

FAUSTO SILVA FERRAZ

**MORFOFISIOLOGIA TESTICULAR DE SAGUIS HÍBRIDOS DE VIDA LIVRE  
(CALLITRICHIDAE: PRIMATAS), RIO DE JANEIRO - RJ, BRASIL**

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

VIÇOSA,  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2015

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

F381m  
2015 Ferraz, Fausto Silva, 1986-  
Morfofisiologia testicular de saguis híbridos de vida livre  
(Callitrichidae: Primatas), Rio de Janeiro - RJ, Brasil / Fausto  
Silva Ferraz. – Viçosa, MG, 2015.  
xii, 63f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexo.

Orientador: Laércio dos Anjos Benjamim.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.52-63.


1. *Callithrix* - Morfologia. 2. Testículo. 3. Híbridação.  
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária.  
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

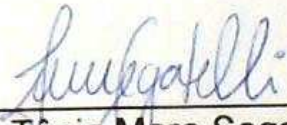
CDD 22. ed. 599.84

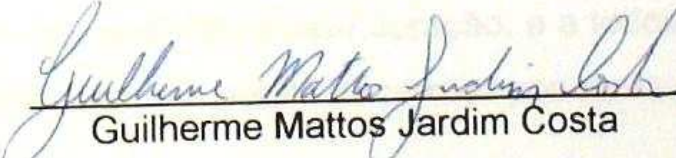
**MORFOFISIOLOGIA TESTICULAR DE SAGUIS HÍBRIDOS DE VIDA LIVRE  
(CALLITRICHIDAE: PRIMATAS), RIO DE JANEIRO – RJ, BRASIL**

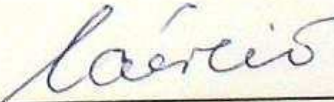
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 25 de fevereiro de 2015.

  
\_\_\_\_\_  
Ita de Oliveira e Silva  
(Coorientadora)

  
\_\_\_\_\_  
Tânia Mara Segatelli

  
\_\_\_\_\_  
Guilherme Mattos Jardim Costa

  
\_\_\_\_\_  
Laércio dos Anjos Benjamin  
(Orientador)

Dedico este trabalho à minha querida mãe, Márcia Maria da Silva, por ter-me proporcionado um lar amoroso e instrutivo; à minha irmã, Dinamácia da Silva Spírito, pelas sensatas e fraternas orientações; à Ludmila Ferraz Arêdes, com quem compartilho o meu coração; e a todos aqueles que vivem adquirindo e aperfeiçoando o hábito de pensar por conta própria.

### ***Aprendizado de amor***

*Dá do que tens e do que és a benefício dos outros.  
Se os outros não te compreendem, auxilia-os, mesmo assim.  
Se te perseguem ou caluniam, continua fazendo o melhor em benefício deles.  
Se te repelem, prossegue no esforço de ampará-los como puderes.  
É assim que o amor começa, e onde o amor se faz presente aí está Deus.  
E onde Deus está nada falta, para que sejas feliz.*

*Emmanuel*

*(Retirada do Livro "Seara de Fé" – Psicografada por Francisco C. Xavier)*

## AGRADECIMENTOS

Pai celestial,

Agradeço-te por essa maravilhosa conquista. É um degrau a mais na minha escala evolutiva. Que as tuas bênçãos se irradiem sobre a vida dos meus professores:

**Dr. Laércio dos Anjos Benjamin**, pela excelência abalizada de sua orientação a mim dispensada e por sempre confiar na minha amizade que lhe devoto; agradeço-lhe, principalmente, pelos generosos ensinamentos (além dos que lhe eram exigidos pela sua função) cujo teor me enriqueceram e dilataram-me a consciência moral e intelectual, nesse tão pouco tempo de convívio.

**Dr. Vanner Boere** e **Dra. Ita de Oliveira e Silva**, por serem duas almas gentis e dadivosas a tal ponto de intensificarem, em mim, o interesse pelo fascinante e magnífico campo científico. A humildade com que ambos fazem isso é admirável.

**Dra. Tânia Mara**, por aceitar meu convite em participar e somar seus conhecimentos junto à dissertação.

**Dr. Carlos Ruiz Miranda**, por confiar-me a responsabilidade pelos animais, com os quais desenvolvemos os nossos trabalhos.

**Dr. Guilherme M. J. Costa**, por ter possibilitado a mim a viabilização desta dissertação, através da clareza de seus conselhos, apoio e forte incentivo.

Sou extremamente grato à minha mãe, **Márcia Maria da Silva**, pelo seu altruísmo e amor incondicional; ao meu pai, **Mário Lúcio Ferraz**, pela sensatez nos corretivos que me foram aplicados, quando os mesmos se fizeram necessários; à minha dedicada irmã, **Dinamércia Espírito**, pelas opiniões e palavras inspiradoras repletas de lúcido discernimento. Também sou grato aos meus sogros, **Sra. Dalila Ferraz** e **Sr. Melchiades Arêdes** por sempre me apoiarem em todos os sentidos; e a mim confiarem a mais linda “flor”, sua filha **Ludmila Ferraz Arêdes**, cujo companheirismo sincero muito me tem sustentado no propósito do bem. Aos meus tios **Maurio**, **Filomena** e minha prima **Marina Stela**, por sentirem em mim a dedicação de afeto que tenho por eles, ao primo **Lucas** e à minha querida tia **Lúcia**, pois sem saberem, foram uns dos pilares dessa conquista.

Agradeço a todos os meus **AMIGOS** que, direta ou indiretamente, se mantiveram “A POSTOS” em minhas alegrias e alusões desta vida!

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão da bolsa de estudos que permitiu a realização do presente projeto.

À **Petrobrás Transporte S.A. (TRANSPETRO)** pelo apoio financeiro nas capturas.

Agradeço, também, ao **Setor de Etologia e Reintrodução de Animais Silvestres (SERCAS)** e à **Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF)**, onde pude realizar os primeiros procedimentos da coleta de material; ao **Setor de Reprodução Animal - Laboratório de Morfofunção de Peixes, Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (UFV)**, onde foi feita toda análise biométrica e morfométrica; e, por último, ao **Laboratório de Biologia Celular do Departamento de Morfologia - Instituto de Ciências Biológicas (UFMG)**, onde pude realizar a análise estatística dos dados.

## BIOGRAFIA

Fausto Silva Ferraz nasceu em 30 de maio de 1986 na Santa Casa de Saúde “Santa Lúcia”, em Muriaé-MG. É filho caçula de Márcia Maria da Silva e Mário Lúcio Ferraz. Concluiu o estudo fundamental na Escola São Paulo. Teve o início do estudo médio na Escola Estadual Professor Orlando de Lima Faria, completando-o no Colégio Anglo-Equipe, sempre em Muriaé-MG. Ingressou, no ano de 2007, no curso de Ciências Biológicas da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, Santa Marcelina – FAFISM, também em Muriaé-MG, curso que foi concluído em 2010. Em 2012, deu início ao mestrado em Medicina Veterinária, na Universidade Federal de Viçosa, MG. Neste seu empenho para a concentração nesse tão almejado mestrado, tem o privilégio de ser orientando do digníssimo Professor Dr. Laércio dos Anjos Benjamin. Pode contar, também, sempre que se faz necessário, com a assistência de outros notáveis professores. Conta, ainda, com a contribuição de generosos colegas, quando uma ajuda é solicitada.

## SUMÁRIO

	<b>Pág.</b>
<b>RESUMO</b>	<b>x</b>
<b>1. ABSTRACT</b>	<b>xii</b>
<b>2. INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>1</b>
<b>2.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>2</b>
2.2. Validade das espécies	2
2.3. Conservação e reprodução	3
2.4. Hibridação	4
2.5. Estrutura do testículo	5
2.6. Espermatogênese	7
2.7. Espermatogênese em primatas	10
<b>2.8. Caracterização do estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero investigado por meio do método da morfologia tubular</b>	<b>10</b>
<b>3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b>	<b>15</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>16</b>
4.1. Histologia dos animais	16
4.2. Procedência e qualidade das amostras	17
4.3. Delineamento experimental	17
4.3.1. Processamento do material para análise histológica	18
4.4. Histologia quantitativa dos testículos	19
4.4.1. Proporção volumétrica (%) e volume dos componentes testiculares e seus índices reprodutivos	19
4.4.2. Diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero e comprimento total dos túbulos seminíferos	21
4.4.3. População de células espermatogênicas e de células de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero	21
4.4.4. Volumes nucleares das células germinativas do estágio 1 do CES	23
4.4.5. Razão entre números celulares	23
4.4.6. . Número de células de Sertoli por testículo	24
4.4.7. Número de células de Leydig por testículo, proporção núcleo- citoplasma das células de Leydig e níveis de testosterona	24
4.4.8. Níveis de testosterona	24

4.5.	Análise estatística	25
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>26</b>
5.1.	Biometria e índice gonadossomático	26
5.2.	Análise morfométrica dos testículos	27
5.2.1.	Proporções volumétricas (%) e volume dos componentes testiculares	27
5.2.2.	Diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero e comprimento total dos túbulos seminíferos	28
5.3.	Contagem celulares e quantificação da espermatogênese	29
5.3.1.	Populações e razões celulares	29
5.3.2.	Número e eficiência da célula de Sertoli	30
5.3.3.	Morfometria, população das células de Leydig, índice leydigossomático e níveis de testosterona	32
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>34</b>
6.1.	Peso corporal, biometria e análise morfométrica dos testículos	34
6.1.1.	Peso corporal e biometria testicular	34
6.1.2.	Análise morfométrica dos testículos	36
6.2.	Contagens celulares e quantificação da espermatogênese	39
6.2.1.	População e razões celulares	39
6.2.2.	Número de células de Sertoli	43
6.2.3.	Morfometria, população das células de Leydig, índice leydigossomático e níveis de testosterona	44
	<b>ANEXO I</b>	<b>50</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>48</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>51</b>

## RESUMO

FERRAZ, Fausto Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2015. **Morfofisiologia testicular de saguis híbridos de vida livre (Callitricidae: Primatas), Rio de Janeiro - RJ, Brasil.** Orientador: Laércio dos Anjos Benjamin. Coorientadores: Ita de Oliveira e Silva e Vanner Boere Souza.

A espermatogênese é um processo biológico altamente eficiente que se inicia com a proliferação das espermatogônias que, após divisões e diferenciação, dão origem aos espermatozoides. O número final de espermatozoides produzidos em uma espécie depende de vários fatores, sendo muito baixo em primatas. As espécies de saguis *Callithrix jacchus* e *Callithrix penicillata* são primatas do Novo Mundo que, por possuírem processos espermatogênicos semelhantes ao do homem, tornam-se modelos experimentais atrativos. Esses saguis filogeneticamente próximos hibridizam gerando indivíduos altamente adaptados e viris em meio natural. O presente estudo descreve a organização morfofuncional dos testículos e quantifica os componentes testiculares, ainda não estudados para este híbrido. Para isso, testículos de nove animais foram obtidos após a eutanásia de saguis machos adultos provenientes do SERCAS - UENF. Os testículos foram fixados em solução de Karnovsky modificada (glutaraldeído a 4% e paraformaldeído a 4% em tampão fosfato 0,05 M, pH 7,3) e processados para estudos em microscopia de luz. Secções de três micrômetros de espessura foram obtidas e coradas com azul de toluidina/borato de sódio. Esses saguis híbridos apresentaram índice gonadossomático de 0,37%, bem maior que observado para espécies de comportamento monogâmico ou poligâmico masculino de dominância, como o homem (0,08%) e o gorila (0,02%) e semelhante ao valor encontrado para o *C. penicillata* (~0,4%), sugerindo que o sagui apresenta comportamento sexual predominantemente promíscuo. O percentual do parênquima ocupado pelos túbulos seminíferos de 87% encontra-se num patamar elevado entre os mamíferos já investigados, e o percentual observado para as células de Leydig (1,4%) é muito baixo. Os valores médios encontrados para o diâmetro tubular (228  $\mu\text{m}$ ) e o comprimento tubular (~20 metros) por grama de testículo encontra-se dentro da faixa média observada para a maioria das espécies de mamíferos já investigadas. Os coeficientes obtidos para as contagens feitas nos saguis híbridos mostraram que as perdas celulares durante a meiose (50%; índice meiótico) são equivalentes a outros

mamíferos e relativamente acima ao citado para o *C. jacchus* e o *C. penicillata* (~15%) seus progenitores, e bastante próxima àquelas citadas para o homem (~70%). O rendimento geral da espermatogênese ficou em torno de 8,3:1 e superior ao do homem (3,2:1). A eficiência da célula de Sertoli foi 3 vezes maior do que o valor citado para o homem. O número de células de Sertoli por grama de testículo (~58 milhões) encontra-se em conformidade a outros mamíferos. A medida encontrada para o volume individual da célula de Leydig (~323 $\mu\text{m}^3$ ) ficou bem abaixo do encontrado para o *C. penicillata* (1400 $\mu\text{m}^3$ ), diferindo também do observado para a maioria dos mamíferos e representando um valor bastante baixo do valor médio citado para o homem (2940-4300 $\mu\text{m}^3$ ). Em contrapartida, existe um maior número dessas células por grama de testículo nos saguis híbridos (47,4 milhões) do que o encontrado para *C. penicillata* (13,9 milhões) e para o homem (9 milhões), fator esse significativo ( $r=0,8$ ) ao se tratar do baixo volume de células de Leydig em correlação com a concentração de testosterona encontrado nos saguis híbridos aqui estudados. Com isso, por meio da morfologia tubular, foi possível concluir que a composição celular do estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero desses saguis híbridos é muito semelhante à relatada para humanos.

## ABSTRACT

FERRAZ, Fausto Silva, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, february of 2015. **Testicular morphophysiology of life free marmosets hybrid (Callitrichidae : Primates), Rio de Janeiro - RJ, Brazil.** Advisor: Laércio dos Anjos Benjamin. Co-advisors: Ita de Oliveira e Silva and Vanner Boere Souza.

Spermatogenesis is a highly efficient biological process that begins with the proliferation of spermatogonia that progressively differentiate into sperms. The final number of sperms produced in a species depends on several factors, being very low in primates. The species of *Callithrix jacchus* and *Callithrix penicillata* marmosets are primates of the New World that have similar spermatogenic process as humans, becoming attractive experimental models. These marmosets phylogenetically close hybridize themselves generating individuals highly adapted and virile in the wild. This study describes the morpho-functional organization of the testicles and quantifies its components, not yet studied for this hybrid. For this, testicles of nine animals were obtained after the euthanasia of adult male marmosets from SERCAS-UENF. The testicles were fixed in glutaraldehyde solution at 4% and 4% paraformaldehyde in 0.05 M phosphate buffer, pH 7.3 and processed for studies in light microscopy. Sections of three micrometers thick were obtained and stained with blue toluidine/sodium borate. These hybrids marmosets showed GSI of 0.37%, much higher than observed in species of monogamous or polygamous male dominance behavior, such as men (0.08%) and the gorilla (0.02%) and similar to the value found to the *C. penicillata* (~0.4%), suggesting that the marmoset presents a behaviour predominantly sexually promiscuous. The percentage of parenchyma occupied by the 87% seminiferous tubules is the highest baseline level in mammals already investigated, and the percentage observed in the Leydig cells (1.4%) is very low. The average values found for the tubular diameter (228  $\mu\text{m}$ ) and the tubular length (~20 meters) per gram of testicles is within the average range observed for most mammalian species that have been investigated. The coefficients for the countings made in hybrid marmosets showed that cell losses during meiosis (50%; meiotic index) are equivalent to other mammals and relatively up to the quoted for *C. jacchus* and *C. penicillata* (~15%) their parents, and very close to those quoted for man (~70%). The spermatogenesis yield was around 8.3:1 and higher to the men (3.2:1). The efficiency of the Sertoli cells was 3 times higher than the value quoted for man. The number of Sertoli cells per gram of testicles (~58 million) is in accordance with

other mammals. The measure found to the individual Leydig cell volume ( $\sim 323\mu\text{m}^3$ ) was below to that found for *C. penicillata* ( $1400\mu\text{m}^3$ ), also differing from the observed for most mammals, and representing a very low value of the mentioned average value for man ( $2940\text{-}4300\mu\text{m}^3$ ). On the other hand, there is a higher number of these cells per gram of testicles in hybrid marmosets (47.4 million) than the one found for *C. penicillata* (13.9 million) and for men (9 million), being a significant factor ( $r=0.8$ ) when dealing with the low volume of Leydig cells in correlation with testosterone concentration found in hybrid marmosets in this study. Thus, through the tubular morphology was concluded that the cellular composition of stage 1 of the seminiferous epithelium cycle of these hybrid marmosets is very similar to that reported for humans.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Os ecossistemas brasileiros vêm passando por um acelerado processo de fragmentação, no qual a maioria das espécies está representada por pequenos conjuntos de populações isoladas. A rapidez da destruição, aliada à grande riqueza biológica, tem colocado as florestas tropicais no centro das atenções conservacionistas. A Mata Atlântica representa atualmente apenas 7% da cobertura da superfície terrestre original, podendo abrigar mais da metade das espécies biológicas brasileiras, a maioria das quais completamente desconhecidas para a ciência (PINTO e BRITO, 2005) e nenhum achado bibliográfico sobre espécies híbridas, constatando aqui o primeiro dado produzido para híbridos de saguis.

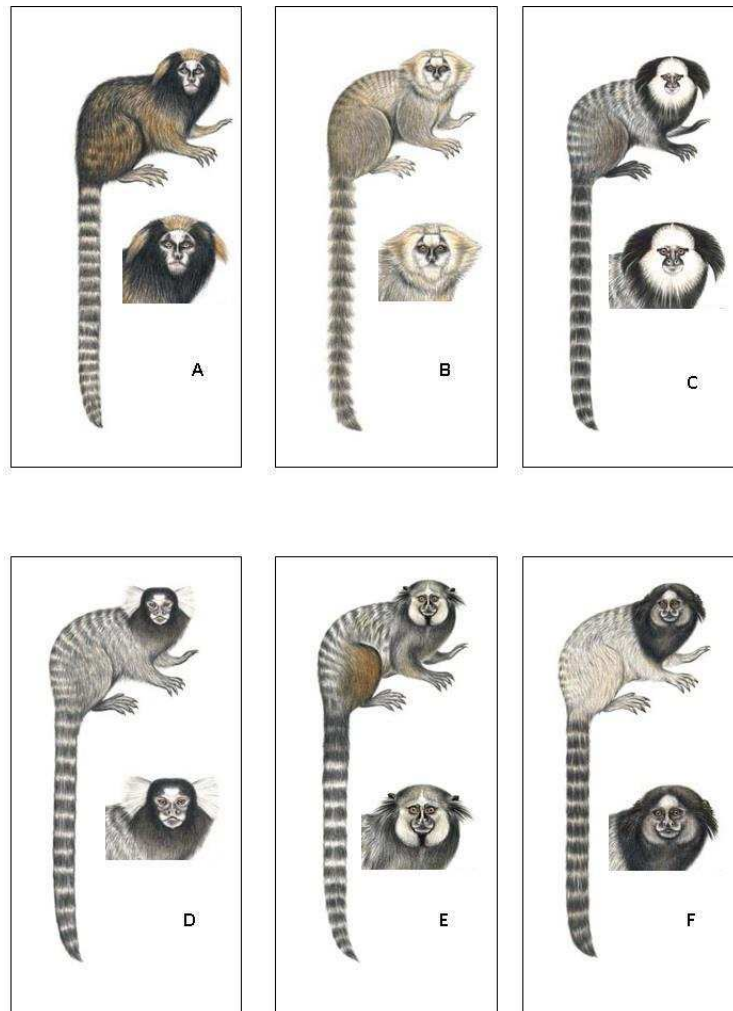
O sagui é um pequeno primata pertencente à família de macacos Callithricidae do Novo Mundo e comumente usado em investigações de biologia reprodutiva, devido ao período relativamente curto necessário para que este gênero atinja a maturidade sexual (12-18 meses de idade), apresetta alta fecundidade, facilidade de manuseio, de custo relativamente baixo quando comparado com outros primatas oriundos de criadouros, e também sua relação filogenética próxima à dos seres humanos (BICCA-MARQUES, 2007). Apesar da relação filogenética muito estreita entre *C. penicillata* e *C. jacchus*, há pouca informação científica a respeito dos órgãos reprodutivos masculinos, e especialmente sobre a espermatogênese do sagui-de-tufos-preto (*C. penicillata*).

O estudo da fisiologia testicular dessas populações híbridas torna-se demasiadamente necessário visto que os mecanismos pré-copulatórios e pós-copulatórios não estabelecem um isolamento reprodutivo, possivelmente pelo histórico da ação antrópica atuando nessas duas espécies de calitriquídeos. Por outro lado, a avaliação histológica precisa dos testículos pode dar respostas a perguntas importantes sobre a estrutura e função testiculares e a identificação das fases do ciclo do epitélio seminífero, além das correlações com os achados fisiológicos e bioquímicos. Desta forma, a proposta do presente trabalho foi a realização de uma investigação cuidadosa e precisa da histologia e morfometria do testículo de calitriquídeos híbridos gerados pelo cruzamento de *C. penicillata* e *C. jacchus*.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Validade das espécies

Evidências morfológicas (HERSHKOVITZ, 1977; MITTERMEIER E COIMBRO-FILHO, 1981; VIVO, 1991; NATORI, 1994), biogeográficas (HERSHKOVITZ, 1977; VIVO, 1991, apud MENDIS, 1997) e genéticas (MEIRELES et al., 1992; SAMPAIO et al., TAGLIARO et al., 1997, apud MENDIS, 1997), têm sido utilizadas na identificação das espécies do gênero *Callithrix* sendo este composto por seis espécies válidas: *C. penicillata*, *C. jacchus*, *C. aurita*, *C. flaviceps*, *C. geoffroyi* e *C. kuhlii* (Figura 1).



**Figura 1.** Seis espécies válidas de calitriquídeos: (A) *C. aurita*, (B) *C. flaviceps*, (C) *C. geoffroyi*, (D) *C. jacchus*, (E) *C. kuhlii* e (F) *C. penicillata*.  
Fonte: FORD (2009).

Em contrapartida, MENDES (1997) coloca que as hipóteses evolutivas para *Callithrix* são bastante especulativas, e devem ser vistas como uma grande simplificação filogenética de processos muito mais complexos e dinâmicos. Embora as espécies *C. penicillata* e *C. jacchus* tenham a maior distribuição geográfica para o gênero e tenham sido introduzidas fora da sua área natural de distribuição, as populações têm declinado enormemente em decorrência da destruição de habitats (COIMBRA-FILHO, 1984).

## **2.2. Conservação e reprodução**

Estratégias como a preservação pela proteção dos habitats ou pela propagação natural em zoológicos não têm se mostrado práticas e adequadas para a conservação dos recursos genéticos do planeta. Os problemas advêm, no primeiro caso, da dificuldade em selecionar qual ou quais habitats devem ser preservados, pois algumas espécies, como os grandes predadores que se encontram no topo da cadeia alimentar, requerem áreas muito extensas, gerando um custo social adicional, e necessitam de financiamentos vultosos que assegurem o sucesso dos projetos. Já a manutenção de espécies em cativeiro representa uma fração pouco significativa dentro da dimensão que o problema vem alcançando (WILDT, 1992).

A escassez de conhecimentos sobre como e porque espécies e ecossistemas sobrevivem ou degeneram é um fator crítico no campo da conservação. Assim, os bancos de germoplasma, com a criopreservação de sêmen e seus derivados, dos tecidos e do DNA, fornecem um rico material para o desenvolvimento de pesquisas básicas e aplicadas. Porém, essas iniciativas de conservação dependem do profundo conhecimento da biologia reprodutiva das diferentes espécies, principalmente aquelas que hibridizam. Muitos estudos revelam que a fisiologia e a morfologia, mesmo de espécies intimamente relacionadas, apresentam diferenças marcantes, dificultando a extrapolação das técnicas dominadas para aquelas espécies pouco conhecidas. Portanto, as biotécnicas somente serão aplicadas com sucesso nas práticas conservacionistas, após o domínio dos conhecimentos relativos à anatomia e à histologia dos órgãos reprodutivos, à gametogênese e a mecanismos gerais que regulam o processo da reprodução (ZÚCCARI & BEZERRA, 2006).

Conforme será descrito adiante, o presente estudo terá como objetivos principais a investigação da função testicular de saguis híbridos empregando-se material preparado para análises morfológicas e morfométricas que permitam análises bastante precisas. Os resultados serão comparados com os dados já adquiridos para os progenitores já estudados. Com o advento de novas tecnologias aplicadas à biologia da reprodução, como o transplante de espermatogônias (BRINSTER & AVARBOCK, 1994; BRINSTER & ZIMMERMANN, 1994; FRANÇA & RUSSEL, 2000; NAGANO et al., 2001; BRINSTER, 2002; FREDERICKX *et al.*, 2004) e o enxerto de fragmentos testiculares interespecíficos (HONARAMOOZ *et al.*, 2002; SCHLATT et al., 2003; OATLEY et al., 2004), os saguis híbridos que constatados como risco de causarem “impacto ambiental”, podem tornar-se um modelo experimental bastante atraente e que eventualmente servirá como receptor de células tronco e de fragmentos testiculares de outros primatas, incluindo-se aí a espécie humana.

O parâmetro andrológico de mamíferos representa o cuidado diagnóstico e prognóstico da saúde do macho, especificamente no que se refere à função sexual do macho, ao sistema reprodutor do mesmo, além de estimar a taxa de produção espermática e fornecer informações a respeito da normalidade do órgão (AMANN, 1970<sup>a</sup>; AMANN & SCHANBACHER, 1983; FRANÇA & RUSSELL, 1998). Ao se tratar de animais com histórico de hibridação em condições naturais o parâmetro andrológico nos diz muito sobre o estado biológico e histológico dos órgãos reprodutores. Maiores variações no peso testicular para as diferentes espécies podem ser observada em espécies que não sofrem seleção contínua para a reprodução (JOHNSON et al., 1980; CLEMMONS et al., 1995; PAULA, 1999; GODINHO, 1999; ALMEIDA, 2002).

### **2.3. Hibridação**

A colonização de ambientes mais abertos e reprodutivos são características adaptativas que tanto *C. jacchus* e *C. penicillata* adquiriram com maior adaptação para a exploração de gomas (RYLANDS & FARIA, 1993). Ambas as espécies colonizaram eficientemente as regiões de cerrado e caatinga, que incluem florestas caducifólias, altamente sazonais. Supõe-se que essas espécies tenham potenciais adaptativos próximos, no que tange à ocupação de paisagens abertas, sendo *C.*

*penicillata* ligeiramente mais eficiente em termos competitivos em cerrado e *C. jacchus* em caatinga (MENDES, 1997).

Em cativeiro, foram realizadas várias experiências de cruzamentos entre estas duas espécies (COIMBRA-FILHO, 1970; 1971 e 1978; juntamente com Mittermeier, 1974), tendo sido obtidas até três gerações férteis de híbridos. A presença de híbridos em ambiente natural foi descrita por ALONSO et al. (1987), que identificaram a presença de espécimes com fenótipo híbrido entre *C. jacchus* e *C. penicillata* no Recôncavo Baiano, restritos a uma faixa estreita (menos de 50 Km), embora esta seja uma área com forte perturbação antrópica, o que poderia favorecer a quebra dos mecanismos de isolamento.

Considerando a ampla distribuição geográfica de *C. jacchus* e *C. penicillata* e o fato da hibridação documentada por ALONSO et al. (1987), ambas as espécies possuem o mesmo número diplóide de cromossomos e ocorrem justamente numa zona de transição entre regiões fitoecológicas, acreditando-se que o padrão observado é perfeitamente previsível para um grupo de espécies em que os potenciais adaptativos ecológicos explicam grande parte dos limites biogeográficos.

No entanto, a hibridação dessas duas espécies não enquadra como região fitoecológica o estado do Rio de Janeiro, anulando qualquer hipótese de zona de transição natural, uma vez que ambas são espécies exóticas para a região. Na natureza, foram encontrados híbridos em Santo Amaro, e no norte de Salvador, no Estado da Bahia, sendo estas populações estudadas por ALONSO et al. (1987). Neste trabalho foram descritos até cinco padrões intermediários entre as formas típicas das duas espécies. COIMBRA-FILHO et al. (1993) pressupõem que os híbridos vêm sendo o resultado de muitos anos de introduções casuais nessa região onde não existiam originalmente, ou que era habitada apenas por *C. penicillata*. Outra evidência é descrita por SANT'ANNA (2003) na Ilha de Santa Catarina, onde pelo menos três espécies de saguis foram introduzidas através de solturas aleatórias nas últimas décadas: *C. penicillata*, *C. jacchus* e *C. geoffroyi*. O *C. penicillata*, espécie do cerrado e matas dos estados de São Paulo, Minas Gerais, Goiás e interior da Bahia, hipoteticamente poderiam fazer parte de uma expansão natural. No entanto, isto é duvidoso, visto que existe uma grande descontinuidade na distribuição, e a Serra do Mar tem sido historicamente uma barreira geográfica para essa espécie.

O *C. jacchus*, espécie também alóctone nessa região é nativo da Floresta Atlântica do nordeste brasileiro e, dificilmente, chegaria ao Rio de Janeiro como resultado de um processo de expansão geográfica natural, embora em ambos os casos tenha-se informações que confirmam a ocorrência de introduções deliberadas, PAULA *et al.* (2008).

#### **2.4. Estrutura do testículo**

O testículo está sob o controle de hormônios gonadotróficos produzidos pela hipófise anterior, sendo um órgão glandular formado por uma porção exócrina e uma porção endócrina. Geralmente, em mamíferos está localizado no escroto e envolvido por uma espessa cápsula de tecido conjuntivo, a túnica albugínea. Esta túnica envia trabéculas de tecido conjuntivo (os septos testiculares) de forma espécie específica, para o interior do órgão até a região do mediastino testicular, dividindo-o em lóbulos. Existe ainda uma grande variação entre as diferentes espécies de mamíferos com relação à quantidade de tecido conjuntivo que formam estas trabéculas (FRANÇA & RUSSELL, 1998; PAULA, 1999; SILVA JR., 2000; ALMEIDA, 2002). A artéria testicular e seus ramos e veias correm na face interna da túnica albugínea, sendo normalmente bastante visíveis (AMANN, 1981a).

O testículo é constituído por dois compartimentos: o compartimento tubular e o intertubular ou intersticial. No primeiro, responsável pela produção de espermatozóides, encontram-se os túbulos seminíferos, os quais se conectam através de duas extremidades à *rete testis*, localizada na região do mediastino testicular. A maioria dos mamíferos possui na maior parte do testículo, 70% a 90% do parênquima testicular de túbulos seminíferos. Os túbulos seminíferos são constituídos a partir de sua porção externa para a interna, de túnica própria, epitélio e lume. Na túnica própria, podem ser observadas as células mióides ou peritubulares, a membrana basal e fibras colágenas. Dois tipos celulares de origens embrionárias diferentes estão presentes no epitélio seminífero: as células de Sertoli, de origem somática, provenientes do epitélio celomático, e as células germinativas ou espermatogênicas, originárias do epiblasto (FAWCETT *et al.*, 1973; FRANÇA & RUSSELL, 1998; PAULA, 1999). Os componentes do compartimento intertubular são representados pelas células de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e uma população celular variável do tecido conjuntivo constituída principalmente de

fibroblastos, macrófagos e mastócitos (RUSELL *et al.*, 1990a; SETCHELL, 1991). Dentro do lume tubular encontra-se o fluido secretado pelas células de Sertoli e os espermatozóides recém espermiados em animais sexualmente maduros (SETCHELL, 1991).

As células de Sertoli, juntamente com as células mióides, sintetizam a membrana basal que serve de suporte estrutural para a própria célula de Sertoli e para as células germinativas (DYM, 1994). As junções de oclusão entre as células de Sertoli dividem o epitélio seminífero em dois compartimentos, o compartimento basal e o compartimento adluminal, no qual se encontram os espermatócitos primários a partir da fase de zigóteno, espermatócitos secundários e espermátides. A célula de Sertoli controla o compartimento adluminal, que propicia um microambiente isolado e imunoprivilegiado denominado barreira de célula de Sertoli, sendo essencial para desenvolvimento das células espermatogênicas (RUSSEL *et al.*, 1990a; SETCHELL, 1991; POCCIA, 1994; SHARPE, 1994).

Variações são observadas nos números de células germinativas e de células de Sertoli e nas dimensões (diâmetro e comprimento) dos túbulos seminíferos de espécie para espécie em mamíferos (FRANÇA & RUSSEL, 1998), como exemplo o suíno doméstico que apresenta de várias centenas a alguns poucos milhares de túbulos seminíferos e aproximadamente 6000 metros de túbulos no total (FRANÇA & RUSSELL, 1998). Já o camundongo, possui aproximadamente 20 túbulos seminíferos por testículo perfazendo um total cerca de dois metros de comprimento tubular por testículo (BASCUM & OSTRUD, 1925). Observa-se, na maioria dos mamíferos, um valor para o diâmetro tubular em torno de 180µm a 300µm (ROOSEN-RUNGE, 1977; SETCHELL *et al.*, 1994, FRANÇA & RUSSELL, 1998).

## **2.5. Espermatogênese**

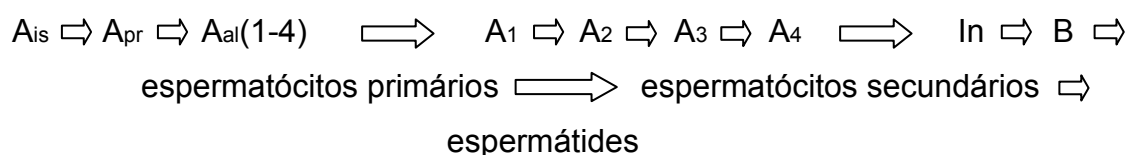
A espermatogênese é um processo cíclico e regular, altamente complexo, que ocorre dentro dos túbulos seminíferos onde uma célula tronco passa por sucessivas divisões mitóticas e mitoses, dando origem a uma célula haplóide altamente especializada denominada de espermatozóide (FRANÇA & RUSSELL, 1998; FRANÇA *et al.*, 1998; GODINHO, 1999; ALMEIDA, 2002). Este é considerado o sistema auto-renovável mais produtivo do corpo animal, no qual milhões de espermatozóides são produzidos diariamente por grama de testículo, a partir das

espermatogônias tronco (COUROT et al., 1970; CLERMONT, 1972; ORTAVANT et al., 1977; De ROOIJ & RUSSELL, 2000).

Nos adultos, a espermatogênese é um processo contínuo que pode ser dividido em três fases distintas (RUSSELL et al., 1990a; SHARPE, 1994):

- (a) Fase mitótica, também chamada de fase proliferativa ou espermatogonial, na qual sucessivas e rápidas divisões mitóticas ocorrem com as espermatogônias, como um processo auto-renovável;
- (b) Fase meiótica ou espermatocitária, importante para o fluxo gênico entre membros de uma mesma espécie como também para a especiação, pois o material genético é duplicado, recombinado e segregado; e
- (c) Fase de diferenciação ou espermiogênica, na qual as células haplóides formadas se diferenciam em espermatozóides, que são células altamente especializadas e estruturalmente equipadas para alcançar e fertilizar os óocitos.

Desta forma, três tipos de células germinativas estão envolvidas neste processo: as espermatogônias, os espermatócitos e as espermátides. As espermatogônias possuem duas categorias básicas de classificação, as espermatogônias indiferenciadas e as diferenciadas (DE ROOIJ, 1998). Com isso, podem ser colocadas em duas categorias, sendo a primeira das espermatogônias indiferenciadas, incluindo espermatogônias isoladas ( $A_{is}$ ), pareadas ( $A_{pr}$ ) e alinhadas ( $A_{al}$ ), sendo a  $A_{is}$ , considerada funcionalmente como espermatogônia tronco. Trabalhos de CHIARINI-GARCIA & RUSSEL (2001) e CHIARINI-GARCIA *et al.* (2001), preconizam que espermatogônias indiferenciadas possuem nichos e regiões específicas no epitélio seminífero. Quando essas espermatogônias passam para o tipo A ( $A_1$ - $A_4$  em várias espécies de mamíferos), intermediária (In) e tipo B, são consideradas espermatogônias diferenciadas, estando comprometidas de forma irreversível com a formação dos espermatozóides.



De acordo com DE ROOIJ & RUSSEL (2000), não ocorre divisão mitótica da  $A_{a1}$  para  $A_1$  nessa etapa da fase espermatogonial. Vale ressaltar que existem várias diferenças em relação ao número de gerações de espermatogônias diferenciadas em mamíferos. Foram encontradas duas gerações para humanos (*Homo sapiens*), quatro para saguis (*Callithrix jacchus*) e cinco para macaco *rhesus* (*Macaca mulata*) (FRANÇA et al., 2002; MILLAR et al., 2000), embora para todas as espécies de mamíferos estudadas até o momento não tenha sido encontrado um número de gerações superior a seis (DE ROOIJ & GROOTEGOED, 1998; FRANÇA & RUSSEL, 1998; FRANÇA et al., 2002).

Em grande parte das espécies de mamíferos já estudados, bem como roedores de laboratório (camundongos e ratos), ruminantes e cão, existem seis gerações de espermatogônias diferenciadas ( $A_{1-4}$ ; In e B), enquanto para o equino e o coelho, cinco gerações de espermatogônias são descritas. Em primatas, o menor número de gerações espermatogônias (duas) é encontrado no homem (SINHA-HIKIN et al., 1985<sup>a</sup>), enquanto que no *M. mulatta*, *M. fascicularis* e *M. arctoides* são encontradas cinco gerações (FRANÇA et al., 2002). Na tabela 1 observa-se o número de gerações espermatogoniais como um dos principais fatores relacionados com a eficiência deste tipo celular e seu índice meiótico. Também na tabela 1, estudos indicam a presença de cinco gerações de espermatogônias para sagui *C. jacchus* (MILLER et al., 2000; WEINBAUER et al., 2001; MILLAR, et al., 2001), sendo esta espécie uma das progenitoras dos híbridos aqui estudados.

**TABELA 1.** Número de gerações de espermatogônias e índice meiótico em diferentes mamíferos.

Espécies	Geração		Referências
	Espermatogonial <sup>1</sup>	Índice meiótico <sup>2</sup>	
Rato	6 (A <sub>1-4</sub> ; In, B)	3,4 (15)*	CLERMONT & BUSTOS-OBREGON, 1968; CLERMONT & MORGENTALER, 1955
Camundongo	6 (A <sub>1-4</sub> ; In, B)	3,1 (23)	DE ROOJI, 1973; BERNDTSON & THOMPSON, 1990
Suíno	6 (A <sub>1-4</sub> ; In, B)	3,2 (20)	FRANÇA, 1991; FRANKENHUIS <i>et al.</i> , 1982
Cão	6 (A <sub>1-4</sub> ; In, B)	3,4 (15)	PAULA, 1992
Bovino	6 (A <sub>1-3</sub> ; In, B <sub>1-2</sub> )	3,6 (10)	HOCHEREAU-DE REVIERS, 1976; AMANN, 1962
Búfalo	6 (A <sub>1-3</sub> ; In, B <sub>1-2</sub> )	3,4 (15)	BILASPURI & GURAYA, 1980
Ovino	6 (A <sub>1-3</sub> ; In, B <sub>1-2</sub> )	3,1 (23)	BILASPURI & GURAYA, 1986; QUEIROZ & CARDOSO, 1989
Caprino	6 (A <sub>1-3</sub> ; In, B <sub>1-2</sub> )	2,8 (30)	LEAL <i>et al.</i> , 2004 (in press)
Gato	6 (A <sub>1-4</sub> ; In, B <sub>1-2</sub> )	2,8 (30)	GODINHO, 1999
Equino	5 (A <sub>1-3</sub> ; In, B <sub>1-2</sub> )	2,8 (30)	JONHSON <i>et al.</i> , 1994
Jumento	5 (A <sub>1-3</sub> ; In, B <sub>1-2</sub> )	2,8 (30)	NEVES, 2001
Coelho	5 (A <sub>1-2</sub> ; In <sub>1-2</sub> , B)	3,3 (18)	CASTRO, 1995
<i>Macaca mulata</i>	5 (A <sub>1-2</sub> , B <sub>1-3</sub> )		CLERMONT, 1972
<i>Macaca fascicularis</i>	5 (A <sub>ara</sub> , B <sub>1-4</sub> )	3,9 (15)	FOUQUET & DADOUNE, 1986; ZHENGWEI <i>et al.</i> , 1997
<i>Macaca arctoides</i>	5 (A <sub>ara</sub> , B <sub>1-4</sub> )	2,5 (38)	CLERMONT & ANTAR, 1973
<i>Callithrix jacchus</i>	5 (A <sub>1-4</sub> ; B)		MILLAR <i>et al.</i> , 2000; WEINBAUER <i>et al.</i> , 2001
Homem	2 (A <sub>ara</sub> , B)	1,3 (68)	SINHA HIKIM <i>et al.</i> , 1985 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>A = espermatogônia A; In = espermatogônia intermediária; B = espermatogônia B.

<sup>2</sup> Número de espermátides arredondadas por espermátócito primário.

Os índices celulares alcançados a partir de contagens feitas em estádios específicos do processo espermatogênico atuam de maneira bastante apurada de se analisar a funcionalidade deste processo e estimar a produção espermática, permitindo ainda acareações entre as diferentes espécies. Na análise das diferentes fases da espermatogênese pode utilizar três índices: o coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais o qual quantifica o grau de perdas celulares na fase

espermatogonial ou proliferativa e estima as degenerações que ocorrem nas conversões celulares de espermatogônias do tipo A<sub>1</sub> até a formação de espermatócitos primários e pré-leptóteno (PL) ou em paquíteno (P) sendo considerado de 1:1 a perda de PL/P; o rendimento geral da espermatogênese, onde é avaliada a eficiência do processo espermatogênico integralmente e o rendimento meiótico, avaliando a eficiência de duas divisões meióticas. Pelo fato de ser relativamente espécie-específica (RUSSELL & PETERSON, 1984; ORTH et al., 1988; FRANÇA & RUSSELL, 1998), o número de células germinativas por célula de Sertoli é um outro índice que serve para avaliar a eficiência desta última, constituindo-se também num excelente parâmetro para se estimar a eficiência espermatogênica (RUSSELL & PETERSON, 1984; SHARPE, 1994; FRANÇA & RUSSELL, 1998), que seguidamente será visto. Em questão da eficiência das células de Sertoli, provavelmente por espaço físico, as menores são as mais eficientes (RUSSELL & PETERSON, 1984; FRANÇA & RUSSELL, 1998). Conquanto ainda muito pouco investigado (RUSSELL & PETERSON, 1984), o tamanho e a forma das células espermatogênicas também podem influenciar na habilidade das células de Sertoli em suportar as mesmas.

### ***2.5.1. Espermatogênese em primatas***

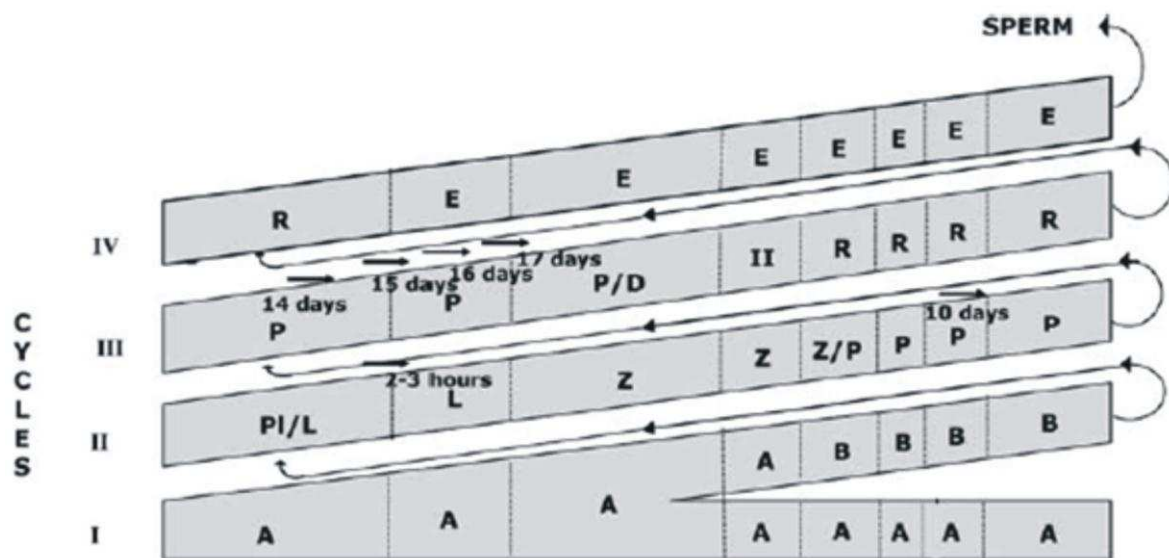
#### ***2.5.1.1. Caracterização do estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero investigado por meio do método da morfologia tubular***

O estudo do ciclo do epitélio seminífero (CES) tem sido baseado no método da morfologia tubular (CURTIS, 1918; BERNDTSON, 1977; ORTAVANT et al., 1977; FRANÇA & CARDOSO, 1998), método esse que se torna possível pelas modificações de forma e posição do núcleo das espermátides e na ocorrência de divisão meiótica no epitélio seminífero e caracterizar os estádios do ciclo, sendo possível a identificação do estágio 1 como foco principal do estudo nos saguis híbridos. Essa metodologia nos fornece oito estádios do ciclo para todos os mamíferos incluindo os saguis:

- **Estádio 1:** estende-se do fim da liberação (espermição) das espermátides alongadas no lume do túbulo seminífero até o início de alongamento dos núcleos das espermátides arredondadas;
- **Estádio 2:** estende-se do início do processo de alongamento dos núcleos das espermátides arredondadas até o início de agrupamento das espermátides alongadas em feixes;
- **Estádio 3:** caracteriza-se pelo início de agrupamento das espermátides alongadas em feixes até o início da primeira divisão meiótica;
- **Estádio 4:** estende-se do início ao fim da primeira e segunda divisões meióticas, envolvendo a presença de espermátócitos secundários;
- **Estádio 5:** caracteriza-se pela presença de espermátides arredondadas recém-formadas e pela localização mais profunda dos compactos feixes de espermátides alongadas no epitélio seminífero, os quais se situam próximos dos núcleos das células de Sertoli;
- **Estádio 6:** é caracterizado pelo deslocamento dos feixes de espermátides alongadas em direção ao lume tubular, apresentado-se os mesmos, menos compactos;
- **Estádio 7:** caracteriza-se pela dissociação dos feixes de espermátides alongadas e localização dos mesmos próximos à borda luminal e o aparecimento dos primeiros corpos residuais; e
- **Estádio 8:** caracterizado pela localização das espermátides alongadas na borda luminal, em forma de paliçada, e liberação (espermição) das mesmas no lume tubular, e pela presença de corpos residuais evidentes.

Duas diferenças importantes no arranjo topográfico das etapas da espermatogênese são reconhecidas entre os mamíferos. Na maioria deles, a distribuição dos estádios no ciclo do epitélio seminífero é segmentar, contendo um estágio em cada secção transversal por túbulo seminífero (RUSSELL et al., 1990a; COSTA, 2003; PAULA, 2003). Em contra partida, alguns primatas como o *Callithrix jacchus* (MILLAR et al., 2000), chimpanzés (*Pan troglodytes*) e seres humanos, podem ser encontrados mais de um estágio por secção transversal do túbulo seminífero. No macaco *cynomolgus* (*Macaca fascicularis*) (DIETRICH et al., 1986), e no babuíno-anubis (*Papio anubis*) tem sido descrita uma etapa intermédia, tendo as secções tubulares a presença de um estágio em 60% e a presença de dois ou três

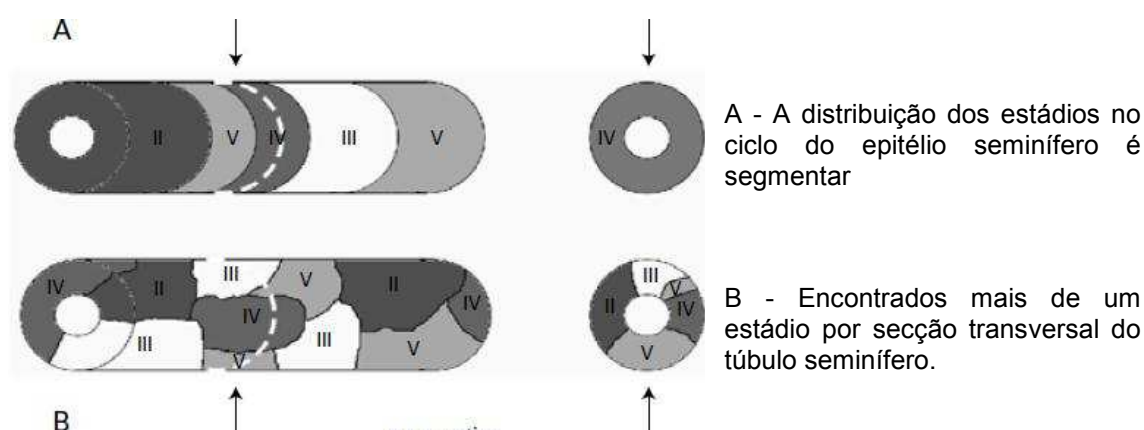
estádios em 40% da secções (CHOWDHURY e MARSHALL, 1980). Foi proposto para os testículos humanos que a presença de vários estádios do ciclo do epitélio seminífero forma uma organização helicoidal da espermatogênese (SCHULZE e REHDER, 1984), mas essa visão tem sido contestada, sugerindo que o arranjo dos estágios é aleatório (ROSS, 1985; WEINBAUER et al., 2001) (Figura 2).



Estádios	1	2	3	4	5	6	7	8
Frequência (%)	24.0	12.48	22.8	8.0.8	9.57	4.9	5.51	12.66
Duração (dias)	3.68	1.92	3.52	1.23	1.47	.76	.84	1.94

**Figura 2.** Diagrama representando os oito estádios do ciclo do epitélio seminífero em saguis (Leal e França, 2006). Algarismos romanos indicam o ciclo espermatogênico. O espaço para cada coluna é proporcional à sua frequência relativa e duração. As setas indicam as localizações das células espermatogênicas mais precisa no estágio em questão. Espermatogônias dos tipos A (A) e B (B); espermatócitos primários em pré-leptóteno (PI/L); leptóteno (L); zigóteno (Z); paquíteno (P); diplóteno (D): espermatócitos secundários (II); espermátides arredondadas (R) e espermátides alongadas (E).

Nos seres humanos grande proporção de células germinativas aparentemente sofre degeneração durante a fase espermatogonial e aproximadamente 50% de espermatócitos são perdidos durante a meiose (JOHNSON, 1995). No entanto, um estudo mais recente de ZHENGWEI et al. (1998) indicou que a espermatogênese humana poderia ser mais eficiente do que se pensava anteriormente. Outro estudo quantitativo da espermatogênese em macacos (macacos *cynomolgus*) revelou pouca ou nenhuma perda de células germinativas durante a meiose e espermiogênese (ZHENGWEI et al., 1998) (Tabela 2).



**Figura 3.** Diferenças no arranjo topográfico das etapas de espermatogênese.

Fonte: Modificado a partir de ROSS (1985) e WEINBAUER et al. (2001).

**TABELA 2.** Comparação da organização espermatogênica entre primatas e o rato.

Espécies	Duração do ciclo (dias)	Nº de estágios	Estádios por secção transversal tubular	Nº de mitoses espermatogoniais
Homem	16	6	1-5	1-2
Chimpanzé	14	12	2-4	1-2
Macaco <i>rhesus</i>	10.42	12	1	5-6
<i>Cynomolgus</i>	9.8	12	1	5-6
<i>Callithrix jacchus</i>	10	9	1-5	4
Rato	12.5-13.3	14	1	6

Fonte: MILLER et al. (2000).

O significado biológico do padrão irregular de espermatogênese em relação à produção de células germinativas ainda não está claro, e um modelo animal de fácil acesso está faltando.

O sagui comum (*Callithrix jacchus*) é um primata não-humano que tem sido utilizado em biologia reprodutiva e investigações de toxicologia por muitos anos (ABBOTT e HEARN, 1978) e (HEARN, 1978). No presente trabalho, células germinativas, números de células de Sertoli e apoptose testicular foram quantificados pela primeira vez em híbridos. HOLT e MOORE (1984), descreveram oito estádios da espermatogênese, e o trabalho subsequente sugeriu que a distribuição dos estádios da espermatogênese no sagui comum se assemelha ao de seres humanos, com mais de um estágio por corte transversal tubular (HAIDER, 1989).

Entretanto, LEAL e FRANÇA, (2006), dizem que mesmo os saguis sendo considerados como excelente modelo experimental para estudos toxicológicos e comparativos envolvendo vários aspectos da biologia reprodutiva dos primatas mencionando, quando eles são comparados aos seres humanos, existem diferenças importantes do sistema reprodutivo de saguis que podem limitar a utilização dessa espécie em tais estudos. Por exemplo, entre as particularidades de saguis podem ser citados a geração de gêmeos uniplacentários, a diferenciação testicular primitiva no nascimento, a supressão do *exon* 10 do receptor de LH, bem como a dependência de HCG para a maturação e função testicular (ver revisão em LI *et al.*, 2005).

Os conjuntos literários indicam que fatores filogenéticos não são responsáveis pela determinação do percentual ocupado pelo compartimento intertubular nas distintas espécies de mamíferos. A título de exemplo, ampla variação é observada para as diferentes espécies de roedores já investigados, mesmo quando se considera o mesmo gênero (FAWCETT, *et al.*, 1973; BREED, 1982). Em capivaras, que é o maior roedor vivo, o compartimento intertubular ocupa cerca de 50% (PAULA, 1999), ao passo que, em ratos este percentual é de aproximadamente 10% do parênquima testicular (RUSSEL & FRANÇA, 1995; ROCHA *et al.*, 1999).

Os três padrões distintos observados para o arranjo e a proporção dos elementos constituintes do espaço intertubular nas diferentes espécies de mamíferos (FAWCETT *et al.*, 1973) são:

I - espécies nas quais as células de Leydig e o tecido conjuntivo ocupam uma área muito pequena no compartimento intertubular, destoando com extensos sinusóides linfáticos ou espaços linfáticos (ex.: rato, camundongo, hamster, *guinea pig* e chinchila);

II – espécies que apresentam grupos de células de Leydig espalhadas em abundante tecido conjuntivo frouxo, o qual é drenado por um vaso linfático localizado central ou excentricamente no espaço intertubular (ex.: bovino, ovino, macaco e homem); e

III – espécies nas quais abundantes agrupamentos de células de Leydig ocupam grande parte do compartimento intertubular, apresentam pouco tecido conjuntivo e vasos linfáticos (ex.: suínos e zebra).

### 3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Apesar da hibridação de animais ser muitas vezes desejada, e mesmo buscada devido às possíveis vantagens dos híbridos, pelo menos sob cultivo celular, seus riscos, não raros, são citados como fontes de efeitos mais que indesejáveis e imprevisíveis para a biodiversidade do planeta. Outra importante observação é que as diferenças cariotípicas decorrentes de rearranjos cromossômicos estão entre as principais barreiras para a reprodução interespecífica. Por outro lado, uma vez que o sucesso evolutivo que determina a perpetuação de uma espécie e suas relações com o ecossistema se deve à sua reprodução e quando da produção de híbridos capazes de reproduzir entre si ou com indivíduos das espécies que lhes deram origem, tais híbridos interespecíficos podem representar sérios riscos biológicos ao meio ambiente, interferindo no fluxo gênico de estoques naturais ou cultivados e competindo com as linhagens parentais. A análise dos dados obtidos no levantamento bibliográfico mostrou produção incipiente sobre a hibridação em mamíferos. Além disso, este estudo pode servir também de modelo para estudo avaliativo da reprodução masculina devido à proximidade filogenética com o homem.

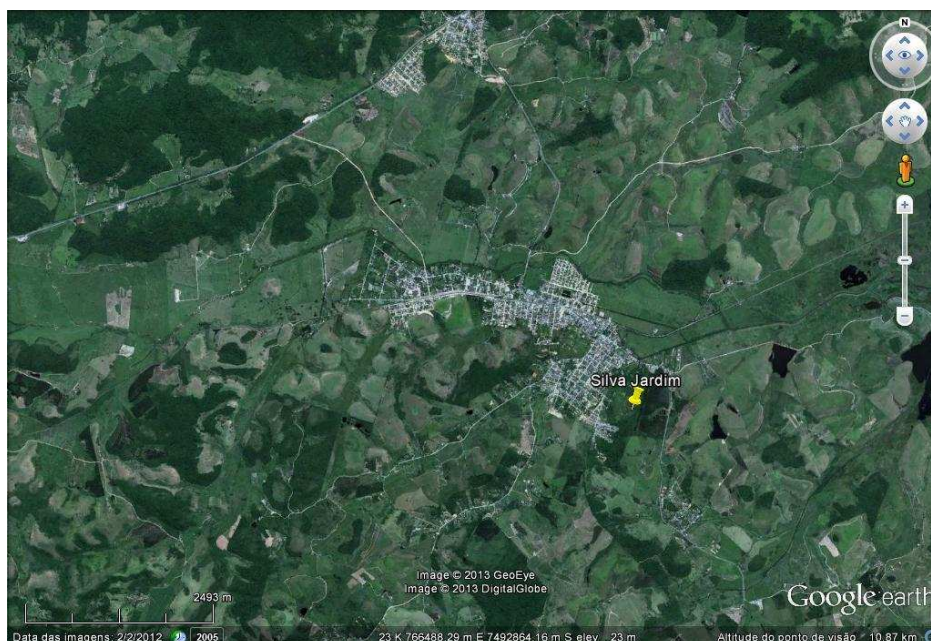
A morfologia reprodutiva em primatas silvestres ainda é pouco conhecida. Assim, com o objetivo de fornecer dados sobre a organização morfofuncional dos componentes do testículo, o presente trabalho propõe:

- a) Realizar a morfometria macro e microscópica dos testículos;
- b) Calcular o índice gonadossomático;
- c) Calcular o diâmetro tubular e a altura do epitélio seminífero;
- d) Calcular o comprimento total do túbulo seminífero por testículo e por grama de testículo;
- e) Caracterizar qualitativa e quantitativamente o compartimento intertubular;
- f) Calcular o rendimento intrínseco da espermatogênese e determinar a população celular dos túbulos seminíferos presente no estágio 1 do CES;
- g) Determinar as relações quantitativas entre células da linhagem espermatogênica e célula de Sertoli; e
- h) Determinar a correlação entre a concentração sérica de testosterona e os demais componentes de proporção volumétrica.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Histórico dos animais

Os *Callithrix* híbridos do presente estudo provêm dos progenitores *Callithrix jacchus* e *Callithrix penicillata* oriundos da Ilha d'Água, Baía de Guanabara/RJ, e de uma fazenda no município de Silva Jardim/RJ (Figura 3), regiões onde a espécie não ocorre naturalmente.



**Figura 4.** Local de coleta dos saguis híbridos. Município de Silva Jardim, RJ.  
Fonte: Google Earth.

A Ilha d'Água (Figura 4) pertence à TRANSPETRO, e os saguis constituem um grave problema de segurança do trabalho neste local por ocasionar acidentes aos trabalhadores, sendo também região de ocorrência do *Leothopithecus rosalia* (Mico-leão-dourado), onde há realização de estudos de campo, visando desenvolver um plano de controle de animais introduzidos.



**Figura 5.** Local de coleta dos saguis híbridos. Ilha D'Água, Rio de Janeiro, RJ.  
Fonte: Google Earth.

#### **4.2. Procedência e qualidade das amostras**

A colônia de saguis (*Callithrix jacchus*, *Callithrix penicillata* e híbridos) do SERCAS-UENF (Setor de Estudos de Etologia, Reintrodução e Conservação de Animais Silvestres) em Campos dos Goytacases/RJ, foi obtida de programas de remoção licenciada, da região de ocorrência do ameaçado Mico-leão-dourado. Com isso, foram obtidos nove animais híbridos com tempo em cativeiro aproximado de dois meses, sendo esses animais provenientes da Ilha D'Água de uma fazenda do município de Silva Jardim - RJ.

Os saguis machos do presente estudo foram mantidos aproximadamente sempre no mesmo grupo com mais duas fêmeas adultas, uma fêmea juvenil e três machos juvenis. No protocolo de alimentação, foram utilizadas 40g de banana e ração no período da manhã, e 30g de frutas e legumes variados no período da tarde, por indivíduo.

#### **4.3. Delineamento experimental**

Na experimentação, foram utilizados nove saguis híbridos machos e adultos, obtidos do cativeiro SERCAS-UENF. Todo procedimento clínico-cirúrgico e de eutanásia foi desenvolvido sempre com o auxílio do médico veterinário Vanner

Boere Souza (CRMV-DF 0757). Todos os espécimes foram coletados conforme licença nº 33965-1, emitida pelo SISBIO-ICMBio-MMA e mediante autorização da Comissão de Ética da UFV (protocolo 38/2013).

Os animais foram pesados e classificados como sexualmente maduros. Em seguida, foram anestesiados utilizando-se associação de cloridrato de quetamina (10mg/Kg de peso) e xilazina (1mg/Kg de peso). Enquanto anestesiados, os animais tiveram uma amostra de sangue coletada para posterior realização de hemograma completo, e o plasma foi separado para análise dos concentrados de testosterona para a comparação da mesma com relatos descritos na literatura para as espécies progenitoras. Amostras de sangue venoso foram coletadas entre 8h e 12h30min e, posteriormente, o plasma foi separado e armazenado a 4°C até o ensaio no dia seguinte da coleta.

Os animais foram eutanasiados com 2mL de cloreto de potássio por via intracardíaca. Através de palpação percutânea, foi verificada a integridade dos testículos, bem como mensuradas dimensões externas de testículos quanto à largura, espessura e comprimento, assim como a espessura do escroto, utilizando-se paquímetro, para posterior cálculo do volume testicular (MASCARENHAS et al., 2005). Estas dimensões testiculares externas foram utilizadas na fórmula  $4/\pi (ABC)$ , onde A representa metade do comprimento, B metade da largura, e C metade da espessura, permitindo o cálculo do volume testicular.

Para tricotomia e antissepsia foi usado iodo povidine tópico, logo após a incisão da pele do escroto com um bisturi circular de 4 mm de diâmetro, para obtenção dos testículos esquerdo e direito. Logo após, ambos os testículos foram seccionados na porção *capitata*, terço médio e *caudata* e identificados. Estes fragmentos foram imersos em fixador de Karnovsky modificado (paraformaldeído 4% e glutaraldeído 5% em tampão fosfato 0,2M pH 7,2-7,4) em temperatura ambiente por, no mínimo, duas horas.

#### **4.3.1 Processamento do material para análise histológica**

Para estudos em microscopia de luz, os fragmentos foram desidratados em séries de concentrações crescentes de alcoóis (70°, 80°, 90°, 95°, 100° ABS I e 100° ABS II) e incluídos em resina plástica à base de glicol metacrilato (Leica Historesin Embedding Kit, Leica Instruments). Os fragmentos foram posicionados de modo a

oferecer uma secção transversal. A partir destes, foram obtidos cortes histológicos, de modo sequencial, utilizando-se micrótomo rotativo dotado de navalha de vidro, com 3µm de espessura. Os cortes foram corados com solução de azul de toluidina-borato de sódio 1%, montadas com Entellan (Merck), e analisadas em microscópio Olympus BX 60.

#### **4.4. Histologia quantitativa dos testículos**

Todas as medidas obtidas (proporção volumétrica, população celular, altura do epitélio seminífero, diâmetro tubular, proporção núcleo-citoplasma das células de Leydig, diâmetro nuclear das células germinativas e nucleolar das células de Sertoli) foram realizadas a partir de imagens digitais por meio do programa Cell<sup>^</sup>F – AnalySiS Image Processing (desenvolvido por Olympus Soft Imaging Solutions) no sistema computadorizado do Laboratório de Biologia Celular, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas/UFMG, contando com uma régua micrométrica acoplada à ocular de microscópio de luz (Olympus BX 60) com objetiva de 20x, e posterior análise no programa “Image J” (desenvolvido por Wayne Rasband, do Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland).

##### **4.4.1 Proporções volumétricas (%) e volume dos componentes testiculares e seus índices representativos**

Com auxílio de fotomicroscópio, foram obtidas imagens para avaliar a proporção volumétrica do túbulo seminífero e do espaço intertubular no parênquima testicular, por meio da contagem destes elementos teciduais correspondentes aos pontos em 15 campos, aleatoriamente distribuídos, utilizando um retículo com 540 intersecções totalizando 8.100 pontos por animal em aumento de 200x. Calculou-se, por meio dessas proporções, o volume total do parênquima testicular, obtido dos volumes totais de cada componente testicular em todos os saguis. Foram contabilizados os pontos que coincidiam com as estruturas testiculares (RUSSELL *et al.*, 1990b; GRONDONA, 2012).

Os seguintes elementos tiveram sua proporção e volume estimados:

Do compartimento tubular foram avaliados:

- Túnica própria
- Epitélio seminífero
- Lume

Do compartimento intertubular foram analisados:

- Células de Leydig
- Células e fibras de tecido conjuntivo
- Vasos sanguíneos e linfáticos

O cálculo do volume de cada componente testicular, expresso em mL, foi estimado a partir do conhecimento do volume líquido do testículo. Como a densidade do testículo é próxima de 1 (1,03 a 1,046 g/mL; FRANÇA, 1991; JOHNSON, *et al.*, 1981), o peso do testículo foi considerado igual ao seu volume. No sagui, o valor da albugínea já foi obtido em outros estudos, subtraindo-se do peso bruto do testículo o peso da túnica albugínea e do mediastino testicular, estimado em 7% do peso testicular.

O volume de cada um destes componentes, descontando os 7% da albugínea foi calculado de acordo com a fórmula:

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

Onde:

V = volume de um componente testicular ( $\mu$ L)

$V_T$  = volume líquido do parênquima testicular ( $\mu$ L)

X = porcentagem ocupada pelo componente no testículo (%)

A partir do peso calculado para ambos os testículos e para o volume das células de Leydig, foi possível calcular os índices gonadossomático e leydigossomático, os quais se referem aos percentuais de massa corporal alocados, respectivamente, em gônadas e em células de Leydig.

#### **4.4.2. Diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero e comprimento total dos túbulos seminíferos**

O diâmetro médio dos túbulos seminíferos e a espessura do epitélio seminífero foram obtidos pela média das mensurações de 30 secções transversais de túbulos seminíferos, o mais circular possível, em cada sagui, utilizando-se ocular micrométrica de 20x com aumento final de 200x. Nas mesmas secções utilizadas para se medir o diâmetro tubular, foi mensurada a altura do epitélio seminífero, a qual foi tomada da membrana basal até a borda luminal. O valor encontrado para a altura do epitélio em cada túbulo seminífero representou a média de duas medidas tomadas de forma diametralmente oposta e calculadas as médias e erros padrão.

O comprimento total dos túbulos seminíferos (CT) por testículo, expresso em metros, foi estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos túbulos seminíferos no testículo, e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal. A seguinte fórmula foi empregada (ATTAL & COUROT, 1963; DORST & SAJONSKI, 1974):

$$CT=VTS/\pi R^2$$

Onde:

VTS= volume total dos túbulos seminíferos no testículo

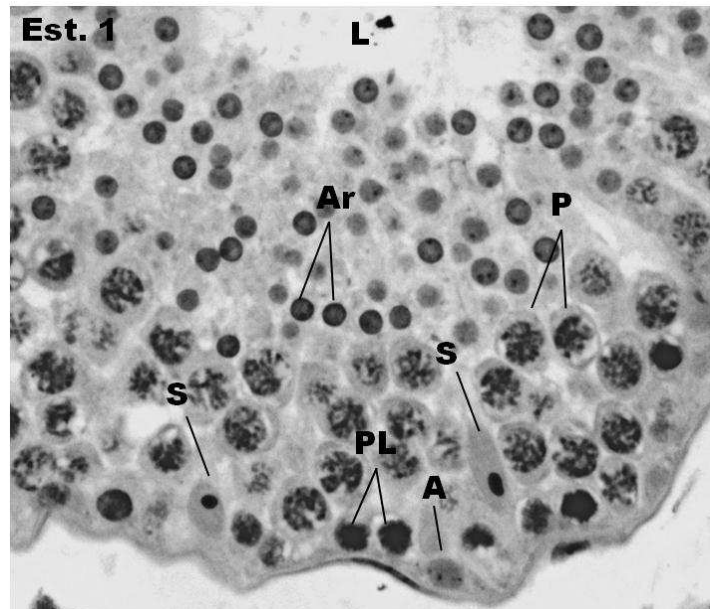
$\pi R^2$ = área da secção transversal de túbulos seminíferos

( $\pi = 3,14$  e  $R = \text{diâmetro tubular}/2$ )

#### **4.4.3. População de células espermatogênicas e de células de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero**

O principal objetivo desta análise foi o de fornecer dados para se investigar quantitativamente a evolução do processo espermatogênico por meio de índices ou razões celulares nos testículos de saguis híbridos. Para isto, as populações de células germinativas e de células de Sertoli foram estimadas para cada sagui, a partir da contagem em 10 secções transversais de túbulos seminíferos no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero (CES), no aumento de 200X, segundo o método da morfologia tubular de BERNDSTON (1977) (Figura 5). Foram considerados os seguintes tipos celulares:

- Espermatogônias do tipo A<sub>1</sub>
- Espermatócitos primários em paquíteno
- Espermátides arredondadas
- Células de Sertoli com nucléolo evidente



**Figura 6.** Secção transversal de túbulos seminíferos de sagui híbrido no estágio 1 do epitélio seminífero classificado de acordo com o método da morfologia tubular. Azul de toluidina, 400x. pode-se observar nesta imagem o lume (L) e os seguintes tipos celulares: célula de Sertoli (S); espermatogônia tipo A<sub>1</sub> (A); espermatócitos primários pré-leptóteno (PL) e em paquíteno (P); espermátides arredondadas (Ar).

A contagem obtida para cada tipo celular foi corrigida pelo diâmetro nuclear médio e a espessura do corte, utilizando-se a fórmula de ABERCROMBIE (1946) modificada por AMANN (1962), conforme segue:

$$\text{Número corrigido} = \text{contagem obtida} \times \frac{\text{Espessura do Corte}}{\text{Espessura do Corte} + \sqrt{\left(\frac{DM}{2}\right)^2 - \left(\frac{DM}{4}\right)^2}}$$

A média dos diâmetros de 10 núcleos de células germinativas no estágio 1 e por animal representa o diâmetro nuclear médio (DM) na fórmula acima em aumento de 100x.

Pelo fato das células de Sertoli apresentarem núcleo irregular, a correção do número das mesmas foi feita a partir do diâmetro nucleolar médio. Neste caso, somente núcleos com nucléolo evidente foram contados. O diâmetro nuclear ou nucleolar médio (DM) foi obtido pela média das mensurações dos números de núcleos ou nucléolos obtidos dos tipos celulares estudados no estágio 1 do CES para cada sagui.

#### **4.4.4. Volumes nucleares das células germinativas do estágio 1 do CES**

Com o objetivo de se verificar a evolução do volume nuclear das células espermatogênicas, desde espermatogônias do tipo A<sub>1</sub> até espermatídes arredondadas, o volume nuclear de diferentes tipos celulares da linhagem espermatogênica foram obtidos empregando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Volume nuclear} = 4/3\pi R^3$$

Onde:

$$R = \text{diâmetro nuclear}/2 \text{ e } \pi = 3,14$$

#### **4.4.5. Razão entre números celulares**

Com o objetivo de se estimar as divisões celulares do processo espermatogênico e eficiência da célula de Sertoli, foram calculadas as razões entre os números corrigidos de células espermatogênicas e entre estas últimas e as células de Sertoli, no estágio 1 do CES. As seguintes razões baseadas nas contagens feitas no estágio avaliado foram obtidas:

- Espermatíde arredondada/Núcleo de célula de Sertoli (eficiência da célula de Sertoli);
- Espermatíde arredondada/Espermatócito primário em paquíteno (índice meiótico);
- Espermatócito primário em paquíteno/Espermatogônia do tipo A<sub>1</sub> (coeficiente de eficiência de mitose espermatogonial); e

- Espermátide arredondada/Espermatogônia do tipo A<sub>1</sub> (rendimento geral da espermatogênese).

#### **4.4.6. Número de células de Sertoli por testículo**

Para se estimar o número de célula de Sertoli por testículo, foi obtido o número corrigido de nucléolos de células de Sertoli em secção transversal de túbulo seminífero com espessura de 3µm e também foi calculado o comprimento total de túbulos seminíferos por testículo, segundo a fórmula empregada por HOCHEREAU-DE REVIERS & LINCOLN (1978). A partir deste cálculo, foi também estimado o número de células de Sertoli por grama de testículo.

#### **4.4.7. Número de células de Leydig por testículo, proporção núcleo-citoplasma das células de Leydig, índice leydigossomático**

Investigou-se, nos nove saguis, o número de células de Leydig, empregando-se retículo com 540 intersecções (pontos), em aumento de 200x, em 15 campos por animal, com aproximadamente 8100 pontos por animal, com a finalidade de se determinar a média total e a média por animal da proporção (%) de células de Leydig. Para o diâmetro nuclear das células de Leydig, os núcleos medidos, escolhidos aleatoriamente, foram aqueles que apresentaram o contorno mais esférico possível e com cromatina perinuclear e nucléolos bastante evidentes. A partir desses dados foram aplicadas as fórmulas do volume nuclear, volume de cada célula de Leydig por animal e por último o volume citoplasmático, valores esses expressos em micrômetros cúbicos.

$$\text{Volume nuclear} = 4/3\pi R^3$$

Onde:

$$R = \text{diâmetro nuclear}/2 \quad \text{e} \quad \pi = 3,14$$

$$\text{Volume celular} = \text{volume nuclear} + \text{volume citoplasmático}$$

De posse do volume ( $\mu\text{m}^3$ ) das células de Leydig e do volume total (mL) ocupado por estas células no testículo, foi calculado o número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo em cada animal, obtendo-se o índice leydigossomático, cuja fórmula é:

$$\text{ILS} = \frac{\text{vtcl}}{\text{PC}} \times 100$$

Onde:

ILS = índice leydigossomático

vtcl = volume total de células de Leydig

PC = peso corporal

#### **4.4.8. Níveis de testosterona**

As concentrações de testosterona no plasma dos saguis foram realizadas em laboratório independente que executou a análise pela técnica de quimioluminescência (Immulite, Siemens®).

#### **4.5. Análise estatística**

Os dados foram previamente analisados quanto à média, desvio padrão, erro padrão e análise de variância para contagens celulares na verificação da evolução do processo espermatogênico (Student-Newman-Keuls). Os dados obtidos foram expressos como média  $\pm$  EP ( $p < 0,05$ ). Em alguns casos, quando possível, foi aplicado o teste de correlação e o intervalo de confiança proposto para  $p < 0,05$  segundo a função estatística do programa GraphPad Prism 6.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. *Biometria e índice gonadossomático*

O peso corporal médio dos animais estudados foi próximo a 370g (Tabela 3), variando entre 323,7 e 413,7 g, dentro de uma faixa considerada normal para as espécies progenitoras. Não foi possível determinar precisamente a idade dos animais do presente estudo; porém; todos os nove animais eram sexualmente maduros, ou seja, apresentaram espermatogênese completa. O peso testicular médio foi de 682,7mg (Tabela 3). Esses animais apresentaram índice gonadossomático (IGS) médio de 0,37% (Tabela 3).

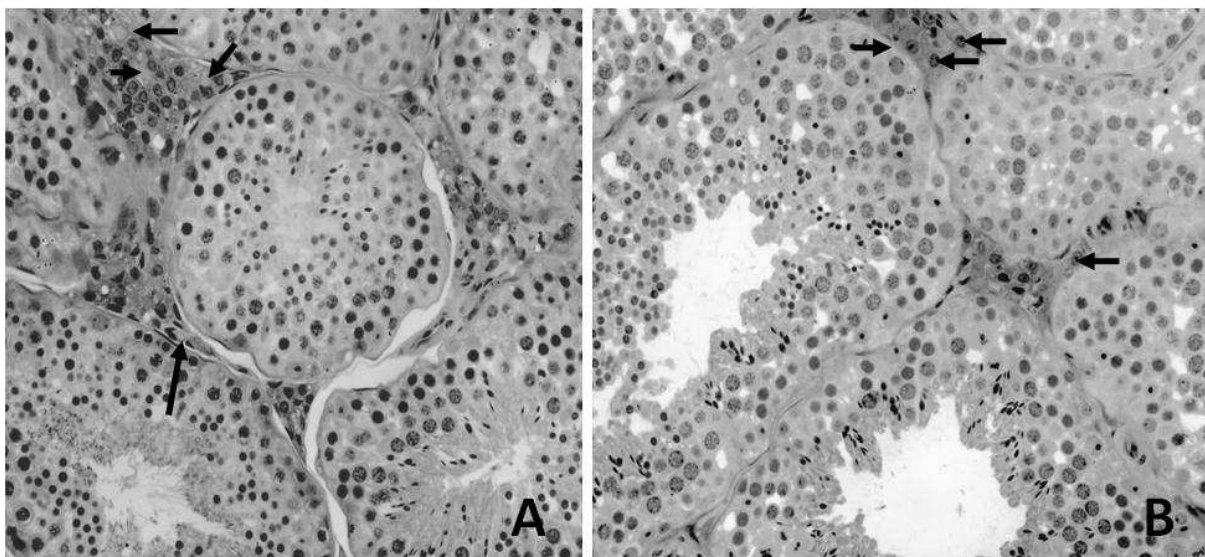
**TABELA 3.** Biometria e histometria do testículo de saguis sexualmente maduros.

<b>Parâmetro</b>	<b>Média ± EP</b>
Peso corporal (g)	368,7 ± 14,9
Peso testicular (mg)	682,7 ± 125
Testículo direito	778 ± 149,3
Testículo esquerdo	587,4 ± 100,7
Índice gonadossomático (%)	0,37 ± 0,04
Proporção volumétrica (%)	
Total de túbulos seminíferos	87,1 ± 0,9
Túnica própria	5,8 ± 0,1
Epitélio seminífero	74,1 ± 1
Lume	7,2 ± 0,8
Espaço Intersticial	12,9 ± 0,9
Células de Leydig	1,4 ± 0,2
Tecido conjuntivo	10,9 ± 0,7
Vasos sanguíneos	0,6 ± 0,1
Diâmetro tubular (µm)	228 ± 4,4
Altura do epitélio seminífero (µm)	86 ± 3,3
Comprimento de túbulo seminíferos (m)	
Por grama de testículo	19,9 ± 0,6
Total por testículo	11,8 ± 1,90

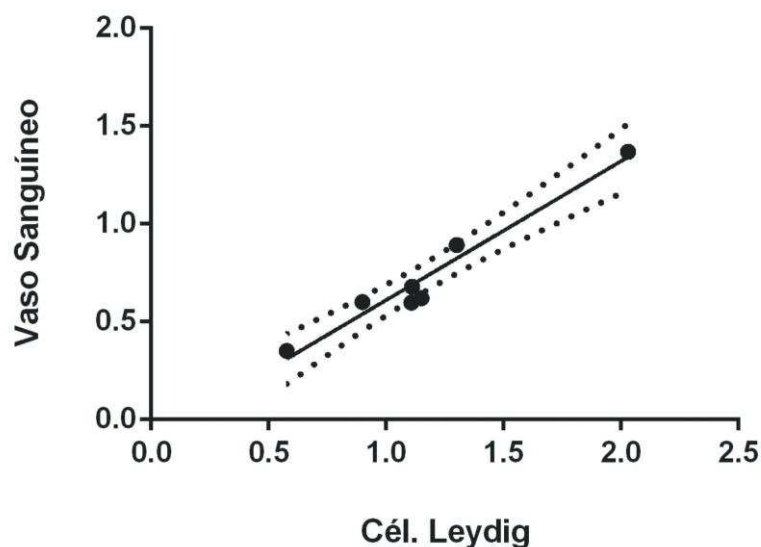
## 5.2. Análise morfométrica dos testículos

### 5.2.1. Proporções volumétricas (%) e volume dos componentes testiculares

Pode ser observado que, em média, os túbulos seminíferos dos saguis híbridos ocuparam aproximadamente 87% do parênquima testicular (Tabela 3). Deste total, quase 85% é representado pelo epitélio seminífero, enquanto que aproximadamente 7% é composto de túnica própria, e os restantes 8% de lume tubular. Já no compartimento intertubular (~13%), as células de Leydig preencheram aproximadamente 11%, enquanto o tecido conjuntivo ocupou a maior parte (84%), ficando o restante (5%) preenchido por vasos sanguíneos (Figura 7). Através de análise estatística, foi observado que as células de Leydig apresentaram uma correlação positiva e significativa em relação ao volume ocupado pelos vasos sanguíneos ( $r=0,9286$ ) (Figura 8).



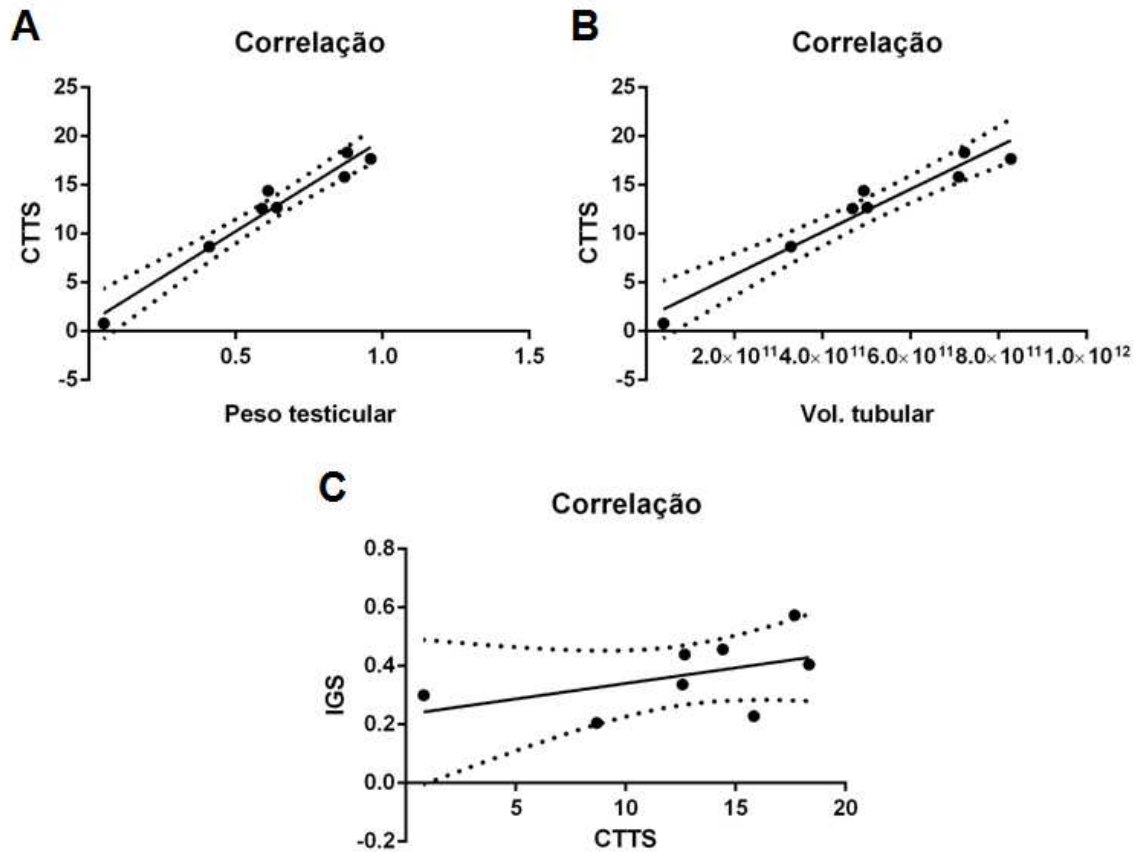
**Figura 7.** Secção transversal de túbulo seminífero em saguis híbridos apresentando setas, (A) vasos sanguíneos e (B) células de Leydig.



**Figura 8.** Correlação entre a proporção volumétrica das células de Leydig e a proporção volumétrica dos vasos sanguíneos.

### **5.2.2. Diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero e comprimento total dos túbulos seminíferos**

Os valores apresentados na tabela 3 em torno de 228 $\mu$ m e 86 $\mu$ m foram observados para o diâmetro dos túbulos seminíferos e altura do epitélio seminífero, respectivamente. Assim, os valores obtidos do cálculo do volume líquido testicular multiplicado pelo percentual de túbulos seminíferos nos mostra uma média de 11,8 e 19,9 m de túbulos seminíferos encontrados por testículo e por grama de parênquima testicular, respectivamente. O comprimento tubular total por testículo correlacionou significativamente com peso testicular ( $r=0,95$ ) e volume tubular ( $r=0,95$ ). Para o índice gonadossomático ( $r = 0,52$ ) não houve significância na correlação, uma vez que o peso corporal apresentava ampla variação em relação ao comprimento total de túbulos seminíferos por testículo (Figura 9).



**Figura 9.** Correlação positiva do comprimento total de túbulos seminíferos (CTTS) com o peso testicular, em g (A); com o volume tubular, em  $\mu\text{L}$  (B); e negativa com o índice gonadossomático, em % (C).

### 5.3. Contagens celulares e quantificação da espermatogênese

#### 5.3.1. Populações e razões celulares

Os números corrigidos das células germinativas e células de Sertoli, obtidos a partir do estágio 1 do ciclo de epitélio seminífero, são apresentados na tabela 4 com os respectivos valores médios de células espermatogênicas e de nucléolos de células de Sertoli; já na tabela 5, encontram-se as razões obtidas entre estes tipos celulares no estágio 1 do CES.

**TABELA 4.** Números corrigidos<sup>1</sup> de células germinativas e de nucléolos de célula de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero.

<b>Parâmetro</b>	<b>Média ± EP</b>
Espermatogônia do tipo A <sub>1</sub>	10,9 ± 1,66
Espermatócito primário em paquíteno	40,4 ± 4,30
Espermátide arredondada	81,3 ± 6,41
Nucléolo de célula de Sertoli	8,70 ± 0,66

<sup>1</sup> Corrigido segundo Amam, 1962.

Condizente com a tabela 5 observa-se o índice de células de Sertoli (Ar/S) como padrão da eficiência da célula de Sertoli, o índice meiótico (Ar/P) como eficiência da meiose, o rendimento espermatogonial (P/A<sub>1</sub>) como o coeficiente de eficiência de mitoses espermatogonial e, por último, o rendimento geral (Ar/A<sub>1</sub>) como o resultado final da espermatogênese.

**TABELA 5.** Razões entre números celulares corrigidos obtidos no estágio 1 do ciclo de epitélio seminífero.

<b>Parâmetro</b>	<b>Média ± EP</b>
Índice de células de Sertoli (Ar/S)	9,6 ± 0,95
Índice meiótico (Ar/P)	2,0 ± 0,13
Rendimento espermatogonial (P/A <sub>1</sub> )	3,7 ± 0,63
Rendimento geral (Ar/A <sub>1</sub> )	8,3 ± 1,47

*Espermatogônia tipo A<sub>1</sub> (A<sub>1</sub>), espermatócitos em paquíteno (P), espermátides arredondadas (Ar) e células de Sertoli (S).*

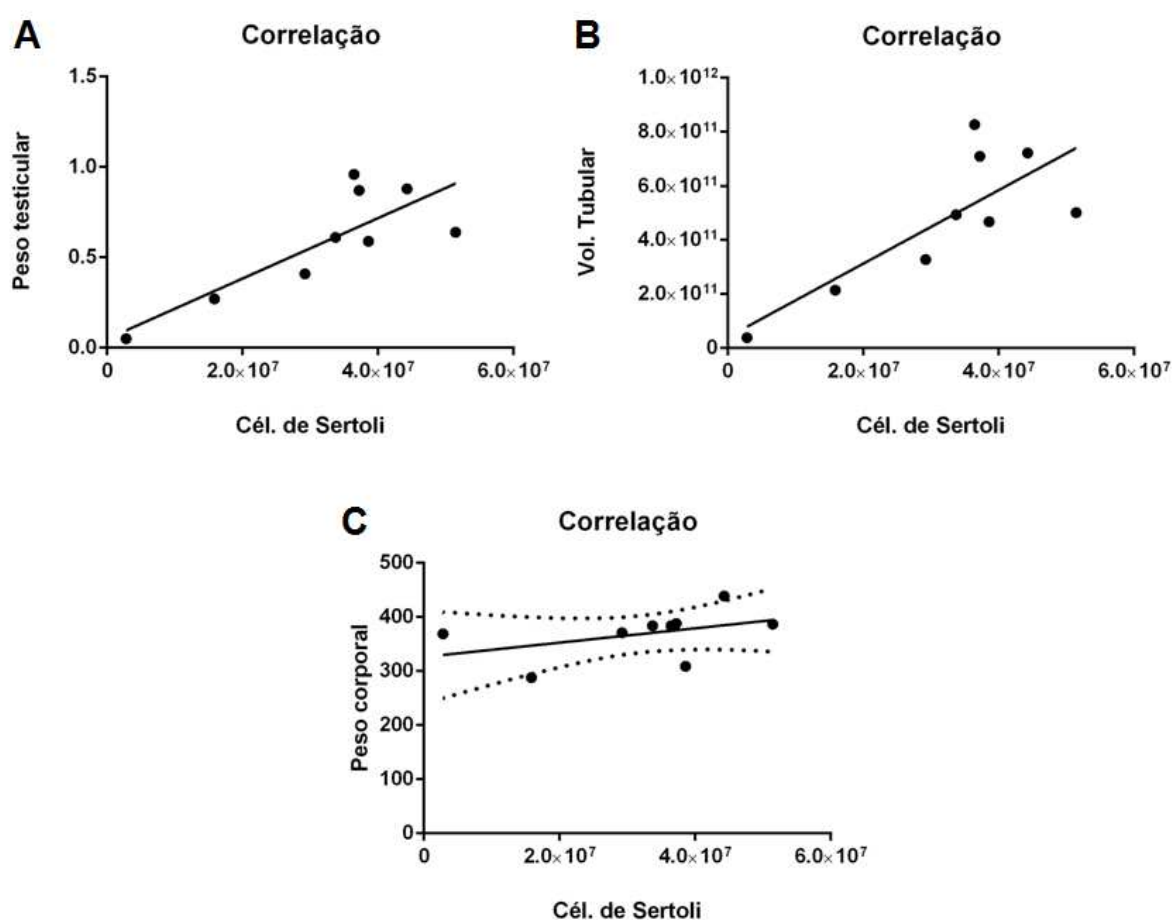
### **5.3.2. Número e eficiência da célula de Sertoli**

Obtido o comprimento total de túbulos seminíferos e o número corrigido de células de Sertoli por secção tubular no estágio 1, estimou-se o número médio de células de Sertoli por testículo e por grama de parênquima testicular. Destarte, na tabela 6, o número de célula de Sertoli por testículo e por grama de parênquima testicular em saguis híbridos foi de aproximadamente 32 e 58 milhões, respectivamente.

**TABELA 6.** Números de células de Sertoli ( $\times 10^6$ ) no testículo de saguis híbridos sexualmente maduros.

Parâmetro	Média $\pm$ EP
Número de células de Sertoli por grama de testículo	57,8 $\pm$ 4,4
Número de células de Sertoli por testículo	32,1 $\pm$ 4,9

O número total de células de Sertoli, por testículo correlacionou-se significativamente com peso testicular ( $r=0,7$ ) e com volume tubular ( $r=0,7$ ), não apresentando correlação significativa com o peso corporal ( $r=0,43$ ) (Figura 10).



**Figura 9.** Correlação do número de células de Sertoli com o peso testicular, em g (A); com o volume tubular, em  $\mu\text{L}$  (B); e ausência de correlação com o peso corporal, em g (C).

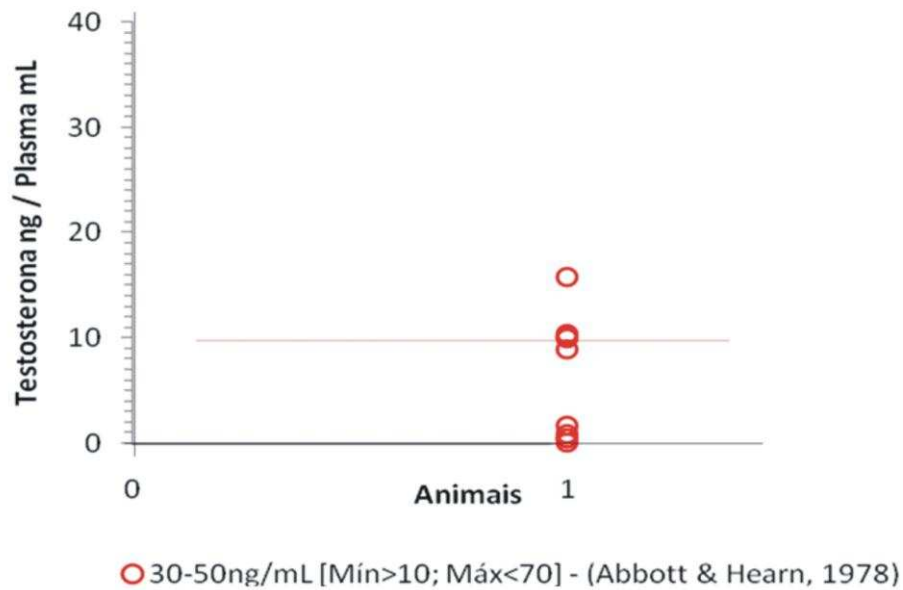
### 5.3.3. Morfometria, população das células de Leydig, índice leydigossomático

Por meio das análises dos dados morfométricos dos testículos dos saguis híbridos, foram tomados como pontos fundamentais de referência, o volume ocupado pelas células de Leydig no testículo e o volume individual celular. Isto posto, a tabela 7 mostra que cada célula de Leydig ocupa um volume de aproximadamente  $323 \mu\text{m}^3$ , sendo o núcleo e o citoplasma responsáveis por cerca de 35% e 65% deste volume, respectivamente. O número de células de Leydig foi aferido em 29 milhões de células por testículo, enquanto que exatamente 47 milhões destas células são encontradas por grama de parênquima testicular.

**TABELA 7.** Morfometria e número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo em saguis híbridos sexualmente maduros.

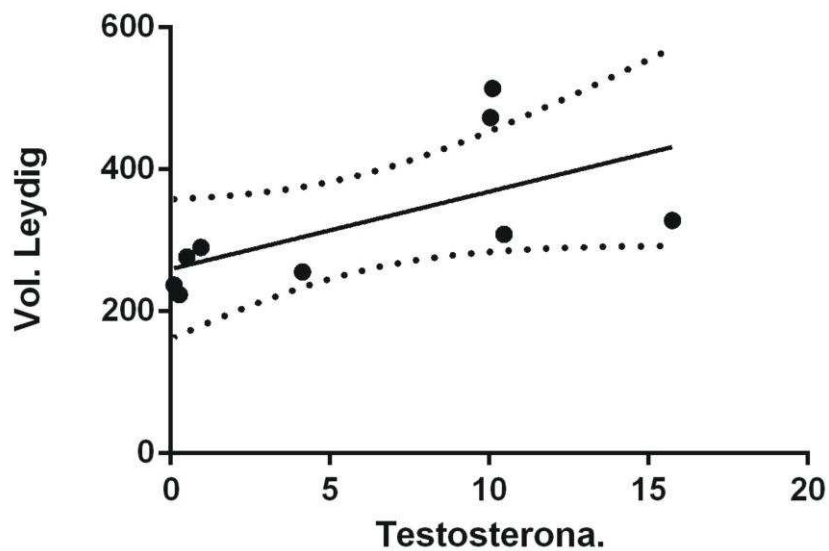
Parâmetro	Média $\pm$ EP
Diâmetro nuclear ( $\mu\text{m}$ )	$5,9 \pm 0,16$
Volume da célula de Leydig ( $\mu\text{m}^3$ )	$323,1 \pm 34,25$
Volume nuclear ( $\mu\text{m}^3$ )	$114,7 \pm 9,19$
Volume citoplasmático ( $\mu\text{m}^3$ )	$208,4 \pm 26,09$
Número de células de Leydig por grama de testículo ( $\times 10^6$ )	$47 \pm 9,81$
Número de células de Leydig por testículo ( $\times 10^6$ )	$29,4 \pm 8,2$

Dos *Callithrix* híbridos, 40% apresentaram valor entre 10 e 15 ng/mL de testosterona sérica, e 60% tiveram seu valor abaixo da margem mínima, ficando entre 0,1-9 ng/mL (Figura 11).



**Figura 11.** Níveis de testosterona no plasma de saguis híbridos sexualmente maduros. Técnica de quimioluminescência (Immulite, Siemens®).

O volume de células de Leydig em correlação com os níveis séricos de testosterona mostrou-se significativo ( $r = 0,8$ ) (Figura 12).



**Figura 12.** Correlação entre níveis séricos de testosterona e o volume das células de Leydig dos saguis híbridos.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. *Peso corporal, biometria e análise morfométrica dos testículos*

#### 6.1.1. *Peso corporal e biometria testicular*

Os valores obtidos para o peso corporal dos animais indicam que os mesmos se encontravam dentro da faixa de peso considerada normal (300 a 450g) para indivíduos adultos de *C. penicillata* e *C. jacchus* (HIRSCH, 2003 e STEVENSON & RYLANDS, 1988).

No presente estudo, observou-se um coeficiente de variação (cv) de 55% para o peso testicular (dados da matriz de cada peso testicular obtidos em gramas dos nove saguis híbridos - dados não apresentados) dos saguis híbridos, mostrando que a população não é muito homogênea, tendo uma variabilidade ainda que considerável; porém, não muito baixa para os dados em relação à média. No *Callithrix penicillata*, um dos progenitores destes híbridos aqui estudados, constatou-se um cv de ~25%, que evidencia que os híbridos do presente estudo são uma população menos estável do que a população de *C. penicillata* utilizada nos estudos do Leal & França (2006). Embora seja difícil classificar um coeficiente de variação como baixo, médio, alto ou muito alto, este pode ser bastante útil na comparação de duas variáveis ou dois grupos que, a princípio, não são comparáveis. De acordo com Jhonson et al. (1981), a densidade volumétrica média do testículo é de aproximadamente 1,046g/mL e, em decorrência deste fato, assumiu-se no presente trabalho, o volume testicular em mililitros igual à sua massa em gramas. O peso dos testículos em saguis híbridos não sofreu variação significativa entre os antímeros (teste *t* de Student a 5%), confirmando o observado para todos os mamíferos já pesquisados (FRANÇA & RUSSELL, 1998).

A simetria entre o peso testicular e o peso corporal em *C. penicillata* é bastante próxima do citado para *C. jacchus* (FONSECA et al., 1996; WEINBAUER et al., 2001), corroborando assim para uma semelhança simétrica dos pesos testicular e corporal nos híbridos aqui estudados, cujas duas espécies citadas são progenitoras, inferindo também a semelhança do comportamento sexual dessa trindade filogeneticamente próxima (NAGAMACHI et al., 1997). No entanto, estudos

mais conclusivos sobre o *C. penicillata* e híbridos se fazem ainda necessários, para possibilitar melhor entendimento do comportamento sexual.

O índice gonadossomático encontrado para saguis híbridos do presente estudo (0,37%) foi aproximadamente de 5 e 20 vezes maior do que o observado para primatas, como o homem (0,08%) e o gorila (0,02%), respectivamente (HALL-CRAGGS, 1962; JOHNSON et al., 1980; FRANÇA et al., 2002). Certamente, este aspecto ecoa na intensidade de competição espermática relativamente baixa observada para o homem e o gorila, por exemplo, em contraste com o macaco rhesus e *M. fascicularis* (IGS = ~0,75%) que são promíscuos ou poligâmicos femininos. Estas duas espécies de primatas apresentam comportamento sexual monogâmico ou poligâmico masculino de dominância, que pleiteiam pouca competição espermática (SHORT, 1997; FRANÇA et al., 2002). O *C. penicillata* com IGS de 0,36% (LEAL & FRANÇA, 2006) esteve bastante aproximado dos saguis do presente estudo.

O índice gonadossomático (IGS) varia grandemente em mamíferos. Em trabalhos (revisão em KENAGY & TROMBALUK, 1986) envolvendo mais de 130 diferentes espécies de mamíferos, o IGS pode variar de 0,01% em baleias a 8,4% no roedor *Tatera afra*. Os mesmos autores tratam que espécies com menor peso corporal alocam maior percentual de massa corporal para tecido testicular, proferindo assim, mais energia para este órgão e, de modo consequente, para a reprodução. O comportamento sexual desses saguis também é relacionado com o tamanho do testículo, consoante com a literatura. Em conformidade com alguns pesquisadores (KENAGY & TROMBLUK, 1986; SHORT, 1997), pelo fato da competição ser por maior quantidade de sêmen depositado no trato genital feminino, as espécies que exprimem comportamento sexual promíscuo ou poligâmico feminino, como acontece com vários machos que cruzam com a mesma fêmea, num mesmo ciclo estral, tendem a apresentar testículos relativamente maiores do que aquelas espécies que são monogâmicos ou poligâmicos masculinos. O valor encontrado para o IGS dos saguis híbridos (0,37%) aqui estudados reforça que os saguis híbridos devem possuir um comportamento poligâmico feminino.

Em um todo, nos mamíferos investigados até o presente momento, o percentual do testículo ocupado pela túnica albugínea mais mediastino testiculares fica em torno de 10% (AMANN, 1970; FRANÇA & RUSSEL, 1998). Isto posto que o percentual de aproximadamente 7%, avaliado para saguis, encontra-se ligeiramente

abaixo desta faixa, sendo, no entanto, aproximadamente 2,5 vezes menor que o valor encontrado para o homem (JOHNSON et al., 1980; LEAL & FRANÇA, 2006).

### **6.1.2. Análise morfométrica dos testículos**

O compartimento tubular ocupa a maior parte do testículo, exercendo, assim, grande ação sobre o peso testicular e a produção espermática (AMANN, 1970a). Apesar disso, variação considerável é observada no percentual ocupado pelos túbulos seminíferos no testículo de diferentes espécies de mamíferos. Para uns dos progenitores dos saguis (*C. penicillata*), o percentual ocupado pelos túbulos seminíferos foi de ~92% (LEAL & FRANÇA, 2006), encontrando-se no patamar mais elevado para os mamíferos já investigados (ALMEIDA, 2002). O mesmo não se deu para os saguis híbridos que obtiveram um valor de ~85% de túbulos seminíferos. O *C. penicillata* possui a proporção mais elevada de túbulos seminíferos dentre os poucos primatas investigados, sendo aproximadamente 50% e 10% maior do que o observado para o homem e *M. fascicularis*, respectivamente (JOHNSON et al., 1980; ZHENGWEI et al., 1997).

A eficiência de produção espermática entre as várias espécies observadas compõe um dos principais fatores, a proporção entre os compartimentos tubular (espermatogênico) e intertubular (esteroidogênico), sendo bastante variável em mamíferos (FRANÇA & RUSSEL, 1998; GODINHO, 1999; NEVES, 2001; ALMEIDA, 2002).

Dos três padrões observados para o arranjo e a proporção dos elementos constituintes do espaço intertubular na revisão bibliográfica (FAWCETT et al., 1973), os saguis do presente estudo enquadraram-se no padrão II, onde espécies que apresentam grupos de células de Leydig espalhadas em abundante tecido conjuntivo frouxo e drenado por um vaso linfático localizado central ou excentricamente no espaço intertubular. Em capivaras foram observados padrões do tipo I e III (PAULA, 1999), denotando que a classificação de Fawcett está ainda em aberto. Para o *C. penicillata* o arranjo do espaço intertubular observado (LEAL & FRANÇA, 2006) enquadra na classificação do tipo II citado por Fawcett et al. (1973), juntamente com os saguis híbridos aqui trabalhados.

A começar da divergência dos padrões acima descritos, fica notadamente evidenciado que existem amplas variações com relação à quantidade de células de

Leydig e também com a disposição de vasos/espacos linfáticos nos testículos de mamíferos. Apesar de existir ainda pouco conhecimento a respeito das implicações fisiológicas destas variações, Fawcett et al., (1973) indagaram que as mesmas estariam provavelmente associadas com a habilidade dos vasos linfáticos de mover para fora dos testículos materiais vascularmente secretados, e manter as concentrações adequadas de andrógenos no testículo e nos vasos sanguíneos. Esta especulação é também uma hipótese para tentar transpassar o fato de que os capilares sanguíneos testiculares não são fenestrados como ocorre em outras glândulas endócrinas (FAWCETT et al., 1973). Ainda que não se compreenda a razão pela qual a organização dos vasos/espacos linfáticos e células de Leydig apresentam variações tão enfatizadas nas diversas espécies de mamíferos, os resultados observados para roedores investigados até o presente momento propõem que a filogenia aparenta representar um importante papel na determinação do arranjo arquitetônico dos mesmos. Entretanto, mais estudos se fazem necessários para inteirar-se da razão destas variações morfofuncionais. A correlação positiva e significativa observada entre o volume ocupado pelas células de Leydig e o volume ocupado pelos vasos sanguíneos no presente trabalho com saguis híbridos pode ser um importante indicativo do que se passa funcionalmente no compartimento intertubular.

Devido ao fato do diâmetro tubular variar em função de uma série de fatores, o mesmo é um parâmetro especificamente utilizado como indicador de funcionamento espermatogênico em averiguações envolvendo a função testicular. Desta forma, podemos citar estudos versados no desenvolvimento testicular com o objetivo de se determinar o período de estabelecimento da puberdade e maturidade sexual (época em que ocorre a estabilização no diâmetro tubular) (ATTAL & COUROT, 1963; GODINHO & CARDOSO, 1979; FRANÇA et al., 2000), a ação dos fatores sazonais na espermatogênese (HOCHEREAU-DE REVIERS & LINCOLN, 1978; BERNDTSON *et al.*, 1983; PARREIRA & CARDOSO, 1991), os efeitos da idade avançada (JONES & BERNDTSON, 1986; PAULA & CARDOSO, 1994; NIPKEN & WROBEL, 1997), análises experimentais e toxicológicas (RUSSELL et al., 1993) e alterações no processo espermatogênico devido a problemas cromossômicos (CLOSE et al., 1996; NEVES et al., 2002).

O valor encontrado nos saguis híbridos do presente estudo foi de 228µm. Em algumas espécies de marsupiais, o valor encontrado para o diâmetro tubular médio

pode chegar a 550 $\mu$ m (WOOLLEY, 1975); nos amniotas já investigados, o valor encontrado foi de 160 a 350 $\mu$ m (ROOSEN-RUNGE, 1977; SETCHELL et al., 1994). Na investigação para o sagui-de-tufos-pretos (*C. penicillata*), o diâmetro tubular médio encontrado foi de aproximadamente 260 $\mu$ m (LEAL & FRANÇA, 2006). Diversos parâmetros contribuem para a constituição do diâmetro tubular, dentre os quais podem ser mencionados o número de camadas de células mióides, que constituem a túnica própria; o tamanho e a eficiência das células de Sertoli, responsáveis pela altura do epitélio seminífero; e a secreção de fluidos pela célula de Sertoli, que, em última análise, determina o tamanho do lume tubular. Esses elementos citados podem diferenciar consideravelmente nas diferentes espécies de mamíferos (FRANÇA & RUSSELL, 1998) e ainda dentro de linhagens ou raças de uma mesma espécie (FRANÇA & RUSSELL, 1998; AVELAR et al., 2004). O diâmetro tubular médio observado para os saguis híbridos do presente trabalho (228 $\mu$ m) foi relativamente próximo do valor encontrado para os saguis *C. jacchus* e *C. penicillata* (~280 $\mu$ m) por HODGES & HEARN (1977) e LEAL & FRANÇA (2006), respectivamente. Entretanto, em trabalho prévio com *C. penicillata* (GUERRA & GODINHO, 1984a) o valor encontrado para este parâmetro foi aproximadamente 30% menor (~180  $\mu$ m). Esta diferença deveu-se, provavelmente, ao fato do material deste trabalho ter sido incluído em parafina. Dessa forma, só podemos validar em estudos de comparações se as condições de preparação do material forem semelhantes.

Do peso testicular, do diâmetro tubular e do volume de túbulos seminíferos no testículo, obtemos o valor do comprimento total dos túbulos seminíferos. O peso deste órgão varia nas distintas espécies de mamíferos, tornando-se sem acepção discutir o valor deste parâmetro. Ainda assim, podemos utilizar um ponto de referência unitário de peso bem como o valor por grama de testículo, o que torna possível comparar as diferentes espécies. Assim, considerando que a variação expressiva pode ocorrer para o comprimento tubular entre os mamíferos, podemos citar dois exemplos que divergem, como o marsupial *Antechinus stuartii* que apresenta seis metros de túbulos seminíferos (WOOLEY, 1975) e o jumento Pêga com 22 metros de túbulos por grama de testículo (NEVES, 2001). A resultante da variação no diâmetro e no volume ocupado pelos túbulos seminíferos no testículo constitui esta grande diferença acima citada. A título de exemplo, é esperado que um maior diâmetro tubular implique em menor comprimento tubular por grama de

testículo em uma dada espécie. No geral, de 10 a 20 metros de túbulos seminíferos por grama de testículo é observado na maioria dos mamíferos já investigados (AMANN, 1970a; YADAV & SHARMA, 1994; FRANÇA & RUSSELL, 1998). O mesmo se deu para os saguis híbridos do presente estudo com um valor aproximado de 20 metros, corroborando as referências anteriormente citadas ao se tratar do menor diâmetro tubular (228 $\mu$ m) em relação a um maior comprimento tubular nos saguis híbridos. O mesmo se dá para o *C. penicillata* com 256 $\mu$ m de diâmetro tubular em relação ao menor comprimento de túbulos seminíferos (18 metros), ambos, apresentando parâmetros relativamente altos para maioria dos mamíferos.

## **6.2. Contagens celulares e quantificação da espermatogênese**

### **6.2.1. População e razões celulares**

A estabilidade entre proliferação e apoptose exerce uma função muito importante na regulação do número de células espermatogênicas no epitélio seminífero. Principalmente na fase espermatogonial, o recurso homeostático de regulação de apoptoses é visto como densidade-dependente, limitando a quantidade de células germinativas que entram na fase meiótica a um número que possa ser suportado pelas células de Sertoli disponíveis (HUCKINS, 1978; DE ROOIJ & LOK, 1987; SHARPE, 1994; DE ROOIJ, 1998). Assim, este recurso de regulação numérica das células germinativas pode ser representado como uma competição por fatores de crescimento ou outros fatores importantes para o avanço destas células durante a espermatogênese (JACOBSON et al., 1997). Conforme o estado e a maneira de degeneração das células germinativas serem espécie-específicas, de maneira geral, apoptoses ocorrem durante as divisões mitóticas e meióticas (ROOSEN-RUNGE, 1973). O mesmo autor nos conta que mesmo as espécies com um alto número na produção espermática, as perdas celulares que sucedem durante as divisões espermatogoniais podem ser notoriamente altas. Enfatizamos em observações com peixes teleósteos (MATTA et al., 2002) e em mamíferos que as células pertencentes a um mesmo clone (interconectadas por pontes celulares) podem suportar sua apoptose de maneira isolada (HAMER et al., 2003).

A eficiência das células de Sertoli é a quantidade de espermátides arredondadas sustentada por cada célula de Sertoli e que, foi observado em *Callithrix penicillata* (LEAL & FRANÇA, 2006) um valor pouco acima de 2,5 vezes maior do que o valor observado para a espécie humana (FRANÇA et al., 2002) já para saguis híbridos, esse valor obteve 1,2 vezes maior em relação ao *Callithrix penicillata* e 3,2 vezes maior do que no homem respectivamente citados. Condizente com a tabela 5, quando comparada aos saguis do presente estudo e um dos seus progenitores observamos uma contiguidade entre os mesmos e, quando comparado a outros mamíferos já investigados neste aspecto, o número de espermátides arredondadas por célula de Sertoli encontrado para *Callithrix penicillata* ( $8,0 \pm 0,4$  - LEAL & FRANÇA, 2006) e para os saguis híbridos ( $9,6 \pm 0,95$ , presente estudo) encontram-se em uma escala intermediária. Este índice, como densidade-dependente, é relatado como um mecanismo adaptador da população de células germinativas e denomina-se, também, a eficiência da célula de Sertoli, sendo um bom indicativo da eficiência espermatogênica desses animais hibridizados, uma vez que, após o estágio 1, as espermátides se alongam e praticamente não sofrem apoptose.

Para o homem, esse número encontra-se na faixa de três espermátides arredondadas por célula de Sertoli (CLERMONT, 1963; RUSSELL, 1996; JOHNSON et al., 1998; FRANÇA et al., 2002). Embora os valores observados para o índice de células de Sertoli no presente trabalho difiram significativamente em relação aos observados para os seres humanos, isto não implica que o sagui híbrido seja um excelente modelo experimental para estudos toxicológicos e comparativos envolvendo vários aspectos da biologia reprodutiva dos primatas. Sendo o sagui filogeneticamente próximo ao homem, e quanto à utilização de certos roedores para a maioria das pesquisas biomédicas, além do arranjo das associações de células germinativas e, particularmente, da duração da espermatogênese de *C. penicillata* e *C. jacchus*, nos estudos de Leal & França (2006), assim como os dados do presente estudo para saguis híbridos, observa-se a existência de um padrão semelhante ao homem, sugerindo que esta espécie hibridizada pode representar um modelo alternativo e experimental útil para a realização de estudos comparativos do processo espermatogênico, particularmente investigações relacionadas com a expansão do uso de células-tronco espermatogônias e a criação de ondas de espermatogênese *in vitro*. Além disso, os resultados encontrados no presente

estudo podem ser úteis para a pesquisa biomédica em que o transplante de espermatogônias e técnicas de enxerto testicular poderiam ser utilizados como ferramentas para melhor compreender a função testicular afim de se preservar o material genético da extinção de populações de primatas.

Ao sabermos de quantas gerações espermatogoniais possuem uma determinada espécie podemos inferir fatores relacionados com a eficiência deste tipo celular (Tabela 2 - *Revisão Bibliográfica*). A mesma tabela nos mostra em achados literários que normalmente existe uma grande perda celular (de 60 a 80%) na fase espermatogonial, em relação ao número teoricamente esperado (64 espermatócitos primários para espécies que possuem 6 gerações de espermatogônias e 32 para espécies com 5 gerações). Em grande parte das espécies de mamíferos já investigados, tais como equino e coelhos 5 gerações de espermatogônias são descritas, enquanto para roedores de laboratório (ratos e camundogos), suínos, ruminantes e cão, existem 6 gerações de espermatogônias diferenciadas (A1-4; In; e B). Em primatas o menor número de gerações espermatogônias (duas) é encontrado no homem (SINHA-HIKIM et al., 1985<sup>a</sup>), enquanto que no *M. mulatta*, *M. fascicularis* e *M. arctoides* são encontradas cinco gerações (FRANÇA et al., 2002). Para o *C. jacchus* filogeneticamente próximo ao *C. penicillata* progenitores dos saguis híbridos aqui estudados possui a presença de 4 gerações espermatogoniais (MILLAR et al., 2000; WEINBAUER et al., 2001). Conforme foi citado na secção resultados, o presente trabalho não teve como objetivo investigar a cinética espermatogonial nos saguis híbridos, embora, acreditamos que o número de gerações espermatogoniais nestes indivíduos seja semelhante ao encontrado para o *C. jacchus* (MILLAR et al., 2000; WEINBAUER et al., 2001). Certos autores reforçam que na família Callitrichidae quatro gerações de espermatogônias estão presentes, uma vez que é considerado que este aspecto do processo espermatogênico é provavelmente filogeneticamente determinado (CLERMONT, 1972; FRANÇA & RUSSEL, 1998; FRANÇA et al., 2002). Em saguis híbridos, cerca de 40 espermatócitos primários em páquíteno são produzidos, valor este, acima da faixa observado para o *C. penicillata* (18,4/ LEAL & FRANÇA, 2006) e acima da faixa da maioria dos animais domésticos que é de 14,6 a 24, 8 (FRANÇA & RUSSEL, 1998). Entretanto, quando nos referimos a relação nas razões dos números corrigidos nos saguis híbridos, observamos um valor de 3,7 do rendimento espermatogonial, valor este, pouco abaixo do estimado para o *C. penicillata* (7,3/

LEAL & FRANÇA, 2006) e pouco acima do valor observado em humanos (2,5/ SINHA-HIKIM et al., 1985<sup>a</sup>). Esse valor nos diz uma apoptose espermatogonial de ~77% do esperado (16 espermatócitos em paquíteno para 4 gerações espermatogoniais) subentendendo que, não houve nenhuma anormalidade relevante no rendimento espermatogonial nos saguis hibridizados em relação ao sagui e em humanos. O rendimento geral da espermatogênese é a mensuração da eficiência do processo espermatogênico como um todo, sua confiabilidade, como índice de estimativa da formação de espermatozoides, é envasado no fato de que os extravios durante o processo espermatogênico são considerados pequenos e não significativos (AMANN, 1970; BERNDTSON, 1977; RUSSELL & PETERSON, 1984; JOHNSON et al., 2000). A disponibilidade literária para mamíferos cita que, de maneira ecumênica, somente em torno de 15 a 30% dos espermatozoides teoricamente esperados são produzidos (HUCKINS, 1978; FRANÇA & RUSSELL, 1998; SWERDLOFF et al., 1998; FRANÇA et al., 2000<sup>a</sup>). Considerando que o sagui híbrido tenha quatro gerações espermatogoniais, a perda celular foi aproximadamente 87% ficando perto da maioria dos mamíferos já investigados, incluindo-se o homem cuja perda celular é de aproximadamente 80% do número de espermátides teoricamente esperados. Em contrapartida, essa perda celular para o saguis híbridos foi de ~27% maior quando comparado a um dos seus progenitores o *C. penicillata* (60% de perda celular/ LEAL & FRANÇA, 2006).

### **6.2.2. Número de células de Sertoli**

No presente trabalho, cerca de 58 milhões de células de Sertoli foram encontradas por grama de testículo. De maneira geral, este valor está pouco acima do encontrado para a maioria dos mamíferos, ficando em torno de 17% maior do que citado para o homem (FRANÇA & RUSSEL, 1998; FRANÇA et al., 2002). Já o número de células por testículo deixa em pauta uma diferença dos híbridos aqui estudados pelo método de morfometria tubular para os progenitores *C. jacchus* que utilizou citometria de fluxo (WEINBAUER et al., 2001) e o *C. penicillata* (LEAL & FRANÇA, 2006) que utilizou morfometria tubular, sendo 32, 17 e 18 milhões de células de Sertoli por testículo, respectivamente, merecendo ser ressaltado que o peso testicular em ambas as espécies progenitoras foi muito próximo. Para o presente híbrido, este valor foi cerca de 21% maior que seus progenitores. Este

valor também é evidenciado na literatura por dados bastante discrepantes para uma mesma espécie, principalmente pelo fato de diferentes metodologias serem empregadas para obtenção de tais valores (RUSSEL et al., 1990b; FRANÇA & RUSSELL, 1998). Em ratos, por exemplo, espécie mais investigada para este parâmetro, o valor encontrado para o número de células de Sertoli varia cerca 350% (RUSSEL & FRANÇA, 1995). Portanto, é recomendável que somente dados obtidos com metodologias semelhantes sejam comparados.

As interações entre células de Sertoli e as células germinativas são de vital importância para a manutenção da produção espermática normal (GRISWOLD, 1995). Concomitante, o número total de células de Sertoli por testículo é o principal elemento na determinação da produção espermática e no tamanho do testículo (FRANÇA et al., 1995) sendo a população desse tipo celular estável ao longo dos diferentes estádios do ciclo, partindo-se da inferência do cálculo feito por França, (1991) e Neves, (2001). A célula de Sertoli para cada espécie possui uma capacidade de suporte de células germinativas relativamente fixa, uma vez que sua população não aumenta após a puberdade e ao longo dos diferentes estádios do ciclo do epitélio seminífero, sendo este número determinado durante o período pré-púbere (ORTH, 1993; FRANÇA et al., 2000) servindo de parâmetro para se quantificar e avaliar funcionalmente o processo espermatogênico de uma dada espécie (STEINBERGER, 1971; ORTH, 1982; RUSSELL & PETERSON, 1984; ORTH et al., 1988; FRANÇA & RUSSEL, 1998; FRANÇA, et al., 1999).

### ***6.2.3. Morfometria, população das células de Leydig, índice leydigossomático e níveis de testosterona***

O epitélio seminífero compõe-se por gerações de células germinativas suportadas por células de Sertoli com funções na condução e manutenção do processo espermatogênico (RUSSELL et al., 1990), Os efeitos endócrinos na espermatogênese são, em sua maioria, através de ações indiretas nas células de Sertoli (PARKS et al., 2003). O perfeito funcionamento da célula de Sertoli depende de inúmeras interações, endócrinas, parácrinas e de relações celulares, dentre elas as interações físicas e parácrinas com as células germinativas (YE et al., 1993; BOUJRAD et al., 1995; CAVICCHIA et al., 1998), células peritubulares (DHYM, 1994; PARKS et al., 2003), destacando-se as células de Leydig (LEJEUNE et al., 1998;

MENDIS-HANDGAMA & ARIYARATNE, 2001). Os diferentes arranjos e relações quantitativas entre os componentes do espaço intertubular, influenciam diretamente na espermatogênese, bem como na liberação da testosterona, na corrente sanguínea (RUSSELL, 1996). É sabido que o volume individual destas células é bastante variado nas diferentes espécies de mamíferos. Dados na literatura indicam que o volume individual da célula de Leydig pode variar de  $\sim 400\mu\text{m}^3$  em ovinos e javalis (LUNSTRA & SCHANBACHER, 1998; ALMEIDA, 2002) e  $\sim 500\mu\text{m}^3$  em equinos (JOHNSON & NEAVES, 1981), estando o valor observado para a maioria dos mamíferos investigados situados na faixa compreendida entre 1000 e  $2000\mu\text{m}^3$  (ALMEIDA, 2002). Entretanto, o volume individual das células de Leydig encontrado em saguis híbridos foi abaixo do esperado no patamar intermediário observado para a maioria dos mamíferos já estudados, sendo 77% abaixo do *C. penicillata* (LEAL & FRANÇA, 2006) e muito inferior ao valor médio ( $\sim 3000\mu\text{m}^3$ ) citado para a espécie humana (MORI, 1980; KALER & NEAVES, 1978; SINHA-HIKIM et al., 1987). Corroborando com esses valores volumétricos das células de Leydig para saguis híbridos os mesmo apresentaram concentrações de testosterona abaixo da média observada em saguis do gênero *Callithrix sp.*, embora esse valor encontre-se consideravelmente dentro da margem mínima das espécies progenitoras. Possivelmente, a baixa de testosterona está relacionada com a baixa no volume, em  $\mu\text{m}^3$ , das células de Leydig. A imprescindibilidade de testosterona para a produção espermática e para manter os níveis periféricos de andrógenos pode estar associado com o tamanho do compartimento de células de Leydig. Entretanto, de acordo com alguns pesquisadores (FAWCETT et al., 1973; RUSSELL, 1996), a maior quantidade de células de Leydig, em algumas espécies, pode estar relacionada com a síntese de outros tipos de esteróides que não testosterona-feromônios ou substâncias com algumas outras funções ainda indefinidas. Corroborar citar ainda que inúmeros fatores possam influir na quantidade necessária de células de Leydig por animal, dentre os quais podem ser destacados: a quantidade de LH disponível; os números de receptores de LH por célula; a quantidade de testosterona que a célula de Leydig é capaz de secretar em um dado tempo; a velocidade pela qual a testosterona deixa o testículo via vasos linfáticos, vasos sanguíneos e fluido seminal; o volume sanguíneo do animal; e a taxa de metabolismo da testosterona (RUSSEL et al., 1994; RUSSEL, 1996). Assim, podemos colocar que o número total de células de Leydig por testículo nos saguis

híbridos foi quatro vezes maior que os valores encontrados para o *C. penicillata* (LEAL & FRANÇA, 2006) dando um importante parâmetro de discussão sobre o número de células de Leydig com o aumento do parênquima testicular também estando relacionado com produção de testosterona, uma vez que a significância do volume de células de Leydig em correlação aos níveis séricos de testosterona foi significativo ( $r=0,8$ ), embora seja sabido que as células de Leydig são as principais responsáveis pela produção de esteróides, essa correlação positiva entre o número total de células de Leydig no testículo e a concentração de testosterona foi anteriormente encontrada em coelhos (Castro et al., 2002). No entanto, não se sabe ainda a razão da enorme variação observada para o percentual ocupado por estas células no testículo. A estrutura correlacionada com a função das células de Leydig em estudos com várias espécies de mamíferos mostraram que variações na secreção de testosterona resultam mais da capacidade individual desta célula em secretar testosterona do que de diferenças do volume total das mesmo no testículo (EWING et al., 1979) Esta capacidade está altamente correlacionada com a quantidade de retículo endoplasmático liso presente na célula de Leydig (ZIRKIN et al., 1980).

Considerando que os saguis híbridos do presente estudo estavam em estado aparentemente normal (peso, inspeção clínica, valores hematológicos e bioquímicos) e que a coleta do plasma sanguíneo ocorreu no limiar mínimo do pico sérico para *C. penicillata* e *C. jacchus*, estes resultados sugerem que a hibridação pode interferir nos níveis de testosterona em uma parte da população, embora a reprodução seja mantida nos grupos, o que é evidenciada pela presença de filhotes. Podemos avaliar que o volume nuclear das células de Leydig em saguis híbridos ( $\sim 115\mu\text{m}^3$ ) não ficou tão abaixo da média na maioria dos mamíferos já investigados ( $150\text{-}250\mu\text{m}^3$ ) mostrando que a relação da capacidade individual desta célula em secretar testosterona pode estar relacionada com a quantidade de retículo endoplasmático liso presente na célula de Leydig e não com volume total das células de Leydig (RUSSEL, 1996; FRANÇA & RUSSELL, 1998).

Em relação ao homem, o maior número de células de Leydig por grama de testículo nos saguis híbridos deve-se principalmente ao menor tamanho desta célula, embora deva ser ressaltado que os dados disponíveis na literatura para a espécie humana são muito variados. Na tabela 8, também se pode observar uma comparação mais ampla entre o sagui híbrido, seu progenitor e o homem, em

relação a diversos parâmetros considerados importantes ou ilustrativos da função testicular e biologia reprodutiva destas três espécies de primatas.

**TABELA 8.** Biometria e morfometria comparada de dados obtidos para o sagui híbrido (*C. penicillata* com *C. jacchus*) (presente estudo), *Callithrix penicillata*, *C.* e o homem.

Parâmetro	Híbrido	<i>C. penicillata</i> *	Homem**
Peso Testicular (g)	0,6	0,5	17
Índice gonadossomático (%)	0,37	0,36	0,08
Túbulos seminíferos (%)	87,1	92	62
Comprimento de TS (m)	11,8	8,9	-
Índice meiótico <sup>1</sup>	2	3,4	1,3
Nº cél. Sertoli (g/test. x 10 <sup>6</sup> )	57,8	35	49
Nº Ar/S	8,7	8	3
Rendimento geral	8,3	25	3,2
Célula de Leydig (%)	1,4	2	3,1-15,7
Vol. individual cél. Leydig (µm <sup>3</sup> )	323	1400	2940-4300
Nº cél. de Leydig (g/test. x10 <sup>6</sup> )	47	14	9

\*Dados extraídos da literatura, ver Leal, M. C., 2005. \*\*Dados extraídos da literatura, ver Clermont, 1963; Russell, 1996; Johnson et al., 1998; França et al., 2002.

<sup>1</sup>Número de espermatídes arredondadas por espermatócitos primário. TS – Túbulo seminífero. S- Sertoli. Test- Testículo. g- grama. m- metros. Ar- Espermatídes arredondadas.

## 7. CONCLUSÕES

Esse é o primeiro estudo a descrever a espermatogênese e quantificar os números de células germinativas e células de Sertoli em saguis híbridos. No atual trabalho, a composição celular do ciclo do epitélio seminífero desses saguis híbridos é muito semelhante à relatada para seus progenitores e para humanos.

O alto número de apoptoses de células germinativas na fase espermatogonial pode estar relacionado com as estratégias reprodutivas e com o comportamento sexual devido à competição espermáticas. A apoptose também podem estar relacionada com o tamanho do testículo dos saguis híbridos, sugerindo tanto para os progenitores (*C. jacchus* e *C. penicillata*) quanto para os indivíduos híbridos dos mesmos um comportamento sexual predominantemente promíscuo ou poligâmico feminino, uma vez que o índice gonadossomático teve uma proporção elevada para o híbrido e seus progenitores (~0,4%), bem maiores que aquelas espécies de comportamento monogâmico ou poligâmico masculino de dominância.

Ao se tratar da densidade volumétrica (%) dos diferentes componentes do testículo, o valor ocupado pelos túbulos seminíferos foi de ~87%, em consoante aos padrões mais elevados para as espécies de mamíferos estudados. Os valores médios observados para diâmetro tubular (~230 $\mu$ m) e comprimento tubular (~20metros) por grama de testículo, encontram-se no limiar da faixa média observada para a maioria dos mamíferos já investigados.

Grande número de célula de Sertoli por grama de testículo foi encontrado para os saguis híbridos (~58 milhões) assim como humanos (~49 milhões). Para os progenitores *C. jacchus* e o *C. penicillata* o valor foi de ~35 milhões, encontrando-se dentro dos padrões intermediários para a maioria dos mamíferos já investigados.

Embora o valor encontrado para o volume individual da célula de Leydig (~323 $\mu$ m) tenha sido muito abaixo dos progenitores (~1400 $\mu$ m), do homem (2940 – 4300 $\mu$ m) e do observado para maioria dos mamíferos, o número médio de células de Leydig por grama de testículo aumentou consideravelmente. O valor encontrado para os híbridos foi de 47%, enquanto os progenitores apresentaram 14% e o homem 9%.

A correlação positiva e significativa entre o volume de células de Leydig e as concentrações de testosterona nos saguis híbridos ( $r = 0,8$ ) provavelmente reflete esse maior número de células de Leydig. As células de Leydig adultas e maduras

dos saguis híbridos podem ser células menos diferenciadas, como indicam os menores volumes nuclear e citoplasmático, sugerindo que tais células estejam atrasadas em seu desenvolvimento, mostrando um atraso no desenvolvimento sexual desses animais. Este fato também pode ter relação com o comportamento sexual, uma vez que estes animais podem possuir certa hierarquia de dominância sobre machos alfa.

Como resultante da proximidade filogenética com a espécie humana, em virtude dos modelos experimentais mais utilizados, tais como ratos e camundongos, e com os impactos ecológicos comprovados desses animais na natureza com prescrição de serem tomadas medidas para sua retirada e alocados em recintos, os saguis híbridos podem ser bastante úteis para se efetuarem estudos comparativos entre estas duas espécies de primatas, principalmente nos mecanismos de regulação do processo espermatogênico.

Os primatas mais utilizados em pesquisas do gênero *Callithrix* (6 espécies) são o *Callithrix jacchus* e o *Callithrix penicillata*, com o *C. jacchus* como modelo para pesquisas em estresse fisiológico, reprodução, genética, morfologia, etologia, virologia, parasitologia, cancerologia, teratologia, produção de vacinas, células linfoblásticas e o *C. penicillata* como modelo para pesquisas em oftalmologia, reprodução, malária e leishmaniose.

Assim, os saguis híbridos dessas duas espécies que forem constatadas sob “impacto ambiental ou risco social”, e forem capturados e alocados em recintos apropriados a ponto de não poderem mais voltar ao meio natural, poderão ser de grande valia em pesquisas de mérito ético e social para a melhoria da saúde humana e suas adversidades.

## ANEXO I

### Protocolo utilizado na inclusão em resina (Historesin® Leica) e coloração com azul de toluidina:

#### Desidratação:

- Álcool 70% ..... 30 min. (pode ficar por tempo indeterminado)
- Álcool 80% ..... 30 min.
- Álcool 90% ..... 30 min.
- Álcool absoluto ..... 30 min.
- Álcool-resina..... 30 min.

#### Pré-Infiltração e infiltração:

- Resina de infiltração nova
  - Colocar resina para cobrir o corte
  - Deixar na geladeira “overnight”
- Preparo da resina de infiltração  
100 ml de Historesin e 1g de catalisador (misturar)

#### Inclusão:

- Preparar a resina no momento de uso e manter em gelo.
- O volume de resina utilizada é de cerca de 0,5mL/bloquinho
- Preparo da resina de inclusão: 15 mL de solução infiltração e 1mL de endurecedor (sob refrigeração).

#### Coloração:

- Azul de toluidina: 1g
  - Bórax (Borato de Sódio): 1g
  - Água destilada: 100mL
- ✓ TEMPO: 5 min. em imersão e 10 min. em água corrente.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT, D. H.; HEARN, J. P. **Physical, hormonal and behavioural aspects of sexual development in the marmoset monkey, *Callithrix jacchus*.** *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 53, p. 155–166, 1978.
- ABERCROMBIE, M. **Estimation of nuclear populations from microtome sections.** *Anatomical Record*, v. 94, p.238-248, 1946.
- ALMEIDA, F. F. L. **Estrutura e função testiculares em javalis (*Sus scrofa scrofa*) sexualmente maduros.** 2002, p. 65. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – *Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais*, Belo Horizonte, 2002.
- ALONSO, C.; FARIA, D. S.; LANGGUTH, A.; SANTEE, D. F. **Variação da pelagem na área de intergradação entre *Callithrix jacchus* e *Callithrix penicillata*.** *Revista Brasileira de Biologia*, v. 47, n. 4, p. 465-470, 1987.
- AMANN, R. P. **Sperm production rates.** In: JONHSON, A D., GOMES, W. R., VANDEMARK, N.L. (Eds.). *The testis*. New York: Academic Press, v. 1, cap. 7, p. 433-482 1970.
- AMANN, R. P., **A review of anatomy and physiology of the stallion.** *Journal of Equine Veterinary Science*, p. 83-105, 1981.
- AMANN, R. P.; LAMBIASE, J. T. **The male rabbit III. Determination of daily sperm production hy means of testicular homogenates.** *Journal of Animal Science*, v. 28, p. 369-374, 1969.
- AMANN, R. P.; SCHANBACHER, B. D. **Physiology of male reproduction.** *Journal of Animal Science. Suppl.*, v. 57, p. 380-403, 1983.
- ATTAL, J.; COUROT, M. **Développement testiculaire et etablissement de la spermatogenese chez le taureau.** *Annales de Biologie Animal Biochimie Biophysique*, v. 8, n. 3, p. 219-241, 1973.
- AVELAR, G. F.; LEAL, M. C; FRANÇA, L. R. **Sertoli and Leydig cells number per testis and daily sperm production in different mice strains.** In: *13 European workshop on molecular e cellular endocrinology of the testis*, 2004, Dunblane, Scotland. *Programme e Miniposters*: n. H1, 2004.
- BAKER, A. J.; DIETZ, J. M.; KLEIMAN, D. G. **Behavioral evidence for monopolization of paternity in multi-male groups of golden lion tamarins.** *Animal Behavior*, v. 46, p. 1091-1103, 1993.
- BERNDTSON, W. E. **Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review.** *Journal of Animal Science*, v. 44, n. 5, p. 818-83, 1977.

BERNDTSON, W. E.; SQUIRES, E. L.; THOMPSON Jr, D. L. **Spermatogenesis, testicular composition and the concentration of testosterone in the equine testis as influenced by season.** *Theriogenology*, v. 20, n. 1, p. 449-457, 1983.

BRAZ, J. **Avaliação das características seminais de macacos pregos (*Cebus apella*) mantidos em cativeiro, antes e após vasectomia bilateral.** *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 43, n. 4, p. 561-567, 2006.

BREED, W.G. Morphological variation in the testes and accessory sex organs of australian rodents in the genera *Pseudomys* and *Notomys*. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 66, n. 1, p. 607-613, 1982.

BRINSTER, R. L. **Germline stem cell transplantation and transgenesis.** *Science*, v. 296, n. 5576, p. 2174-6, 2002.

BRINSTER, R. L.; AVARBOCK, M. R. **Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 91, n. 24, p. 11303-7, 1994.

BRINSTER, R. L.; ZIMMERMANN, J. W. **Spermatogenesis following male germ-cell transplantation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 91, n. 24, p. 11298-302, 1994.

CASTRO, A.C.S.; BERNDTSON, W.E.; CARDOSO, F.M. **Plasma and testicular testosterone levels, volume density and number of Leydig cells and spermatogenic efficiency of rabbits.** *Brazilian Journal of Medical Biological Research*, v. 35, p.493-498, 2002.

CARDOSO, F. M. **Morfologia, cinética e qualificação da espermatogênese em zebus (*Bos indicus*).** 1981, 203 p. Tese (Doutorado em Ciências) - *Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais*, Belo Horizonte.

CHIARINI-GARCIA, H.; RUSSEL, L. D. **High-resolution light microscopic characterization of mouse spermatogonia.** *Biology of Reproduction*, v. 65, n. 4, p. 1170-78, 2001.

CHIARINI-GARCIA, H.; HORNICK, J. R.; GRISWOLD, M. D.; RUSSEL, L. D. **Distribution of type A spermatogonia in the mouse is not random.** *Biology of Reproduction*, v. 65, n. 4, p. 1179-85, 2001.

CHOWDHURY, A. K.; MARSHALL, G. R. **Irregular pattern of spermatogenesis in the baboon (*Papio anubis*) and its possible mechanism.** In: Steinberger, A.; Steinberger, E. (eds.). *Testicular Development, Structure and Function*. New York: Raven Press, p. 129-137, 1980.

CLERMONT, Y. **The cycle of the seminiferous epithelium in man.** *Animal Journal of Anatomy*, v. 112, p. 35-51, 1963.

CLERMONT, Y. **Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial review.** *Physiological Reviews*, v. 52, n. 1, p. 198-236, 1972.

CLEMMONS, A. J.; THOMPSON, Jr., D. L.; JOHNSON, L. **Local initiation of spermatogenesis in the horse.** *Biology of Reproduction*, v. 52, n. 6, p. 1258-1267, 1995.

CLOSE, R. L.; BELL, J. N.; DOLLIN, A. E.; HARDING, H. R. **Spermatogenesis and synaptonemal complexes of hybrid *Petrogale* (Marsupialia).** *Journal of Heredity*, v. 87, n. 2, p. 96-107, 1996.

COIMBRA-FILHO, A. F. **Acerca de um caso de hibridismo entre *Callithrix jacchus* (L., 1758) X *C. geoffroyi* (Humbolt, 1812) (Callitricidae, Primates).** *Revista Brasileira de Biologia*, v. 30, n. 4, p. 507-517, 1970.

COIMBRA-FILHO, A. F. **Os sagüis do gênero *Callithrix* da região oriental brasileira e um caso de duplo-hibridismo entre três de suas formas.** *Revista Brasileira de Biologia*, v. 31, n. 3, p. 377-388, 1971.

COIMBRA-FILHO, A. F. **Sobre um caso de triplo-hibridismo em *Callithrix* (Callitrichidae, Primates).** *Revista Brasileira de Biologia*, v. 38, n. 1, p. 61-71, 1978.

COIMBRA-FILHO, A. F. **Sistemática, distribuição geográfica e situação atual dos símios brasileiros (Plathyrrhini-Primates).** *Revista Brasileira de Biologia*, v. 50, n. 4, p. 1063-1079, 1990.

COIMBRA-FILHO, A. F., PISSINATTI, A., RYLANDS, A. B. **Experimental multiple hybridism among *Callithrix* species from eastern Brazil.** In: *Marmosets and 45 Tamarins: Systematics, Behaviour and Ecology* (RYLANDS, A. B. Ed.). Oxford University Press. New York, 1993.

COSTA, D. S.; PAULA, T. A. R. **Espermatogênese em mamíferos.** *Scientia*, v. 4, n. 1/2, p. 53-72, 2003.

COUROT, M.; HOCHEREAU-DE REVIERS, M. T.; ORTAVANT, R. **Spermatogenesis.** In: JOHNSON, A. D.; GOMES, W. R.; VANDEMARK, N. L. (eds.). *The testis*. New York, CI: Academic Press, 1970, v.1, cap.6, p.339-432.

DE ROOIJ, D. G. **Sperm cells in the testis.** *International Journal of Experimental Pathology*, v. 79, n.2, p. 67-80, 1998.

DE ROOIJ, D. G.; GROOTEGOED, J. A. **Spermatogonial stem cells.** *Current Opinion in Cell Biology*, v. 10, n. 6, p. 694-701, 1998.

DE ROOIJ, D. G.; LOK, D. **Regulation of the density of spermatogonia in the seminiferous epithelium of the Chinese hamster: II. Differentiating spermatogonia.** *Anatomical Record*, v. 217, n.2, p. 131-36, 1987.

DE ROOIJ, D. G.; RUSSEL, L. D. **All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask.** *Journal of Andrology*, v. 21, n. 6, p. 776-798, 2000.

DIETZ, J. M.; BAKER, A. J. **Polygyny and female reproduction success in golden lion tamarins (*Leontopithecus rosalia*)**. *Animal Behavior*, v. 46, p. 1067-1078, 1993.

DIETRICH, T.; SCHULZE, W.; RIEMER, M. **Classification of the germinal epithelium in Java monkeys (*Macaca cynomolgus*) using digital image processing**. *Urology*, v. 25, p. 179-186, 1986.

DIGBY, L. J. **Social organization in a wild population of *Callithrix jacchus*: II. Intra-group social behavior**. *Primates*, v. 36, p. 361-375, 1995.

DIGBY, L. J. **Sexual behavior and extragroup copulations in a wild population of common marmosets (*Callithrix jacchus*)**. *Folia Primatologica*, v. 70, n. 3, p. 136-145, 1999.

DORST, V. J.; SAJONSKI, H. **Morphometrische untersuchungen am tubulussystem des schweinehodens während der postnatalen entwicklug**. *Monaths Veteriny Medicine*, v. 29, n. 24, p. 11298-11302, 1974.

DYM, M. **Spermatogonial stem cells of the testis**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 91, n. 24,, p. 11298-11302, 1994.

EPPLE, G. **Reproductive and social behavior of marmosets with special reference to captive breeding**. *Primates Medicine*, v. 10, p. 50-62, 1978.

FAWCETT, D. W.; NEAVES, W. B.; FLORES, M. N. **Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis**. *Biology of Reproduction*, v. 9, n. 5, p. 500-532, 1973.

FONSECA, G. A. B.; HERRMANN, G.; LEITE, Y. L.; MITTERMEIER, R. A.; RYLANDS, A. B.; PATTON, J. L. **Lista anotada dos mamíferos do Brasil. Conservation Internacional e Fundação Biodiversitas. Occasional Paper**; n. 4, 1996.

FORD, S.M.; PORTER, L.M.; DAVIS, L.C. **The Smallest Anthropoids: The Marmoset/ Callimico Radiation**. *Springer*, p. 25-61. 2009.

FRANÇA, L. R. **Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau**. 1991, p. 185, Tese (Doutorado em Ciências) – *Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais*, Belo Horizonte.

FRANÇA, L. R.; CARDOSO, F. M. **Desenvolvimento testicular de suínos Piau. III. Estabelecimento e evolução da espermatogênese, com ênfase na puberdade**. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 40, n. 5, p. 329-338, 1986.

FRANÇA, L. R.; OGAWA, T.; AVARBOCK, M.R.; BRINSTER, R.L.; RUSSELL, L.D. **Germ cells genotype control cells cycle during spermatogenesis in the rat**. *Biology of Reproduction*, v.59, n. 6, p. 1371-1377, 1998.

FRANÇA, L.R.; RUSSELL, L.D. **The testis of domestic animals.** In: REGADERA, J.; MARTINEZ-GARCIA (Ed.). *Male reproduction: a multidisciplinary overview.* Madrid: Churchill Livingstone, p. 197- 219, 1998.

FRANÇA, L.R.; RUSSELL, L.D. **Spermatogonial transplantation in mammals.** *Annual Review Biomedical Science*, v. 2, p. 61-76, 2000.

FRANÇA, L.R.; RUSSELL, L.D.; CUMMINS, J. M. **Is human spermatogenesis uniquely poor?** *Annual Review Biomedical Science* v. 4, p. 19-40, 2002.

FRANÇA, L. R.; SILVA Jr., V.; 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, n. 6, p. 1629-1636, 2000.

FREDERICKX, V.; MICHIELS, A.; GOOSSENS, E.; DE BLOCK, G., VAN STEIRTEGHEM, A. C., TOURNAYE, H. **Recovery, survival and functional evaluation by transplantation of frozen-thawed mouse germ cells.** *Human Reproduction*, v. 19, n. 4, p. 948-53, 2004.

GARBER, P. A.; ENCARNACIÓN, F. MOYA, L.; PRUETZ, J. D. **Demographic and reproductive patterns in moustached tamarin monkeys (*Saguinus mystax*): Implications for reconstructing platyrrhine mating systems.** *American Journal of Primatology*, v. 29, p. 235-254, 1993.

GODINHO, C. L. **Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*), sexualmente maduros.** 1999, p. 80. *Dissertação* (Mestrado em Biologia Celular) – *Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais*, Belo Horizonte, 1999.

GODINHO, H. P.; CARDOSO, F. M. **Desenvolvimento sexual de porcos Yorkshire. II. Estabelecimento e evolução da espermatogênese.** *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 31, n. 3, p. 351-361, 1979.

GRONDONA, K. E. B. **Morfometria do órgão vomeronasal e do testículo, comportamento sexual de coelhos e perfis de testosterona e androstenediona após cauterização do ducto incisivo,** 2012, p. 91. (Doutorado em Medicina Veterinária), *Universidade Federal de Viçosa*, Viçosa, 2012.

GUERRA, M. O.; GODINHO, H. P. **Espermatogênese em saguis *Callithrix penicillata*: identificação e determinação da frequência relativa dos estádios do ciclo do epitélio seminífero.** IN: *A Primatologia no Brasil* – 1. M. T. de Mello (ed.), p. 247-251. Sociedade Brasileira de Primatologia, Brasília, D F, 1984b.

HADLEY, M. A.; DYM, M. **Spermatogenesis in the vasectomized monkey: quantitative analysis.** *The Anatomical Record*, v. 205, p. 381-386, 1983.

HAIDER, S. G.; PASSIA D.; TREIBER, A.; MILHORST, S. **Description of eight phases of spermiogenesis in the marmoset testis.** *Acta Anatomica*, v. 135, p. 180-184, 1989.

HALL-CRAGGS, E. C. B. **The testis of Gorilla gorilla beringei**. *Proceeding of the Zoological Society London*, v. 139, p. 511-14, 1962.

HAMER, G.; ROEPERS-GAJADIEN, H. L.; GADEMAN, I. S.; KAL, H. B.; DE ROOIJ, D. G. **Intercellular bridges and apoptosis in clone of male germ cells**. *Journal of Andrology*, v. 26, p. 6, p. 348-53, 2003.

HEARN, J. P.; ABBOTT, D. H.; CHAMBERS, P. C.; HODGES, J.K.; LUNN, S. F. **Use of the common marmoset, *Callithrix jacchus*, in reproductive research**. *Primates Medicine*, v. 10, p. 40–49, 1978.

HELLER, C. G.; CLERMONT, Y. **Kinetics of the germinal epithelium in man**. *Recent Progress in Hormone Research*, v. 20, p. 545–575, 1964.

HERSHKOVITZ, P. **Living New World monkeys (Platyrrhini)**. *Chicago: University of Chicago Press*, 1977. Volume 1.

HESS, R. A.; COOKE, P. S.; BUNICK, KIRBY, J. D. **Adult testicular enlargement induced by neonatal hypothyroidism is accompanied by increased Sertoli and germ cell numbers**. *Endocrinology*, v. 132, n. 6, p. 2607-2613, 1993.

HIRSCH, A. **Avaliação da fragmentação do habitat e seleção de áreas prioritárias para a conservação dos primatas da bacia do Rio Doce, Minas Gerais, através da aplicação de um sistema de informações geográficas**. 2003. p. 227. Tese (Doutorado em Ecologia) – *Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais*, Belo Horizonte, 2003.

HOCHEREAU-DE-REVIERS, M. T.; LINCOLN, G. A. **Seasonal- variation in histology of testis of red deer, *Cervus elaphus***. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 54, n. 2, p. 209-213, 1978.

HODGES, J. K.; HEARN, J. P. **Effects of immunization against luteinizing hormone releasing hormone on reproduction of the marmoset monkey *Callithrix jacchus***. *Nature*, v. 265, n. 5596, p. 746-748, 1977.

HOLT, W. V.; MOORE, H. D. **Ultrastructural aspects of spermatogenesis in the common marmoset (*Callithrix jacchus*)**. *Journal of Anatomy*, v. 138, p.175-188, 1984.

HONARAMOOZ, A.; SNEDAKER, A.; BOIANI, M.; SCHOLER, H.; DOBRINSKI, I.; SCHLATT, S. **Sperm from neonatal mammalian testes grafted in mice**. *Nature*, v. 418, n. 6899, p. 778-81, 2002.

HUCKINS, C. **The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analyses using a simplified classification of the germinal epithelium**. *Anatomical Record*, v. 190, n. 4, p. 905-926, 1978.

JACOBSON, M. D.; WEIL, M.; RAFF, M. C. **Programmed cell death in animal development**. *Cell*, v. 88, n. 3, p. 347-354, 1997.

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

JOHNSON, L.; BARNARD, J. J.; RODRIGUEZ, L.; SMITH, E. C.; SWERDLOFF, R.S.; WANG, X.H.; WANG, C. **Ethnic differences in testicular structure and spermatogenic potencial may predispose testes of asian men to a heightened sensitivity to steroidal contraceptives.** *Journal of Andrology*, v. 19, n. 3, p. 348-357, 1998.

JOHNSON, L.; PETTY, C. S.; NEAVES, W. B. **A comparative study of daily sperm production and testicular composition in humans and rat.** *Biology of Reproduction*, v. 22, n. 5, p. 1233-1243, 1980.

JONES, L. S.; BERNDTSON, W. E. **A quantitative study of Sertoli cell and germ cell populations as related to sexual development and aging in the stallion.** *Biology of Reproduction*, v. 35, n. 1, p. 138-148, 1996.

KENAGY, G. J.; TROMBALUK, C. **Size and function of mammalian testes in relation to body size.** *Journal of Mammalogy*, v. 67, p. 1-22, 1986.

LEAL, M. C.; FRANÇA, L.R. **The Seminiferous Epithelium Cycle Length in the Black Tufted-Ear Marmoset (*Callithrix penicillata*) is Similar to Humans.** *Biology of Reproduction*, v. 74, p. 616–624, 2006.

Li L. H.; DONALD J. M.; GOLUB, M. S. **Review on testicular development, structure, function, and regulation in common marmoset.** *Birth Defects Research part B Developmental and Reproductive Toxicology*, v. 74, p. 450–469, 2005.

MASCARENHAS R. M.; PAULA T. A. R.; CARRETTA JÚNIOR, M.; RIBEIRO, E. C. S., BORBOLETA L. R., MATTA S. L. P. **Efeitos da biópsia incisional testicular sobre o rendimento intrínseco da espermatogênese e índices de células de Sertoli em cães.** *Revista CERES*, v. 53, p. 100-105, 2005.

MATTA, S. L.; VILELA, D. A.; GODINHO, H. P.; FRANÇA, L. R. **The goitrogen 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) given during testis development increases Sertoli and germ cell numbers per cys in fish: the tilapia (*Oreochromis niloticus*) model.** *Endocrinology*, v. 143, n. 3, p. 970-8, 2002.

MEIRELES, C. M. M.; SAMPAIO, M. I. C.; SCHNEIDER, M. P. C. **Protein variation, taxonomy and differentiation in five species of marmosets (Genus *Callithrix* Erxleben, 1777).** *Primates*, v. 33, p. 227-238, 1992.

MENDIS, S. L. **Padrões biogeográficos e vocais em *Callithrix* do grupo *jacchus* (Primates, Callitrichidae),** 1997, p. 13-15, Tese (Doutorado) – *Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, São Paulo.*

MILLAR, M. R.; SHARPE, R. M.; WEINBAUER, G. F.; FRASER, H. M.; SAUNDERS, P. T. **Marmoset spermatogenesis: organizational similarities to the human.** *International Journal of Andrology*, v. 23, n. 5, p. 266-277, 2000.

MITTERMEIER, R. A.; COIMBRA-FILHO, A. F. **Systematics: Species and subspecies.** Páginas 29-111 In: COIMBRA-FILHO, A. F.; MITTERMEIER, R. A. Eds. **Ecology and behavior of neotropical primates.** *Academia Brasileira de Ciências, Belo Horizonte*, 1981, v. 1.

NAGAMACHI, C. Y.; PIECZARKA, J. C.; SCHWARZ, M.; BARROS, R. M.; MATTEVI, M. S. **A comparative chromosomal study of five taxa of genus *Callithrix*, group jacchus (Platyrrhini, Primates).** *American Journal of Primatology*, v. 41, n. 1, p. 53-60, 1997.

NAGANO, M.; MCCARREY, J. R.; BRINSTER, R. L. **Primate spermatogonial stem cells colonize mouse testes.** *Biology of Reproduction*, v. 64, n. 5, p. 1409-16, 2001.

NATORI, M. **Craniometrical variation among eastern Brazilian marmosets and their systematic relationships.** *Primates*, v. 35, n. 2, p. 167-176, 1994.

NEVES, E. S. **Estudo comparativo da estrutura do testículo e do processo espermatogênico em jumentos (*Equus asinus*) e burros (*Equus mulus mulus*),** 2001, p. 135. Tese (Doutorado em Ciências) – *Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte*, 2001.

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, n. 1, p. 247-455, 2002.

NIPKEN, C.; WROBEL, K. H. **A quantitative morphological study of age-related changes in the donkey testis in the period between puberty and senium.** *Andrologia*, v. 29, n.3, p. 149-161, 1997.

OATLEY, J. M.; DE AVILA, D. M.; REEVES, J. J.; MCLEAN, D. J. **Spermatogenesis and germ cell transgene expression in xenografted bovine testicular tissue.** *Biology of Reproduction*, v. 71, p. 494 – 501, 2004.

ORTAVANT, R.; COUROT, M.; HOCHEREAU-DE-REVIERS, M. T. **Spermatogenesis in domestic mammals.** In: COLE, H. H.; CUPPS, P. T. (ed.). *Reproduction in domestic mammals*. 3ed. New York: Academic Press, 1977, p. 203-227.

ORTH, J. M.; GUNSALUS, G. L.; LAMPERTI, A. A. **Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development.** *Endocrinology*, v. 122, n. 3, p. 787-794, 1988.

PARREIRA, G. G.; CARDOSO, F. M. **Biologia reprodutiva de machos *Bolomys lasiurus* Lund, 1841 (*Rodentia, Cricetidae*). I. Morfologia da espermatogênese e ciclo do epitélio seminífero.** *Revista Brasileira de Biologia*, v. 51, n. 3, p. 639-646, 1991.

PAULA, T. A. R. **Análise histométrica e funcional do testículo de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) adultos.** 1999, p. 84. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1999.

PAULA, T. A. R.; CARDOSO, F. M. **Alterações etárias na espermatogênese do cão. I. Análise histométrica.** *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 46, n. 1, p. 19-30, 1994.

PAULA, T. A. R.; CHIARINI-GARCIA, H.; FRANÇA, L. R. **Seminiferous epithalium cycle and its duration in capybaras (*Hydrocoerus hydrochaeris*).** *Tissue and Cell*, v. 31, n. 3, p. 327-334, 1999.

PAULA, P. O.; GRATIVOL, A. D.; RUIZ-MIRANDA, C. R. **Conservação do mico-leão-dourado: enfrentando os desafios de uma paisagem fragmentada.** In: De MORAIS, JR.; RUIZ-MIRANDA, C. R.; GRATIVOL, A. D.; ANDRADE, C.; LIMA, S.; MARTINS; BECK. **Os saguis, *Callithrix jacchus* e *penicillata*, como espécies invasoras na região de ocorrência do mico-leão-dourado.** *Universidade Estadual do Norte Fluminense*, Campos dos Goytacazes - RJ, v.1, p. 86-117, 2008.

PENGE, B. **Quantitative (stereological) study of the effects of vasectomy on spermatogenesis in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*).** *Reproduction*, v. 124, p. 847-856, 2002.

POCCIA, D. **Molecules of the somatic cells.** In: POCCIA, D. *Molecular biology intelligence unit; molecular aspects of spermatogenesis.* Austin: R. G. Landes Company, 1994. cap. 4, p. 75-90.

RASBAND, W. **Image J Documentation.** Disponível em: <<http://rsb.info.nih.gov/ij/docs/index.html>>. Acesso em 28 de jan 2014.

ROCHA, D. C. M.; DEBELJUK, L.; FRANÇA, L. R. **Exposure to Constant light during testis development increases daily sperm production in adult Wistar rats.** *Tissue and Cell*, v. 31, n. 3, p. 372-379, 1999.

ROOSEN-RUNGE, E. C. **Germinal-cells loss in normal metazoan spermatogenesis.** *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 35, n. 2, p. 339-348, 1973.

ROOSEN-RUNGE, E. C. **The process of spermatogenesis in mammals.** *Cambridge: University Press.* 1977, p. 214.

ROSS, M. H. **Male reproductive system.** In: *Histology, a test and atlas.* Eds. ROSS, M. H.; REITH, E. J. p. 627. Harper and Row, New York, 1985.

ROTHER, H. **Some aspects of sexuality and reproduction in groups of captive marmosets (*Callithrix jacchus*).** *Zeitschrift fur Tierpsychologie*, v. 37, n. 3, p. 255-73, 1975.

RUSSELL, L. D. **Mammalian Leydig cell structure.** In: PAYNE, A.H.; HARDY, M.P.; RUSSELL, L. D. (Eds.) **The Leydig cell.** Vienna: Cache River Press, 1996. Cap.3, p. 43-96.

RUSSELL, L. D.; CORBIN, T. J.; BORG, K. E.; DE FRANÇA, L. R.; GRASSO, P.; BARTKE, A. **Recombinant human follicle- stimulating hormone is capable of exerting a biological effect in the adult hypophysectomized rat by reducing the numbers of degenerating germ cells.** *Endocrinology*, v. 133, n. 5, p. 2062-70, 1993.

RUSSELL, L. D.; ETTLIN, R. A.; SINHA-HIKIN, A. P.; CLEGG, E. D. **Histological and histopathological evaluation of the testis.** Clearwater, Florida: Cache River Press, p. 286, 1990.

RUSSELL, L. D.; FRANÇA, L. R. **Building a testis.** *Tissue and Cell*, v. 27, n. 2, p. 129-147, 1995.

RUSSELL, L. D.; PETERSON, R. N. **Determination of the elongate spermatid-Sertoli cell ratio in various mammals.** *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 70n. 2, p. 635-664, 1984.

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

RYLANDS, A. B.; FARIA, D. S. **Habitats, feeding ecology, and home range size in the genus *Callithrix*.** In: RYLANDS, A. B. Ed. **Marmosets and Tamarins: Systematics, Ecology and Behaviour.** Oxford University Press, Oxford, 1993. p. 262-272.

SAMPAIO, I. S.; SCHNEIDER, C. M. L.; BARROSO; SCHNEIDER, H. **Polymorphism of phosphogluconate dehydrogenase (PGD) in new world monkeys: taxonomic significance.** *Revista Brasileira de Genética*, v.19, n.1, p. 87-92, 1996.

SANT'ANNA F. **Uso de árvores gomíferas por um grupo de *Callithrix penicillata* (Primates) na Ilha de Santa Catarina – SC.** Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.

SCHLATT, S.; HONARAMOOZ, A.; BOIANI, M.; SCHOLER, H. R.; DOBRINSKI, I. **Progeny from sperm obtained after ectopic grafting of neonatal mouse testes.** *Biology of Reproduction*, v. 68(6), p. 2331-5, 2003.

SCHULZE, W.; REHDER, U. **Organization and morphogenesis of the human seminiferous epithelium.** *Cell and Tissue Research*, v. 237, p. 395–407, 1984.

SETCHELL, B. P. **Male reproductive organs and semen.** In: CUPPS, P. T. (Ed.). **Reproduction in Domestic Animals.** San Diego: Academic Press, 1991, p. 221-249.

SETCHELL, B. P.; MADDOCKS, S; BROOKS, D. E. **Anatomy, vasculature, innervations, and fluids of the male reproductive.** In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. (Eds.) **The Physiology of Reproduction.** 2 ed. *New York: Raven Press*, 1994. p. 1063-1175.

SHARPE, R. M. **Regulation of spermatogenesis.** In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. (Ed.). **The physiology of reproduction.** 2 ed. *New York: Raven Press*, 1994, p. 1363-1434.

SHORT, R. V. **The testis - the witness of the mating system, the site of mutation and the engine of desire.** *Acta Paediatrica*, v. 86, n. 3 – 7, 1997.

STEVENSON, M. F.; RYLANDS, A. B. 1988. **The marmosets: Genus Callithrix. In: Ecology and Behaviour of Neotropical Primates.** (MITTERMEIER, R. A.; RYLANDS, A. B.; COIMBRA-FILHO, A.; FONSECA, G. A. B. Eds.) Littera Maciel Ltda. Washington, D.C, p. 131-222.

TAGLIARO, C. H.; SCHNEIDER, M. P. C.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I. C.; STANHOPE, M. J. **Marmoset phylogenetics, conservation perspectives, and evolution of the mtDNA control region.** *Molecular Biology and Evolution*, v.14, n. 6, p. 674 - 684, 1997.

VIVO, M. **Taxonomia de Callithrix Erxleben, 1777 (Callitrichidae, Primates).** *Fundação Biodiversitas*, Belo Horizonte, 1991.

WEINBAUER, G. F.; ASLAM, H.; KRISHNAMURTHY, H.; BRINKWORTH, M. H.; EINSPANIER, A.; HODGES, J.K. **Quantitative analysis of spermatogenesis and apoptosis in the common marmoset (*Callithrix jacchus*) reveals high rates of spermatogonial turnover and high spermatogenic efficiency.** *Biology of Reproduction*, v. 69, n. 2, p. 582-591, 2003.

WEINBAUER, G. F.; SCHLATT, S.; WALTER, V.; NIESCHLAG, E. **Testosterone-induced inhibition of spermatogenesis is more closely related to suppression of FSH than to testicular androgen levels in the cynomolgus monkey model (*Macaca fascicularis*).** *Journal of Endocrinology*, v. 168, p. 25–38, 2001.

WOOLLEY, P. **The seminiferous tubules in dasyurid marsupials.** *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 45, n. 2, p. 255-261, 1975.

YADAV, S. K.; SHARMA, A. K. **Seminiferous length in normal buffalos-bulls and bucks.** *International Journal of Animal Science*, v. 9, p. 293-296, 1994.

ZHENGWEI, Y.; MCLACHILAN, R. I.; BREMNER, W. J.; WREFORD, N.G. **Quantitative (stereological) study of the normal spermatogenesis in the adult monkey (*Macaca fascicularis*).** *Journal of Andrology*, v. 18, n. 6, p. 681-7, 1997.

ZHENGWEI, Y.; WREFORD, N. G.; ROYCE, P.; DE KRETZER, D. M.; MCLACHLAN, R. I. **Stereological evaluation of human spermatogenesis after suppression by testosterone treatment: heterogeneous pattern of spermatogenic impairment.** *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 83, p. 1284–1291, 1998.

ZHENGWEI, Y.; WREFORD, N. G.; SCHALATT, S.; WEINBAUER, G. F.; NIESCHLAG, E.; McLACHLAN, R. I. **Acute and specific impairment of spermatogonial development by GnRH antagonist-induced gonadotrophin withdrawal in the adult macaque (*Macaca fascicularis*)**. *Journal of Reproduction and Fertility*, p. 139–147, 1998.

ZÚCCARI, C. E. S. N.; BEZERRA, J. R. **Biotécnicas da reprodução animal aplicadas à conservação de cervídeos**. *Documento Embrapa Cerrados*, ed.1 p.10-11, 2006.

WISTUBA, J.; SCHROD, A.; GREVE, B.; HODGES, J. K.; ASLAM, H.; WEINBAUER, G. F.; LUETJENS, C. M. **Organization of seminiferous epithelium in primates: relationship to spermatogenic efficiency, phylogeny, and mating system**. *Biology of Reproduction*, v. 69, n. 2, p. 582-591, 2003.

WILDT, D. E. **Genetic resource banks for conserving wildlife species: justification, examples and becoming organized on a global basis**. *Animal Reproduction Science*, v. 28, p. 247-257, 1992.