

EFEITO DA EXPOSIÇÃO PRÉ E PÓS-NATAL AO ULTRA-SOM DE BAIXA INTENSIDADE SOBRE A CÉLULA DE LEYDIG E DEMAIS COMPONENTES DO ESPAÇO INTERTUBULAR DO TESTÍCULO DE CAMUNDONGOS ADULTOS¹

Rodrigo Diana Navarro²
Tarcízio Antônio Rego de Paula²
Sérgio Luis Pinto da Matta³
Cláudio César Fonseca²
Marco Túlio David das Neves²

RESUMO

A estimulação ultra-sônica de baixa intensidade (7,5 Mhz), fornecida por aparelhos comerciais de diagnóstico por imagem, quando aplicada no abdômen de camundongas nos últimos 10 dias de gestação e na região urogenital dos filhotes nos 15 dias seguintes ao parto, diariamente, por cinco minutos, levou a um aumento significativo dos pesos corporais e das glândulas vesiculares e da concentração sérica de testosterona nos animais adultos. Aumentou também a proporção volumétrica, o volume e o número de células de Leydig por testículo e o volume individual da célula de Leydig, embora somente o último parâmetro de forma estatisticamente significativa. A influência do ultra-som perinatal, em doses de diagnóstico clínico no testículo de camundongos, referiu-se principalmente a estímulo no crescimento individual da célula de Leydig antes de sua proliferação, o que refletiu em significativo aumento no nível sérico de testosterona. Influenciou ainda, positivamente, a proporção volumétrica de tecido conjuntivo intertubular e, negativa e significativamente, a proporção de vasos linfáticos.

Palavras-chave: espaço linfático, intertúbulo, testosterona, ultra-sonografia.

¹ Aceito para publicação em 25.03.2004.

² Setor de Morfologia, Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa. 36570-000 Viçosa, MG. E-mail: tarcizio@ufv.br

³ Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa. 36570-000 Viçosa, MG.

ABSTRACT

EFFECT OF LOW INTENSITY ULTRASOUND EXPOSURE IN PERINATAL PERIOD ON THE LEYDIG CELL AND OTHER COMPONENTS OF THE INTERTUBULAR SPACE IN ADULT MOUSE TESTIS

Low intensity ultrasound stimulation (7.5 Mhz) provided by image diagnosis commercial devices, when applied to female mouse abdomen in the final 10 days of gestation and to the urogenital organs of their offspring in the following 15 days for 5 min. daily, significantly increased body weight, vesicular glands and serum testosterone level in the adult animals. The volumetric proportion, the Leydig cell volume and number per testis and the individual volume of Leydig cell were also increased, although only the last parameter being significantly affected. The effect of ultrasound stimuli of therapeutic doses on the mouse testis was mainly correlated to the individual growth of the Leydig cell, rather than to its proliferation, reflecting a significant increase of the serum level of testosterone. It had a positive effect on the volumetric proportion of the intertubular connective tissue and a negative and significant effect on lymphatic vessel proportion, as well.

Key words: lymphatic vessel, interstitial space, testosterone, ultrasonography.

INTRODUÇÃO

O ultra-som tem ampla gama de utilização na biologia animal, sendo rotineiramente empregado em diagnóstico por imagem com finalidades clínicas e no monitoramento em pesquisa e procedimentos de rotina. Mais recentemente, seu uso tem sido preconizado em terapias específicas, devido a sua capacidade de estimulação na regeneração de diferentes tecidos danificados (17, 23, 29). A exposição de tecidos de mamíferos ao ultra-som de baixa intensidade apresenta efeitos estimulatórios ou deletérios no metabolismo celular, dependendo do tecido, dose e frequência do tratamento (1, 2, 6, 7, 12, 13, 14, 19, 30, 31).

O compartimento intertubular do parênquima testicular é composto por vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, células e fibras conjuntivas, leucócitos e células de Leydig. Nas diferentes espécies de mamíferos são observados dois tipos de células de Leydig: as fetais, que se originam no período pré-natal, produzindo andrógenos requeridos para a masculinização fetal e persistem durante toda a vida adulta (15); e as adultas, que se originam no período pós-natal, a partir de um precursor indiferenciado, a célula mesenquimal (4).

Há grande variabilidade entre os mamíferos quanto à proporção volumétrica dos elementos constituintes do compartimento intertubular do testículo, sendo a célula de Leydig o elemento que apresenta maior variação percentual (21). Esta célula é a principal responsável pela produção de esteróide, principalmente a testosterona, que, além da função

moduladora dos caracteres sexuais secundários, atua diretamente no processo espermatogênico (27). A função esteroidogênica e a estrutura da célula de Leydig apresentam correlação direta com o volume ocupado pelo retículo endoplasmático liso e com o número de células de Leydig por testículo (3, 32). Dentre os fatores que podem influenciar na quantidade de células de Leydig por animal estão a quantidade de LH disponível, o número de receptores de LH por célula, a quantidade de testosterona que a célula de Leydig é capaz de secretar em dado tempo e a velocidade pela qual a testosterona deixa o testículo (21).

O uso de ultra-som na intensidade de dose terapêutica (1 watt/cm^2) diretamente sobre o testículo de gato, cão, macaco e humano adultos, por 10 minutos, tem efeito deletério na espermatogênese, sem influenciar as células de Leydig e os níveis séricos de testosterona (7). Observou-se, porém, aumento significativo do crescimento e da atividade secretora das glândulas vesiculares em ratos pré-púberes com a aplicação prévia de ultra-som de baixa intensidade em dose recomendada para reparação tecidual (14). Não se observou o mesmo efeito em animais adultos (14, 31), e efeito inverso foi verificado em ratos idosos (12).

O presente trabalho objetivou avaliar os constituintes do espaço intertubular de camundongos no período perinatal, em especial a célula de Leydig, à exposição ao ultra-som de baixa intensidade fornecido por aparelhos comerciais. Este estudo foi motivado pela crescente utilização de aparelhos de diagnóstico por imagem no acompanhamento clínico em diferentes espécies domésticas e silvestres e de sua utilização no monitoramento e coleta de dados em experimentos e procedimentos rotineiros envolvendo os órgãos reprodutivos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas seis camundongas adultas, separadas aleatoriamente em dois grupos de três, sendo uma unidade experimental controle e uma unidade de tratamento com estímulos ultra-sônicos. Todas as fêmeas foram acasaladas naturalmente, e o grupo de tratamento recebeu estímulo ultra-sônico diário, através de um aparelho de ultra-sonografia comercial para diagnóstico por imagem, com probe de 7,5 MHz, diretamente sobre o abdômen, usando gel de contato, por cinco minutos, nos 10 últimos dias de gestação. Após o nascimento, tratamento semelhante foi realizado em todos os filhotes, na região urogenital, até os 15 dias de idade. Os animais do grupo-controle receberam tratamento semelhante com o aparelho desligado. Após o desmame, os filhotes machos foram agrupados até 160 dias de idade, quando foram sacrificados.

O seu peso e o das fêmeas foram verificados semanalmente durante todo o período.

Após o sacrifício, com inalação contínua de éter sulfúrico, os animais foram perfundidos via artéria aorta torácica, à temperatura ambiente, com solução salina a 0,9% contendo heparina (125 UI/litro), durante três minutos. Para circulação eficiente em todo o metâmero caudal, a veia cava caudal foi seccionada próximo ao coração. Em seguida, foi utilizada solução fixadora de glutaraldeído a 3%, em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ e pH 7,4, durante 10 minutos. Após a perfusão, os testículos foram removidos e pesados, assim como as glândulas vesiculares. Aleatoriamente, um dos testículos foi dissecado para estabelecimento da proporção ocupada pela albugínea testicular e o testículo contralateral foi segmentado e refixado por imersão por duas horas em solução de glutaraldeído 4%, em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ e pH 7,4. Estes fragmentos foram desidratados em séries de concentrações crescentes de álcoois e incluídos em resina polimerizável do tipo glicol metacrilato. Foram obtidos cortes de quatro micrômetros de espessura, montados sobre lâminas de vidro e corados em solução de azul de toluidina/borato de sódio a 1% .

Utilizando-se microscópio de luz foi feita, com o auxílio de uma ocular integradora dotada de 441 pontos, em aumento de 400 vezes, a avaliação da proporção volumétrica dos componentes do parênquima testicular. Foram computados, em 20 campos aleatoriamente distribuídos para cada animal, pontos correspondentes a túbulos seminíferos, núcleo e citoplasma de células de Leydig, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e tecido conjuntivo. Inferindo-se a estas proporções o volume total do parênquima testicular, calculado previamente, foram obtidos os volumes ocupados por componente.

O número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo foi calculado pela correlação do volume médio do núcleo de uma célula de Leydig ao volume ocupado pelo total de núcleos de células de Leydig por testículo. O volume individual foi estimado de acordo com a fórmula $4/3\pi r^3$, em que r corresponde ao raio nuclear médio, mensurado pelo uso de ocular micrométrica com aumento de 100 vezes em 20 células por animal.

Foram calculados os índices gonadossomático e Leydigossomático pelo percentual do peso corporal, alocados respectivamente em peso testicular e células de Leydig.

No momento do sacrifício foram coletadas amostras de sangue, as quais foram centrifugadas e o soro analisado em laboratório pelo método Elisa, com quimioluminescência em imunensaio de dois sítios, para mensuração do nível de testosterona.

Os dados foram apresentados em médias e desvios-padrão e analisados pelo teste t de Student, para comparação de médias (26).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste experimento, camundongos tratados com ultra-som de baixa intensidade, em dosagens de diagnóstico clínico, no período perinatal, não apresentaram variação do peso corporal até o desmame; porém, aos 160 dias de idade, o grupo de machos tratados apresentou peso corporal superior ($p < 0,05$) ao de machos-controle (Quadro 1) que, por sua vez, apresentou peso corporal superior ($p < 0,05$) ao das fêmeas, as quais, nesta idade, não diferiram entre as tratadas e controle.

Ratas tratadas durante o período de gestação com altas doses de ultra-som, acima das intensidades recomendadas para o uso terapêutico (1, 2), apresentaram aumento no número de reabsorções fetais e filhotes natimortos por sítio de implantação, assim como os filhotes sobreviventes apresentaram peso corporal abaixo do de animais-controle. Já a exposição de camundongas gestantes ao ultra-som de baixa intensidade, no período perinatal, não influenciou o tamanho da ninhada ou o peso dos filhotes. O peso corporal de ratos machos, aos 50 dias de idade, submetidos à exposição a ultra-som de alta intensidade durante a gestação, apresentou comportamento variado em resposta ao período e dose do tratamento. Contudo, nas mesmas condições, as fêmeas não apresentaram variação do peso corporal aos 50 dias de idade (2).

QUADRO 1 - Peso corporal, peso do testículo, índice gonadossomático (IGS), percentual de túnica albugínea, percentual de parênquima, peso da glândula vesicular e níveis séricos de testosterona de camundongos aos 160 dias de idade, controle e tratados perinatalmente com ultra-som de baixa intensidade. Valores apresentados em média \pm desvio-padrão

	Tratado	Controle
n	11	11
Peso corporal (g)	44,04 \pm 2,94*	40,93 \pm 1,56*
Peso dos testículos (g)	0,253 \pm 0,01	0,247 \pm 0,007
IGS %	1,15 \pm 0,1	1,18 \pm 0,09
Túnica albugínea %	6,92 \pm 2,27	6,43 \pm 3,04
Parênquima %	93,08 \pm 2,27	94,18 \pm 2,91
Glândula vesicular (g)	0,566 \pm 0,05*	0,426 \pm 0,066*
Concentração sérica de testosterona (ng/ml)	5,66 \pm 5,46*	0,74 \pm 0,11*

* valores na mesma linha diferem significativamente ($p < 0,05$).
n = número de animais.

O estímulo ultrassônico perinatal induziu em camundongos machos, aos 160 dias de idade, a aumento ($p < 0,05$) da concentração plasmática de testosterona (Quadro 1). O aumento no peso corporal dos animais tratados provavelmente deveu-se a aumento da massa muscular esquelética, que é uma resposta comumente observada em animais com aumento da testosterona endógena (16, 20). O aumento significativo do peso das glândulas vesiculares nos camundongos machos tratados ($p < 0,05$) foi uma resposta esperada, visto que a concentração de testosterona circulante está diretamente implicada com o desenvolvimento e manutenção destas glândulas (28). Ratos púberes expostos a ultra-som de baixa intensidade apresentaram aumento da glândula vesicular ($p < 0,05$) sem alteração da concentração sérica de andrógenos, sugerindo, assim, uma ação direta do ultra-som sobre o desenvolvimento da glândula vesicular (14). Em ratos pré-púberes o estímulo ultra-sônico de baixa intensidade, diretamente sobre o escroto, também induziu aumentos na atividade androgênica testicular e no crescimento da glândula vesicular (14). Por outro lado, o ultra-som de baixa intensidade nas mesmas condições, em ratos idosos, falhou em restabelecer a função esteroidogênica testicular (12).

O uso de ultra-som em doses terapêuticas, durante a vida fetal em camundongos, embora leve à diminuição do peso testicular dos animais adultos (2), em baixa intensidade, em doses de diagnóstico clínico, aplicado no período gestacional, não alterou ($p > 0,05$) o peso dos testículos nos camundongos adultos, assim como não alterou os percentuais de albugínea e do parênquima testiculares (Quadro 1). O índice gonadossomático, que representa o percentual de massa corporal alocado em testículos, apresentou-se ligeiramente menor nos animais tratados, refletindo, assim, apenas um acompanhamento parcial do peso testicular ao aumento observado na massa corporal, nestes animais (Quadro 1).

O compartimento intertubular do parênquima testicular é composto por vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, células conjuntivas e células de Leydig. A organização destes componentes pode seguir padrões distintos (8, 24), nos quais as células de Leydig podem ocupar pequena porcentagem – cerca de 2% no rato (10), ou até de 60% na capivara (21). Deste modo, a célula de Leydig é o elemento constituinte do compartimento intertubular que apresenta maior variação percentual dentre as espécies já estudadas.

Células mesenquimais indiferenciadas, no testículo no período perinatal, têm origem provável na crista neural, e durante a gestação algumas destas células transformam-se nas células de Leydig fetais, que suprem os andrógenos necessários para a masculinização do feto. Entretanto, outras células permanecem indiferenciadas até o período pós-natal, quando, no início da maturação testicular, se desenvolvem em células de Leydig adultas (11).

Neste experimento, os camundongos apresentaram 7,3% de células de Leydig no parênquima testicular, chegando a 8,3% quando estimulados perinatalmente ($p > 0,05$) com ultra-som de baixa intensidade (Quadro 2). Este aumento, embora não-significativo, explica o aumento na concentração plasmática de testosterona, concordando com o observado em coelhos adultos, em que a concentração de testosterona plasmática é positivamente correlacionada com o volume percentual de células de Leydig no testículo (3). A proporção volumétrica e o volume total das células de Leydig apresentaram valores maiores (14,24 e 7,2%, respectivamente) nos animais tratados. Acompanhando esta tendência, o índice Leydigossomático, que reflete o percentual da massa corporal alocada em células de Leydig, alcançou cerca de 0,095% nos camundongos tratados, enquanto nos animais-controle este foi de 0,082% da massa corporal ($p > 0,05$, Quadro 2).

Em coelhos adultos, foi observada correlação positiva e significativa entre o número de células de Leydig por grama de testículo e as concentrações plasmáticas e testiculares de testosterona (3). Camundongos estimulados perinatalmente com ultra-som de baixa intensidade apresentaram concentração mais elevada de testosterona plasmática ($p < 0,05$), embora o número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo não tenha mostrado diferenças entre os grupos ($p > 0,05$, Quadro 2).

Estudos correlacionando a estrutura e a função das células de Leydig em várias espécies de mamíferos mostraram que as variações na secreção de testosterona resultam mais da capacidade individual desta célula em secretar testosterona do que de diferenças do seu volume total no testículo (5). Esta capacidade está altamente associada com a quantidade de retículo endoplasmático liso na célula de Leydig (32). O tamanho desta célula é mais importante que o seu número para explicar as diferenças na capacidade de secreção de testosterona (18). Nos camundongos tratados deste experimento, o tamanho médio de uma célula de Leydig foi maior ($p < 0,05$) cerca de 17,6% que em animais-controle (Quadro 2). Não foi possível a diferenciação entre populações de células de Leydig de origem fetal ou pós-natal, uma vez que as primeiras permanecem durante toda a vida do animal (15). A influência do ultra-som perinatal, em doses de diagnóstico clínico, no testículo de camundongos adultos, estimulou o crescimento individual das células de Leydig antes de sua proliferação, o que refletiu num aumento significativo no nível sérico de testosterona. O aumento do volume das células de Leydig não se refletiu no volume total e no tamanho dos testículos, porque elas passaram a ocupar mais espaço, em detrimento dos vasos linfáticos, que reduziram a sua proporção.

As células de Leydig organizam-se em cordões circundando os túbulos seminíferos e seguindo primariamente o curso dos vasos sanguíneos e linfáticos (24), o que reflete a função endócrina dessas

células (27). Embora elas sejam o elemento constituinte do compartimento intertubular que apresenta maior variação percentual entre as espécies já estudadas, os outros componentes do espaço intertubular também apresentam variações, porém menos evidentes, entre as espécies (8). O tecido conjuntivo, por exemplo, corresponde a 7% do parênquima testicular do suíno Piau (9), 7,5% no cão (22) e 8% em capivaras (21). Por sua vez, o espaço linfático ocupa cerca de 3,5% do parênquima testicular na maioria dos animais estudados (25). Nos camundongos-controle, aos 160 dias de idade observaram-se também cerca de 3,5% de vasos linfáticos no testículo, enquanto nos animais tratados perinatalmente com ultra-som, em doses de diagnóstico clínico, estes valores corresponderam a 1,17% ($p < 0,05$, Quadro 3).

QUADRO 2 - Proporção volumétrica de célula de Leydig, índice Leydigossomático (ILS), volumes médio total e individual de célula de Leydig e número de célula de Leydig por testículo e por grama de testículo, em camundongos-controle e tratados com ultra-som de baixa intensidade. Dados apresentados em média \pm desvio-padrão		
	Tratado	Controle
n	11	11
% célula de Leydig	8,34 \pm 2,08	7,3 \pm 2,45
ILS %	0,095 \pm 0,02	0,082 \pm 0,03
Volume de uma célula de Leydig ($\times 10^{-10}$ ml)	3,072 \pm 0,46*	2,611 \pm 0,0051*
Volume total de células de Leydig (ml)	0,0193 \pm 0,005	0,018 \pm 0,003
N ^o de célula de Leydig/testículo ($\times 10^6$)	21,34 \pm 9,705	20,08 \pm 5,51
N ^o de célula de Leydig/grama de testículo ($\times 10^6$)	84,99 \pm 37,07	84,84 \pm 2,33
* valores na mesma linha diferem significativamente ($p < 0,05$). n = número de animais.		

Gatos, cães, macaco *Cebus apella* e humanos, maduros sexualmente, que receberam estímulos em doses terapêuticas diretamente sobre o testículo apresentaram significativa supressão da espermatogênese,

porém não tiveram afetados as células de Leydig ou os níveis sanguíneos de testosterona (7). Neste trabalho, os camundongos estimulados perinatalmente com ultra-som de baixa intensidade não apresentaram diferença na proporção volumétrica dos túbulos seminíferos em relação aos animais-controle ($p > 0,05$). Com exceção dos vasos linfáticos, os demais componentes testiculares analisados não apresentaram diferença ($p > 0,05$) entre controles e tratados (Quadro 3).

QUADRO 3 - Proporção volumétrica (%) de túbulos seminíferos, espaço intertubular, vasos sanguíneos, tecido conjuntivo e vasos linfáticos em camundongos-controle e tratados com ultra-som de baixa intensidade. Dados apresentados em média \pm desvio-padrão		
	Tratado	Controle
n	11	11
Túbulos seminíferos	90,57 \pm 3,7	88,12 \pm 2,7
Espaço intertubular	10,76 \pm 2,8	11,85 \pm 2,7
Vasos sanguíneos	0,57 \pm 0,14	0,54 \pm 0,13
Tecido conjuntivo	0,65 \pm 0,23	0,50 \pm 0,1
Vasos linfáticos	1,17 \pm 0,65*	3,48 \pm 0,2*

* valores na mesma linha diferem significativamente ($p < 0,05$).
n = número de animais.

CONCLUSÕES

1) O uso do ultra-som de baixa intensidade no período perinatal, em camundongos, leva a aumento dos pesos corporal e das glândulas vesiculares e da concentração sérica de testosterona.

2) A estimulação por ultra-som de baixa intensidade, no período perinatal, aumenta consideravelmente o volume individual das células de Leydig de camundongos antes de sua proliferação.

3) Há alterações na proporção volumétrica e no volume total das células de Leydig por testículo, no número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo nos animais submetidos ao ultra-som na fase perinatal.

4) Há redução na proporção volumétrica dos vasos linfáticos dos animais submetidos ao ultra-som na fase perinatal.

REFERÊNCIAS

1. CARNES, K. I.; HESS, R. A. & DUNN, F. Effects of in utero ultrasound exposure on the development of the fetal mouse testis. *Biol. Reprod.*, 45:432-9, 1991.

2. CARNES, K.I.; HESS, R. A. & DUNN, F. The effect of ultrasound exposure in utero on the development of the fetal mouse testis: adult consequences. *Ultrasound Med. Biol.*, 9:1247-57, 1995.
3. CASTRO, A.C.S.; BERNDTSON, W.E. & CARDOSO, F.M. Plasma and testicular testosterone levels, volume density and number of Leydig cell and spermatogenic efficiency of rabbits. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 35:493-8, 2002.
4. DE KRETZER, D.M. & KERR, J.B. The cytology of the testis. In: Knobil, E.; Neil, J.D.; Greenwald, G.S.; Markert, C. L. & Pfaff, D.W. (eds.). *The physiology of reproduction*. New York, Raven Press, 1994. p. 1177-290.
5. EWING, L. L.; ZIRKIN, B. R.; COCHRAN, R. C.; KROMANN, N.; PETERS, C. & RUIZ-BRAVO, N. Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cell mass. *Endocrinology*, 105:1135-42, 1979.
6. FAHIM, M.S.; FAHIM, Z. & AZZAZI, F. Effect of ultrasound on testicular electrolytes (sodium and potassium). *Arch. Androl.*, 1:179-84, 1978.
7. FAHIM, M.S.; FAHIM, Z.; HARMAN, J.; THOMPSON, I.; MONTIE, J. & HALL, D.G. Ultrasound as a new method of male contraception. *Fertil. Steril.*, 28:823-31, 1977.
8. FAWCETT, D. W.; NEAVES, W. B. & FLORES, M. N. Comparative observations on intertubular lymphatic and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biol. Reprod.*, 9:500-32, 1973.
9. FRANÇA, L.R. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. Belo Horizonte, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 1991. 180p. (Tese de doutorado).
10. FRANÇA, L. R. & RUSSELL, L. D. The testis of domestic animals. In: Regadera, J. & Martinez-Garcia, F. (eds.). *Male reproduction. A multidisciplinary overview*. Madrid, Churchill Livingstone, 1998. p.197-219.
11. GE, R.S.; SHAN, L.X. & HARDY, M.P. Pubertal development of Leydig cells. In: Payne, A. H.; Hardy, M.P. & Russell, L.D. (eds.). *The Leydig cell*. Vienna, IL, Cache River Press, 1996. p.159-74
12. HADDAD, S.; FRANCI, J.A.; PETENUSCI, S.O. & CARVALHO, T.L.L. Low-intensity ultrasound energy applied to the testes of aged rats. *Histol. Histopathol.*, 13:385-9, 1998.
13. HADDAD, S.; CARVALHO, T. L. L.; FRANCI, J. A.; PETENUSCI, S. O. & FAVARETTO, A. L. Ultrasound stimulation of rat testes damaged by busulfan. *Ultrasound Med Biol.*, 23:1421-5, 1997.
14. HADDAD, S.; PETENUSCI, S. O.; FRANCI, J. A. & CARVALHO, T. L. L. Stimulation of prepubertal, pubertal and adult rat testis with low-intensity pulsed ultrasound. *Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys.*, 102:13-6, 1994.
15. HUHTANIEMI, I. & PELLINIEMI, L. J. Fetal Leydig cells: cellular origin, morphology life span, and special functional features. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 201:125-40, 1992.
16. KEMNITZ, J. W.; SLADKY, K. K.; FLITSCH, J. T.; POMERANTZ, M. S. & GOY, W. R. Androgenic influences on body size and composition of adult rhesus monkeys. *Amer. Physiol. Soc.*, 6:857-64, 1988.
17. MAYLIA, E. & NOKES, L.D. The use of ultrasonic in orthopedics-A review. *Technol. Health Care*, 7:21-8, 1999.
18. MENDIS-HANDAGAMA, S. M.; ZIRKIN, B. R. & EWING, L. L. Comparison of components of the testis interstitium with testosterone secretion in hamster, rat and guinea pig testes perfused in vitro. *Am. J. Anat.*, 181:12-22, 1988.
19. NAVARRO, R.D. & PAULA, T.A.R. Efeito da estimulação pré e pós-natal por ultrassom de baixa intensidade sobre parâmetros biométricos corporais, testiculares e das

- glândulas vesiculares em camundongos (*Mus musculus*) machos adultos. Rev. Bras. Reprod. Anim., 25:212-3, 2001.
20. NETO, J.P. Anabolizante e pecuária de corte. Revista de Educação Continuada do CRMV – SP, 1:10–5, 1998.
 21. PAULA, T. A. R. Avaliação histológica e funcional do testículo de capivaras adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Belo Horizonte, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 1999. 84p. (Tese de doutorado).
 22. PAULA, T.A.R. & CARDOSO, F. M. Alterações etárias na espermatogênese do cão. I. Análise histométrica. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., 46:19-30, 1994.
 23. RAMIREZ, A.; SCHWANE, J.A.; MCFARLAND, C. & STARCHER, B. The effect of ultrasound on collagen synthesis and fibroblast proliferation in vitro. Med. Sci. Sports Exerc., 29:326-32, 1997.
 24. RUSSELL, L.D. Mammalian Leydig cell structure In: Payne, A.H.; Hardy, M.P. & Russell, L.D. (eds.). The Leydig cell. Vienna, Cache River, 1996. p. 43-96.
 25. RUSSELL, L.D. & FRANÇA, L.R. Building a testis. Tiss. Cell, 27:129-47, 1995.
 26. SAMPAIO, I.B.M. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte, Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221p.
 27. SILVA JR., V.A. & FRANÇA, L. R. Células de Leydig e esteroidogênese em mamíferos. Cad. Téc. Vet. Zootec., 35:15-29, 2001.
 28. STABENFELDT, G.H. & EDQVIST, L.E. Processos reprodutivos do macho. In: Swenson, M.J. & Reece, W.O. (eds.). Fisiologia dos animais domésticos. 11ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1993. p. 603-14.
 29. TANZER, M.; HARVEY, E.; KAY, A.; MORTON, P. & BOBYN, J.D. Effect of noninvasive low intensity ultrasound on bone growth into porous-coated implants. J. Orthop. Res., 14:901-6, 1996.
 30. TIMMERMANS, L. Morphological effect of low intensity ultrasounds on urogenital organs of male mice. R. C. Seances Soc. Bol. Fil., 167:1485-7, 1973.
 31. URRY, R.L.; DOUGHERTY, K.A.; CHILD, S.A.; FERNANDEZ, F.; LINKE, C. A. & CARSTENSEN, E. Ultrasound and spermatogenesis in the rat. Ultrasound Med. Biol., 14:213-7, 1988.
 32. ZIRKIN, B. R.; EWING, L. L.; KROMANN, N. & COCHRAN, R. C. Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog, and hamster testes perfused in vitro: Correlation with Leydig cell ultrastructure. Endocrinology, 107:1867-74, 1980.