

MOACIR CARRETTA JÚNIOR

**ESTUDO COMPARATIVO DO PROCESSO ESPERMATOGÊNICO E DURAÇÃO
DO CICLO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO ATRAVÉS DA TÉCNICA DE
IMUNOHISTOQUÍMICA COM BROMODEOXIURIDINA
DE TRÊS DIFERENTES ESPÉCIES DE ROEDORES DA SUBORDEM
HYSTRICOMORFA: CUTIA (*Dasyprocta leporina*), PACA (*Cuniculus paca*) E
CAPIVARA (*Hydrochoerus hydrochaeris*).**

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

VIÇOSA

MINAS GERAIS – BRASIL

2012

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

T

C315e
2012

Carretta Júnior, Moacir, 1982-

Estudo comparativo do processo espermatogênico e duração do ciclo do epitélio seminífero através da técnica de imunohistoquímica com bromodeoxiuridina de três diferentes espécies de roedores da subordem Hystricomorfa: cutia (*Dasyprocta leporina*), paca (*Cuniculus paca*) e capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) / Moacir Carretta Júnior. – Viçosa, MG, 2012.

xiii, 131f. : il. ; (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Tarcízio Antonio Rêgo de Paula
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Roedor. 2. Animais silvestres. 3. Espermatogênese em animais. 4. Morfologia. 5. Histologia. 6. Imunohistoquímica. 7. Paca. 8. Cutia. 9. Capivara. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 636.935

MOACIR CARRETTA JÚNIOR

ESTUDO COMPARATIVO DO PROCESSO ESPERMATOGÊNICO E DURAÇÃO DO CICLO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO ATRAVÉS DA TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA COM BROMODEOXIURIDINA DE TRÊS DIFERENTES ESPÉCIES DE ROEDORES DA SUBORDEM HYSTRICOMORFA: CUTIA (*Dasyprocta leporina*), PACA (*Cuniculus paca*) E CAPIVARA (*Hydrochoerus hydrochaeris*)

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

APROVADA: 27 de julho de 2012.

Cláudio César Fonseca

Deiler Sampaio Costa

Ita de Oliveira e Silva

Sérgio Luis Pinto da Matta
(Coorientador)

Tarcízio Antônio Rêgo de Paula
(Orientador)

DEDICATÓRIA

Aos meus Pais, Zélia e Moacir;

À minha noiva, Ayisa;

A todos os meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Obrigado meu Deus por mais essa vitória.

Aos meus pais, Zélia e Moacir. Por toda confiança em mim depositada, pelo apoio incondicional e pelo amor, que foi meu pilar de sustentação. Amo vocês.

À minha tia Lourdes. Sempre como uma segunda mãe ela me acompanhou nas dificuldades e vitórias. Você sempre estará nas minhas orações.

Ayisa, você deu novo sentido à minha vida. Esse trabalho tem muito de você, não só pela sua contribuição científica, mas também pelo efeito que seu amor trouxe a minha vida. Te amo.

Filipe e Vinícius. Para um filho único como eu vocês são como irmãos que eu pude escolher. Juntamente com a Ayisa vocês são minha equipe de trabalho dos sonhos. Muito obrigado por toda ajuda e principalmente pela amizade.

Mariana. O que seria de mim sem você para colocar minha vida no lugar? Graças as suas neuras esse trabalho (que também é seu) foi finalizado. Muito obrigado por tudo, principalmente pela amizade.

Rebeca, pela amizade que perdura desde o primeiro período da graduação e que ainda vai longe...

Aos demais amigos: Tabela, Gimgin, Alice, Ciro, Diego, André, Don, Elisa, Aloísio, Juliano, Igor, Renan e mais qualquer um que eu possa ter esquecido. Perto ou longe todos vocês me deram força para a realização de mais esse trabalho.

Ao prof. Tarcízio. Após quase doze anos de trabalho em sua equipe só tenho a agradecer pelo aprendizado e possibilidade de crescimento profissional e como pessoa. Muito Obrigado.

A toda equipe de trabalho do CETAS-UFV: Thyara, Gê, Carlão, Marcos, Natasha, Grazi, Leanes, Letícia e Luana. Muito obrigado pelo apoio na realização desse projeto.

Aos prof. Ita e Vanner pela ajuda em mais essa etapa e pela oportunidade de trabalhar na sua equipe.

Aos professores Cláudio e Deiler, pelos valorosos conselhos e orientações.

Ao professor Sérgio pela grande ajuda no desenvolvimento desse trabalho. A todos os pós-graduandos, estagiários, funcionários e professores do Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral da UFV.

À todos os funcionários do DVT, em especial a Rose, o anjo da guarda de todo pós-graduando.

Aos animais deste experimento.

Meus sinceros agradecimentos a todos.

BIOGRAFIA

Moacir Carretta Júnior, filho de Zélia Inês Corteletti e Moacir Carreta, nasceu em 18 de março de 1982 em Santa Teresa, Estado do Espírito Santo.

Realizou seu estudo fundamental nas escolas da rede pública local até o ano de 1996. Terminou seu ensino médio no Educandário Seráfico São Francisco de Assis no ano de 1999.

Em 2001 ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa – Minas Gerais, terminando sua graduação em maio de 2006.

Iniciou seu mestrado em Morfofisiologia de animais domésticos e selvagens do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa em maio de 2006, defendendo sua dissertação em abril de 2008.

Em julho de 2008 iniciou simultaneamente sua atividade como professor do curso de medicina veterinária da FACISA–UNIVIÇOSA e seu doutorado em Morfofisiologia de animais domésticos e selvagens pelo Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa.

CONTEÚDO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT	xi
1.0 REVISÃO DE LITERATURA.....	1
1.1. Ordem Rodentia, Subordem Hystricomorpha	1
1.2. Os testículos	4
1.3. Compartimento tubular e ciclo do epitélio seminífero	6
1.5. Compartimento intertubular	10
2.0. OBJETIVOS	12
3.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13
4.0 MORFOMETRIA TESTICULAR E DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS DE TRÊS DIFERENTES ROEDORES DA SUBORDEM HYSTRICOMORPHA: CAPIVARA (<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>), CUTIA (<i>Dasyprocta leporina</i>) E PACA (<i>Cuniculus paca</i>).	
Resumo	21
Abstract	22
4.1. Introdução	23
4.2. Material e Métodos	25
4.2.1. Animais utilizados e procedimento de coleta dos testículos	25
4.2.1. Processamento histológico	27
4.2.1. Proporção volumétrica dos componentes do parênquima testicular, mensuração tubular e parâmetros somáticos	28
4.3. Resultados e discussões	29
4.4. Conclusões	37
4.5. Referências Bibliográficas	38
5.0 ORGANIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES DO ESPAÇO INTERTUBULAR EM CAPIVARAS (<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>), CUTIAS (<i>Dasyprocta leporina</i>) e PACAS (<i>Cuniculus paca</i>) ADULTAS	
Resumo	44
Abstract	45
5.1. Introdução	46
5.2. Material e Métodos.....	48
5.2.1. Origem dos animais e procedimento de hemicastração	48
5.2.2. Processamento histológico	49
5.2.3. Proporção volumétrica dos componentes do parênquima testicular e determinação da população de células de Leydig	50
5.3. Resultados e discussão	51
5.4. Conclusões	59
5.5. Referências bibliográficas	61

6.0 CARACTERIZAÇÃO DOS ESTÁDIOS E DURAÇÃO DO CICLO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO DE CAPIVARA (*Hydrochoerus hydrochaeris*), DE CUTIA (*Dasyprocta leporina*) E DE PACA (*Cuniculus paca*) ATRAVÉS DA TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA COM BROMODEOXIURIDINA

Resumo	65
Abstract	66
6.1. Introdução	67
6.2. Materias e Métodos	69
6.2.1. Animais utilizados e injeção do BrdU	69
6.2.2. Processamento histológico	70
6.2.3. Estádios do ciclo do epitélio seminífero, suas frequências relativas e duração do CES	72
6.3. Resultados e Discussão	73
6.3.1. Estádios do ciclo do epitélio seminífero e frequência relativa dos Estádios	73
6.3.2. Duração do ciclo do epitélio seminífero	81
6.4. Conclusões	87
6.5. Referências bibliográficas	88

7.0 PRODUÇÃO ESPERMÁTICA DIÁRIA E RENDIMENTOS INTRÍNSECOS DA ESPERMATOGÊNESE DE CAPIVARAS (*Hydrochoerus hydrochaeris*), CUTIAS (*Dasyprocta leporina*) e PACAS (*Cuniculus paca*) ADULTAS

Resumo	93
Abstract	94
7.1. Introdução	95
7.2. Material e Métodos	98
7.2.1. Animais utilizados e procedimento de coleta dos testículos	98
7.2.2. Processamento histológico	100
7.2.3. Proporção volumétrica de túbulos seminíferos e mensuração tubular	102
7.2.4. Estimativa das populações celulares e rendimento intrínseco do processo espermatogênico	103
7.2.5. Estimativa da duração do CES	104
7.2.6. Cálculo da produção espermática diária	105
7.3. Resultados e discussão	105
7.3.1. Populações celulares do estágio I o CES	105
7.3.2. Rendimentos intrínsecos da espermatogênese e capacidade de suporte da célula de Sertoli	108
7.3.2.1 Coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais	109
7.3.2.2 Coeficiente de manutenção da prófase meiótica	109
7.3.2.3 Rendimento meiótico	110
7.3.2.4 Rendimento geral da espermatogênese	110
7.3.2.5 Capacidade de suporte da célula de Sertoli	111
7.3.3. Parâmetros corporais, testiculares e tubulares	112
7.3.4. Duração do ciclo do epitélio seminífero	115
7.3.5. Produção espermática diária	115
7.4. Conclusões	118
7.5. Referências Bibliográficas	120

8.0. CONSIDERAÇÕES FINAIS

RESUMO

CARRETTA JÚNIOR, Moacir, D. Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2012. **Estudo comparativo do processo espermatogênico e duração do ciclo do epitélio seminífero através da técnica de imunohistoquímica com Bromodeoxiuridina de três diferentes espécies de roedores da subordem Hystricomorfa: cutia (*Dasyprocta leporina*), paca (*Cuniculus paca*) e capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*).** Orientador: Tarcízio Antônio Rego de Paula. Coorientadores: Eduardo Paulino da Costa e Sérgio Luis Pinto da Matta.

Dentre os animais da ordem Rodentia, subordem Hystricomorfa, destacam-se a capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*), cutia (*Dasyprocta leporina*) e paca (*Cuniculus paca*) por apresentarem grande porte e alto potencial para exploração comercial, visando a produção de carne de excelente qualidade no mercado internacional. Estas três espécies atualmente se encontram em baixo risco de extinção, segundo a IUCN (2012), mas considerando-se a crescente destruição do habitat natural destas espécies, assim como a pressão de caça predatória que estas estão sujeitas em natureza, pode vir a ocorrer futuramente uma queda nos valores populacionais em vida livre. Desta forma, o conhecimento da biologia reprodutiva destas espécies é de grande valia no desenvolvimento de técnicas de reprodução assistida, o que vem de encontro com o interesse das atividades comerciais assim como trabalhos visando a conservação de espécies. Para a realização deste trabalho foram selecionados cinco exemplares de machos adultos de capivaras, do plano de manejo de capivaras do campus da Universidade Federal de Viçosa; pacas, sendo uma proveniente do Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Viçosa e outras quatro do criatório comercial “Fazenda um sonho a mais” – Carangola – MG; e cutias, sendo os cinco animais provenientes da criação comercial “Chácara Lourenço Carreta” - Santa Teresa – ES. Todas as origens dos animais estavam em dia com a legislação do instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Os animais foram contidos física e quimicamente para a aplicação intratesticular de imunomarcador (5-Bromodeoxiuridina) assim como para os procedimentos de hemicastração. Todos os procedimentos nos animais foram aprovados previamente pelo Comitê de Ética para o uso de animais da Universidade Federal de Viçosa. Após hemicastração, os testículos coletados foram fixados em solução de Karnovsky e fragmentos distintos foram submetidos a processamento histológico em resina de glicol metacrilato, para análise

morfológica e morfométrica do testículo, e em parafina, sendo estes montados em lâminas eletricamente carregadas, para à detecção por anticorpo monoclonal e reveladas pelo sistema de coloração streptavidin-biotin, através do kit de coloração BrdU. Observou-se que a proporção de massa corporal alocada em testículos (índice gonadossomático) foi de 0,11% em capivaras, 0,27% em cutias e 0,28% em pacas. A proporção do testículo alocado em mediastino e albugínea testiculares foram de aproximadamente 12% em capivaras, 8% em cutias e 6% em pacas, estando o valor para estas duas últimas inferiores a maioria dos mamíferos já estudados. A proporção volumétrica de túbulos seminíferos apresentou altos valores em cutias (93%) e pacas (91%), enquanto a capivara apresentou um dos menores valores já estudados (50%). O comprimento total de túbulos seminíferos por grama de testículo em capivaras (12,46m/g) está dentro do intervalo descrito para mamíferos, enquanto a paca e cutia apresentaram valores muito acima deste intervalo (26,7 e 35,5 m/g respectivamente). O índice Tubulossomático (ITS) foi de 0,06% em capivaras, 0,23% em cutias e 0,24 em pacas, sendo que estes valores corroboram o comportamento de acasalamento descrito para estas espécies. Foi observado que as três espécies apresentam o padrão tipo I de organização dos componentes do espaço intertubular proposto por Fawcett (1973), estando a paca e cutia dentro do mesmo subpadrão descrito por Paula (1999) para a superfamília Cavioidea, enquanto a capivara encontra-se em subpadrão exclusivo. Os valores de proporção volumétrica da célula de Leydig em cutias (2%) e pacas (2,6%) encontram-se próximo ao descrito para vários outros roedores enquanto a capivara destaca-se por um valor extremamente mais alto (35%). Os índices leydigossomáticos (ILS) da cutia (0,005%) e paca (0,007%) encontram-se abaixo dos demais roedores já estudados, enquanto a capivara apresenta valores similares a estes. A população de células de Leydig por grama de testículo em capivaras foi a maior encontrada (126 milhões de células/g) enquanto os valores de cutias (16 milhões) e pacas (35 milhões) estão bem abaixo. A população celular das diferentes células germinativas de capivaras, cutias e pacas, em secções transversais do túbulo seminífero no estágio 1 do CES, se apresentaram dentro do intervalo observado na superfamília Cavioidea. As capacidades de suporte do total de células germinativas pelas células de Sertoli na cutia (22 células germinativas : 1 célula de Sertoli) e paca (24 células germinativas : 1 célula de Sertoli) são superiores aos valores de outros roedores e principalmente das diversas espécies de mamíferos domésticos já estudados, indicando uma grande eficiência destas células nessa espécie. A capivara (11 células germinativas : 1 célula de Sertoli) apresentou

valores semelhantes aos demais roedores estudados. O processo de mitoses espermatogoniais apresenta uma perda de 93,23% em capivaras, 87,51% em cutias e 86,7% em pacas, caso estas possuam seis gerações de espermatogônias. O rendimento meiótico e o rendimento geral da espermatogênese demonstraram uma perda do valor total teoricamente esperado respectivamente de 47,25% 92,5% em capivaras, 30% e 91,2% em cutias e 38,5 % e 93 %, estando dentro da amplitude observada para os demais mamíferos estudados. A duração do CES observada em capivaras (10,39 dias) e pacas (8,57 dias) encontra-se dentro do intervalo observado para as diversas espécies de roedores já estudados, enquanto a cutia apresentou a menor duração já relatada para um roedor (5,86 dias). A reserva espermática por grama de testículo é de 105 milhões de espermatozoides em capivaras, 290 milhões em pacas e 674 milhões em cutias. O valor da produção espermática por grama de testículo em cutias (115 milhões) foi extremamente superior à diversas espécies de mamíferos domésticos e selvagens já estudados, inclusive ao valor observado em pacas (34 milhões) e capivaras (10 milhões).

ABSTRACT

CARRETTA JÚNIOR, Moacir, D. Sc., Universidade federal de Viçosa. July, 2012. **Comparative study of the spermatogenic process and duration of the cycle of the seminiferous epithelium by immunohistochemical technique with bromodeoxyuridine in three different species of rodents of the suborder Hystricomorfa: agouti (*Dasyprocta leporina*), paca (paca *Cuniculus*) and capybara (*hydrochaeris*).** Advisor: Tarcízio Antonio Rego de Paula. Co-advisors: Eduardo Paulino da Costa and Sergio Luis Pinto da Matta.

Among the animals of the order Rodentia, suborder Hystricomorfa, we can highlight the capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*, the agouti (*Dasyprocta leporina*) and paca (*Cuniculus paca*) because of their big corporal dimensions and high potential for commercial exploitation in order to produce excellent quality meat in the international market. These three species are currently at low risk of extinction, according to IUCN (2012), but considering the increasing destruction of natural habitat of these species, as well as poaching pressure they are subjected in nature, may occur a future decline in values in the wild population. Thus, knowledge of their reproductive biology is extremely useful in the development of assisted reproduction techniques, which is a great interest of business as well as works to promote the conservation of species. For this work we selected five specimens of adult male capybaras, from the management plan of capybaras in the campus of Universidade Federal de Viçosa; five pacas, one from the Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Viçosa and the other four commercial breeding "Um sonho a mais" - Carangola - MG, and five agoutis, from commercial breeding "Chácara Lourenço Carreta" - Santa Teresa - ES. All sources of animals were following the law of the Brazilian Institute of Environment and Natural Resources (IBAMA). The animals were restrained physically and chemically for the application of intratesticular immunomarker (5-bromodeoxyuridine) as well as procedures of hemicastration. All procedures in animals were previously approved by the Ethics Committee for animal use at the Universidade Federal de Viçosa. After hemicastration, the testes collected were fixed in Karnovsky solution and distinct fragments were subjected to histological processing in glycol methacrylate resin, for histological and morphometric parameters of the testis, and paraffin wax, which are mounted on slides electrically charged for the detection by monoclonal antibody and revealed by staining system biotin-streptavidin, by BrdU

staining kit. It was observed that the proportion of body mass allocated in testis (GSI) was 0.11% in capybara, 0.27% and 0.28% in agouti in pacas. The proportion allocated to the mediastinum testis and testicular albuginea was approximately 12% in capybaras, agoutis 8% and 6% in pacas, and the value for the latter two are below the majority mammals already studied. The volumetric proportion of seminiferous tubules showed high values in agouti (93%) and pacas (91%), while the capybara showed one of the lowest values previously studied (50%). The total length of the seminiferous tubules of testes per gram of testis in capybaras (12.46 m / g) is within the range described to mammals, while the agouti and agouti showed values much above this range (26.7 and 35.5 m / g respectively). Tubulossomatic Index (TSI) was 0.06% in capybaras, agoutis, and 0.23% in 0.24 in pacas, and these values confirm the mating behavior described for these species. It was observed that the three species exhibit the pattern I organization of the components of the intertubular space proposed by Fawcett (1973), with the agouti and agouti within the same sub-pattern described by Paula (1999) for Caviioidea superfamily, the capybara showed na unique sub-pattern. The values of volumetric proportion of Leydig cell in agouti (2%) and pacas (2.6%) are close to that described for various other rodents, while capybara distinguished by an extremely higher value (35%). The Leydigossomatic index (LSI) of the agouti (0.005%) and paca (0.007%) are below the other rodents already studied, while the capybara has values similar to these. The population of Leydig cells per gram of testis in capybaras was found the largest (126 million cells / g) while the values of agouti (16 million) and pacas (35 million) are below. The cell population of the different germ cells of capybaras, agoutis and pacas, in cross sections of seminiferous tubule in stage 1 of the seminiferum epithelium cycle (ESC), were within the range observed in the superfamily Caviioidea. The support capabilities of all germ cells by Sertoli cells on the agouti (22 germ cells: one Sertoli cell) and the agouti (24 germ cells: one Sertoli cell) are higher than other rodents and mostly of the various species of domestic mammals already studied, indicating a high efficiency of these cells in this species. The capybara (11 germ cell: one Sertoli cell) had values similar to other rodents already studied. The process of spermatogonial mitoses show a loss of 93.23% in capybaras, 87,51% in agoutis and 86.7% in pacas, if they have six generations of meiotic spermatogonia. The meiotic yield and overall yield of spermatogenesis showed a total loss of the theoretically expected value respectively from 92.5% and 47.25% in capybaras, 30% and 91.2% in agoutis and 38.5% and 93% in pacas, being within the range observed for the other mammals. An ESC observed in

capybaras (10.39 days) and pacas (8.57 days) is in the range observed for several rodent species already studied, while the agouti had the shortest duration ever reported for a rodent (5.86 days). The sperm reserves per gram of testis is 105 million sperm in capybaras, 290 million in pacas and 674 million in the agouti. The sperm production per gram of testis in agoutis (115 million) was far superior to many species of wild and domestic mammals already studied, including the value observed in pacas (34 million) and capybaras (10 million).

1.0 REVISÃO DE LITERATURA

1.1. Ordem Rodentia, Subordem Hystricomorpha

A maioria dos representantes da subordem Hystricomorpha é constituída de roedores de pequeno a médio porte. Porém, algumas espécies destacam-se pelo grande porte físico como a cutia (*Dasyprocta leporina*) com peso médio de 6 kg (ASSIS-NETO, 2003), o porco espinho canadense (*Erethizon dorsatum*) que pode alcançar 7 kg de peso vivo, o visacha (*Lagostomus maximus*) podendo atingir cerca de 8 kg (MUÑOZ et al., 1998), o rato do banhado (*Myocastor coypus*) com até 9 kg e a paca (*Cuniculus paca*) atingindo cerca de 10 kg (THENIUS et al. 1975). Dentre os vários representantes dessa subordem destaca-se a capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*), que apresenta peso corporal de até 65 kg (PAULA, 1999).

Entre os roedores da subordem Hystricomorpha a superfamília Caviioidea se destaca na América do Sul. Essa é composta por 33 espécies de extraordinária diversidade em relação ao comportamento, utilização do habitat, morfologia, entre outros (ROWE & HONEYCUTT, 2002). Seis famílias constituíam a superfamília Caviioidea, sendo estas as famílias Cephalomyidae, Eocardiidae, Dasyproctidae, Cuniculidae, Dinomyidae e Caviidae, estando as duas primeiras extintas por processo natural (MYERS, 2000; ROWE & HONEYCUTT, 2002). Serão destacadas neste estudo espécies das famílias Dasyproctidae, Cuniculidae e Caviidae.

A família Dasyproctidae contém treze espécies em dois gêneros, *Dasyprocta* e *Myoprocta*, sendo a espécie *Dasyprocta leporina* a de maior ocorrência no Brasil (Figura 1). Todos os membros dessa família são conhecidos vulgarmente como cutias ou cotias (DEUSTSCH & PUGLIA, 1988).



Figura 1. Cutia (*Dasyprocta leporina*) proveniente do criatório Lourenço Carreta, Santa Teresa – ES.

A família Cuniculidae possui apenas duas espécies, sendo ambas conhecidas como pacas e estando no mesmo gênero: *Cuniculus taczanowskii* e *Cuniculus paca*, sendo que apenas a segunda é de ocorrência no território brasileiro (Figura 2). Alguns autores referem-se à família Cuniculidae como Agoutidae, e outros incluem as pacas dentro da família Dasyproctidae, devido às similaridades morfológicas entre pacas e cutias (CORBET & HILL 1991; WILSON & REEDER 1993). Porém, baseado ainda em evidências morfológicas outros autores sugerem uma família separada (MCKENNA & BELL 1997). Segundo Rowe & Honeycutt (2002) evidências moleculares, em duas seqüências nucleares e do gene mitocondrial do rRNA 12S, suportam fortemente a colocação das pacas em sua própria família, distinta da família Dasyproctidae.



Figura 2. Paca (*Cuniculus paca*) macho adulto, proveniente do Centro de triagem de animais silvestres da Universidade Federal de Viçosa.

A família Hydrochoeridae apresenta três subfamílias, sendo duas delas extintas e somente a subfamília Hydrochoerinae remanescente. Dos três gêneros conhecidos desta subfamília (*Neochoerus*, *Hydrochoeropis* e *Hydrochoerus*) apenas o *Hydrochoerus* existe nos dias atuais, sendo a espécie *Hydrochoerus hydrochaeris* a única de ocorrência no Brasil (Kraglievich, 1930; Mones & Ojasti, 1986) (Figura 3).



Figura 3. Capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) provenientes do “Plano de Manejo de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) de vida livre no campus universitário da Universidade Federal de Viçosa-MG”. Em destaque circular na imagem é possível a observação de dardo anestésico fixo no animal.

Atualmente a cutia, a paca e a capivara encontram-se em baixo risco de extinção de acordo com Conservation on International Trade in Endangered Species (CITES, 2012). Mesmo assim estas espécies são relatadas como sendo as mais visadas pela caça predatória e vulneráveis à crescente destruição de seu habitat natural (HOSKEN & SILVEIRA, 2001). A perda contínua e acelerada da biodiversidade global tem desafiado o campo da biologia da conservação, que identifica os muitos fatores que influenciam ecossistemas e a sobrevivência das espécies. A fragmentação, a exploração de recursos naturais e a poluição têm levado a perdas catastróficas da variabilidade genética causada pela constrição subsequente de populações (WILDT et al., 1992).

1.2. Os testículos

O testículo dos mamíferos é um órgão de formato oval a arredondado, geralmente localizado fora da cavidade abdominal, em uma prega cutânea denominada escroto. Esta localização testicular é importante na maioria das espécies de mamíferos devido à necessidade de uma temperatura inferior à temperatura abdominal, para a manutenção das funções testiculares (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008). Dentre as camadas constituintes do escroto observa-se a continuidade da parede abdominal, e projeções musculares (músculo cremaster), que juntos permitem a mobilidade necessária para uma termorregulação mecânica. Nos roedores Hystricomorfos, em especial a capivara, a projeção do músculo cremaster reveste totalmente o testículo, permitindo uma grande amplitude de movimento, por vezes permitindo a internalização do testículo para o abdomen (PAULA, 2012).

O testículo está envolto pela albugínea, uma cápsula constituída de tecido conjuntivo fibroso e, em algumas espécies, também por células contráteis (SETCHELL,

1991). Esta túnica é contínua com as trabéculas de tecido conjuntivo, denominados septos testiculares, que convergem para o interior do testículo no sentido do mediastino testicular.

No testículo são observados dois compartimentos principais: o compartimento dos túbulos seminíferos e o compartimento intertubular ou intersticial. No compartimento intertubular estão localizadas as células de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, células e fibras do tecido conjuntivo, e uma população variável de outras células como macrófagos e mastócitos. Os testículos apresentam tanto função endócrina quanto exócrina, ambas governadas pelos hormônios gonadotróficos hipofisários. O hormônio folículo estimulante (FSH) está diretamente relacionado com o início e manutenção da atividade gametogênica dos túbulos seminíferos. O hormônio luteinizante (LH) controla a atividade endócrina das células de Leydig, as quais produzem a testosterona que, além de dar suporte à atividade gametogênica, é responsável pelos caracteres sexuais secundários no macho adulto (ASHDOWN & HANCOCK, 1988).

Quanto à origem embrionária das células constituintes do testículo, as células germinativas se originam do epiblasto, enquanto a grande maioria das células somáticas constituintes dos testículos é procedente dos ductos mesonéfricos e do epitélio celomático (KARL & CAPEL, 1998; MERCHANT-LARRIOS & MORENO-MENDOZA, 1998).

Há correlação positiva entre o peso testicular e a produção espermática (AMANN, 1970; OLAR et al., 1983; FRANÇA & RUSSELL, 1998), porém, o tamanho testicular não acompanha proporcionalmente o tamanho corporal, ou seja, o investimento somático em massa gonadal é maior em animais de pequeno porte em relação àqueles de maior porte corporal (KENAGY & TROMBULAK, 1986). A quantidade de espermatozóides produzidos é sempre muito maior que o número necessário para a

fecundação, e o fato de o tamanho do testículo não necessariamente acompanhar o tamanho corporal é um contribuinte para a economia energética uma vez que animais de grande porte produziram quantidades excessivamente grandes de espermatozoídes (PAULA, 1999).

A relação entre o tamanho dos testículos e o tamanho corporal é conhecida como índice gonadossomático. Este índice pode fornecer informações sobre a fisiologia reprodutiva e até mesmo sobre o sistema de acasalamento de uma espécie (KENAGY & TROMBULAK, 1986). O tamanho testicular está diretamente relacionado ao comportamento reprodutivo, uma vez que animais com comportamento monogâmicos e poligínicos apresentam menor índice gonadossomático em relação às espécies com comportamentos promíscuos ou poliândricos. No primeiro caso, o pequeno investimento testicular é reflexo da formação de casais ou haréns onde um único macho é responsável pela cópula. Nos animais promíscuos ou poliândricos, vários machos têm acesso à mesma fêmea, sendo os mais aptos à paternidade aqueles com produção espermática mais destacada e, conseqüentemente, maior tamanho testicular (KENAGY & TROMBULAK, 1986).

1.3. Compartimento tubular e ciclo do epitélio seminífero

O túbulo seminífero apresenta grande variação em sua proporção volumétrica no testículo entre as diferentes espécies, porém, este é o componente mais abundante do parênquima testicular em todas as espécies já estudadas (FRANÇA & RUSSELL, 1998). Parâmetros quantitativos diretamente relacionados com o túbulo seminífero, como diâmetro tubular, espessura do epitélio seminífero e comprimento total de túbulos seminíferos apresentam relação positiva com a atividade espermatogênica, fornecendo

informações que permitem a descrição da mesma em uma dada espécie (FRANÇA & RUSSELL, 1998; PAULA, 1999).

A espermatogênese é um processo sincrônico e regular de divisão celular e diferenciação, pelo qual uma espermatogônia-tronco gradativamente se diferencia numa célula haplóide altamente especializada, o espermatozóide (JOHNSON, 1991; FRANÇA & RUSSELL, 1998). Esta diferenciação complexa e organizada envolve três fases, baseando-se em considerações morfológicas e funcionais: (1) fase proliferativa (espermatogonial) na qual as células sofrem rápidas e sucessivas divisões mitóticas; (2) fase meiótica (espermatócitos), na qual o material genético é duplicado e passa por recombinação genética e por duas divisões celulares sequenciais e (3) fase de diferenciação ou espermiogênica, na qual as espermátides sofrem intensas modificações, transformando-se em espermatozoides.

A espermatogênese é um processo contínuo em que cada fase é caracterizada por mudanças morfológicas e bioquímicas dos componentes do citoplasma e do núcleo (COURROT et al., 1970). O epitélio seminífero compõe-se de quatro camadas de células germinativas de gerações distintas. Na camada basal do epitélio seminífero observam-se espermatogônias e espermatócitos primários iniciais; nas camadas intermediárias observam-se gerações de espermatócitos primários mais desenvolvidos e espermatócitos secundários; e na camada adluminal, espermátides. Todas essas células estão organizadas numa série bem definida de associações celulares ou estádios. Estes estádios se sucedem numa determinada área do epitélio seminífero, com o decorrer do tempo. Esta seqüência, assim ordenada, constitui o processo denominado ciclo do epitélio seminífero (CES) (LEBLOND & CLERMONT, 1952; SWIERSTRA, 1968; ORTAVANT et al., 1977; RUSSELL et al., 1991). Entre quatro e cinco ciclos são necessários para que todo o processo espermatogênico se complete, ou seja, o processo

espermatogênico total compreende o tempo decorrido entre a formação de uma geração de células germinativas na base do epitélio até a sua liberação no lume tubular como espermatozoides (LEBLOND & CLERMONT, 1952). Em mamíferos, o CES é considerado uma constante biológica, com variações apenas interespecíficas, estando sob controle do genótipo da célula germinativa, não sendo influenciada por qualquer fator conhecido (FRANÇA et al., 1998; CLERMONT, 1972; AMANN & SCHANBACHER, 1983).

Dentre os sistemas utilizados para se estudar os estádios do CES, o mais empregado é o método da morfologia tubular. Esse método se baseia no arranjo observado entre as diferentes gerações de células germinativas, em especial na forma e na localização dos núcleos das espermatídes e na presença de figuras de divisões meióticas, o que permite a obtenção de oito estádios do ciclo em todas as espécies estudadas, de forma padronizada (ROOSEN-RUNGE & GIESEL, 1950; COUROT et al., 1970; BERNDTSON, 1977; ORTAVANT, et al., 1977; GUERRA, 1983; PAULA, 1999; GUIÃO-LEITE, 2002; BITTENCOURT, et al., 2007; PEIXOTO, 2010; BALARINI, 2011).

Para o cálculo da duração do CES são utilizados como marcadores celulares a timidina triciada (CARDOSO e GODINHO, 1982; FRANÇA, 1991) ou a bromodeoxiuridina (BrdU) (PEIXOTO, 2010; BALARINI, 2011) ambos injetados diretamente no parênquima testicular. O marcador é incorporado ao DNA de células em duplicação no momento da injeção, ou seja, os diferentes tipos de espermatogônias e os espermatócitos primários durante a prófase meiótica. Como os espermatócitos primários são as células mais avançadas no processo espermatogênico a incorporarem o marcador em seus núcleos, os mesmo são utilizados como ponto de referência para a determinação do cálculo do ciclo do epitélio seminífero. Aproximadamente 4,5 ciclos

são requeridos para que o processo espermatogênico se complete, ou seja, para que ocorra a liberação de espermatozoides no lume do túbulo seminífero, a partir de uma espermatogônia (AMANN & SCHANBACHER, 1983, FRANÇA & RUSSELL, 1998).

A sustentação e organização das células germinativas ao longo do epitélio seminífero são feitas por uma célula somática denominada célula de Sertoli (RUSSELL et al., 1990). Esta desempenha papel fundamental na mediação da ação do FSH e da testosterona no processo espermático, no suporte e nutrição das células germinativas em desenvolvimento, na compartimentalização do epitélio seminífero, na liberação de espermatozoides no lume tubular, na secreção de fluidos e na fagocitose do excesso de citoplasma das espermatídes em espermição e de células germinativas em degeneração e (RUSSELL & GRISWOLD, 1993; FRANÇA & RUSSELL, 1998).

As células de Sertoli têm sido utilizadas numericamente como ponto de referência para a quantificação e a correção de contagem de células germinativas (CLERMONT & MORGENTALER, 1955; BUSTOS-OBREGON, 1970; SHAKKEBAK & HELLER, 1973; FRANÇA, 1991). Essas células constituem ainda, base para o estudo de alterações no processo espermatogênico, em decorrência de fatores patológicos e terapêuticos (ROWLEY & HELLER, 1971; RUSSELL & CLERMONT, 1977; KUMIDIKA et al., 1983; SINHA-HIKIM et al., 1991).

O estudo quantitativo das células que compõem o epitélio seminífero é essencial para o entendimento do processo espermatogênico possibilitando, ademais, valiosas correlações com achados fisiológicos e bioquímicos (ROOSEN-RUNGE & GIESEL Jr., 1950; WING & CHIRSTENSEN, 1982; RUSSELL et al., 1991; 1993; FRANÇA et al., 1994; FRANÇA et al., 1995). Assim, além de permitir a determinação do rendimento intrínseco da espermatogênese (BERNDTSON & DESJARDINS, 1974; CARDOSO & GODINHO, 1985; FRANÇA, 1991), a avaliação histológica quantitativa dos testículos

torna também possível a verificação de normalidade ou não da espermatogênese, a observação do tipo celular que está sofrendo degeneração, ou mesmo se ocorre degeneração (AMANN, 1981; FRANÇA, 1991; RUSSELL et al., 1991 e 1993; FRANÇA et al. 1994).

1.4. Compartimento intertubular

O compartimento intertubular consiste de diferentes componentes alocados entre os túbulos seminíferos, dentre estes estão tecido conjuntivo, nervos, vasos sanguíneos e linfáticos. Porém, o principal componente deste compartimento é a célula de Leydig (HOOKER, 1970).

As células de Leydig iniciam a secreção de testosterona ainda na vida fetal, para a diferenciação embriológica dos órgãos genitais masculinos. No entanto é durante a puberdade que as células intersticiais de Leydig tornam-se mais evidentes e funcionais. A densidade populacional das células de Leydig pode variar entre indivíduos de espécies diferentes e mesmo entre indivíduos da mesma espécie. Dentre os inúmeros fatores que podem influenciar na sua quantidade por animal, estão a quantidade de LH disponível, o número de receptores de LH por célula, a quantidade de testosterona que a célula de Leydig é capaz de secretar por uma unidade de tempo, a velocidade pela qual a testosterona deixa o testículo via vasos linfáticos, vasos sanguíneos e fluidos seminais, o volume sanguíneo do animal e a taxa de metabolismo da testosterona (RUSSELL et al., 1994 ; RUSSELL , 1996).

Estudos correlacionando a estrutura e a função das células de Leydig, em várias espécies de mamíferos, mostraram que variações na secreção de testosterona resultam mais da capacidade individual desta célula em secretar este hormônio do que de diferenças do volume total das mesmas no testículo (EWING et al., 1979). Esta

capacidade está altamente associada com a quantidade de retículo endoplasmático liso presente na célula de Leydig (ZIRKIN et al., 1980). Neste sentido, Costa & Paula (2006) observaram que os níveis séricos de testosterona em capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*), apresentaram correlação positiva e significativa com o volume individual de células de Leydig e não com a sua proporção total ou o número das mesmas por testículo.

Segundo Fawcett et al. (1973), a drenagem linfática, aliada à quantidade de células de Leydig e tecido conjuntivo frouxo no espaço intertubular, nas diferentes espécies de mamíferos segue, em geral, três padrões distintos: 1) espécies nas quais as células de Leydig e o tecido conjuntivo ocupam uma área muito pequena no compartimento intertubular, contrastando com extensos sinusóides ou espaços linfáticos interpostos aos túbulos seminíferos; 2) espécies que apresentam grupos de células de Leydig espalhados em abundante tecido conjuntivo frouxo edemaciado, o qual é drenado por um vaso linfático localizado central ou excentricamente no espaço intertubular; 3) espécies nas quais abundantes grupamentos de células de Leydig ocupam praticamente todo o compartimento intertubular, apresentando pouco tecido conjuntivo e vasos linfáticos. Apesar do pouco conhecimento a respeito das implicações fisiológicas destas variações, Fawcett et al. (1973) especularam que as mesmas provavelmente estariam relacionadas com a habilidade dos vasos linfáticos de mover para fora dos testículos substâncias vascularmente secretadas, além de manter as concentrações adequadas de andrógenos no testículo e no sangue. Sabe-se que a concentração de testosterona, principal produto da célula de Leydig, é de duas a três vezes maior no fluido intersticial do que nos vasos sangüíneos testiculares e de 40 a 250 vezes maior nestes em relação ao sangue periférico em diferente espécies de mamíferos (SHARPE, 1994).

2.0. OBJETIVOS

Objetivou-se com este trabalho analisar morfofisiologicamente o processo espermatogênico de capivaras, cutias e pacas através de análises histológicas morfométricas e procedimento imunohistoquímico a base de 5-Bromodeoxiuridina, a fim de estabelecer maiores parâmetros da biologia reprodutiva de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*), cutias (*Dasyprocta leporina*) e pacas (*Cuniculus paca*) e garantir subsídios para o estabelecimento de técnicas de reprodução assistida para essas.

3.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMANN, R.P. 1970. Sperm production rates. In: JOHNSON, A.D., GOMES, W.R. VANDERMARK, N.L. (ed.). **The testis**. New York: Academic Press, v.1, Cap. 7, p.433-482.
- AMANN, R.P. 1981. A critical review of methods o evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. **Journal of Andrology**, v.2, p.37-58.
- AMANN, R. P., SCHANBACHER, B. D. 1983. Physiology of male reproduction. **Journal of Animal Science Supplement**. v. 57, p. 380– 403.
- ASHDOWN, R. R., HANCOCK, J. L. 1988. Anatomia funcional da reprodução masculina. **Reprodução Animal**, 4. ed. São Paulo: Manole, cap. 2, p. 7 - 31.
- ASSIS-NETO, A.C., MELO, M.I.V., CARVALHO, M.A.M., , MIGLINO, M.A., OLIVEIRA, M.F., AMBRÓSIO, C.E., SILVA, S.M.M.S., BLASQUEZ, F.X.H., PAPA, P.C., KFOURY JÚNIOR, J.R. 2003. Quantificação de células dos túbulos seminíferos e rendimento da espermatogênese em cutias (*Dasyprocta aguti*) criadas em cativeiros. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.40, suppl.3, p.175-179
- BALARINI, M.K.; PAULA, T.A.R.; MATTA, S.L.P.; PEIXOTO, J.V.; GUIÃO-LEITE, F.L.; ROSSI JR, J.L.; CZERMAK JR, A.C.; WALKER, N.J. 2011. Stages and duration of the cycle of the seminiferous epithelium in oncilla (*Leopardus tigrinus*, SCHREBER, 1775). **Theriogenology**. 15;77(5):873-80.
- BERNDTSON, W.E., DESJARDINS, C. 1974. The cycle of seminiferous epithelium and spermatogenesis in the bovine testis. **American Journal of Anatomy**, V.140, p. 167-180.

- BERNDTSON, W.E. 1977. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. **Journal of Animal Science**, v.4, n.5, p.818-83.
- BITTENCOURT, V.L., PAULA, T. A. R., MATTA, S. L P., FONSECA, C. C.; COSTA, D. S., BENJAMIM, L. A., COSTA, E. P. 2007. The seminiferous cycle and the daily spermatogenic production in the adult maned Wolf (*Chrysocyon brachyurus*, ILIGER, 1811). **Mícron**. 38: 584-589.
- BUSTOS-OBREGON, E. 1970. On Sertoli cell number and distribution in rat testis. **Archive of Biology**, v.81, p.99-180.
- CARDOSO, F. M., GODINHO, H. P. 1982. Cycle of the epithelium and its duration in the zebu, *Bos indicus*. **Animal Reproduction Science**. 5: 231-245
- CARDOSO, F.M., GODINHO, H.P. 1985. Daily sperm production of zebus (*Bos indicus*) estimated by quantitative histology of the testis. **Theriogenology**. v.23, n.6, p.841-847.
- CITES (Conservation on International Trade in Endangered Species). Disponível em: [http:// www.cites.org/eng/resources/species.html](http://www.cites.org/eng/resources/species.html). Acesso em 25 de junho de 2012.
- CLERMONT, Y., MORGENTALER, H. 1955. Quantitative study of spermatogenesis in the hypophysectomized rat. **Endocrinology**, v.57, p.369-382.
- CLERMONT, Y. 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammals, seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. **Physiology Review**. 52(1): p.198-236.
- CORBET, G., HILL, J. 1991. A World List of Mammalian Species. **Oxford: Oxford University Press**, p. 539-586.
- COSTA, D. S.; PAULA, T. A. R. 2006. Testosterone level, nasal gland volume and Leydig cell morphometry in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 1086-1091.

- COUROT, M., HOCHEREAU-DE-REVIERS, M.T., ORTAVANT, R. 1970. Spermatogenesis. In: Johnson, A.D., Gomes, W.R., Vandemark, N.L. (ed). **The testis**. New York: Academic Press. v.1, cap. 6 : 339-432.
- DEUSTSCH, L. A.; PUGLIA, L. R. R. 1988. Os animais silvestres: proteção, doenças e manejo. **Rio de Janeiro: Globo**.
- EWING, L. L., ZIRKIN, B. B., COCHRAN, R. C., KROMANN, N. 1979. Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog, and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cell mass. **Endocrinology**, v. 105, p. 1135 - 1142.
- FAWCETT, D. W., NEAVES, W. B., FLORES, M. N. 1973. Comparative observations on intertubular lymphatic and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. **Biology of Reproduction**, v. 9, p. 500- 532.
- FRANÇA, L.R. 1991. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. Belo Horizonte: UFMG, 1991, 180p. Tese (Doutorado em Morfologia). **Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais**.
- FRANÇA, L.R., JACKSON, A., RUSSEL, L.D. 1994. Hormone sensitivity of germ cells in stage XIV and in stage I of the rat spermatogenic cycle. **Tissue & Cell**, v.26, n.3, p. 375-383.
- FRANÇA, L.R., YE, S-J., YING, L., SANDBERG, M., RUSSEL, L.D. 1995. Morphometry of rat germs cells during spermatogenesis. **Anatomy Record**, v.241, p. 181-204.
- FRANÇA, LR., RUSSELL, LD. 1998. The testis of domestic animals. In: Regadera, J. & M.-G. (eds.). **Male reproduction: A multidisciplinary overview**. Churchill Livingstone, Madrid, p. 197-219.

- GUERRA, M.O. 1983. Comparação entre dois métodos de determinação da frequência relativa dos estádios do ciclo do epitélio seminífero, em dados da literatura. **Revista Brasileira de Biologia**, v.43, n.4, p.385-394.
- GUIÃO-LEITE, F.L. 2002. Análise morfológica do testículo e do processo espermatogênico da onça parda (*Puma concolor*) adulta. Dissertação (Mestrado em morfologia), **Viçosa: Universidade Federal de Viçosa**, 64p.
- HOOKER, C. W. 1970. The intertubular tissue of the testis In: The testis development, anatomy and physiology. **Nova York: Academic Press**, v. 1, cap. 8, p. 483 - 550.
- HOSKEN, F.M.; SILVEIRA, A.C. 2001. Criação de cutias. Viçosa, MG: **Aprenda fácil**, v.4, p.21-22.
- JOHNSON, L. 1991. Spermatogenesis . In : Reproduction in domestic animals. 4 . ed . **New York : Academic Press**. p. 173 - 219.
- JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. 2008. Aparelho Reprodutor Masculino. In: JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO. J. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 11 ed., cap. 21, p. 323-334.
- KARL, J., CAPEL, B. 1998. Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. **Developmental Biology**, v. 203, p. 323–333.
- KENAGY, G. J., TROMBULAK, S. C. 1986. Size and function of mammalian testes in relation to body size. **Journal of Mammalogy**, 67(1):1-22.
- KRAGLIEVICH, L. 1930. Los ás grandes carpinchos actuales y fosiles de la subfamilia Hydrochoerinae. **Anales de la Sociedad Científica Argentina**.110: 233-250.
- KUMI-DIAKA, J., OSORI, D. I. K., NJOKU, C. O., OGWLI, D. 1983. Quantitative estimation of spermatogenesis in bulls (*Bos indicus*) in a tropical environment of Nigeria. **Veterinary research communications**, v.6, p.215-222.

- LEBLOND, C. P., CLERMONT, Y. 1952. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. **Annual New York Academic Science**, v.55, p.548-584.
- MCKENNA, M., BELL, S. 1997. Classification of Mammals Above the Species Level. **New York: University Press**, 631 p.
- MERCHANT-LARRIOS, H. & MORENO-MENDOZA, N. 1998. Mesonephric stromal cells differentiate into Leydig cells in the mouse fetal testis. **Experimental Cell Research**, v. 244, 230– 238.
- MONES, A. & OJASTI, J. 1986. Hydrochoerus hydrochaeris. **Mammalian Species**. 264, 1-7.
- MUÑOZ, E. M., FOGAL, T., DOMINGUEZ, S., SCARDAPANE, L., GUZMAN, J., CAVICCHIA, J.C., PIEZZI, R. S. 1998. Stages of the cycle of the seminiferous epithelium of the viscacha (*Lagostomus maximul maximus*). **Anatomy Record** 252: 8-16.
- MYERS, P. 2000. "Dasyproctidae" (On-line), **Animal Diversity Web**. Disponível em: <http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Dasyproctidae.html> Acesso em 10/06/2012.
- OLAR, T. T., AMANN, R. P., PICKETT, B. W. 1983. Relationships among testicular size, daily production and output of spermatozoa and extragonadal spermatozoa reserves of the dog. **Biology of Reproduction**, v. 29, p. 1114-1120. 1983.
- ORTAVANT, R., COUROT, M., HOCHEREAU-DE-REVIERS, M.T. 1977. Spermatogenesis in domestic mammals. In: COLE, H.H., CUPPS, P.T. (ed.). **Reproduction in domestic animals** . 3 ed. **New York: Academic Press**. Cap.8, p. 203-227.

- PAULA, T. A. R. 1999. Avaliação Histológica e Funcional do Testículo de Capivaras Adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Belo Horizonte: UFMG, 84p. Tese (Doutorado em Morfologia). **Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais**
- PAULA, T. A. R. 2012. Reproductive morphology and physiology of the male capybara. In: MOREIRA, J. R.; FERAZ, K. M. P. M. B.; HERRERA, E. A.; MACDONALD, D. W. **Use and conservation of an exceptional neotropical species**. Cap. 06. Ed. Springer.
- PEIXOTO, J.V. 2010. Criopreservação de sêmen e avaliação histológica e funcional do testículo de periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus* SHAW, 1805). Tese de Doutorado. Departamento de Veterinária, Centro de Ciências Biológicas da **Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais**. 78p.
- ROSEN-RUNGE, E. C., GIESEL, Jr. L.O. 1950. Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. **American Journal of Anatomy**, v. 87, n.1, p.1-30.
- ROWE, D., HONEYCUTT, R. 2002. Phylogenetic relationships, ecological correlates, and molecular evolution within the Cavoidea (Mammalia, Rodentia). **Molecular Biology and Evolution**, 19(3): 263-277.
- ROWLEY, M. J. & HELLER, C. G. 1971. Quantification of the cells of the human testis employing the Sertoli cells as a constant. **Zell Zellforsch**, v.115, p. 461-472.
- RUSSELL, L. D. & CLERMONT, Y. 1977. Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats. **Anatomy Record**, v.187, p. 347-366.

- RUSSEL, L. D., ETTLIN, R.A., SINHA HIKIM, A.P., CLEGG, E.D. 1991. **Histological and histopathological evaluation of the testis**. Clearwater, FL, Cache River Press, 286 p.
- RUSSELL, L. D. & GRISWOLD, M. D. 1993. **The Sertoli cell**. (ed) Cache River Press, Clearwater, Florida, 801 p.
- RUSSELL, L. D., CHANDRASHEKAR, V., BARTKE, A., SINHA-HIKIM, A. P. 1994. The hamsters Sertoli cell in early testicular regression and early recrudescence: a stereological and endocrine study. **International Journal of Andrology**, v. 17(2), p. 93-106.
- RUSSELL, L. D. 1996. Mammalian Leydig cell structure. In: Payne, A. H., Hardy, M. P., Russell, L. D. (eds). **The Leydig cell**. Cache River Press. Vienna, IL., cap. 10, p. 218-222.
- SHARPE, R. M. 1994. Regulation of spermatogenesis. K., E. & N., J. D. (eds) **The physiology of reproduction**, 2ed. Raven Press, New York, p.1363-1434.
- SINHA-HIKIM, A. P., SINHA-HIKIM, I. S., AMADOR, A.G., BARTKE, A., WOOLF, A., RUSSELL, L. D. 1991. Reinitiation of spermatogenesis by exogenous gonadotropins in a seasonal breeder, the woodchuck (*Marmota monax*), during gonadal inactivity. **American Journal of Anatomy**, v. 192(2), p. 194-213.
- SETCHELL, B. P. 1991. Male reproductive organs and semen. In: *Reproduction of domestic animals*. C., P.T. (Ed). **New York: Academic Press**, p. 221-249.
- SHAKKEBAK, N. E. & HELLER, C. G. 1973. Quantification of human seminiferous epithelium. **Journal of Reproduction & Fertility**, v. 32: 379-389.
- SWIERSTRA, E. E. 1968. Cytology and duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the boar; duration of spermatozoan transit through the epididimys. **Anatomy Record**, v.161, p.171-186.

- THENIUS, E., HEINEMANN, D., WENDT, H., MOHR, E., 1975. The Cavies. In: **Grzimek's animal life encyclopedia**. eds. Van Nostrand Reinhold Company, New York, v. 11, 420-456.
- WILDT, D. E., MONFORT S, L, DONOGHUE A, M, JOHNSTON L, A, HOWARD J. 1992. Embryogenesis in conservation biology - or, how to make an endangered species embryo. **Theriogenology**, 37:161-184.
- WILSON, D., REEDER D. 1993. Mammal Species of the World. Washington, D. C.: **Smithsonian Institution Press**. 2000 p.
- WING, .T. Y., CHRISTENSEN, A.K. 1982. Morphometric studies on rat seminiferous tubules. **American Journal of Anatomy**, v.165, p. 13-25.
- ZIRKIN, B. R., EWING, L. L., KROMANN, N., COCHRAN, R. C. 1980. Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog, and hamster testes in vitro: correlation with Leydig cells ultrastructure. **Endocrinology**, v. 107, p. 1867-1874.

4.0 MORFOMETRIA TESTICULAR E DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS DE TRÊS DIFERENTES ROEDORES DA SUBORDEM HYSTRICOMORPHA: CAPIVARA (*Hydrochoerus hydrochaeris*), CUTIA (*Dasyprocta leporina*) E PACA (*Cuniculus paca*).

Resumo

O conhecimento dos parâmetros testiculares de uma espécie é de grande importância no estabelecimento de padrões reprodutivos e, conseqüentemente, no auxílio ao desenvolvimento de protocolos de reprodução assistida para essa espécie. Os parâmetros morfométricos testiculares estão diretamente relacionados com a produção espermática, como observado em espécies já estudadas. O objetivo do presente trabalho foi definir parâmetros volumétricos e morfométricos do testículo e dos túbulos seminíferos de capivaras, cutias e pacas adultas e suas correlações somáticas. Os animais do presente experimento apresentavam peso corpóreo médio de 54,3, 3,1 e 6,4 kg respectivamente para capivaras, cutias e pacas. O peso médio de ambos os testículos é de aproximadamente 69 g em capivaras, 8,5 g em cutias e 18 g em pacas, correspondendo respectivamente a 0,12; 0,27 e 0,28 % do peso corporal (Índice gonadossomático). O somatório da albugínea testicular e mediastino representou cerca de 12%, 8% e 5 % do peso testicular respectivamente para capivaras, cutias e pacas. Aproximadamente 50% em capivaras, 93% em cutias e 91,0 % em pacas do parênquima testicular é composto por túbulos seminíferos, estando o restante distribuído entre os diferentes componentes intertubulares. A proporção de massa corporal alocada em túbulos seminíferos foi de 0,06; 0,23 e 0,24 % (Índice tubulossomático) respectivamente em capivaras, cutias e pacas. Os túbulos seminíferos apresentaram diâmetro médio de 212, 175 e 202 μm com altura média de epitélio seminífero de 79, 72 e 63 μm respectivamente em capivaras cutias e pacas. O comprimento total de túbulos por grama de testículo foi de aproximadamente 12,5 m/g em capivaras, 35,5 m/g em cutias e 27 m/g em pacas, sendo os dois últimos os maiores já registrados entre os mamíferos estudados.

Palavras-chave: testículo, túbulo seminífero, morfologia reprodutiva, índice gonadossomático, índice tubulossomático.

TESTICULAR MORPHOMETRY AND OF SEMINIFEROUS TUBULES OF THREE DIFFERENT RODENT FROM THE SUBORDER HYSTRICOMORPHA: CAPYBARA (*Hydrochoerus hydrochaeris*), AGOUTI (*Dasyprocta leporina*) AND PACA (*Cuniculus paca*).

Abstract

Knowledge of testicular parameters of a species is of great importance in establishing the reproductive pattern and thus aid in the development of assisted reproduction protocols for this species. The testicular morphometric parameters are directly related to sperm production, as observed in previously studied species. The objectives of this study were to define volumetric and morphometric parameters of the testicle and the seminiferous tubules of adult capybaras, agoutis and pacas and their somatic correlations. The animals of this experiment showed a mean weight of 54.3, 3.1 and 6.4 kg for capybaras, agoutis and pacas, respectively. The average weight of both testicles is approximately 69g in capybara, 8.5g in agouti and 18g in pacas, corresponding respectively to 0.12%, 0.27% and 0.28% of body weight (Gonadosomatic index). The sum of albuginea and mediastinum testis represented about 12%, 8% and 4%, respectively, for testicular weight of capybaras, agoutis and pacas. The percentage of testicular parenchyma composed of seminiferous tubules is approximately 50% in capybaras, 93% in agoutis and 91% in pacas, the remainder being distributed among the different intertubular components. The proportion of body mass allocated in seminiferous tubules was 0.06%, 0.23% and 0.24% (Tubulossomatic index) in capybaras, agoutis and pacas, respectively. The seminiferous tubules showed an average diameter of 212, 175 and 202 μm , with an average height of 79, 72 and 63 μm of the seminiferous epithelium in capybaras, agoutis and pacas, respectively. The total length of tubules per gram of testis was about 12.5 m/g in capybara, 35.5 m/g in agouti and 27 m/g in pacas, being the latter two the largest ever registered among studied mammals.

Keywords: testis, seminiferous tubule, reproductive morphology, gonadosomatic index, tubulossomatic index.

4.1. Introdução

Capivaras, cutias e pacas são espécies da fauna silvestre brasileira da ordem Rodentia, subordem Hystricomorpha, sendo reconhecidos como de grande potencial econômico, mas que apresentam poucos dados referentes à sua biologia reprodutiva (ALHO, 1986; BROWN-UDDENBERG et al., 2004; MACHADO & OHASHI, 1996; MATAMOROS, 1981; MOLLINEAU et al., 2006; PASHOV & MATAMOROS, 1984; STRADIOTTI, 2006; URENA et al. 1988). Atualmente essas três espécies se encontram em baixo risco de extinção de acordo com o Conservation on International Trade in Endangered Species (CITES, 2012). A cutia e a paca, devido à continuidade da depreciação de seu habitat natural, associado à sua caça ilegal, podem vir a apresentar reduções significativas em suas populações na natureza (NOWAK, 1999; IUCN, 2012). Por outro lado, embora a capivara também seja susceptível a estes mesmos impactos ambientais, apresenta uma grande adaptabilidade e diferente da cutia e da paca, apresenta populações sinantrópicas potencialmente nocivas à saúde pública, uma vez que está, associada a transmissão da febre maculosa (Rickettsiose) (SOUZA et al., 2009).

Dessa forma, o estudo das características morfofuncionais do testículo destas espécies, principalmente em seus aspectos básicos, é importante para o desenvolvimento de biotécnicas aplicadas à reprodução (AMANN & SCHANBACHER, 1983; FRANÇA, 1991), que podem gerar maiores resultados quando aplicadas a estudos visando à produção comercial, a conservação ou até mesmo no controle populacional dessas espécies.

Para se avaliar as características fisiológicas da reprodução de uma dada espécie vários métodos têm sido utilizados, porém, os mais confiáveis na caracterização reprodutiva masculina baseiam-se na histologia quantitativa dos testículos (AMANN, 1970; BERNDTSON, 1977). O testículo é um órgão ovalado composto por um componente intertubular e um componente tubular, sendo este um aglomerado de túbulos conhecidos como túbulos seminíferos. Os parâmetros quantitativos relacionados com o túbulo seminífero, como diâmetro tubular, espessura do epitélio seminífero e o comprimento total e por grama de testículo, apresentam uma correlação positiva com a atividade espermatogênica (FRANÇA & RUSSELL, 1998; PAULA, 1999). Desta forma, as mensurações tubulares são abordagens geralmente utilizadas como indicadores da atividade espermatogênica em investigações envolvendo a função testicular (NAVARRO et al., 2004; SOUZA et al., 2005; SILVA JR et al., 2006, MASCARENHAS et al., 2006).

Por ser o túbulo seminífero o componente mais abundante do parênquima testicular, há uma correlação positiva entre o peso testicular e a produção espermática (AMANN, 1970; OLAR et al., 1983; FRANÇA & RUSSELL, 1998). Porém, em diferentes animais de portes distintos, o tamanho testicular não acompanha proporcionalmente o tamanho corporal. Independente do porte físico a quantidade de espermatozoides produzidos é sempre muito maior que o número necessário para a fecundação. Assim, o fato de o tamanho do testículo não necessariamente acompanhar o tamanho corporal é um contribuinte para a economia energética, uma vez que animais de grande porte produziram quantidades excessivamente altas de espermatozoides (KENAGY & TROMBULAK, 1986; PAULA, 1999).

O índice gonadossomático pode fornecer informações sobre a fisiologia reprodutiva e até mesmo sobre o sistema de acasalamento de uma espécie. O tamanho

testicular está diretamente relacionado ao comportamento reprodutivo, uma vez que animais com comportamento monogâmico ou poligínico apresentam menor índice gonadossomático em relação às espécies com comportamento promíscuo ou poliândrico (KENAGY & TROMBULAK, 1986).

Assim, o estudo da morfofisiologia testicular e da biometria corporal em animais silvestres permite o estabelecimento de padrões fisiológicos e comportamentais, importantes para o conhecimento de particularidades sobre a biologia reprodutiva das diferentes espécies, com as quais é possível o desenvolvimento de protocolos visando técnicas reprodutivas. Neste sentido, os objetivos deste trabalho foram estabelecer parâmetros volumétricos do testículo e correlacionar dados de morfometria testicular e do túbulo seminífero com a massa corporal em capivaras, cutias e pacas adultas.

4.2. Material e Métodos

4.2.1. Animais utilizados e procedimento de coleta dos testículos

Cada espécie estudada diferiu quanto às suas origens. Foram utilizadas cinco pacas adultas, uma proveniente do Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e quatro do criatório especializado “Fazenda Um Sonho a Mais”, localizado no município de Carangola-MG, registrado perante o IBAMA sob o número 296010. Foram utilizadas cinco cutias machos adultos, provenientes do Criatório Comercial “Chácara Lourenço Carreta” localizado no município de Santa Teresa, Espírito Santo, Brasil, registrado perante o IBAMA sob o número 312226. Já o procedimento em capivaras foi realizado em cinco animais capturados no “Plano de Manejo de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) de vida livre no campus universitário da Universidade Federal de Viçosa-MG”, sendo este um

projeto já registrado ao Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, com número de registro 20558259287 de 04 de maio de 2010 e autorização número 29981-2 pelo Sistema de autorização e Informação em Biodiversidade (SISBio).

Este estudo foi aprovado pelo SISBio, sob o número 26.469-1 e pela Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA - processo número 10/2012).

Após um jejum de 12 horas, as pacas e cutias foram contidas fisicamente, com auxílio de puçá, para a aplicação intramuscular de cloridato de quetamina (40 mg/kg) associado ao cloridrato de xilazina (1 mg/kg), como associação anestésica. As capivaras foram cevas em áreas de baixa presença humana, dentro do campus da Universidade Federal de Viçosa, para serem contidas quimicamente com uso de dardos anestésicos propelidos por arma anestésica, sendo utilizada a mesma associação citada. Depois de anestesiados, os animais foram pesados e, por meio de palpação percutânea, foi verificada a integridade dos testículos.

A técnica de hemicastração foi realizada no testículo e epidídimo direitos, através de técnica convencional. Após a coleta, o testículo foi isolado do epidídimo, teve a albugínea perfurada em vários pontos com uso de uma agulha 0,45 mm de diâmetro externo e imerso em solução fixadora de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965) em temperatura ambiente durante 2 horas. Posteriormente às perfurações da túnica albugínea, cuja finalidade foi a de melhorar a penetração do líquido fixador no interior dos testículos, os mesmos foram seccionados longitudinalmente e mantidos em solução Karnovsky por mais 22 horas. Os testículos foram transferidos para solução de álcool 70% e armazenados sob refrigeração até o processamento histológico. No final do procedimento, cada animal foi medicado com agentes antiinflamatórios (Flunixin

Meglunime, Banamine – Schering-Plough S/A, 1,1 mg/kg de peso) e antibióticos (enrofloxacino, 20mg/kg de peso).

4.2.1. Processamento histológico

Os testículos recolhidos foram pesados em balança de precisão de 0,001g e, por meio de dissecação, foram isolados o mediastino e albugínea, os quais foram pesados separadamente, exceto para a cutia onde não foi possível a separação do mediastino testicular, sendo apenas a albugínea pesada separadamente. Uma vez que a densidade volumétrica do testículo é muito próxima de 1,0 (JOHNSON et al., 1981), o peso do testículo coletado foi considerado como sendo igual ao seu volume. Foi considerado volume do parênquima testicular o peso testicular subtraído do peso da albugínea e do mediastino, exceto para cutias. Para o cálculo do peso total dos testículos de cada animal, o peso do testículo contralateral foi considerado igual ao peso do testículo coletado, uma vez que nos animais já estudados nenhuma variação significativa foi observada entre o peso do testículo direito e esquerdo (FRANÇA & RUSSELL, 1998; MASCARENHAS et al. 2006).

Fragmentos testiculares foram processados segundo a técnica rotineira para inclusão em resina glicol metacrilato (Historesin, Leica Instruments). Foram realizados cortes de 3,0 µm de espessura em micrótomo rotativo dotado de navalhas de vidro (Leica RM 2155) que posteriormente foram montados em lâmina de vidro em intervalos de 10 cortes e corados com azul de toluidina e borato de sódio 1%. Todo o processamento histológico foi realizado no Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral da UFV.

4.2.1. Proporção volumétrica dos componentes do parênquima testicular, mensuração tubular e parâmetros somáticos

Para o cálculo da proporção volumétrica dos componentes do parênquima testicular foram examinados 20 campos fotomicrografados, em aumento de 200 vezes, escolhidos ao acaso por meio de varredura horizontal dos cortes histológicos. Foi sobreposta a cada imagem uma graticula com 500 intersecções consideradas como pontos. Foram computados os pontos coincidentes com: túbulos seminíferos, núcleo de células de Leydig, citoplasma de célula de Leydig, tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e espaços linfáticos, totalizando 10.000 pontos por animal, convertidos em representação percentual. A partir da proporção desses componentes frente ao volume do parênquima testicular foi possível o cálculo de seus volumes separadamente.

O diâmetro médio dos túbulos seminíferos foi obtido com o uso do programa de análise de imagens IMAGE J ® a partir de fotografias do parênquima testicular em 20 secções transversais de túbulos, os mais circulares possíveis, em cada testículo, em aumento de 200 vezes independente do estágio em que se encontravam. Na mesma secção em que se obteve o diâmetro tubular também foi aferida a altura do epitélio seminífero, sendo esta a medida desde a membrana basal até a borda luminal. Duas anotações foram obtidas para cada parâmetro, em cada secção transversal, considerando-se como medida representativa a média das duas.

O comprimento total dos túbulos seminíferos foi calculado a partir da fórmula do volume do cilindro (área da base x altura). Assim, o comprimento representa o volume total de túbulos seminíferos dividido pela área da secção transversal do túbulo seminífero. Foi calculado também o comprimento total de túbulos seminíferos por grama de testículo dividindo-se o comprimento total de túbulos seminíferos pelo peso em gramas de ambos os testículos.

O índice gonadossomático foi calculado dividindo-se o peso de ambos os testículos pelo peso corporal e o resultado foi multiplicado por cem. Esse índice representa a porcentagem do peso corporal alocado em testículos. Sobre o valor do índice gonadossomático foi inferido o valor percentual ocupado por túbulos seminíferos, obtendo-se assim o índice tubulossomático, ou seja, o percentual do peso corporal alocado em túbulos seminíferos.

Os dados obtidos foram analisados por estatística descritiva (média e desvio padrão) empregando-se o programa Excel for Windows XP (2010).

4.3. Resultados e discussão

Assim como na capivara (PAULA, 1999), a paca e a cutia não apresentam um escroto propriamente definido e os testículos localizam-se subcutaneamente na região inguinal. Os revestimentos testiculares são os mesmos observados nos demais mamíferos, porém, nos animais estudados foi observado uma espessa camada de músculo cremaster, compondo, de forma contínua, a túnica cremastérica. Devido à destacada presença desta túnica e à disposição em separado dos testículos no espaço subcutâneo, durante a hemicastração foram observadas duas saculações inguinais musculosas distintas, sem a presença de um septo ou formação de pregueamento cutâneo. A túnica cremastérica bem desenvolvida, associada à presença um amplo canal inguinal, favorece a movimentação testicular para o interior da cavidade abdominal. Neste sentido, em função do estresse de captura e manipulação, é comum a observação da posição intra-abdominal do testículo, também observado por Borges (2004) em pacas.

O peso corporal, o peso testicular e o índice gonadossomático das três espécies estudadas estão apresentados na Tabela 1. O índice gonadossomático registrado para as

três espécies estudadas estão entre os menores observados para animais da ordem Rodentia. Segundo KENAGY & TROMBULAK (1986), a ordem rodentia é a que apresenta a maior variação para o peso relativo dos testículos (de 0,05 % para castor-americano - *Castor canadensis* a 8,41 % em gerbil indiano - *Tatera indica*). Estes mesmos autores observaram que animais de menor peso corporal alocam maior proporção de massa corporal e desprendimento de energia no tecido testicular, comparados com animais de maior porte. Neste aspecto, é bastante representativo o fato do índice gonadossomático das espécies estudadas serem os mais baixos encontrados para roedores, uma vez que os pesos corporais médios para estas espécies são justamente os mais altos dentre os roedores.

Tabela 1. Valores Peso corporal, peso do testículo coletado e índice gonadossomático de capivaras, cutias e pacas adultas (média \pm desvio padrão).

Animal	Capivara (N=5)	Cutia (N=5)	Paca (N=5)
Peso corporal médio (Kg)	54,3 \pm 1,3	3,14 \pm 0,28	6,4 \pm 1,5
Peso médio do testículo coletado (g)	34,4 \pm 1,0	4,22 \pm 0,96	9,1 \pm 2,8
Índice gonadossomático (%)	0,12 \pm 0,003	0,27 \pm 0,06	0,28 \pm 0,05

Ainda segundo KENAGY & TROMBULAK (1986), o tamanho testicular relativo também está relacionado ao comportamento reprodutivo, uma vez que animais com comportamentos monogâmicos e poligínicos apresentam menor índice gonadossomático em relação às espécies com comportamentos promíscuos ou poliândricos. No primeiro caso, o pequeno investimento testicular é reflexo da formação de casais ou haréns onde

um único macho é responsável pela cópula. Nos animais promíscuos ou poliândricos, vários machos têm acesso à mesma fêmea, sendo mais aptos à paternidade aqueles com a produção espermática mais destacada e, conseqüentemente, maior tamanho testicular. Baseado no baixo índice gonadossomático observado, capivaras, cutias e pacas machos adultos enquadram-se em um sistema de comportamento reprodutivo poligínico. Em capivaras o modelo de comportamento reprodutivo é baseado em grupos familiares onde um macho considerado dominante arrebanha número variado de fêmeas e filhotes (LÓPEZ-BARBELLA, 1985).

Embora a descrição anatômica dos órgãos reprodutivos masculinos não tenha sido o objetivo do presente trabalho, observou-se durante os procedimentos de coleta, uma estrutura rígida com borda serrilhada e cortante, bastante peculiar nas faces laterais do pênis de cutias e pacas. Esta estrutura é também descrita em pacas por Borges (2004) e Mollineau (2006) e durante a cópula, certamente acarreta uma lesão vaginal, o que poderia inibir novas cópulas de outros machos.

Os valores referentes aos volumes do testículo, parênquima testicular, albugínea e mediastino, assim como as proporções referentes ao compartimento tubular e intertubular estão expressos na Tabela 2. Embora parênquima testicular não seja um termo totalmente adequado para citar o testículo desprovido de albugínea e mediastino, este é amplamente mencionado na literatura (BERNDTSON, 1977; JOHNSON et al., 1981; RUSSELL et al., 1990; JOHNSON et al., 2000). Em capivaras e pacas o parênquima testicular sem mediastino representa respectivamente 88,67% e 94,3% do peso total do órgão, enquanto que em cutias o parênquima testicular com o mediastino representou 91,7% do órgão total (Tabela 2).

Na maioria das espécies domésticas a proporção volumétrica da albugínea e mediastino testiculares é geralmente em torno de 10% (FRANÇA & RUSSELL, 1998).

Neste sentido a proporção volumétrica da albugínea e mediastino testiculares na paca é relativamente menor que o observado nas demais espécies estudadas, inclusive da outra espécie da subordem Hystricomorpha, a capivara, que apresenta cerca de 11,9 % do testículo alocado em albugínea e mediastino.

Tabela 2. Volume testicular, volume do parênquima testicular, volume da albugínea, porcentagem do testículo alocado em albugínea, volume do mediastino e porcentagem do testículo alocado em mediastino, proporção volumétrica de túbulo seminífero, proporção volumétrica de espaço intertubular de capivaras, cutias e pacas adultas (média \pm desvio padrão).

Parâmetro	Capivara (N=5)	Cutia (N=5)	Paca (N=5)
Volume testicular (ml)	34,4 \pm 0,3	4,22 \pm 0,96	9,11 \pm 2,8
Volume do parênquima testicular (ml)	30,5 \pm 0,3	3,87 \pm 0,87	8,59 \pm 1,36
Volume da albugínea (ml)	2,2 \pm 0,9	0,34 \pm 0,11	0,35 \pm 0,09
% do testículo alocado em albugínea	6,5 \pm 0,2	8,12 \pm 1,5	3,98 \pm 0,7
Volume do mediastino (ml)	1,7 \pm 0,1	–	0,17 \pm 0,08
% do testículo alocado em mediastino	5,5 \pm 0,3	–	1,89 \pm 0,46
Proporção volumétrica de túbulo seminífero (%)	50,1 \pm 2,5	92,9 \pm 1,55	90,87 \pm 0,63
Proporção volumétrica de espaço intertubular (%)	49,9 \pm 2,5	7,1 \pm 1,55	9,13 \pm 0,63

Aproximadamente 93,0 % do parênquima testicular de cutias adultas foi composto por túbulos seminíferos, sendo ligeiramente superior ao observado em pacas (91%). Os túbulos seminíferos são os principais constituintes do parênquima testicular da maioria dos mamíferos, ocupando em torno de 60 a 90 % na maioria das espécies (SETCHELL, 1982). A capivara, diferentemente dos demais animais já estudados, apresenta apenas 50% do parênquima testicular alocado em túbulos seminíferos. Os volumes do compartimento tubular e intertubular do parênquima, por testículo, foram respectivamente de 15,29 e 15,21 ml para capivaras, 3,59 e 0,27 ml para cutias e 7,8 e 0,78 ml para pacas.

A capivara apresentou um índice tubulossomático bem abaixo do apresentado por outras espécies de roedores, e embora a cutia e paca apresentem valores acima dos apresentados pela capivara, estes ainda estão abaixo do observado em diversas outras espécies da Ordem Rodentia (Tabela 3). O índice tubulossomático (ITS) é um parâmetro que visa quantificar o investimento de massa corporal em túbulos seminíferos. Este parâmetro é de grande importância quanto à avaliação da influência do comportamento reprodutivo sobre a morfologia testicular. Segundo a teoria de Kenagy & Trombulak (1986) espécies sabidamente monogâmicas ou poligínicas apresentam menor investimento em túbulos seminíferos quando comparadas com espécies promíscuas ou poliândricas.

Tabela 3. Índices gonadossomáticos (IGS) e índices tubulossomáticos (ITS) de sete espécies da Ordem Roentia (média \pm desvio padrão).

Espécie	I.G.S. (%)	I.T.S. (%)
Capivara	0,11 \pm 0,016	0,06 \pm 0,018
Cutia	0,27 \pm 0,06	0,23 \pm 0,05
Paca	0,28 \pm 0,05	0,24 \pm 0,026
Cobaio ¹	0,43 \pm 0,001	0,34 \pm 0,117
Rato ¹	0,75 \pm 0,001	0,61 \pm 0,118
Gerbil ¹	1,86 \pm 0,003	1,67 \pm 0,250
Camundongo ¹	1,15 \pm 0,002	1,125 \pm 0,250

¹ ROMANO et al., 2002

A mensuração tubular é uma das abordagens utilizadas como indicadores da atividade espermatogênica em experimentos relacionados à função testicular (NAVARRO et al., 2004; SOUZA et al., 2005; MASCARENHAS et al., 2006; SILVA JR et al., 2006, PEIXOTO, 2006, BALARINI, 2008). O valor tipicamente observado para diâmetro tubular na maioria das espécies de amniotas varia de 180 a 300 μ m (ROOSEN-RUNGE, 1977). O diâmetro do túbulo seminífero permanece relativamente constante nos animais não sazonais e sexualmente maduros (PAULA, 1999; GUIÃO-LEITE, 2002), porém, grandes variações podem ser observadas entre raças e linhagens diferentes e fora do período de atividade reprodutiva em espécies sazonais (PAULA et al., 2002). O diâmetro médio dos túbulos seminíferos de cutias no presente estudo foi de 174,85 μ m (Tabela 4). Desta forma o diâmetro tubular médio para cutias se encontra pouco abaixo do menor diâmetro tubular médio relatado para a maioria dos amniotas

(ROOSEN-RUNGE, 1977). Os diâmetros observados, respectivamente, em pacas e capivaras foram de 202,05 e 213 μm .

Vários fatores podem contribuir para justificar a grande amplitude de diâmetro tubular observada nos mamíferos. Dentre eles podem ser citados: metodologias em que não se considera a retração tecidual durante o processamento histológico, principalmente quando se trabalha com inclusões com parafina; uso de animais que ainda não atingiram a maturidade sexual; variações no número de camadas de células mioídes que constituem a túnica própria; diferenças na população das células de Sertoli e células espermatogênicas e diferentes padrões de secreção de fluido pelas células de Sertoli, o que determina o tamanho do lume tubular (COSTA e PAULA, 2003, ASSIS-NETO et al., 2003).

Segundo Wing & Christensen (1982), a mensuração do epitélio seminífero é mais efetiva que o diâmetro tubular para a avaliação da produção espermática, por apresentar menor influência dos fatores supracitados. A altura do epitélio seminífero para capivaras, cutias e pacas adultas foi de 79 μm , 72 μm e 63 μm , respectivamente. Tais valores estão inseridos no intervalo relatado para a maioria dos mamíferos, que é de 60 a 100 μm (FRANÇA e RUSSELL, 1998). A altura epitelial não parece ser afetada nas comparações entre estádios diferentes do ciclo do epitélio seminífero no mesmo animal, a despeito das diferentes associações celulares e dos diferentes volumes de células de Sertoli em cada estágio (WROBEL e SCHIMMEL, 1989, WROBEL et al., 1995).

O comprimento total do túbulo seminífero para as três espécies estudadas está apresentado na Tabela 4. Este dado não permite uma análise comparativa precisa entre espécies diferentes devido às diferenças da massa testicular em cada uma. Para contornar tal situação, permitindo comparações independentemente do porte do animal, deve-se converter o comprimento tubular total em comprimento tubular por grama de

testículo. Assim procedendo, percebe-se que a maioria dos animais estudados até o momento apresenta valores que variam de 10 a 15 m de túbulo por grama de testículo, estando a capivara dentro deste intervalo. Neste parâmetro a cutia e a paca se destacam por apresentarem os maiores valores já relatados para um mamífero até o momento, sendo estes de 35,5 m/g e 26,77 m/g respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4. Diâmetro do túbulo seminífero, altura do epitélio seminífero, comprimento do túbulo seminífero por grama de testículo e comprimento total de túbulo seminífero em pacas adultas (média \pm desvio padrão).

Parâmetro	Capivara	Cutia	Paca
Diâmetro do túbulo seminífero (μm)	213 \pm 4,0	174,85 \pm 10,59	202,05 \pm 1,53
Altura do epitélio seminífero (μm)	79 \pm 3,0	72,01 \pm 4,1	63,05 \pm 0,79
Comprimento do túbulo seminífero por grama de testículo (m/g)	12,46 \pm 0,6	35,5 \pm 4,68	26,77 \pm 1,35
Comprimento total do túbulo seminífero (m)	857,63 \pm 43,6	299,72 \pm 39,55	487,81 \pm 25,36

4.4. Conclusões

Capivaras, cutias e pacas apresentaram os menores IGS observados para animais da ordem Rodentia. A proporção volumétrica de mediastino e albugínea testiculares em capivaras encontram-se no intervalo observado para a maioria das espécies de mamíferos estudados, enquanto que para pacas os valores estão abaixo desse intervalo. Embora a proporção volumétrica de túbulos seminíferos na cutia e paca se apresentarem dentro dos valores mais altos observados nos roedores, o diâmetro tubular médio para estes animais está dentro da amplitude observada para os demais mamíferos já estudados. O comprimento de túbulos seminíferos por grama de testículo na cutia e na paca destacam-se dentre todas as espécies já estudada e o índice tubulossomático (ITS) destas espécies encontra-se entre os mais baixos para roedores. Em capivaras o comprimento de túbulos seminíferos por grama de testículo está dentro do intervalo relatado para as espécies de mamíferos estudados enquanto o ITS é o menor registrado para a ordem rodentia.

4.5. Referências Bibliográficas

- ALHO, C. J. R. 1986. Criação e manejo de capivaras em pequenas propriedades rurais. Dep. de Difusão de Tecnologia, Brasília, DF- **Embrapa**, 33p.
- AMANN, R.P. 1970. Sperm production rates. In: JOHNSON, A.D., GOMES, W.R. VANDERMARK, N.L. (ed.). The testis. **New York: Academic Press**, v.1, Cap. 7, p.433-482.
- AMANN, R. P., SCHANBACHER, B. D. 1983. Physiology of male reproduction. **Journal of Animal Science Supplement**. v. 57, p. 380– 403.
- ASSIS-NETO, A.C., MELO, M.I.V., CARVALHO, M.A.M., MIGLINO, M.A., OLIVEIRA, M.F., MENEZES, D.J.A, PAPA, P.C., KFOURY JÚNIOR, J.R. 2003. Análise qualitativa do estabelecimento da espermatogênese em cutias (*Dasyprocta aguti*) criadas em cativeiros. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.40, suppl.3, p.180-184.
- BALARINI, M. K. 2008. Avaliação morfofuncional do testículo e do processo espermatogênico de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*, Schreber, 1775) adulto. Dissertação (Mestrado em morfologia), Viçosa: **Universidade federal de Viçosa**, 60p.
- BERNDTSON, W.E. 1977. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. **Journal of Animal Science**, v.4, n.5, p.818-83.
- BITTENCOURT, V. L. 2003. Avaliação morfofuncional do testículo e do processo espermatogênico do lobo - guará (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1811), adulto. Dissertação (Mestrado em morfologia), Viçosa: **Universidade Federal de Viçosa**.

- BORGES, E. M. 2004. Morfologia dos órgãos genitais masculinos de pacas (*Agouti paca* Linnaeus, 1766). Tese (Doutorado em anatomia), São Paulo: **Universidade de São Paulo**, 180p.
- BROWN-UDDENBERG, R.C., GARCIA, G.W., BATISTE, Q.S., COUNAND, T., ADOGWA, A.O., SAMPSON, T., 2004. **The Agouti (*Dasyprocta leporina*, D. aguti) Booklet and Producers' Manual**. 1st ed. GWG Publications, Trinidad and Tobago.
- CITES (Conservation on International Trade in Endangered Species). Disponível em: <http://www.cites.org/eng/resources/species.html>. Acesso em 25 de junho de 2012.
- COSTA, D.S., PAULA, T.A.R. 2003. Espermatogênese em mamíferos. **Scientia**, v. 4, p. 53-72.
- FAWCETT, D. W., NEAVES, W. B., FLORES, M. N. 1973. Comparative observations on intertubular lymphatic and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. **Biology of Reproduction**, v. 9: 500- 532.
- FRANÇA, L.R. 1991. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. Belo Horizonte: UFMG, 1991, 180p. Tese (Doutorado em Morfologia). **Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais**.
- FRANÇA, LR., RUSSELL, LD. 1998. The testis of domestic animals. In: Regadera, J. & Martinez-Garcia (eds.). **Male reproduction: A multidisciplinary overview**. Churchill Livingstone, Madrid, p. 197-219.
- GUIÃO-LEITE, F.L. 2002. Análise morfológica do testículo e do processo espermatogênico da onça parda (*Puma concolor*) adulta. Dissertação (Mestrado em morfologia), Viçosa: **Universidade Federal de Viçosa**, 64p.
- JOHNSON, L., PETTY, C.S., NEAVES, W.B. 1981. A new approach to qualification of spermatogenesis and its application to germinal cell attrition during human spermatogenesis. **Biology of Reproduction**, v. 25, p. 217-226.

- JOHNSON, L., VARNER, D. D., ROBERTS, M. E., SMITH, T. L., KEILLOR, G. E., SCRUTCHFIELD, W. L. 2000. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. **Animal Reproduction Science**. v. 60 - 61, p. 471 - 480, .
- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cellular Biology**, v.27, p.137-138, 1965.
- KENAGY, G. J., TROMBULAK, S. C. 1986. Size and function of mammalian testes in relation to body size. **Journal of Mammalogy**, 67(1):1-22.
- LÓPEZ-BARBELLA, S. Una contribución al conocimiento de la fisiología de la reproducción del chiguire (*Hydrochoerus hydrochaeris*). **Universidad Central de Venezuela**, Maracay; 1985; 51 pp.
- MACHADO, A.A.C., OHASHI, O. M. 1996. Estudo das características físicas e morfológicas do sêmen de *Agouti paca* (Linnaeus, 1766) (Agoutidae). In: **XXI Congresso Brasileiro de Zoologia. Resumos...** Porto Alegre, p.228, 1996.
- MASCARENHAS, R.M., PAULA, T.A.R., MATTA, S.L.P., LANNA, L.L., FONSECA, C.C., NEVES, M.T.D. 2006. Morfometria macro e microscópica e índices somáticos dos componentes testiculares de cães sem raça definida, da puberdade à senilidade. **Revista CERES**, n. 53. v. 305, p. 106-112.
- MATAMOROS, Y. 1981. Anatomía e histología del sistema reproductor del tepezcuinte (*Cuniculus paca*). **Revista de Biología Tropical**, 29(1): 155-164.
- MOLLINEAU, W.M., ADOGWA, A., JASPER, N., YOUNG, K., GARCIA, G., 2006. The gross anatomy of the male reproductive system of a neotropical rodent: the agouti (*Dasyprocta leporina*). **Anatomia, Histologia, Embryologia**. 35, 47–52.
- NAVARRO, R.D., PAULA, T.A.R., MATTA, S.L.P., FONSECA, C.C., NEVES, M.T.D. 2004. Efeito da exposição pré e pós-natal ao ultra-som de baixa intensidade

- sobre a célula de Leydig e demais componentes do espaço intertubular do testículo de camundongos adultos. **Revista CERES**, n. 51, v. 296, p. 445-455.
- NOWAK, R. 1999. Walker's Mammals of the World, v. 2. Baltimore and London: **The Johns Hopkins University Press**, 1936 p.
- OLAR , T . T ., AMANN , R . P ., PICKETT , B . W . 1983. Relationships among testicular size, daily production and output of spermatozoa and extragonadal spermatozoa reserves of the dog. **Biology of Reproduction**, v . 29 , p . 1114 - 1120.
- PASHOV, B. MATAMOROS, Y. 1984. Description histologica del epitelio seminifero del testiculo del tepezcuinte (*Cuniculus paca*, Brisson, 1762) e identificacion de sus diferentes etapas. **Ciência Veterinária**, v. 1, p. 9-15.
- PAULA, T.A.R. 1999. Avaliação Histológica e Funcional do Testículo de Capivaras Adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Belo Horizonte: **Instituto de Ciências Biológicas da UFMG**, 84p. Tese (Doutorado em Morfologia).
- PAULA, T. A. R.; COSTA, D. S.; MATTA, S. L. P. 2002. Avaliação histológica quantitativa do testículo de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 18, n. 1, p. 121-136.
- PEIXOTO, J. V. 2006. Avaliação morfofuncional do testículo e do processo espermatogênico do periquitão-maracanã (*Aratinga leucophthalma* Muller, 1776) adulto, mantido em cativeiro, nas diferentes estações do ano. Viçosa: **Universidade Federal de Viçosa**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). 39 p.
- ROMANO, H. S. ; PEREIRA, T. ; FONSECA, C. C. ; PAULA, T. A. R. ; NEVES, M. T. D. ; MATA, S. L. P. 2002. Avaliação do testículo e do processo espermatogênico em 5 diferentes espécies de roedores. In: **XI Simpósio de**

Iniciação Científica. Resumos... Viçosa, MG : Universidade Federal de Viçosa, v. 1. p. 352-353.

ROOSEN-RUNGE, E.C. 1977. The process of spermatogenesis in animals.

Cambridge: University Press, 214 p.

RUSSELL, L.D., REN, H.P., SINHA HIKIM, I., SCHULZE, W., SINHA HIKIM, A.P.

1990. A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell. **American Journal of Anatomy**, v. 188, n.1, p. 21-30.

SETCHELL, BP. 1982. Spermatogenesis and spermatozoa. In: Austin, C.R., Short, R.V.

(ed). **Reproduction in mammalian**. London: Elek, v. 1, p. 63-101.

SILVA JR, V.A., VIEIRA, C.F.P., PAULA, T.A.R., PALMA, M.B., AMORIM, A.A.,

MANHÃES, R.C. 2006. Neonatal treatment with naloxone increases the population of Sertoli cells and sperm production in adult rats. **Reproduction Nutrition Development**. 46, p.157-166.

SMYTHE, N. 1987. The paca (*Cuniculus paca*) as a domestic source of protein the

Neotropical, Humid Lowlands. **Applied Animal Behaviour Science**, 17:155-170.

SOUZA , E.C., MORAES-FILHO, J., OGRZEWALSKA, M., UCHOA, F.C., HORTA,

M.C., SOUZA, S.S.L., BORBA, R.C.M., LABRUNA, M.B. 2009. Experimental infection of capybaras *Hydrochoerus hydrochaeris* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajannense*.

Veterinary parasitology, 161: 116-121.

SOUZA, P.C., PAULA, T.A.R., NATALI, A.J., MATTA, S.L.P., COSTA, D.S.,

FONSECA, C.C., SARTI, P. 2005. Efeito do exercício crônico voluntário e do sedentarismo, com e sem o uso do esteróide anabólico nandrolona, sobre os

- componentes do parênquima testicular de ratos adultos. **Revista CERES**, n. 53, v.300, p. 305-316.
- STRADIOTTI, C.P. 2006. Anatomia dos órgãos reprodutivos do macho e método de coleta de sêmen em pacas (*Agouti paca*). **Universidade Estadual do Norte Fluminense**. Campos dos Goytacazes. Dissertação (Mestrado em anatomia), 47p.
- URENA, F., BOLANOS, R. 1988. Tipos de espermatogônios em “Tepezcuintle” (*Cuniculus paca*). Estudo ultraestrutural. **Revista Biologia Tropical**, v.36:325-328.
- WING, .TY., CHRISTENSEN, A.K. 1982. Morphometric studies on rat seminiferous tubules. **American Journal of Anatomy**, v.165, p. 13-25.
- WROBEL, KH., REICHOLD, J., SCHIMMEL, M. 1995. Quantitative morphology of the ovine seminiferous epithelium. **Anatomischer Anzeiger**, v. 177:19-32.
- WROBEL, KH., SCHIMMEL, M. 1989. Morphology of the bovine Sertoli cell during the spermatogenic cycle. **Cell Tissue Research**, v. 257:93-103.

5.0 ORGANIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES DO ESPAÇO INTERTUBULAR EM CAPIVARAS (*Hydrochoerus hydrochaeris*), CUTIAS (*Dasyprocta leporina*) e PACAS (*Cuniculus paca*) ADULTAS

Resumo

No presente trabalho objetivou-se o estudo quantitativo dos componentes do espaço intertubular e a descrição do seu arranjo no testículo de capivaras, cutias e pacas adultas. O espaço intertubular é composto por células e fibras conjuntivas, leucócitos, vasos sanguíneos e linfáticos, juntamente com as células de Leydig, sendo estas diretamente responsáveis pela função endócrina do testículo. Nas três espécies estudadas a organização dos componentes do espaço intertubular é classificada como padrão tipo I, segundo a literatura. Em cutias e pacas o tecido conjuntivo associado ao espaço linfático representou a maior proporção do tecido intertubular, sendo este valor de aproximadamente, 3,7 e 5,7 % do parênquima testicular respectivamente, já em capivaras o mesmo componente representou 11,2%. Em capivaras o componente de destaque do tecido intertubular foi a célula de Leydig, representando 34,8% do parênquima testicular, sendo que o mesmo componente representou apenas 2,0 e 2,6% em cutias e pacas respectivamente. Os estudos morfométricos da célula de Leydig revelaram que as proporções de núcleo e citoplasma dessa célula são respectivamente 14% e 86% em capivaras, 28% e 72% em cutias e 36,0 % e 64 % em pacas. O volume da célula de Leydig foi de 2169 μm^3 em capivaras, 1125 μm^3 em cutias e 690 μm^3 em pacas. Relacionando-se o volume individual desta célula com o volume total ocupado pelo seu conjunto nos testículos foram estimados populações totais de 7,72 bilhões de células de Leydig em capivaras, 136,9 milhões em cutias e 655,98 milhões em pacas, correspondendo a uma média de respectivamente 126,5 milhões, 16,2 milhões e 35,9 milhões de células de Leydig por grama de testículo. A porcentagem de massa corporal alocada em células de Leydig (índice Leydigossomático) foi de 0,037, 0,005 e 0,007 % respectivamente para capivaras, cutias e pacas.

Palavras-chave: espaço intertubular, célula de Leydig, índice leydigossomático, Subordem Hystricomorfa.

5.0 ORGANIZATION AND QUANTIFICATION OF INTERTUBULAR SPACE COMPONENTS IN ADULT CAPYBARAS (*Hydrochoerus hydrochaeris*), AGOUTIS (*Dasyprocta leporina*) AND PACAS (*Cuniculus paca*)

Abstract

The objective of the present paper was the quantitative study of the components of intertubular space and a description of their arrangement in the testis of adult capybaras, agoutis and pacas. The intertubular space is composed of cells and connective fibers, leucocytes, blood and lymph vessels, as well as Leydig cells, which are directly responsible for the endocrine function of the testis. In all three species studied the organization of intertubular space components is classified as type I pattern, according to the literature. In agouti and pacas the connective tissue associated to the lymphatic space represented a greater proportion of intertubular tissue, this value being approximately 3.7 and 5.7% of testicular parenchyma, respectively, differently from capybaras in which the same component represented 11.2%. In capybaras the prominent component of the intertubular tissue was the Leydig cell, representing 34.8% of the testicular parenchyma, whereas the same component represented only 2.0 and 2.6% respectively in agoutis and pacas. Morphometric studies of the Leydig cell showed that its nucleus and cytoplasm proportion are respectively 14% and 86% in capybara, 28% and 72% in agouti and 36.0% and 64% in pacas. The Leydig cell volume was 2169 μm^3 in capybaras, 1125 μm^3 in agoutis and 690 μm^3 in pacas. Relating the individual volume of the cell to the total volume occupied by it in the whole testis were estimated population totals of 7.72 billion of Leydig cells in capybaras, 136.9 millions in agoutis, and 655.98 millions in pacas. It represents an average of 126.5, 16.2 and 35.9 millions of Leydig cells per gram of testicle, respectively. The percentage of body mass allocated in Leydig cells (Leydigosomatic index) was 0.037, 0.005 and 0.007% respectively for capybaras, agoutis and pacas.

Palavras-chave: intertubular space, Leydig cell, Leydigosomatic index, Suborder Hystricomorpha.

5.1. Introdução

Capivaras, cutias e pacas são espécies de roedores da fauna silvestre brasileira, pertencentes à subordem Hystricomorpha, sendo reconhecidas como de grande potencial econômico, mas são poucos os dados referentes à sua biologia reprodutiva (ALHO, 1986; BROWN-UDDENBERG et al., 2004; MATAMOROS, 1981; MOLLINEAU et al., 2000; PASHOV & MATAMOROS, 1984; STRADIOTTI, 2006; URENA et al. 1988). Apesar dessas três espécies se encontrarem em baixo risco de extinção de acordo com o Conservation on International Trade in Endangered Species (CITES, 2012), mas, devido à continuidade do desmatamento do seu habitat natural, associado a sua caça ilegal, podem apresentar reduções significativas em suas populações em natureza (NOWAK, 1999; IUCN, 2012).

Dessa forma, a caracterização morfofuncional do testículo dessas espécies, principalmente em seus aspectos básicos, são de grande importância no estudo e entendimento de aspectos da biologia reprodutiva, além de potencial contribuição para o desenvolvimento de biotécnicas aplicadas à reprodução (AMANN & SCHANBACHER, 1983; FRANÇA, 1991). O estudo da morfologia do espaço intertubular, pode subsidiar maiores informações sobre a dinâmica circulatória dos fluidos testiculares, fundamentais tanto para manutenção de um nível fisiológico de andrógenos intratesticulares, requerido para o perfeito funcionamento do processo espermatogênico, quanto para o fornecimento de uma provisão regular de andrógenos séricos para o desenvolvimento e manutenção das características sexuais secundárias.

O testículo dos mamíferos é dividido funcionalmente em dois compartimentos básicos: o tubular, que tem a função gametogênica, e o intertubular, relacionado à função endócrina (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2008). O compartimento intertubular,

ou intertúbulo, é composto por vasos sanguíneos, vasos linfáticos, nervos, uma população variada de células que inclui fibroblastos, macrófagos e células de Leydig (RUSSELL, 1996). Estas últimas são encarregadas da androgênese e constituem o principal componente celular do compartimento intertubular (HOOKER, 1970).

Uma grande variação no percentual volumétrico e no arranjo entre os componentes do intertúbulo é observada entre as diferentes espécies de mamíferos já estudadas. Segundo Fawcett et al. (1973), estes diferentes arranjos podem ser definidos em três diferentes padrões provavelmente relacionados com a habilidade dos vasos linfáticos em promover a circulação dos fluidos testiculares. De modo geral, os roedores apresentam o padrão do tipo I descrito por Fawcett et al. (1973), onde células de Leydig e os vasos sanguíneos encontram-se separados dos túbulos seminíferos por um espaço linfático bem desenvolvido. Uma vez que uma grande variação no arranjo desses componentes é observada em roedores, Paula (1999, 2007) sugeriu uma subdivisão do proposto, onde a descontinuidade do endotélio linfático visceral, bem como a quantidade de células de Leydig determinam três novos arranjos dentro do padrão tipo I descrito por Fawcett et al. (1973).

Assim, o presente trabalho teve como objetivos caracterizar e classificar o espaço intertubular do testículo de cutias e pacas adultas frente ao descrito em capivaras, além de quantificar os diferentes constituintes do espaço intertubular e determinar a população de células de Leydig por unidade de massa testicular, relacionando seu volume com a massa corporal.

5.2. Material e Métodos

5.2.1. Origem dos animais e procedimento de hemicastração

Para a realização desse trabalho foram selecionados cinco exemplares adultos de cada uma das espécies deste estudo, sendo estes submetidos ao procedimento de hemicastração. Dos testículos obtidos foram confeccionadas lâminas histológicas. Este trabalho foi aprovado pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBio), sob o número 26.469-1 e pela Comissão de Ética para o uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (processo número 10/2012).

O procedimento em capivaras foi realizado em cinco animais capturados no “Plano de Manejo de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) de vida livre no campus universitário da Universidade Federal de Viçosa-MG”, sendo este um projeto já registrado ao Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, com número de registro 20558259287 de 04 de maio de 2010. Foram utilizadas cinco cutias machos adultos, provenientes do Criatório Comercial “Chácara Lourenço Carreta” localizado no município de Santa Teresa, Espírito Santo, Brasil, registrado perante o IBAMA sob o número 312226. Foram utilizadas cinco pacas adultas, uma proveniente do Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e quatro do criatório especializado “Fazenda Um Sonho a Mais”, localizado no município de Carangola-MG, registrado perante o IBAMA sob o número 296010.

Após um jejum de 12 horas, as pacas e cutias foram contidas fisicamente, com auxílio de puçá, para a aplicação intramuscular de cloridato de quetamina (10 mg/kg) associado ao cloridrato de xilazina (1 mg/kg), como associação anestésica. As capivaras foram sevadas em áreas de baixa presença humana dentro do campus da Universidade Federal de Viçosa para serem contidas quimicamente com uso de dardos anestésicos

propelidos por arma anestésica, sendo utilizada a mesma associação supracitada. Depois de anestesiados, os animais foram pesados e, por meio de palpação percutânea, foi verificada a integridade dos testículos.

A técnica de hemicastração foi realizada no testículo e epidídimo direitos, através de técnica convencional e após a coleta, o testículo foi isolado do epidídimo, teve a albugínea perfurada em vários pontos com uso de uma agulha 0,45 mm de diâmetro externo, para garantir melhor penetração da solução fixadora de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965), onde permaneceu imerso em temperatura ambiente durante 24 horas. Duas horas após a imersão em solução fixadora os testículos foram seccionados longitudinalmente, para melhor fixação. Posteriormente, o material foi armazenado sob refrigeração, em solução de álcool 70%, até o processamento histológico. No final do procedimento, cada animal foi medicado com agentes antiinflamatórios (Flunixin Meglunime, Banamine – Schering-Plough S/A, 1,1 mg/kg de peso) e antibióticos (enrofloxacino, 20mg/kg de peso).

5.2.2. Processamento histológico

Os testículos coletados foram pesados em balança de precisão de 0,001g e após dissecação foram pesados separadamente o mediastino e albugínea, exceto para a cutia, onde apenas a albugínea foi pesada separadamente. Uma vez que a densidade do testículo é muito próxima de 1,0 (JOHNSON et al., 1981), o peso do testículo coletado foi considerado como sendo igual ao seu volume. O volume do parênquima testicular foi calculado subtraindo-se do peso testicular o peso da albugínea e do mediastino. Para o cálculo do peso total dos testículos de cada animal, o peso do testículo contralateral foi considerado igual ao peso do testículo coletado, uma vez que nos animais já

estudados nenhuma variação significativa foi observada entre o peso do testículo direito e esquerdo (FRANÇA & RUSSELL, 1998; MASCARENHAS et al. 2006).

Foram coletados fragmentos de cada testículo para o processamento histológico. Esses foram processados segundo a técnica rotineira para inclusão em resina a base de glicol metacrilato (Historesin, Leica Instruments). Foram realizados cortes seriados de 3,0 µm de espessura em micrótomo rotativo dotado de navalhas de vidro, que posteriormente foram montados em lâmina de vidro em intervalos de 10 cortes e corados com azul de toluidina e borato de sódio 1%. Todo o processamento histológico foi realizado no Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral da UFV.

5.2.3. Proporção volumétrica dos componentes do parênquima testicular e determinação da população de células de Leydig

Para o cálculo da proporção volumétrica dos componentes do parênquima testicular foram examinados 20 campos fotomicrografados, em aumento de 200 vezes, escolhidos ao acaso por meio de varredura horizontal dos cortes histológicos. Sobrepostas às imagens foi colocada uma grátula com 500 intersecções consideradas como pontos. Foram computados os pontos coincidentes com os túbulos seminíferos, células de Leydig (núcleo e citoplasma), tecido conjuntivo e vasos sanguíneos e espaços linfáticos, totalizando 10.000 pontos computados por animal. A partir da proporção dos componentes do parênquima testicular foi possível o cálculo de seus volumes.

Para a estimativa das dimensões volumétricas da célula de Leydig foi realizada a mensuração do diâmetro de dez núcleos dessas, utilizando o programa de análise de imagens Image J® associado ao microscópio Olympus BX70 em aumento de 1000 vezes no laboratório de fotomicroscopia do Departamento de Veterinária da

Universidade Federal de Viçosa. Com o diâmetro médio do núcleo das células de Leydig foi calculado o seu volume, utilizando-se a fórmula $\frac{4}{3} \pi r^3$, onde r é o raio nuclear médio encontrado. Com o volume do núcleo obtido e sua proporção no volume total da célula de Leydig, calculou-se o volume de uma célula. Inferindo-se este valor ao volume total de células de Leydig por testículo, obteve-se o número destas células por testículo e, conseqüentemente, por grama de testículo.

Os dados obtidos foram analisados por estatística descritiva (média, desvio padrão e coeficiente de variação) empregando-se o programa Excel for Windows XP (2010).

5.3. Resultados e discussão

Segundo FAWCETT et al. (1973), a drenagem linfática, aliada à quantidade de células de Leydig e tecido conjuntivo frouxo no espaço intertubular, nas diferentes espécies de mamíferos segue, em geral, três padrões distintos: 1) espécies nas quais as células de Leydig e o tecido conjuntivo ocupam uma área muito pequena no compartimento intertubular, contrastando com extensos sinusóides ou espaços linfáticos interpostos aos túbulos seminíferos; 2) espécies que apresentam grupos de células de Leydig espalhados em abundante tecido conjuntivo frouxo edemaciado, o qual é drenado por um vaso linfático localizado central ou excentricamente no espaço intertubular; 3) espécies nas quais abundantes agrupamentos de células de Leydig ocupam praticamente todo o compartimento intertubular, apresentando pouco tecido conjuntivo e vasos linfáticos. Em roedores, Paula (1999, 2007) descreve uma subdivisão do padrão do tipo I, devido à presença de uma descontinuidade no endotélio linfático visceral e à grande quantidade descrita para as células de Leydig em capivaras. Assim ratos camundongos e hamster seriam classificados em um subgrupo, cobaios e

chinchilas em um segundo, e as capivaras seriam classificadas isoladamente em um terceiro. Cutias e pacas adultas apresentam claramente o padrão do tipo I da classificação de FAWCETT et al. (1973), compartilhando com cobaios e chinchilas a mesma subdivisão proposta por Paula (1999). Nestas espécies é possível observar uma pequena quantidade de células de Leydig que, juntamente com os vasos sanguíneos, encontram-se separadas dos túbulos seminíferos por um espaço linfático bem desenvolvido. Este espaço linfático é revestido por uma camada endotelial visceral, a qual envolve as células de Leydig e os vasos sanguíneos, e por uma camada parietal que se encontra em contato com a túnica própria dos túbulos seminíferos (Figuras 1 e 2). A capivara também apresenta o mesmo padrão de classificação proposto por FAWCETT (1973), mas, diferindo das outras duas espécies porque os agrupamentos de células de Leydig são mais expressivos em quantidade. Além disso, estes grupamentos celulares estão envoltos pela camada epitelial visceral do espaço linfático, sendo possível a visualização de mais de um grupamento de células de Leydig entre o espaços intertubulares (Figura 3).

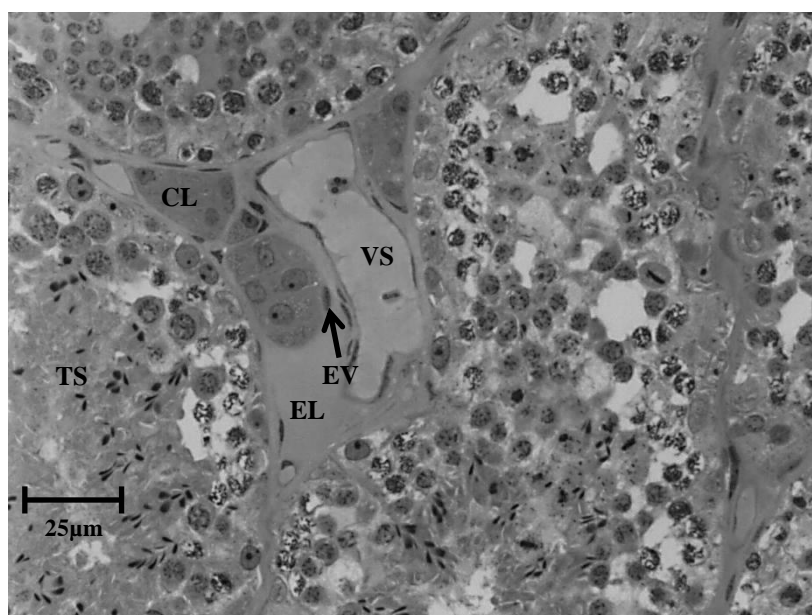


Figura 1: Componentes do parênquima testicular de cutia: túbulo seminífero (TS), células de Leydig (CL), endotélio visceral da célula de célula de Leydig (EV), espaço linfático (EL), e vaso sanguíneo (VS).

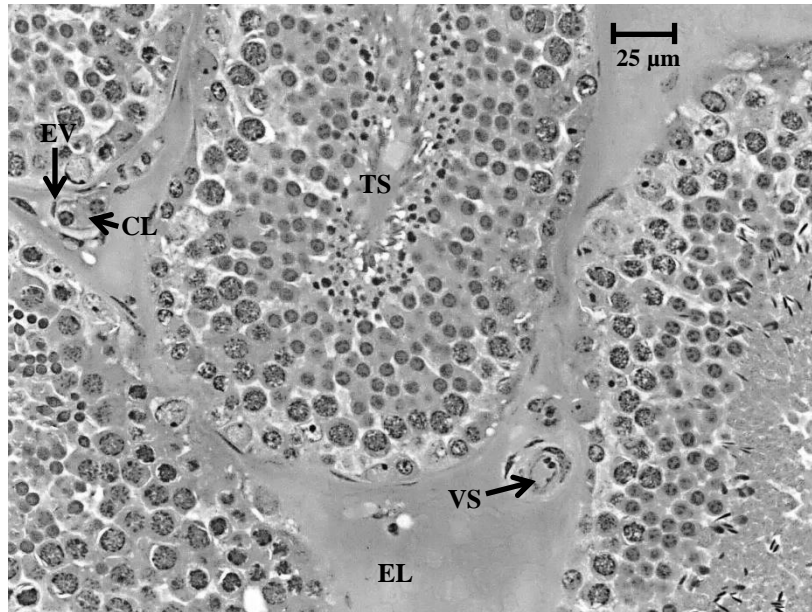


Figura 2: Componentes do parênquima testicular de paca: túbulo seminífero (TS), células de Leydig (CL), endotélio visceral da célula de célula de Leydig (EV), espaço linfático (EL), e vaso sanguíneo (VS).

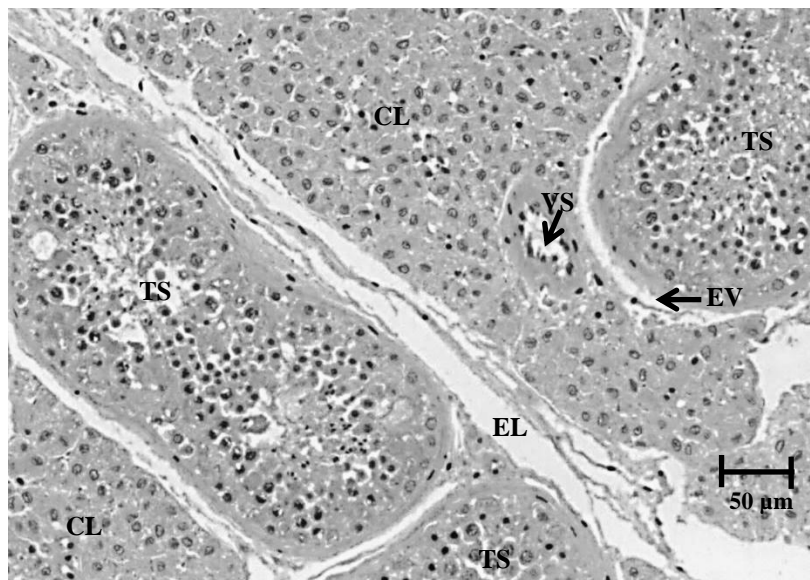


Figura 3: Componentes do parênquima testicular de capivara: túbulo seminífero (TS), células de Leydig (CL), endotélio visceral da célula de célula de Leydig (EV), espaço linfático (EL) e vaso sanguíneo (VS).

Os dados de proporção volumétrica dos diferentes componentes do espaço intertubular de capivaras, cutias e pacas adultas encontram-se registrados na Tabela 1. Através da proporção volumétrica ocupada pelo tecido conjuntivo associado ao espaço linfático de cutias e paca foi possível a observação de que estes foram os componentes mais abundantes do tecido intertubular, representando, em média, 3,62 e 5,69 % do parênquima testicular, respectivamente (Tabela 1). A capivara apresentou 11,24% do parênquima testicular alocado em tecido conjuntivo associado ao espaço linfático, valor aproximadamente três vezes maior que o de cutias e duas vezes maior que o de paca. Quanto à volumetria proporcional dos vasos sanguíneos, a capivara, cutia e paca apresentaram, respectivamente 3,9, 1,48 e 0,8 % do parênquima testicular alocado nesse componente (Tabela 1).

Na maioria dos mamíferos estudados o principal componente do compartimento intertubular é a célula de Leydig. Na cutia e paca a proporção volumétrica das células de Leydig representou respectivamente 2,0 e 2,64 % do parênquima testicular (Tabela 1). Segundo ROMANO et al. (2002) a proporção volumétrica de células de Leydig no parênquima testicular do cobaio (2,82 %), rato (2,48 %) e gerbil (2,63 %) está muito próxima ao observado para pacas adultas, enquanto que no camundongo estes valores são maiores chegando a cerca de 4 % do parênquima testicular. A capivara apresentou o maior valor proporcional de células de Leydig no parênquima testicular já registrado em mamíferos, cerca de 35%.

Tabela 1. Proporção volumétrica dos componentes do compartimento intertubular capivaras, cutias e pacas adultas (média \pm desvio padrão).

Proporção volumétrica (%)	Capivara (N=5)	Cutia (N=5)	Paca (N=5)
Núcleo de células de Leydig	5,1 \pm 1,14	0,56 \pm 0,16	0,85 \pm 0,05
Citoplasma de células de Leydig	29,8 \pm 8,41	1,44 \pm 0,32	1,77 \pm 0,1
Total de células de Leydig	34,8 \pm 11,51	2,0 \pm 0,41	2,64 \pm 0,12
Tecido conjuntivo e espaço linfático	11,2 \pm 4,24	3,62 \pm 0,65	5,69 \pm 0,38
Vasos sanguíneos	3,9 \pm 1,95	1,48 \pm 0,77	0,8 \pm 0,26
Total de intertúbulo	49,9 \pm 12,33	7,1 \pm 1,55	9,13 \pm 1,23

Dentre os inúmeros fatores que podem influenciar na variação populacional das células de Leydig entre indivíduos de espécies diferentes e mesmo entre indivíduos da mesma espécie estão: a quantidade de hormônio luteinizante (LH) disponível, o número de receptores de LH por célula, a quantidade de testosterona que a célula de Leydig é capaz de secretar por unidade de 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 (RUSSELL et al., 1994; RUSSELL, 1996). No entanto, estudos correlacionando estrutura e função das células de Leydig, em várias espécies de mamíferos, mostraram que variações na secreção de testosterona resultam mais da capacidade individual desta célula em secretar andrógeno do que de diferenças do volume total das mesmas no testículo (EWING et al., 1979). Esta capacidade está altamente associada com a quantidade de retículo endoplasmático liso presente na célula de Leydig (ZIRKIN et al., 1980).

Dados do diâmetro e o volume nuclear, bem como da relação núcleo/citoplasma encontrados para as células de Leydig em capivaras, cutias e pacas estão apresentados na Tabela 2. A partir desses valores foi possível o cálculo do volume de uma célula de Leydig, sendo estes de 2169, 1125 e 691 μm^3 , respectivamente, para capivaras, cutias e pacas (Tabela 2). Os valores encontrados para o volume celular de Leydig em pacas são próximos aos relatados para as células de Leydig do porco e do carneiro (400 μm^3 , ALMEIDA, 2002; LUSNTRA & SCHANBACHER, 1988). Em relação a outros roedores, o volume celular de Leydig da paca e da cutia está abaixo dos valores registrados para o camundongo e para o cobaio (1500 μm^3 RUSSELL, 1996) e para o rato (1500 μm^3 , RUSSELL & FRANÇA, 1995). Porém, capivaras apresentam valores superiores e quando comparados aos valores encontrados para paca e cutia, o volume médio da célula de Leydig é respectivamente três vezes e duas vezes maior.

Como é sabido, as células de Leydig são as principais responsáveis pela produção de esteróides. Estudos correlacionando a estrutura e a função das células de Leydig em várias espécies de mamíferos mostraram que variações na secreção de testosterona resultam mais da capacidade individual destas células em secretar testosterona do que de diferenças do volume total das mesmas no testículo (EWING et al., 1979). Segundo COSTA & PAULA (2006), uma correlação positiva foi observada entre o volume da célula de Leydig e o nível de testosterona circulante em capivaras.

Tabela 2. Diâmetro nuclear, volume nuclear, proporção nuclear e volume total de células de Leydig em capivaras, cutias e pacas adultas (média \pm desvio padrão).

Parâmetro	Capivara (N=5)	Cutia (N=5)	Paca (N=5)
Diâmetro nuclear (μm)	8,34 \pm 0,15	8,44 \pm 0,14	7,52 \pm 0,14
Volume nuclear (μm^3)	303,66 \pm 22,51	315,06 \pm 5,86	222,86 \pm 1,26
Proporção nuclear (% da célula)	14,0 \pm 0,88	28,0 \pm 1,23	32,36 \pm 1,86
Volume celular (μm^3)	2169,41 \pm 302,14	1125,72 \pm 4,52	690,96 \pm 63,29

O volume total das células de Leydig, em ambos os testículos da capivaras, cutia e paca adultas está apresentado na tabela 3. No intuito de se avaliar a variação individual destas células nas espécies estudadas, inferiu-se à massa corporal a proporção volumétrica de células de Leydig, obtendo-se o índice leydigossomático, que representa o percentual da massa corporal alocada em células de Leydig. Em cutias e pacas estas células representam em média 0,005 e 0,007 % do peso corporal, respectivamente, sendo estes valores muito menores que os observados em capivara (0,037 %), camundongo (0,05%, ROMANO et al., 2002), gerbi (0,05%, ROMANO et al., 2002), rato (0,018%, ROMANO et al., 2002) e cobaio (0,011%, ROMANO et al., 2002).

Os dados referentes à quantidade total de células de Leydig e número de células de Leydig por grama de testículo estão apresentados na tabela 3. O número de células de Leydig por grama de testículo observado em pacas encontra-se dentro da amplitude

descrita para a maioria dos mamíferos, entre 20 e 40 milhões (RUSSELL, 1996; FRANÇA & RUSSELL, 1998), enquanto na cutia está levemente abaixo. A capivara apresenta um número aproximadamente três vezes maior que o limite máximo dessa amplitude. A quantidade de células de Leydig parece variar bastante entre os indivíduos e entre espécies de mamíferos, não sendo esta variação encontrada para outras glândulas endócrinas (FAWCETT et al., 1973; PAULA, 1999).

Tabela 3. Peso corporal, peso de ambos os testículos, volume total de células de Leydig em ambos os testículos, número de células de Leydig em ambos os testículos, número de células de Leydig por grama de testículo e índice leydigossomático, em capivaras, cutias e pacas adultas (média \pm desvio padrão).

Parâmetro	Capivara	Cutia	Paca
Peso corporal (kg)	50,8 \pm 3,0	3,14 \pm 0,28	6,4 \pm 1,51
Peso de ambos os testículos (g)	61,2 \pm 3,48	8,44 \pm 1,93	18,22 \pm 5,61
Volume total de células de Leydig (ml)	21,29 \pm 1,0	0,15 \pm 0,04	0,44 \pm 0,13
Número de células de Leydig em ambos os testículos (10^6)	7720,88 \pm 981,87	136,88 \pm 44, 31	655,98 \pm 216,5
Número de células de Leydig por grama de testículo (10^6)	126,44 \pm 28.93	16,2 \pm 5,25	35,88 \pm 2,8
Índice Leydigossomático	0,037 \pm 0,012	0,005 \pm 0,001	0,007 \pm 0,001

5.4. Conclusões

Por meio do arranjo dos diferentes componentes intertubulares foi possível o enquadramento da cutia e paca dentro do padrão do tipo 1 descrito por Fawcett.

Quanto à proporção volumétrica de células de Leydig no parênquima testicular, a cutia e paca encontram-se próximo ao observado para a maioria dos roedores já

estudados, porém, a capivara é o mamífero com maior proporção de células de Leydig já descrito. O índice Leydigossomático (ILS) apresentado por cutias e pacas está entre os menores observados para roedores, enquanto a capivara, mesmo apresentando uma alta proporção de células de Leydig apresenta em valores próximos aos demais roedores.

O número de células de Leydig por grama de testículo da cutia encontra-se levemente abaixo da amplitude observada para a maioria dos mamíferos já estudados, enquanto a paca apresenta valor dentro dessa amplitude e a capivara valor três vezes maior que o intervalo máximo descrito para a maioria das espécies de mamíferos.

5.5. Referências bibliográficas

- ALHO, C. J. R. 1986. Criação e manejo de capivaras em pequenas propriedades rurais. Departamento de Difusão de Tecnologia, Brasília, DF- **Embrapa**, 33p.
- ALMEIDA, F.F.L. 2002. Estrutura e funções testiculares em javalis (*Sus scrofa scrofa*) sexualmente maduros. Dissertação (Mestrado em morfologia), Belo Horizonte: **Universidade Federal de Minas Gerais**, 65 pp..
- AMANN, R. P., SCHANBACHER, B. D. 1983. Physiology of male reproduction. **Journal of Animal Science Supplement**. v. 57, p. 380– 403.
- BERNDTSON, W.E. 1977. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. **Journal of Animal Science**, v.4, n.5, p.818-83.
- BROWN-UDDENBERG, R.C., GARCIA, G.W., BATISTE, Q.S., COUNAND, T., ADOGWA, A.O., SAMPSON, T., 2004. **The Agouti (*Dasyprocta leporina*, D. aguti) Booklet and Producers' Manual**, 1st ed. GWG Publications, Trinidad and Tobago. p. 535-569.
- CITES (Conservation on International Trade in Endangered Species). Disponível em: [http:// www.cites.org/eng/resources/species.html](http://www.cites.org/eng/resources/species.html). Acesso em 25 de junho de 2012.
- COSTA, D. S.; PAULA, T. A. R. 2006. Testosterone level, nasal gland volume and Leydig cell morphometry in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 1086-1091.
- EWING, L. L., ZIRKIN, B. B., COCHRAN, R. C., KROMANN, N. 1979. Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog, and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cell mass. **Endocrinology**, v. 105, p. 1135 - 1142.

- FAWCETT, D. W., NEAVES, W. B., FLORES, M. N. 1973. Comparative observations on intertubular lymphatic and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. **Biology of Reproduction**, v. 9, p. 500 - 532.
- FRANÇA, L.R. 1991. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. Belo Horizonte: UFMG, 1991, 180p. Tese (Doutorado em Morfologia). **Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.**
- FRANÇA, LR., RUSSELL, LD. 1998. The testis of domestic animals. In: Regadera, J. & Martinez-Garcia (eds.). **Male reproduction: A multidisciplinary overview.** Churchill Livingstone, Madrid, p. 197-219.
- HOOKER, C. W. 1970. The intertubular tissue of the testis In: The testis development, anatomy and physiology. **Nova York: Academic Press**, v. 1, cap. 8, p. 483 - 550.
- IUCN (International Union for Conservation of Nature). "**2006 IUCN Red List of Threatened Species**" (On-line). Disponível em: <http://www.iucnredlist.org>. Acesso em 20 de março de 2012.
- JOHNSON, L., PETTY, C.S., NEAVES, W.B. 1981. A new approach to qualification of spermatogenesis and its application to germinal cell attrition during human spermatogenesis. **Biology of Reproduction**, v. 25, p. 217-226.
- JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. 2008. Aparelho Reprodutor Masculino. In: JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. **Histologia básica.** Rio de Janeiro: Editora Guanabara, 11 ed., cap. 21, p. 323-334.
- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cellular Biology**, v.27, p.137-138, 1965.
- LUSNTRA, D.D., SCHANBACHER, B.D. 1988. Testicular function and Leydig cell ultrastructure in long-term bilateral cryptorchid rams. **Biology of Reproduction**. 38, 211-220.
- MATAMOROS, Y. 1981. Anatomía e histología del sistema reproductor del tepezcuinte (*Cuniculus paca*). **Revista de Biología Tropical**, 29(1): 155-164.

- MASCARENHAS, R.M., PAULA, T.A.R., MATTA, S.L.P., LANNA, L.L., FONSECA, C.C., NEVES, M.T.D. 2006. Morfometria macro e microscópica e índices somáticos dos componentes testiculares de cães sem raça definida, da puberdade à senilidade. **Revista CERES**, n. 53. v. 305, p. 106-112, 2006.
- MOLLINEAU, W.M., GARCIA, G.W., SAMAYAH, D., KISSOONSINGH, W., PROCOPE-GARCIA, A., 2000. The wildlife industry in Trinidad: a case study towards developing a sustainable industry model for a small twin island state (Trinidad and Tobago). Paper Presented at a Conference on Managing Space for Sustainable Living in Small Island Development States. **University of the West Indies**, St. Augustine, Department of Economics, November 2000.
- NOWAK, R. 1999. Walker's Mammals of the World, v. 2. **Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press**, 1936 p.
- PASHOV, B. MATAMOROS, Y. 1984. Description histologica del epitelio seminifero del testiculo del tepezcuinte (Cuniculus paca, Brisson, 1762) e identificacion de sus diferentes etapas. **Ciência Veterinária**, v.1, p.9-15
- PAULA, T.A.R. 1999. Avaliação Histológica e Funcional do Testículo de Capivaras Adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Belo Horizonte: **Instituto de Ciências Biológicas da UFMG**, 84p. Tese (Doutorado em Morfologia).
- PAULA, T. A. R.; MATTA, S. L. P.; SILVA JÚNIOR, V. A.; COSTA, D. S.; FONSECA, C. C.; NEVES, M. T. D. 2007. Intertubular space characterization in adult capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) testis. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 50, n. 5, p. 289-297.
- ROMANO, H. S. ; PEREIRA, T. ; FONSECA, C. C. ; PAULA, T. A. R. ; NEVES, M. T. D. ; MATTA, S. L. P. 2002. Avaliação do testículo e do processo espermatogênico em 5 diferentes espécies de roedores. In: **XI Simpósio de**

Iniciação Científica. Resumos... Viçosa, MG : Universidade Federal de Viçosa, v. 1. p. 352-353.

RUSSELL, L. D., CHANDRASHEKAR, V., BARTKE, A., SINHA-HIKIM, A. P. 1994. The hamsters Sertoli cell in early testicular regression and early recrudescence: a stereological and endocrine study. **International Journal of Andrology**, v. 17(2), p. 93-106.

RUSSELL, L.D., FRANÇA, L.R. 1995. **Building a testis.** Tissue & Cell, v. 27(2), p. 129-147.

RUSSELL, L. D. 1996. Mammalian Leydig cell structure. In: Payne, A. H., Hardy, M. P., Russell, L. D. (eds). **The Leydig cell.** Cache River Press. Vienna, IL., cap. 10, p. 218-222.

STRADIOTTI, C.P. 2006. Anatomia dos órgãos reprodutivos do macho e método de coleta de sêmen em pacas (Agouti paca). **Universidade Estadual do Norte Fluminense.** Campos dos Goytacazes. Dissertação (Mestrado em anatomia), 47p.

URENA, F., BOLANOS, R. 1988. Tipos de espermatogônios em “Tepezcuintle” (Cuniculus paca). Estudo ultrastructural. **Revista de Biologia Tropical**, v.36:325-328.

ZIRKIN, B. R., EWING, L. L., KROMANN, N., COCHRAN, R. C. 1980. Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog, and hamster testes in vitro: correlation with Leydig cells ultrastructure. **Endocrinology**, v. 107, p. 1867-1874.

6.0 CARACTERIZAÇÃO DOS ESTÁDIOS E DURAÇÃO DO CICLO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO DE CAPIVARA (*Hydrochoerus hydrochaeris*), DE CUTIA (*Dasyprocta leporina*) E DE PACA (*Cuniculus paca*) ATRAVÉS DA TÉCNICA DE IMUNOHISTOQUÍMICA COM BROMODEOXIURIDINA

Resumo

O entendimento sobre a morfofisiologia dos túbulos seminíferos é a base para a compreensão da espermatogênese normal e anormal. O objetivo do presente estudo foi caracterizar os estádios do ciclo do epitélio seminífero (CES) e sua duração na capivara, cutia e paca usando técnica de imunohistoquímica. Para estimar a duração do ciclo do CES nas espécies deste estudo foi realizada a incorporação de 5-bromodeoxiuridina ao DNA das células germinativas através da injeção intratesticular de BrdU (Sigma, St. Louis, MO, USA) em solução salina. Dias após a aplicação foi realizada a hemicastração do testículo marcado, processamento histológico e imunohistoquímico do fragmento testicular. Foram descritos oito estádios do ciclo com base no método da morfologia tubular. Foi encontrado um estágio por secção transversal de túbulo seminífero, sendo o estágio I o mais frequente na cutia e paca enquanto na capivara o estágio III teve a maior frequência. Os estádios de menor frequência foram o VI, V e VII, respectivamente para a capivara, cutia e paca. Nas três espécies deste estudo a fase pré-meiótica foi maior do que as outras. A imunomarcção mais avançada encontrada em capivaras foi no início do estágio II em espermatócitos primários em leptóteno, após 3 dias de aplicação. Em cutias observou-se a marcação no início do estágio III em espermatócitos primários em zigóteno após três dias de aplicação. Já em pacas a marcação mais avançada foi no início do estágio VI em espermatócitos primários em paquíteno, após sete dias de aplicação. Assim, a duração de um ciclo foi calculada em 10,39 dias para capivaras, 5,86 dias para cutias e 8,57 dias para pacas. Como são necessários 4,5 ciclos para que o processo espermatogênico se complete, cerca de 46,75, 26,37 e 38,56 dias são necessários para produção de espermatozoides a partir de uma espermatogônia respectivamente em capivaras, cutias e pacas.

Palavras-chaves: BrdU, espermatogênese, testículo, roedores silvestres, subordem Hytricomorfa.

6.0 CHARACTERIZATION OF THE STAGES AND DURATION OF SEMINIFEROUS EPITHELIUM CYCLE FROM CAPYBARA (*Hydrochoerus hydrochaeris*), AGOUTI (*Dasyprocta leporina*) AND PACA (*Cuniculus paca*) THROUGH IMMUNOHISTOCHEMICAL TECHNIQUE WITH BROMODEOXYURIDINE

Abstract

The understanding of the seminiferous tubules morphophysiology is the basis to understand normal and abnormal spermatogenesis. The aim of this study was to characterize the stages of the seminiferous epithelium cycle (SEC) and its duration in capybaras, agouti and paca using immunohistochemical technique. For estimating the duration of the SEC on the species of this study was performed a 5-bromodeoxyuridine incorporation of the DNA of germ cells through intratesticular injection of BrdU (Sigma, St. Louis, MO, USA) in saline. An unilateral orchiectomy of the marked testicle was performed days after the application as well as an histological processing and an immunohistochemical study of testis fragments. Have been described eight stages of the cycle based on the method of the tubular morphology. Was found one stadium *per* cross-section of seminiferous tubule, being stage I the most frequent in the agouti and paca while in capybara stage III had the highest frequency. The less frequent stadiums were VI, V and VII, respectively for the capybara, agouti and paca. In all species of this study the pre-meiotic was higher than the others. The most advanced immunostaining was found in capybaras early stage II into primary spermatocytes at leptotene after three days of application. In agouti was observed the marking at the beginning of stage III in primary spermatocytes at zygotene after three days of application. At pacas the most advanced marking was at the beginning of stage VI in primary spermatocytes at pachytene, after seven days of application. Thus, the duration of a cycle was calculated for 10.39 days capybara, 5.86 days for agouti and 8.57 days for pacas. If 4.5 cycles are necessary for the spermatogenic process been completed, about 46.75, 26.37 and 38.56 days are needed for sperm production from a spermatogonium respectively at capybaras, agoutis and pacas.

Key-words: BrdU, spermatogenesis, testis, wild rodents, suborder Hystricomorpha.

6.1. Introdução

Dentre os animais da ordem Rodentia, subordem Hystricomorpha encontram-se espécies de roedores de grande porte, como capivaras, cutias e pacas, sendo estas três pertencentes à lista da fauna silvestre brasileira (MCKENNA & BELL, 1997). Outro ponto em comum destas espécies é o fato delas serem reconhecidas como de grande potencial econômico, porém apresentando poucos dados referentes à sua biologia reprodutiva (ALHO, 1986; BROWN-UDDENBERG et al., 2004; MATAMOROS, 1981; MOLLINEAU et al., 2000; PASHOV & MATAMOROS, 1984; STRADIOTTI, 2006; URENA et al. 1988). Atualmente essas três espécies se encontram em baixo risco de extinção de acordo com o Conservation on International Trade in Endangered Species (CITES, 2012) devido à continuidade da depreciação de seu habitat natural associado a sua caça ilegal, podem vir a apresentar baixas significativas em suas populações em natureza (NOWAK, 1999; IUCN, 2012).

O estudo da biologia reprodutiva de uma espécie, em especial o processo espermatogênico, fornece informações que subsidiam o manejo e protocolos em reprodução assistida auxiliando tanto a conservação da espécie quanto a exploração comercial desta (COMIZZOLI, 2000).

O principal componente do parênquima testicular é o túbulo seminífero, que apresenta um epitélio seminífero composto por quatro a cinco camadas de gerações distintas de células germinativas em fases progressivas de desenvolvimento da base para o lume do túbulo. Desta forma, o processo espermatogênico é um evento cíclico, sendo que cada ciclo do epitélio seminífero (CES) é definido como o conjunto de eventos observados ao longo da espessura deste epitélio, entre a formação de uma nova geração de células germinativas em sua base e a espermiacção da geração mais avançada no lume

tubular. São necessários entre quatro e cinco ciclos para que todo o processo espermatogênico se complete, ou seja, a cada CES as gerações progridem em direção ao lume tubular e o processo espermatogênico total compreende o tempo decorrido entre a formação de uma geração de células germinativas, na base do epitélio, até a sua liberação no lume tubular como espermatozoides (LEBLOND & CLERMONT, 1952). Em mamíferos, o CES é considerado uma constante biológica, com variações apenas interespecíficas, estando sob controle do genótipo da célula germinativa, não sendo influenciada por qualquer fator conhecido (CLERMONT, 1972; AMANN & SCHANBACHER, 1983).

Dentre os sistemas utilizados para se estudar os estádios do CES, o mais empregado é o método da morfologia tubular. Esse método se baseia no arranjo observado entre as diferentes gerações de células germinativas, em especial na forma e na localização dos núcleos das espermátides e na presença de figuras de divisões meióticas, o que permite a obtenção de oito estádios do ciclo em todas as espécies estudadas, de forma padronizada (ROOSEN-RUNGE & GIESEL, 1950; COUROT et al., 1970; BERNDTSON, 1977; ORTAVANT et al., 1977; GUERRA, 1983; PAULA, 1999; GUIÃO-LEITE, 2002; BITTENCOURT et al., 2007; PEIXOTO, 2010; BALARINI, 2011).

A 5-bromodeoxiuridina (BrdU) é uma pirimidina análoga da timidina que é seletivamente incorporada ao DNA celular durante a fase S do ciclo celular. Por meio de técnica imunohistoquímica com o uso de anticorpos anti-BrdU é possível a identificação das células que incorporaram este precursor *in vivo* (FAGERHOLM et al., 1994). Por ser uma técnica não radioativa, a incorporação do BrdU é uma alternativa ao método da timidina triciada para estudos morfofuncionais, já que é uma técnica com abordagem adequada, precisa e rápida para determinar o CES (ROSIEPEN et al., 1997).

Com base no exposto, os objetivos deste trabalho foram caracterizar cada estágio do CES por meio do método da morfologia tubular e determinar a duração do CES, utilizando-se de técnica de imunohistoquímica, em capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*), cutias (*Dasyprocta leporina*) e pacas (*Cuniculus paca*), utilizando o marcador celular 5-bromodeoxiuridina.

6.2. Material e Métodos

6.2.1. Animais utilizados e injeção do BrdU

Foram utilizados cinco exemplares machos adultos de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*), cinco machos adultos de cutia (*Dasyprocta leporina*) e cinco machos adultos de paca (*Cuniculus paca*), sendo que cada espécie diferiu quanto a sua origem e protocolo de aplicação do imunomarcador. As capivaras foram selecionadas dentre os animais capturados no “Plano de Manejo de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) de vida livre no campus universitário da Universidade Federal de Viçosa-MG”, sendo este um projeto já registrado ao Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, com número de registro 20558259287 de 04 de maio de 2010. As cutias foram oriundas do Criatório Comercial “Chácara Lourenço Carreta” localizado no município de Santa Teresa, Espírito Santo, Brasil, registrado perante o IBAMA sob o número 312226. Uma das pacas foi proveniente do Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e quatro do criatório especializado “Fazenda Um Sonho a Mais”, localizado no município de Carangola-MG, registrado perante o IBAMA sob o número 296010.

Este estudo foi aprovado pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), sob o número 26.469-1 e pela Comissão de Ética para o uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (processo número 10/2012).

Após um jejum de 12 horas, as pacas e cutias foram contidas fisicamente, com auxílio de puçá, para a aplicação intramuscular de cloridato de quetamina (40 mg/kg) associado ao cloridrato de xilazina (1 mg/kg), como associação anestésica. As capivaras foram sevadas em áreas de baixa presença humana dentro do campus da Universidade Federal de Viçosa para serem contidas quimicamente com uso de dardos anestésicos propelidos por arma anestésica, sendo utilizada a mesma associação supracitada. Depois de anestesiados, os animais foram pesados e, por meio de palpação percutânea, foi verificada a integridade dos testículos.

Em cutias e paca foi aplicado 0,1ml de 5-bromodeoxiuridina (BrdU - Laboratórios Zymed, Carlsbad, CA, EUA), na extremidade caudata do testículo direito. Já em capivaras o volume do produto aplicado foi de 0,4 ml. Foram utilizados tempos para permanência do imunomarcador de acordo com a logística associada a cada espécie estudada, sendo que em capivaras utilizou-se período de 3 dias; em cutias períodos de 1 hora, 1 dia e 3 dias; e em pacas 1 hora, 1 dia, 3 dias e 7 dias.

A técnica de orquiectomia foi realizada de forma rotineira, sendo feita a sutura da região utilizando-se fio sintético absorvível. Todos os animais foram medicados com agentes anti-inflamatórios (Flunixin Meglumine, 1,1mg/kg IM) e antibioticoterapia profilática (Penicilina Benzatina, 20.000 UI/kg) em dose única.

6.2.2. Processamento histológico

Após a coleta, os testículos foram imersos imediatamente em solução fixadora Karnovsky (KARNOVSKY, 1965), sendo a albugínea testicular perfurada em vários pontos para melhor penetração do fixador. Após 2 horas em imersão os testículos foram seccionados longitudinalmente e mantidos por mais 22 horas no mesmo fixador. Após este período, foram mantidos em álcool 70% até o momento do processamento

histológico. Um fragmento testicular de aproximadamente 10x4x4 mm da extremidade caudata foi encaminhado para o processamento histológico para inclusão em parafina e realização de técnica imunohistoquímica. Outro fragmento 4x4x4 mm foi encaminhado para processamento em resina glicolmetacrilato (Historesin® - Leica Microsystems, Nussloch, Heidelberg Germany), para análises morfológicas.

Para inclusão em parafina o fragmento foi submetido à desidratação em série crescente de etanol (70, 80, 90% e absoluto) em banhos de trinta minutos cada e à diafanização em três passagens consecutivas de meia hora em xilol, até inclusão em parafina. O bloco contendo o fragmento testicular foi seccionado em micrótomo rotativo (Reichert-Jung), com navalha de aço, obtendo-se cortes semi-sequenciais de 4µm de espessura. Os cortes histológicos obtidos foram colocados em lâminas eletricamente carregadas (ImmunoSlide®- EasyPath), garantindo uma melhor adesão dos mesmos. As lâminas foram submetidas à detecção por anticorpo monoclonal e reveladas pelo sistema de coloração streptavidin-biotin, através do kit de coloração BrdU (Zymed®- Invitrogen, Camarillo, CA, EUA). Para tal, o material foi inicialmente desparafinado e reidratado, lavado em tampão fosfato (PBS) e a atividade peroxidase bloqueada endogenamente com H₂O₂. O material após novo banho com PBS foi submetido à desnaturação do DNA, sendo novamente lavado em PBS para o pré tratamento enzimático, que foi realizado com incubação em solução de tripsina. Após novo banho com PBS, foi realizado o procedimento de bloqueio de reações cruzadas com soro de cabra a 5%, seguido pela incubação com anticorpo monoclonal biotilado anti BrdU de camundongo e revelação com reação streptavidina peroxidase.

O fragmento a ser incluído em resina foi submetido à desidratação em concentrações crescentes de etanol (80, 90 e 100%) permanecendo trinta minutos em cada meio, com posterior infiltração na resina em dois banhos distintos e incluídos, na

mesma resina, com a adição de catalisador. Os fragmentos incluídos foram então seccionados com navalha de vidro em micrótomo rotativo (Leica RM2155 - Leica Microsystems, Nussloch, Heidelberg, Germany), obtendo-se cortes semi-sequenciais de 3µm de espessura. Posteriormente foi realizada coloração dos cortes cortes histológicos com azul de toluidina/borato de sódio 1%, sendo então montadas com lamínulas e Entellan ®.

6.2.3. Estádios do ciclo do epitélio seminífero, suas frequências relativas e duração do CES

Os estádios do CES foram caracterizados com base no método da morfologia tubular (BERNDTSON, 1977). A estimativa da frequência relativa dos oito estádios do CES foi calculada com base nas suas quantificações em 150 secções transversais de túbulos seminíferos em cada animal, em microscópio de luz, com aumento de 200 X. As secções contabilizadas foram aquelas com formato o mais circular possível e selecionadas de forma aleatória. Devido à presença do sequenciamento fisiologicamente observado dos estádios do CES ao longo do mesmo túbulo seminífero (onda espermatogênica) (PEREY et al., 1961), um espaçamento mínimo de cinco túbulos foi estabelecido entre as secções contadas. Ainda com o intuito de promover maior aleatoriedade, a busca de secções transversais circulares foi realizada com a imagem desfocada permitindo a visualização do contorno tubular, mas evitando a classificação prévia do estágio durante o deslocamento do campo.

Para registro e ilustração foram obtidas imagens digitais capturadas em fotomicroscópio de luz (Olympus CX31), equipado com câmera digital Olympus SC20.

A duração do CES foi calculada através da observação da célula imunomarcada, na geração mais avançada no epitélio seminífero, após a hemicastração do testículo

previamente submetido à aplicação do BrdU, ou seja, desde a incorporação do BrdU até a coleta do material. Para tal, foi computada a proporção dos estádios percorridos durante este período e assim calculado a duração de um CES, bem como do processo espermatogênico total.

6.3. Resultados e Discussão

6.3.1. Estádios do ciclo do epitélio seminífero e frequência relativa dos estádios

A espermatogênese é um evento dinâmico, sincrônico e bem organizado que ocorre ciclicamente no epitélio do túbulo seminífero. Uma geração de célula germinativa sofre, a partir de uma célula tronco diploide, a espermatogônia, sucessivas divisões e diferenciações até ser liberada como célula haploide, o espermatozoide, no lume do túbulo seminífero (RUSSELL et al., 1990). No epitélio seminífero das espécies deste estudo foi possível a observação de todas as etapas de desenvolvimento espermatogênico dentro do padrão observado nos demais mamíferos já estudados. As avaliações do processo espermatogênico são, geralmente, realizadas em secções transversais do túbulo seminífero, onde é possível a visualização de quatro a cinco camadas concêntricas de células germinativas. Cada camada é composta por uma geração celular em uma fase distinta de desenvolvimento, ou seja, a partir da base do epitélio seminífero é possível a diferenciação de gerações em etapas progressivas de desenvolvimento, ao longo do epitélio seminífero em direção ao lume tubular.

As células de uma mesma geração apresentam-se interligadas por pontes citoplasmáticas (De ROOJI, 1998), o que confere um acurado desenvolvimento sincrônico em cada camada epitelial. Devido à ação da célula de Sertoli, que compõe o epitélio como célula somática reguladora, uma sincronia extrema também é observada entre as diferentes gerações. Assim, em corte transversal, o túbulo seminífero apresenta

um de oito padrões de associação sequenciais, denominados estádios do CES (BERNDTSON, 1977), comumente identificáveis em todas as espécies de mamíferos já estudadas (FRANÇA & RUSSELL, 1998).

Foi encontrado um estágio por secção transversal do túbulo seminífero nas espécies estudadas, o que corrobora os dados existentes na literatura para as outras espécies de roedores (PAULA, 1999; COSTA et al., 2010). Dessa forma, capivaras, cutias e pacas apresentam o túbulo seminífero com arranjo do CES de forma segmentar conforme a maioria dos mamíferos (LEBLOND & CLERMONT, 1952; PAULA, 1999; NEVES et al., 2002; BITTENCOURT et al., 2007; VASCONCELOS, 2011).

Os oito estádios encontrados nas espécies estudadas estão descritos a seguir e identificados nas figuras 1, 2 e 3.

Estádio I: assim como nos demais estádios é possível a observação de núcleos de células de Sertoli, com nucléolo bem desenvolvido e cromatina frouxa, posicionado próximo à membrana basal, juntamente com espermatogônias do tipo A. No estágio I é possível a observação, ainda neste compartimento basal, de espermatócitos primários em transição de preleptóteno para leptóteno. Espermatócitos primários em paquíteno ocupam posição intermediária no epitélio e espermátides, caracterizadas pelos núcleos arredondados e escuros, formam de três a quatro camadas próximas ao lume do epitélio seminífero (Fig.1, 2 e 3, Estádio I).

Estádio II: Além dos núcleos das células de Sertoli e espermatogônias do tipo A, próximo à membrana basal, é ainda possível a observação, neste estágio, de espermatócitos primários em leptóteno. Na região intermediária do epitélio observam-se espermatócitos primários em paquíteno. O evento mais marcante no estágio II é o início do processo de alongamento do núcleo das espermátides, anteriormente arredondados (Fig. 1, 2 e 3, Estádio II).

Estádio III: As duas gerações de espermatócitos primários no estágio III avançaram para as etapas de zigóteno, mais próximo à posição basal, e para diplóteno na região intermediária do epitélio. Observou-se na camada mais próxima ao lume tubular, feixes de espermátides cujos núcleos apresentam-se mais alongados e com maior condensação da cromatina quando comparados ao estágio II (Fig. 1, 2 e 3, Estádio III).

Estádio IV: a geração de espermatócitos primários próxima à membrana basal apresentou-se em transição de zigóteno para paquíteno, enquanto os espermatócitos, anteriormente em diplóteno, sofrem divisões meióticas para a produção de espermátides arredondadas. Neste sentido é possível a observação de placas metafásicas bem como a presença de espermatócitos secundários, sendo estes os aspectos mais característicos deste estágio. Feixes de espermátides alongadas com grande condensação cromossômica são observados próximos ao lume tubular (Fig. 1, 2 e 3, Estádio IV).

Estádio V: Um claro aumento no número de espermatogônias foi observado na camada próxima à membrana basal. Assim, os espermatócitos primários em paquíteno foram observados na região intermediária do epitélio. Duas gerações de espermátides são observadas neste estágio: as recém-formadas espermátides arredondadas, e feixes bem definidos de espermátides alongadas (Fig. 1, 2 e 3, Estádio V).

Estádio VI: Espermatogônias intermediárias já podem ser observadas na base do túbulo, sendo que os demais tipos celulares observados no estágio anterior estão presentes e em posicionamento similar. O aspecto diferencial desse estágio é que as espermátides alongadas iniciam uma dispersão na camada mais próxima ao lume tubular (Fig. 1, 2 e 3, Estádio VI).

Estádio VII: espermatogônias dos tipos intermediária e B são observadas na base do epitélio, e núcleos de espermatócitos primários em paquíteno ocupam a região

intermediária do epitélio. As espermatídes alongadas apresentam-se dissociadas e localizadas próximo ao lume tubular, sendo possível a visualização de corpos residuais (Fig.1, 2 e 3, Estádio VII).

Estádio VIII: células de Sertoli, espermatogônias do tipo B e alguns espermatócitos primários em pré-leptóteno são observados próximos à lâmina basal. Espermatócitos em paquíteno e espermatídes arredondadas ocupam a região intermediária do epitélio. O aspecto mais característico deste estágio é a localização das espermatídes alongadas bem próximas do lume tubular, com flagelos bem evidentes e prontas para a espermição. Corpos residuais são evidenciados próximos à borda luminal do epitélio seminífero (Fig.1, 2 e 3, Estádio VIII).

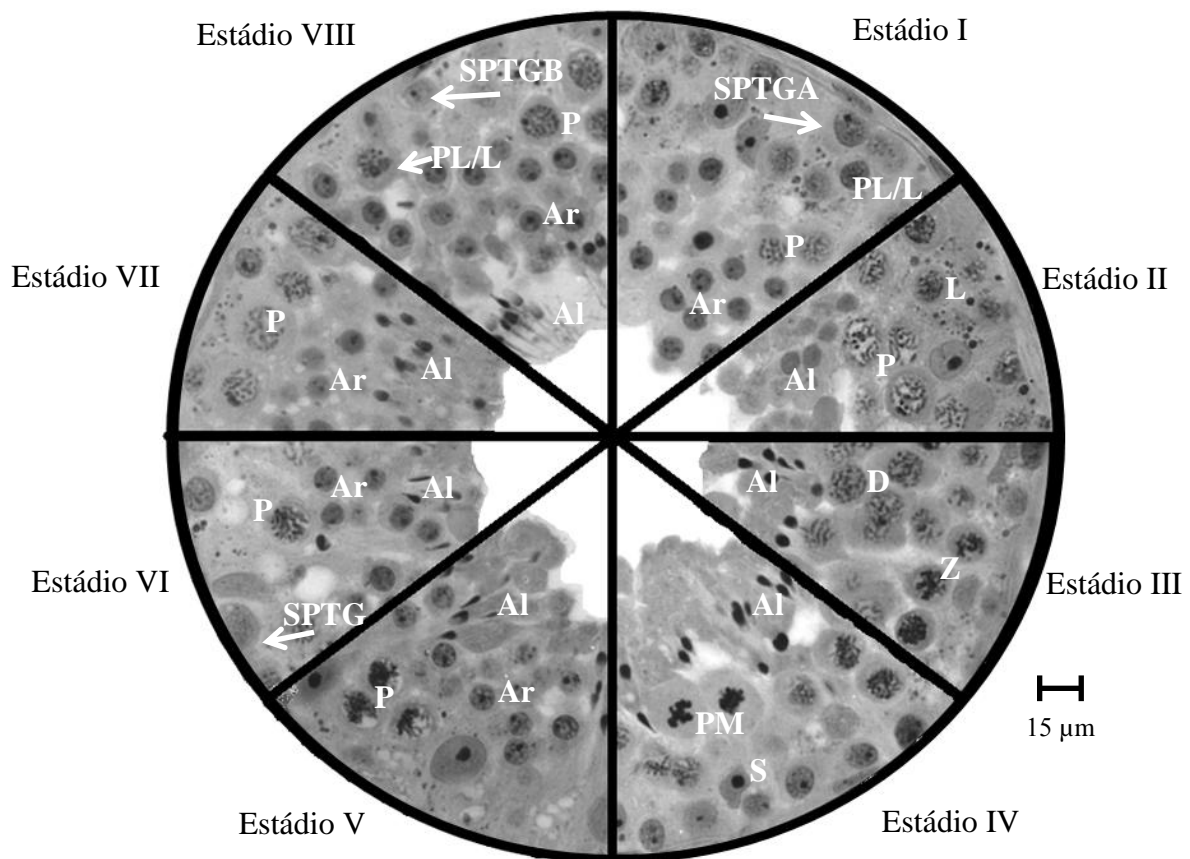


Figura 1- Montagem fotográfica contendo os oito estádios do ciclo do epitélio seminífero de capivara (*Hydrochoerus hydrocaeris*). Espermatogônia (SPTG); espermatogônia do tipo A (SPTGA); espermatogônia do tipo B (SPTGB); célula de Sertoli (S); espermatócito em transição preleptóteno/leptóteno (PL/L); leptóteno (L); zigóteno (Z); paquíteno (P); diplóteno (D); placa metafásica (PM); espermátide arredondada (Ar); espermátide em alongamento/alongada (Al).

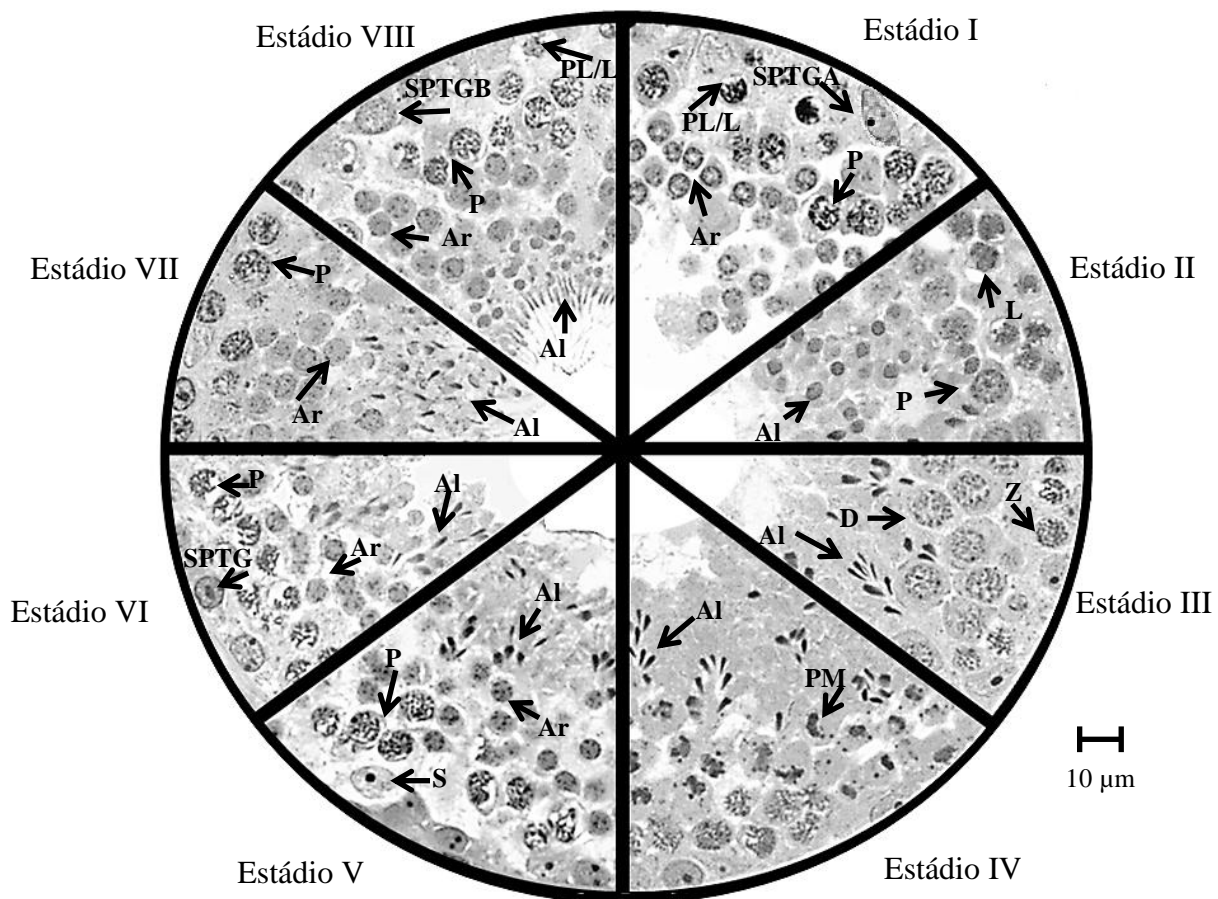


Figura 2- Montagem fotográfica contendo os oito estádios do ciclo do epitélio seminífero de cutia (*Dasyprocta leporina*). Espermatogônia (SPTG); espermatogônia do tipo A (SPTGA); espermatogônia do tipo B (SPTGB); célula de Sertoli (S); espermatócito em transição preleptóteno/leptóteno (PL/L); leptóteno (L); zigóteno (Z); paquíteno (P); diplóteno (D); placa metafásica (PM); espermátide arredondada (Ar); espermátide em alongamento/alongada (Al).

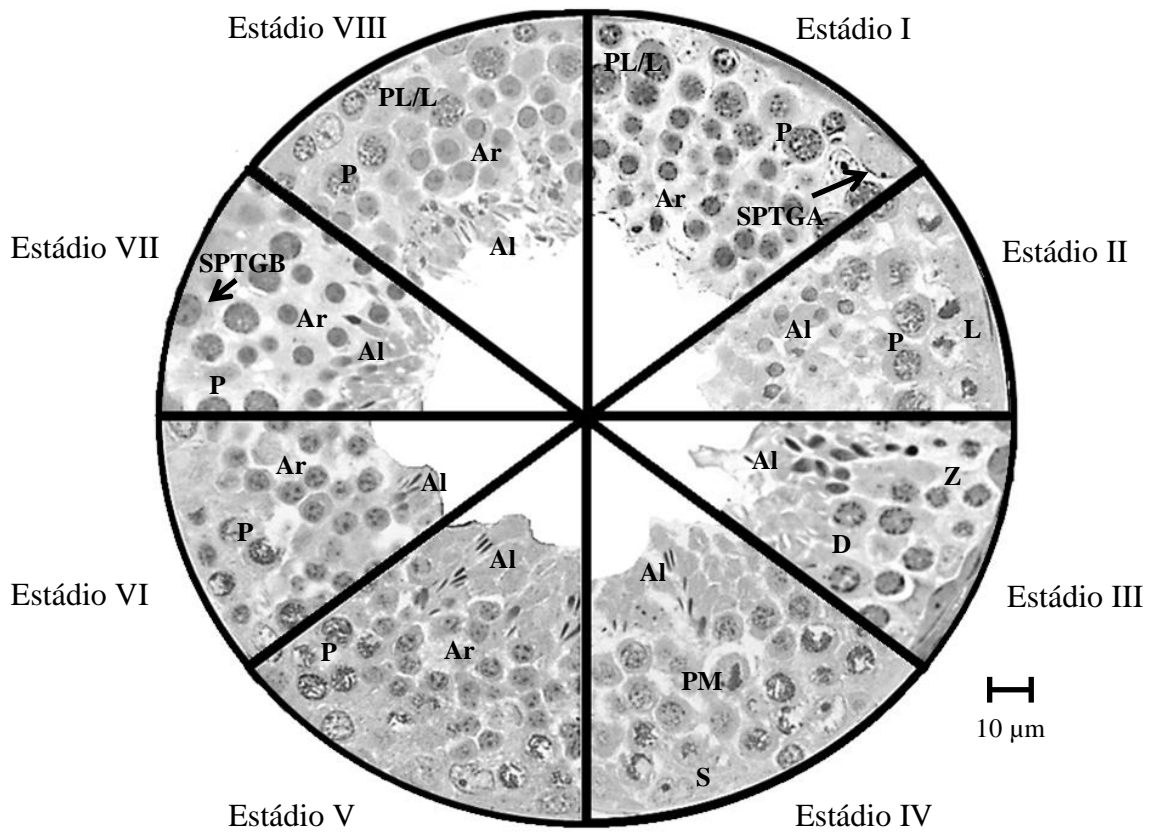


Figura 3- Montagem fotográfica contendo os oito estádios do ciclo do epitélio seminífero de paca (*Cuniculus paca*). Espermatogônia do tipo A (SPTGA); espermatogônia do tipo B (SPTGB); célula de Sertoli (S); espermatócito em transição preleptóteno/leptóteno (PL/L); leptóteno (L); zigóteno (Z); paquíteno (P); diplóteno (D); placa metafásica (PM); espermatíde arredondada (Ar); espermatíde em alongamento/alongada (Al).

Em um mesmo ponto no túbulo seminífero os eventos cíclicos observados no epitélio referem-se à progressão das gerações no sentido da sua espessura. Assim, cada geração, ao avançar uma camada, percorre os oito estádios de um ciclo. São necessários ao menos 4,5 ciclos para que as células da camada mais basal atinja a borda luminal e sejam espermiadas (LEBLOND & CLERMONT, 1952; PAULA, 1999). A frequência relativa da ocorrência de cada estágio do CES corresponde ao percentual de sua duração ao longo do desenvolvimento espermatogênico. Assim, o cálculo da frequência relativa dos estádios é um procedimento fundamental para estimativa da duração do CES, uma vez que a incorporação e o progresso do marcador celular utilizado pode ser rastreado e mensurado a partir do tempo de permanência no animal.

A frequência relativa de cada estágio do CES das espécies estudadas é apresentada na tabela 1. O estágio I foi o mais frequente na cutia e paca, enquanto na capivara o estágio III teve a maior frequência. Os estádios de menor frequência foram os estádios VI, V e VII, respectivamente, para a capivara, cutia e paca. As frequências dos estádios podem ser agrupadas em três diferentes fases: período pré-meiótico (estádios I a III), meiótico (estádio IV) e pós-meiótico (estádio V ao VIII), sendo um parâmetro com pouco significado funcional, mas relatado como correlacionado filogeneticamente (GUERRA, 1983). Nos animais do presente estudo a fase pré-meiótica foi maior do que as outras, principalmente ao se analisar a cutia e paca. Na capivara a diferença entre as fases pré-meiótica e pós-meiótica é mais sutil, estando quase em equivalência. Esta variação é reflexo da maior frequência relativa observada no estágio I da cutia e paca, no presente experimento.

Tabela 1- Frequência relativa e duração de cada estágio e das fases do ciclo do epitélio seminífero de capivara, paca e cutia.

Estádios	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Frequência (%)								
Capivara	14,0	15,1	15,7	14,6	8,7	7,0	9,4	15,5
Cutia	30,8	11,6	11,47	9,1	7,2	7,73	7,6	14,5
Paca	27,2	11,0	11,4	11,6	10,6	10,2	7,4	10,6

Estádios	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Duração (dias)								
Capivara	1,45	1,57	1,63	1,52	0,9	0,73	0,98	1,61
Cutia	1,8	0,68	0,67	0,54	0,42	0,45	0,45	0,85
Paca	2,34	0,95	0,98	1,0	0,9	0,87	0,63	0,9

Fases	Pré-meiótica	Meiótica	Pós-meiótica
Frequência (%)			
Capivara	44,8	14,6	40,6
Cutia	53,8	9,1	37,1
Paca	49,6	11,6	38,8

6.3.2. Duração do ciclo do epitélio seminífero

A 5-bromodeoxiuridina aplicada no testículo do animal é incorporada pelo núcleo das células que estão sintetizando DNA no momento da injeção, especificamente as espermatogônias durante as diferentes mitoses ao longo do ciclo, e os espermatócitos primários durante a prófase meiótica (preleptóteno/leptóteno) no estágio I do CES. Assim, ao coletar os fragmentos testiculares em um período de tempo conhecido após a injeção de BrdU, é possível acompanhar a progressão, a partir do espermatócito

primário no estágio I, identificar as células imunomarcadas mais avançadas e a partir do percentual do ciclo percorrido calcular a sua duração total (PEIXOTO, 2010).

Nas análises realizadas em pacas e cutias após, 1 hora e 1 dia de aplicação da BrdU, foi encontrada imunomarcagem apenas em espermátocitos primários em preleptóteno/leptóteno no estágio I do CES (Fig. 1 e 2). Após 3 dias de aplicação, as células mais avançadas no CES a apresentarem imunomarcagem para capivaras e pacas foram os espermátocitos primários em leptóteno em secções do estágio II (Fig. 3). Após o mesmo período, em cutias, as marcações mais avançadas foram espermátocitos primários em zigóteno em secções no estágio III, porém algumas secções transversais em estágio III em fase mais avançada apresentavam zigótenos sem imunomarcagem (Fig. 1). Desta forma foi estimado que aproximadamente 75% do estágio III foi percorrido no período avaliado. Após sete dias de aplicação em pacas a imunomarcagem mais avançada foi em espermátocitos primários em paquíteno no estágio VI (Fig. 3).

De acordo com as progressões máximas observadas, após a aplicação da BrdU observou-se que 3 dias correspondem a cerca de 29,1% e 51% de um ciclo em capivaras e cutias, respectivamente, e sete dias correspondem a 82% de um CES em pacas. Assim, a duração de um CES em capivaras, cutias e pacas é de respectivamente 10,39, 5,86 e 8,57 dias (Fig. 4). Estimando-se 4,5 CES para que todo o processo espermatogênico se complete (BERNDTSON, 1977), são necessários então 46,75, 26,37 e 38,56 dias para o desenvolvimento de espermatozoides a partir de uma espermatogônia tronco, respectivamente, em capivaras, cutias e pacas.

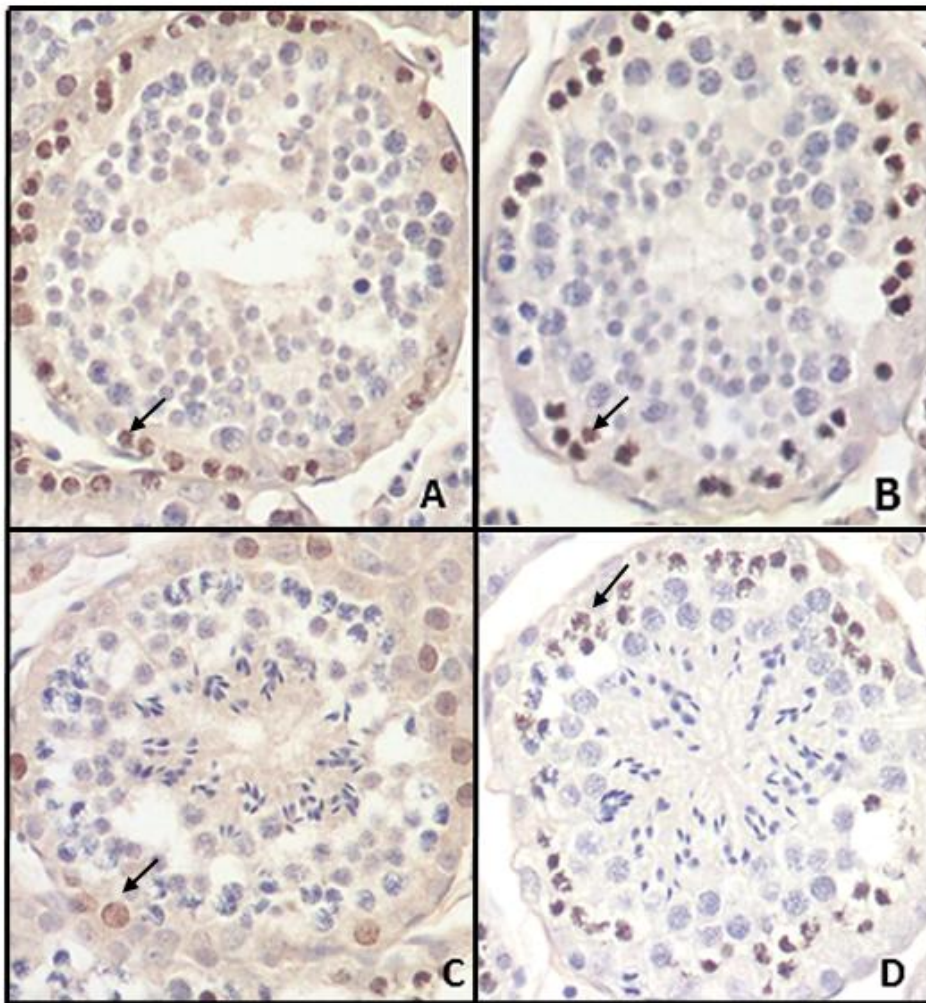


Figura 1. Estádio I do CES de cutia (*Dasyprocta leporina*), demonstrando imunomarcção (seta) em espermatócitos primários em transição preleptóteno/leptóteno após 1 hora e um dia de aplicação do BrdU (A e B respectivamente). Estádio III do CES de cutia apresentando imunomarcção (seta) em espermatogônias (C) e em zigótenos (D).



Figura 2. Estádio VI do CES de paca (*Cuniculus paca*), demonstrando imunomarcção (seta) em espermatócitos primários em paquíteno após 7 dias de aplicação do BrdU.

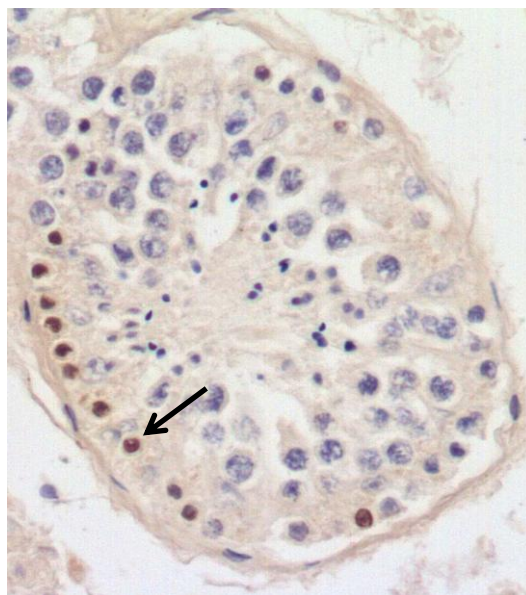


Figura 3. Estádio II do CES de Capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*), demonstrando imunomarcção (seta) em espermatócitos primários em leptóteno após 3 dias de aplicação do BrdU.

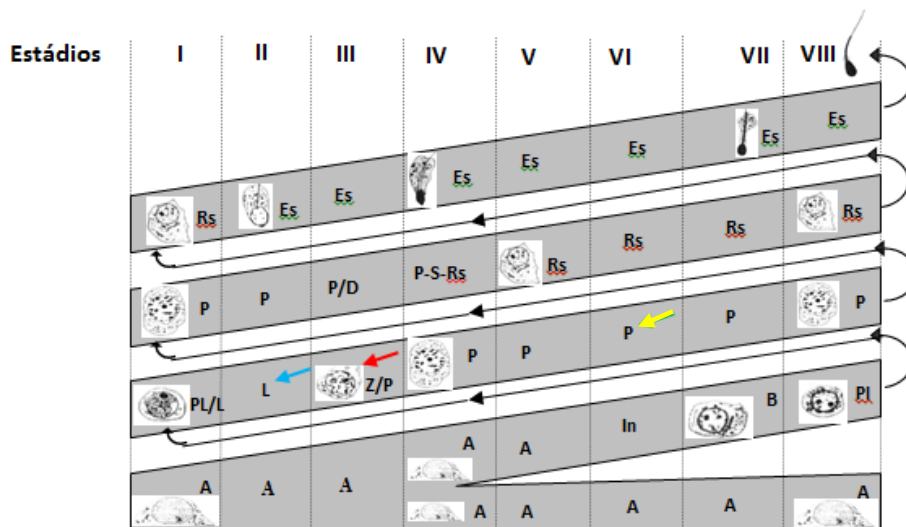


Figura 4- Diagrama do processo espermatogênico, onde os números romanos (colunas) indicam os 8 estádios do ciclo do epitélio seminífero. A célula germinativa imunomarcada mais avançada, após três dias da injeção de BrdU em capivaras foi o espermatócito primário em leptóteno no estágio II (seta azul). Em cutias foi o espermatócito primário em zigóteno no início do estágio III após 3 dias de aplicação (seta vermelha). Em pacas, após sete dias, a marcação mais avançada foi espermatócito primário em paquíteno no estágio VI (seta amarela). Espermatogônia do tipo A (A); espermatogônia intermediária (In); espermatogônia do tipo B (B); espermátocito primário: em pré-leptóteno/leptóteno (PL/L); em leptóteno (L); em zigóteno (Z); em paquíteno (P); em diplóteno (D); espermátocito secundário (ES); espermátide arredondada (Ar) e espermátide alongada (AI).

Em pesquisa realizada para estimar a duração do ciclo do epitélio seminífero em da cutia e paca, porém com técnica baseada no uso de timidina triciada, Costa et al. (2010) registraram a duração do CES de 9,5 dias na cutia e 11,5 dias na paca, resultados estes, respectivamente, 38% e 25,5% maiores que o obtido no presente estudo. Da mesma forma, Paula (1999) estimou a duração do ciclo do epitélio seminífero de capivaras a partir de técnica baseada em timidina triciada, obtendo o resultado de 11,9 dias de duração, resultado este 14,5% maior que o observado no presente estudo.

A metodologia a partir do uso de timidina triciada apresenta o mesmo princípio de incorporação no momento da síntese de DNA, daquele observado com o uso de BrdU.

Neste sentido, em ambas as metodologias, com a computação do período de progressão do marcador e a frequência relativa dos estádios percorridos, é possível o cálculo da duração do CES (PAULA, 1999; COSTA et al., 2010).

Não houve diferenças significativas entre as frequências relativas obtidas para as capivaras e pacas deste estudo com aquelas relatadas por Paula (1999) e Costa et al. (2010). Por outro lado, a frequência relativa do estádio I do CES encontrada para cutias neste trabalho foi de 30,8%, sendo 38% maior que os 18,9% observados por Costa et al. (2010), para a mesma frequência, no mesmo animal.

Uma vez que a progressão registrada com o uso de BrdU na cutia, em três dias, foi claramente observada ao longo do estádio III do CES, ao se utilizar a frequência relativa descrita por Costa et al. (2010) para esta progressão, a duração do CES seria de aproximadamente 7 dias, mais próxima dos 5,86 dias observados no presente trabalho que dos 9,5 dias descritos por estes autores. Desta forma, a diferença registrada na frequência relativa dos estádios entre os dois estudos, referentes à cutia, não esclarece a variação observada no cálculo da duração do CES. Uma possível explicação seria o fato de Costa et al. (2010), ter em baseado a observação da marcação mais avançada aos 21 dias após a aplicação do marcador, o que de acordo com a duração descrita no presente trabalho, já teria resultado na espermição das células incorporadas durante a prófase meiótica. Assim sendo, as marcações observadas por Costa et al. (2010), possivelmente referem-se à incorporação realizada por espermatogônias durante as mitoses espermatogoniais.

A diferença observada entre os valores de duração do CES nas três espécies está possivelmente relacionada às metodologias empregadas, uma vez que a duração do CES é considerada uma constante biológica espécie-específica, sendo controlada pelo genótipo das células germinativas e não é afetada por nenhum fator conhecido

(CLERMONT, 1972; AMANN & SCHANBACHER, 1983; FRANÇA et al., 1998; PARREIRA et al., 1998).

Dentre os mamíferos eutérios já estudados a menor e a maior duração do ciclo do epitélio seminífero são encontradas na Ordem Rodentia, mais especificamente na Família Muridae, com valores de 6,7 dias no “bank vole” (*Cletheriomys glareolus*, Grocock & Clarke, 1976) e 17 dias no hamster chinês (*Cricetulus griseus*, Oud & de Rooij, 1977). Desta forma, observa-se que a duração do CES em cutias foi extremamente curta, estando abaixo do intervalo dos roedores já estudados, enquanto a capivara e paca encontram-se no patamar intermediário deste intervalo.

6.4. Conclusões

Conclui-se que a duração do CES em cutias foi extremamente curta, estando abaixo do intervalo dos roedores já estudados, enquanto a capivara e paca encontram-se no patamar intermediário deste intervalo. Foi encontrado um único estágio por secção transversal de túbulo seminífero, sendo descritos oito estádios do CES em capivaras, cutias e pacas. O método da morfologia tubular aliado ao uso de marcadores celulares imunohistoquímicos surgem como uma alternativa no auxílio para descrição e identificação dos estádios do CES.

6.5. Referências bibliográficas

- ALHO, C. J. R. 1986. Criação e manejo de capivaras em pequenas propriedades rurais. Dep. de Difusão de Tecnologia, Brasília, DF- **Embrapa**, 33p.
- AMANN, R. P., SCHANBACHER, B. D. 1983. Physiology of male reproduction. **Journal of Animal Science Supplement**. v. 57, p. 380– 403.
- BALARINI, M. K.; PAULA, T. A. R.; MATTA, S. L. P.; PEIXOTO, J. V.; GUIÃO-LEITE, F. L.; ROSSI JR, J. L.; CZERMAK JR, A. C.; WALKER, N. J. 2011. Stages and duration of the cycle of the seminiferous epithelium in oncilla (*Leopardus tigrinus*, SCHREBER, 1775). **Theriogenology**. 15;77(5):873-80
- BERNDTSON, W. E. 1977. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. **Journal of Animal Science Supplement**. v. 44: 818-883.
- BITTENCOURT, V. L., PAULA T. A. R., MATTA S. L. P., FONSECA C. C., COSTA D. S., BENJAMIN L. A., COSTA E. P. 2007. The seminiferous epithelium cycle and daily spermatid production in the adult maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1811). **Mícron**. v. 38: 584-589.
- BROWN-UDDENBERG, R.C., GARCIA, G.W., BATISTE, Q.S., COUNAND, T., ADOGWA, A.O., SAMPSON, T., 2004. **The Agouti (Dasyprocta leporina, D. aguti) Booklet and Producers' Manual**, 1st ed. GWG Publications, Trinidad and Tobago. p. 535-569.
- CITES (Conservation on International Trade in Endangered Species). Disponível em: [http:// www.cites.org/eng/resources/species.html](http://www.cites.org/eng/resources/species.html). Acesso em 25 de junho de 2012.
- CLERMONT, Y. 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammals, seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. **Physiological Reviews**. 52: 198-236.

- COMIZZOLI P., MERMILLOD P., MAUGET R. 2000. Reproductive biotechnologies for endangered mammalian species. **Reproduction Nutrition Development**; 40: 493-504
- COSTA, G. M. J.; LEAL, M. C.; FERREIRA, A. C.; GUIMARÃES, D. A.; FRANÇA, L. R. 2010. Duration of spermatogenesis and spermatogenic efficiency in 2 large neotropical rodent species: the Agouti (*Dasyprocta leporina*) and Paca (*Agouti paca*). **Journal of Andrology**, Vol. 31, n° 5. 489-499.
- COUROT, M., HOCHEREAU-DE-REVIERS, M. T., ORTAVANT, R. 1970. Spermatogenesis. In: Johnson, A.D., Gomes, W.R., Vandemark, N.L. (ed). **The testis**. New York: Academic Press. v.1. pp. 339-432.
- DE ROOIJ, D. G. 1998. Stem cells in the testis. **International Journal of Experimental Pathology**. 79: 67-80.
- FAGERHOLM, P.; HAMBERG-NYSTRÖM, H.; TENGROTH, B. 1994. Wound healing and myopic regression following photorefractive keratectomy. **Acta Ophthalmologica (Copen)**, 72(2):229-234.
- FRANÇA, L. R.; OGAWA, T.; AVARBOCK, M. R. BRINSTER, R. L. RUSSELL, L. D. 1998. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. **Biology of Reproduction**, 59:1371-1337.
- FRANÇA, L. R.; RUSSELL, L. D. 1998. The testis of domestic animals. In: REGADERA, J. & MARTINEZ-GARCIA (eds.). **Male reproduction: A multidisciplinary overview**. Churchill Livingstone, Madrid, p. 197-219
- GROCOCK, C. A. & CLARK, J. R. 1976. Duration of spermatogenesis in the vole (*Microtus agrestis*) and the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). **Journal of Reproduction and Fertility**. 47: 133-135.

- GUERRA, M. O. 1983. Comparação entre dois métodos de determinação da frequência relativa dos estádios do ciclo do epitélio seminífero, em dados da literatura. **Revista Brasileira de Biologia**. 43: 385-394.
- GUIÃO-LEITE, F. L. 2002. Análise morfológica do testículo e do processo espermatogênico da onça parda (*Puma concolor*) adulta. Dissertação (Mestrado em morfologia), Viçosa: **Universidade Federal de Viçosa**, 64p.
- IUCN (International Union for Conservation of Nature). "2008 IUCN Red List of Threatened Species" (On-line). Disponível em: [http:// www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org). Acesso em 20 de maio de 2012.
- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cellular Biology**, v.27, p.137-138, 1965.
- LEBLOND, C. P., CLERMONT, Y. 1952. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. **Annals of New York Academy of Sciences**. 55: 548-584.
- MATAMOROS, Y. 1981. Anatomía e histología del sistema reproductor del tepezcuinte (*Cuniculus paca*). **Revista de Biología Tropical**, 29(1): 155-164.
- MCKENNA, M., BELL, S. 1997. Classification of Mammals Above the Species Level. **New York: University Press**, 631 p.
- MOLLINEAU, W.M., GARCIA, G.W., SAMAYAH, D., KISSOONSINGH, W., PROCOPE-GARCIA, A., 2000. The wildlife industry in Trinidad: a case study towards developing a sustainable industry model for a small twin island state (Trinidad and Tobago). Paper Presented at a Conference on Managing Space for Sustainable Living in Small Island Development States. **University of the West Indies**, St. Augustine, Department of Economics, November 2000.

- NEVES, E. S.; CHIARINI-GARCIA, H.; FRANÇA, L. R. 2002. Comparative testis morphometry and seminiferous epithelium cycle length in donkeys and mules. **Biology of Reproduction**, 94:238-248.
- NOWAK, R. 1999. Walker's Mammals of the World, v. 2. **Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press**, 1936 p.
- ORTAVANT, R., COUROT, M., HOCHEREAU-DE-REVIERS, M.T. 1977. Spermatogenesis in domestic mammals. In: Cole, H.H., Cupps, P.T. (eds). Reproduction in domestic animals. 3 ed. **New York: Academic Press**. pp. 203-227.
- ODD, J. L. & DE ROOIJ, D. G. 1977. Spermatogenesis in the chinese hamster. **Anatomy Records**. 187(1): 113-124.
- PARREIRA, G. G.; OGAWA, T.; AVARBOCK, M. R.; FRANÇA, L. R.; BRINSTER, R. L.; RUSSELL, L. D. 1998. Development of germ cell transplants in mice. **Biology of Reproduction**, 59:1360-1370.
- PASHOV, B. MATAMOROS, Y. 1984. Description histologica del epitelio seminifero del testiculo del tepezcuinte (*Cuniculus paca*, Brisson, 1762) e identificacion de sus diferentes etapas. **Ciência Veterinária**, v.1, p.9-15
- PAULA, T.A.R. 1999. Avaliação Histológica e Funcional do Testículo de Capivaras Adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Belo Horizonte: **Instituto de Ciências Biológicas da UFMG**, 84p. Tese (Doutorado em Morfologia).
- PEIXOTO, J.V. 2010. Criopreservação de sêmen e avaliação histológica e funcional do testículo de periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus* SHAW, 1805). Tese de Doutorado. Departamento de Veterinária, Centro de Ciências Biológicas da **Universidade Federal de Viçosa**, Minas Gerais. 78p.

- PEREY, B., CELRMONT, Y., LEBLOND, C. P. 1961. The wave of the seminiferous epithelium in the rat. **American Journal of Anatomy**. 108: 47-77.
- ROOSEN-RUNGE, E.C., GIESEL, JR.L.O. 1950. Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. **American Journal of Anatomy**. 87: 1-30.
- ROSIEPEN, G.; ARSLAN, M.; CLEMEN, G.; NIESCHLAG, E.; WEINBAUER, G.F. 1997. Estimation of the duration of the cycle of the seminiferous epithelium in the non-human primate *Macaca mulatta* using the 5-bromodeoxyuridine technique. **Cell and Tissue Research**, 288:365-369.
- RUSSELL, L.D.; ETTLIN, R.A.; SINHA-HIKIM, A.P.; CLEGG, E.D. 1990. **Histological and histopathological evaluation of the testis**. Cache River Press, Clearwater, Flórida. pp. 119-161.
- STRADIOTTI, C.P. 2006. Anatomia dos órgãos reprodutivos do macho e método de coleta de sêmen em pacas (*Agouti paca*). **Universidade Estadual do Norte Fluminense**. Campos dos Goytacazes. Dissertação (Mestrado em anatomia), 47p.
- URENA, F., BOLANOS, R. 1988. Tipos de espermatogonios em “Tepezcuintle” (Cuniculus paca). Estúdio ultraestructural. **Revista de Biologia Tropical**, v.36:325-328.
- VASCONCELOS, G.S.C. 2011. Ciclo do epitélio seminífero de quati (*Nasua nasua*, Linnaeus, 1766). Dissertação - Departamento de Veterinária, Centro de Ciências Biológicas da **Universidade Federal de Viçosa**, Minas Gerais. 59p.

7.0 PRODUÇÃO ESPERMÁTICA DIÁRIA E RENDIMENTOS INTRÍNSECOS DA ESPERMATOGÊNESE DE CAPIVARAS (*Hydrochoerus hydrochaeris*), CUTIAS (*Dasyprocta leporina*) e PACAS (*Cuniculus paca*) ADULTAS

Resumo

O estudo quantitativo das células que compõem o epitélio seminífero é essencial para o entendimento do processo espermatogênico em si, possibilitando, ademais valiosas correlações com achados fisiológicos e bioquímicos. Através da estimativa das populações celulares dos estádios do ciclo do epitélio seminífero é possível o cálculo de rendimentos intrínsecos do processo espermatogênico. Conciliando ao conhecimento das populações celulares a duração do ciclo do epitélio seminífero é possível estimar a produção espermatogênica diária da espécie. Assim no presente trabalho foram observadas em capivaras, cutias e pacas, populações médias para células de Sertoli de 6,0, 4,5 e 3,36 respectivamente, por secção transversal de túbulos seminíferos em estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero. As populações de espermatogônias do tipo A (A), espermatócitos primários em pré-leptóteno/ leptóteno (PL/L), espermatócitos primários em paquíteno (PQ), espermátides arredondadas (Ar) em capivaras foram de 1,6, 14,8, 16,0, 33,8 respectivamente. Em cutias os valores observados foram de 2,5 (A), 20,0 (PL/L), 20,0 (PQ) e 56,9 (AR). Já em pacas as mesmas populações foram de 2,19(A), 18,6 (PL/L), 17,61 (PQ) e 43,36 (AR). Observou-se uma eficiência de mitoses espermatogoniais (PL/L:A) de aproximadamente 9,3 células em capivaras, 7,9 na cutia e 8,49 em pacas, um rendimento meiótico (Ar:PQ) de 2,1 células em capivaras, 2,8 em cutias e 2,46 em pacas e um rendimento geral da espermatogênese (Ar:A) de cerca de 21,1 células em capivaras, 22,68 em cutias e 19,80 em pacas. Não foram observadas perdas significativas durante a prófase meiótica em nenhuma das três espécies. A capacidade de suporte da célula de Sertoli para o total das células da linhagem germinativa foi de 11,0 em capivaras, 22,0 em cutias e 24,34 em pacas. As durações do ciclo do epitélio seminífero nas três espécies foram de 10,39 dias em capivaras, 5,86 dias em cutias e 8,57 dias em pacas, sendo a produção espermática diária por grama de testículo de $10,1 \times 10^6$ para capivaras, $11,5 \times 10^7$ para cutias e $33,9 \times 10^6$ para pacas.

Palavras-chave: Rendimentos intrínsecos da espermatogênese, produção espermática diária, reserva espermatogênica, células germinativas, célula de Sertoli, BrdU

7.0 DAILY SPERM PRODUCTION AND INTRINSIC EFFICIENCY OF SPERMATOGENESIS OF ADULT CAPYBARAS (HYDROCHOERUS HYDROCHAERIS), AGOUTIS (*Dasyprocta leporina*) AND PACAS (*Cuniculus paca*)

Abstract

The quantitative study of the cells that make up the seminiferous epithelium is essential for understanding the spermatogenic process itself, allowing other valuable correlations with physiological and biochemical findings. Through the estimation of cell populations of the stages of the seminiferous epithelium cycle it is possible to calculate intrinsic yields of the spermatogenic process. Combining the knowledge of the cell populations to the seminiferous epithelium cycle duration it is possible to estimate the spermatogenic daily output of the species. Thus, in this study, population averages of Sertoli cells in capybaras, agoutis and pacas, of 6.0, 4.5 and 3.36, respectively, were observed through cross-section of seminiferous tubules in stage 1 of the seminiferous epithelium cycle. Populations of type A spermatogonia (A), primary spermatocytes in pre-leptotene/leptotene (PL/L), primary spermatocytes at pachytene (PQ), round spermatids (Ar) in capybaras were 1.6, 14.8, 16.0, 33.8 cells, respectively. In agoutis, the values were 2.5 (A), 20.0 (PL/L), 20.0 (PQ) and 56.9 (Ar). In pacas, the same populations were 2.19 (A), 18.6 (PL/L), 17.61 (PQ) and 43.36 (Ar). We observed an efficiency of spermatogonium mitosis (PL/L:A) of approximately 9.3 cells in capybara, 7.9 in agoutis and 8.49 in pacas; meiotic yield (Ar:FP) of 2.1 cells in capybaras, 2.8 in agoutis, and 2.46 in pacas; and an overall spermatogenesis yield (Ar:A) of about 21.1 cells in capybaras, 22.68 in agoutis, and 19.80 in pacas. There were no significant losses during meiotic prophase in any of the three species. The carrying capacity of the Sertoli cell regard to the total of germline cells was 11.0 cells in capybaras, 22.0 cells in agoutis, and 24.34 cells in pacas. The duration of the seminiferous epithelium cycle of the three species is about 10.39 days in capybaras, 5.86 days in agoutis and 8:57 days in pacas, making the daily sperm production per gram of testis of 10.1×10^6 cells for capybaras, 11.5×10^7 cells for agoutis and $33,9 \times 10^6$ cells for pacas.

Keywords: Spermatogenesis intrinsic yield, daily sperm production, spermatogenic reserves, germ cells, Sertoli cell, BrdU

7.1. Introdução

A Ordem Rodentia constitui uma das mais numerosas dentre os mamíferos possuindo cinco subordens, trinta famílias e mais de duas mil espécies. Dentre suas subordens está a Hystricomorpha, que tem como destaque roedores de grande porte como a cutia (*Dasyprocta leporina*), paca (*Cuniculus paca*) e capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) (WILSON & REEDER, 2005).

De forma geral, essas três espécies são de ampla distribuição na América Latina, habitando regiões de florestas tropicais geralmente próximos a riachos ou outras fontes de água (MONDOLFI, 1972). Devido ao crescente desmatamento de seu habitat natural, é comum encontrar esses animais próximos a áreas de cultivo, onde se alimentam de milho, mandioca, manga e bananas (SMYTHE, 1987).

Segundo a União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais, 2010 (IUCN, sigla em inglês), capivaras, cutias e pacas se encontram em baixo risco de extinção. Mesmo assim estão entre as espécies mais caçadas na América Latina por sua carne suave, clara e de excelente paladar (HOSKEN e SILVEIRA, 2001; STRADIOTTI, 2006). Esse fato, juntamente com a crescente devastação de seu habitat natural, causa preocupação com as condições futuras de conservação dessas espécies.

Existem poucos estudos descrevendo a biologia reprodutiva destes grandes roedores, mesmo com um grande aumento do número de criatórios regulamentados pelo IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), principalmente devido ao aumento na demanda de sua carne. Os poucos estudos realizados, em sua maioria fazem apenas uma abordagem dos aspectos relacionados com a morfologia dos órgãos reprodutivos (MATAMOROS, 1981; PASHOV & MATAMOROS, 1984; URENA et al. 1988).

Para se avaliar as características fisiológicas da reprodução de uma dada espécie, vários métodos têm sido utilizados, porém, os dados mais confiáveis na caracterização reprodutiva masculina, baseiam-se na histologia quantitativa dos testículos (AMANN, 1970; BERNDTSON, 1977).

O testículo de mamíferos é um órgão que expressa tanto função exócrina quanto endócrina, estando estas representadas, respectivamente, pelos componentes tubular e intertubular. O compartimento tubular é o mais volumoso no parênquima testicular das diversas espécies de mamíferos já estudados, sendo representado pelos túbulos seminíferos, principal componente do processo espermatogênico (RUSSELL et al., 1990). Dois tipos celulares estão presentes no epitélio seminífero: as células de Sertoli de origem somática e as células germinativas ou espermatogênicas (RUSSELL et al., 1994).

A espermatogênese é um evento dinâmico, sincrônico e bem organizado que ocorre ciclicamente no epitélio do túbulo seminífero. Uma geração de célula germinativa sofre, a partir de uma célula tronco diploide, a espermatogônia, sucessivas divisões e diferenciações até ser liberada como célula haploide, o espermatozoide, no lume do túbulo seminífero (RUSSELL et al., 1990). As células de uma mesma geração apresentam-se interligadas por pontes citoplasmáticas, o que confere um acurado desenvolvimento sincrônico em cada camada epitelial (DE ROOJI, 1998). Uma sincronia extremada também é observada entre as diferentes gerações, devido a ação da célula de Sertoli, que compõe o epitélio como célula somática reguladora, impondo limites à produção espermática de acordo com sua capacidade de suporte. Sendo assim, as interações entre as células de Sertoli e as células germinativas são cruciais para a manutenção da produção espermática normal (GRISWOLD, 1995).

As razões entre os diferentes tipos de células germinativas constituem o rendimento intrínseco do processo espermatogênico, que é uma forma acurada de se analisar a eficiência deste processo (BERNDTSON & DESJARDINS, 1974; CARDOSO & GODINHO, 1985; FRANÇA, 1991; PAULA, 1999). Classicamente, três índices avaliando as diferentes fases da espermatogênese são utilizados: o coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais, o qual quantifica o grau de perdas celulares na fase espermatogonial ou proliferativa, estimando as degenerações que ocorrem nas conversões celulares de espermatogônias do tipo A₁ até a formação de espermatócitos primários em pré-leptóteno; o rendimento meiótico que avalia a eficiência das duas divisões meióticas; e o rendimento geral da espermatogênese, no qual a eficiência do processo espermatogênico como um todo é investigada.

A capacidade da célula de Sertoli é expressa pela divisão do número de células germinativas por célula de Sertoli, sendo este considerado como um índice bastante confiável para se avaliar a eficiência e a função da célula de Sertoli e um fator determinante da produção espermática (RUSSELL & PETERSON, 1984; SHARPE, 1994). A capacidade de suporte das células de Sertoli é uma variável espécie-específica (RUSSELL & PETERSON, 1984; FRANÇA & RUSSELL, 1998; FRANÇA et al., 1999).

Os métodos quantitativos baseados em histologia testicular têm sido utilizados em diferentes espécies para avaliar a reserva espermática e produção espermática diária (AMANN, 1970; BERNDTSON, 1977; AMANN, 1981; ROCHA et al, 1999; BITTENCOURT et al., 2004, GUIÃO LEITE et al, 2006;. BITTENCOURT et al, 2007). Correlacionando-se a quantidade de espermátides formadas por secção transversal de túbulo seminífero com o comprimento total de túbulo em ambos os testículos é possível calcular a reserva espermática do testículo, que quantifica o número

potencial de espermatozóides em produção nos testículos em cada ciclo do epitélio seminífero (CES) de um dada espécie (AMANN, 1970; BERNDTSON, 1977).

A duração CES é considerada como uma constante biológica espécie-específica, onde a célula de Sertoli garante subsídios para que as espermatogônias expressem seu potencial genotípico (ORTAVANT et al., 1977; AMANN & SCHANBACHER, 1983). O conhecimento da duração do CES, juntamente com o peso testicular e a reserva espermática de uma espécie, possibilita a determinação da produção espermática diária por grama de testículo, valor este que mede a eficiência do processo espermatogênico. Desta forma, a influência do peso testicular e da duração da espermatogênese, duas variáveis bastante díspares nas diversas espécies de mamíferos, são praticamente eliminadas em estudos comparativos (PAULA, 1999).

Neste sentido, os objetivos deste trabalho foram estabelecer os valores da produção espermática diária, os rendimentos intrínsecos das diferentes fases do processo espermatogênico e as capacidade de suporte das células de Sertoli das três espécies deste estudo, por meio do levantamento da população celular do túbulo seminífero no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero, mensurações tubulares e uso de técnica imunohistoquímica para determinação da duração do ciclo do epitélio seminífero.

7.2. Material e Métodos

7.2.1. Animais utilizados e procedimento de coleta dos testículos

Utilizaram-se cinco pacas adultas, uma proveniente do Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e quatro do criatório especializado “Fazenda Um Sonho a Mais”, localizado no município de Carangola-MG, registrado perante o IBAMA sob o número 296010. Foram utilizadas cinco cutias

machos adultos, provenientes do Criatório Comercial “Chácara Lourenço Carreta” localizado no município de Santa Teresa, Espírito Santo, Brasil, registrado perante o IBAMA sob o número 312226. Já o procedimento em capivaras utilizou de cinco animais capturados no “Plano de Manejo de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) de vida livre no campus universitário da Universidade Federal de Viçosa-MG”, sendo este um projeto já registrado ao Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, com número de registro 20558259287 de 04 de maio de 2010.

Este estudo foi aprovado pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), sob o número 26.469-1 e pela Comissão de Ética para o uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (processo número 10/2012).

Após um jejum de 12 horas, as pacas e cutias foram contidas fisicamente, com auxílio de puçá, para a aplicação intramuscular de cloridato de quetamina (10 mg/kg) associado ao cloridrato de xilazina (1 mg/kg), como associação anestésica. As capivaras foram sevadas em áreas de baixa presença humana dentro do campus da Universidade Federal de Viçosa para serem contidas quimicamente com uso de dardos anestésicos propelidos por arma anestésica, sendo utilizada a mesma associação supracitada. Depois de anestesiados, os animais foram pesados e, por meio de palpação percutânea, foi verificada a integridade dos testículos.

Para o cálculo da duração de um ciclo do epitélio seminífero (CES) foi aplicado previamente às hemicastrações, 0,1ml do imunomarcador 5-bromodeoxiuridina (BrdU - Laboratórios Zymed, Carlsbad, CA, EUA) na extremidade caudata do testículo direito em cutias e pacas e 0,4 ml do mesmo produto em capivaras. O imunomarcador utilizado é incorporado por células em síntese de DNA no início do processo espermatogênico e a partir da progressão em um período de tempo conhecido é possível a estimativa da duração do CES. Neste sentido foram utilizados tempos para permanência do

imunomarcador de acordo com a logística associada a cada espécie estudada. Assim, em Capivaras utilizou-se período de 3 dias; em cutias períodos de 1 hora, 1 dia e 3 dias; e em pacas 1 hora, 1 dia, 3 dias e 7 dias.

O procedimento de hemicastração foi realizado através de técnica convencional e após a coleta, o testículo foi isolado do epidídimo e imerso imediatamente em solução fixadora Karnovsky (KARNOVSKY, 1965), sendo a albugínea testicular perfurada em vários pontos para melhor penetração do fixador. Após 2 horas os testículos foram seccionados longitudinalmente e mantidos por mais 22 horas no mesmo fixador. Posteriormente o material fixado foi armazenado sob refrigeração, em solução de álcool 70%, até o processamento histológico. No final do procedimento, cada animal foi medicado com agentes antiinflamatórios (Flunixin Meglunime, Banamine – Schering-Plough S/A, 1,1 mg/kg de peso) e antibióticos (enrofloxacino, 20mg/kg de peso).

7.2.2. Processamento histológico

Os testículos foram pesados em balança de precisão de 0,001g e por meio de dissecação foram isolados o mediastino e albugínea testiculares, os quais foram pesados separadamente, exceto para a cutia onde não foi possível a separação do mediastino testicular, sendo apenas a albugínea pesada separadamente. Uma vez que a densidade volumétrica do testículo é muito próxima de 1,0 (JOHNSON et al., 1981), o peso do testículo coletado foi considerado como sendo igual ao seu volume. Foi considerado volume do parênquima testicular o peso testicular subtraído do peso da albugínea e do mediastino. Para o cálculo do peso total dos testículos de cada animal, o peso do testículo contralateral foi considerado igual ao peso do testículo coletado, uma vez que nos animais já estudados nenhuma variação significativa foi observada entre o peso do

testículo direito e esquerdo (FRANÇA & RUSSELL, 1998; MASCARENHAS et al. 2006).

De cada testículo coletado um fragmento testicular de aproximadamente 10x4x4 mm da extremidade caudata foi encaminhado para o processamento histológico para inclusão em parafina para técnica de imunohistoquímica e outro fragmento 4x4x4 mm foi encaminhado para processamento em resina glicolmetacrilato (Historesin® - Leica Microsystems, Nussloch, Heidelberg Germany), para cálculos morfométricos.

Para inclusão em parafina o fragmento foi submetido à desidratação em séries crescentes de etanol (70, 80, 90% e absoluto) em banhos de trinta minutos cada e à diafanização em três passagens consecutivas de meia hora em xilol, até inclusão em parafina. O bloco contendo o fragmento testicular foi seccionado em micrótomo rotativo (Reichert-Jung), com navalha de aço, obtendo-se cortes semi-sequenciais de 4µm de espessura. Os cortes histológicos obtidos foram colocados em lâminas eletricamente carregadas (ImmunoSlide®- EasyPath), garantindo uma melhor adesão dos mesmos. As lâminas foram submetidas à detecção por anticorpo monoclonal e reveladas pelo sistema de coloração streptavidin-biotin, através do kit de coloração BrdU (Zymed®- Invitrogen, Camarillo, CA, EUA).

O fragmento a ser incluído em resina foi submetido à desidratação em concentrações crescentes de etanol (80, 90 e 100%) permanecendo trinta minutos em cada meio, com posterior infiltração na resina em dois banhos distintos e incluídos, na mesma resina, com a adição de catalisador. Os fragmentos incluídos foram então seccionados com navalha de vidro em micrótomo rotativo (Leica RM2155 - Leica Microsystems, Nussloch, Heidelberg, Germany), obtendo-se cortes semi-sequenciais de 3µm de espessura para cutias e 4µm para capivaras e pacas. Posteriormente foi realizada

a montagem em lâminas de vidro, corando-se os cortes histológicos com azul de toluidina/borato de sódio 1%.

7.2.3. Proporção volumétrica de túbulos seminíferos e mensuração tubular

Para o cálculo da proporção volumétrica dos túbulos seminíferos do parênquima testicular foram examinados 20 campos fotomicrografados, em aumento de 200 vezes, escolhidos ao acaso por meio de varredura horizontal dos cortes histológicos. Foi sobreposta a cada imagem uma gráticula com 500 intersecções consideradas como pontos. Foram computados os pontos coincidentes com os túbulos seminíferos em um total de 10.000 pontos por animal, convertidos em representação percentual. A partir da proporção dos túbulos seminíferos frente ao volume do parênquima testicular foi possível o cálculo de seu volume separadamente.

O diâmetro médio dos túbulos seminíferos foi obtido com o uso do programa de análise de imagens IMAGE J ® a partir de fotografias do parênquima testicular em 20 secções transversais de túbulos, os mais circulares possíveis, em cada testículo, em aumento de 200 vezes independente do estágio em que se encontravam. Duas anotações foram obtidas para cada parâmetro, em cada secção transversal, considerando-se como medida representativa a média das duas.

O comprimento total dos túbulos seminíferos foi calculado a partir da fórmula do volume de um cilindro (volume = área da base x altura), assim, o comprimento representa o volume total de túbulos seminíferos dividido pela área da secção transversal do túbulo seminífero.

7.2.4. Estimativa das populações celulares e rendimento intrínseco do processo espermatogênico

Para a estimativa da população das diferentes gerações das células germinativas, os seguintes tipos celulares foram contabilizados, em 10 secções transversais do estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero: espermatogônias do tipo A (A), espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno (PL/L), espermatócitos primários em paquíteno (PQ), espermátides arredondadas (Ar) e células de Sertoli (CS). A contagem obtida foi corrigida para a espessura do corte histológico e diâmetro nuclear médio, utilizando-se a fórmula de ABERCROMBIE (1946) modificada por AMANN (1962). Para tal, foi realizada a mensuração do diâmetro de dez núcleos das células germinativas, utilizando o programa de análise de imagens Image J[®], associado ao microscópio Olympus BX70 em aumento de 200X, no laboratório de fotomicroscopia do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa. Uma vez que as células de Sertoli possuem núcleo irregular, a contagem, bem como a correção foram realizadas baseando-se no aparente nucléolo característico desta célula.

O rendimento intrínseco da espermatogênese foi determinado baseando-se nas razões obtidas entre os números celulares corrigidos. As seguintes razões foram calculadas: coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais (PL/L:A), rendimento meiótico (Ar:PQ), rendimento geral da espermatogênese (Ar:A) e ocorrência de perdas celulares durante a prófase meiótica (PL/L:PQ) (COSTA et al., 2004).

O estudo das razões entre números de células da linhagem espermatogênica e de células de Sertoli no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero (índice de célula de Sertoli) abrangeu as razões que se seguem: A:CS, PL/L:CS, PQ:CS, AR:CS e total de células germinativas:CS.

Os dados obtidos foram analisados por estatística descritiva (média e desvio-padrão) empregando-se o programa Excel for Windows XP (2010).

7.2.5. Estimativa da duração do CES

Para a estimativa da progressão do imunomarcador ao longo do CES nos diferentes tempos utilizados nos animais estudados, foi calculado a frequência relativa dos oito estádios do CES caracterizados com base no método da morfologia tubular (BERNDTSON, 1977). Para tal, foram quantificadas 150 secções transversais, aleatoriamente distribuídas, de túbulos seminíferos em cada animal, em microscópio de luz, com aumento de 200 X. As secções contabilizadas foram aquelas com formato o mais circular possível e selecionadas de forma aleatória. Devido a presença de um sequenciamento fisiologicamente observado dos estádios do CES ao longo do mesmo túbulo seminífero, um espaçamento mínimo de 2 mm foi observado entre as secções contadas. Ainda com o intuito de promover uma maior aleatoriedade, a busca de secções transversais circulares foi realizada com a imagem desfocada permitindo a visualização do contorno tubular, mas evitando a classificação durante o deslocamento do campo.

Para registro e ilustração foram obtidas imagens digitais capturadas em fotomicroscópio de luz (Olympus CX31), equipado com câmara digital Olympus SC20.

A duração do CES foi calculada através da observação da célula imunomarcada, na geração mais avançada no epitélio seminífero, ou seja, desde a incorporação do BrdU até a coleta do material. Para tal, foi computada a frequência relativa dos estádios percorridos durante este período e assim calculado a duração de um CES.

7.2.6. Cálculo da produção espermática diária

O cálculo da produção espermática diária foi feito a partir da histologia quantitativa dos testículos, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{PED} = \frac{\left(\begin{array}{l} \text{Comprimento total de} \\ \text{túbulo seminífero em } \mu\text{m} \end{array} \times \begin{array}{l} \text{N}^\circ \text{ corrigido de Ar por secção} \\ \text{transversal no estágio I do CES} \end{array} \right) / \begin{array}{l} \text{Espessura do corte da} \\ \text{secção transversal em } \mu\text{m} \end{array}}{\text{Duração do CES em dias}}$$

Utilizou-se para este cálculo os dados obtidos dos cinco animais de cada espécie, sendo o resultado expresso em produção diária de espermátides em ambos os testículos. Este dado não permite uma análise comparativa precisa entre espécies diferentes devido às diferenças do tamanho dos testículos em cada uma. Para permitir comparações a PED foi expressa como produção espermática diária por grama de testículo.

7.3. Resultados e discussão

7.3.1. Populações celulares do estágio I o CES

Foi possível observar em capivaras, cutias e pacas que, assim como nos demais mamíferos já estudados, o epitélio seminífero é caracterizado pela presença de gerações celulares em fases distintas de seu desenvolvimento dispostas em camadas no epitélio. Neste sentido, células da camada basal, à medida que se desenvolvem migram em direção ao lúmen tubular, enquanto novas gerações são formadas em seu lugar. Assim, mantém-se uma organização de tal magnitude que apenas oito arranjos distintos são observados em todas as espécies (BERNDTSON, 1977).

Esta organização ocorre graças à célula de Sertoli, que tem funções tão variadas como regular o número produzido pelas mitoses espermatogoniais, acompanhar o processo meiótico eliminando células danificadas e suprir as necessidades fisiológicas do processo espermiogênico. Notavelmente, todas estas funções ocorrem simultaneamente nas diferentes camadas de distintas gerações germinativas. Desta forma, a estimativa populacional destas diferentes, porém inter-relacionadas gerações de células germinativas, subsidia a quantificação dos rendimentos do processo espermatogênico. Os números médios corrigidos das populações das diferentes células espermatogênicas e de Sertoli, em secções transversais de túbulos seminíferos no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero, em capivaras, cutias e pacas encontram-se apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Populações celulares no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero de pacas adultas, em valores corrigidos segundo AMANN (1962) (média \pm desvio padrão).

Tipo Celular	Capivara	Cutia	Paca
Células de Sertoli	6,0 \pm 0,2	4,5 \pm 0,17	3,36 \pm 0,07
Espermatogônias A	1,6 \pm 0,3	2,5 \pm 0,72	2,19 \pm 0,04
Espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno	16,1 \pm 0,8	20,04 \pm 0,16	18,60 \pm 0,49
Espermatócitos primários em paquíteno	16,0 \pm 1,7	20,06 \pm 0,17	17,61 \pm 0,47
Espermátides arredondadas	33,8 \pm 2,4	56,91 \pm 0,21	43,36 \pm 0,99

Na camada basal do epitélio seminífero encontra-se a primeira geração de células germinativas (espermatogônias), que se apresenta em franco processo de divisões mitóticas para a formação dos espermatócitos primários. Durante o estágio 1 esta geração é observada como espermatogônias do tipo A. O número médio corrigido destas células, a cada secção transversal de túbulos no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero, foi muito próximo entre as três espécies estudadas, assim como a população observada no cobaio, outro roedor da superfamília Caviioidea (ROMANO et al., 2002). Nos próximos ciclos esta população basal dará origem aos espermatócitos primários para início da longa fase da prófase meiótica, tão longa que duas gerações de espermatócitos primários podem ser observadas no estágio 1, uma delas ainda como preleptótenos/leptótenos e uma segunda já como paquítenos. O número médio corrigido encontrado para estas populações em secções transversais de túbulos no estágio 1 do CES, foram próximos entre a paca e a capivara, mas a cutia apresentou valores entre 10 a 25% maiores que os observadas para essas espécies.

A camada mais próxima ao lume tubular, no estágio 1 do CES, é formada por espermatídes arredondadas (AR) originadas por meiose dos espermatócitos do ciclo anterior. Nos animais estudados a população de AR no estágio 1 do CES foi menor em capivaras e maior em cutias. O valor observado para essa população em cutias foi bastante próximo ao relatado em cobaios (ROMANO et al., 2002).

A população de células de Sertoli de pacas foi a menor observada entre as três espécies estudadas, estando a cutia em um valor intermediário, e a capivara com a maior população deste tipo celular. Novamente houve uma semelhança entre o valor observado para a população de células de Sertoli em cutias ao valor relatado em cobaios (ROMANO et al., 2002).

7.3.2. Rendimentos intrínsecos da espermatogênese e capacidade de suporte da célula de Sertoli

O rendimento intrínseco do processo espermatogênico é definido por razões entre os números corrigidos de células germinativas de diferentes gerações, na secção transversal de túbulo no estágio 1 do CES. Os resultados obtidos nos animais estudados encontram-se apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Rendimentos intrínsecos do processo espermatogênico de capivaras, cutias e pacas adultas.

Rendimentos	Capivara	Cutia	Paca
Coeficiente de eficiência de mitoses			
espermatogoniais (Espermatogônia A: Espermatócitos I PL/L)	1 : 10,06	1 : 7,99	1 : 8,49
Coeficiente de manutenção da prófase			
meiótica (Espermatócitos I PQ : Espermatócitos I PL/L)	1 : 1,12	1 : 1,0	1 : 1,05
Rendimento meiótico			
(Espermatócitos I PQ : Espermátides Ar)	1 : 2,11	1 : 2,8	1 : 2,46
Rendimento geral da espermatogênese (Espermatogônias A : Espermátides Ar)	1 : 21,12	1 : 22,68	1 : 19,80

PL/L = preleptóteno e leptóteno; PQ = paquíteno; Ar = arredondadas

7.3.2.1 Coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais

Percebe-se que cada espermatogônia do tipo A, no início do processo espermatogênico de capivaras, cutias e pacas, produziram, respectivamente, 10, 8 e 8,5 espermátocitos primários em pré-leptóteno/leptóteno, aptos a ingressarem na prófase meiótica.

A interpretação do resultado do coeficiente de eficiência das mitoses espermatogoniais (PL/L:A) depende diretamente do número de gerações de espermatogônias que a espécie possui. A maioria das espécies estudadas apresentam seis gerações de espermatogônias (CLERMONT, 1972; FRANÇA e RUSSELL, 1998). Assim, uma espermatogônia do tipo A produziria teoricamente 64 espermátocitos primários. Neste sentido, os valores observados em capivaras, cutias e pacas representariam apenas 16%, 12% e 13%, respectivamente, do número teoricamente esperado. Porém, assim como ocorre nas outras espécies estudadas, grandes perdas são normalmente observadas durante esta fase do processo espermatogênico. Essas perdas usualmente variam de 60 a 90% na maioria dos animais (ROOSEN-RUNGE, 1973; FRANÇA e RUSSELL, 1998, COSTA & PAULA, 2003), e ocorrem devido a um mecanismo coordenado pelas células de Sertoli que visa a adequação populacional, por meio de apoptoses induzidas, para a sua capacidade suporte (SHARPE, 1994).

7.3.2.2 Coeficiente de manutenção da prófase meiótica

É possível a observação de que não houve perdas significativas durante a prófase meiótica em nenhuma das três espécies estudadas, ou seja, a população de espermátocitos primários se manteve constante durante esta fase (Tabela 2). Na maioria das espécies estudadas até o momento também não ocorrem perdas significativas

durante a prófase meiótica (BERNDTSON e DESJARDINS, 1974, GODINHO e CARDOSO, 1979, COSTA e PAULA, 2003).

7.3.2.3 Rendimento meiótico

Para capivaras, cutias e pacas o rendimento meiótico indicou que cada espermatócito primário em paquíteno gerou, em média, respectivamente, 53 %, 70% e 62 % do valor teoricamente esperado de espermátides arredondadas (1:4), caso não houvesse perdas nesta fase. Normalmente, as perdas durante essa fase são um pouco inferiores nos animais domésticos (10 a 30 %; FRANÇA e RUSSELL, 1998).

7.3.2.4 Rendimento geral da espermatogênese

Uma vez que não são observadas perdas significativas durante a espermiogênese (RUSSELL & PETERSON, 1984), o rendimento geral da espermatogênese pode ser calculado com base no número de espermátides arredondadas computadas no estágio 1 do CES. Assim, o número de espermátides arredondadas, e conseqüentemente de espermatozoides resultantes de cada espermatogônia do tipo A, foi de aproximadamente 20 células nos três roedores (Tabela 3), ficando cerca de duas a quatro vezes mais baixo do que o observado para a maioria dos animais domésticos e animais de laboratório (FRANÇA e RUSSELL, 1998).

Entretanto, deve-se ressaltar que em todos os mamíferos já estudados, apenas 15% a 30 % dos espermatozoides teoricamente esperados são produzidos (HUCKINS, 1978; FRANÇA e RUSSELL, 1998) e portanto, as perdas celulares são um componente integral do processo espermatogênico normal.

7.3.2.5 Capacidade de suporte da célula de Sertoli

Na tabela 3 encontram-se as razões entre os números de células de Sertoli e de células da linhagem espermatogênica em secções transversais de túbulos no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero.

Tabela 3. Razões entre os números corrigidos de células germinativas e de células de Sertoli, no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero, em capivaras, cutias e pacas adultas.

Tipos celulares	Capivara	Cutia	Paca
Células de Sertoli : Espermatogônias A	1 : 0,27	1 : 0,55	1 : 0,65
Células de Sertoli : Espermatócitos I PL/L	1 : 2,68	1 : 4,45	1 : 5,54
Células de Sertoli : Espermatócitos I PQ	1 : 2,67	1 : 4,45	1 : 5,24
Células de Sertoli : Espermátides Ar	1 : 5,63	1 : 12,63	1 : 12,90
Células de Sertoli : Total de células germinativas	1 : 11,25	1 : 22,09	1 : 24,36

PL/L = preleptóteno e leptóteno; PQ = paquíteno; Ar = arredondadas

As razões entre o número de células de Sertoli e de células germinativas, em secções transversais de túbulos seminíferos, podem ser interpretadas como sendo a capacidade de suporte das células de Sertoli (RUSSELL e PETERSON, 1984), ou seja, o número de células germinativas que cada célula de Sertoli pode dar suporte estrutural e funcional, sendo então, um indicativo da eficiência funcional desta última (FRANÇA e RUSSELL, 1998). O equilíbrio entre proliferação e apoptose desempenha papel muito importante na regulação do número de células espermatogênicas no epitélio seminífero. Particularmente na fase espermatogonial, o mecanismo homeostático de regulação de apoptoses é considerado 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, 1998).

Nas cutias e pacas, cada célula de Sertoli foi capaz de suportar duas vezes mais espermatídes arredondadas do que em capivaras sendo invariavelmente mais alto que os valores relatados para a maioria dos animais domésticos (FRANÇA e RUSSELL, 1998). Seguindo as tendências até agora relatadas, as razões entre células de Sertoli e espermátócitos primários em preleptóteno/leptóteno, paquítenos e total de células espermatogênicas de cutias e pacas adultas, foram bem superiores ao observado em capivaras, evidenciando a maior eficiência funcional das células de Sertoli das duas primeiras espécies.

7.3.3. Parâmetros corporais, testiculares e tubulares

Os valores referentes ao peso corporal médio, mensurações testiculares, volume e porcentagem de albugínea e mediastino, volume do parênquima testicular, assim como as proporções e volumetria referentes ao compartimento tubular estão apresentados na Tabela 4.

Embora parênquima testicular não seja um termo totalmente adequado para citar o testículo desprovido de albugínea e mediastino, este é amplamente mencionado na literatura (BERNDTSON, 1977; JOHNSON et al., 1981; RUSSELL et al., 1990; JOHNSON et al., 2000). Em capivaras, cutias e pacas o parênquima testicular representa 88,67%, 91,7% e 94,3% do peso total do órgão, respectivamente.

Aproximadamente 93,0 % do parênquima testicular de cutias adultas foram compostos por túbulos seminíferos, sendo ligeiramente superior ao observado em pacas (91%). Os túbulos seminíferos são os principais constituintes do parênquima testicular da maioria dos mamíferos, ocupando em torno de 60 a 90 % na maioria das espécies

(SETCHELL, 1982). A capivara, diferentemente dos demais animais já estudados, apresenta apenas 50 % do parênquima testicular alocado em túbulos seminíferos.

A mensuração tubular é uma das abordagens utilizadas como indicadores da atividade espermatogênica em experimentos relacionados à função testicular (PAULA et al., 2002, NAVARRO et al., 2004; SOUZA et al., 2005; MASCARENHAS et al., 2006; SILVA JR et al., 2006, PEIXOTO, 2006, BALARINI, 2008). O comprimento total do túbulo seminífero para as três espécies estudadas está apresentado na Tabela 4. Este dado não permite uma análise comparativa precisa entre espécies diferentes devido às diferenças do tamanho dos testículos em cada uma. Para contornar tal situação, permitindo comparações independentemente do porte do animal, deve-se converter o comprimento tubular total em comprimento tubular por grama de testículo. Assim procedendo, percebe-se que a maioria dos animais estudados até o momento apresenta valores que variam de 10 a 15 m de túbulo por grama de testículo, estando a capivara dentro deste intervalo. Neste parâmetro a cutia e a paca se destacam por apresentar os maiores valores já relatados para um mamífero até o momento, sendo este de 35,5 m/g e 26,77 m/g respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4. Peso corporal, o peso testicular, volumes de ambos os testículos, volume e porcentagem da albugínea e mediastino, volume do parênquima testicular, proporções referentes ao compartimento tubular e volume total de túbulos seminíferos de capivaras, cutias e pacas adultas (média \pm desvio padrão).

Animal	Capivara	Cutia	Paca
Peso corporal médio (kg)	54,3 \pm 1,3	3,14 \pm 0,28	6,4 \pm 1,5
Peso testicular (g)	34,4 \pm 1,0	4,22 \pm 0,96	9,1 \pm 2,8
Volume de ambos os testículos (ml)	68,8 \pm 2,0	8,44 \pm 1,93	18,2 \pm 5,6
Volume da albugínea (ml)	2,2 \pm 0,9	0,34 \pm 0,11	0,35 \pm 0,09
% do testículo alocado em albugínea	6,5 \pm 0,2	8,12 \pm 1,5	3,98 \pm 0,7
Volume do mediastino (ml)	1,7 \pm 0,1	–	0,17 \pm 0,08
% do testículo alocado em mediastino	5,5 \pm 0,3	–	1,89 \pm 0,46
Volume do parênquima testicular para ambos os testículos(ml)	61,0 \pm 0,6	7,76 \pm 1,74	17,18 \pm 2,72
Proporção volumétrica de túbulo seminífero (%)	50,1 \pm 2,5	92,9 \pm 1,55	90,87 \pm 0,63
Volume total de túbulos seminíferos (ml)	30,56 \pm 1,25	7,2 \pm 1,43	15,61 \pm 0,57
Comprimento total do túbulo seminífero (m)	857,63 \pm 43,6	299,72 \pm 39,55	487,81 \pm 25,36
Comprimento do túbulo seminífero por grama de testículo (m/g)	12,46 \pm 0,6	35,5 \pm 4,68	26,77 \pm 1,35

7.3.4. Duração do ciclo do epitélio seminífero

Para a capivara, a progressão máxima do imunomarcador utilizado após três dias foi de 29,1 % do CES, correspondendo a uma duração de 10,39 dias. Na cutia foi observada uma progressão do marcador de 51% após 3 dias de aplicação, o que corresponde a 5,86 dias de duração do CES. Em pacas foi observada uma progressão de 82% após 7 dias, correspondendo a uma duração do CES de 8,57 dias.

Dentre os mamíferos eutérios já estudados a menor e a maior duração do ciclo do epitélio seminífero são encontradas na Ordem Rodentia, mais especificamente na Família Muridae, com valores de 6,7 dias no “bank vole” (*Cletheriomys glareolus*, GROCOCK & CLARKE, 1976) e 17 dias no hamster chinês (*Cricetulus griseus*, OUD & DE ROOIJ, 1977).

Desta forma observa-se que a duração do CES em cutias foi extremamente curta, estando abaixo do intervalo dos roedores já estudados, enquanto a capivara e paca encontram-se no patamar intermediário deste intervalo.

7.3.5. Produção espermática diária

Através da determinação da taxa de produção espermática diária de uma espécie é possível obter melhor manejo e exploração dos reprodutores de destacado potencial genético (AMANN, 1970; AMANN & SCHAMBACHER, 1983, FRANÇA, 1991), além de se viabilizar um importante dado para a determinação de programas de reprodução assistida para possíveis espécies ameaçadas. Para se avaliar a produção espermática vários métodos têm sido utilizados, dentre os quais podem ser citados aqueles baseados na histologia quantitativa do testículo, na estimativa da reserva espermática através da contagem hemocitométrica de células espermáticas em homogeneizados do parênquima testicular, na quantificação de espermatozoides

ejaculados e na colheita de espermatozoides através de canulação direta do ducto deferente ou da rede testicular (AMANN, 1970, BERNDTSON, 1977). A eficiência espermatogênica em mamíferos depende principalmente da duração do processo espermatogênico e da densidade volumétrica (%) de túbulos seminíferos no testículo (FRANÇA & RUSSEL, 1998).

Os valores para reserva espermática testicular, reserva espermática por grama de testículo, produção espermática diária (PED) e PED por grama de testículo para capivaras, cutias e pacas estão expressos na tabela 5.

Nos animais domésticos a reserva espermática por grama de testículo varia de 120 a 260×10^6 células (FRANÇA & RUSSELL, 1998). Neste contexto é possível observar que o valor da reserva espermática por grama de testículo na capivara está abaixo do limite mínimo relatado entre as espécies domésticas, enquanto os valores para a paca e cutia se encontram acima do limite máximo do intervalo, sendo o valor da cutia maior que o dobro deste limite. Embora a reserva testicular por grama de testículo seja válida em comparações interespecíficas, deve-se lembrar de que esta variável é relativa à duração de um CES, que é uma constante biológica espécie específica (ORTAVANT et al., 1977; AMANN & SCHANBACHER, 1983). Assim, dividindo-se a reserva espermática pela duração do CES é possível calcular a produção espermática diária (PED).

Tabela 5. Reserva espermática, reserva espermática por grama de testículo, produção espermática e produção espermática por grama de testículo em capivaras, cutias e pacas.

	Capivara	Cutia	Paca
Reserva espermática	$724,7 \times 10^7$	$568,5 \times 10^7$	$528,8 \times 10^7$
Reserva espermática por grama de testículo	105×10^6	674×10^6	290×10^6
Produção espermática diária	$69,7 \times 10^7$	$97,0 \times 10^7$	$61,7 \times 10^7$
Produção espermática por grama de testículo	$10,1 \times 10^6$	$11,5 \times 10^7$	$33,9 \times 10^6$

De acordo com o citado por França & Russell (1998), a alta eficiência espermatogênica observada em alguns mamíferos deve-se principalmente à curta duração da espermatogênese, alta capacidade de suporte das células de Sertoli, alta densidade volumétrica (%) de túbulos seminíferos no testículo, grande número de gerações de espermatogônias e baixa perda celular durante o processo espermatogênico. A análise da literatura permite agrupar a produção espermática diária por grama de testículo em três patamares: espécies com alta eficiência espermatogênica e que produzem cerca de vinte a trinta milhões de espermatozoides, incluindo-se aí animais domésticos como o suíno, equino, ovino e o coelho (França & Russell, 1998), o rato (Robb et al., 1978) e o macaco rhesus (Amann et al., 1976); espécies com eficiência espermatogênica média, produzindo de dez a vinte milhões de espermatozoides, dentre

as quais se encontram o bovino e o búfalo (França & Russell, 1998); e por último, espécies que produzem abaixo de dez milhões de espermatozóides como por exemplo o homem (Amann, 1981) e o gambá (*Didelphis albiventris*) (Queiroz & Nogueira, 1992). Desta forma, a análise retrospectiva dos vários itens discutidos no presente trabalho, permite inferir com bastante clareza a razão da eficiência da espermatogênese em capivaras estar situada num nível que pode ser considerado no limiar entre médio e baixo, enquanto a paca e, principalmente, a cutia se destacam com altas produções espermáticas.

7.4. Conclusões

A população das diferentes células germinativas de capivaras, cutias e pacas, em secções transversais do túbulo seminífero no estágio 1 do ciclo de epitélio seminífero, se apresentaram dentro do intervalo observado na superfamília Caviioidea da ordem Rodentia. Em cutias e pacas a célula de Sertoli apresentou uma população inferior ao relatado nas diferentes espécies da superfamília Caviioidea. Desta forma, quanto à capacidade de suporte das células de Sertoli, os valores registrados em cutias e pacas foram maiores do que os relatados em outras espécies de roedores silvestres, inclusive para a capivara, e principalmente das diversas espécies de mamíferos domésticos já estudados, indicando uma grande eficiência destas células na cutia e paca.

Observou-se que o processo de mitoses espermatogoniais pode apresentar uma perda de 83,23% em capivaras, 87,51% em cutias e 86,7 % para as pacas caso estas possuam seis gerações espermatogoniais. O rendimento meiótico e o rendimento geral da espermatogênese demonstraram uma perda do valor total teoricamente esperado

respectivamente de 47,2% e 92,5% em capivaras, 30% e 91,2% em cutias e 38,5 % e 93 %, estando dentro da amplitude observada para os demais mamíferos estudados.

A duração do CES observada em capivaras e pacas encontra-se dentro do intervalo observado para as diversas espécies de roedores já estudados, enquanto a cutia apresentou a menor duração já relatada para um roedor.

A reserva espermática por grama de testículo apresentou os menores valores em capivara e os maiores em cutia, estando a paca no intervalo médio entre as duas espécies. Da mesma forma, o valor da produção espermática por grama de testículo em cutias foi extremamente superior à diversas espécies de mamíferos domésticos e selvagens já estudados, inclusive ao valor observado em pacas e capivaras.

7.5. Referências Bibliográficas

ABERCROMBIE, M. 1946. Estimation of nuclear populations from microtome sections.

Anatomical Record, 94, p. 238-248.

AMANN, R.P. & ALMQUIST, J.O. 1962. Reproductive capacity of dairy bulls. VIII.

Direct and indirect measurement of testicular sperm production. **Journal of Dairy Science**, 45, p. 774-781.

AMANN, R.P., 1970. Sperm production rates. In: Johnson, A.D., Gomes, W.R.,

Vandemark, N.L. (Eds.), **The Testis**. Academic Press, New York, pp. 433-482.

AMANN, R. P., JOHNSON, L., THOMPSON JR, D. L. PICKETT, B. W., 1976. Daily

spermatozoal production, epididymal spermatozoal reserves and transit time of spermatozoa through the epididymis of the Rhesus monkey. **Biology of Reproduction**, 15: 586-592.

AMANN, R.P. 1981. A critical review of methods of evaluation of spermatogenesis

from seminal characteristics. **Journal of Andrology**, 2: 37-58.

AMANN, R. P., SCHANBACHER, B. D. 1983. Physiology of male reproduction.

Journal of Animal Science Supplement. 57: 380-403.

BALARINI, M. K. 2008. Avaliação morfofuncional do testículo e do processo

espermatogênico de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*, Schreber, 1775) adulto. Dissertação (Mestrado em morfologia), Viçosa: **Universidade federal de Viçosa**, 60p.

BERNDTSON, W.E., DESJARDINS, C. 1974. The cycle of seminiferous epithelium

and spermatogenesis in the bovine testis. **American Journal of Anatomy**. 140: 167-180.

BERNDTSON, W.E. 1977. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a

review. **Journal of Animal Science**. 4, n.5: 18-83.

- BITTENCOURT, V.L., PAULA, T.A.R., MATTA, S.L.P., FONSECA, S.S., NEVES, M.T.D., COSTA, M.E.L., MALTA, M.C.C., COELHO, C.M., BASTOS, J.A.B., 2004. Evaluation of seminiferous epithelium cell population and indicative index of sperm production by testicular biopsy in adult maned Wolf (*Crysocyon brachyurus*, Illiger, 1811). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. 28 (2), 108–113.
- BITTENCOURT V L, PAULA T A R, MATTA S L P, FONSECA C C, COSTA D S, BENJAMIN L A, COSTA E P. 2007. The seminiferous epithelium cycle and daily spermatogenic production in the adult maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1811). **Mícron**, 38, 584-589.
- CARDOSO, F.M., GODINHO, H.P. 1985. Daily sperm production of zebus (*Bos indicus*) estimated by quantitative histology of the testis. **Theriogenology**. v.23, n.6, p.841-847.
- CLERMONT, Y. 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammals, seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. **Physiological Reviews**, 52:198-236.
- COSTA, D.S., PAULA, T.A.R. 2003. Espermatogênese em mamíferos. **Scientia**, 4: 53-72.
- COSTA, DS., HENRY, M.; PAULA, TAR. 2004. Espermatogênese de Catetos (*Tayassu tajacu*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, p. 46-51.
- DE ROOIJ, DG. 1998. Stem cells in the testis. **International Journal of Experimental Pathology**, 79:57-80.

- FRANÇA, L.R. 1991. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. Belo Horizonte: UFMG, 1991, 180p. Tese (Doutorado em Morfologia). **Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.**
- FRANÇA, L.R., RUSSELL, LD. 1998. The testis of domestic animals. In: Regadera, J. & M.-G. (eds.). **Male reproduction. A multidisciplinary overview.** Churchill Livingstone, Madrid, p. 197-219.
- FRANÇA, L.R., BECKER –SILVA, S.C., CHIARINI-GARCIA, H. 1999. The length of the cycle of the seminiferous epithelium in goats (*Capra hircus*). **Tissue & Cell.** 31: 274-280.
- GODINHO, HP., CARDOSO, FM.. 1979. Desenvolvimento sexual de porcos Yorkshire. II. Estabelecimento e evolução da espermatogênese. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.31, p.351-361.
- GRISWOLD, M. D. 1995. Interaction between germ cells and Sertoli cells in the testis. **Biology of Reproduction.** 52: 211-216.
- GROCOCK, C. A. & CLARK, J. R. 1976. Duration of spermatogenesis in the vole (*Microtus agrestis*) and the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). **Journal of Reproduction and Fertility.** 47: 133-135.
- GUIÃO LEITE, F.L., PAULA, T.A.R., MATTA, S.L.P., FONSECA, C.S., NEVES, M.T., BARROS, J.B.G., 2006. Cycle and duration of the seminiferous epithelium in puma (*Puma concolor*). **Animal Reproduction Science.** 91, 307–316.
- HOSKEN, F.M.; SILVEIRA, A.C. 2001. Criação de cutias. Viçosa, MG: **Aprenda fácil**, v.4, p.21-22.
- HUCKINS, C. 1978. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. **Anatomy Record.** 190(4), p. 905-26.

- IUCN (International Union for Conservation of Nature). "2006 IUCN Red List of Threatened Species" (On-line). Disponível em: [http:// www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org). Acesso em 20 de março de 2008.
- JOHNSON, L., PETTY, C.S., NEAVES, W.B. 1981. A new approach to qualification of spermatogenesis and its application to germinal cell attrition during human spermatogenesis. **Biology of Reproduction**, v. 25, p. 217-226.
- JOHNSON, L., VARNER, D. D., ROBERTS, M. E., SMITH, T. L., KEILLOR, G. E., SCRUTCHFIELD, W. L. 2000. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. **Animal Reproduction Science**. v. 60 - 61, p. 471 - 480, .
- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cellular Biology**, v.27, p.137-138, 1965.
- LEBLOND, C.P., CLERMONT, Y. 1952. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. **Annual New York Academic Science**, v.55, p.548-584.
- MATAMOROS, Y. 1981. Anatomía e histología del sistema reproductor del tepezcuinte (*Cuniculus paca*). **Revista de Biología Tropical**, 29(1): 155-164.
- MASCARENHAS, R.M., PAULA, T.A.R., MATTA, S.L.P., LANNA, L.L., FONSECACC., NEVES, M.T.D. 2006. Morfometria macro e microscópica e índices somáticos dos componentes testiculares de cães sem raça definida, da puberdade à senilidade. **Revista CERES**, n. 53. v. 305, p. 106-112.
- MONDOLFI, E. 1972. La Lapa o Paca – Mamíferos de caza de Venezuela. **Defensa De la Naturaleza**. v. 2 (5) : 4-16.
- NAVARRO, R.D., PAULA, T.A.R., MATTA, S.L.P., FONSECA, C.C., NEVES, M.T.D. 2004. Efeito da exposição pré e pós-natal ao ultra-som de baixa intensidade sobre a célula de Leydig e demais componentes do espaço intertubular do testículo de camundongos adultos. **Revista CERES**, n. 51, v. 296, p. 445-455.

- NOWAK, R. 1999. Walker's Mammals of the World, v. 2. **Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press**. 1936 p.
- ORTAVANT, R., COUROT, M., HOCHEREAU-DE-REVIERS, M.T. 1977. Spermatogenesis in domestic mammals. In: COLE, H.H., CUPPS, P.T. (ed.). **Reproduction in domestic animals** . 3 ed. New York: Academic Press. Cap.8, p. 203-227.
- ODD, J. L. & DE ROOIJ, D. G. 1977. Spermatogenesis in the chinese hamster. **Anatomical Record**. 187(1): 113-124.
- PAULA, T.A.R. 1999. Avaliação Histológica e Funcional do Testículo de Capivaras Adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Belo Horizonte: **Instituto de Ciências Biológicas da UFMG**, 84p. Tese (Doutorado em Morfologia).
- PAULA T.A.R., GARCIA H.C., FRANÇA L.R. 1999. Seminiferous epithelium cycle and its duration in capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*). **Tissue & Cell**, 31:327-334.
- PAULA, T. A. R.; COSTA, D. S.; MATTA, S. L. P. 2002. Avaliação histológica quantitativa do testículo de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). **Bioscience journal**, Uberlândia, v. 18, n. 1, p. 121-136.
- PASHOV, B. MATAMOROS, Y. 1984. Description histologica del epitelio seminifero del testiculo del tepezcuinte (Cuniculus paca, Brisson, 1762) e identificacion de sus diferentes etapas. **Ciência Veterinária**, v.1, p.9-15.
- PEIXOTO, J. V. 2006. Avaliação morfofuncional do testículo e do processo espermatogênico do periquitão-maracanã (*Aratinga leucophthalma* Muller, 1776) adulto, mantido em cativeiro, nas diferentes estações do ano. Viçosa: **Universidade Federal de Viçosa**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). 39 p.

- QUEIROZ, G. F. & NOGUEIRA, J. C. 1992. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium and quantitative histology of the testis of the south american white belly opossum (*Didelphis albiventris*), Marsupialia. **Reproduction, Fertility and Development**. 4: 213-222.
- ROBB, G. E., AMANN, R. P., KILLIAN, G. J. 1978. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. **Journal of Reproduction and Fertility**. 54: 103-107.
- ROCHA, D.C.M., DEBELJUK, L., FRANÇA, L.R., 1999. Exposure to constant light during testis development increases daily sperm production in adult Wistar rats. **Tissue & Cell**, 31 (3): 372-9
- ROMANO, H. S. ; PEREIRA, T. ; FONSECA, C. C. ; PAULA, T. A. R. ; NEVES, M. T. D. ; MATTA, S. L. P. 2002. Avaliação do testículo e do processo espermatogênico em 5 diferentes espécies de roedores. In: **XI Simpósio de Iniciação Científica, Viçosa, MG. Resumos...** Viçosa, MG : Universidade Federal de Viçosa, v. 1. p. 352-353.
- ROOSEN- RUNGE, EC. 1973. Germinal-cell loss in normal metazoan spermatogenesis. **Journal of Reproduction & Fertility**, v. 35, p. 339-348.
- RUSSELL, LD., PETERSON, RN. 1984. Determination of the elongate spermatid-Sertoli cell ratio in various mammals. **Journal of Reproduction & Fertility**, v. 70, p. 635-641.
- RUSSEL, L.D., ETTLIN, R.A., SINHA HIKIM, A.P., CLEGG, E.D. 1990. **Histological and histopathological evaluation of the testis**. Clearwater, FL, Cache River Press, 286 p.
- RUSSELL, L. D., CHANDRASHEKAR, V., BARTKE, A., SINHA-HIKIM, A. P. 1994. The hamsters Sertoli cell in early testicular regression and early recrudescence: a

stereological and endocrine study. **International Journal of Andrology**, v. 17(2), p. 93-106.

SETCHELL, B.P. 1982. Spermatogenesis and spermatozoa. In: Austin, C.R., Short, R.V. (ed). **Reproduction in mammalian**. London: Elek, v. 1, p. 63-101.

SHARPE, R. M. 1994. Regulation of spermatogenesis. In. Knobil, E. & Neil, J. D. (eds) **The physiology of reproduction**, 2ed. Raven Press, N.Y., p.1363-1434.

SILVA JR, V.A., VIEIRA, C.F.P., PAULA, T.A.R., PALMA, M.B., AMORIM, A.A., MANHÃES, R.C. 2006. Neonatal treatment with naloxone increases the population of Sertoli cells and sperm production in adult rats. **Reproduction Nutrition Development**. 46, p.157-166.

SMYTHE, N. 1987. The paca (*Cuniculus paca*) as a dosmetic source of protein the Neotropical, Humid Lowlands. **Applied Animal Behaviour Science**, 17:155-170.

SOUZA, P.C., PAULA, T.A.R., NATALI, A.J., MATTA, S.L.P., COSTA, D.S., FONSECA, C.C., SARTI, P. 2005. Efeito do exercício crônico voluntário e do sedentarismo, com e sem o uso do esteróide anabólico nandrolona, sobre os componentes do parênquima testicular de ratos adultos. **Revista CERES**, n. 53, v.300, p. 305-316.

STRADIOTTI, C. P. 2006. Anatomia dos órgãos reprodutivos do macho e método de coleta de sêmen em pacas (*Agouti paca*). **Universidade Estadual do Norte Fluminense**. Campos dos Goytacazes. Dissertação (Mestrado em anatomia), 47p.

SWIERSTRA, E.E. 1968. Cytology and duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the boar; duration of spermatozoan transit through the epididimys . **Anatomy Record**, v.161, p.171-186.

URENA, F., BOLANOS, R. 1988. Tipos de espermatogonios em “Tepezcuintle” (*Cuniculus paca*). Estúdio ultraestructural. **Revista de Biologia Tropical**, v.36:325-328.

WILSON, D., REEDER D. 1993. Mammal Species of the World. Washington, D. C.:
Smithsonian Institution Press. 2000 p.

8.0. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O objetivo do presente trabalho foi o estudo comparativo das características morfofisiológicas do testículo e do processo espermatogênico em capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*), cutias (*Dasyprocta leporina*) e pacas (*Cuniculus paca*) adultas. Os resultados obtidos nesta dissertação foram agrupados em quatro diferentes trabalhos visando à facilitação de sua divulgação em revistas e periódicos afins. A partir dos dados obtidos nos diferentes trabalhos foi possível concluir:

1- A proporção de massa corporal alocada em testículos foi de 0,11% em capivaras, 0,27% em cutias 0,28% na paca, sendo que este valor menor que o observado em roedores de menor porte. Os dados encontrados corroboram os dados da literatura sobre a relação inversa entre peso corporal e proporção corporal alocada em gônadas.

2- A proporção volumétrica de mediastino e albugínea testiculares em capivaras (12%) encontram-se no intervalo observado na maioria das espécies de mamíferos estudados, enquanto em cutias e pacas (8,12% e 5,87% respectivamente) estão abaixo desse intervalo.

3- A proporção volumétrica de túbulos seminíferos na cutia (93%) e paca (91%) encontra-se entre os valores mais altos entre os roedores já estudados. Na capivara esta proporção (50%) esta entre as mais baixas relatadas para mamíferos.

4- O diâmetro tubular e a altura do epitélio seminífero médios foram respectivamente, 213 μm e 79 μm em capivaras, 175 μm e 72 μm em cutias e 202 μm e 63 μm em pacas.

5- Os comprimentos de túbulos seminíferos por grama de testículo em cutias e pacas adultas (35,5 m/g e 26,7 m/g respectivamente) destacam-se como os maiores entre os mamíferos já estudados. O valor observado para a capivara encontra-se dentro do intervalo observado para os mamíferos já estudados

6- O índice tubulossomático (ITS) da capivara (0,06%), cutia (0,23%) e paca (0,24%) corroboram um comportamento poligínico descrito nestas espécies, estando estes entre os valores mais baixos dentro da ordem Rodentia.

7- Na cutia e pacas as células de Leydig e o tecido conjuntivo ocupam um volume muito pequena no compartimento intertubular, contrastando com extensos sinusóides ou espaços linfáticos interpostos aos túbulos seminíferos. As células de Leydig encontram-se revestidas por um endotélio visceral. Desta forma estas duas espécies foram classificadas como pertencentes ao padrão tipo I citado na literatura e à mesma subdivisão deste padrão onde estão incluídos espécies de roedores da superfamília Caviioidea.

8- A proporção volumétrica de células de Leydig no parênquima testicular da cutia (2,0%) e da paca (2,6%) encontra-se muito próximo ao observado para os roedores já estudados. A capivara apresentou a mais alta proporção do parênquima testicular alocado em células de Leydig (35%) entre os mamíferos já estudados.

9- O volume médio total de células de Leydig, em ambos os testículos foi de 21,3 ml em capivaras, 0,15 ml em cutias e 0,44 em pacas.

10- A proporção entre núcleo e citoplasma da célula de Leydig das espécies estudadas foi de respectivamente 14 e 86% em capivaras, 28 e 72% em cutias e 32 e 67% em pacas.

11- O volume individual da célula de Leydig e o índice leydigossomático (ILS) na cutia e paca são invariavelmente menores que dos demais roedores estudados. A capivara apresenta o maior valor relatado para o volume individual da célula de Leydig e valores próximos aos demais roedores estudados para o ILS.

12- A cutia apresentou valor médio 16 milhões de células de Leydig por grama de testículo, estando este levemente abaixo do intervalo descrito para mamíferos já estudados, enquanto a paca apresenta em média 35 milhões de células de Leydig por grama de testículo, valor este dentro do intervalo observado para os mamíferos já estudados. A capivara destaca-se com o valor de 126 milhões de células de Leydig por grama de testículo, estando este muito três vezes acima do limite descrito.

13- A população celular das diferentes células germinativas de capivaras, cutias e pacas, em secções transversais do túbulo seminífero no estágio 1 do CES, se apresentaram dentro do intervalo observado na superfamília Cavioidea.

14- As capacidades de suporte das células de Sertoli na cutia e paca são superiores aos valores de outros roedores e principalmente das diversas espécies de mamíferos domésticos já estudados, indicando uma grande eficiência destas células nessa espécie. A capivara apresentou valores semelhantes aos demais roedores estudados.

15- O processo de mitoses espermatogoniais apresenta uma perda de 93,23% em capivaras, 87,51% em cutias e 86,7% em pacas, caso estas possuam seis gerações de espermatogônias.

16- O rendimento meiótico e o rendimento geral da espermatogênese demonstram uma perda do valor total teoricamente esperado respectivamente de 47,25% e 92,5% em capivaras, 30% e 91,2% em cutias e 38,5 % e 93 %, estando dentro da amplitude observada para os demais mamíferos estudados.

17- A duração do CES observada em capivaras (10,39 dias) e pacas (8,57 dias) encontra-se dentro do intervalo observado para as diversas espécies de roedores já estudados, enquanto a cutia apresentou a menor duração já relatada para um roedor (5,86 dias).

18- A reserva espermática por grama de testículo é de 105 milhões de espermatozoides em capivaras, 290 milhões em pacas e 674 milhões em cutias.

19- O valor da produção espermática por grama de testículo em cutias (115 milhões) foi extremamente superior à diversas espécies de mamíferos domésticos e selvagens já estudados, inclusive ao valor observado em pacas (34 milhões) e capivaras (10 milhões).