

JULIANO VOGAS PEIXOTO

**AVALIAÇÃO MORFOFUNCIONAL DO TESTÍCULO E
DO PROCESSO ESPERMATOGÊNICO DO
PERIQUITÃO-MARACANÃ (*Aratinga leucophthalma*
MULLER, 1776) ADULTO, MANTIDO EM CATIVEIRO,
NAS DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2006**

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

T

P379a
2006

Peixoto, Juliano Vogas, 1980-

Avaliação morfofuncional do testículo e do processo espermatogênico do periquitão-maracanã (*Aratinga leucophthalma* MULLER, 1776) adulto, mantido em cativeiro, nas diferentes estações do ano / Juliano Vogas Peixoto. – Viçosa : UFV, 2006. xii, 39f. : il. ; 29cm.

Orientador: Tarcízio Antônio Rêgo de Paula.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 33-39.

1. *Aratinga leucophthalma* - Morfologia - Testículos.
2. *Aratinga leucophthalma* - Reprodução. 3. Testículos - Fisiologia. 4. Espermatogênese em animais. 5. Animais silvestres - Conservação. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 636.6865089163

JULIANO VOGAS PEIXOTO

**AVALIAÇÃO MORFOFUNCIONAL DO TESTÍCULO E DO PROCESSO
ESPERMATOGÊNICO DO PERIQUITÃO-MARACANÃ (*Aratinga
leucophthalma* MULLER, 1776) ADULTO, MANTIDO EM CATIVEIRO,
NAS DIFERENTES ESTAÇÕES DO ANO.**

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

APROVADA: 30 de novembro de 2006.

Prof. Laércio dos Anjos Benjamin
(Co-orientador)

Prof. Sérgio Luís Pinto da Matta
(Co-orientador)

Prof. Cláudio César Fonseca

Prof^a. Flaviana Lima Guião Leite

Prof. Tarcízio Antônio Rêgo de Paula
(Orientador)

À aqueles que me deram asas para voar bem alto: meus queridos pais José Luiz e Jucelem, e meu irmão Guilherme.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu amparo e refúgio. Aquele que concedeu o caminho, a verdade e a vida.

Aos meus pais José Luiz e Jucelem, por concretizarem comigo os meus sonhos. Pelo amor, amparo e por todas as orações. Amo vocês.

Ao meu irmão Guilherme, por ser amigo e companheiro. Meus finais de semana foram mais alegres com você aqui!

A todos os meus primos e tios que me acompanharam e torceram por mim todos esses anos.

A minha namorada Laine. Seu amor soube vencer as minhas limitações fazendo com que eu te admirasse ainda mais. Te amo.

Ao Professor Tarcízio. Mais que um orientador. Um amigo, cuja companhia nos dava a segurança de que pra tudo se dava um jeito. E jeito “bão”!

Se quem achou um amigo, achou um tesouro, eu já estou milionário! Valeu por fazerem parte da minha vida! Aos amigos da Capela-UFV, de Viçosa, de Valão do Barro, São Paulo, Rio e de tantos outros lugares.

A minha e tão amada família do Grupo Católico de Estudo Bíblico SEMENTE: Nathália, Samuel, Val, Flávio, Nínive, André, Vivi, Renato, Ana Cris, Mirian, Fernandinha, Fernandona e todos aqueles que passaram por lá. Vocês são peças fundamentais em minha vida.

Ao CETAS-UFV por me tornar Veterinário de verdade e por exercer tão bela função pela proteção dos animais silvestres.

Aos CETAS-MEN: Alexandre, Gê, Simone, Cecília, Anna, Tássia, Thaís, Thyara, César, Clarisse, Ingrid, Letícia, Diana, Rodrigo, Mara e a todos que deram sua contribuição pelo CETAS-UFV. Vocês fazem a vida se tornar mais engraçada.

Aos colegas Éder, Melissa, Morgana, Mirian, Paulo, Sandra, Priscilla, João Bosco, Adolfo, Marcelle, Flavia, Áurea, Camila e tantos outros com quem vivi bons momentos.

Àqueles que se doaram junto comigo: Maytê, Moacir, Bianca, Rebeca e Marcos. A companhia de vocês fez os problemas se tornarem mais fáceis de serem vencidos. As noites foram mais curtas e os dias mais alegres. Meus grandes suportes. “Uiii”!

Aos estagiários e amigos, Monique e Vinícius, pela grande ajuda.

A Regina, Tarcizinho e Rebeca que me fizeram sentir “de casa”. A Abgail, Juju, Mustache e Teobaldo que sempre estavam dispostos a um momento de carinho e atenção em meio ao cansaço.

Aos professores Cláudio, Laércio e Marco Túlio (*in memoriam*) do Setor de Morfologia do DVT pela amizade, confiança e conselhos valiosos.

À Professora e amiga Flaviana, por fazer parte da minha banca.

Ao “capitão do Beagle” - Laboratório de Sistemática Molecular do Departamento de Biologia Animal da UFV, professor Jorge Dergan e sua tripulação Lucione, Tiago, Lílian e Thuani. A Gisele, meu braço direito nas análises, por sua amizade e ajuda constante. Vocês me receberam de braços abertos e merecem todo o meu respeito e carinho.

Ao professor Sérgio da Matta por compartilhar todo o seu conhecimento e seus momentos de descontração. A Sirlene, Dani, Marcos e todos os outros amigos e professores do Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral da UFV.

A todos os funcionários do DVT, em especial a Rose (sua disposição em nos ajudar, me encanta!), Divina, Soninha, Luciano, Geraldinho, Sergio, Bel, Eloísa, Cláudio, Adão, Aécio, Lucinda, Maninha, Toninho e Zé de Oliveira.

À Universidade Federal de Viçosa e a todos os professores do DVT por compartilharem seus conhecimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

Aos periquitões-maracanãs que doaram um fragmento pra que todo esse trabalho pudesse ser realizado.

Eternamente grato.

BIOGRAFIA

JULIANO VOGAS PEIXOTO, filho de José Luiz Dias Peixoto e Jucelem Vogas Peixoto, nasceu em 10 de dezembro de 1980, em Cordeiro, Estado do Rio de Janeiro.

Residente em Valão do Barro, interior do Estado do Rio de Janeiro, concluiu o Ensino Fundamental no Colégio Estadual Januário de Toledo Pizza em 1995, nesta mesma localidade.

Em 1996 ingressou no sistema GRAFITE/SEI, Município de Itaocara, Estado do Rio de Janeiro, onde realizou os estudos do Ensino Médio.

Em fevereiro de 2000 ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa - Minas Gerais, no qual se graduou em janeiro de 2005.

Em março de 2005, ingressou no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária com área de concentração em Morfologia, pelo Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa - Minas Gerais.

“Não basta ouvir o canto dos pássaros, é preciso entender a letra.”
(São Francisco de Assis)

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
1.0. INTRODUÇÃO.....	1
2.0. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Família Psittacidae – <i>Aratinga leucophthalma</i>	4
2.2. Órgãos reprodutores masculinos das aves.....	5
2.2.1. O compartimento tubular e as células de Sertoli.....	7
2.2.2. O compartimento intertubular e as células de Leydig.....	8
2.3. Sexagem em aves.....	8
2.3.1. Sexagem por celioscopia.....	9
2.2.2. Sexagem por análise citogenética.....	9
2.2.3. Sexagem por análise de hormônios.....	9
2.2.4. Sexagem por diagnóstico por imagem.....	10
2.2.5. Sexagem por análise de DNA.....	10
2.4. Reprodução – ciclo sazonal.....	11
2.5. Biópsia testicular.....	12
3.0. OBJETIVOS.....	13
4.0. MATERIAL E MÉTODOS.....	14
4.1. Animais.....	14
4.2. Sexagem por PCR.....	15
4.2.1. Extração do DNA.....	16

4.2.2. Amplificação do DNA.....	16
4.2.3. Eletroforese e revelação do gel.....	17
4.6. Biópsia testicular.....	18
5.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
6.0. CONCLUSÕES.....	32
7.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

RESUMO

PEIXOTO, Juliano Vogas, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 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.** Orientador: Tarcízio Antônio Rêgo de Paula. Co-orientadores: Sérgio Luís Pinto da Matta e Laércio dos Anjos Benjamin.

Para o presente experimento foram utilizados fragmentos testiculares de 14 periquitões-maracanã (*Aratinga leucophthalma*) adultos, provenientes do Centro de Triagem de Animais Silvestres da UFV, para a avaliação sazonal da atividade reprodutiva através dos seguintes parâmetros: espessura média da albugínea testicular, proporção volumétrica dos compartimentos tubular e extratubular, diâmetro médio do túbulo seminífero, além do peso corporal. Para tal, os animais foram distribuídos em quatro grupos e tiveram fragmentos testiculares coletados nas seguintes datas: 06/02/2006, 11/05/2006, 16/08/2006 e 07/11/2006, correspondendo ao período intermediário das estações de verão, outono, inverno e primavera, respectivamente. Os animais submetidos à anestesia geral volátil foram biopsiados por meio de celioscopia. Os fragmentos coletados foram processados histologicamente para confecção de lâminas, que foram avaliadas ao microscópio de luz. Os valores médios sazonais de peso corporal foram crescentes a partir do inverno, culminando com as maiores médias durante a primavera. Um ciclo testicular sazonal foi observado em *A. leucophthalma*, uma vez que valores significativamente maiores de proporção volumétrica de túbulos seminíferos, diâmetro médio dos túbulos seminíferos e grau de desenvolvimento espermatogênico foram observados na primavera, em relação aos valores mínimos destes parâmetros observados no outono. A espessura média da albugínea testicular foi significativamente maior durante o outono, apresentando decréscimo gradativo até atingir valores significativamente menores na primavera. Os parâmetros da produção espermática avaliados em *A. leucophthalma*, nas diferentes estações do ano, apresentaram alta correlação positiva com a luminosidade média diária ($p < 0,1$) e alta correlação negativa com a umidade relativa do ar ($p < 0,1$). Conclui-se que durante a primavera, os testículos de *A. leucophthalma* apresentam os valores dos parâmetros

qualiquantitativos de produção espermática compatíveis com período de maior atividade reprodutiva, o inverso acontecendo durante o outono.

ABSTRACT

PEIXOTO, Juliano Vogas, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November of 2006. **Morphofunctional evaluation of the testicle and the spermatogenic process of white-eyed parakeet (*Aratinga leucophthalma* MULLER, 1776), adult, in captivity, during the different seasons of the year.** Adviser: Tarcízio Antônio Rêgo de Paula. Co-Advisers: Sérgio Luís Pinto da Matta e Laércio dos Anjos Benjamin.

For this experiment it was utilized testicles fragments from 14 adults White-Eyed Parakeet (*Aratinga leucophthalma*), proceeding from the Centro de Triagem de Animais Silvestres - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brazil. The fragments were evaluated for seasonal reproductive activities using the following parameters: average thickness of testicular tunica albuginea, volumetric proportion of tubular and extratubular compartment, average diameter of the seminiferous tubules, and in addition the average of corporal weight. For this experiment the animals were distributed into four groups and had collected testicular fragments on the following dates: February 6, 2006, May 11, 2006, August 16, 2006 and November 7, 2006. These dates corresponded to the seasons of Summer, Fall, Winter and Spring respectively. The animals were submitted to general anesthesia, using a volatile gas, and a incisional biopsy was made using celioscopy. The fragments collected were processed histologically, the slides were prepared and later evaluated using an optical microscope. The average seasonal values of body weight increased starting at the Winter and reaching the peak during the Spring. A seasonal testicle cycle was observed in *Aratinga leucophthalma*, since increased significant values of volumetric proportion of seminiferous tubules, average diameter of the seminiferous tubules and degree of spermatogenic development were observed during the Spring, in contrast with the minimum values of these same parameters observed during the Fall. Furthermore, the average thickness of the testicular tunica albuginea was significantly greater during the Fall, showing a significant and gradual decrease of the values during the Spring. The evaluated parameters of spermatogenic production in *Aratinga leucophthalma*, during the different seasons, showed strong positive correlations with the average daily light ($p < 0,1$) and strong negative correlation with the relative air humidity ($p < 0,1$). In conclusion, during the Spring the testicles of the *Aratinga leucophthalma* show the values of the quantitative parameters of spermatogenic

production, compatible with the period of greater activity, the opposite happening during the Fall.

1.0. INTRODUÇÃO

Os psitacídeos possuem características muito marcantes, como a plumagem multicolorida, o bico fortemente recurvado, o quarto dedo deslocado caudalmente junto ao primeiro e alto grau de assimilação e reprodução de vocábulos humanos. Seus principais representantes são as araras e os papagaios (COLLAR, 1997; SICK, 1997).

A destruição de seus *habitats* e o comércio ilegal para sua venda como animais de estimação ou de coleções, faz com que muitas espécies estejam ameaçadas de extinção. O caso mais grave é o da ararinha-azul (*Cyanopsitta spixii*), extinta na natureza e tendo no Brasil apenas oito indivíduos em cativeiro. Provavelmente, dentre todos os animais silvestres, os psitacídeos são os mais visados pelo tráfico de animais silvestres que movimenta um comércio de milhões de dólares por ano (BIRDLIFE, 2000). Diante desse quadro, se fundamenta a importância de estudos da morfofisiologia reprodutiva, os quais possuem grande potencial de informação para o desenvolvimento de protocolos de reprodução assistida que poderão, de maneira muito direta, contribuir decisivamente na conservação destas espécies.

O periquitão-maracanã (*Aratinga leucophthalma*) possui cor predominantemente verde, com algumas penas vermelhas nas faces laterais da cabeça, pescoço e asas (Figura 1), apresentando tamanho e peso corporal intermediários aos demais psitacídeos (SICK, 1997). É sexualmente monomórfico, sendo observado aos pares, em família ou em bandos de 10 a 30 indivíduos (COLLAR, 1997). Vive nas orlas das matas e se distribui pelas Américas Central e do Sul, sendo encontrado em todos os estados do Brasil, excluindo a porção mais ocidental da Amazônia. Apesar dessa espécie se encontrar listada no Apêndice II da CITES - *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora* (2006), que a classifica como fora da lista de animais ameaçados de extinção, sua utilização para qualquer finalidade está sob controle do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA. Sua população é abundante em algumas regiões do Brasil, estando envolvido na destruição de plantações de grãos e frutas, além de ser acusado como responsável por

curtos-circuitos ao bicar fios elétricos (SICK, 1997). O aparecimento de filhotes se dá no fim da primavera e no verão (PEIXOTO et al., 2006).



Figura 1 - *Aratinga leucophthalma* adulta.

A maioria das espécies de aves são reprodutores sazonais, cujos mecanismos fisiológicos que regulam a gametogênese são sincronizados por estímulos do ambiente, assegurando que o nascimento de filhotes ocorra nos períodos anuais mais favoráveis à sua sobrevivência (IMMELMANN, 1971). A época de reprodução das aves do Brasil é indicada geralmente como sendo de setembro a janeiro, aparentemente de forma pouco dependente dos fatores climáticos observados nas diferentes regiões tropicais. Embora inúmeras variações ocorram entre as diferentes espécies de aves, a maior atividade de reprodução concentra-se em outubro, reduzindo em abril e maio, o que corresponde à primavera e ao outono austrais, respectivamente (SICK, 1997).

Dois conjuntos de fatores colocam-se como definitivos na regulação da sazonalidade reprodutiva das aves: fatores ecológicos, como suprimento de alimentação, competição interespecífica, condições de nidificação, condições sociais

e pressão de predação; e fatores climáticos, como fotoperíodo, temperatura, umidade relativa do ar e precipitação pluviométrica (IMMELMANN, 1971). De acordo com este autor, as adaptações aos fatores ecológicos exercem maior influência sobre a sazonalidade reprodutiva que os fatores climáticos que contribuem apenas indiretamente, por meio de mudanças na vegetação e suprimento de alimentação.

Apesar da fisiologia testicular em mamíferos ser estudada rotineiramente, não há muita informação para outras classes de animais, particularmente em aves. Conseqüentemente não é possível tecer muitos comentários sobre a produção de células germinativas nas aves, assim como suas adaptações evolucionárias e fisiológicas, como as relacionadas à homeotermia e fertilização (JONES & LIN, 1993).

O parênquima testicular das aves apresenta semelhança com o observado em mamíferos, com a presença de uma massa de túbulos seminíferos convoluídos e agrupamentos intertubulares de tecido conjuntivo frouxo, contendo capilares sanguíneos, espaços linfáticos e células intersticiais ou de Leydig produtoras de hormônios esteróides sexuais (LOFTS & MURTON, 1973). Desta forma o testículo pode ser dividido funcionalmente em dois compartimentos básicos: o tubular ou espermatogênico e o extratubular ou androgênico (LOFTS & MURTON, 1973).

As principais abordagens utilizadas como indicadores da atividade espermatogênica em experimentos que envolvam a função testicular, utilizam a mensuração do diâmetro tubular, espessura do epitélio seminífero e a quantificação da proporção volumétrica dos diferentes componentes do parênquima testicular, uma vez que estes são diretamente relacionados com a produção espermática (ATTAL & COUROT, 1963; GODINHO & CARDOSO, 1979; SINHA-HIKIM et al., 1988; RUSSELL et al., 1994; MUÑOZ et al., 1998; FRANÇA & CARDOSO, 1998).

Assim como para a maioria das aves silvestres, poucos são os estudos sobre a morfofisiologia reprodutiva de psitacídeos, levando à escassez de conhecimentos sobre a reprodução dessas aves. O desenvolvimento de protocolos de reprodução assistida em espécies da fauna brasileira que se encontram em vias de extinção, como grande parte dos psitacídeos, é essencial para garantir a sobrevivência e proliferação destes animais. A utilização de biotécnicas reprodutivas, associadas à preservação do seu *habitat* natural, pode possibilitar o aumento do número de indivíduos, auxiliando a sobrevivência da espécie.

2.0. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Família Psitacidae – *Aratinga leucophthalma*

A ordem Psitaciforme é considerada por parte dos pesquisadores como constituída por uma única família, a Psitacidae. Porém, alguns autores classificam-na em três grandes famílias: a Loridae, representada pelos lóris; a Cacatuidae, representada pelas cacatuas e a Psitacidae, composta pelos papagaios, araras, periquitos, jandaias e maracanãs (COLLAR, 1997; SICK 1997).

As aves da família Psitacidae encontram-se amplamente distribuídas pelo globo terrestre, sendo encontradas desde áreas tropicais até regiões bastante frias. É composta por 78 gêneros e 332 espécies, sendo 148 encontradas no Novo Mundo e 184 no Velho Mundo. Cerca de 100 delas estão na América do Sul sendo 80 encontradas no Brasil. Por isso o Brasil é considerado o mais rico do mundo em representantes desta família, onde vivem ainda seus maiores representantes, as araras. Em textos antigos, como mapas datados de 1500, o Brasil tem sido referido como a “Terra dos Papagaios” (*Brasilia sive terra papagallorum*), (COLLAR 1997; SICK 1997).

Segundo o Censo Mundial de Psitaciformes ameaçados de extinção, realizado em 1994, 86 (26%) das 332 espécies de psitacídeos do mundo estão em risco de extinção, sendo 36 altamente ameaçadas (BIRDLIFE, 2000). Esta proporção é acentuada em relação às demais famílias de aves, principalmente devido à peculiar vulnerabilidade dos papagaios à contínua destruição de seus *habitats* e à calamitosa captura de exemplares na natureza para o tráfico ilegal (BIRDLIFE, 2000). Os casos mais críticos são: o da ararinha-azul (*Cyanopsitta spixii*), considerada extinta na natureza e com aproximadamente 60 indivíduos em cativeiro, sendo 8 no Brasil (IBAMA, 2004), e o da arara-azul-de-lear (*Anodorhynchus leari*), com aproximadamente 455 indivíduos de vida livre na região conhecida como Raso da Catarina, ao nordeste do estado da Bahia (OLMOS, 2003).

Poucas famílias possuem características tão específicas, sendo imediato o reconhecimento de um exemplar de um psitacídeo. Entre elas, o bico curto de base larga, com a maxila intensamente curvada e ajustada sobre a mandíbula, extremamente móvel, permitindo variados movimentos. A língua e a estrutura

muscular da maxila são altamente desenvolvidas, estando intimamente relacionada à grande força e controle para apreensão, preparo e ingestão de alimento (SICK, 1997). Segundo Collar (1997), estes animais apresentam cabeça sempre proporcionalmente grande e larga e o pescoço curto. Os membros pélvicos são zigodáctilos, com escamas granulares e invariavelmente curtos. Ainda existe uma tendência de desaparecimento da glândula uropigiana nos psitacídeos neotropicais, sendo que os gêneros *Amazona*, *Pionus* e *Brotogeris* não a possuem (SICK, 1997).

O periquitão-maracanã (*Aratinga leucophthalma*) possui cabeça em forma oval, cor predominantemente verde, com algumas penas vermelhas nas faces laterais da cabeça, pescoço e asas, não apresentando dimorfismo sexual. As penas da face ventral das asas demonstram uma coloração amarelada, chamando atenção ao vôo por destoarem do verde característico. Apresenta região perioftálmica nua e branca, o que lhe confere o nome, em inglês, de “white-eyed parakeet”. Sua íris apresenta coloração alaranjada e seu bico é de cor clara (SICK, 1997). Segundo RUSCHI (1979), possuem em média 320 mm de comprimento, sendo 155 mm somente de cauda, 178 mm de asa, 28 mm de bico e 20 mm de tarso. Vive nas orlas das matas e possui distribuição pelas Américas Central e do Sul, sendo encontrado em todos os estados do Brasil, excluindo a porção mais ocidental da Amazônia. São animais que vivem em bandos e são extremamente barulhentos. Não se encontram na lista do IBAMA (2006) de animais ameaçados de extinção e são considerados pragas em algumas regiões do Brasil, por destruírem plantações de grãos e frutas, além de serem acusados como responsáveis por curtos-circuitos ao bicarem fios elétricos. A casuística de atendimento a filhotes de *Aratinga leucophthalma* se dá no fim da primavera e no verão em Centros de Triagem de Animais Silvestres na Zona da Mata mineira e interior de São Paulo (PEIXOTO et al., 2006; GRANDO, 2002). A idade reprodutiva desta espécie é estimada para os machos a partir dos 18 meses de idade (GRANDO, 2002).

2.2. Órgãos reprodutores masculinos das aves

Os órgãos reprodutores dos machos das aves são constituídos bilateralmente por testículos, epidídimos e ductos deferentes, localizados no interior da cavidade celomática (JONES & LIN, 1993). Os testículos estão suspensos por uma pequena prega peritoneal, o mesórquio, situando-se medialmente ao pólo cranial dos rins. Em

alguns machos, e na maioria das fêmeas em procriação, as gônadas podem estender-se sob todo o pólo cranial dos rins, inclusive às adrenais. O testículo é revestido por uma cápsula de tecido conjuntivo, a albugínea testicular, envolta pela túnica *vaginalis*, que se trata de uma extensão do peritônio. Ademais, a túnica albugínea não envia septos conjuntivos para o centro dos testículos dividindo-o em lóbulos, como ocorre em mamíferos (LOFTS & MURTON, 1973; JONES & LIN, 1993).

Em espécies de reprodução sazonal em zonas temperadas, o testículo está sujeito a uma grande variação anual em seu tamanho, em algumas chega a ser superior a 400 vezes. Este aumento considerável de tamanho pode confundi-los com neoplasias, em radiografias (HARRISSON, 1994). O ciclo de crescimento e regressão testicular observado em espécies de aves com reprodução sazonal, se reflete em uma grande variação na espessura da albugínea testicular ao longo do ano. O crescimento dos túbulos seminíferos impõe um estiramento desta túnica no período reprodutivo, tornando-a mais delgada. Há uma substituição anual desta túnica devido a uma proliferação de fibroblastos, profundamente à antiga cápsula. O surgimento destes fibroblastos acontece no período de regressão dos testículos e por algum tempo pode-se observar a presença de duas camadas revestindo o testículo (LOFTS & MURTON, 1973).

O testículo esquerdo é ligeiramente maior que o direito, particularmente em pássaros jovens (JONES & LIN, 1993; HARRISSON, 1994; EVANS, 1996). Os testículos são geralmente brancos quando ativos e tornam-se escuros em estado de repouso reprodutivo. Os epidídimos não são facilmente visualizados, enquanto os tortuosos ductos deferentes surgem próximos à porção medial dos testículos e correm paralelos aos ureteres, desembocando caudalmente no interior da cloaca, onde formam o ducto ejaculatório. Os ductos deferentes são bastante evidentes em época reprodutiva, mostrando-se ingurgitados e tortuosos à celioscopia, facilitando a sua diferenciação dos ureteres (HARRISSON, 1994).

Glândulas acessórias macroscópicas estão ausentes nos órgãos reprodutores em psitacídeos, sendo o fluido seminal produzido pelos túbulos seminíferos e ductos eferentes. Diferente de outras aves como galos, perus, patos e avestruzes, os psitacídeos não apresentam o *falus*, estrutura análoga ao pênis dos mamíferos (HARRISSON, 1994).

2.2.1. O compartimento tubular e as células de Sertoli

Assim como nos mamíferos, nas aves os túbulos seminíferos formam uma massa enovelada, porém, ao contrário daqueles, são anastomosados, formando uma complexa cadeia de comunicação ao longo do testículo (LOFTS & MURTON, 1973). Segundo JONES & LIN (1993), a superfície interna dos túbulos seminíferos das aves é recoberta por um epitélio de células não germinativas de sustentação ou células de Sertoli e quatro tipos básicos de células germinativas: espermatogônias, espermatócitos primários, espermatócitos secundários e espermátides, todas envolvidas no processo de espermatogênese.

As células de Sertoli são responsáveis pela nutrição das células germinativas, secreção de fluidos e proteínas, liberação de espermatozóides no lume tubular, fagocitose de células germinativas em apoptose e do excesso de citoplasma das espermátides em espermiogênese, além de função mediadora da ação do FSH e da testosterona na espermatogênese (PAULA, 1999). Estudos sobre a estrutura das células de Sertoli de galo e pato indicaram que são semelhantes às de mamíferos, sendo facilmente distinguidas no epitélio germinativo pelo grande tamanho e forma irregular (JONES & LIN, 1993). Assim como em mamíferos, as células de Sertoli além de atuarem no suporte físico para as células germinativas, são também responsáveis pela formação de uma barreira hematotesticular, por meio de junções citoplasmáticas complexas caracterizadas por zonas de oclusão e desmossomas (PELLETIER, 1990).

Um ciclo testicular evidente é observado em aves sazonais. Assim, durante o período de quiescência sexual, o epitélio germinativo consiste de uma única camada de espermatogônias e células de Sertoli, não sendo observado um lume tubular evidente. Entretanto, com o advento da estação reprodutiva, uma recrudescência da atividade mitótica nas espermatogônias tronco causa a propagação de numerosas células germinativas, as quais maturam sucessivamente até o completo restabelecimento da atividade espermatogênica (LOFTS & MURTON, 1973).

2.2.2. O compartimento intertubular e as células de Leydig

Nas aves o compartimento intertubular é formado por tecido conjuntivo, vasos sanguíneos, espaços linfáticos e células intersticiais ou de Leydig, principais responsáveis pela produção dos hormônios sexuais masculinos. Além disso, grande número de melanoblastos podem ser observados neste compartimento em algumas espécies, conferindo uma coloração negra ou acinzentada a este órgão (LOFTS & MURTON, 1973; JONES & LIN, 1993; CROSTA et al., 2003). Com a proliferação sazonal observada no epitélio germinativo e conseqüente expansão dos túbulos seminíferos no período reprodutivo, o tecido intersticial torna-se confinado a restritos espaços intertubulares. Já nos animais fora da estação reprodutiva o tecido intertubular torna-se mais facilmente visualizado (LOFTS & MURTON, 1973). As células de Leydig das aves sofrem um ciclo de mudanças histofisiológicas bem definido que acompanha o ciclo testicular. Aparentemente as células de Leydig são derivadas de células semelhantes a fibroblastos nas áreas intertubulares e tornam-se mais globulosas, com grande quantidade de gotículas de colesterol no citoplasma, durante a fase de preparação para a atividade reprodutiva. Já no período de máxima atividade reprodutiva estas células permanecem globulosas, mas perdem grande parte das gotículas lipídicas acumuladas. Após a fase reprodutiva o testículo diminui a atividade espermatogênica e androgênica, reduzindo drasticamente a área de túbulos seminíferos e o número total de células de Leydig (LOFTS & MURTON, 1973; CESÁRIO, 1994).

2.3. Sexagem em aves

As aves, em sua maioria, caracterizam-se morfologicamente pela exuberância em suas cores e formato de penas, principalmente o macho, que utiliza esta característica como um atrativo para as fêmeas no período reprodutivo. Porém, algumas espécies não apresentam um marcado dimorfismo sexual, seja este temporário, como observado durante a fase jovem da vida de alguns passeriformes, ou definitivo, como na maioria dos psitacídeos. Várias metodologias podem ser empregadas para a diferenciação sexual de aves monomórficas, dentre elas a celioscopia, a análise citogenética, a análise de hormônios, o diagnóstico por imagem e a análise de DNA.

2.3.1. Sexagem por celioscopia

Um dos métodos mais confiáveis de sexagem de aves é a identificação direta da gônada por meio de celioscopia. Esta metodologia é baseada em uma intervenção cirúrgica na qual, através de pequena incisão na região formada por um triângulo imaginário tendo como vértices o fêmur esquerdo, o púbis e a última costela, acessa-se o interior da cavidade celomática e identifica-se a gônada (RASO & WERTHER, 2004). Esta identificação pode ser feita por meio de observação direta ou por instrumentos ópticos como o otoscópio e o endoscópio (PACHALY, 1992). A celioscopia permite ainda a avaliação da higidez da gônada e a condição reprodutiva da ave. Embora seja um método muito preciso em animais adultos, pode mostrar-se pouco eficiente na diferenciação em aves jovens ou que apresentam grande acúmulo de gordura intracelomática. Esta técnica incorre ainda em riscos como hemorragias, acidente anestésico, infecções e formação de enfisema subcutâneo pós-cirúrgico.

2.2.2. Sexagem por análise citogenética

A análise citogenética do sexo é baseada na cariotipagem e identificação do cromossomo W, que é restrito às fêmeas das aves. Esta técnica permite ainda o estabelecimento de relações taxonômicas e evolutivas entre os vários grupos (LUCCA & ROCHA, 1992). Para o desenvolvimento desta técnica é necessário o acesso a cromossomos na fase metafásica, podendo ser utilizada cultura de linfócitos do sangue periférico ou de polpa de penas ou ainda células da medula óssea e de embriões. Os cromossomos são então contados, medidos e analisados morfológicamente (GIANNONI et al., 1986). É uma técnica precisa, porém trabalhosa e demorada, podendo levar até 20 dias para a obtenção dos resultados (GIANNONI et al., 1986; LUCCA & ROCHA, 1992).

2.2.3. Sexagem por análise de hormônios

A sexagem de aves por análise de hormônios baseia-se na identificação da relação estrógeno x testosterona, presente na circulação sanguínea ou nas fezes. Em ambos os casos há uma limitação da técnica às aves adultas em período reprodutivo. Estas técnicas apresentam ainda resultados não totalmente confiáveis embora a

análise fecal apresente a grande vantagem de não ser invasiva, não submetendo, desta forma as aves ao estresse de contenção (DIAS, 2003).

2.2.4. Sexagem por diagnóstico por imagem

As técnicas de sexagem por imagem em aves são ainda limitadas e pouco precisas, sendo que o uso da ultra-sonografia transcloacal permite a identificação do oviduto esquerdo em aves de rapina e pinguins adultos (HILDEBRANDT et al., 1995; HILDEBRANDT et al., 1996). GRANDO (2002) sugere a sexagem com a utilização de tomografia por ressonância magnética nuclear em *Aratinga leucophthalma* e embora concluindo pela eficiência da técnica, seus resultados foram limitados somente à observação de gônadas bem desenvolvidas em animais adultos. Esta técnica incorre ainda em riscos de acidentes anestésicos e limita-se a equipamentos caros e não portáteis.

2.2.5. Sexagem por análise de DNA

A sexagem por meio do DNA baseia-se na análise quantitativa ou qualitativa do cromossomo W presente apenas nas fêmeas das aves. Para a análise quantitativa, utiliza-se um citômetro de fluxo, o que torna esta técnica dispendiosa além de pouco precisa, não sendo capaz da identificação sexual em todos os casos (GRANDO, 2002). Já a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) é uma técnica qualitativa extremamente confiável e pouco invasiva. Esta técnica utiliza *primers* de dois genes conservados CHD (cromo-helicases ligantes de DNA): P8(5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3') e P2(5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3'). O gene CHD-W localiza-se no cromossomo W e, portanto restrito às fêmeas e o CHD-Z, presente em machos e fêmeas. Os *primers* utilizados amplificam uma banda nos machos ZZ e duas bandas nas fêmeas ZW, as quais apresentam diferentes comprimentos pela presença de íntrons (GRIFFITHS et al., 1998). Assim, esta técnica consiste na extração e amplificação de segmentos específicos do DNA da amostra, correspondentes aos genes CHD-W da fêmea e CHD-Z do macho e da fêmea. Estes são então depositados sobre colunas de gel polimerizado de poliácridamida e submetidos à eletroforese de 80v, o que separa especificamente estes fragmentos em bandas identificáveis (GRIFFITHS et al., 1998).

2.4. Reprodução – ciclo sazonal

De modo geral, as aves apresentam um ciclo reprodutivo adaptado às estações do ano. Nas regiões tropicais a principal influência sazonal na reprodução das aves são as estações seca e chuvosa, sendo que a primeira compreende o outono e o inverno e a segunda a primavera e o verão, não havendo influência ponderável do fotoperíodo, que regula este ciclo em latitudes mais elevadas (RUSCHI, 1979). Assim, as principais causas para o desenvolvimento de um ciclo reprodutivo em aves tropicais é a fartura de alimentos dependente da precipitação pluviométrica, uma vez que a oferta qualiquantitativa de alimentos é preponderante para a manifestação reprodutiva e um fator facilitador da criação da prole (RUSCHI, 1979).

Também exercem influência na ciclicidade reprodutiva a temperatura, a disponibilidade de material para confecção do ninho e o exercício muscular (SICK, 1997). O comportamento sexual cíclico observado nas aves é decisivamente dependente da variação sérica anual de hormônios sexuais e na maioria das aves silvestres, a atividade reprodutiva ocorre todos os anos no mesmo período. No Brasil, a estação reprodutiva corresponde ao período chuvoso (RUSCHI, 1979). São raros os casos de aves silvestres que manifestam mais de um ciclo sexual por ano, o que pode ser observado em certos anatídeos e andorinhas. Entretanto, nas aves domésticas a atividade sexual é constante durante todo o ano, como se observa no galo, no pato, no pombo (RUSCHI, 1979).

A maioria das espécies de aves são reprodutores sazonais, cujos mecanismos fisiológicos que regulam a gametogênese são sincronizados por estímulos do ambiente, que asseguram o nascimento de filhotes nos períodos anuais mais favoráveis à sua sobrevivência (IMMELMANN, 1971). A época de reprodução das aves do Brasil é indicada geralmente como sendo de setembro a janeiro, aparentemente de forma pouco dependente dos fatores climáticos observados nas diferentes regiões tropicais. Embora inúmeras variações ocorram entre as diferentes espécies de aves, a maior atividade de reprodução concentra-se em outubro, reduzindo em abril e maio, o que corresponde à primavera e ao outono austrais, respectivamente (SICK, 1997).

Dois conjuntos de fatores colocam-se como definitivos na regulação da sazonalidade reprodutiva das aves: fatores ecológicos, como suprimento de

alimentação, competição interespecífica, condições de nidificação, condições sociais e pressão de predação; e fatores climáticos, como fotoperíodo, temperatura, umidade relativa do ar e precipitação pluviométrica (IMMELMANN, 1971). De acordo com este autor, as adaptações aos fatores ecológicos exercem maior influência sobre a sazonalidade reprodutiva que os fatores climáticos que contribuem apenas indiretamente, por meio de mudanças na vegetação e suprimento de alimentação.

2.5. Biópsia testicular

A biópsia testicular é o meio conservativo da capacidade reprodutiva mais efetivo para o estudo da morfofisiologia testicular. Permite traçar parâmetros de grande importância para a reprodução, além de diagnósticos de alterações na produção de espermatozóides, como oligospermia ou azospermia (BITTENCOURT, 2003; GUIÃO-LEITE, 2003; AZEVEDO, 2004; MASCARENHAS et al., 2006).

A biópsia testicular é pouco utilizada devido ao receio de ocasionar efeitos deletérios na produção espermática, direta ou indiretamente, pela produção de anticorpos antiespermatozóides. No entanto, estudos recentes dos efeitos da biópsia testicular em mamíferos e aves demonstraram que a redução da produção de espermatozóides, ou não ocorre, ou é apenas transitória, não interferindo na capacidade reprodutiva dos animais (ATTIA et al., 2000; CROSTA et al., 2002; CROSTA et al., 2003; MASCARENHAS et al., 2006). Devido a isto, esse método de coleta de material tem sido utilizado como método de eleição para o estudo da fisiologia e patologias reprodutivas em animais domésticos e selvagens, uma vez que fornece material suficiente para análise histológica (LOPATE et al., 1989; THRELFALL, 1993; ATTIA et al., 2000; CROSTA et al., 2002; BITTENCOURT, 2003; CROSTA et al., 2003; GUIÃO-LEITE, 2003; AZEVEDO, 2004; MASCARENHAS et al., 2006).

3.0. OBJETIVOS

A biologia reprodutiva da *Aratinga leucophthalma*, bem como da maioria dos psitacídeos brasileiros, ainda é pouco conhecida. Apesar de informações sobre o ciclo sazonal testicular reconhecido em várias espécies de aves silvestres habitantes de regiões de clima temperado, poucas informações são disponíveis na literatura sobre as aves de clima tropical. Há sabidamente influência dos diferentes fatores abióticos climáticos e ecológicos sobre o desenvolvimento do ciclo reprodutivo masculino nas aves. Neste sentido, o objetivo geral do presente trabalho foi avaliar qualitativa e quantitativamente os parâmetros biométricos corporais e testiculares de machos adultos de *Aratinga leucophthalma*, nas diferentes estações do ano, sob condições controladas de cativeiro.

Para tal foram avaliados nas diferentes estações climáticas anuais:

- 1- O peso corporal;
- 2- A espessura média da albugínea testicular;
- 3- O diâmetro médio dos túbulos seminíferos;
- 4- A proporção volumétrica dos compartimentos tubular e extratubular;
- 5- O grau de desenvolvimento espermatogênico dos túbulos seminíferos;
- 6- A correlação dos parâmetros acima com os fatores climáticos: temperatura, umidade relativa do ar, luminosidade, pressão atmosférica e precipitação pluviométrica.

4.0. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Foram utilizados 14 periquitões-maracanãs (*Aratinga leucophthalma*) machos adultos, com idade mínima de 2 anos, alocados no Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Viçosa (CETAS-UFV). Os animais foram mantidos em recinto comunitário, delimitado por tela de arame, com dimensões de 4,76m de comprimento, 2,50m de largura e 2,50m de altura, juntamente com exemplares fêmeas em proporções similares. Todas as aves foram individualizadas por anilhas de metal ao redor do tarsometatarso direito, contendo número de identificação.

Os animais receberam alimentação à base de mistura de sementes como girassol, amendoim, milho e lentilhas, frutas diversas, além de água *ad libitum*. Por se tratarem de animais pertencentes à fauna brasileira, o experimento foi conduzido sob autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) por meio de licença número 447/05-NUFAS/MG, processo 02015.016298/05-59. O presente projeto de pesquisa foi devidamente submetido e aprovado pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (protocolo número 84/2005).

A coleta do material procedeu-se nos meses de dezembro de 2005 a novembro de 2006, sendo as aves divididas em quatro grupos para realização dos procedimentos de biópsia testicular. Estes procedimentos foram conduzidos nas seguintes datas: 06/02/2006, 11/05/2006, 16/08/2006 e 07/11/2006, correspondendo ao período intermediário das estações de verão, outono, inverno e primavera, respectivamente.

A área onde se desenvolveu o presente estudo corresponde às coordenadas latitude $-20^{\circ}45'$ e longitude $42^{\circ}52'$. Os dados climáticos do período de estudo encontram-se na Tabela 1 e foram coletados no Campus Universitário pela Estação Meteorológica do Departamento de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa. Segundo a classificação de Köppen, o clima regional é Cwb, isto é, clima tropical de altitude, mesotérmico, caracterizado por verões brandos e chuvosos, com temperaturas médias mensais sempre superiores a 17°C e inferiores a 24°C .

Tabela 1- Médias dos parâmetros climáticos nas diferentes estações do ano, no período de dezembro de 2005 a novembro de 2006.

	Luminosidade (minutos/dia)	Temperatura (°C)	Umidade relativa do ar (%)	Pressão atmosférica (hPa)	Precipitação pluviométrica (mm)
verão	776	22,7	79,3	934,9	184,3
outono	671	20,5	81,9	936,1	82,9
inverno	685	17,13	77,4	940,1	9,6
primavera	779	20,4	78,4	936,2	158,4

Fonte: Estação Meteorológica do Departamento de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Viçosa.

4.2. Sexagem por PCR

Devido à ausência de dimorfismo sexual nesta espécie, tornou-se necessária a sexagem prévia de todas as aves. Para tal, optou-se por uma técnica pouco invasiva e que gerasse um resultado preciso, sendo usada a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) conforme indicado por GRIFFITHS et al. (1998), utilizando *primers* comerciais de dois genes conservados CHD (cromo-helicases ligantes de DNA): P8(5'-CTCCAAGGATGAGRAAYTG-3') e P2(5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3'). O gene CHD-W localiza-se no cromossomo W e, portanto restrito às fêmeas e o CHD-Z, presente em machos e fêmeas. Os *primers* utilizados amplificam uma banda nos machos ZZ e duas bandas nas fêmeas ZW, as quais apresentam diferente comprimento pela presença de íntrons. Os testes foram conduzidos no Laboratório de Sistemática Molecular do Departamento de Biologia Animal da Universidade Federal de Viçosa.

Para a coleta do material, cada ave foi contida fisicamente com auxílio de uma toalha, com posterior exposição do membro pélvico direito. Após anti-sepsia local, foi feita uma secção na extremidade distal da unha do dedo 3 para coleta de duas gotas de sangue, que foram colocadas em tubos ependorf contendo 500 µl de álcool absoluto. O material foi armazenado em freezer a -60 °C até o momento das análises. Após a coleta do sangue, foi realizada hemostasia do local com aplicação tópica de nitrato de prata em pó.

4.2.1. Extração do DNA

As extrações do DNA foram processadas utilizando-se o detergente CTAB (brometo de cetiltrimetil amônia), a partir de modificações do protocolo de Boyce *et al.* (1989). Um pequeno fragmento do sangue já coagulado foi colocado em um tubo eppendorf contendo 500 µl de CTAB (cada 200 mL da solução de CTAB contém 160 mL de H₂O; 16,36g de NaCl; 400 mL de b-mercapto-etanol; 20 mL de solução a 1M de Tris-HCl em pH 8,0; 8 mL de solução a 0,5 M de Na₂EDTA em pH 8,0; 4 g de CTAB) e macerados com auxílio de pistilo. Esta mistura foi posteriormente incubada em Banho-Maria *Fanem* a 60 °C durante uma hora, sendo a suspensão misturada com um vórtex em intervalos de 20 minutos para uma ação mais eficiente do detergente na ruptura das membranas celulares.

Após este período, o material foi centrifugado a 14.000 rotações por minuto por 2 minutos em centrífuga *Eppendorf*[®] e o sobrenadante, cerca de 450 µl, foi transferido com o auxílio de uma pipeta para outros tubos contendo 500 µl de clorofórmio:álcool isoamílico (1:24). Esta solução foi homogeneizada manualmente, e posteriormente, centrifugada a 13.600 rotações por minuto, durante 15 minutos, para precipitar as proteínas na interface entre o CTAB e o álcool isoamílico. Após este momento ocorre a formação de duas fases separadas por uma interface esbranquiçada semelhante a uma película. O sobrenadante desta solução foi transferido para um terceiro conjunto de tubos contendo 250 µl de propanol resfriado (-20°C), homogeneizado e mantido por um período mínimo de 30 minutos em geladeira (4°C). Essa etapa permitia estocagem até o dia seguinte (*over night*).

4.2.2. Amplificação do DNA

Para cada amostra, foi feita uma solução contendo 14,3 µl de água milli-Q, 2 µl de tampão da Taq polimerase 10x, 0,3 µl de MgCl₂, 0,2 µl de dNTPs, 0,2 µl de Taq polimerase, 1 µl de cada primer 10 mM e 1 µl de DNA do animal a ser sexado. As reações foram executadas num termociclador *MJ Research*[®] (PTC100), onde passaram por 30 ciclos de desnaturação a 95°C durante 30 segundos, seguido por 1 ciclo de anelamento a 47°C por 30 segundos e um ciclo de extensão a 72°C por 30 segundos.

4.2.3. Eletroforese e revelação do gel

Após a amplificação do DNA, as amostras foram carregadas em géis (13 cm X 17 cm) de poliacrilamida 6% (14,63 mL água ultra- pura; 6,0 mL de bis-acrilamida 30%; 5 mL TEB 5x; 12,5 µL TEMED e 250 µL PSA 10 %), feitos utilizando-se duas placas de vidro. Uma vez polimerizados, os géis foram montados em cubas verticais contendo TEB 1X. O gel foi carregado com 6 µL de amostra adicionados de 4 µL de tampão de amostra (Azul de Bromofenol 0,12% e Xileno Cianol 0,12% dissolvidos em TEB 5x), carregados em cada canaleta e submetidos a corridas de aproximadamente quatro horas, a uma voltagem de 80V, para separação de bandas específicas de fragmentos de DNA por eletroforese.

Após esse período, o gel foi fixado em solução contendo 10% de etanol absoluto e 0,5% de ácido acético por um período de 10 minutos. Posteriormente foi impregnado com solução a base de AgNO_3 0,2% durante 10 minutos, lavado em água deionizada por 30 segundos e revelado em solução a 3% de NaOH e 0,6% de formol. Para interromper a revelação, utilizou-se o fixador acima citado por aproximadamente 30 segundos. Finalmente foi realizada a desidratação do gel em álcool 50% e montagem sobre placa de vidro recoberta com lâmina de plástico, permanecendo à temperatura ambiente até que secasse totalmente (Figura 2).

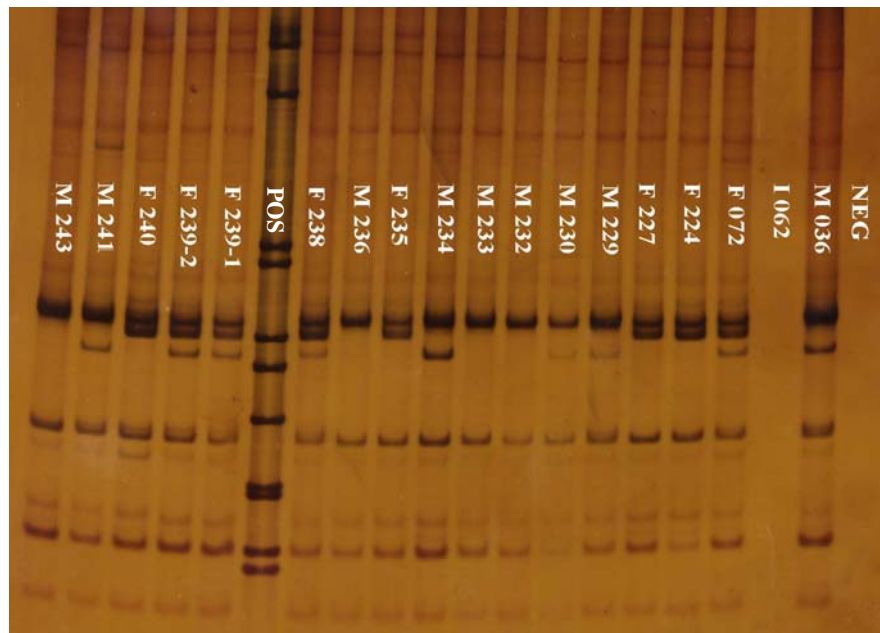


Figura 2 - Gel de poliacrilamida demonstrando padrão de 1 banda para o sexo masculino (M) e 2 bandas para o sexo feminino (F), seguidos do número de identificação de cada indivíduo de *Aratinga leucophthalma*. NEG – controle negativo da eletroforese, POS – controle positivo da eletroforese, I – sexo não identificado, devido ausência de DNA.

4.6. Biópsia testicular

Quatro grupos de animais foram reunidos de forma aleatória para coleta dos dados, nas épocas correspondentes à primavera (n=4), verão (n=4), outono (n=3) e inverno (n=3). Estes animais tiveram o testículo esquerdo biopsiado por meio de celioscopia. Para tal, após jejum de 4 a 6 horas, os animais foram submetidos à anestesia inalatória com o uso de isoflurano, através de circuito aberto de oxigênio com o uso de máscaras específicas. Uma vez anestesiado, o animal foi pesado em balança digital e acomodado sobre bolsa térmica (40°C) em decúbito lateral direito. As asas foram imobilizadas dorsalmente e o membro pélvico esquerdo tracionado cranialmente, por meio de fita adesiva. O local da incisão é uma região formada por um triângulo virtual, tendo como vértices o fêmur esquerdo, o púbis e a última costela.

Para preparo do campo cirúrgico foram removidas as penas do local e procedida anti-sepsia com iodo polivinil pirrolidona. Posteriormente foi realizada uma pequena incisão de pele e com uma tesoura de ponta fina, a musculatura

abdominal foi divulsionada para acesso à cavidade celomática. Para visualização interna foi utilizado um otoscópio veterinário Welch-Allyn® com lâmpada halogênica produtora de luz fria e uma espécula de polipropileno de 4mm de diâmetro, devidamente esterilizada em solução de Germekil® e lavada com solução fisiológica. A partir da incisão, a espécula foi introduzida no saco aéreo abdominal caudal, visualizando a gônada esquerda.

A biópsia foi realizada com uma pinça própria, introduzida paralela à espécula, coletando um pequeno fragmento testicular, perpendicularmente ao eixo axial do testículo esquerdo e em sua extremidade cranial, evitando possíveis lesões em epidídimo e ductos deferentes segundo CROSTA et al. (2002). Foram realizados dois planos de sutura: na musculatura, com pontos simples separados e na pele, com ponto intradérmico contínuo com extremidades embutidas, utilizando fio absorvível sintético poliglactina 910 (Vicril® 2,0 – Ethicon).

O procedimento pós-cirúrgico envolveu tratamento local e aplicação de 15 mg/kg de Enrofloxacina 2,5% via intramuscular, como agente antibiótico, uma vez ao dia, durante três dias, e de 4 mg/kg de Flunixin meglumine via intramuscular, como agente antiinflamatório, uma vez ao dia, durante três dias.

Após a coleta, os fragmentos testiculares foram imersos imediatamente em solução fixadora Karnovsky (paraformaldeído 4% e glutaraldeído 4%) em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,4 a temperatura ambiente, sendo posteriormente, encaminhados para o processamento histológico.

No processamento histológico, os fragmentos foram desidratados em bateria de etanol em concentrações crescentes (70, 80, 90, 100 GL) permanecendo uma hora em cada banho, com posterior infiltração de resina plástica (Historesin® Leica) em dois banhos e incluídos, na mesma resina, com a adição de endurecedor. O material foi seccionado com navalha de vidro em micrótomo rotativo, no Laboratório de Biologia Estrutural da Universidade Federal de Viçosa, obtendo-se cortes seqüenciais de 3 µm de espessura. Posteriormente foram corados com solução de azul de toluidina/borato de sódio 1%, para análise em microscópio de luz.

Através de fotografias digitais, capturadas em fotomicroscópio, de 10 campos aleatoriamente distribuídos no parênquima testicular de cada animal, foram quantificadas as proporções volumétricas dos compartimentos tubular e extratubular pela contagem de 100 pontos de interseção projetados por meio do programa *Power Point/ Windows XP*. As fotografias foram capturadas com aumento de 400X.

Para obtenção do diâmetro médio dos túbulos seminíferos foram mensuradas 10 secções transversais de túbulos com formato mais circular possível, utilizando ocular micrométrica de 10X e objetiva de 40X em microscópio de luz. Através da mensuração em 10 pontos ao longo da albugínea testicular, em cada animal, foi aferida a espessura média e observada qualitativamente a albugínea testicular. O grau de desenvolvimento espermatogênico foi qualificado através de pontuação de 1 a 4, de acordo com a composição mais avançada observada no epitélio seminífero. Desta forma, valor 1 foi atribuído ao animal com apenas uma camada de espermatogônia e células de Sertoli em todos os túbulos seminíferos; valor 2 foi atribuído ao animal com gerações esporádicas de espermatócitos primários; valor 3 foi atribuído para o animal contendo várias gerações de espermatócitos primários e espermátides arredondadas e valor 4 foi atribuído a animais com espermatogênese completada, com presença de espermátides alongadas.

Os resultados foram analisados quanto à média, desvio-padrão, coeficiente de variação e aplicado teste de variação de médias com intervalo de confiança a 5%, segundo a função estatística do programa *Excel/Windows XP*. Foram ainda realizados teste de correlação de Pearson com significância de 5 a 17% segundo programa estatístico sistema de análises estatísticas e genéticas (SAEG).

5.0. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais do presente experimento apresentaram peso corporal médio de 186,6 gramas (Tabela 2). Quando distribuídos nas diferentes estações climáticas observou-se que os valores médios sazonais de peso corporal foram crescentes a partir do inverno, culminando com as maiores médias durante a primavera, sendo neste período significativamente superiores (Gráfico 1 e tabela 3). WIKELSKI et al. (2000) também descrevem aumento do peso corporal em passeriforme (*Hylaphylax n. naevioides*) durante a fase reprodutiva sazonal no Panamá.

O aparecimento de filhotes em épocas do ano específicas é o principal fator indicador de sazonalidade reprodutiva nas diferentes espécies animais. Segundo PEIXOTO (2006) é durante a primavera e principalmente no verão, onde se concentra toda a casuística de atendimento a filhotes de periquitão-maracanã (*Aratinga leucophthalma*) no Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Viçosa. Da mesma forma, GRANDO (2002) descreve a procriação desta espécie durante os meses de setembro a janeiro na região de São Carlos-SP. Também RUPLEY (1999) descreve a sazonalidade reprodutiva da *Aratinga leucophthalma* na primavera e verão.

Tabela 2- Valores individuais de peso corporal e valores médios de proporção volumétrica testicular, espessura da albugínea, diâmetro tubular e grau de desenvolvimento espermatogênico em *Aratinga leucophthalma* adultas, em condição de cativeiro nas diferentes condições climáticas anuais.

Animal	Data da biópsia testicular	Peso Corporal (gr)	Espessura albugínea (μm)	Proporção volumétrica túbulo (%)	Proporção volumétrica extratúbulo (%)	Diâmetro tubular (μm)	Grau de desenvolvimento espermatogênico
233	06/02/2006	154	43,5	92,4	7,6	166	4
234	06/02/2006	186	26,5	93	7	123,6	4
236	06/02/2006	185	25	87,8	12,2	93	2
244	06/02/2006	180	33,75	76,6	27,4	96,75	3
36	11/05/2006	194	*	81,1	18,9	91,75	2
230	11/05/2006	150	30,75	69,5	30,5	82,75	2
232	11/05/2006	185	30,5	67,1	32,9	63,25	1
241	11/05/2006	*	40,5	81	19	80	2
229	16/08/2006	192	22,75	81,3	18,7	94,25	3
332	16/08/2006	184	22,75	77,2	22,8	80,75	2
369	16/08/2006	180	25,75	94,1	5,9	172	4
242	07/11/2006	230	15,25	92,6	7,4	131,5	4
243	07/11/2006	206	15,5	88,8	11,2	122,1	4
697	07/11/2006	200	15,5	86	14	114,3	3
Média \pm dp		186,6 \pm 20,5	26,8 \pm 9	83,5 \pm 8,7	16,8 \pm 9	108 \pm 32,2	2,9 \pm 1,0
cv		10,96562	33,58925	10,43729	53,58755	29,79995	35,94868

* valores não computados

Tabela 3- Valores médios de peso corporal, proporção volumétrica testicular, espessura da albugínea, diâmetro tubular e grau de desenvolvimento espermatogênico, em *Aratinga leucophthalma* adultas em condição de cativeiro, nas diferentes estações climáticas do ano.

Estação climática anual	Data da biópsia testicular	Peso Corporal (gr)*	Espessura albugínea (μm)*	Proporção volumétrica túbulo (%)*	Proporção volumétrica extratúbulo (%)*	Diâmetro tubular (μm)*	Grau de desenvolvimento espermatogênico*
Verão	06/02/2006	176,3 \pm 15,0 ^B (8,5)	32,2 \pm 8,5 ^{AB} (26,3)	87,5 \pm 7,6 ^{AB} (8,7)	13,5 \pm 9,5 ^{AB} (70,3)	119,8 \pm 33,7 ^{AB} (28,1)	3,3 \pm 0,95 ^A (29,5)
Outono	11/05/2006	176,3 \pm 23,2 ^{AB} (13,2)	33,9 \pm 5,7 ^A (16,8)	74,7 \pm 7,4 ^B (9,9)	25,3 \pm 7,4 ^A (29,32)	79,4 \pm 11,9 ^B (15)	1,75 \pm 0,5 ^B (28,6)
Inverno	16/08/2006	185,3 \pm 6,1 ^B (3,3)	23,8 \pm 1,7 ^B (7,3)	84,2 \pm 8,8 ^{AB} (10,5)	15,8 \pm 8,8 ^{AB} (55,8)	115,7 \pm 49,3 ^{AB} (42,6)	3 \pm 1 ^{AB} (33,3)
Primavera	07/11/2006	212 \pm 15,9 ^A (7,5)	15,4 \pm 0,1 ^C (0,9)	89,2 \pm 3,3 ^A (3,7)	10,9 \pm 3,3 ^B (30,5)	122,6 \pm 8,6 ^A (7)	3,7 \pm 0,6 ^A (15,7)

* Dados apresentados como média \pm desvio-padrão (coeficiente de variação). Médias seguidas por letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si ($p < 0,05$) pelo teste t de Student.

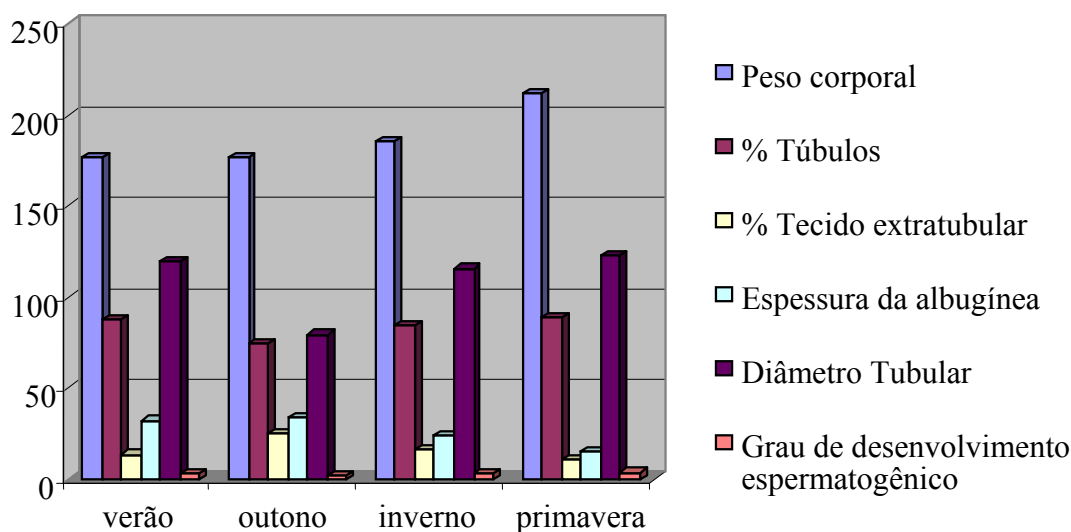


Gráfico 1- Valores médios de peso corporal, proporção volumétrica dos componentes testiculares, espessura da albugínea testicular, diâmetro tubular e grau de desenvolvimento espermatogênico nas diferentes estações climáticas do ano em *Aratinga leucophthalma* adultas.

A despeito da localização intracelomática, os testículos das aves apresentam semelhanças com o testículo mamífero, com forma ovóide e encapsulado por uma túnica fibrosa, a albugínea testicular. Em espécies de aves com reprodução sazonal, os testículos estão sujeitos a grande variação anual em seu tamanho, algumas vezes superior a 400 vezes (LOFTS & MURTON, 1973). Não foi possível a verificação da variação sazonal no tamanho testicular em *Aratinga leucophthalma*, uma vez que a coleta de fragmentos foi realizada por procedimento cirúrgico através de biópsia testicular incisional. A biópsia testicular é pouco utilizada devido ao receio de ocasionar efeitos deletérios na produção espermática direta ou indiretamente pela produção de anticorpos antiespermatozóides (ATTIA et al., 2000). No entanto estudos recentes dos efeitos da biópsia testicular em mamíferos e aves demonstraram que a redução da produção de espermatozóides ou não ocorre, ou é apenas transitória, não interferindo na capacidade reprodutiva dos animais (ATTIA et al., 2000; CROSTA et al., 2002; CROSTA et al., 2003; MASCARENHAS et al., 2006).

O ciclo de crescimento e regressão testicular observado em espécies de aves com reprodução sazonal se reflete em grande variação na espessura da albugínea testicular ao longo do ano. O crescimento dos túbulos seminíferos impõe um estiramento desta túnica no período reprodutivo, tornando-a mais delgada. Há uma

substituição anual desta túnica devido a uma proliferação de fibroblastos, profundamente à antiga cápsula. O surgimento destes fibroblastos acontece no período de regressão dos testículos e por algum tempo pode-se observar a presença de duas camadas de revestimento testicular (LOFTS & MURTON, 1973). Nos animais do presente experimento observou-se grande variação na espessura da albugínea testicular entre os indivíduos (Tabela 2), sendo possível a observação de duas camadas de albugínea testicular durante o verão e o outono (Figura 3). Observou-se ainda a presença de pigmentos ao longo da albugínea testicular em todas as épocas do ano (Figura 3). A espessura média da albugínea testicular de *Aratinga leucophthalma* foi significativamente maior durante o outono, apresentando decréscimo gradativo até atingir valores significativamente menores na primavera (Tabela 3 e gráfico 1), presumidamente o período de maior atividade do ciclo testicular.

Uma vez que o peso corporal de *Aratinga leucophthalma* apresentou um crescimento significativo ao longo do período reprodutivo, uma correlação negativa significativa ($p < 0,05$) pôde ser observada entre a espessura da albugínea e o peso corporal nas diferentes estações climáticas anuais (Tabela 4).

O parênquima testicular das aves apresenta semelhança com o observado em mamíferos, com a presença de uma massa de túbulos seminíferos convoluídos e agrupamentos intertubulares de tecido conjuntivo frouxo, contendo capilares sanguíneos, espaços linfáticos e células intersticiais de Leydig, sendo estas produtoras de hormônios esteróides sexuais (LOFTS & MURTON, 1973). Desta forma o testículo pode ser dividido funcionalmente em dois compartimentos básicos: o tubular ou espermatogênico e o extratubular ou androgênico (LOFTS & MURTON, 1973).

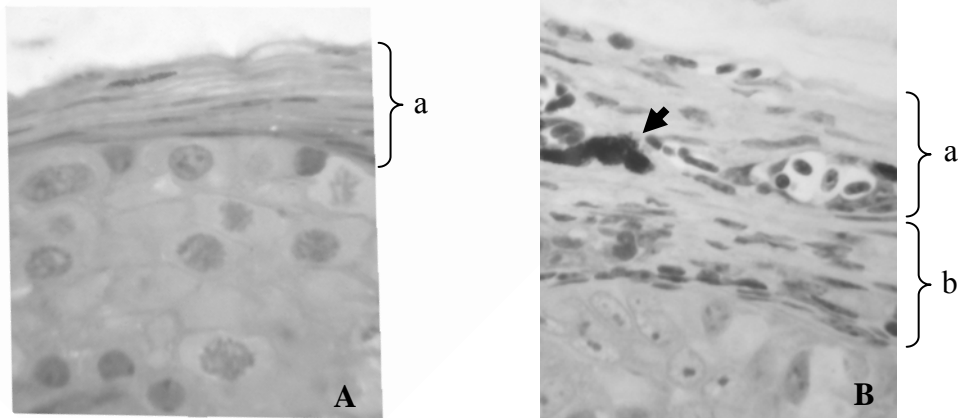


Figura 3- Albugínea testicular de *Aratinga leucophthalma*. A - durante a primavera demonstrando uma única camada (a). B - durante o outono, demonstrando a- túnica antiga e b- nova túnica em formação. Seta indica pigmentos observados em todas as épocas do ano. 940X.

Diferentemente do testículo de mamíferos, as aves apresentam túbulos seminíferos anastomosados, formando uma rede complexa no parênquima testicular. Este não se apresenta lobulado por septos provenientes da túnica albugínea como nos mamíferos (JONES & LIN, 1993; PEREIRA et al., 1994). Em *Aratinga leucophthalma* também registrou-se a ausência de septos conjuntivos e a presença de túbulos seminíferos anastomosados (Figura 4).

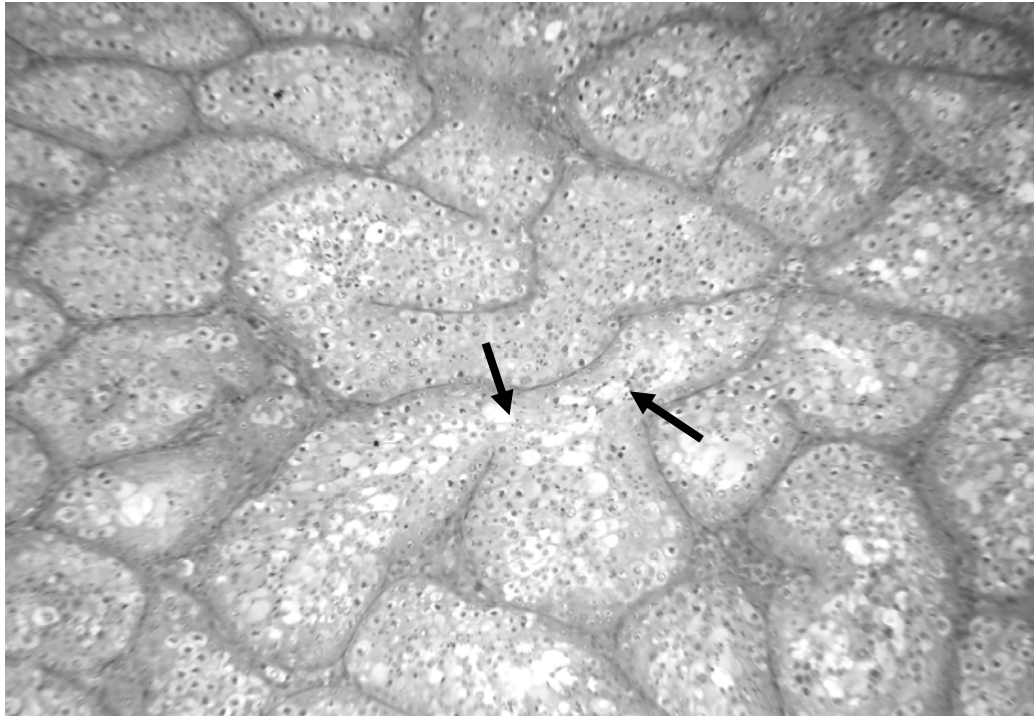


Figura 4 – Parênquima testicular de *Aratinga leucophthalma*. Ausência de septos conjuntivos e presença de anastomoses no túbulo seminífero (seta).160X.

A proporção entre os compartimentos testiculares é bastante variável, sendo um dos principais fatores responsáveis pela diferença observada para a eficiência na produção espermática nas diversas espécies (RUSSELL et al. 1990, FRANÇA & RUSSELL, 1998). Nos animais do presente experimento o túbulo seminífero foi o principal componente do parênquima testicular. A proporção volumétrica entre os compartimentos tubular e extratubular mostrou grande variação entre os indivíduos (Tabela 2) apresentando, conforme esperado, alta correlação negativa entre essas variáveis (Tabela 4). A proporção volumétrica de túbulos seminíferos apresentou um crescimento significativo nos valores registrados entre o outono e a primavera, estando desta forma diretamente relacionado aos períodos de menor e maior atividade reprodutiva, respectivamente, para esta espécie (Tabela 3 e Gráfico 1). TAE et al. (2005) observaram que faisões coreanos apresentam um aumento de cerca de 98% no volume de túbulos seminíferos no período de reprodução. Uma vez que é o crescimento do túbulo seminífero que leva à diminuição da espessura da albugínea

testicular (LOFTS & MURTON, 1973), observou-se correlação negativa entre estes parâmetros em *Aratinga leucophthalma* (Tabela 4).

Conforme esperado, a proporção volumétrica do compartimento extratubular apresentou comportamento inverso ao compartimento tubular. Neste sentido, uma correlação positiva pode ser observada entre a proporção volumétrica do compartimento extratubular e a espessura da albugínea testicular em *A. leucophthalma* (Tabela 4).

Tabela 4- Matriz de correlação entre o peso corporal, proporção volumétrica testicular, espessura da albugínea, diâmetro tubular, grau de desenvolvimento espermato gênico e fatores abióticos médios nas diferentes estações climáticas do ano em *Aratinga leucophthalma*.

	PC	% Tub	%Ext	Alb	DT	GDE	Luz	Temp	Umid	Pres	PPluv
PC	1	0,58	-0,63	-0,96*	0,52	0,65	0,49	-0,17	-0,48	0,06	0,22
%Tub		1,00	-1,00*	-0,65***	0,98*	0,99*	0,85**	0,14	-0,78**	-0,06	0,48
%Ext			1,00	0,70***	-0,98*	-1,00*	-0,83**	-0,09	0,81**	0,01	-0,44
Alb				1,00	-0,63***	-0,72***	-0,40	0,39	0,70***	-0,32	-0,02
DT					1,00	0,98*	0,75**	0,00	-0,87**	0,10	0,33
GDE						1,00	0,82**	0,07	-0,81**	0,00	0,43
Luz							1,00	0,62	-0,34	-0,57	0,87**
Temp								1,00	0,48	-0,98*	0,91*
Umid									1,00	-0,58	-0,90*
Pres										1,00	-0,90*
PPluv											1

PC- peso corporal, %Tub- proporção volumétrica de túbulo seminífero, %Ext- Proporção volumétrica de tecido extratubular, Alb- espessura da albugínea testicular, DT- diâmetro tubular, GDE- grau de desenvolvimento espermato gênico, Luz- fotoperíodo, Temp- temperatura, Umid- umidade, Pres- Pressão atmosférica, PPluv- precipitação pluviométrica.

Nível de significância pelo teste de correlação de Pearson: *p<0,05; ** p<0,1; *** p< 0,17

O compartimento tubular do parênquima testicular, como seu principal componente, na maioria dos animais estudados, exerce grande influência sobre o peso testicular e, por conseqüência, sobre a produção espermática (AMANN, 1970; FRANÇA & RUSSELL, 1998; PAULA, 1999). A medida do diâmetro tubular é uma das principais abordagens utilizadas como indicador da atividade espermato gênica em experimentos que envolvam a função testicular (ATTAL & COUROT, 1963; GODINHO & CARDOSO, 1979; SINHÁ-HIKIM et al., 1991; RUSSELL et al., 1994; MUÑOZ et al., 1998; FRANÇA & CARDOSO, 1998).

A sazonalidade reprodutiva observada em machos de aves descreve uma atividade cíclica envolvendo fases de quiescência, durante o período de repouso reprodutivo e de recrudescência espermatogênica durante os períodos de cópula (LOFTS & MURTON, 1973). Durante a quiescência sexual, o epitélio germinativo consiste em uma única camada de células tronco (espermatogônias) e células de Sertoli. Com o advento do período reprodutivo há uma recrudescência da atividade mitótica, causando a propagação das células germinativas e a consequente reativação da produção espermática (LOFTS & MURTON, 1973). Assim, ao longo do ano observam-se diferentes graus de desenvolvimento espermático, diretamente relacionados com o tamanho testicular e com a proporção volumétrica e diâmetro dos túbulos seminíferos (WIKELSKI et al., 2000; KIM & YANG, 2001; MADEKUROZWA et al., 2002; BHARDWAJ & ANUSHI, 2006). O grau de desenvolvimento do processo espermatogênico nos animais do presente experimento foi qualificado em quatro categorias crescentes, variando de quiescência total (grau 1) ao processo totalmente estabelecido, com a presença de espermátides alongadas (grau 4) (Figura 5). Uma altíssima correlação positiva foi observada entre o grau de desenvolvimento espermatogênico e o diâmetro dos túbulos seminíferos (Tabela 4). Assim, em concordância com todos os achados indicativos de maior atividade reprodutiva em *Aratinga leucophthalma* e em outras espécies de aves estudadas (WIKELSKI et al., 2000; KIM & YANG, 2001; MADEKUROZWA et al., 2002; BHARDWAJ & ANUSHI, 2006), o diâmetro dos túbulos seminíferos e o grau de desenvolvimento espermatogênico foram significativamente maiores na primavera em relação aos valores observados no outono (Tabela 3 e Gráfico 1).

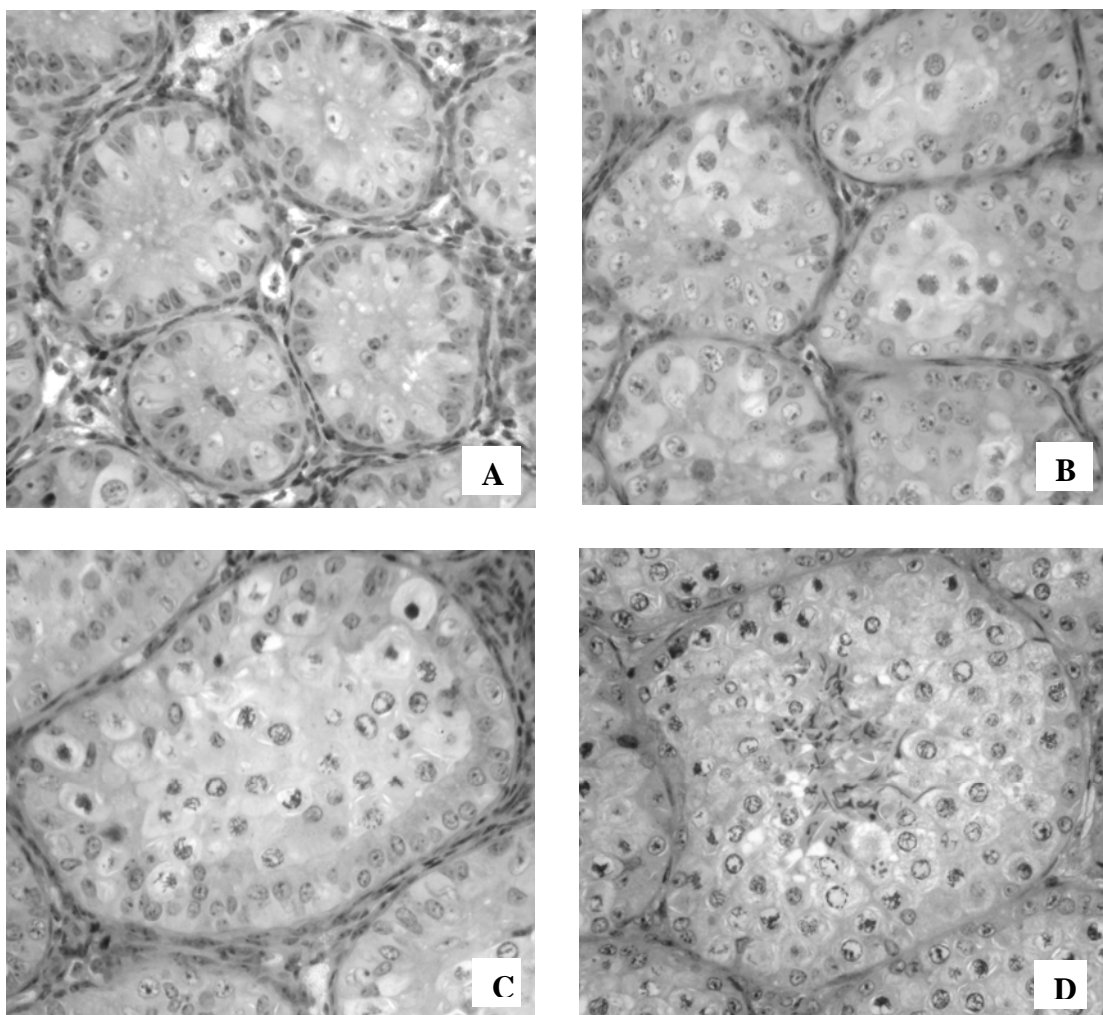


Figura 5 - Fotomicrografia dos diferentes graus de desenvolvimento espermatogênico considerados em *Aratinga leucophthalma* adulta ao longo das diferentes estações climáticas. A- valor 1 (epitélio seminífero apresentando apenas uma camada de espermatogônia e células de Sertoli), B- valor 2 (epitélio seminífero com gerações esporádicas de espermatócitos primários), C- valor 3 (epitélio seminífero contendo várias gerações de espermatócitos primários e espermátides arredondadas) e D- valor 4 (epitélio seminífero com espermatogênese completa). 400X.

Cada espécie animal está aparentemente ajustada para se reproduzir nas épocas do ano nas quais o desenvolvimento dos seus filhotes seja mais propício (IMMELMANN, 1971). Dentre os fatores implicados no desencadeamento da atividade reprodutiva sazonal em aves, há de se considerar as condições ecológicas, as condições climáticas e os fatores intrínsecos espécie-específicos (IMMELMANN, 1971). A seleção natural, pela qual todos os seres vivos estão expostos, formatou inúmeras condições intrínsecas espécie-específicas para a reprodução das aves. Assim, o complexo de genes daquelas aves que produzem filhotes na época “errada” do ano será reduzido, e mesmo eliminado pela seleção natural. Em geral, a pressão da seleção natural é maior em espécies com algum tipo de especialização, seja alimentar, na produção de ninhos ou demais condições ecológicas. Segundo IMMELMANN (1971), os fatores climáticos contribuem apenas indiretamente, por meio de mudanças na vegetação e suprimento de alimentação. Neste sentido, RUSCHI (1979) pondera que nas regiões tropicais as principais influências sazonais na reprodução das aves são as estações seca e chuvosa, respectivamente o outono e o inverno, e a primavera e o verão, não havendo influência ponderável do fotoperiodismo. Assim, as principais causas para o desenvolvimento de um ciclo reprodutivo em aves tropicais seria a fartura de alimentos dependente da precipitação pluviométrica, uma vez que a oferta qualiquantitativa de alimentos é preponderante para a manifestação reprodutiva e um fator facilitador da criação da prole (RUSCHI, 1979).

No presente trabalho a variação sazonal relacionada aos fatores intrínsecos espécie-específicos e ecológicos da *Aratinga leucophthalma* foram minorados com as condições de cativeiro. Neste sentido, os animais foram mantidos em condições gregárias, com relação numérica semelhante entre machos e fêmeas, material e recintos para confecção de ninhos, além de supridas as necessidades de alimentação regularmente ao longo do ano.

Os parâmetros climáticos locais de luminosidade média diária, temperatura média, umidade relativa do ar, pressão atmosférica e precipitação pluviométrica foram registrados (Tabela 1) e correlacionados com a sazonalidade dos parâmetros testiculares em *Aratinga leucophthalma* (Tabela 4). Uma baixíssima correlação foi observada entre os diferentes parâmetros testiculares avaliados no presente experimento e a temperatura média diária, pressão atmosférica e precipitação pluviométrica nas diferentes estações do ano (Tabela 4). Da mesma forma

WIKELSKI et al. (2000) não observaram correlação significativa destes mesmos parâmetros climáticos sazonais e o volume testicular em passeriforme (*Hylophylax n. naevioides*) nas florestas do Panamá. Em regiões temperadas a temperatura é o fator ambiental mais importante afetando o desenvolvimento testicular em algumas espécies de aves. Já em regiões tropicais, por apresentarem pouca variação anual nas diferentes estações do ano, é provavelmente de pouca influência no ciclo testicular (IMMELMANN, 1971; WIKELSKI et al., 2000). Aliado a isto, a presença intracavitária do testículo das aves define seu funcionamento em temperaturas mais altas que aquelas observadas em mamíferos (CLULOW & JONES, 2004), e associado ao fato das aves apresentarem apenas uma diminuta variação na temperatura corporal interna durante a noite (BEAUPRÉ et al., 1997), seus testículos estão expostos a condições constantes de temperatura.

Os parâmetros da produção espermática mais significativos avaliados em *Aratinga leucophthalma* nas diferentes estações do ano foram a proporção volumétrica, o diâmetro dos túbulos seminíferos e o grau de desenvolvimento espermato gênico. Estes dados apresentam alta correlação positiva com a luminosidade média diária ($p < 0,1$) e alta correlação negativa com a umidade relativa do ar ($p < 0,1$) (Tabela 4). Surpreendentemente nenhum trabalho foi encontrado na literatura avaliando a umidade relativa do ar como influência sobre a sazonalidade reprodutiva em aves. No presente trabalho, a correlação observada sugere um efeito inverso direto, uma vez que não se observou correlação significativa entre a umidade relativa do ar e a luminosidade, outro único fator ambiental correlacionado com os parâmetros produtivos testiculares em *Aratinga leucophthalma*. Já a luminosidade ou comprimento do dia, apresenta forte influência no controle do ciclo reprodutivo em aves de regiões temperadas (BHARDWAJ & ANUSHI, 2006). Embora SICK (1997) afirme não haver influência ponderável do fotoperiodismo sobre a reprodução das aves de regiões tropicais, o presente trabalho, assim como trabalhos recentes em aves tropicais (WIKELSKI et al., 2000), apontam para uma forte correlação da duração da luminosidade diária com o grau de desenvolvimento testicular.

6.0. CONCLUSÕES

- 1- A *Aratinga leucophthalma* macho, adulta, em condições de cativeiro, apresenta um ciclo de quiescência e recrudescência da função espermatogênica.
- 2- O ciclo testicular observado em *Aratinga leucophthalma* apresenta valores significativamente maiores de proporção volumétrica de túbulos seminíferos, diâmetro médio dos túbulos seminíferos e grau de desenvolvimento espermatogênico na primavera em relação ao outono, no qual são encontrados os menores valores para esses parâmetros.
- 3- Valores significativamente maiores para o peso corporal de *Aratinga leucophthalma* adulta foram observados durante a primavera.
- 4- A espessura média da albugínea testicular apresentou-se significativamente reduzida na primavera, apresentando correlação negativa ($p < 0,17$) com os parâmetros produtivos tubulares. A túnica albugínea apresentou-se constituída por dupla camada no verão e no outono.
- 5- Os parâmetros da produção espermática avaliados em *Aratinga leucophthalma* nas diferentes estações do ano apresentam alta correlação positiva com a luminosidade média diária ($p < 0,1$) e alta correlação negativa com a umidade relativa do ar ($p < 0,1$).
- 6- Durante a primavera os testículos de *Aratinga leucophthalma* apresentam os valores dos parâmetros qualiquantitativos de produção espermática compatíveis com período reprodutivo, descrito para a espécie.

7.0. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMANN, R.P. 1970. Sperm production rates. In: JOHNSON, A.D., GOMES, W.R., VANDEMARK, N.L. (ed). **The testis**. New York: Academic Press. v.1, pp.433-482.
- ATTAL, J. & COUROT, M. 1963. Développement testiculaire et établissement de la spermatogénèse chez le taureau. **Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique**. v.3, p.219-241.
- ATTIA, K. A., ZAKI, A.A., EILTS, B.E., PACCAMONT, D.L., HOSGOOD, G., DIETRICH, M.A., HOROHOV, D.W., BLOWIN, D.C. 2000. Anti-sperm antibodies and seminal characteristics after testicular biopsy or epididymal aspiration in dogs. **Theriogenology**. v.53, p.1355-1363.
- AZEVEDO, M.H.F. 2004. **Análise morfofuncional do testículo da onça pintada (*Panthera onca*) adulta**. Viçosa: UFV, 63 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).
- BEAUPRÉ, C.E., TRESSLER, C.J., BEAUPRÉ, S.J., MORGAN, J.L.M., BOTTJE, W.G., KIRBY, J.D. 1997. Determination of testis temperature rhythms and effects of constant light on testicular function in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). **Biology of Reproduction**. v.56, p.1570-1575.
- BHARDWAJ, S.K. & ANUSHI, N. 2006. Effect of photoperiod length on body mass and testicular growth in the house sparrow (*Passer domesticus*) and brahminy myna (*Sturnus pagodarum*). **Reproduction Nutrition Development**. v.46, n.1, p.69-76.
- BIRDLIFE INTERNATIONAL. 2000. **Threatened birds of the world**. Cambridge: Lynx Editions and Bird Life International. 852 p.

- BITTENCOURT, V.L. 2003. **Avaliação morfofuncional do testículo e do processo espermatogênico do lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1811), adulto.** Viçosa: UFV, 65 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).
- BOYCE, T.M., ZWICK, M.E., AQUADRO, C.F. 1989. Mitochondrial DNA in the bark weevils: size, structure and heteroplasmy. **Genetics.** v.123, p.825-836.
- BUSH, M., WILDT, D.E., KENNEDY, S., SEAGER, W.J. 1978. Laparoscopy in zoological medicine. **Journal of the American Veterinary Medical Association.** v.173, n.9, p.1081-1087.
- CESÁRIO, M.D. 1994. **Fisiologia da reprodução de aves.** Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas. 141p.
- CITES, Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. 2006. Disponível em: <<http://www.cites.org/eng/resources/species.html>>. Acesso em: 09 dezembro 2006.
- CLULOW, J. & JONES, R.C. 2004. Composition of luminal fluid secreted by the seminiferous tubules and after reabsorption by the extratesticular ducts of the japanese quail, *Coturnix coturnix japonica*. **Biology of Reproduction.** v.71, p.1508-1516.
- COLLAR, N. J. 1997. Family Psittacidae (Parrots). In: DEL HOYO, J., ELLIOTT, A., SARGATAL, J. **Handbook of the birds of the world.** Barcelona: Lynx Edicions. v.4, pp.280-447.
- CROSTA, L., GERLACH, H., BÜRKLE, H.M. 2002. Endoscopic testicular biopsy technique in psittaciformes. **Journal of Avian Medicine and Surgery.** v.16, n.2, p.106-110.

- CROSTA, L., GERLACH, H., BÜRKLE, H.M., TIMOSSO, L. 2003. Physiology, diagnosis, and diseases of the avian reproductive tract. **The Veterinary Clinics Exotic Animal Practice**, v.6, p.57-83.
- DIAS, E.A. 2003. **Determinação do sexo de psitacídeos por radioimunensaio (RIE) de esteróides sexuais e por reação em cadeia pela polimerase (PCR) a partir de excretas cloacais**. São Paulo: USP, 109 p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal).
- EVANS, H.E. 1996. Anatomy of the budgerigar and other birds. In: ROSSKOPF, W.J. & WOERPEL, R.W. **Diseases of cage and aviary birds**. Baltimore: Williams & Wilkins. 3 ed. pp.79-162.
- FRANÇA, L.R. & CARDOSO, F.M. 1998. Duration of spermatogenesis and sperm transit time through the epididymis in the piau boar. **Tissue & Cell**. v.30, n.5, p.573-582.
- FRANÇA, L.R. & RUSSELL, L.D. 1998. The testis of domestic animals. In: REGADERA, J. & MARTINEZ-GARCIA, F. (eds.). **Male reproduction. A multidisciplinary overview**. Madrid: Churchill Livingstone, pp.197-219.
- GIANNONI, M.L., GIANNONI, M.A. FERRARI, I. 1986. **Citogenética aplicada às aves: técnicas para obtenção de metáfases**. Piracicaba: FEALQ. p.52.
- GODINHO, H.P. & CARDOSO, F.M. 1979. Desenvolvimento sexual de porcos Yorkshire. II. Estabelecimento e evolução da espermatogênese. **Arquivos da Escola de Veterinária da UFMG**. v.31, n.3, p.351-361.
- GRANDO, A.P. 2002. **Utilização de tomografia por ressonância magnética nuclear para sexagem de aves silvestres sem dimorfismo sexual**. São Carlos: USP, 89p. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia).

- GRIFFITHS, R., DOUBLÉ, M.C., ORR, K., DAWSON, R.J.G. 1998. A DNA test to sex most birds. **Molecular Ecology**. v.7, p.1071-1075.
- GUIÃO-LEITE, F.L. & PAULA, T.A.R. 2003. Rendimento intrínseco da espermatogênese, o índice de células de Sertoli e a produção espermática diária da onça parda (*Puma concolor*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.27, p.21-26.
- HARRISSON, G.J., RITCHIE, B.W., HARRISSON, L.R. 1994. **Avian medicine: principles and application**. Florida: Wingers Publishing. 1384 p.
- HILDEBRANDT, T., GÖRITZ, F., BOSCH, H., SEIDEL, B., PITRA, C. 1996. Ultrasonographic sexing and reproductive assessment of penguins. **Penguin Conservation**. v.9, n.1, p.6-12.
- HILDEBRANDT, T., PITRA, C., SÖMMER, P., PINHOWSKI, M. 1995. Sex identification in birds of prey by ultrasonography. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**. v.26, n.3, p.367-376.
- IBAMA (**Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis**). Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/sbf/fauna/index.cfm/>>. Acesso em: 09 dezembro 2006.
- IBAMA. **IBAMA dissolve comitê de recuperação da ararinha-azul**. Disponível em: <http://www.saudeanimal.com.br/noticia_ararinha.htm>. Acesso em: 02 novembro 2004.
- IMMELMANN, K. 1971. Ecological aspects of periodic reproduction. In: FARNER, D.S. & KING, J.R. **Avian biology**. New York: Academic Press. v.1, pp.341-389.
- JONES, R.C., LIN, M. 1993. Spermatogenesis in birds. **Oxford Reviews Reproductive Biology**. v.15, p.233-260.

- KIM, S. & YANG, H.H. 2001. Seasonal changes of testicular weight, sperm production, serum testosterone, and *in vitro* testosterone release in Korean ring-necked pheasants (*Phasianus colchicus karpowi*). **Journal of Veterinary Medical Science**. v.63, n.2, p.151-156.
- LOFTS, B. & MURTON, R.K. 1973. Reproduction in birds. In: FARNER, D.S. & KING, J.R. **Avian biology**. New York: Academic Press. v.3, pp.1-107.
- LOPATE, C., THRELFALL, W.R., ROSOL, T.J. 1989. Histopatologic and gross effects of testicular biopsy in the dog. **Theriogenology**. v.32, p.585-602.
- LUCCA, E.J. & ROCHA, G.T. 1992. Citogenética de aves. **Boletim do Museu Paranaense Emílio Goeldi – Série Zoologia**. v.8, n.1, p.33-68.
- MADEKUROZWA, M.C, CHABVEPI, T.S., MATEMA, S., TEERDS, K.J. 2002. Relationship between seasonal changes in spermatogenesis in the juvenile ostrich (*Stuthio camelus*) and the presence of the LH receptor and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase. **Reproduction**. v.123, p.735-742.
- MASCARENHAS, R.M., PAULA, T.A.R., CARRETTA JÚNIOR, M., RIBEIRO, E.C.S., BORBOLETA, L.R., MATTA, S.L.P. 2006. Efeitos da biópsia incisional testicular sobre o rendimento intrínseco da espermatogênese e índices de células de Sertoli em cães. **Revista Ceres**. v.53, p.100-105.
- MUÑOZ, E.M., FOGAL, T., DOMINGUES, 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*). **The Anatomical Record**. v.252, p.8-16.
- OLMOS, F. **População de araras-azuis-de-lear aumenta 5%**. Disponível em: <<http://208.185.149.227/WebX?50@53.pQEda7hNbl3.8@.2cba2783>>. Acesso em: 01 outubro 2005.

- PACHALY, J.R. 1992. Procedimentos diagnósticos acessórios em aves silvestres cativas In: _____. **Medicina de animais selvagens**. Paraná: Universidade Paranaense. p.110-111.
- PAULA, T.A.R. 1999. **Avaliação histológica e funcional do testículo de capivaras adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*)**. Belo Horizonte: UFMG, 84p. Tese (Doutorado em Morfologia).
- PEIXOTO, J.V., BALARINI, M.K., ARAÚJO, G., SÁ, S.S., TELES, M.A.D., ZARIF, C. S., TAVELA, A.O., PAULA, T.A.R. 2006. Lesão nos membros pélvicos de filhotes de periquitão-maracanã (*Aratinga leucophthalma*) por extrato artificial utilizado na nidificação em vida livre. **XIV Congresso Brasileiro de Ornitologia**. Ouro Preto: Anais CD Room.
- PELLETIER, R.M. 1990. A novel perspective: the occluding zonule encircles the apex of the Sertoli cell as observed in birds. **American Journal of Anatomy**. v.188, p.87-108.
- PEREIRA, K.S., MARUCH, S.M.G., RIBEIRO, M.G., TELES, M.E.O. 1994. Morfologia do testículo de *Numida meleagris* (Linné, 1758) Numididae – Galliformes. **BIOS – Cadernos do Departamento de Ciências Biológicas da PUC-MG**. v.2, n.2, p.19-24.
- RASO, T.F. & WERTHER, K. 2004. Sexagem cirúrgica em aves silvestres. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.56, n.2, p.187-192.
- RUPLEY, A.E. 1999. **Manual de clínica aviária**. São Paulo: Roca. 582 p.
- RUSCHI, A. 1979. **Aves do Brasil**. São Paulo: Rios. 335p.
- RUSSEL, 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, n.2, p.194-213.

- 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, n.2, p.93-106.
- RUSSELL, L.D., REN, H.P., SINHA-HIKIN, I., SCHULZE, W., SINHA-HIKIN, 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.
- SICK, H. 1997. **Ornitologia Brasileira**. Rio de Janeiro: Ed. Nova Fronteira. 912 p.
- SINHA-HIKIM, A.P., BARTKE, A., RUSSELL, L.D. 1988. Morphometric studies on hamster testes in gonadally active and inactive states: light microscope findings. **Biology of Reproduction**. v.39, p.1225-1237.
- TAE, H.J., JANG, B.G., AHN, D.C, CHOI, E.Y., KANG, H.S., KIM, N.S., LEE, J.H., PARK, S.Y., YANG, H.H., KIM, I.S. 2005. Morphometric studies on the testis of Korean ring-necked pheasant (*Phasianus colchicus karkpovi*) during the breeding and non-breeding seasons. **Veterinary Research Communications**. v.29, n.7, p.629-643.
- THRELFALL, W.R. & LOPATE, C. 1993. Testicular biopsy. In: Mc KINNON, A.O. & VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger. pp.943-949.
- WIKELSKI, M., HAU, M., WINGFIELD, J.C. 2000. Seasonality of reproduction in a neotropical rain forest bird. **Ecology**. v.81, n.9, p.2458-2472.