

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL - EQUINOS

**AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO TESTICULAR DE EQUINOS DA
RAÇA CRIOLA NO PERÍODO DA PERI-PUBERDADE**

Autor: Joana Weber Gregory

Porto Alegre, maio de 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL - EQUINOS

**AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO TESTICULAR DE EQUINOS DA
RAÇA CRIOLA NO PERÍODO DA PERI-PUBERDADE**

Autor: Joana Weber Gregory

**Dissertação apresentada como
requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre em Medicina Animal
na área de Reprodução Animal**

**Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês
Mascarenhas Jobim**

Porto Alegre, maio de 2012

CIP - Catalogação na Publicação

Weber Gregory, Joana
Avaliação do desenvolvimento testicular de equinos
da raça Crioula no período da peri-puberdade / Joana
Weber Gregory. -- 2012.
50 f.

Orientador: Maria Inês Mascarenhas Jobim.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal
do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,
Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos,
Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. Puberdade. 2. Cavalo Crioulo. 3. Biometria
testicular. 4. Epidídimo. 5. Espermatogênese. I.
Mascarenhas Jobim, Maria Inês, orient. II.
Título.

JOANA WEBER GREGORY

**AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO TESTICULAR DE EQUINOS DA
RAÇA CRIOLA NO PERÍODO DA PERI-PUBERDADE**

APROVADA POR:

Profa. Dra. Maria Inês Mascarenhas Jobim
Orientadora e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos
Membro da Comissão

Prof. Dr. Cláudio Alves Pimentel
Membro da Comissão

Dra. Caroline Antoniazzi Wolf
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora e “Mãe Científica”, Dra. Professora Maria Inês Mascarenhas Jobim, por toda confiança, ensinamentos e apoio incondicional, oportunizando a realização do meu mestrado. E, a cima de tudo, agradece sua amizade, que já vem de muitos anos.

Ao Professor Dr. Rodrigo Costa Mattos, pelo suporte e colaboração.

Ao meu pai, pela compreensão, parceria de trabalho, apoio, conselhos, sugestões e ensinamentos durante todos estes anos.

À minha mãe e irmãs, que mesmo longe sempre estiveram presentes na minha jornada.

Ao meu noivo, pelo apoio nos trabalhos de campo e laboratório. Pela tranquilidade transmitida nos momentos de preocupação. Agradeço pelo amor, carinho e conselhos.

Aos proprietários das cabanhas que possibilitaram a obtenção dos dados necessários para realização do experimento.

À Professora Dr. Ana Maria Telles Esmeraldino pela preparação das lâminas e realização dos exames histológicos.

Ao colega, Dr. Lucas Brunelli de Moraes pela colaboração na realização do experimento.

À Professora Dr. Concepta McManus Pimentel pela realização das análises estatísticas.

Ao aluno de graduação, Daniel Vianna Luz, pela cooperação na avaliação histológica.

Aos amigos e colegas do REPROLAB, em especial à aluna de Pós-Doutorado, Caroline, pela parceria de estudo, apoio e amizade.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo ensino público, gratuito e de qualidade.

À CAPES, pela bolsa de mestrado.

Avaliação do desenvolvimento testicular de equinos da raça Crioula no período da peri-puberdade

Dissertação de Mestrado

Autor: Joana Weber Gregory

Orientadora: Maria Inês Mascarenhas Jobim

RESUMO

Este estudo teve como objetivos caracterizar modificações no tamanho testicular e concentrações sanguíneas de testosterona relacionadas à idade, avaliar a presença de espermatozoides epididimários, mensurar o diâmetro dos túbulos seminíferos e determinar o grau de maturação testicular, através da presença das células germinativas mais avançadas no epitélio seminífero de machos Crioulos no período da peri-puberdade. Os animais foram castrados cirurgicamente. Foi avaliada a circunferência torácica para estimativa do peso corporal. Trinta e quatro equinos foram agrupados em quatro categorias. O grupo I (GI) com quatro potros com idade de até 14 meses. O grupo II (GII) composto por sete animais com mais de 14 meses e menos de 17 meses. No terceiro grupo (GIII) foram incluídos 14 animais com mais de 17 meses e menos de 19 meses de idade e o último grupo (GIV) composto por nove equinos com mais de 19 meses e menos de 34 meses de idade. Após a castração os testículos foram pesados e medidos. Um fragmento foi coletado para posterior avaliação histológica e verificação do diâmetro dos túbulos seminíferos, além da presença de células germinativas do epitélio seminífero em diferentes fases de desenvolvimento. Uma amostra de sangue foi coletada para posterior determinação da concentração plasmática de testosterona. O peso médio dos animais no GI aumentou de 232 kg para 321 kg nos garanhões do GIV. Não houve diferença significativa entre medidas dos testículos direito e esquerdo. O peso e volume testicular apresentaram variações mais acentuadas nos animais no GIV e diferiram significativamente em relação aos animais mais jovens. Valores plasmáticos de testosterona não diferiram entre grupos e peso corporal. O diâmetro dos túbulos seminíferos apresentou variação mais marcante nos garanhões do GIV, aumentando de 89,13 μm nos potros do GI para 168,24 μm nos garanhões do GIV. Em média, 17,5% dos túbulos seminíferos não apresentaram células germinativas no GI, decrescendo para 5,4% no GII, 5,2% no GIII e 0,8% no GIV. O número de túbulos contendo espermátides maduras e espermatozoides aumentou conforme o avanço da idade dos animais. As variações mais acentuadas no incremento do volume testicular e aumento do diâmetro dos túbulos seminíferos coincidiram com a uma elevada presença de espermatozoides nos túbulos. Em conclusão, todos os animais com 20 meses de idade ou mais alcançaram a puberdade e os primeiros espermatozoides epididimários foram encontrados em potros com 16 meses. Ao testículo atingir um volume e peso testicular de 16cm³ e 23g, respectivamente, todos os animais apresentaram espermatozoides epididimários.

Palavras-chave: puberdade, garanhão, biometria testicular, epidídimo, espermatogênese, testosterona

Evaluation of the testicular development of Criollo Horses in the period of the peri-puberty

Master of Science Dissertation

Author: Joana Weber Gregory

Adviser: Maria Inês Mascarenhas Jobim

ABSTRACT

The objectives of this study were to characterize age-associated changes in testicular size and blood concentrations of testosterone, as well as evaluate the presence of epididymal sperm. The testicular maturity was evaluated by measuring seminiferous tubule diameter and the presence of the most advanced germ cells in the seminiferous epithelium of colts in the peri-puberty period. The animals were surgically castrated and thorax circumference was taken to estimate the body weight. Thirty four male horses were grouped into four categories: Group I (GI) with four foals aged up to 14 months; Group II (GII) with seven animals over 14 months and less than 17 months; The third group (GIII) included 14 animals over 17 months and less than 19 months; Group (GIV) was composed of nine horses over 19 months and under 34 months of age. After castration the testes were weighed and measured. A segment was collected for subsequent histological evaluation, including measurement of the diameter of the seminiferous tubules and the presence of germ cells of the seminiferous epithelium at different stages of development. A blood sample was collected for determination of plasma testosterone. The average body weight of the animals increased significantly from 232 kg in GI to 321 kg for horses in GIV. There was no difference between measures taken on right and left testes. The testicular weight and volume was greater in animals of GIV and differed significantly compared to the younger animals. Plasma levels of testosterone did not differ between age groups. The diameter of the seminiferous tubules increased from 89.13 μm in foals of GI to 168.24 μm in horses of GIV. On average, 17.5% of the seminiferous tubules had no germ cells in animals of GI, decreasing to 5.4% in GII, 5.2% in GIII and 0.8% in GIV. The number of tubules containing mature spermatids and spermatozoa increased with age. Most significant variations in the increase of testicular volume and diameter of seminiferous tubules were associated with a high presence of spermatozoa in the tubules. In conclusion all animals with 20 months of age or more had reached puberty in the present study and the first spermatozoa appeared in 16 month old colts. All animals presented epididymal sperm when testicular volume and weight were over 16cm³ and 23g, respectively.

Keywords: *puberty, horse, testes biometrics, epididymis, spermatogenesis, testosterone*

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** Mean \pm S.E. Testicular weight and testicular volume of 34 Horses divided in four age groups. [a,b,c] different superscripts indicate statistical difference ($P < 0.05$)..... **31**
- FIGURA 2** Diameter of seminiferous tubules, testicular height and length in Crioulo Horses. [a,b,c] different superscripts indicate statistical difference ($P < 0.05$)..... **34**

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------------|---|-----------|
| TABELA 1 | Testicle biometry of horses in different age groups..... | 32 |
| TABELA 2 | Development of seminiferous epithelium of horse as related to the most advanced germ cell type (mean \pm standard error)..... | 33 |

SUMÁRIO

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 9 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 11 |
| 2.1 | O Cavalo Crioulo | 11 |
| 2.2 | Puberdade | 12 |
| 2.3 | Função testicular | 14 |
| 2.4 | Controle endócrino | 15 |
| 2.5 | Espermatogênese | 17 |
| 2.6 | Biometria testicular | 19 |
| 2.7 | Epidídimo | 21 |
| | 2.7.1 Função epididimária | 21 |
| | 2.7.2 Espermatozóides epididimários | 22 |
| 3 | ARTIGO: Peri-puberty in male Horses: testicular development, histology of the seminiferous epithelium and epididymal sperm..... | 24 |
| 4 | CONCLUSÕES | 41 |
| | REFERÊNCIAS | 42 |

1 INTRODUÇÃO

Desde o início do século passado pesquisadores vêm se dedicando ao estudo da reprodução eqüina, porém deve-se ressaltar que apenas recentemente aspectos reprodutivos ligados ao gananhão estão recebendo uma maior atenção.

Importantes informações têm sido obtidas nos últimos anos quanto às modificações fisiológicas das células germinativas que ocorrem na fase de peri-puberdade em outras espécies (MACKAY, 2000; SHARPE et al., 2003, AGUIAR et al., 2006, DREEF et al., 2007, MOURA & ERICKSON, 2011), porém não são conhecidos estudos a este respeito em equinos Crioulos. Eventos ligados à espermatogênese, presença de células espermáticas no lavado epididimário e crescimento testicular não estão completamente esclarecidos em equinos no período da peri-puberdade. Em gananhões adultos, a biometria testicular tem como principais finalidades diagnosticar alterações testiculares, assim como auxiliar na predição do potencial reprodutivo bem como da produção espermática diária (SQUIRES & PICKETT, 2011).

A influência da idade sobre o desenvolvimento testicular, concentração hormonal e início da puberdade já foi estudada em equinos. Foi sugerido, que a idade à puberdade, baseada nas características espermáticas, seria aos 21 meses, podendo variar entre 14 e 24 meses (NADEN et al.,1990). Segundo Steiner e Umphenour (2009) a capacidade reprodutiva de gananhões é influenciada pela idade, e a puberdade é atingida entre os 12 e 24 meses de idade. No entanto a puberdade no macho não pode ser determinada com precisão. Idade, peso corporal, fotoperíodo e estado nutricional foram citados como fatores determinantes no controle da maturidade sexual, porém não isoladamente, mas sim de forma interativa (JOHNSON et al., 1991; HOLYOAK et al.,1994).

Puberdade é o período de transição do estágio da imaturidade sexual para a completa competência reprodutiva (CAMERON, 1990). Conforme descrito por Rowlands et al. (1982) no macho a puberdade é definida como o momento em que espermatozoides maduros aparece no ejaculado em animais jovens. Entretanto este evento não necessariamente coincide com a maturação das funções endócrinas dos testículos (maturação sexual).

Em equinos da raça Crioula não se tem nenhuma informação a respeito da idade na qual o animal atinge a puberdade. Este estudo teve como objetivos

caracterizar alterações no tamanho testicular e concentrações sanguíneas de testosterona relacionadas à idade, avaliar a presença de espermatozoides epididimários, mensurar o diâmetro dos túbulos seminíferos e determinar o grau de maturação testicular, através da presença das células germinativas mais avançadas nos epitélio seminífero de garanhões da Raça Crioulos no período da peri-puberdade.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O Cavalo Crioulo

O Cavalo Crioulo tem como origem os cavalos espanhóis trazidos em 1493, às terras americanas, para a ilha La Española, hoje São Domingos, e são os antepassados diretos de todos os cavalos "crioulos" americanos. Após a introdução do cavalo nas Américas, sucessivas expedições como as de Pedro de Mendonza (1535) e Alvar Núñez Cabeza de Vaca (1541) introduzem cavalos diretamente da Espanha, no Rio da Prata e no Paraguai, além de outras regiões (MANUAL DO CRIADOR DA ABCCC, 2000).

Por séculos, estes animais sofreram seleção natural de adaptação ao meio do continente americano (AFFONSO & CORREA, 1992), dando aos cavalos espanhóis trazidos à América características próprias de rusticidade e resistência (SOLANET, 1946).

O cavalo Crioulo destaca-se entre as demais raças por enfrentar adversidades climáticas e manter-se em campos nativos pobres devido à pouca exigência alimentar (PONS, 1993). A rusticidade desta raça vem do longo processo de seleção natural ao qual foi submetido, dando a ele particularidades únicas e próprias de adaptação ao meio ambiente sul americano.

A raça Crioula é bastante expandida em diversos países da América do Sul, dentre eles Brasil, Argentina, Uruguai, Chile e Paraguai, sendo notável o crescimento da raça, visível pela extensão do mercado e investimento financeiro por parte de criadores nos últimos tempos.

A organização do registro genealógico da raça inicia-se, no Rio Grande do Sul, em 1932, com o registro dos primeiros animais. Atualmente, estão presentes em praticamente todos os estados brasileiros, sendo até hoje o Rio Grande do Sul o Estado com o maior número de equinos da raça no país. Com base nos dados de Dezembro de 2011, o relatório populacional da raça, emitido pela ABCCC, informa que estão registrados 363.476 animais sendo destes 198.322 fêmeas e 165.154 machos, dos quais 121.371 são registrados como machos não castrados. (SETOR DE REGISTROS GENEALÓGICOS DA ABCCC, 2011).

Com o crescimento da criação comercial de cavalos Crioulos, a seleção da raça tornou-se dirigida para desempenho atlético e conformação, podendo ter trazido alterações nos aspectos ligados à reprodução de machos e fêmeas da raça Crioula.

Diversos trabalhos vêm abordando assuntos relacionados à reprodução da fêmea Crioula, porém poucos estudos foram realizados para a avaliação da fertilidade de garanhões da raça Crioula, ficando implícita a necessidade de mais pesquisas sobre os aspectos reprodutivos destes animais.

2.2 Puberdade

Na maioria das espécies, inclusive na eqüina, o significado de puberdade tem se mostrado difícil de ser definido. A puberdade é o período de vida em que ocorre o início da capacidade reprodutiva, sendo caracterizada pelo desenvolvimento dos órgãos sexuais e aparecimento das características sexuais secundárias (ANDERSON et al.,1998), sendo atingida quando o animal, macho ou fêmea, se torna capaz de liberar gametas e de manifestar seqüências de comportamento sexual completo (GARNER & HAFEZ, 2004). Conforme descrito por Allen et al. (1982) no macho a puberdade é definida como o momento em que espermatozoides maduros aparece no ejaculado em animais jovens. Entretanto este evento não necessariamente coincide com a maturação das funções endócrinas dos testículos (maturação sexual).

Em machos equinos a fase infantil perdura em torno de seis meses, para então ocorrerem mudanças que envolvem o período da pré-puberdade e puberdade (AMANN, 2011). Pouco se sabe a respeito dos quesitos que determinam o início da puberdade em garanhões. Idade, peso corporal, fotoperíodo e nutrição são citados como fatores determinantes, porém não de forma isolada mas sim de forma interativa (JOHNSON et al., 1991; HOLYOAK et al.,1994). Foi estabelecido que um mínimo de idade e peso corporal seriam necessários para o aparecimento da puberdade. Entretanto, outros fatores, como taxa de crescimento, composição corporal e fatores metabólicos podem também apresentar um efeito estimulatório ou inibitório no aparecimento da puberdade (KIRKWOOD & AHERNE, 1985).

A puberdade no macho não pode ser determinada com a mesma precisão das fêmeas, pois representa um somatório de processos e não só um evento isolado. Foi definida como o momento em que os testículos se tornam ativos para produção de

testosterona, com valores superiores a 0,5 ng/mL e com a capacidade de produzir 50×10^6 espermatozóides por ejaculado e com mais de 10% de motilidade (WOLF et al., 1965, NADEN et al., 1990). Para Naden et al. (1990) a testosterona não pode ser detectada até as 32 semanas de idade, sendo seu aumento evidenciado entre as 75 e 80 semanas de vida, com o início da puberdade às 83 semanas de idade. Hormônios esteróides aumentam em torno dos 15 meses de idade, porém poucos espermatozóides são produzidos neste período. A capacidade reprodutiva cresce quando a produção de testosterona estiver estabelecida, sendo a maturidade sexual ou eficiência reprodutiva máxima atingida entre os dois e quatro anos de idade (AMANN, 1993).

A qualidade seminal também foi utilizada para determinar a idade à puberdade em garanhões Quarto de Milha. Foi estabelecido que este evento ocorre aproximadamente às 83 semanas de idade (NADEN et al., 1990). Através das características seminais, em Welsh pôneis a puberdade sucede entre os 12 e 23 meses de idade (SKINNER & BOWEN, 1968). Para garanhões nascidos na primavera, nenhum espermatozóide foi evidenciado no ejaculado antes dos 16 meses de idade, embora espermatozóides epididimários tenham sido encontrados (WESSON & GINTHER, 1981). Johnson et al. (1991) confirmaram a presença de poucas células espermáticas no ejaculado de garanhões aos 14 meses de idade. Estudando as características seminais e comportamento sexual em equinos da raça Caspian foi determinado que a puberdade incide aos 24,6 meses de idade, com uma variação de 18 a 34 meses (DORDARI et al, 2006).

Segundo Steiner e Umphenour (2009), os garanhões atingem a puberdade entre os 12 e 24 meses de idade. No entanto, aumentam sua capacidade reprodutiva até os cinco a seis ou mais anos de idade. Para Johnson et al. (1991), o garanhão atinge a maturidade sexual dois a quatro anos após a puberdade.

Em 2001, Argo et al., estudaram mudanças sazonais e atividade sexual de pôneis no período da peri-puberdade avaliando idade, época do ano, dosagens hormonais e biópsias testiculares determinando que a puberdade ocorre entre os 17 e 19 meses de idade. Ainda avaliando a influência da sazonalidade no aparecimento da puberdade em equinos foi verificado que a puberdade ocorre na segunda primavera de vida dos animais, aproximadamente entre os 12 e 15 meses de idade (WESSON & GINTHER, 1981).

Pesquisadores não chegaram a consenso algum em relação ao início da puberdade em potros, inclusive da raça Crioula, principalmente devido às diversidades

de raças existentes, diferentes protocolos experimentais, manejo e técnicas de avaliações utilizadas nos diversos estudos.

2.3 Função testicular

O testículo é um órgão que possui duas funções primordiais: Uma exócrina, a espermatogênese, e outra endócrina, com a produção de hormônios importantes para a espermatogênese, diferenciação sexual, desenvolvimento das características sexuais secundárias e para a libido (AMANN, 2011).

O parênquima testicular ocupa entre 80 e 90% da massa testicular no cavalo adulto e 70% do parênquima testicular é ocupado pelos túbulos seminíferos (VARNER & JOHNSON, 2007). O tamanho e o volume testicular são medidas diretas da quantidade do parênquima testicular presente, que por sua vez determina o potencial da produção espermática (THOMPSON et al.1979). A porção intertubular é composta por células de Leydig, fibroblastos, linfócitos, mastócitos, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e tecido conjuntivo (NEVES, 2002, COSTA & PAULA, 2003, VARNER & JOHNSON, 2007).

As células de Sertoli são as únicas células somáticas presentes nos túbulos seminíferos e fornecem suporte morfológico, nutricional e hormonal às células germinativas (BARDIN et al., 1994). A complexa ligação entre as células de Sertoli forma uma barreira hematotesticular garantindo uma região protegida para o desenvolvimento das células germinativas (AMANN, 1993), promovendo a compartimentalização do epitélio seminífero (NEVES, 2002), espermição das espermátides, movimento das linhagens jovens, fagocitose das células germinativas degeneradas e corpos residuais além de secreção de fluido luminal e comunicação intercelular (DYM E MADHWA RAJ, 1977).

As células peritubulares mióides constituem o principal componente da parede dos túbulos seminíferos e provavelmente participam de maneira bastante ativa da regulação parácrina da função testicular. Essas células, juntamente com as células de Sertoli, são responsáveis pela formação da lâmina basal (DYM, 1994; SKINNER, 2005).

Nos mamíferos, os testículos evoluíram como um elaborado sistema de comunicação intercelular, para eficientemente coordenar os diferentes compartimentos

(intersticial e intratubular) e seus componentes celulares, assegurando assim uma espermatogênese ordenada. Embora a regulação endócrina dos testículos seja importante para assegurar que o processo reprodutivo seja sincronizado com os eventos fisiológicos, tais como puberdade, está associado a um processo ainda maior, envolvendo meio ambiente, estação do ano e nutrição. Está cada vez mais evidente a existência de um controle local parácrino-autócrino que modula a intrincada rede de interações intercelulares nos testículos (SPITERI-GRECH & NIESCHLAG, 1993, ROSER, 2008).

Fatores parácrinos-autócrinos da função testicular foram introduzidos na literatura somente na década passada. Estes fatores têm sido caracterizados como moduladores locais da função celular, secretados por um tipo de célula para atuarem em outro tipo celular (parácrino) ou retornarem para agirem na própria célula que os secretaram (autócrino) (ROSER, 2008). Os mecanismos de controle parácrino-autócrino coordenam várias funções de diferentes tipos celulares no testículo ou modulam a ação das gonadotrofinas (FSH e LH) nos testículos, de acordo com as condições e exigências locais (ROSER, 2001).

Esteróides, proteínas e peptídeos têm sido identificados como substâncias produzidas e secretadas por diferentes tipos de células testiculares (ROSER, 2001). Muitos reguladores parácrinos-autócrinos em potencial da função testicular e da espermatogênese foram comprovados, como testosterona, inibina, ativina, fatores de crescimento, transferrina, entre outros; porém, os mecanismos pelos quais tais fatores agem no testículo do garanhão ainda não foram elucidados (ROSER, 2001, ROSER, 2008).

2.4 Controle endócrino

O FSH tem importância crítica na iniciação e expansão da espermatogênese nos mamíferos durante a puberdade; porém sua função na espermatogênese em adultos não está bem clara (SHARPE, 1994).

As células de Leydig são bastante conhecidas por sua marcante produção de esteróides, os quais são sintetizados a partir de uma molécula base, o colesterol (BARDIN, 1996). Esta produção ocorre através de estímulos do LH (hormônio luteinizante) em receptores localizados na membrana citoplasmática destas células. À

semelhança do FSH, o LH é uma glicoproteína sintetizada e secretada na adenohipófise sob a influência do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) proveniente do hipotálamo. O controle de retroalimentação negativa do LH é exercido tanto pela testosterona quanto pelo estrógeno concomitantemente na adenohipófise e hipotálamo (SHUPNIK & SCHREIHOFFER, 1997; ROCHIRA et al., 2006). Nos testículos, existem receptores para andrógenos nas células de Sertoli, peritubulares mióides, musculares lisas dos vasos e na própria célula de Leydig (SCHLATT et al., 1997; SUÁREZ-QUIAN et al., 1998; DE GENDT et al., 2004). Dentre os andrógenos sintetizados pelas células de Leydig incluem-se a testosterona e a dihidrotestosterona, os quais são responsáveis pela diferenciação do trato genital masculino, da genitália externa na fase fetal (PELLINIEMI et al., 1996; WU et al., 2007), e pelo aparecimento dos caracteres sexuais secundários e manutenção quantitativa da espermatogênese a partir da puberdade (SHARPE, 1994; ZIRKIN et al., 1994; DE GENDT et al., 2004; WU et al., 2007). Particularmente, a dihidrotestosterona é também responsável pela manutenção funcional das glândulas sexuais acessórias e do epidídimo (FAN & ROBAIRE, 1998; GOYAL et al., 1999).

A testosterona é o principal hormônio masculino que controla a espermatogênese, libido e as características sexuais secundárias e aumenta progressivamente, desde níveis muito baixos no animal pré-púbere até níveis elevados no adulto, em resposta à secreção de gonadotrofinas, (GARNER & HAFEZ, 2004). A concentração sérica de testosterona $\geq 0,5$ ng/mL é marcadora do início da puberdade, provocando, à medida que a idade avança uma melhoria nas características físicas do sêmen até a maturidade sexual (NADEN et al. 1990).

De acordo com Zirkin et al. (1994), em quase todos os mamíferos, a testosterona sozinha é capaz de manter qualitativamente a espermatogênese completa, enquanto que o FSH influencia a quantidade de espermatozóides produzidos. Entretanto, o aumento dos dados referentes à participação do estrógeno na reprodução masculina e seu potencial na modulação parácrina-autócrina da espermatogênese sugerem um evento muito mais complexo, principalmente em eqüinos, onde o estrógeno em machos é produzido em quantidades atipicamente altas (THOMPSON et al., 1979, RAESIDE, 1979, AMANN, 1993).

O início do período pré-puberal é marcado por transformações no eixo hipotalâmico-hipofisário e resulta em aumento nas quantidades da secreção de LH e FSH entre as 32 e 40 semanas (10 meses). Foi verificado que a elevação na secreção de

LH foi resultado do aumento da frequência do pulso de LH, em touros (AMANN & WALKER, 1983) e em carneiros (FOSTER et al, 1978). Um padrão similar na frequência da secreção do LH deve ocorrer em potros no período prepuperal (NADEN et al., 1990). Amann & Walker (1983) postulam que altas concentrações de LH no período pré-puperal induzem a diferenciação das células de Leydig possibilitando a secreção de testosterona necessária para a função da célula de Sertoli e estabelecimento da espermatogênese.

As concentrações de LH e FSH baixam depois das 40 semanas (10 meses), presumivelmente devido ao efeito da retroalimentação negativa da testosterona na hipófise e hipotálamo. As concentrações de FSH voltam a crescer novamente as 64 semanas (16 meses), mas os valores de LH permanecem baixos até às 80 semanas (20 meses). As secreções de LH e FSH parecem ser controladas diferentemente, nesta idade (NADEN ET AL., 1990).

As concentrações de testosterona começam a aumentar de forma rápida depois das 72 semanas de idade (18 meses). O que coincide com a média de idade na qual a espermatogênese tem início nas 83 semanas de idade (20,75 meses) (NADEN et al., 1990).

A liberação de espermatozoides dos túbulos seminíferos que acontece na puberdade marca o final do período pré-puberal. Esta fase é também caracterizada pelo rápido crescimento linear do testículo (NADEN et al., 1990).

2.5 Espermatogênese

A espermatogênese é um processo cíclico altamente organizado que ocorre nos túbulos seminíferos onde células diplóides (espermatogônias) se diferenciam numa célula haplóide madura (espermatozoide). Estes túbulos, na espécie eqüina, apresentam um comprimento médio de 2.419 metros em cada testículo e são compostos por células germinativas em diferentes graus de desenvolvimento, intercaladas e sustentadas por células de Sertoli, que se fixam na membrana basal e se estendem até o lúmen (VARNER & JOHNSON, 2007).

O processo espermatogênico, composto por diferentes associações celulares, é um dos mais produtivos sistemas de auto-renovação do organismo animal, com duração de 30 a 78 dias nos mamíferos já investigados (FRANÇA & RUSSEL, 1998). No

garanhão leva 57 dias (JOHNSON, 1991, JOHNSON & NEAVES, 1981) e é controlado através de mensageiros que atuam através de rotas endócrinas parácrinas e autócrinas (JOHNSON & THOMPSON, 1983; JOHNSON & NGUYEN, 1986; JOHNSON et al., 1986; JOHNSON & THOMPSON, 1986; JOHNSON & TATUM, 1989)

Embora o processo espermatogênico seja essencialmente o mesmo em todos os mamíferos, existem características específicas entre as diferentes espécies. Estas particularidades estão relacionadas com o número de gerações espermatogoniais e as características morfológicas das células germinativas presentes nas várias fases do processo espermatogênico, principalmente nas espermatídes alongadas. Nos túbulos seminíferos de animais sexualmente maduros, as células espermatogênicas não estão arranjadas ao acaso e sim em associações celulares distintas denominadas de estádios, ordenados de modo espécie-específico (FRANÇA et al., 2000; FRANÇA et al., 2005).

O processo espermatogênico se divide em três fases: a espermatocitogênese (fase de proliferação), a meiose (fase de multiplicação) e a espermiogênese (fase de diferenciação). Durante a espermatocitogênese (fase de proliferação), as células germinativas mais jovens, as espermatogônias, se dividem em cinco gerações celulares (A1, A2, A3, B1 e B2). Durante esta fase parte do citoplasma dessas células continua unido, formando as pontes intercelulares que são importantes por permitir a comunicação direta entre as células irmãs, garantindo o desenvolvimento sincronizado desta linhagem celular (JOHNSON et al., 1997, NEVES 2002). O número estimado de gerações de espermatogônias varia de quatro a seis, na maior parte das espécies estudadas (JOHNSON et al., 1997). Em touros, carneiros e no cão são seis gerações. No cavalo são cinco (JOHNSON et al., 1978; FRANÇA & RUSSEL, 1998).

Após a última divisão espermatogonial, estas passam a se chamar de espermatócitos; os da primeira divisão meiótica são os espermatócitos primários e os da segunda são os espermatócitos secundários (COSTA & PAULA, 2003). Os espermatócitos primários em pré-leptóteno têm seu número semelhante aos da espermatogônia B2. Logo após, eles vão para a fase de leptóteno e, sequencialmente, zigóteno, onde ocorre o pareamento dos cromossomos homólogos. Logo após, os cromossomos compactam-se e entram na fase de paquíteno, sequencialmente, de diplóteno onde eles se separam parcialmente. O núcleo, agora, passa pela metáfase, anáfase e telófase da primeira divisão meiótica para produzir os espermatócitos secundários, que apresentam os núcleos menores que os do espermatócito primário em paquíteno e, sem que ocorra duplicação de DNA (CLERMONT, 1972).

Após a segunda divisão meiótica, os espermátocitos secundários dividem-se e passam a ser denominados espermátides arredondadas; aqui a espermiogênese tem início com o processo de diferenciação celular, até a formação dos espermatozóides (JOHNSON et al., 1997).

Já na espermiogênese (fase de diferenciação) as espermátides arredondadas sofrem uma transformação severa com compactação da cromatina, formação do flagelo, do acrossoma e perde citoplasma para, então, serem liberadas no lúmen do túbulo seminífero como espermatozóides, processo ao qual é dado o nome de espermição. Durante esta fase a célula, o espermatozóide, fica mais vulnerável a defeitos estruturais e genéticos (AMANN, 1993, KERR et al., 2006).

Mesmo os espermatozóides chegando ao lúmen dos túbulos seminíferos, estes ainda precisam sofrer o processo de maturação espermática no epidídimo e de capacitação no trato genital feminino para se tornarem aptos à fertilização (COSTA e PAULA, 2003).

2.6 Biometria testicular

Existem diversos estudos relacionados às medidas de tamanho e peso testiculares em garanhões adultos (JOHNSON et al, 1994; PARLEVLIET et al, 1994; BLANCHARD et al., 2001), porém as referências para comparação de parâmetros testiculares em garanhões jovens, com menos de três anos de idade são escassas.

Em machos adultos, a biometria testicular tem como principais finalidades diagnosticar alterações testiculares, auxiliar na predição do potencial reprodutivo e da produção espermática diária. Devido à disposição horizontal dos testículos no escroto do garanhão, o perímetro escrotal não é realizado, porém variantes da técnica, como a largura escrotal total e o comprimento, são medidas utilizadas (VARNER et al., 1991).

A produção espermática diária é considerada como sendo o número total de espermatozóides produzidos diariamente pelos testículos. O número de espermatozóides que um animal é capaz de produzir depende da quantidade de tecido funcional presente nos testículos, sendo o tamanho testicular um importante fator a ser considerado na seleção de reprodutores quanto à sua máxima eficiência reprodutiva. Medidas testiculares podem ser utilizadas para estimar a produção espermática e assim identificar garanhões de alto e baixo potencial produtivo. (SQUIRES & PICKETT, 2011).

A utilização da medida de largura escrotal total é uma aplicação útil pra predizer a produção espermática diária de um garanhão, havendo um coeficiente de correlação entre largura escrotal total e peso do parênquima testicular de $r=0.83$, e entre largura escrotal total e produção espermática diária de $r=0.75$ (THOMPSON et al. 1979).

Diversos estudos foram conduzidos no intuito de determinar uma relação entre idade do animal e dimensões testiculares. Thompson et al. (1979) verificaram esta relação em 48 garanhões entre dois e 16 anos e determinaram que o tamanho testicular é afetado pela idade do animal, sendo os testículos dos garanhões com uma idade igual ou superior a sete anos maiores que os dos animais mais jovens.

Um pequeno crescimento testicular foi verificado desde o nascimento até o 10^o mês de vida, um lento aumento do 11^o ao 16^o mês e rápido crescimento após o 17^o mês de idade (NISHIKAWA, 1959). Para Roser (2000) o crescimento e desenvolvimento testicular máximo não ocorrem somente no período da puberdade (12-18 meses), mas sim, é caracterizado por um processo longo que continua até que o animal atinja quatro a cinco anos de idade.

Existe uma grande variação em relação ao tamanho e peso testicular de garanhões após a puberdade (AMANN, 2011). Entretanto, diversos fatores, entre eles raça, peso corporal, idade do animal e estação do ano podem afetar significativamente o peso e as medidas testiculares. Quanto a variações raciais em relação ao peso testicular foram verificados valores de 70 a 80g, em oito diferentes raças com idade média de três anos (BLANCHARD et al. 2001), de 103,0g na raça Quarto de Milha aos dois anos de idade (NADEN et al., 1990) e na raça Crioula com idade média de 48 meses, o peso testicular foi de 162,9g (FIGUERÓ, 2010).

Utilizando a largura escrotal total para estimar o volume testicular e predizer a produção espermática diária foi verificado que garanhões com largura escrotal total inferior a 8 cm não apresentam espermogramas dentro dos padrões considerados satisfatórios, devido ao baixo potencial para produção espermática diária (PICKETT et al., 1993), sendo a concentração espermática fortemente influenciada pelo intervalo entre ejaculações, tamanho testicular e idade do animal (AMANN et al., 1979). Existem evidências que o volume testicular para pôneis, é inferior ao dos garanhões de grande porte (METCALF et al., 1997).

Parlevliet et al. (1994) não verificaram nenhuma diferença significativa entre os testículos direito e esquerdo, para medidas de biometria testicular em reprodutores com idade média de 34 meses. Da mesma forma, em estudo na raça Quarto de Milha não foi

observada diferença nas medições e pesos entre testículo esquerdo e direito (NADEN et al., 1990).

2.7 Epidídimo

2.7.1 Função epididimária

O epidídimo, da palavra grega “epi” (dentro) e didymoi (germinativo ou testículo), é um órgão alongado, monotubular e enrolado em espiral, localizado na superfície do testículo, que transporta os espermatozóides dos vasos eferentes para os vasos deferentes (SULLIVAN et al., 2005). No garanhão, o epidídimo apresenta um comprimento aproximado de 70 m (NICKEL et al., 1979) e assim como em outros mamíferos pode ser dividido em regiões anatômicas denominadas de cabeça, corpo e cauda.

Em equinos, a duração do trânsito epididimário apresenta uma variação de cinco a 14 dias (FRANÇA et al. 2005) e o deslocamento espermático, ao longo do epidídimo, se dá inicialmente através de contrações peristálticas da musculatura lisa da parede da cabeça e cauda do epidídimo.

Sob condições normais, a aquisição da capacidade de fecundação essencialmente se completa quando os espermatozóides chegam na parte proximal da cauda do epidídimo (ROBAIRE et al., 2006). A obtenção da habilidade de fertilização durante o trânsito epididimário define o conceito de maturação espermática.

O segmento inicial e intermediário do epidídimo, denominados de cabeça e corpo, estão envolvidos na maturação espermática (CLOVER & NICANDER, 1971), enquanto a porção terminal, também chamada de cauda, apresenta a função de estocagem dos espermatozóides férteis antes da ejaculação. O processo de maturação dos espermatozóides depende de uma seqüência de modificações espermáticas resultantes da interação da superfície do espermatozóide com diferentes fluídos intraluminais (RODRIGUEZ et al., 2001), envolvendo mudanças morfológicas e bioquímicas da membrana plasmática em resposta das secreções epididimárias e diversas proteínas que contém.

Durante o período de estocagem, a cauda do epidídimo é capaz de acumular espermatozóides suficientes para o momento da ejaculação. Em touros e garanhões o número de espermatozóides armazenados na cauda do epidídimo pode ser suficiente

para até 10 ejaculados sucessivos dependendo da idade, tamanho e atividade reprodutiva do animal (BEDFORD,1994; SULLIVAN et al., 2007). Baseado em estudos de Amann et al. (1979), em touros e garanhões, em torno de 50 a 60% dos espermatozóides da cauda do epidídimo e ducto deferente, em machos sexualmente inativos, podem ser removidos com cinco a 20 ejaculações consecutivas. Em adultos, o número de espermatozóides epididimários, na cabeça e no corpo, é similar nos animais em repouso sexual e em animais com ejaculações diárias. Entretanto, o número de espermatozóides presentes na cauda do epidídimo é mais baixo em animais com ejaculações regulares, quando comparado com aqueles em repouso sexual (AMANN et al, 1976).

2.7.2 Espermatozóides epididimários

A coleta de espermatozóides epididimários é realizada em geral para a recuperação e criopreservação do sêmen de garanhões de alto valor genético em casos de morte ou lesões graves (MONTEIRO et al., 2009). Entretanto, para fins científicos, a presença de células espermáticas no lavado epididimário pode ser um dado complementar para prever o grau de desenvolvimento sexual do animal.

Em geral, os espermatozóides são coletados da cauda do epidídimo e de acordo com Amann et al. (1979), é estimado que este local, junto com o ductos deferente, representam o maior reservatório espermático extragonadal. Do número total de espermatozóides estocados, aproximadamente 61% se localizam na cauda epididimária. A coleta dos espermatozóides da cauda do epidídimo após orquiectomia pode ser realizada através de três técnicas: Método de perfuração (BARTELS et al., 2000), fluxo retrógrado na cauda do epidídimo e método de flutuação (BRUEMMER, 2006).

A busca de células espermáticas epididimárias em animais jovens aplica-se para o prognóstico do nível de desenvolvimento sexual do animal. Em equinos Quarto de Milha, aos dois anos de idade, foi encontrada a concentração de $6,49 \times 10^9$ espermatozoides totais por epidídimo (NADEN et al., 1990), sendo estes valores considerados inferiores aos dados em animais de cinco a nove anos de idade, encontrados por outros pesquisadores (AMANN et al., 1979).

Wesson e Ginther (1981) avaliaram a presença de espermatozóides epididimários, no intuito de determinar o período da puberdade em pôneis. Nenhum espermatozóide foi evidenciado no ejaculado de garanhões nascidos na primavera antes

dos 16 meses de idade, embora espermatozóides epididimários tenham sido encontrados. Os autores concluíram que a puberdade ocorreu aproximadamente entre os 12 e 15 meses de idade.

Entretanto, não há estudos quanto à presença de espermatozóides epididimários em equinos da raça Crioula no período da peri-puberdade.

3 ARTIGO

Peri-puberty in male horses: testicular development, histology of the seminiferous epithelium and epididymal sperm

Peri-Pubertät beim männlichen Pferd: Hodenentwicklung, Histologie des Keimepithels und Nebenhoden Spermien

Joana Weber Gregory^{1,2}, Anamaria Telles Esmeraldino³, Daniel Vianna Luz¹, Lucas Brunelli de Moraes⁴, Concepta McManus⁵, Ricardo Macedo Gregory¹, Rodrigo Costa Mattos¹ and Maria Inês Mascarenhas Jobim²

REPROLAB, Veterinary Faculty, Federal University of Rio Grande do Sul (Brazil)¹, Laboratory of Semen and Protein Technology Related to Animal Reproduction, Veterinary Faculty, Federal University of Rio Grande do Sul (Brazil)², Veterinary Faculty, Lutheran University of Brazil (Brazil)³, Institute for Veterinary Research, Animal Health, State Foundation of Agricultural Research (Brazil)⁴, Animal Production Department, Federal University of Rio Grande do Sul (Brazil)⁵

Summary

The objectives of this study were to characterize age-associated changes in testicular size and blood concentrations of testosterone, as well as to evaluate the presence of epididymal sperm. Testicular maturity was evaluated by measuring seminiferous tubule diameter and the presence of the most advanced germ cells in seminiferous epithelium of horses in the peri-puberty period. The animals were surgically castrated and the thorax circumference was taken to estimate body weight. Thirty four male horses were grouped into four categories: Group I (GI) with four foals aged up to 14 months; Group II (GII) with seven animals over 14 months and less than 17 months; The third group (GIII) included 14 animals over 17 months and less than 19 months; Group (GIV) was composed of nine horses over 19 months and under 34 months of age. After castration, testes were weighed and measured. A segment was collected for subsequent histological evaluation, including measurement of the diameter of seminiferous tubules and the presence of germ cells of the seminiferous epithelium at different stages of development. A blood sample was collected to determine plasma testosterone. The average body weight of the animals increased significantly from 232 kg in GI to 321 kg for horses in GIV. There was no difference between measures from the right and left testes. The testicular weight and volume was greater in animals of GIV and differed significantly compared to younger animals. Plasma levels of testosterone did not differ between age groups. The diameter of seminiferous tubules increased from 89.13 µm in foals of GI to 168.24 µm in horses of GIV. On average, 17.5% of seminiferous tubules had no germ cells in animals from GI, decreasing to 5.4% in GII, 5.2% in GIII and 0.8% in GIV. The number of tubules containing mature spermatids and spermatozoa increased with age. Most significant variations in the increase of testicular volume and diameter of seminiferous tubules were associated with a high presence of spermatozoa in the tubules. In conclusion all animals with 20 months of age or more had reached puberty in the present study and the first spermatozoa appeared in 16 month old colts. All animals presented epididymal sperm when testicular volume and weight were over 16cm³ and 23g, respectively.

Keywords: puberty, horse, testes biometrics, epididymis, spermatogenesis, testosterone

Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es die alterbezogenen Veränderungen der Hodengrösse und des Testosteronspiegels im Blut zu beschreiben, als auch das Vorhandensein von Nebenhoden Spermien auszuwerten. Die Hodenreife wurde ausgewertet durch Ausmessen des Durchmessers der Samenkanäle und durch das Vorhandensein der am höchstentwickelten Keimzellen im Keimepithels von Hengsten in der Phase der Peri-Pubertät. Die Tiere wurden chirurgisch kastriert und der Umfang des Thorax wurde gemessen, um das Gewicht des Tieres zu schätzen. Vierunddreissig männliche Pferde wurden in vier Kategorien eingeteilt: Gruppe I (GI) mit vier Fohlen bis zu 14 Monaten; Gruppe II (GII) mit sieben Tieren die älter als 14 und jünger als 17 Monate waren; die dritte Gruppe (GIII) beinhaltete 14 Tiere im Alter zwischen 17 und 19 Monaten; Gruppe IV (GIV) bestand aus neun Pferden die älter als 19 und jünger als 34 Monate waren. Nach der Kastration wurden die Hoden gewogen und gemessen. Ein Teilstück wurde für anschliessende histologische Auswertungen einbehalten. Die Untersuchungen beinhalteten die Messung des Durchmessers der Samenkanäle und das Vorhandensein von Keimzellen im Keimepithel zu unterschiedlichen Entwicklungsstadien. Eine Blutprobe wurde gesammelt, um Plasma Testosteron zu ermitteln. Das durchschnittliche Körpergewicht der Tiere stieg von 232 kg in GI auf 321 kg bei Hengsten in GIV. Es gab kein Unterschied in den Massnahmen zwischen dem rechten und dem linken Hoden. Das Gewicht des Hodens and Volumen war bei Tieren in GIV höher und der Unterschied war signifikant im Vergleich zu den jüngeren Tieren. Die Testosteron Konzentration unterschied sich nicht zwischen den Altersgruppen. Der Durchmesser des Samenkanals stieg an von 89.13 μm bei Fohlen in GI auf 168.24 μm bei Hengsten in GIV. Im Durchschnitt hatten 17.5% der Samenkanäle der Tiere in GI keine Keimzellen, dieser Wert fiel auf 5.4% in GII, 5.2% in GIII und 0.8% in GIV. Die Anzahl der Kanäle die reife Spermatozoen enthielten, stieg mit zunehmendem Alter an. Die wesentliche Abweichung des Hodenvolumens und Durchmesser der Samenkanäle hingen mit dem hohen Vorhandensein an Spermatozoen in den Kanälen zusammen. Alle Tiere mit 20 Monaten oder mehr erreichten die Pubertät und die ersten Spermatozoen erschienen in 16 Monat alten Fohlen. Mit einer Hoden Grösse und Gewicht über 16cm³ und 23g, jeweilig, alle Tiere zeigten Nebenhoden Spermatozoen.

Schlüsselwörter: Pubertät, Hengst, Hoden Biometrie, Nebenhoden, Spermatogenese, Testosterone

Introduction

Age related changes in reproduction of male horses have been described in several reports. Spermatozoa in testes were detected one year after birth and the animals take approximately two years to attain sexual maturation (Swiestra et al. 1974). The influence of age on testicular size, hormone concentration and puberty has already been studied in horses. Mean age at puberty based on semen characteristics is 21 months, ranging from 14 to 24 months (Naden et al. 1990). Based on the presence of spermatozoa in the epididymis, the puberty is reached between 12 and 16 months (Wesson and Ginther 1981).

Morphometric analysis on some parameters, such as the number of Leydig and Sertoli cells, and sperm production has also been reported (Jonhson et al. 1997, Neves et al. 2002, Remiezowicz et al., 2008, Figueiró 2010). The number of Leydig cells per testicular weight increases during the breeding season (Johnson and Thompson 1987, Jonhson 1997). Daily sperm production shows the same tendency (Johnson and Thompson 1987, Squires and Pickett 2011). A positive correlation between daily sperm output and testicular volume has been demonstrated (Pickett et al. 1987, Love et al 1991, Quartuccio et al. 2011).

Testicular size is an important factor in selecting and managing the stallion for maximum reproductive efficiency (Squires and Pickett 2011). Otherwise, there is little information of the testicular morphology in horses during peri-puberal development. Studies involving the reproductive characteristics of horses suggest that the influence of breed is significant (Dowsett and Pattie 1982, Voss et al 1982, Dowsett and Pattie 1987,

Neves et al. 2005). However, there is no data on testicular development on colts of the breed before and after puberty. Knowledge of the normal progression of events before and after puberty is necessary if further research is to be conducted on puberty of this breed.

The objective of this study was to determine if testis biometrics, histology, epididimal spermatozoa and plasmatic testosterone concentrations are related to qualitative aspects of spermatogenesis in different age groups.

Materials and Methods

Animals

Data were collected during the summer season (January and March) in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. The location of the study was at 30° 16' 57" latitude south and 55° 53' 47" longitude west at 145 meters above sea level. The horses were fed exclusively on natural pasture without any supplementation.

Thirty four colts were divided into 4 age groups as follow: GI (n=4) 12 to 14 months old; GII (n=7) 14.1 to 17 months old, GIII (n=14) 17.1 to 19 months old and GIV (n=9) 19.1 to 34 months old.

The body condition was evaluated, including only animals with conditions equal or more than 3 (1-5). The thorax circumference was measured to estimate the body weight of the animals.

Testicular size

All animals were weighed. Testes of all horses were surgically removed by a veterinarian using approved animal care practices. Immediately after castration, testicles were separated from the epididymys, weighed, and the length, width and height measured. Testicular volume was determined according to Love et al. (1991): $\frac{4}{3} \pi$ (height/2 x width/2 x length/2).

Spermatozoa from epididimys

The epididimys were dissected from the testis. The tail and ductus deferens were isolated and spermatozoa were collected using the retrograde flush technique according to Bruemmer (2006), using 5mL of PBS buffer (pH 7.2). The samples were centrifuged at 1500 xg for 15 minutes to obtain the spermatozoa from the flush of the epididimys. The resulting pellet was transferred to cryovials for storage at -80°C for subsequent laboratory analysis. The presence of spermatozoa from the epididimys tail was analyzed under a light microscope (400X). According Wesson & Ginther (1981), animals were considered in puberty when spermatozoa were found in the flush.

Histological analysis

For histological examination, testicular samples from the 34 horses of different ages were taken with the tunica albuginea, after transversal section. Testicular samples were fixed in 10% phosphate buffered formalin. Samples were dehydrated using alcohol solutions and finally included in paraffin. Sections of 5 μm slices were stained with

hematoxylin-eosin (HE). Methods for evaluation of cell counts and seminiferous tubules were conducted according to procedures previously published (Abercrombie 1946, Moura and Erickson 2001).

To estimate the degree of seminiferous tubule development, 40 tubule cross sections from one testicle were evaluated based on the most advanced germ cell type (Aguilar et al. 2006) and registered in one of the following categories: tubules without germ cells, tubules with spermatogonia, spermatocytes, round spermatids, elongate/mature spermatids and spermatozoa in the lumen.

Seminiferous tubule diameters were examined under a conventional light microscope (Olympus CX40, Tokyo, Japan), using a 200X objective, coupled to a digital camera (Olympus C-7070, Tokyo, Japan) connected to a microcomputer. The seminiferous tubules diameters analysis was conducted using the biometric software Motic Images Plus 2.0. Measurements were made basically on 20 circular seminiferous tubules cross sections from each sample.

Testosterone measurements

Single blood samples were obtained immediately before the castration of the horses, placed on ice and returned to the laboratory. Plasma was separated by centrifugation and kept frozen at -20°C until assayed. The analysis of testosterone was carried out using the technique of immune-test of chemiluminescence (Immulite/Immulite 1000[®]) with values detected starting from 15 ng/dL. Mean intra-assay and inter-assay coefficients of

variations for testosterone were 13.0 and 16.4, respectively and the assay sensitivity was 0,1 ng/tube.

Statistical analyzes

Data were analysed using Statistical Analysis Software (SAS[®]). Analysis of variance (GLM – General Linear Model) was performed to compare (among age groups) the body weight, testicular measurements and weight, testosterone concentration, epididymal sperm, diameter of seminiferous tubules and spermatogenesis. Tukey post hoc test was used to locate differences and $P < 0.05$ was regarded as significant. Using the four age groups, Pearson's method was used to estimate the correlations among body weight, testis size and volume, germ cell types numbers, epididymal sperm, diameter of seminiferous tubules and hormone concentrations. Only correlations with P -values < 0.05 were considered as significant

Results

At the time of the castration, the average age and body weight of the animals in the four age groups were 13.2 ± 0.6 months and 232 ± 32.2 kg, 16.1 ± 0.1 months and 255 ± 28.7 kg, 17.8 ± 0.3 months and 261 ± 24.7 kg and 26.6 ± 5.4 months and 321 ± 35.5 kg, for GI – GIV respectively. Body weight did not differ between GI, GII and GIII ($P > 0.05$), but was higher for horses in GIV in compared to the other groups ($P < 0.001$).

Testicular volume and testicular weight increased ($P < 0.001$) in GI through the GIII and GIV, but there was no significant difference between testicular weight and testicular volume between GI and GII and between GII and GIII (**Fig.1**).

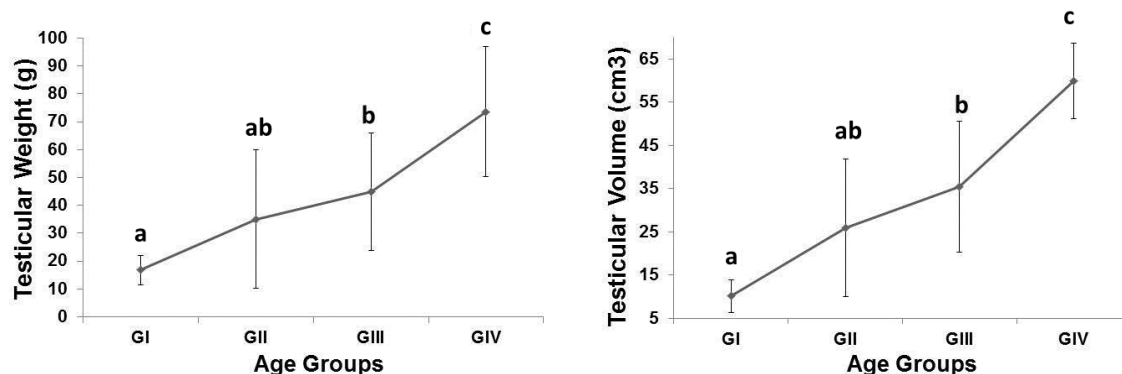


Fig. 1 Mean \pm S.E. Testicular weight and testicular volume of 34 Horses divided in four age groups. [a,b,c] different superscripts indicate statistical difference ($P < 0.05$).

Durchschnittswert \pm S.E. vom Hodengewicht und Hodenvolumen bei 34 Pferden, aufgeteilt in vier Altersgruppen. [a,b,c] Verschiedene obere Zeiger zeigen statistischen Unterschied an ($P < 0.05$).

Testicle biometry categorized by age groups is shown in Table 1. The analysis of mean testicular measurements for all groups showed no significant differences between the left and right testis (length $P = 0.09$, width $P = 0.08$ and height $P = 0.08$).

Table 1 Testicle biometry of horses in different age groups
Hoden Biometrie bei Hengsten in verschiedenen Altersgruppen

| Age Groups | Left testis | | | Right testis | | |
|------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| | Length (cm) (Mean ± SE) (Range) | Width (cm) (Mean ± SE) (Range) | Height (cm) (Mean ± SE) (Range) | Length (cm) (Mean ± SE) (Range) | Width (cm) (Mean ± SE) (Range) | Height (cm) (Mean ± SE) (Range) |
| G I (n=4) | 4.2 ± 0.5 ^a 3.5-4.7 | 2.0 ± 0.4 ^a 1.4-2.4 | 2.6 ± 0.3 ^a 2.5-2.9 | 4.2 ± 0.2 ^a 4.0-4.5 | 1.7 ± 0.3 ^a 1.2-1.9 | 2.4 ± 0.3 ^a 2.0-2.6 |
| G II (n=7) | 5.6 ± 1.3 ^{ab} 3.5-7.2 | 2.8 ± 0.9 ^b 1.6-3.8 | 3.3 ± 0.8 ^{ab} 1.9-4.0 | 4.9 ± 0.9 ^a 3.6-6.0 | 2.4 ± 0.7 ^{ab} 1.7-3.9 | 2.9 ± 0.7 ^a 1.9-3.9 |
| G III (n=14) | 6.1 ± 1.1 ^{bc} 4.0-8.0 | 3.1 ± 0.6 ^b 1.8-3.7 | 3.7 ± 0.6 ^{bc} 2.4-4.5 | 5.6 ± 1.2 ^{ab} 3.5-7.6 | 2.9 ± 0.6 ^{bc} 1.5-3.5 | 3.4 ± 0.7 ^{ab} 1.7-4.4 |
| G IV (n=9) | 7.5 ± 0.5 ^c 7.0-8.7 | 4.0 ± 0.3 ^c 3.6-4.7 | 4.4 ± 0.4 ^c 4.0-5.4 | 6.7 ± 0.9 ^b 4.9-7.6 | 3.4 ± 0.6 ^c 2.4-4.1 | 4.0 ± 0.7 ^b 2.7-4.8 |

a,b,c different superscripts in column indicate statistical difference ($P < 0.05$)

Testosterone concentrations were detectable in all animals and mean testosterone concentrations varied from 20 to 129 ng/dL. There was no significant effect of age group ($P=0.42$) or body weight ($P=0.51$).

The development of the seminiferous epithelium of horse as related to the most advanced germ cell type is shown in Table 2. A positive correlation ($R^2=0.38$, $P < 0.0001$) was observed between the growth of testicular volume and the increase of round spermatids. The raise of mature spermatids is related to the growth of testicular volume ($R^2=0.66$, $P=0.0212$), testicular weight ($R^2=0.76$, $P=0.0021$) and diameter of seminiferous tubules ($R^2=0.60$, $P < 0.0001$). Also, the increase of spermatozoa is related to the growth of testicular volume ($R^2=0.39$, $P=0.0183$) and diameter of seminiferous tubules ($R^2=0.47$, $P=0.0419$). The first spermatozoa in lumen of the seminiferous tubules appeared in 16 month old colts.

Table 2. Development of seminiferous epithelium of horse as related to the most advanced germ cell type (mean \pm standard error).
Entwicklung des Keimepithels bei Pferden bezogen auf den höchentwickelten Keimzelltyp (Durchschnitt \pm Standard deviation).

| Age Groups | Percentage of cross sections of seminiferous tubules with the most developed germ cell type (mean \pm standard error) | | | | | |
|-------------|---|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| | Tubules without germ cells | Tubules with Spermatogonia | Tubules with Spermatocytes | Tubules with Round spermatids | Tubules with Mature spermatids | Tubules with Spermatozoa |
| GI (n=4) | 17,5 \pm 4,7 ^a | 57,5 \pm 8,9 ^a | 22,5 \pm 11,2 ^a | 2,5 \pm 2,0 ^b | 0 | 0 |
| GII (n=7) | 5,4 \pm 3,6 ^{ab} | 28,9 \pm 6,8 ^{ab} | 40,7 \pm 4,3 ^a | 13,9 \pm 4,8 ^{ab} | 10,4 \pm 5,5 ^b | 0,4 \pm 0,4 ^b |
| GIII (n=14) | 5,2 \pm 5,5 ^{ab} | 13,6 \pm 8,9 ^b | 27,7 \pm 6,9 ^a | 21,4 \pm 5,7 ^a | 25,0 \pm 7,1 ^{ab} | 5,5 \pm 4,0 ^b |
| GIV (n=9) | 0,8 \pm 1,0 ^b | 8,9 \pm 6,1 ^b | 16,4 \pm 10 ^a | 12,8 \pm 3,4 ^{ab} | 36,4 \pm 8,2 ^a | 25,3 \pm 6,2 ^a |

a,b different superscripts in column indicate statistical difference ($P < 0.05$)

All animals of GIV had spermatozoa present in the epididymis. The first spermatozoa appeared in 16 month old colts. In GIII, twelve horses (85.7%) had sperm stored in epididymal tail, three animals (42.8%) of GII had spermatozoa present in the epididymis and in GI zero colts presented spermatozoa. These parameters were different between age groups ($P = 0.001$). With the exception of one horse which had high testicular volume and weight, but no spermatozoon, all animals presented epididymal sperm when testicular volume and weight were over 16 cm³ and 23 g, respectively.

In GI, the tubular diameter reached approximately 89.13 \pm 23.62 μ m, and increased to 168.24 \pm 28.08 μ m in GIV ($P = 0.0044$). In GII and GIII, the mean tubular diameter was 107.24 \pm 20.92 μ m and 150.20 \pm 39.56 μ m, respectively. The diameter of the seminiferous tubules showed the same pattern of growth of testicular height and length (**Fig. 2**).

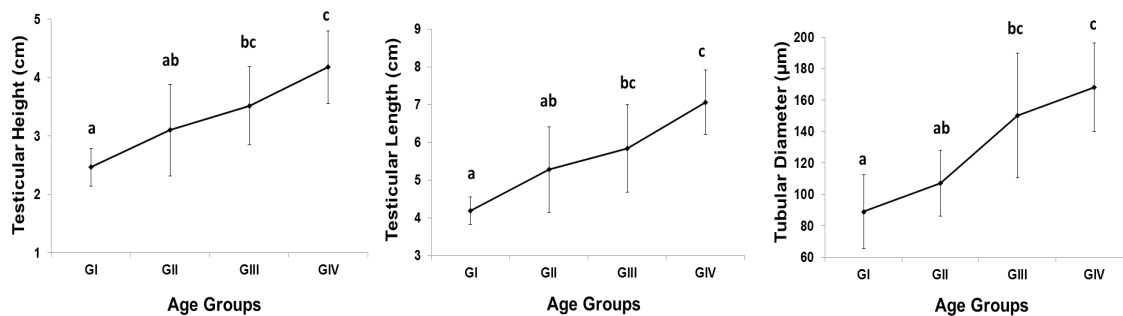


Fig 2 Diameter of seminiferous tubules, testicular height and length in Crioulo Horses. [a,b,c] different superscripts indicate statistical difference ($P < 0.05$). Durchmesser der Samenkanälchen, der Hodengröße und Hodenlänge bei Crioulo Pferden. [a,b,c] Verschiedene obere Zeiger zeigen statistischen Unterschied an ($P < 0.05$).

Discussion

Testes measurements were related to the appearance of more advanced germ cell types, suggesting that gonad volume and weight were mainly determined by percentage of these cells. As previously shown by Moura et al. (2011), as animal age and proliferation of germ cells increases, the number of these cells starts to affect testis weight. In GIV animals seminiferous tubules with large quantities of mature spermatids were found, but not in GI. These findings suggest that one year old horses were in inpuberal gonadal development (Johnson et al., 1991). From seventeen months of age a significant numbers of mature spermatids were identified in the seminiferous tubules. Based on this evidence, these can be considered near puberty and according Johnson (1995) the efficiency of spermatogenesis is related to the amount of germ cell degeneration, pubertal development, season of the year, and aging of humans and animals. In these study, with the exception of one horse, all animals presented epididymal sperm when testicular volume and weight were over 16 cm^3 and 23 g, respectively. No research was

found that relates testicular size and weight to the beginning of the sperm production and puberty.

As noted in previous reports, testicular weight and dimension vary significantly in sexually immature stallions (Johnson and Thompson 1983; Pickett et al. 1989; Naden et al. 1990 and Melo et al. 1998). Testicular volume, estimated by measurements, is correlated to sperm production (Johnson et al. 1994; Love et al. 1991 and Quartuccio et al. 2011) and small testicular size can be associated with reduced sperm production (Figueiró 2010). There was no difference ($P > 0.05$) between the left and right testis for any weight or size measurement in horses, which is in accordance with Parlevliet et al. (1994). However, Nishikawa (1959), Gebauer et al. (1974), Paccamonti et al. (1999) and Kavak et al. (2003), report tendencies of the left testicle to be larger than the right. The reason for the left–right variation of testis size is not known, but Nishikawa (1959) suggests that the left testis developed earlier and grew more rapidly from one month to 4-5 years in 80% of the horses. In this experiment the mean testicular measurements (length, width and height) of horses in GI were similar to the values found in Pantaneiro colts aged between 12 and 15 months (Melo et al. 1998). In relation to testicular weight, the colts in GI had heavier testis than the Pantaneiro horse. All testicular measurements and testicular weight of horses between 19 and 34 months can be compared to the results obtained in Pantaneiro stallions between 26 and 28 months, according to Melo et al. (1998) and as described by Naden et al. (1990) for Quarter Horse stallions at two years of age.

Testosterone concentrations showed no significant differences between the age groups. The results found in this study disagree from those described by Naden et al. (1990) and

Melo et al. (1998) who described that serum testosterone levels increased with age. According to Amann (2011) three to eight episodic bursts of testosterone production occur each day in most horses. Consequently, if a single blood sample is taken as in this experiment, an unusually high value may be obtained. Furthermore the technique for measurement of testosterone used in this study was the chemiluminescence method, different from the assays used by most authors (Naden et al. 1990, Johnson et al. 1991, Stewart and Roser 1998, Brown-Douglas et al. 2005). The differences in testosterone concentration found in this experiment compared to other studies may be explained by these facts.

According to Wesson and Ginther (1981) the onset of puberty can be determined based on the presence of spermatozoa in the epididymys. Using this criterion, all animals with 20 months of age or more had reached puberty in the present study. The first spermatozoa appeared in 16 month old colts. According to Skinner and Bowen (1968), puberty in pony stallions occurs between 11 and 15 months of age. The presence of spermatozoa in the ejaculate can be detected between 14 and 24 months in Quarter Horse colts (Naden et al. 1990). In colts aged 12-13 months (summer born) and animals aged between 15 and 16 months (spring born), all spring-born colts and only one of four summer-born colts, had reached puberty at this age (Wesson and Ginther, 1981).

The diameter of seminiferous tubules in horses increased with age. In GII and GIII the mean of tubular diameter was $107.24 \pm 20.92 \mu\text{m}$ and $150.20 \pm 39.56 \mu\text{m}$, respectively. Swierstra et al. (1974) evaluated the diameters of the seminiferous tubules, comparing the eight stages of the seminiferous epithelium in two groups of mature stallions. The mean tubular diameters for stages varied between $156 \pm 3 \mu\text{m}$ and $161 \pm 2 \mu\text{m}$,

suggesting a similarity between values obtained in adult stallions (3-10 years of age) and those found in animals of groups GIII and GIV in this study. However, Figueiró (2010) reported an average for seminiferous tubule diameter of 205 μm in mature stallions. This may indicate that the testicular development was ongoing in the animals of the present study.

In conclusion animals with 20 months of age or more had reached puberty in the present study and the first spermatozoa appeared in 16 month old colts. With the exception of one horse which had high testicular volume and weight, but no spermatozoon, epididymal sperm were presented, when testicular volume and weight were over 16 cm^3 and 23g, respectively.

References

- Abercrombie M. (1946) Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anatomical record Journal* 94, 239–247
- Aguiar G. V., Araújo A. A., Moura A. A. A. (2006) Desenvolvimento testicular, espermatogênese e concentrações hormonais em touros Angus. *Revista Brasileira de Zootecnia* 35, Supplement 4, 1629-1638
- Amann R. P. (2011) Physiology and Endocrinology. In: McKinnon A. O., Squires E. L., Vaala W. E., Varner D. D. *Equine Reproduction*. 2. Ed. Wiley-Blackwell v. 1, 881-908
- Brown-Douglas C. G., Parkinson T. J., Firth E. C., Fennessy P. F. (2005) Bodyweights and growth rates of spring- and autumn-born Thoroughbred horses raised on pasture. *New Zealand Veterinary Journal* 53 (5), 326-331
- Bruemmer J. E. (2006) Collection and freezing of epididymal stallion sperm. *Veterinary Clinical Equine* 22, 677–682
- Dowsett K. F and Pattie W. A. (1982) Characteristics and fertility of stallion semen. *Journal of Reproduction and Fertility, Supplement* 32, 1-8
- Dowsett K. F and Pattie W. A. (1987) Variation in characteristics of stallion semen caused by breed, age, season of year and service frequency. *Journal of Reproduction and Fertility, Supplement* 35, 645-647
- Figueiró G. M. (2010) Análise morfofuncional da espermatogênese do cavalo da raça Crioula. Tese de Doutorado. Santa Maria – RS, Universidade Federal de Santa Maria.
- Johnson L., Blanchard T. L., Varner D. D., Scrutchfield W. L. (1997) Factors affecting spermatogenesis in the stallion. *Theriogenology* 48, 1199-1216
- Gebauer M. R., Pickett B.W., Swierstra E. E. (1974) Reproductive physiology of the stallion. II. Daily production and output of sperm. *Journal of Animal Science* 39 (4), 732-736
- Johnson L. and Thompson D. L. Jr. (1983) Age-related and seasonal variation in the Sertoli cell population, daily sperm production and serum concentrations of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone in stallions. *Biol Reprod.* 29 777-789
- Johnson L., Thompson D. L. Jr. (1987) Effect of seasonal changes in Leydig cell number on the volume of smooth endoplasmic reticulum in Leydig cells and intratesticular testosterone content in stallions. *Journal of Reproduction and Fertility* 81, 227-232
- Johnson L., Varner D. D., Thompson D. L. (1991) Effect of age and season on the establishment of spermatogenesis in the horse. *Journal of Reproduction and Fertility, Supplement* 44, 87-97

Johnson L., Carter G. K., Varner D. D., Taylor T. S., Blanchard T. L., Rembert M. S. (1994) The relationship of daily sperm production with number of Sertoli cells and testicular size in adult horses: role of primitive spermatogonia. *Journal of Reproduction and Fertility* 100, 315-321

Johnson L. (1995) Efficiency of spermatogenesis. *Microscopy Research and Technique* 32 (5), 385-422

Kavak A., Lundeheim N., Aidnik M., Einarsson S. (2003) Testicular measurements and Daily Sperm Output of Tori and Estonian Breed Stallions. *Reprod. Dom. Anim.* 38, 167-169

Love C. C., Garcia M. C., Riera F. R., Kenney R. M. (1991) Evaluation of measures taken by ultrasonography and caliper to estimate testicular volume and predict daily sperm output in the stallion. *Journal of Reproduction and Fertility, Supplement* 44, 99-105

Melo M. I. V., Sereno J. R. B., Henry M., Cassali G. D. (1998) Peripuberal sexual development of Pantaneiro stallions. *Theriogenology* 50, 727-737

Moura A. A. and Erickson B. H. (2011) Testicular development, histology, and hormone profiles in three yearling Angus Bulls with spermatogenic arrest. *Theriogenology* 55, 1469-1488

Moura A. A., Souza C. E. A., Erickson B. H. (2011) Early prepubertal testis criteria, seminiferous epithelium and hormone concentrations as related to testicular development in beef bulls. *Animal Reproduction Science* 124, 39-47

Naden J., Amann R. P., Squires E. L. (1990) Testicular growth, hormone concentrations, seminal characteristics and sexual behaviour in stallions. *Journal of Reproduction and Fertility* 88, 167-176

Neves E. S., Chiarini-Garcia H., França L. R. (2002) Comparative Testis Morphometry and Seminiferous Epithelium Cycle Length in Donkeys and Mules. *Biology of Reproduction* 67, 247-255

Neves A. P., Trein C. R., Möller G., Mattos R. C., Klug E. (2005) Reproductive parameters of Mini-Shetland stallions in north Germany. *Anim Reprod Sci.* 89 (1-4), 267-270.

Nishikawa Y. and Horie T. (1955) Studies on the development of the testes and epididymides of the horse. I. Studies on the development of the testes of the horse, with special reference to singularity and the age of sexual maturity. *Bull. natn. Inst. agrie Sci.* 10, 299.

Paccamonti D. L., Buiten A. V., Parlevliet J. M., Colenbrander B. (1999) Reproductive parameters of Miniature stallions. *Theriogenology* 51, 1343-1349

Parlevliet J. M., Kemp B., Colenbrande B. (1994) Reproductive characteristics and semen quality in maiden Dutch Warmblood stallions. *Journal of Reproduction and Fertility* 101(1), 183-187

Pickett B.W., Voss J. L., Bowen R. A., Squires E. L. and McKinnon A. O. (1987) Seminal characteristics and total scrotal width (T.S.W.) of normal and abnormal stallions. *Proceedings of the 33rd Annual American Association of Equine Practitioners Convention* 487-518

Pickett, B. W., Amann, R. P., McKinnon, A. O., Squires, E. X. & Voss, J. L. (1989) Management of the stallion for maximum reproductive efficiency. II. *Animal Reproduction Laboratory Bulletin* No. 05. Fort Collins, Colorado State University

Quartuccio M., Marino G., Zanghi A., Garufi G., Cristarella S. (2011) Testicular Volume and Daily Sperm Output in Ragusano Donkeys. *Journal of Equine Veterinary Science* 31, 143-146

Remiezowicz A., Mattos R.C., Neves A.P., Müller K., Ellenberger C., Schoon H. A. (2008) Small but dynamite: Brazilian pony stallions have more testicular Leydig cells than German warm blood stallions. *Anim Reprod Sci.* 107 (3-4), 345-346.

Skinner J. D. and Bowen J. (1968) Puberty in the Welsh Stallion. *Journal of Reproduction and Fertility* 16, 133-135

Squires E. L. and Pickett B W. (2011) Factors affecting sperm production and output. In: McKinnon A. O., Squires E. L., Vaala W. E and Varner D. D. *Equine Reproduction*. 2. Ed. Wiley-Blackwell, v.1, 1344-1361

Stewart B. L. and Roser J. F. (1998) Effects of age, season, and fertility status on plasma and intratesticular immunoreactive (IR) inhibin concentrations in stallions. *Domestic Animal Endocrinology* 15 (2), 129-139

Swierstra E. E., Gebauer M. R., Pickett B. W. (1974) Reproductive physiology of the Stallion I. Spermatogenesis and testis composition. *Journal of Reproduction and Fertility* 40, 113-123

Voss J. L., Pickett B. W., Loomis P. R. (1982) The relationship between semen characteristics and fertility in Thoroughbred stallions. *Journal of Reproduction and Fertility*, Supplement 32 635-636

Wesson J. A. and Ginther O. J. (1981) Puberty in the male pony: plasma gonadotrophin concentrations and the effects of castration. *Animal Reproduction Science* 4, 165-175

4 CONCLUSÕES

Baseado na presença de espermatozóides epididimários, os equinos da raça Crioula atingiram a puberdade aos 20 meses de idade, embora os primeiros tenham sido encontrados aos 16 meses.

O período peri-puberdade se caracterizou pelo início do aparecimento de espermatozóides epididimários, fato que foi associado ao crescimento do volume testicular e do diâmetro dos túbulos seminíferos. Este estudo mostrou que quando o volume testicular atinge valores a partir de 16 cm³ e 23 g de peso testicular os espermatozoides epididimários começam a serem visualizados no lavado epididimários.

REFERÊNCIAS

- ABERCROMBIE M. Estimation of nuclear population from microtome sections. **Anatomical record Journal** v. 94, p. 239–247, 1946.
- ABCCC. **Setor de registros genealógicos da Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Crioulos**, Pelotas, 2011.
- ABCCC. **Manual do Criador da Associação Brasileira de Criadores de Cavalos Crioulos**, Pelotas, 2000.
- AFFONSO A., CORREA S. **Cavalo Crioulo: uma história de raça**. Porto Alegre, Sagra D-C Luzzato, p. 210, 1992.
- AGUIAR G. V., ARAÚJO A. A., MOURA A. A. A. Desenvolvimento testicular, espermatogênese e concentrações hormonais em touros Angus. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 35, Supplement 4, p. 1629-1638, 2006.
- AMANN R. P., JOHNSON L., THOMPSON D. L., PICKETT B. W. Daily spermatozoal production, epididymal spermatozoal reserves and transit time of spermatozoa through the epididymis of the rhesus monkey. **Biology of Reproduction**. v. 15, p. 586-592, 1976.
- AMANN R. P, THOMPSON D. L, SQUIRES E. L, PICKETT B. W. Effects of age and frequency of ejaculation on sperm production and extragonadal sperm reserves in stallions. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 27, p.1-6, 1979.
- AMANN R. P., WALKER O. A. Changes in the pituitary-gonadal axis associated with puberty in Holstein bulls. **Journal of Animal Science**. v. 57, n. 2, p. 433-442, 1983.
- AMANN R. P. **Physiology and endocrinology**. In: MCKINNON A. O, VOSS J. L. (Eds.). *Equine Reproduction*. Lea e Febiger, Pennsylvania, USA. p. 658-685, 1993.
- AMANN R. P. **Physiology and Endocrinology**. In: MCKINNON A. O., SQUIRES E. L., VAALA W. E., VARNER D. D. (Eds.). *Equine Reproduction*. 2. Ed. Wiley-Blackwell v. 1, p. 881-908, 2011.
- ANDERSON K. N., ANDERSON L. E., GLANZE W. D. **Mosby's Medical, Nursing and Allied Health Dictionary**. 5. ed. St. Louis: Mosby-Year Book, Inc., p. 998, 1998.
- ARGO C. MCG., COLLINGSWORTH M. G. R., COX J. E. Seasonal changes in reproductive and pelage status during the initial 'quiescent' and first 'active' breeding seasons of the peripubertal pony colt. **Animal Science**., v. 72, p. 55-64, 2001.
- BARDIN C. W., CHENG C. Y., MUSTOW N. A., GUNSALUS G. L. **The Sertoli cell**. In: KNOBIL E., NEIL J. D. (Eds.). *The Physiology of Reproduction*. 2. Ed. Raven Press, New York. p. 1291-1331, 1994.

BARDIN C. W. The Anabolic Action of Testosterone. **The New England Journal of Medicine**. v. 335, p. 52-53, 1996.

BARTELS P., LUBBE K., KILIAN I., FRIEDMANN Y. DYK G., MORTIMER D. In vitro maturation and fertilization of lion (*Panthera leo*) oocytes using frozen-thawed epididymal spermatozoa recovered by cauda epididymectomy of an immobilized lion. **Theriogenology**. v.53, p.325, 2000.

BEDFORD J. M. The status and the state of the human epididymis. **Human Reproduction**, v. 9, p. 2187-2199, 1994.

BLANCHARD T. L., JOHNSON L., BRINSKO S. P., VARNER D. D., RIGBY S. L., HURTGEN J. P. Evaluation of Testicular Size and Function In 1–3-Year-Old Stallions **Proceedings of the Annual Convention of the AAEP**. v. 47, p. 332-335, 2001.

BROWN-DOUGLAS C. G., PARKINSON T. J., FIRTH E. C., FENNESSY P. F. Bodyweights and growth rates of spring- and autumn-born Thoroughbred horses raised on pasture. **New Zealand Veterinary Journal**. v. 53, n. 5, p. 326-331, 2005.

BRUEMMER J. E. Collection and freezing of epididymal stallion sperm. **Veterinary Clinical Equine**. v. 22, p. 677–682, 2006.

CAMERON J. L. **Factors controlling the onset of puberty in primates**. In: BANCROFT J., REINISCH J. M. (Eds.). *Adolescence and Puberty*. New York: Oxford University Press, p. 9-28. 1990.

CLERMONT Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. **Physiological Reviews**. v. 52, p. 1198-1236, 1972.

CLOVER T. D., NICANDER L. Some aspects of structure and function in the mammalian epididymis. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 13, p. 39-50, 1971.

COSTA D. S., HENRY M., PAULA T. A. R. Espermatogênese de catetos (*Tayassu tajacu*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 56, n. 1, p. 46-51, 2004.

DE GENDT K., SWINNEN J. V., SAUNDERS P. T., SCHOONJANS L., DEWERCHIN M., DEVOS A., TAN K., ATANASSOVA N., CLAESSENS F., LÉCUREUIL C., HEYNS W., CARMELIET P., GUILLOU F., SHARPE R. M., VERHOEVEN G. A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 101, p. 1327-1332, 2004.

DORDARI S, VOJDANIFAR N., FERREYDOUN A. Reproduction parameters of Caspian Miniature Colts. In: **Australian Society of Animal Production 26th Biennial Conference**, Short Communication number 41, Anais... 2006.

DOWSETT K. F AND PATTIE W. A. Characteristics and fertility of stallion semen. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 32, p. 1-8, 1982.

DOWSETT K. F AND PATTIE W. A. Variation in characteristics of stallion semen caused by breed, age, season of year and service frequency. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 35, p. 645-647, 1987.

DREEF H. C., VAN ESCH E., DE RIJK E. P. C. T. Spermatogenesis in the Cynomolgus Monkey (*Macaca fascicularis*): A Practical Guide for Routine Morphological Staging. **Toxicol Pathol**. n. 35, p. 3395-3404, 2007.

DYM M., MADHWA RAJ H. G. Response of adult rat Sertoli cells and Leydig cells to depletion of LH and testosterone. **Biology Reproduction**. v. 17, p. 676-696, 1977.

DYM M. Basement membrane regulation of Sertoli cells. **Endocrine Reviews**. v. 15, p. 102-115, 1994.

FAN X., ROBAIRE B. Orchidectomy induces a wave of apoptotic cell death in the epididymis. **Endocrinology**. v. 139, p. 2128-2136, 1998.

FERRAZ J. B. S., ELER J. P. Seleção de zebuínos para características produtivas. In: **Simpósio de produção de gado de corte**, 1., Viçosa. Anais... p.29-49, 1999.

FIGUEIRÓ G. M. Análise morfofuncional da espermatogênese do cavalo da raça Crioula. **Tese de Doutorado**. Santa Maria – RS, Universidade Federal de Santa Maria, 2010.

FOSTER D. L., MICKELSON I. H., RYAN K. D., COON G. A., DRONGOWSKI, R. A., HOLT J. A. Ontogeny of pulsatile luteinizing hormone and testosterone secretion in male lambs. **Endocrinology**. v. 102, p. 1137-1146, 1978.

FRANÇA L. R, RUSSELL L. D. **The testis of domestic mammals**. In: MARTÍNEZ-GARCÍA F., REGADERA J. (Eds). Male reproduction; a multidisciplinary overview. Churchill Communications Europe, Madrid, España, p.198-219, 1998.

FRANÇA L. R, SILVA V. A. JR., CHIARINI-GARCIA H., GARCIA S. K., DEBELJUK L. Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. **Biology of Reproduction**. v. 63, p. 1629-1636, 2000.

FRANÇA L., AVELAR G., ALMEIDA F., Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. **Theriogenology**. v. 63, p. 300–318, 2005.

GARNER D. L., HAFEZ E. S. E. **Espermatozóides e Plasma Seminal**. In: HAFEZ E. S. E., HAFEZ B. *Reprodução Animal*. São Paulo: Manole. 7. ed. p. 99-106, 2004.

GEBAUER M. R., PICKETT B.W., SWIERSTRA E. E. Reproductive physiology of the stallion. II. Daily production and output of sperm. **Journal of Animal Science**. v. 39, n. 4, p. 732-736, 1974.

GOYAL H. O., WILLIAMS C. S., KHALIL M. K., VIG M. M., MALONEY M. A. Postnatal differentiation of ductus deferents, tail of the epididymis, and distal body of epididymis in goats occurs independently of rete testis fluid. **The Anatomical record.** v. 254, p. 508-520, 1999.

HOLYOAK G. R., LITTLE T. V., VERNON M., MCCOLLUM W. H., TIMONEY P. J. Correlation between ultrasonographic findings and serum testosterone concentration in prepubertal and peripubertal colts. **American Journal of Veterinary Research.** v. 55, n. 4, p. 450-457, 1994.

JOHNSON L., AMANN R. P., PICKETT B.W. Scanning electrons and light microscopy of the equine seminiferous tubule. **Fertility and Sterility.** v. 29, n. 2, p. 208-215, 1978.

JOHNSON L., NEAVES W. B. Age-related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules, and sperm production in stallions. **Biology of Reproduction.** v. 24, p. 703-712, 1981.

JOHNSON L., THOMPSON D. L. JR. Age-related and seasonal variation in the Sertoli cell population, daily sperm production and serum concentrations of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone in stallions. **Biology of Reproduction.** v. 29, p. 777-789, 1983.

JOHNSON L., NGUYEN H. B. Annual cycle of the Sertoli cell population in adult stallions. **Journal of Reproduction and Fertility.** v. 76, p. 311-316, 1986.

JOHNSON L., THOMPSON DL JR. Seasonal variation in the total volume of Leydig cells in stallions is explained by variation in cell number rather than cell size. **Biology of Reproduction.** v. 35, p. 971-979, 1986.

JOHNSON L., PETTY C. S., NEAVES W. B. Age-related variation in seminiferous tubules in men: a stereologic evaluation. **Journal of Andrology.** v. 7, n. 3, 16-322, 1986.

JOHNSON L., THOMPSON D. L. JR. Effect of seasonal changes in Leydig cell number on the volume of smooth endoplasmic reticulum in Leydig cells and intratesticular testosterone content in stallions. **Journal of Reproduction and Fertility.** v. 81, p. 227-232, 1987.

JOHNSON L., TATUM M. E. Temporal appearance of seasonal changes in numbers of Sertoli cells, Leydig cells, and germ cells in stallions. **Biology of Reproduction.** v. 40, p. 994-999, 1989.

JOHNSON L. **Spermatogenesis.** In: CUPPS P. T., (Ed.). *Reproduction in Domestic Animals*, 4. ed. Academic Press, New York, p. 173-219, 1991.

JOHNSON L., VARNER D. D., THOMPSON D. L. Effect of age and season on the establishment of spermatogenesis in the horse. **Journal of Reproduction and Fertility.** Supplement 44, p. 87-97, 1991.

JOHNSON L., CARTER G. K., VARNER D. D., TAYLOR T. S., BLANCHARD T. L., REMBERT M. S. The relationship of daily sperm production with number of Sertoli cells and testicular size in adult horses: role of primitive spermatogonia. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.100, p. 315-321, 1994.

JOHNSON L. Efficiency of spermatogenesis. **Microscopy Research and Technique**. v. 32, n. 5, p. 385-422, 1995.

JOHNSON L., BLANCHARD T. L., VAMER D. D., SCRUTCHFIELD W. L., Factors affecting spermatogenesis in the stallion. **Theriogenology**. v. 48, p. 1199-1216, 1997.

KAVAK A., LUNDEHEIM N., AIDNIK M., EINARSSON S. Testicular measurements and Daily Sperm Output of Tori and Estonian Breed Stallions. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 38, p. 167-169, 2003.

KERR J. B., KNELL C. M. The fate of fetal Leydig cells during the development of the fetal and postnatal rat testis. **Development**. v. 103, p. 535-544, 1988.

KIRKWOOD R. N., AHERNE F. X. Energy intake, body composition and reproductive performance of the gilt. **Journal of Animal Science**. v. 60, p. 1518-1529, 1985.

LOVE C. C., GARCIA M. C., RIERA F. R., KENNEY R. M. Evaluation of measures taken by ultrasonography and caliper to estimate testicular volume and predict daily sperm output in the stallion. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 44, p. 99-105, 1991.

MACKAY S. **Gonadal development in mammals at the cellular and molecular levels**. **International Review of Cytology – A Survey of Cell Biology**, v.200, p.47-99, 2000.

MELO M. I. V., SERENO J. R. B., HENRY M., CASSALI G. D. Peripuberal sexual development of Pantaneiro stallions. **Theriogenology**. v. 50, p. 727-737, 1998.

METCALF E. S., LEY W. B., LOVE C. C. **Semen parameters of the American Miniature Horse stallion**. In: Proceedings of the 43. Annual Convention of American Association of Equine Practitioners, p. 202-203, 1997.

MONTEIRO G. A., GUASTI P. N., PAPA F. O. Colheita e preservação de células espermáticas de garanhões recuperadas da cauda do epidídimo. **Veterinária e Zootecnia**. p 448-458, v. 16, n3, 2009.

MOURA A. A., SOUZA C. E. A., ERICKSON B. H. Early prepubertal testis criteria, seminiferous epithelium and hormone concentrations as related to testicular development in beef bulls. **Animal Reproduction Science**. v. 124, p. 39-47, 2011.

MOURA A. A., ERICKSON B. H. Testicular development, histology, and hormone profiles in three yearling Angus Bulls with spermatogenic arrest. **Theriogenology**. v. 55, p. 1469-1488, 2011.

NADEN J., AMANN R. P., SQUIRES E. L. Testicular growth, hormone concentrations, seminal characteristics and sexual behaviour in stallions. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 88, p. 167-176, 1990.

NEVES E. S., CHIARINI-GARCIA H., FRANÇA L. R. Comparative Testis Morphometry and Seminiferous Epithelium Cycle Length in Donkeys and Mules. **Biology of Reproduction**. v. 67, p. 247-255, 2002.

NEVES A. P., TREIN C. R., MÖLLER G., MATTOS R. C., KLUG E. Reproductive parameters of Mini-Shetland stallions in north Germany. **Animal Reproduction Science**. v. 89, n. 1-4, p. 267-270, 2005.

NICKEL R. A., SCHUMMER A., SEIFERLE E. **Male genital organs**. In: The Viscera of the Domestic Mammals, 2. Ed. Verlag Paul Parey: Berlin, p. 304, 1979.

NISHIKAWA Y. AND HORIE T. Studies on the development of the testes and epididymides of the horse. I. Studies on the development of the testes of the horse, with special reference to singularity and the age of sexual maturity. **Bulletin of the National Research Council**. v. 10, p. 299, 1955.

NISHIKAWA, Y. **Studies on reproduction in horses**. Tokyo: Japan Racing Association, 340 pp, 1959.

PACCAMONTI D. L., BUITEN A. V., PARLEVLIET J. M., COLENBRANDER B. Reproductive parameters of Miniature stallions. **Theriogenology**. v. 51, p. 1343-1349, 1999.

PARLEVLIET J. M., KEMP B., COLENBRANDE B. Reproductive characteristics and semen quality in maiden Dutch Warmblood stallions. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 101, n. 1, p. 183-187, 1994.

PELLINIEMI L. J, KUOPIO T., FRÖJDMAN K. **The cell biology and function of the fetal Leydig cell**. In: PAYNE A. H, HARDY M. P, RUSSELL L. D (Eds.). The Leydig cell. Viena: Cache River Press, 1996, p.143-157.

PICKETT B.W., VOSS J. L., BOWEN R. A., SQUIRES E. L. AND MCKINNON A. O. Seminal characteristics and total scrotal width (T.S.W.) of normal and abnormal stallions. **Proceedings of the 33rd Annual American Association of Equine Practitioners Convention**. p. 487-518, 1987.

PICKETT, B. W., AMANN, R. P., MCKINNON, A. O., SQUIRES, E. X. & VOSS, J. L. **Management of the stallion for maximum reproductive efficiency**. II. Animal Reproduction Laboratory Bulletin No. 05. Fort Collins, Colorado State University. 1989.

PICKETT B. W. **Reproductive evaluation of the stallion**. In: MCKINNON A. O., VOSS J. L. (Eds.). Philadelphia: Lea & Febiger, p. 755-768, 1993.

PONS D. S. **O cavalo Crioulo: seis décadas de experiências.** Guaíba; Agropecuária, p. 143, 1993.

QUARTUCCIO M., MARINO G., ZANGHÌ A., GARUFI G., CRISTARELLA S. Testicular Volume and Daily Sperm Output in Ragusano Donkeys. **Journal of Equine Veterinary Science.** v. 31, p. 143-146, 2011.

RAESIDEA J. I. Seasonal changes in the concentration of estrogens and testosterone in the plasma of the stallion. **Animal Reproduction Science.** v. 1, n. 3, p. 205–212, 1979.

REMIEZOWICZ A., MATTOS R.C., NEVES A.P., MÜLLER K., ELLENBERGER C., SCHOON H. A. Small but dynamite: Brazilian pony stallions have more testicular Leydig cells than German warm blood stallions. **Animal Reproduction Science.** v. 107, n. 3-4, p. 345-346, 2008.

ROBAIRE B., HINTON B. T., ORGEBIN-CRIST M. C. **The Epididymis.** In: NEILL J. D. (Ed.). *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction.* 3. Ed, Elsevier, p. 1071-1148, 2006.

ROCHIRA V., ZIRILLI L., GENAZZANI A. D., BALESTRIERI A., ARANDA C., FABRE B., ANTUNEZ P., DIAZZI C., CARANI C., MAFFEI L. Hypothalamic-pituitary-gonadal axis in two men with aromatase deficiency: evidence that circulating estrogens are required at the hypothalamic level for the integrity of gonadotropin negative feedback. **European Journal of Endocrinology.** v. 155, p. 513-522, 2006.

RODRIGUEZ C. M., KIRBY J. L., HINTON B. T. Regulation of gene transcription in the epididymis. **Reproduction,** v. 122, p. 41-48, 2001.

ROSER J. F. Testicular function and fertility. **Journal of Equine Veterinary Science.** v. 20, n. 2, p. 90-93, 2000.

ROSER J. F. Endocrine and paracrine control of sperm production in stallions. **Animal Reproduction Science.** v. 68, p. 139-151, 2001.

ROSER, J. F. Regulation of testicular function in the stallion: An intricate network of endocrine, paracrine and autocrine systems. *Animal Reproduction Science* 107, p. 179–196, 2008.

ROWLANDS I. W., ALLEN W. R., ROSSDALE P.D. In *Equine Reproduction III Proceedings of the Third International Symposium on Equine Reproduction* , **Journal of Reproduction and Fertility,** Suppl. 32, 647-652, 1982.

SCHLATT S., MEINHARDT A., NIESCHLAG E. Paracrine regulation of cellular interactions in the testis: factors in search of a function. **European Journal of Endocrinology.** v. 137, p. 107-117, 1997.

SHARPE R. M. **Regulation of spermatogenesis.** In: KNOBIL E., NEILL J. D. (Eds.). *The Physiology of Reproduction.* Raven Press, New York, p. 1363–1434, 1994.

SHUPNIK M. A., SCHREIHOFFER D. A. Molecular aspects of steroid hormone action in the male reproductive axis. **Journal of Andrology**. v. 18, n. 4, p. 341-344, 1997.

SKINNER J. D., BOWEN J. Puberty in the Welsh Stallion. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 16, p. 133-135, 1968.

SKINNER M. K. **Sertoli cell-somatic cell interactions**. In: SKINNER M. K., GRISWOLD M. D. (Eds.). Sertoli cell biology. 1. Ed. Elsevier Academic Press, San Diego. p.317-328, 2005.

SOLANET E. **Tratado de hipotecnia**. Buenos Aires: Ed. Morata, p. 401, 1946.

SQUIRES E. L., PICKETT B. W. **Factors affecting sperm production and output**. In: MCKINNON A. O., SQUIRES E. L., VAALA W. E., VARNER D. D. (Eds.). Equine Reproduction. 2. Ed. Wiley-Blackwell v. 1, 1344-1360, 2011.

SPITERI-GRECH J., NIESCHLAG E. Paracrine factors relevant to the regulation of spermatogenesis--a review. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 98, n. 1, p. 1-14, 1993.

STEINER J. V., UMPHENOUR N. W. **Breeding management of the Thoroughbred Stallion**. In: Samper, J. C. (Eds.). Equine breeding management and artificial insemination. 2. ed. St. Louis, Missouri: Saunders Elsevier, p. 77, 2009.

STEWART B. L. AND ROSER J. F. Effects of age, season, and fertility status on plasma and intratesticular immunoreactive (IR) inhibin concentrations in stallions. **Domestic Animal Endocrinology**. v. 15, n. 2, p. 129-139, 1998.

SUÁREZ-QUIAN C. A., OKE B. O., MUSTO N. **Localization of the androgen receptor in the rodent testis**. In: MARTÍNEZ-GARCÍA F., REGADERA J. (Eds.) Male reproduction; a multidisciplinary overview. Churchill Communications Europe Madrid, España. p. 114-124, 1998.

SULLIVAN R., FRENETTE G., GIROUARD J. Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. **Asian Journal of Andrology**. v. 9, p. 483-491, 2007.

SWIERSTRA E. E., GEBAUER M. R., PICKETT B. W. Reproductive physiology of the Stallion I. Spermatogenesis and testis composition. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 40, p. 113-123, 1974.

THOMPSON D. J. PICKETT B. W., SQUIRES E. L., AMANN R. P. Testicular measurements and reproductive characteristics in stallion. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 27, p. 13-17, 1979.

VARNER D. D., SCHUMACHER J., BLANCHARD T. L., JOHNSON L. **Disease and management of breeding stallions**. Sta Barbara: American Veterinary Publications, p. 349, 1991.

VARNER D. D., JOHNSON L. From a Sperm's Eye View - revisiting our perception of this intriguing cell. In: **Proceedings of the American Association of Equine Practitioners**. 53, p. 104-177, 2007.

VOSS J. L, PICKETT B. W., LOOMIS P. R. The relationship between semen characteristics and fertility in Thoroughbred stallions. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 32, p. 635-636, 1982.

WESSON J. A.; GINTHER O. J. Puberty in the male pony: plasma gonadotrophin concentrations and the effects of castration. **Animal Reproduction Science**. v. 4, p. 165-175, 1981.

WOLF F. R., ALMQUIST J. O., HALE E.B. Prepuberal and puberal characteristics of beef bulls on high nutrient allowance. **Journal of Animal Science**. v. 24, p. 761-773, 1965.

WU X., WAN S., LEE M. M. Key factors in the regulation of fetal and postnatal Leydig cell development. **Journal of Cellular Physiology**. v. 213, p. 429-433, 2007.

ZIRKIN B. R, AWONIYI C., GRISWOLD M. D., RUSSELL L. D., SHARPE R. Is FSH required for adult spermatogenesis? **Journal of Andrology**. v. 15, p. 273-276, 1994.