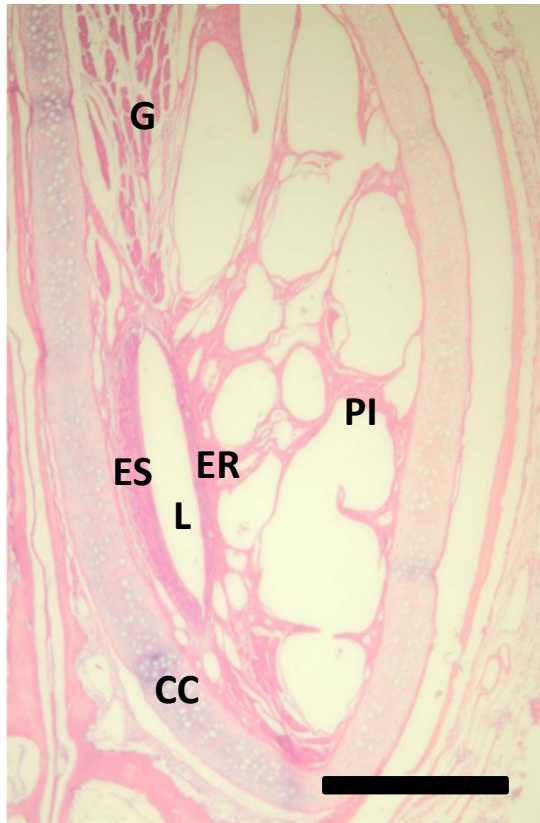


Figura 3: Secção transversal da região nasal direita de coelho adulto do grupo controle, ao nível da quarta ruga palatina, onde se observa a porção média do OVN. Glândulas túbulo-acinosas (G); plexo vascular interno (PI); epitélio sensorial (ES); epitélio respiratório (ER); lume (L); cápsula cartilaginosa (CC). HE Barra: 1mm.

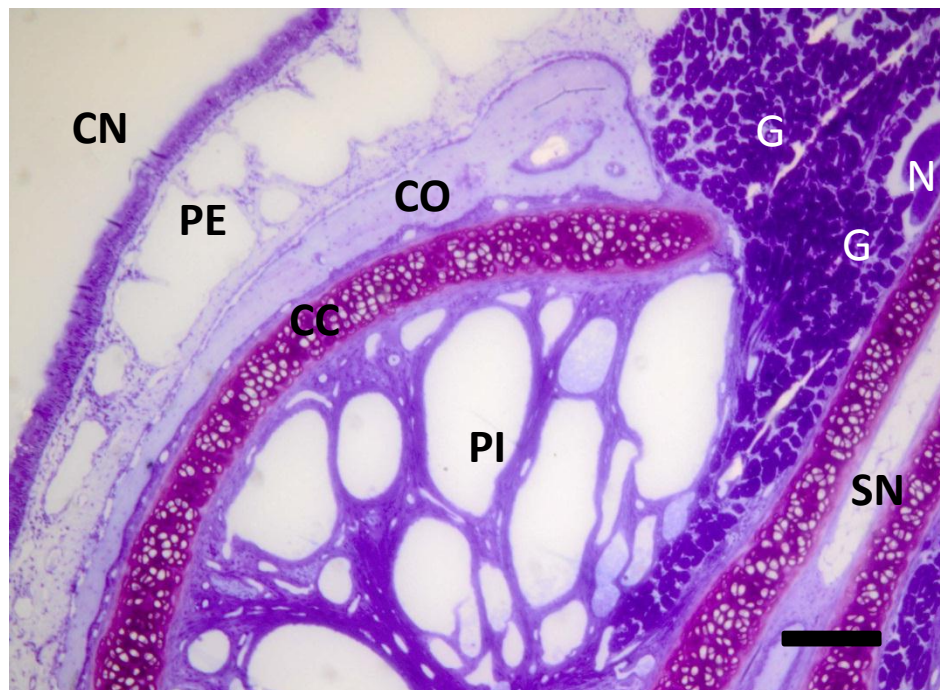


Figura 4: Secção transversal da região nasal de coelho adulto do grupo controle, na porção média do OVN. Cavidade nasal (CN); plexo vascular externo (PE); cápsula óssea (CO); cápsula cartilaginosa (CC); plexo vascular interno (PI); septo nasal (SN); glândulas túbulo-acinosas (G); nervos (N). Azul de toluidina/borato de sódio. Barra: 1mm.

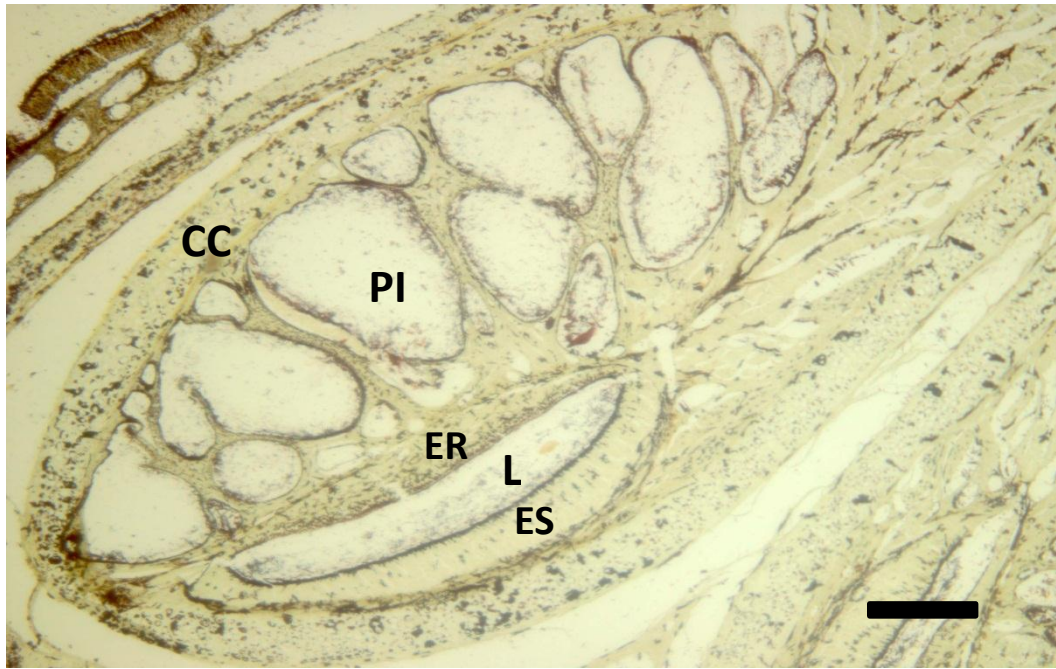


Figura 5: Secção transversal da região nasal de coelho adulto do grupo controle, na porção média do OVN. Plexo vascular interno (PI); cápsula cartilaginosa (CC); epitélio respiratório (ER); lume (L); epitélio sensorial (ES). Impregnação argêntica. Barra: 1mm.

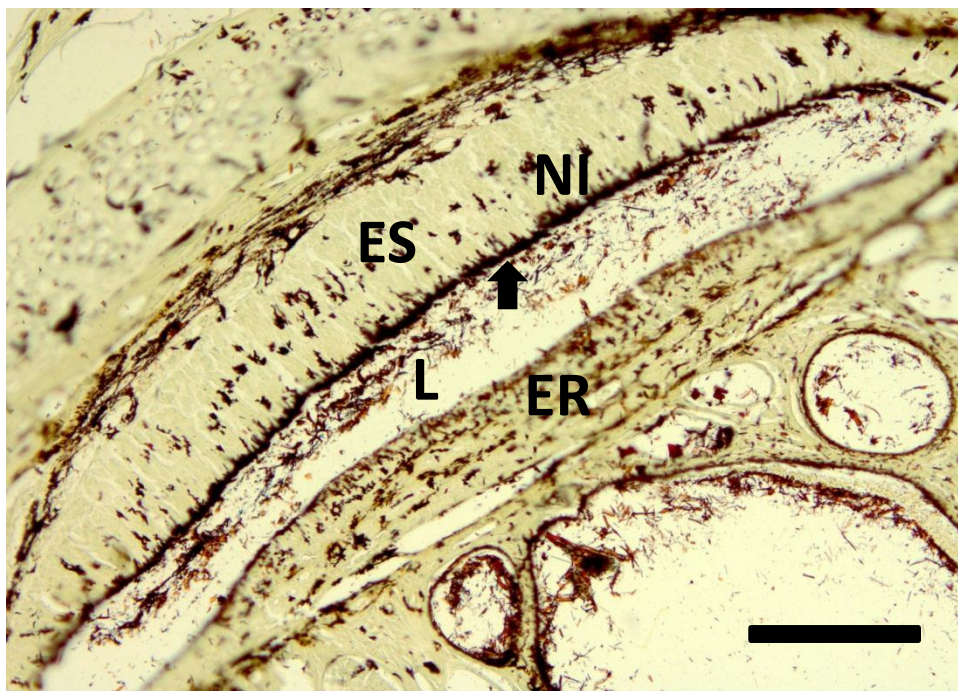


Figura 6: Secção transversal da região nasal de coelho adulto controle, na porção média do OVN. Epitélio respiratório (ER); lume (L); epitélio sensorial (ES); neurônio impregnado pela prata (NI); terminações nervosas das células sensoriais (seta). Impregnação argêntica evidenciando neurônios. Barra: 30 μ m.

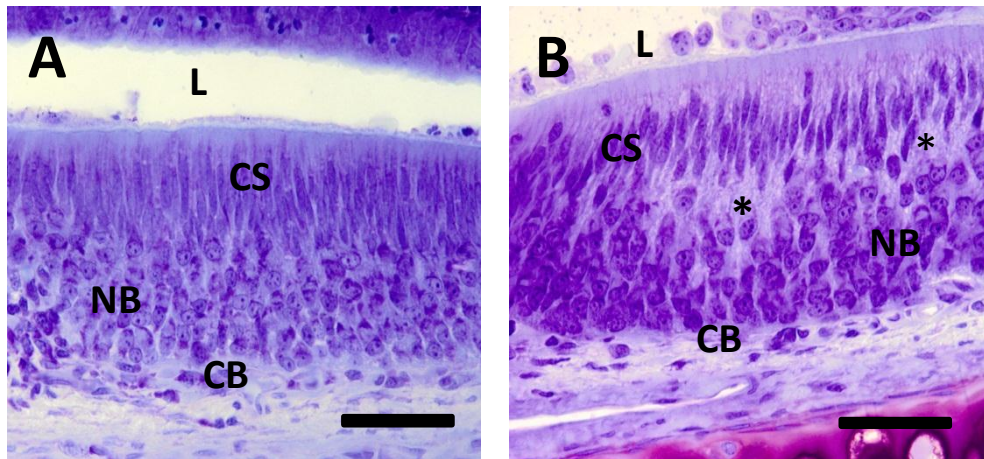


Figura 7: Secções transversais do epitélio sensorial da porção tubular do OVN de coelhos jovens do grupo controle (A) e grupo tratado (B). Lume (L); células de sustentação (CS); neurônios bipolares (NB); células basais (CB); espaços intercelulares (*). Azul de toluidina/borato de sódio. Barra: 15µm.

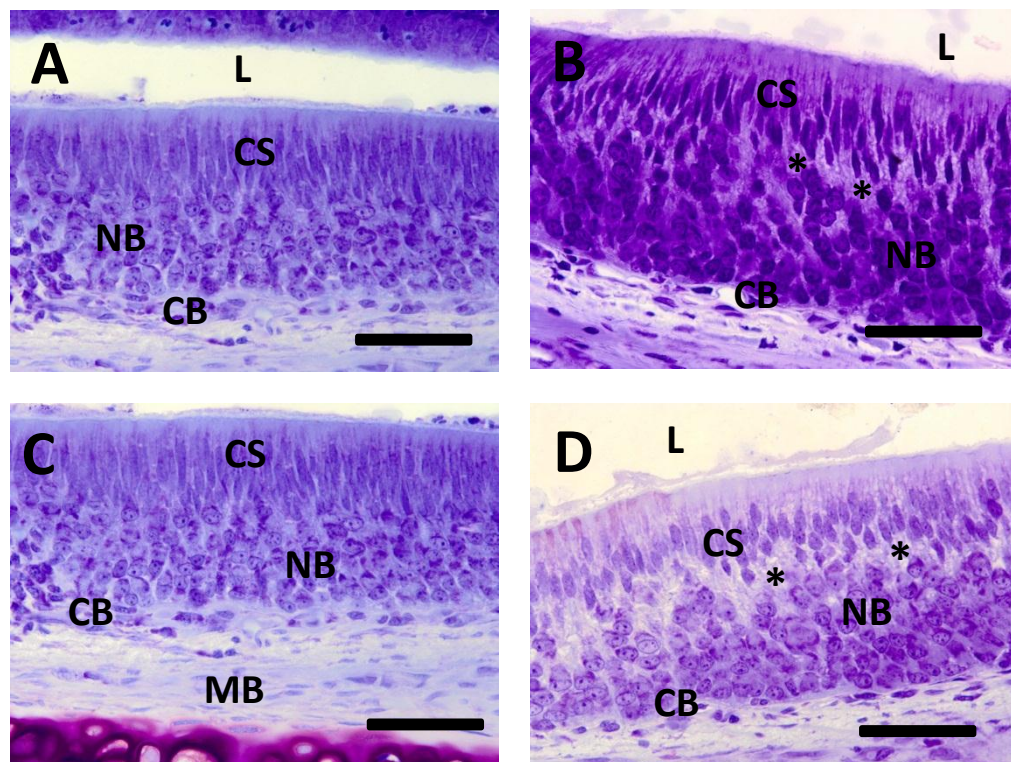


Figura 8: Secções transversais do epitélio sensorial da porção tubular do OVN de coelhos adultos do grupo controle com baixa concentração de testosterona (A), grupo tratado com baixa concentração de testosterona (B), grupo controle com alta concentração de testosterona (C) e grupo tratado com alta concentração testosterona (D). Lume (L); células de sustentação (CS); neurônios bipolares (NB); células basais (CB); membrana basal (MB); espaços intercelulares (*). Azul de toluidina/borato de sódio. Barra: 15µm

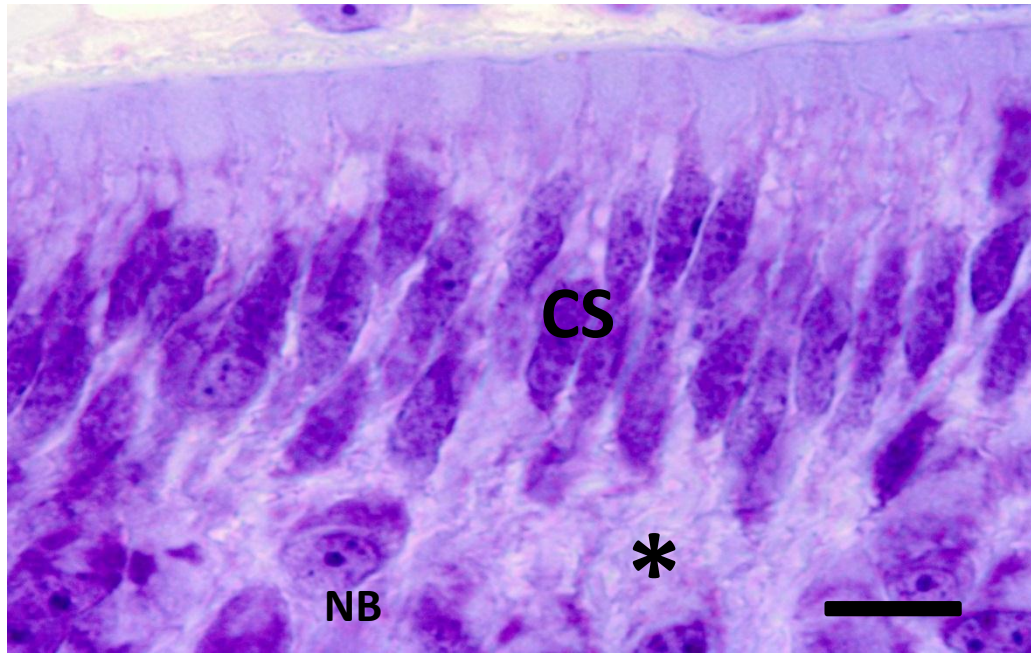


Figura 9: Detalhe da seção transversal do epitélio sensorial da porção tubular do OVN de coelho jovem tratado. Células de sustentação (CS); neurônios bipolares (NB); espaços intercelulares (*). Azul de toluidina/borato de sódio. Barra: 3 μ m.

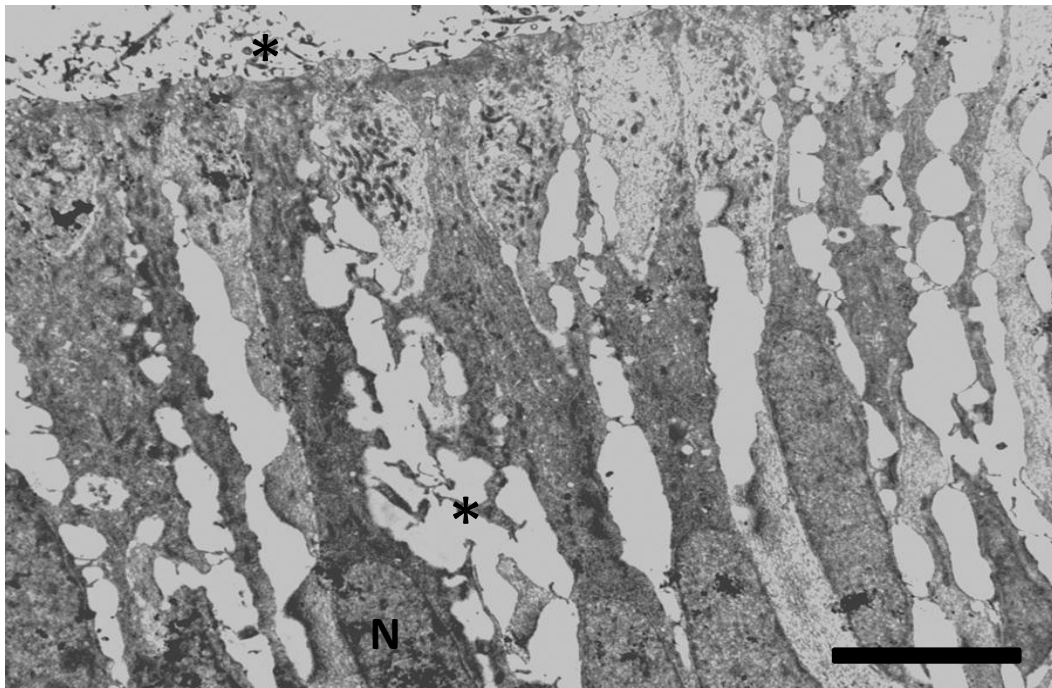


Figura 10: Eletromicrografia de transmissão de seção transversal do epitélio sensorial da porção tubular do OVN de coelho adulto tratado. Núcleo das células de sustentação do epitélio sensorial (N); espaços intercelulares com debris celulares (*). Barra: 8 μ m

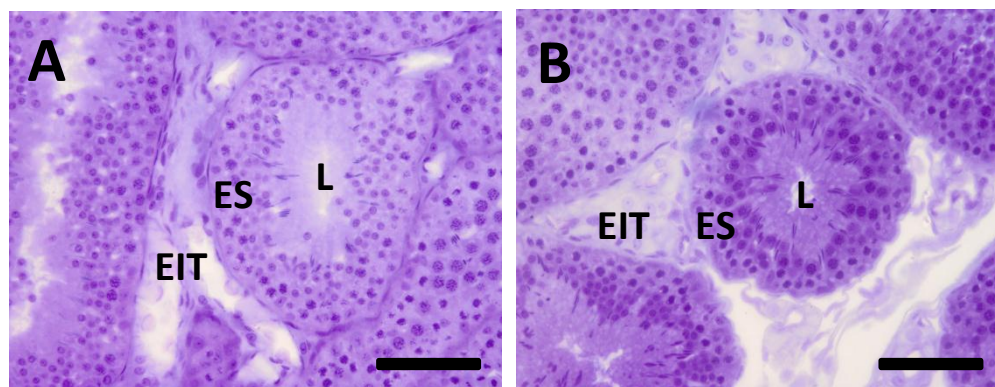


Figura 11: Secções transversais de túbulos seminíferos de testículos de coelhos jovens dos grupos controle (A) e adulto (B). Epitélio seminífero (ES); lume (L); espaço intertubular (EIT). Azul de toluidina/borato de sódio. Barra: 10µm.

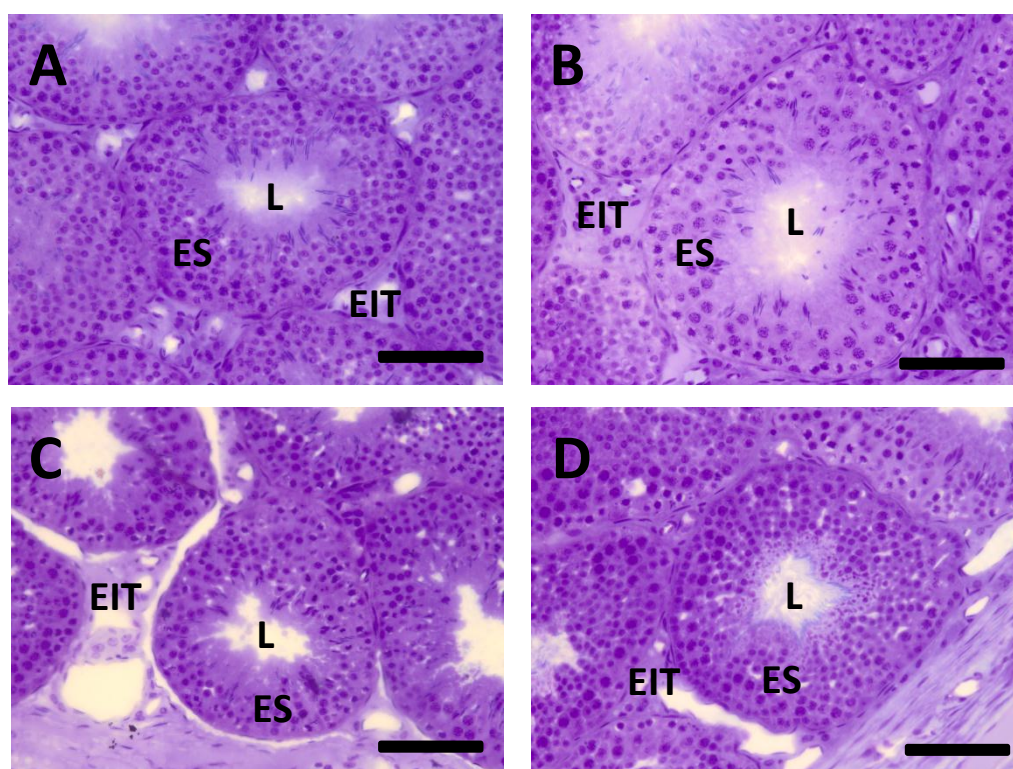


Figura 12: Secções transversais de testículos de coelhos adultos do grupo controle com baixa concentração de testosterona (A), grupo tratado com baixa concentração de testosterona (B), grupo controle com alta concentração de testosterona (C) e grupo tratado com alta concentração de testosterona (D). Epitélio seminífero (ES); lume (L); espaço intertubular (EIT). Azul de toluidina/borato de sódio. Barra: 10µm.

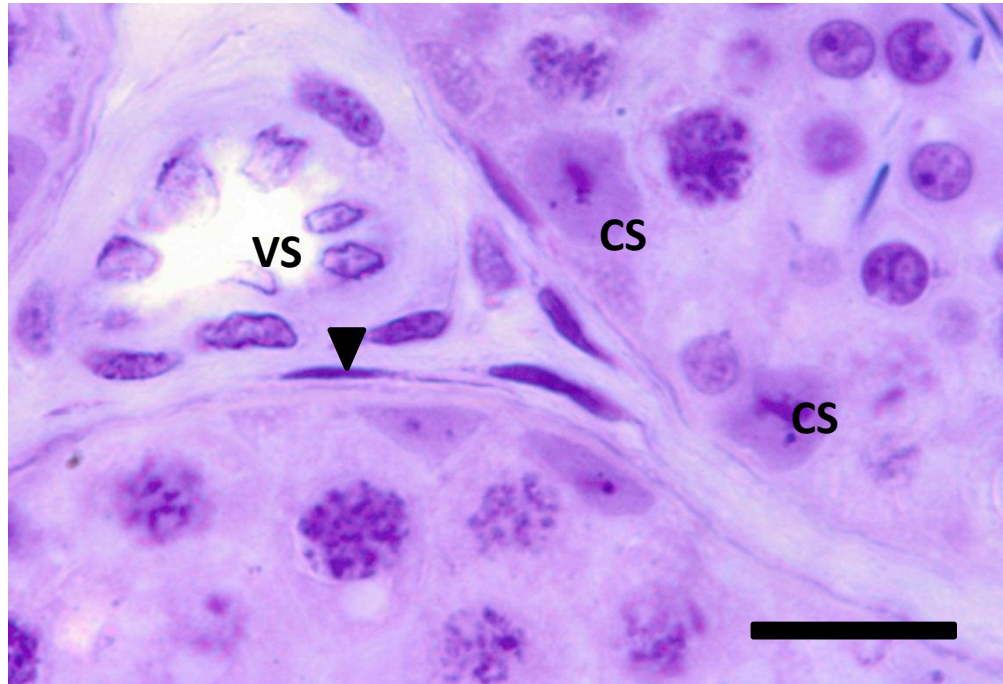


Figura 13: Secção transversal de testículo de coelho adulto controle. Vaso sanguíneo (VS); célula de Sertoli (SC); célula peritubular mióide (cabeça da seta). Azul de toluidina/borato de sódio. Barra: 18 μ m.

5. DISCUSSÃO

A docilidade dos coelhos adultos tratados foi evidenciada pelo comportamento calmo, pelo fato de não realizar contato com os companheiros, por não realizar tentativas de monta e por evitar lutas, o que pode estar associado às baixas concentrações de testosterona sérica. Essas alterações comportamentais associadas à diminuição nas concentrações séricas de testosterona nos animais tratados mostram que a cauterização do ducto incisivo dos coelhos machos impede a percepção de odores pelo OVN e, conseqüentemente, a falta de estímulo do bulbo olfatório acessório e suas conexões com o sistema límbico, uma vez que as estruturas desse sistema estão intimamente relacionadas com funções comportamentais (Tirindelli *et al.*, 2009). Berger *et al.* (1982) sugerem que a ativação dos centros nervosos que regulam o comportamento de monta requerem um longo período de estimulação pela testosterona, a qual modula o comportamento sexual (Fuentes *et al.*, 2004). Os animais deste estudo não tinham experiência sexual prévia, não guardavam memória de monta e o sistema olfatório não tinha sido estimulado por feromônios. Por estes motivos, o comportamento de monta não foi manifestado, uma vez que o OVN não foi estimulado pelos feromônios mesmo quando os coelhos estavam socializando com outros machos (Tirindelli *et al.*, 2009).

Estes achados, associados aos menores números de células de Sertoli e de Leydig no testículo dos animais tratados indicam que a falta de percepção de feromônios pelo OVN desses animais atua no testículo inibindo a proliferação dessas células até a idade adulta, alterando o comportamento sexual e de agressividade dos animais.

O OVN dos coelhos estudados de ambas as idades é uma estrutura bilateral em forma tubular, situada a cada lado da base do septo nasal. Este formato e localização do OVN são similares às descrições realizadas por Barone *et al.* (1966) no cão; Hare (1986) e Keverne (1999) nos mamíferos domésticos; e Taniguchi e Mochizuki (1982) em ratos, camundongos e coelhos. A porção tubular do OVN de coelhos apresenta formato oval terminando caudalmente em fundo cego; na extremidade rostral comunica-se com o ducto incisivo. Este ducto comunica as cavidades nasal e oral por

meio de aberturas no palato duro, como descrito por Dyce *et al.* (2010) nos mamíferos domésticos. Portanto, o estímulo pode alcançar o órgão pelas duas cavidades. Entretanto, Taniguchi e Mochizuki (1982) comparando o OVN de ratos, camundongos e coelhos ao de hamsters, concluíram que nesses animais, a abertura do ducto vomeronasal se dá diretamente com a cavidade nasal. Em ratos, Grondona (2005) demonstrou a comunicação rostral do órgão, sem linha de demarcação, com a cavidade nasal. Em outros animais como bovinos, hipopótamos (Wysocki, 1979) e répteis, o OVN se comunica diretamente com a cavidade oral, conforme relatam Halpern (1987) e Stephan *et al.* (1982). Estes achados levam a concluir que a desembocadura do OVN varia em cada espécie animal.

Nos coelhos estudados, o OVN encontra-se rodeado por uma cápsula de cartilagem hialina, estando de acordo com os estudos de Taniguchi e Mochizuki (1982) em ratos, camundongos e coelhos. Essa cápsula encontra-se circundada externamente por uma cápsula óssea que sofre interrupção na porção dorsal do órgão, assim como no rato (Salazar e Quinteiro, 1998), onde encontram-se numerosas glândulas mucosas. Salazar e Quinteiro (1998) indicam que a cápsula óssea que envolve o órgão vomeronasal é formada pelo osso vômer e por um prolongamento do processo palatino do osso incisivo. Em animais jovens é frequente a presença de cartilagem e osso circundando o OVN, simultaneamente. Entretanto, no presente estudo, observou-se a presença das duas cápsulas, cartilaginosa e óssea, nos animais jovens (120 dias de vida) e nos animais adultos (180 dias de vida), que são estruturas independentes, assim como nos ratos (Salazar e Quinteiro, 1998). Mucignat-Caretta (2010) sugere que o OVN não possui cápsula óssea e que o órgão é incorporado na base do septo nasal, no osso vômer. Estas divergências mostram que a estrutura morfológica deste órgão ainda não está completamente elucidada nas diversas espécies animais.

Os resultados histológicos mostram que o lume do OVN do coelho apresenta formato elíptico em corte transversal como no camundongo, rato e coelho (Taniguchi e Mochizuki, 1982). O lume deste órgão encontra-se limitado por epitélio de revestimento. A face lateral é constituída por epitélio pseudo-estratificado ciliado com células caliciformes, denominado

frequentemente epitélio respiratório. Medialmente, o lume do OVN é revestido por epitélio sensitivo, que não é diretamente exposto ao fluxo de ar. Portanto, os odores chegam às células sensoriais por um mecanismo de bombeamento do muco, para o interior do órgão (Mucignat-Caretta, 2010). Os epitélios sensorial e respiratório desaparecem na porção caudal do tubo, com a diminuição do diâmetro do OVN, como observado no rato por Vacarezza *et al.* (1981). O epitélio sensitivo é formado por três tipos celulares: células basais, células sensoriais (neurônios) e células de sustentação. As células basais indiferenciadas, ou células tronco, se diferenciam em novos neurônios ao longo da vida do animal. Estas células estão localizadas ao longo da membrana basal e na região adjacente ao limite com o neuroepitélio (Barber e Raisman, 1978; Keverne, 1999; De La Rosa-Prieto *et al.*, 2009). As células de sustentação ocupam a altura do epitélio juntamente com as células sensitivas e possuem núcleos próximos ao lume (Keverne, 1999; Taniguchi e Mochizuki, 1982; Tirindelli *et al.*, 2009). As células sensitivas são neurônios bipolares com núcleos evidentes no terço médio do epitélio sensorial. Essas células são responsáveis por receber os estímulos dos odores que chegam ao OVN, e os nervos formados por eles levam informações para o bulbo olfatório acessório. Estes achados vêm demonstrar que o OVN dos coelhos apresenta regiões morfofisiologicamente diferentes, como o OVN dos outros mamíferos descritos anteriormente. Estudos detalhados, inclusive de mapeamentos de neurônios, são necessários para entender o funcionamento deste órgão e seu papel nas diferentes atividades comportamentais desses animais.

As modificações morfológicas encontradas no órgão vomeronasal de machos de coelhos Nova Zelândia com 120 e 180 dias de idade com ducto incisivo cauterizado não foram evidentes quando foi comparado o volume do órgão. Entretanto, o percentual do epitélio respiratório e das glândulas foi menor nos animais tratados assim como espaços intercelulares no neuroepitélio. Estas alterações não foram encontradas em outros animais com o ducto incisivo obstruído (Weiler *et al.*, 1999; Kelliher *et al.*, 2001; Woodley *et al.*, 2004)

A menor proporção percentual de epitélio respiratório nos animais com 180 dias de vida, e que tiveram seus ductos incisivos cauterizados,

assim como menor percentual de glândulas, indicam que houve morte celular por falta ou diminuição da atividade do órgão. Apesar de não terem sido observadas alterações nas proporções percentuais do neuroepitélio, na análise histológica e na análise ultraestrutural foram visualizados espaços intercelulares na região correspondente às células sensoriais. Estes dados vêm confirmar a morte de neurônios do OVN. A normalidade morfológica aparente do órgão pode ser atribuída a uma repopulação neuronal a partir das células tronco ou, devido ao curto tempo transcorrido após a cauterização, não ter acontecido uma destruição suficiente dos neurônios para causar alterações morfométricas. Entretanto, Wilson e Raisman (1980) relatam que existe uma redução no número de células sensoriais com o aumento da idade do animal. Não foi possível associar essa perda celular com os dados obtidos porque no presente estudo os animais eram adultos jovens, com 180 dias de idade.

A presença constante de glândulas tubo-acinosas com aspecto de glândulas secretoras de muco, principalmente na região da lâmina própria, assim como a presença de muco na luz desta porção tubular, mostram que estas secreções devem apresentar um importante papel na lubrificação e limpeza da superfície do epitélio da porção tubular do OVN, como sugeriram Doving e Trotier (1998a), Keverne (1999) e Taniguchi e Mochizuki (1983). Entretanto, a abundância destas glândulas dorsal e ventralmente ao lume, e a presença dos ductos próximos ao tubo, indicam que as secreções destas glândulas não apresentam funções simplesmente mecânicas, podendo ser elas muito mais elaboradas, contribuindo também na percepção de feromônios, como sugerido por Doving e Trotier (1998) e, conseqüentemente, no papel do órgão vomeronasal na reprodução dos mamíferos, como descrito inicialmente por Planel (1953) e posteriormente por Wysocki (1979), Bellringer *et al.* (1980), Wysocki e Meredith (1987), Wysocki e Lepri (1991), Kaba *et al.* (1994), Johnston (1998), Johnston (2000), Johnston (2001), e Halpern e Marcos (2003).

O plexo vascular do OVN é uma estrutura intimamente envolvida na fisiologia do órgão, uma vez que ele ocupa aproximadamente 30% do OVN. Os vasos sanguíneos localizam-se principalmente em torno da porção tubular do OVN. O plexo vascular do OVN apresenta grande quantidade de

arteríolas e vênulas, o que torna extremamente difícil definir qual é a artéria principal, o que é diferente em outras espécies, como o rato, em que uma veia e uma artéria se destacam (Salazar e Quinteiro, 1998; Taniguchi e Mochizuki, 1983; Vacarezza *et al.*, 1981; e Grondona, 2005). Esta artéria é um importante ramo septal da artéria esfenopalatina, que além de irrigar o OVN participa do mecanismo de bomba erétil do órgão assim como os outros vasos, como proposto por Wysocki e Meredith (1987) e Doving e Trotier (1998) nos mamíferos domésticos, Salazar *et al.* (1997) no gato, e Salazar e Sanchez Quinteiro (1998) no rato.

A vasoconstrição das artérias do OVN induzida experimentalmente por estímulo do nervo palatino diminui o volume sanguíneo do leito venoso do plexo vascular. Este fenômeno reduz a pressão da porção tubular do OVN, diminuindo o fluido das glândulas mucosas para a luz do tubo, como descrito por Salazar e Sánchez-Quinteiro (1998) no rato.

Doving e Trotier (1998) observaram que também existe o processo inverso, onde ocorre sucção do fluido do lume para o OVN devido à vasoconstrição da arteríola principal, que faz com que aumente o volume do lume e crie o processo de sucção. Ambos os mecanismos, tanto da saída de fluido do órgão para o lume quanto de sucção para dentro do órgão, são processos ativos neuromediados. Estas observações proporcionam uma ideia da importância das arteríolas na fisiologia do OVN e permitem sugerir a hipótese que nos coelhos estes controles vasculares do fluxo das secreções glandulares são muito mais acurados e precisos, uma vez que neles existe um plexo sanguíneo desenvolvido externamente à cápsula óssea, na porção periférica, lateral do órgão, conforme descrito nos resultados do presente estudo.

O peso corporal médio dos coelhos aos 120 dias foi de $2917,50 \pm 102,06$ g nos animais controle e de $3226,87 \pm 165,54$ g nos animais tratados, não havendo diferença significativa entre os grupos. Tampouco, houve ganho de peso significativo entre os grupos.

Os animais do grupo tratado, com baixas concentrações de testosterona, eutanasiados aos 180 dias, apresentaram peso final maior que os animais controle. Da mesma forma, houve um ganho de peso maior dos animais tratados em relação aos animais controle. Estes resultados sugerem

que as menores concentrações de testosterona sérica nos animais do grupo tratado os tornou mais dóceis e mais calmos. Nestas condições os animais gastam menos energia e, conseqüentemente, ganham mais peso. Fenômeno similar acontece de forma mais acentuada em animais castrados (Kochakian, 1966). Nesses animais, há uma redução do crescimento em função do efeito adverso da castração sobre os hormônios androgênicos, principalmente a testosterona, que, quando presente, proporciona melhor anabolismo do nitrogênio endógeno (Lee *et al.*, 1990).

Nos animais com 180 dias de idade do grupo tratado, com altas concentrações de testosterona, não foram observadas alterações no peso final com média de $3465 \pm 244,01\text{g}$ nos animais controle e $3727 \pm 111,38\text{g}$ nos animais tratados (Amann, 1970a; Jones, 1979; Berger, 1982) Não houve diferença no ganho de peso dos animais do grupo tratado em relação aos animais do grupo controle. Esses animais podem ter obtido estímulo através da via olfatória, como via alternativa para a chegada do estímulo dos feromônios ao sistema nervoso central e como conseqüência, não afetou o ganho de peso e peso final.

Os pesos encontrados para os testículos neste trabalho foram menores que os encontrados na literatura por Amann, (1970a); França e Russell, (1998) e Castro, 2002, mas semelhantes ao encontrados por Grigsby *et al.* 1976 e Berger *et al.*, 1982. Essas divergências podem ser ocasionadas pelos diferentes tamanhos dos animais, diferentes linhagens, protocolos, tipo de alimentação e clima.

Nos animais jovens, e nos animais adultos com baixa concentração de testosterona, não houve diferença entre os pesos dos testículos. Entretanto, o índice gonadossomático nos coelhos tratados foi menor em relação aos animais do grupo controle. Os animais adultos do grupo tratado, com altas concentrações de testosterona, apresentaram testículos mais pesados que seus controles, assim como maiores valores de índice gonadossomático, mesmo apresentando valores menores para o número de células de Sertoli por grama de testículo, uma vez foram reportadas altas correlações entre o tamanho do testículo e o número de células de Sertoli em touros (Berndtson, 1987). Os outros componentes testiculares não apresentaram diferença neste grupo. Este resultado pode ser explicado por

aumento de substâncias não detectadas na análise histomorfométrica, como o aumento de proteínas e do fluido testicular. O estrógeno é um importante hormônio relacionado à reabsorção de fluidos nos ductos deferentes (Hess, 2000). O possível acúmulo de fluido pode ser explicado pelas baixas concentrações de testosterona nos animais tratados uma vez que esse hormônio é convertido em estrógeno pela ação da enzima aromatase p450 (Simpson *et al.*, 1994). Portanto, baixas concentrações de testosterona implicam em baixas concentrações de estrógeno, que pode afetar na reabsorção de fluido testicular. A cauterização do ducto incisivo bloqueia os estímulos no OVN e deste para o hipotálamo, ocasionando um descontrole do eixo hipotalâmico-hipofisário, aumentando a secreção do GnRH. Este hormônio induz a liberação dos hormônios FSH e LH. Por sua vez, o FSH estimula a secreção protéica pelas células de Sertoli (Waites *et al.*, 1985) e o LH é responsável pelo estímulo da secreção de andrógeno, tendo como consequência secreção de fluido testicular (Jegou *et al.*, 1983)

Os animais jovens do grupo tratado apresentaram percentuais de compartimento tubular do testículo menores que os animais do grupo controle devido principalmente a um menor percentual do lume, o que sugere que a cauterização do ducto incisivo ocasiona um atraso no desenvolvimento dos túbulos seminíferos. Segundo Hinton e Setchell (1993) e Aponte *et al.* (2005), a evolução do processo de luminação dos cordões testiculares ocorre paralelamente à maturação das células de Sertoli, à formação da barreira hematotesticular e ao surgimento dos primeiros espermatócitos. É fato que o aumento da secreção de fluidos pelas células de Sertoli resulta na formação do lume dos túbulos seminíferos. Esta secreção é dependente do gradiente osmótico, ocasionando o fluxo de líquido do compartimento basal para o adluminal, formando vacúolos no citoplasma das células de suporte, que posteriormente se juntam formando estruturas maiores, de forma semelhante a lacunas. (Courot *et al.*, 1970; Hilton e Setchell, 1993; Aponte *et al.*, 2005). Apesar desse menor percentual ocupado pelo lume dos túbulos seminíferos, a altura do epitélio seminífero não foi afetada.

Nos animais adultos do grupo tratado que apresentaram baixas concentrações de testosterona, o diâmetro tubular e a altura do epitélio

seminífero foram maiores em relação aos animais do grupo controle. Esse aumento sugere que houve um aumento no número de células germinativas ou mesmo um aumento no volume dessas células. Apesar desse aumento, não há alteração correlacionada do peso testicular. Entretanto, os animais tratados possuem um maior comprimento do túbulo por grama de testículo, que sugere uma diminuição no número de células de Sertoli, já que existe uma correlação negativa entre o comprimento do túbulo seminífero e o número de células de Sertoli (Scolfaro, *et al.*, 2003).

Nos animais adultos do grupo tratado que apresentaram altas concentrações de testosterona, o diâmetro tubular foi menor em relação ao grupo controle, provavelmente pela diminuição do número de células de Sertoli por grama de testículo e, conseqüentemente, uma alteração no número das células germinativas. Entretanto, comprimento dos túbulos seminíferos foi maior, o que pode ter afetado o peso testicular.

Os valores encontrados para o número de células de Leydig e número de células por grama de testículo foram semelhantes aos encontrados na literatura (Castro, 2002). Apesar disso, os valores encontrados para o volume nuclear são diferentes. Essa diferença pode ter se dado por diferenças na metodologia usada por esse autor. Este autor utilizou apenas uma medida de diâmetro e no presente trabalho, foram utilizadas duas medidas de diâmetro (maior e menor) para compor a média.

Nos animais jovens do grupo tratado, as células de Leydig apresentaram todos os parâmetros diminuídos em relação aos animais do grupo controle, inclusive o número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo. A cauterização do ducto incisivo alterou a chegada do estímulo ao OVN e, conseqüentemente, afetou o eixo hipotalâmico-hipofisário. Desta maneira, há uma falta de estímulo hormonal do testículo pelo GnRH, afetando a produção de LH e, conseqüentemente, de testosterona que é essencial para a diferenciação das células progenitoras em células adultas (Mendis-Handagama e Ariyarante, 2001).

As células encontradas aos 120 dias nos testículos dos animais do grupo tratado podem ser células menos diferenciadas, como indicam os menores volumes nuclear e citoplasmático em relação às células de Leydig adultas maduras (Mendis-Handagama e Ariyarante, 2001). Outros

hormônios, como o LH, também podem estar afetados pela ausência do estímulo hipotalâmico. O LH é um hormônio essencial para induzir a proliferação celular, hipertrofia e desenvolvimento das organelas celulares (Mendis-Handagama e Ariyarante, 2001).

Os animais do grupo tratado, aos 180 dias de idade, do subgrupo com baixas concentrações de testosterona, apresentam valores maiores no número de células de Leydig que os animais do grupo controle. Devido à complexidade dos fatores que controlam a proliferação das células de Leydig (Khan, 1992; Mendis-Handagama e Ariyarante, 2001), com a metodologia utilizada nesse trabalho não é possível entender esse fenômeno. Nos animais do grupo tratado, com altas concentrações de testosterona, o número de células de Leydig é menor que nos animais do grupo controle, provavelmente por alterações na produção de GnRH. As células de Leydig nesses animais apresentam menores volumes citoplasmáticos indicando que essas células estão atrasadas em seu desenvolvimento, evidenciando um atraso no desenvolvimento sexual desses animais (Mendis-Handagama e Ariyarante, 2001).

A proliferação das células de Sertoli ocorre após o nascimento e diminui no período neonatal (Russell *et al.*, 1990b). O presente estudo mostra que a obstrução do ducto incisivo causou alteração no número de células de Sertoli por grama de testículo em todos os grupos, sendo menor nos animais tratados. Essa alteração pode ter sido ocasionada por diferentes formas de morte celular, uma vez que a obstrução do ducto incisivo foi realizada após o período de proliferação dessas células. Esta morte celular pode ser atribuída a fatores relacionados às concentrações séricas de testosterona, uma vez que estas se encontraram alteradas nos animais jovens e nos animais adultos com baixa testosterona. O volume menor das células de Sertoli nos animais jovens e nos animais adultos com baixa concentração de testosterona também pode estar influenciado pelas concentrações séricas de testosterona, uma vez que as concentrações deste hormônio encontraram-se menores. Entretanto, pode-se inferir que outros hormônios que participam na homeostase dessas células, como FSH, IGF-1, leptinas e o próprio hormônio do crescimento, também possam participar destas alterações e influenciar na alteração do número de células de Sertoli

por grama de testículo nos animais adultos tratados com altas concentrações de testosterona.

A alteração nos parâmetros das células de Sertoli pode estar relacionada a um atraso no desenvolvimento sexual ocasionado pelas consequências da cauterização do ducto incisivo, assim como ocorre nos bovinos (Emerick, 2011). Como consequência, a espermatogênese nos animais com ducto incisivo obstruído pode estar afetada. Estas alterações não afetaram o tamanho do testículo como mostra a igualdade do IGS e dos pesos testiculares nos animais jovens e no grupo com baixa concentração de testosterona. O atraso no desenvolvimento das células de Sertoli, a luminação dos cordões seminíferos e outros corroboram considerar atraso da puberdade nos animais com o ducto incisivo cauterizado.

Os valores de androstenediona encontrados neste estudo diferem da literatura (Kandsi-Bouhadad e Hadj-Bekkouche, 2010). Essa diferença pode ser pelo fato dos autores utilizarem raças locais (Argélia) e não a raça Nova Zelândia, como no presente estudo. Outro fator que pode influenciar a diferença é a temperatura ambiente do trabalho realizado na Bélgica ser inferior à do Brasil na época que os animais foram eutanasiados (meses de setembro e novembro), com fotoperíodos também diferentes. Sabe-se que coelhos respondem comportamental e fisiologicamente mesmo a pequenas mudanças no fotoperíodo (Hudson e Distel, 1984).

As concentrações da androstenediona não foram alteradas nos animais de 120 e de 180 dias de idade com ducto incisivo cauterizado, apesar de concentrações menores de testosterona nesses animais. Neste estudo, as glândulas adrenais podem não ter sido afetadas pela cauterização do ducto incisivo. A androstenediona é um hormônio precursor da testosterona produzido principalmente pelas glândulas adrenais e é importante nos animais pré-puberis, antes do aumento dos andrógenos testiculares (Kandsi-Bouhadad e Hadj-Bekkouche, 2010). Nos animais adultos do grupo controle eram esperadas concentrações baixas de testosterona, uma vez que os andrógenos testiculares podem inibir a produção de andrógenos nas glândulas adrenais (Kandsi-Bouhadad e Hadj-Bekkouche, 2010). Entretanto, no presente trabalho as concentrações de

androstenediona foram altas, tanto nos animais adultos do grupo tratado quanto nos animais do grupo controle.

Schiebinger *et al.* (1981) e Kandsi-Bouhadad e Hadj-Bekkouche (2010), sugeriram que a androstenediona pode ter uma origem testicular nos animais adultos. No presente trabalho, as alterações testiculares provocadas pela cauterização do ducto incisivo não influenciaram as concentrações de androstenediona produzidas.

Nas análises das concentrações séricas de testosterona dos coelhos adultos foi observada uma distribuição bimodal, com concentrações baixas e altas do hormônio, caracterizando dois subgrupos diferentes, assim como observado por Castro (1995). As concentrações de testosterona dos animais jovens não apresentaram esse comportamento. Entretanto, os animais tratados apresentaram menores concentrações séricas deste hormônio.

Nos animais adultos tratados, e que apresentaram baixas concentrações de testosterona, concentrações séricas desse hormônio foram menores devido provavelmente a falta de estímulo no OVN e a não sensibilização do hipotálamo, alterando a produção de GnRH que afeta diretamente a produção de testosterona pelas células de Leydig.

Nos animais adultos com altas concentrações de testosterona não houve diferença significativa entre as concentrações séricas do hormônio. Provavelmente, porque estes animais são menos sensíveis à falta de estímulos do OVN.

Arteaga *et al.* (2008), estudando as concentrações séricas de testosterona em coelhos domésticos, realizaram três coletas hormonais por indivíduo, no mesmo horário do dia. Estes autores encontraram valores que variaram entre 0,813 a 4,83ng/ml, sugerindo que o horário não influencia nas concentrações séricas de testosterona. Algumas amostras foram coletadas após confronto com outros animais, mas não foram encontradas relações entre as variações do hormônio e os testes comportamentais. As coletas do presente experimento tiveram variação de até seis horas entre elas e também não mostraram alterações relacionadas ao período do dia, demonstrando que os fatores que influenciam as concentrações de testosterona são muito complexos. Nos coelhos do presente estudo foram coletadas amostras aleatórias entre animais controle e tratados. Para

verificar o efeito do horário na concentração de testosterona foi realizado teste de correlação simples entre horário e concentração sérica de testosterona. O resultado (coeficiente de correlação $r = 0,065$) demonstrou não existir forte correlação entre estes dois parâmetros. Estudos mais aprofundados devem ser realizados para uma melhor definição da influência da testosterona no comportamento animal e se as interações relacionadas à dominância são causas das alterações hormonais ou resultados dessas relações sociais (Tarabollini, 1987; Arteaga *et al.*, 2008).

Dentre os parâmetros densidade óssea do osso fêmur, massa do músculo reto femoral, massa do músculo desidratado e desengordurado, percentual de gordura e de água, somente houve diferença nos animais jovens tratados, que apresentaram menor quantidade de água no músculo em relação aos tratados. Estes dados sugerem que as concentrações de testosterona encontradas nos animais tratados não afetaram diretamente a densidade do osso estudado, uma vez que esse hormônio é importante na manutenção do esqueleto (Hofbauer e Khosla, 1999). Outra possibilidade a ser considerada é o fator tempo. Provavelmente, o tempo que os animais tratados estiveram com as concentrações de testosterona mais baixas não foi suficiente para afetar a atuação das células ósseas no órgão. Apesar desses resultados, pode-se observar uma tendência de aumento da densidade óssea nos animais tratados. Estudos com um número maior de animais e com um tempo tratamento maior podem confirmar a influência da cauterização do ducto incisivo na densidade óssea.

Da mesma forma que a densidade óssea não foi afetada, as concentrações de testosterona e o tempo durante o qual os animais tratados ficaram restritos a esse hormônio não alteraram a massa e composição muscular do músculo reto femoral. A perda do crescimento e desenvolvimento muscular é devido à diminuição das concentrações de testosterona (Kochakian, 1966). Em futuros estudos, outros músculos e ossos devem ser analisados, uma vez que alguns músculos não são alvo de testosterona e, por isso, não são tão responsivos ao hormônio quanto outros (Buresova e Gutman, 1971).

O presente trabalho apresenta uma nova abordagem do estudo do OVN sem atuar diretamente sobre o epitélio sensorial deste órgão. Os

resultados mostram a necessidade de aprofundar o estudo deste órgão, utilizando uma metodologia menos traumática, obstrução sem cauterização, que não afete a sua integridade morfofuncional.

Avaliações das concentrações séricas e tissulares de hormônios e fatores que participam do comportamento social e sexual dos mamíferos se fazem necessárias. Com relação ao comportamento sexual, é conveniente lembrar que os estrogênios também participam do comportamento sexual masculino. O atraso da puberdade ocasionado pela obstrução do ducto incisivo é uma ferramenta de estudo que pode ser empregada para propor programas de manejo. Este manejo visa obter acabamento precoce de animais para abate, uma vez que animais púberes apresentam carne mais tenra. Por outro lado, este estudo abre portas para novas áreas do conhecimento, como a etologia, e potencialmente, pode-se constituir um modelo para o estudo do comportamento animal.

Também é plausível pensar que a obstrução do ducto incisivo possa diminuir o odor e sabor desagradáveis da carne de suínos, uma vez que é sabido que altas concentrações de testosterona e androstenediona, entre outros fatores, são responsáveis por essas características indesejadas da carne dos suínos machos. Diante dos resultados demonstrados neste trabalho, percebe-se que existe a necessidade de estudar os efeitos da obstrução do ducto incisivo em outras espécies de mamíferos como cavalos inteiros indóceis, gatos e cães agressivos, e nas fêmeas.

6. CONCLUSÕES

De maneira geral, os resultados obtidos nas investigações realizadas no presente estudo permitem concluir que a obstrução do ducto incisivo por cauterização em coelhos da raça Nova Zelândia:

Altera o comportamento social e sexual dos coelhos tratados;

Não altera o peso corporal;

Altera de diferentes formas aumentando ou diminuindo os valores dos parâmetros testiculares, nos diferentes grupos;

Não altera os níveis séricos de androstenediona;

Altera os níveis séricos de testosterona e

Não afeta a densidade óssea da epífise do osso fêmur, a massa do músculo *in natura* ou processado, e o percentual de gordura e água do músculo reto femoral.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD-ELMAKSOU, A. Comparative expression of laminin and smooth muscle actin in the testis and epididymis of poultry and rabbit. **Journal of Molecular Histology**, v. 40, n.5-6, p.407-416, 2009.
- AMANN, R. P. Sperm production rates. In: Johnson, A. D., Gomes, W. R., Vandemark, N. L. (eds). **The Testis**. New York: Academic Press, 1970a, v. 1, cap. 7, p. 433-482.
- AMANN, R. P. The male rabbit. IV. Quantitative testicular histology and comparisons between daily sperm production as determined histologically and daily sperm output. **Fertility and Sterility**, v. 21, n.9, p. 662-672, 1970b.
- ANAND-IVELL, R.; HENG, K.; HAFEN, B.; SETCHELL, B.; IVELL, R. Dynamics of INSL3 Peptide Expression in the Rodent Testis. **Biology of Reproduction**. v. 81, p. 480-487, 2009.
- APONTE, P.M.; ROOIJ, D.G.; BASTIDAS, P. Testicular development in Brahman bulls. **Theriogenology**, v.64, p.1440-1455, 2005.
- ARIYARATNE, H. B. S.; MASON, J. I.; MENDIS-HANDAGAMA, S. M. L. C. Effects of triiodothyronine on testicular interstitial cells and androgen secretory capacity of the prepubertal rat. **Biology Reproduction**. v. 63, p. 493–502, 2000.
- ARTEAGA, L.; BAUTISTA, A.; MARTÍNEZ-GÓMEZ, M.; NICOLÁS, L.; HUDSON, R. Scent marking, dominance and serum testosterone levels in male domestic rabbits. **Physiology & Behavior**, v. 94, n.3, p. 510-510, 2008.
- BANKS, W. J. **Histologia Veterinária Aplicada**. 2. Ed., São Paulo, Manole, 1992, cap. 26, p. 546-564.
- BARBER, P.C.; RAISMAN, G. Cell division in the vomeronasal organ of the adult mouse. **Brain Research**, v. 141, p.57–66, 1978.
- BARONE, R., LOMBARD, M., MORAND, M. Organe de Jacobson, nerf vomeronasal et nerf terminal du chien. **Bulletin Mensuel de la Société Vétérinaire Pratique de France**, v. 68, n.3, p. 257-270, 1966.
- BELLRINGER, J. F.; PRATT, H. P.; KEVERNE, E. B. Involvement of the vomeronasal organ and prolactin in pheromonal induction of delayed implantation in mice. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 59, p. 223-228, 1980.

BERGER, M.; CHAZAUD, J.; JEAN-FAUCHER, C. H.; TURCKEHEIM, M.; VEYSSIERE, G. Developmental patterns of plasma and testicular testosterone in rabbits from birth to 90 days of age. **Biology of Reproduction**, v.15, p. 561-564, 1976.

BERGER, M.; JEAN-FAUCHER, C. H.; TURCKEHEIM, M.; VEYSSIERE, G.; BLANC, M. R.; POIRIER, J. C.; JEAN, Cl. Testosterone, luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) in plasma of rabbit from birth to adulthood. Correlation with sexual and behavioural development. **Acta Endocrinologica**, v. 99, n.3, p.459-465, 1982.

BERNDTSON, W.E.; IGBOELI, G.; PARKER, W.G. The numbers of Sertoli cells in mature Holstein bulls and their relationship to quantitative aspects of spermatogenesis. **Biology of Reproduction**, v. 37, p.60-67, 1987.

BOURGET, C.; FLOOD, C.; LANGCOPE, C. Steroid dynamics in the rabbit. **Steroids**, v. 43, n.2, p. 225-233, 1984.

BRENNAN, P. A.; KEVERNE, E. B. Neural mechanisms of mammalian olfactory learning. **Progress in Neurobiology**, v. 51, p. 457-481, 1997.

BRECHBUHL, J.; KLAEY, M.; BROILLET, M. C. Grueneberg ganglion cells mediate alarm pheromone detection in mice. **Science**, v. 321, p. 1092-1095, 2008.

BRIGANTI, F.; DELLA SETA, D.; FONTANI, G.; LODI, L.; LUPO, C. Behavioral effects of testosterone in relation to social rank in male rabbits. **Aggressive Behavior**, v. 29, p.269-278, 2003.

BRUCE, H. M. An exteroceptive block to pregnancy in the mouse. **Nature**, v. 184, p. 105, 1959.

BURESOVA, M.; GUTMANN, E. Effect of testosterone on protein synthesis and contractility of the levator ani muscle of the rat. **Journal of Endocrinology**, v.50, p. 643-651, 1971.

BYSCOVE, A. G. Differentiation of mammalian embryonic gonad. **Physiology Review**, v. 66, p. 77-112, 1986.

CARDOSO, J. R.; BÁO, S. N. Effects of chronic exposure to soy meal containing diet or soy derived isoflavones supplement on semen production and reproductive system of male rabbits. **Animal Reproduction Science**, v. 97, p. 237-245, 2007.

CASAS, S. G.; MATEUS, S.; OLIVEIRA, V. R.; ABRAMO, A. C. Importância do “Orgão Vomero Nasal” humano. **Revista da Sociedade Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 13, n. 3, p. 43-50, 1998.

CASTRO, A. C.S, A proposed acrosomal system for identifying stages of the cycle of the seminiferous epithelium and a model for the kinetics of spermatogenesis in the rabbit. Dissertation – University of New Hampshire. EUA, 1995.

CASTRO, A. C. S., BERNDTSON, W. E., CARDOSO, F. M. Cinética e quantificação da espermatogênese: bases morfológicas e suas aplicações em estudos da reprodução de mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 21, n. 1, p. 25-34, 1997.

CLANCY, A. N.; SINGER, A. G.; MACRIDES, F.; BRONSON, F. H.; AGOSTA, W. C. Experiential and endocrine dependence of gonadotropin responses in male mice to conspecific urine. **Biology of Reproduction**, v. 38, p. 183-191, 1988.

CLARKE, I.; WALKER, J.; HENNESSY, D. *et al.* Inherent food safety 1 of a synthetic gonadotropin-releasing factor (GnRF) vaccine for the control of boar taint in entire male pigs. **Journal of Applied Research in Veterinary Medicine**, v.6, n.1, 2008.

COQUELIN, A.; CLANCY, A. N.; MACRIDES, F.; NOBLE, E. P.; GORSKI, R. A. Pheromonally induced release of luteinizing hormone in male mice: involvement of the vomeronasal system. **The Journal of Neuroscience**, v. 4, p.2230-2236, 1984.

CROSBY, E. C., HUMPREY, T. A comparison of the olfactory and accessory olfactory bulb in certain representative vertebrates. **Papers of the Michigan Academy of Science, Arts and Letters**. v. 24, p.95-104, 1939.

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

DE LA ROSA-PRIETO, C.; SAIZ-SANCHEZ, D. UBEDA-BANON, I.; ARGADONA- PALACIOS, L.; GARCIA-MUNOZGUREN, S.; MARTINEZ-MARCOS, A. Fate of marginal neuroblasts in the vomeronasal epithelium of adult mice. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 517, p.723–736, 2009.

DORST, V. J.; SJONSKI, H. Morphometrische untersuchunhen AM tubulussystem des schweinehodens wahrend der postnatalen entwicklug. **Monatsh Veterinary Medicine**, v. 29, p. 67-80, 1974.

DOVING, K. B., TROTIER, D. Anatomical Description of a New Organ in the Nose of Domesticated Animals' by Ludvig Jacobson (1813). **Chemical Senses**, v.23, p. 743-754,1998a.

DOVING, K. B., TROTIER, D. Structure and function of the vomeronasal organ. **The Journal of Experimental Biology**, v. 201, p. 2913-2925, 1998b.

DLUZEN, D.E., RAMIREZ, V.D. Localized and discrete changes inneuropeptide (LHRH and TRH) and neurotransmitter (NE andDA) concentrations within the olfactory bulbs as a function ofsocial interaction. **Hormones and Behavior**,v. 17, p.139–145, 1983.

DUDLEY, C.A.; MOSS, R.L. Electrophysiological evidence for glutamate as a vomeronasal receptor cell neurotransmitter. **Brain Research**, v. 675, p. 208–214, 1995.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de anatomia veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

EMERICK, L. L. Efeito da castração e da cauterização dos ductos incisivos sobre características reprodutivas e produtivas em tourinhos nelore. Trabalho apresentado em exame de qualificação (doutorado em ciência animal) – UFMG, 2011.

FAWCETT, D. W.; PHILIPS, D. M. Morphogenic factors influencing the shape of the sperm head, **Develpmental Biology**, v. 26, p,220-251, 1969.

FRANÇA, L.R. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. 1991. 185p. Tese (doutorado em ciências) - UFMG, 1991.

FRANÇA, L. R., RUSSELL, L. D. The testis of domestic animals. In: Regadera, J. & Martinez-Garcia (eds). **Male reproduction**. A multidisciplinary overview. Churchill Livingstone, Madrid, p. 197-219, 1998.

FUENTES, V. O.; VILLAGRAN, C.; NAVARRO, J. Sexual behavior of male New Zealand white rabbits in an intensive production unit. **Animal reproduction Science**, v.. 80, n.1-2, p. 157-162, 2004.

FUSS, S. H.; OMURA. M., MOMBAERTS, P. The Grueneberg ganglion of the mouse projects axons to glomeruli in the olfactory bulb. **European Journal of Neuroscience**, v. 22, p. 2649-2654, 2005.

GARCÍA-TOMÁS, M.; SÁCHEZ, J.; PILES, M. Post-natal sexual development of testis and epididymis in the rabbit: Variability and relationships among macroscopic and microscopic markers. **Animal Reproduction Science**, v. 110, p. 347-355, 2009.

GONDOS, B.; CONNER, L. A. Ultrastructural differentiation of interstitial cells in the fetal and postnatal rabbit testis. **Biology of Reproduction**, v, 7, p. 118, 1972.

GONDOS, B.; RENSTON, R. H.; CONNER, L. A. Ultrastructure of germ cells and Sertoli cells in the postnatal rabbit testis. **American Journal of Anatomy**, v. 136, n. 4, p. 427-439, 1973.

GONDOS, B.; RENSTON, R. H.; GOLDSTEIN, D.A. Postnatal differentiation of Leydig cells in the rabbit testis. **American Journal of Anatomy**, v. 145 (2), p. 167-181, 1976.

GONDOS, B.; RAO, A.; RAMACHANDRAN, J. Effects of antiserum to luteinizing hormone on the structure and function of rat Leydig cells. **Journal of Endocrinology**, v. 87, p. 265-270, 1990.

GRIGSBY, J. S.; BERGEN, W. G.; MERKEL, R. A. The effect of testosterone on skeletal muscle development and protein synthesis in rabbits. **Growth**, v. 40, p. 303-316, 1976.

GRONDONA, K; E. B. Morfometria do órgão vomeronasal em ratos adultos. Dissertação de mestrado –Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de São Paulo, 2005.

GUPTA, R. S., YADAV, R. K., DIXIT, V. P., DOBHAL, M. P. Antifertility studies of *Colebrookiaoppositifolia* leaf extract in male rats with special reference to testicular cell population dynamics. **Fitoterapia**, v. 72, p. 236-245, 2001.

GUSTAFSON, A. W.; SHEMESH, M. Changes in plasma testosterone levels during the annual reproductive cycle of the hibernating bat, *Myotis lucifungus* with a survey of plasma testosterone levels in adult ale vertebrates. **Biology of Reproduction**, v. 15, p. 9-24, 1976.

GUYTON, A.C.M.D. Tratado de Fisiologia Médica. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. p. 49-58.

HAGEN, W. K. Colony Husbandry. In: *The Biology of the Laboratory Rabbit*. Lea e Fabiger, Philadelphia, London, 1982.

HAFEZ, E.S.E. Reprodução animal. 6 ed. Rio de Janeiro: Manole.1995 p.59-94.

HALPERN, M. The organization and function of the vomeronasal system. **Annals of Veterinary Neuroscience**, v. 10, p.325-362, 1987.

HALPERN, M, MARCOS, A. M. Structure and function of the vomeronasal system: an update. **Progress in Neurobiology**, v. 70, n. 3, p. 245-318, 2003.

HARDMAN, J. G.; GILMANN, A. G.; LINBIRD, L. E. In: *The pharmacological basis of therapeutics*. New York: McGraw-Hill, 1996.

HARDY, M.P.; KELCE, W.R.; KLINEFELTER, G.R.; EWING, L.L. Differentiation of Leydig cell precursors in vitro: a role for androgen. **Journal of Endocrinology**, v. 127, n.1, p. 488–490, 1990.

HARE, W. C. D. Sistema respiratório geral. In: *SISSON, S.; GETTY, R. Anatomia dos Animais Domésticos*.5 ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. P. 111-112.

HEATH, E., Sexual related territorial behavior in the laboratory rabbit. **Laboratory Animal Science**, v. 22, p. 684-691, 1972.

HENAULT, M. A.; KILLIAN, G. J.; KAVANAUGH, J. F.; GRIEL, L. C. Effect of accessory sex gland fluid from bulls of differing fertilities on the ability of cauda epididymal sperm to penetrate zona-free bovine oocytes. **Biology of reproduction**, v. 52, p. 390-397, 1995.

HINTON, B.T.; SETCHELL, B.P. 1993. Fluid secretion and movement. In *The Sertoli cell*. L.D. Russell and M.D. Griswold, editors. Cache River Press.Clearwater, p. 249–267.

- HOFBAUER, L.; KHOSLA, S. Androgen effects on bone metabolism: recent progress and controversies. **European Journal of Endocrinology**, v. 140, n.4, p. 271-286, 1999.
- HUDSON, R.; DISTEL, H. Sensitivity of female rabbits to changes in photoperiod as measured by pheromone emission. **Journal of Comparative Physiology**, V. 167, p.225-230, 1990.
- HUMASON, L. G. Tissue Techniques . Fourth Edition. Los alamos scientific laboratories San Francisco and London: w. H. Freeman and company, p. 327, 1995.
- JEGOU, B.; LE GAC, F.; IRBY, D. C.; DE KRETZER, D. M. Studies on seminiferous tubule fluid production in the adult rat: effect of hypophysectomy and treatment with FSH, LH and testosterone. **International Journal of Andrology**, v.6, p.249–260, 1983.
- JOHNSTON, R. E. Pheromones, the vomeronasal system, and communication. From hormonal responses to individual recognition. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 855, p. 333–348, 1998.
- JOHNSTON, R.E. Chemical communication and pheromones: the types of chemical signals and the role of the vomeronasal system. In: FINGER, T.E., SILVER, W.L., RESTREPO, D. (Eds.), **The Neurobiology of Taste and Smell**, 2 ed. New York: ed Wiley, p. 101–127, 2000.
- JOHNSTON, R.E. Neural mechanisms of communication: from pheromones to mosaic signals. In: MARCHLEWSKA-KOJ, A., LEPRI, J.J., MÜLLER-SCHWARZE, D. (Eds.), **Chemical Signals in Vertebrates**, 9 ed., New York: Plenum Press, 2001. p. 61–67.
- JONES, R. D. W.; HAMILTON, D. W.; D. W. FAWCETT, D. W. Morphology of the epithelium of the extratesticular rete testis, ductuli efferentes and ductus epididymidis of the adult male rabbit. **American Journal of Anatomy**, v.156, n. 3, p.373–400, 1979.
- JONES, R. Sperm survival versus degradation in the Mammalian epididymis: a hypothesis. **Biology of Reproduction**. v. 71, p.1405-1411, 2004.
- JORDAN, J. The vomeronasal organ (of jaacobson) in primates. **Folia Morphologica**, v. 31, p. 418-431,1972.

KABA, H.; HAYASHI, Y.; HIGUCHI, T.; NAKANISHI, S. Induction of olfactory memory activation of a metabotropic glutamate receptor. **Science**, v. 265, p. 262-264, 1994.

KANDSI-BOUHADAD, F.; HADJ-BEKKOUCHE, F. Evaluation of androstenedione adrenal content and effects of castration on the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). **Comptes Rendus Biologies**, v. 333, n.8, p. 591-596, 2010.

KELLIHER, K. R.; BAUM, M. J.; MEREDITH, M. The ferret's vomeronasal organ and accessory olfactory bulb: effect of hormone manipulation in adult males and females. **The Anatomical Record**, v. 236, p. 280–288, 2000.

KEVERNE, E. B. The accessory olfactory system and its role in pheromonally mediated changes in prolactin. In: *Olfaction and Endocrine Regulation*, London: IRL press, 1982, p. 127-140.

KEVERNE, E. B. The vomeronasal organ. **Science**, v. 286, p. 716-20, 1999.

KHAN, S.; TEERDS, K.; DORRINGTON, J. Growth factor requirements for DNA synthesis by Leydig cells from immature rat. **Biology of Reproduction**, v. 46, p.335–341, 1992

KOCHAKIAN, C. D. Regulation of muscle growth by androgens. In: *The Physiology and Biochemistry of Muscle as a Food*. The University of Wisconsin Press, Madison, p. 81-112, 1966.

KOOS, D. S., FRASER, S. E. The Grueneberg ganglion projects to the olfactory bulb. **NeuroReport**, v. 16, p. 1929-1932, 2005.

LEE, C.Y., HENRICKS, D.M., SKELLEY, G.C. *et al.* Growth and hormones response of intact and castrate male cattle to trenbolone acetate and estradiol. **Journal of Animal Science**, v. 68, n.9, p.2682-2689, 1990.

LIMAN, E. R., COREY, D. P., DULAC, C. TRP2: a candidate transduction channel for mammalian pheromone sensory signaling. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 96, p. 5791-6, 1999.

MALI, P. C., ANSARI, A. S., CHATURVEDI, M. Antifertility effect of chronically administered *Martynia annua* root extract on male rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 82, p. 61-67, 2002.

MAMASUEW, K.; BREER, H., FLEISCHER, J. Grueneberg ganglion neurons respond to cool ambient temperatures. **European Journal of Neuroscience**, v. 28, p. 1775-1785, 2008.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Métodos quantitativos em morfologia. Editora UERJ Rio de Janeiro: 1995,131p.

MELLO, H. V.; SILVA, J. F. Criação de coelhos. Viçosa: A. Fácil, 2003.

MENCO, B. P. *et al.*, Ultrastructural localization of G-proteins and the channel protein TRP2 to microvilli of rat vomeronasal receptor cells. **Journal of Comparative Neurology**, v. 438, p. 468-89, 2001.

MENDIS-HANDAGAMA, S.M.; ARIYARATNE, H.B. Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. **Biology of Reproduction**. v. 65, p. 660–671, 2001.

MENDOZA, A. S. The mouse vomeronasal glands: a light and electron microscopical study. **Chemical Senses**, v.11, n.4, p. 541-555, 1986.

MEREDITH, M.; FERNANDEZ-FEWELL, G. Vomeronasal system, LHRH and sex behaviour. **Psychoneuroendocrinology**, v. 19, p. 657-672, 1994.

MEREDITH, M. Vomeronasal function. **Chemical Senses**, v. 23, p. 463-466, 1998.

MUCIGNAT-CARETTA, C. The rodent accessory olfactory system. **Journal of Comparative Physiology A**, v. 196, p. 767-777, 2010.

NICANDER, L. On the regional histology and cytochemistry of the epididymis in the rabbits. **Acta Morphologica Neerland Scandinava**, v. 1, p. 99-118, 1957.

NOTELOVITZ, M. Androgen effects on bone and muscle. **Fertility and sterility**, v. 77 (4), p.34-41, 2002.

OGURA, T.; KROSNOWSKI, K.; ZHANG, L. BEKKERMAN, M.; LIN, W. Chemoreception regulates chemical access to mouse vomeronasal organ: role of solitary chemosensory cells. **PloSone**, v. 5, n. 7, p. e11924, 2010. Disponível em <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2912856&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 23/2/2011.

ORTI, R. M.; GARCÍA, P. M.; SORIANO, J. G. Atlas de Anatomia de Animales Exoticos. Masson, 1 ed. Barcelona: Masson. 2004, 166p.

PIEPER, D.; NEWMAN, S.; LOBOCKI, C.; GOGOLA, G. Bilateral transection of the lateral olfactory tract but not removal of the vomeronasal organs inhibits short-photoperiod-induced testicular regression in golden hamster. **Brain Research**, v. 485, n.2, p. 382-390, 1990.

PEARLMAN, S.M. Jacobson's organ (organon vomeronasale, Jacobsoni): its anatomy, gross, microscopic and comparative, with some observations as well on its function. **The Annals of Otology, Rhinology and Laryngology**, v. 43, p. 739-768, 1934.

PLANEL, H. Etude anatomique et physiologique de l'organe Jacobson. **Archives of Anatomy Histology and Embryology**, v. 36, p. 199-205, 1953.

POPESKO, P.; RAJTOVÁ, V.; HORÁK, J. A. A colour atlas of the anatomy of small laboratory animals. Bratislava: Wolfe, 1992. v. 1. p. 121-222.

POWERS, J. B.; WINANS, S. S. Vomeronasal organ: critical role in mediating sexual behavior in the male hamster. **Science**, v. 187, p. 961-963, 1975.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Farmacologia. 3a. ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1997.

RIVIÈRE, S.; CHALLET, L.; FLUEGGE, D.; SPEHR, M. Formyl peptide receptor-like proteins are a novel family of vomeronasal chemosensors. **Nature**, v. 459 (7246), p. 574-577, 2009.

ROLINSKI, D.L.; BHATNAGAR, K. P.; BURROWS, A.M.; SMITH, T. D. Comparative morphology and histochemistry of glands associated with the vomeronasal organ in humans, mouse lemurs, and voles. **The Anatomical Record**, v.260, p.92-101, 2000.

RUSSEL, L. D. Movement of spermatocytes from the basal to the adluminal compartment of the rat testis. **American Journal of Anatomy**, v. 148, p. 313-328, 1977.

RUSSELL, L. D., ETTLIN, R. A., SINHA-HIKIM, A. P., CLEGG, E. D. **Histological and Histopathological Evaluation of the Testis**. Flórida, CacheRiver Press, Clearwater, 1990a.

RUSSEL L. D.; HONG P. R.; INDRANI S. H.; WOLFGANG, S.; AMIYA P.; SINHA H. A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes, and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell. **The American Journal of Anatomy**, v.188, p.21-30 1990b.

SÁNCHEZ-CRIADO, J. E.; FERNÁNDEZ-GALZ, M. D.; MORA-NOVARO, O. A. Niveles plasmáticos de LH y testosterona em ratas macho sometidas a deaferentación periférica del sistema vomeronasal. **Revista Española de Fisiología**, v. 40, p. 359-364, 1984.

SALAZAR, I.; SANCHEZ QUINTEIRO, P.; CIFUENTES, P. F.; LOMBARDERO, M. Distribution of the arterial supply to the vomeronasal organ in the cat. **The Anatomical Record**. v. 247, p. 129-136, 1997.

SALAZAR, I.; SANCHEZ QUINTEIRO, P. Supporting tissue and vasculature of the mammalian vomeronasal organ: the rat as a model. **Microscopy Research and Technique**. v. 15, n.41, p. 492-505, 1998.

SCALIA, F., WINANS, S. S. New perspectives on the morphology of the olfactory system: olfactory and vomeronasal pathways in mammals, 1976: Doty, R. L editors.

SCHENCKE, C.; DEL SOL, M. MORFOLOGÍA DEL CONDUCTO DEFERENTE EN EL CONEJO (*Orytolagus cuniculus*). **International Journal of Morphology**, v. 21, n. 1, 2003.

SCOLFARO, M. R.; CARDINALI, I. A.; JÚNIOR, G.G. A importância da análise histológica morfométrica gonadal na identificação da gônada disgenética. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n.2, p. 2, 2003.

SIMPSON, E.R.; MAHENDROO, M.S.; MEANS, G.D.; KILGORE, M. W.; HINSELWOOD, M. M.; GRAHAM-LORENCE, S.; AMARNEH, B.; ITO, Y.; FISHER, C.R.; MICHAEL, D. *et al.* 1994 Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. **Endocrine Reviews**, v.15, p.342–355, 1994.

SCHIMMING, B. C.; VICENTINI, C. A.; TIRAPELLI, L. F.; TIRAPELLI, D. P. P. DA CUNHA. Observações morfológicas no ducto epididimário do cão. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, n.2, 2002.

SOUZA, W. Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas. Sociedade Brasileira de Microscopia e Microdiálise/SBMM, Rio de Janeiro, p. 357, 2007.

STEPHAN, H., BARON, G., FRAHM, H. D. Comparison of brain structure volumes in Insectivora and Primates .II. Accessory olfactory bulb (AOB). **Journal FürHirnforschung**, v, 23, p.575-591, 1982.

STARK, D. The development of the chondrocranium in primates. In: W. P. LUCKETT AND F. S. SZALAY. **Phylogeny of the Primates**, London: Pçenum Press, 1975.p. 127-155.

STOWERS, L.; HOLY, T. E.; MEISTER, M.; DULAC, C. KOENTGES, G. Loss of sex discrimination and male-male aggression in mice deficient for TRP2. **Science**, v. 29, p. 1493-1500, 2002.

STOWERS, L.; MARTON, T. What is a pheromone? Mammalian pheromones reconsidered. **Neuron**. v. 46, p. 699-702, 2005.

TANIGUCHI, K; MOCHIZUKI, K. Comparative morphological studies on the vomeronasal organ in rats, mice, and rabbits. **Journal of Veterinary Sciences**, v. 45, n. 67-76, 1982.

TARABOLLINI, F. Behavioral and endocrine aspects of dominance and submission in male rabbits. **Aggressive Behavior**. v. 13; p. 247-258, 1987.

TIRINDELLI, R.; DIBATTISTA, M.; PIFFERI, S.; MENINI, A. From Pheromones to Behavior. **Physiological Reviews**, v.890, p. 921-956, 2009.

THOMSON, S.; WALLACE, A. M.; B. COOK, B. A '251-Radioimmunoassay for Measuring Androstenedione in Serum and in Blood-Spot Samples from Neonates. **Clinical Chemistry**, v. 35, n.8, 1989.

ULLOA-AGUIRRE, A.; JANOVIK, J.A.; LEAÑOS-MIRANDA, A.; CONN, P.M. Misrouted cell surface GnRH receptors as a disease etiology for congenital isolated hypogonadotropic hypogonadism. **Human Reproduction Update**, v.10, n.2, p. 177–192, 2004.

VACCAREZZA, O. L., SPEICH, L. N., TRAMEZZANI, J. H. The vomeronasal organ of the rat. **Journal of Anatomy**, v. 32, p. 167-185, 1981.

WAITES, G.M.; SPEIGHT, A.C.; JENKINS, N. The functional maturation of the Sertoli cell and Leydig cell in the mammalian testis. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.75, p.317-326. 1985.

WEILER, E.; APFELBACH, R.; FARBMAN, A. I. The vomeronasal organ of the male ferret. **Chemical Senses**, v. 24, p.127–136, 1999.

WESEKA, K. S. ANHOLT, R. H. Differential expression of G proteins in the mouse olfactory system. **Brain Research**. v. 837, p. 117-126, 1999.

- WILSON, K. C., RAISMAN, G. Age-related changes in the neurosensory epithelium of the mouse vomeronasal organ: extended period of postnatal growth in size and evidence for rapid cell turnover in the adult. **Brain Research**, v. 185, p. 103-113, 1980.
- WOHRMANN-REPENNING, A. Comparative anatomical studies of the vomeronasal complex and the rostral palae of various mammals. I. **Gegenbaurs Morphologisches Jahrbuch.**, v. 130, p. 501-530, 1984.
- WOODLEY, S. K.; CLOE, A. L.; WATERS, P.; M.J. BAUM, M. J. Effects of vomeronasal organ removal on olfactory sex discrimination and odor preferences of female ferrets. **Chemical Senses**, n.29, n.8, p.659–669, 2004.
- WYSOCKY, C.J., LEPRI, J.J. Consequences of removing the vomeronasal organ. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**. Biol., v. 39, p.661–669, 1991.
- WYSOCKI, C. J. Neurobehavioral evidence for the involvement of the vomeronasal system in mammalian reproduction. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 3, p. 301-341, 1979.
- WYSOCKI, C. J., MEREDITH, M. The vomeronasal system. In: FINGER, T. E., SILVER, W. L., editors **Neurobiology of Taste and Olfaction**. New York: Wiley, 1987. p. 125-150.
- ZANCANARO, C.; MUCIGNAT-CARETTA, C.; MERIGO, F.; CAVAGGIONI, A.; OSCULATI, F. α -Gustducin expression. In the vomeronasal organ of the mouse. **European Journal of Neuroscience**, v. 11, p. 4473-4475, 1999.
- ZIRKIN, B. R.; EWING, L. I.; KROMANN, N.; COCHRAN, R. C. Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog and hamster testes perfused *in vitro*: correlation with Leydig cell ultrastructure. **Endocrinology**, v. 107, n.6, p. 1867-1874, 1980.