

VINÍCIUS HEROLD DORNELAS E SILVA

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO ESPERMATOGÊNICO DE GATOS-
MOURISCOS (*Puma yagouarundi*, LACÉPÈDE, 1809) ADULTOS**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

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

T

S586a
2014
Silva, Vinícius Herold Dornelas e, 1987-
Avaliação do processo espermatogênico de
Gatos-mouriscos (*Puma yagouarundi*, Lacépède, 1809) adultos /
Vinícius Herold Dornelas e Silva. – Viçosa, MG, 2014.
viii, 43f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Tarcizio Antônio Rêgo de Paula.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.33-43.

1. Gato (*Puma yagouarundi*). 2. Reprodução animal.
3. Aparelho genital. 4. Espermatogênese em aninais. 5. .
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária.
Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.8

VINÍCIUS HEROLD DORNELAS E SILVA

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO ESPERMATOGÊNICO DE GATOS-
MOURISCOS (PUMA YAGOUAROUNDI, LACÉPÈDE, 1809)
ADULTOS**

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

APROVADA: 21 de fevereiro de 2014.

Dr. Sérgio Luís Pinto da Matta

Dra. Thyara de Deco Souza

Dr. Cláudio César Fonseca

Dr. Moacir Carretta Júnior

Dr. Tarcízio Antônio Rêgo de Paula
(Orientador)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	iv
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
2.1. GATO MOURISCO - PUMA YAGOUARUNDI (LACÉPÈDE, 1809)	2
2.2. TESTÍCULO	5
2.2.1. COMPARTIMENTO TUBULAR.....	6
2.2.2. COMPARTIMENTO INTERTUBULAR	9
2.3. BIOPSIA TESTICULAR.....	9
2.4. IMUNOHISTOQUÍMICA	10
3. OBJETIVOS.....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
4.1. ANIMAIS	11
4.2. COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS	12
4.3. ANÁLISES REALIZADAS.....	13
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
6. CONCLUSÃO.....	32
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	33

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Gato mourisco (*Puma yagouarundi*) macho, adulto, mantido em cativeiro no Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Viçosa (Acervo CETAS-UFV).3
- Figura 2: Área de ocorrência de *Puma yagouarundi*, em amarelo. (IUCN, 2008).....4
- Figura 3: Montagem fotográfica contendo os oito estádios do ciclo do epitélio seminífero de gato mourisco (*P. yagouarundi*). Espermatogônia (SPTG); célula de Sertoli (S); espermátócito em transição pré-leptóteno/leptóteno (PL/L); leptóteno (L); zigóteno (Z); paquíteno (P); diplóteno (D); placa metafásica (PM); espermátide arredondada (Ar); espermátide em alongamento/alongada (Al). Azul de toluidina. 400 X.....29
- Figura 4: Marcação imunohistoquímica (seta) observada em espermátides arredondadas no estágio V do Ciclo do epitélio seminífero do gato mourisco, 400x.....31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:Parâmetros biométricos corporais testiculares e índice gonadossomático de P. yagouarundi	17
Tabela 2:Proporção volumétrica dos componentes do parênquima testiculares de	19
Tabela 3:Parâmetros biométricos e volumétricos referentes as células de Leydig de P. yagouarundi	20
Tabela 4:Dados sobre a biometria do compartimento tubular em P. yagouarundi.	22
Tabela 5:População celular corrigida por secção transversal de túbulo seminífero	23
Tabela 6:Dados de rendimento da espermatogênese	24
Tabela 7:Capacidade de suporte das células de Sertoli	25
Tabela 8:Frequência relativa e duração de cada estágio e das fases do ciclo do epitélio seminífero de gato-mourisco.....	30

RESUMO

SILVA, Vinícius Herold Dornelas e, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Avaliação do processo espermatogênico de gatos-mouriscos (*Puma yagouarundi*, Lacépède, 1809) adultos.** Orientador: Tarcízio Antônio Rêgo de Paula.

As pesquisas morfofuncionais sobre o testículo aliadas aos estudos em endocrinologia, embriologia e criopreservação de gametas, produzem informações que podem ser aplicadas na reprodução assistida, favorecendo o desenvolvimento de metodologias utilizadas na conservação de espécies. Os objetivos deste estudo foram quantificar as estruturas morfofuncionais do parênquima testicular, calcular os índices gonadossomáticos, tubulossomáticos e leydigossomáticos e de célula de Sertoli; descrever a duração do ciclo do epitélio seminífero pela identificação das células germinativas mais avançadas marcadas pela 5-bromodeoxiuridina (BrdU); caracterizar os diversos estádios que constituem o ciclo do epitélio seminífero com base na morfologia tubular e calcular a produção espermática diária por grama de testículo de gato mourisco (*Puma yagouarundi*). Para isso foram utilizados cinco animais machos adultos, sendo um proveniente do Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Viçosa e quatro do Parque zoológico de São Paulo. Após contenção química os animais tiveram suas medidas corporais de peso, tamanho corporal, e diâmetro de tórax mensurados, foram também submetidos a biópsias testiculares a fim de se obter material biológico para avaliação histológica e imunohistoquímica. Nos gatos mourisco estudados a média de peso foi de 6,6 kg sendo desses, 0,032% alocados em testículo (índice gonadossomático) que possui 57,36 m de túbulo seminífero perfazendo um índice tubulossomático de 0,027%. O número total de células de Leydig encontradas nessa espécie foi de 72,96 milhões de células e o índice leydigossomático foi calculado em 0,001%. Foram descritos e determinada a frequência relativa de oito estádios do ciclo do epitélio seminífero (CES) com base no método da morfologia tubular. No CES a fase pré-meiótica do processo espermatogênico foi maior que as outras (48,66%). Através do uso de um marcador de proliferação celular injetado intratesticularmente (BrdU) foram observadas células marcadas em espermátides arredondadas do estágio V, após 14 dias da aplicação. A partir daí, pode-se concluir que um ciclo do epitélio seminífero do gato mourisco dura 8,4 dias, e o processo espermatogênico duração total de 37,8 dias. O gato mourisco apresentou no epitélio

seminífero, em cada secção transversal do túbulo seminífero no estágio I do ciclo, em média, 1,03 espermatogônias do tipo A; 9,78 espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno; 10,68 espermatócitos primários em paquíteno; 25,3 espermatídes arredondadas. O rendimento geral da espermatogênese nesta espécie foi de aproximadamente 18,9 células, e cada célula de Sertoli foi capaz de sustentar e manter 14,24 espermatídes arredondadas. A produção espermatológica diária encontrada demonstra que o gato mourisco é um animal com alto nível de produção, uma vez que sua produção é cerca de 51,52 milhões de espermatozoides por grama de testículo.

ABSTRACT

SILVA, Vinícius Herold Dornelas e, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2014. **Evaluation of the spermatogenic process in jaguarundis (*Puma yagouarundi*, Lacepede, 1809) adults.** Adviser: Tarcízio Antônio Rêgo de Paula.

Morphofunctional studies on the testis allied to studies in endocrinology, embryology and cryopreservation of gametes, generate information that can be applied in assisted reproduction, favoring the development of methodologies used in conservation of species. The objectives of this study were to quantify morphological and functional structures of the testicular parenchyma, calculate gonadosomatic, tubulosomatic, leydigosomatic and Sertoli cell indices; describe the duration of the seminiferous epithelium cycle (SEC) by identifying the most advanced germ cells labeled by 5- bromodeoxyuridine (BrdU); characterize the various stages that constitute the seminiferous epithelium cycle based on tubular morphology and calculate daily sperm production per gram of testis of jaguarundi (*Pumayagouarundi*). For this purpose we used five adult males, one from Centro de Triagem de Aniamais Silvestres at Universidade Federal de Viçosa and four from Parque Zoológico de São Paulo. After chemical restraint animals had their body weight, body size, and diameter of the chest measured, and underwent testicular biopsies in order to obtain biological material for histological and immunohistochemical evaluation. In the studied Jaguarundis the average weight was 6.6 kg, being that 0.032% of it was allocated in testis (gonadosomatic index), which has 57.36 m of seminiferous tubule, coming to a tubulosomatic index of 0.027%. The total number of Leydig cells found in this species was 72.96 million cells and leydigosomatic index was calculated at 0.001%. Eight stages of the SEC were described and had their relative frequencies determined based on the tubular morphology method. At SEC, pre-meiotic stage of the spermatogenic process was higher than the other ones (48.66%). Through the use of a cell proliferation marker (BrdU) injected in the testicles, labeled cells were observed in round spermatids of stage V after 14 days of application. From this, we can conclude that a seminiferous epithelium cycle of the Jaguarundi lasts 8.4 days, and the total spermatogenic process duration is 37.8 days. The Jaguarundi presented in the seminiferous epithelium, in each cross section of the seminiferous tubule at stage I of the cycle, an average

of 1.03 spermatogonia type A; 9.78 primary spermatocytes at pre-leptotene/leptotene; 10.68 primary spermatocytes in pachytene; 25.3 round spermatids. The spermatogenesis general yield in this species was approximately 18.9 cells, and each Sertoli cell was able to sustain and maintain 14.24 round spermatids. The daily sperm production found demonstrates that the Jaguarundi is an animal with a high level of production, since its production is about 51.52 million sperm per gram of testis.

1. INTRODUÇÃO

A biodiversidade global vem sendo prejudicada pelo crescimento humano e pela consequente redução contínua de ambientes e espécimes, o que resulta em grandes perdas de variabilidade genética, levando a extinção inúmeras espécies (WILDT et al., 1992). Corson (1996) calculou a extinção de aproximadamente um milhão de espécies de plantas, animais e outros organismos, até o início do século XXI.

A destruição do habitat aliada a introdução de espécies exóticas, levam a modificações na dinâmica populacional das espécies. Os carnívoros, por estarem no topo da pirâmide alimentar, possuem grande importância ecológica, influenciando diretamente na dinâmica do ecossistema em que vivem, regulando populações de presas (PITMAN et al., 2002). Entre os carnívoros há 40 espécies de felídeos não domésticos (CHEIDA, et al, 2006), e a maioria destas espécies está em algum nível de ameaça em pelo menos uma de suas áreas de ocorrência natural (NOWELL & JACKSON, 1996; MOREIRA et al., 2001). Desta forma, o conhecimento da fisiologia reprodutiva e o estabelecimento de metodologia aplicada à conservação de espécies tornam-se imprescindíveis para manutenção de indivíduos de diversas espécies.

O gato mourisco ou jaguarundi (*Puma yagouaroundi* Lacépède, 1809), é um felino de pelagem e coloração uniforme podendo variar de cinza até vermelho. No Brasil, ocorre em uma grande variedade de habitat, sendo visto no cerrado, caatinga, pantanal e Mata Atlântica incluindo vegetação secundária (OLIVEIRA, 1994). Possui hábitos predominantemente diurnos e sua alimentação é típica de carnívoros especialistas, predando aves terrestres, lagomorfos (coelhos) e pequenos roedores (SILVEIRA, 1999).

Atualmente é classificado como vulnerável nas regiões sul e sudeste do Brasil estando presente na lista vermelha de animais ameaçados de extinção no estado do Paraná (MARQUES et al., 2002; PARANÁ, 1995). Porém, é uma das espécies de felídeos silvestres menos estudada, sendo pouco conhecidos os aspectos comportamentais, fisiológicos e reprodutivos destes animais.

Nos estudos para a conservação de espécies ameaçadas de extinção pode-se realizar pesquisas in situ, que envolvem estratégias de conservação da população em seu ambiente natural, e ex situ, em que os estudos para a conservação das espécies ocorrem fora do

ambiente natural, como a criação e manutenção em cativeiro, servindo como uma reserva de material biológico contra a extinção dessas espécies na natureza (BENSUSAN, 2008).

As pesquisas morfofuncionais sobre o testículo aliadas aos estudos em endocrinologia, embriologia e criopreservação de gametas, produzem informações que podem ser aplicadas na reprodução assistida, favorecendo o desenvolvimento de metodologias utilizadas na conservação de espécies (AMANN & LAMBIASE, 1969; MOREIRA, 2001; GUIÃO LEITE & PAULA, 2003; BARROS et al., 2004; SARTI, 2006; AZEVEDO et al., 2006; GUIÃO LEITE et al., 2006; BITTENCOURT et al., 2007; BALARINI, 2008; PEIXOTO, 2010; VASCONCELOS, 2011). Para o estudo da morfofisiologia reprodutiva em machos, a técnica de eleição utilizada é a biópsia testicular, pois permite adquirir amostras representativas do testículo para o estudo espermatogênico sem efeitos deletérios à produção espermática dos indivíduos (MASCARENHAS et al. 2006).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. GATO MOURISCO - PUMA YAGOUAROUNDI (LACÉPÈDE, 1809)

O *P. yagouarondi*, anteriormente nomeado *Herpailurusyagouarondi*, possui comprimento corporal entre 69 e 82 cm e cauda variando entre 32 e 56 cm (EISENBERG&REDFORD, 1999). Sua pelagem é de coloração uniforme podendo variar de cinza escuro-negro até vermelho (Fig. 1).



Figura 1: Gato mourisco (*Puma yagouaroundi*) macho, adulto, mantido em cativeiro no Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Viçosa (Acervo CETAS-UFV).

Sua ocorrência é registrada nas Américas, desde o Texas nos Estados Unidos até a Argentina, exceto no Uruguai e Chile (XIMENEZ, 1972; TEWES & EVERETT, 1986). No Brasil, o gato mourisco ocorre em todos os ecossistemas e numa grande variedade de habitat, sendo visto no cerrado, caatinga, pantanal e Mata Atlântica incluindo vegetação secundária, borda de mata, capoeira, capões de preferência perto de rios, lagos e banhados (OLIVEIRA, 1994) (Fig. 2). Essa espécie possui hábitos predominantemente diurnos e, ao contrário de outros pequenos felinos, tem a pupila circular, característica de animais diurnos. Seu hábito alimentar é típico de carnívoros especialistas, predando aves terrestres, lagomorfos (tapiti) e pequenos roedores (SILVEIRA, 1999).



Figura 2: Área de ocorrência de *Puma yagouarundi*, em amarelo. (IUCN, 2008)

São animais predominantemente solitários, mas é possível observar dois indivíduos juntos na natureza, o que geralmente corresponde à mãe e ao filhote jovem. A gestação do gato mourisco dura em torno de 78 dias, quando geralmente nascem dois filhotes (McCARTHY, 1992). Atualmente é classificado como vulnerável nas regiões sul e sudeste do Brasil estando ainda presente na lista das espécies da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul e na lista vermelha de animais ameaçados de extinção no estado do Paraná (MARQUEE et al., 2002, PARANÁ, 1995) e também é categorizado no apêndice I da Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES) nas Américas do Norte e Central, e no apêndice II nas outras regiões. Apesar de sua categoria de animal vulnerável, é uma das espécies de felídeos silvestres menos estudadas atualmente, sendo pouco conhecidos seus aspectos comportamentais, fisiológicos e reprodutivos.

2.2. TESTÍCULO

O testículo dos mamíferos é um órgão de forma ovalada a arredondada, geralmente localizado fora da cavidade abdominal em uma prega cutânea denominada escroto, sendo que nos felinos o escroto é perineal, sésil e comumente revestido por pelos (DYCE, 2004). A localização testicular é importante na maioria das espécies de mamíferos devido à necessidade de uma temperatura inferior nos testículos do que a temperatura da cavidade abdominal, para manter as funções testiculares (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

Este órgão está envolto pela albugínea testicular, uma cápsula constituída de tecido conjuntivo fibroso e, em algumas espécies, também por células contráteis (SETCHELL, 1991). Esta túnica é contínua com trabéculas de tecido conjuntivo, os septos testiculares, que convergem para o interior do testículo no sentido do mediastino testicular formando lóbulos testiculares, que apresentam vasos e alojam os túbulos seminíferos (PAULA, 1999; CARRETTA JUNIOR, 2008).

Embriologicamente a maioria das células somáticas constituintes dos testículos são procedente dos ductos mesonéfricos e do epitélio celomático, exceto as células germinativas, que se originam do epiblasto (KARL & CAPEL, 1998; MERCHANT-LARRIOS & MORENO-MENDOZA, 1998). Funcionalmente o testículo pode ser dividido em dois compartimentos principais, tubular e intertubular (ASHDOWN & HANCOCK, 1988). O compartimento tubular, onde há o epitélio germinativo ou seminífero, que é constituído por dois tipos de células, as da linhagem germinativa e as somáticas ou células de Sertoli que envolvem e nutrem as células germinativas. No compartimento intertubular, se localizam as células intersticiais de Leydig, responsáveis pela produção de testosterona, além de vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, células e fibras do tecido conjuntivo (RONDON et al., 2000; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2008).

Controlando as funções, endócrina e exócrina do testículo, estão os hormônios gonadotróficos hipofisários. O hormônio folículo estimulante (FSH) está relacionado com o início e manutenção da atividade gametogênica dos túbulos seminíferos, e o hormônio luteinizante (LH) que controla a atividade endócrina das células de Leydig. Essas, são responsáveis pela produção de testosterona, dão suporte à atividade gametogênica, além de

serem responsáveis pelas características sexuais secundárias no macho adulto (ASHDOWN & HANCOCK, 1988).

Entre o tamanho corporal e o tamanho dos testículos existe uma relação conhecida como índice gonadossomático (IGS). Este índice pode fornecer informações sobre a fisiologia reprodutiva e até mesmo sobre o sistema de acasalamento de uma espécie (KENAGY & TROMBULAK, 1986). Animais que adotam comportamento sexual baseado em sistemas promíscuo ou poliândrico, no qual diferentes machos copulam com a mesma fêmea no mesmo ciclo estral, apresentam maior IGS quando comparados aos que adotam sistemas monogâmicos ou poligínico, no qual um único macho é responsável pela cópula com uma ou várias fêmeas (SHORT, 1997).

Existe também uma correlação entre o peso testicular e a produção espermática (AMANN, 1970; OLAR et al., 1983; FRANÇA & RUSSELL, 1998). Entretanto, o tamanho testicular não acompanha, proporcionalmente, o tamanho corporal, sendo o investimento somático em massa gonadal maior em animais de pequeno porte em relação àqueles de maior porte corporal (KENAGY & TROMBULAK, 1986). Esse fato contribui para a economia de energia já que animais de grande porte produzem quantidades excessivamente grandes de espermatozoides, sem a necessidade de maior investimento em tamanho testicular (PAULA, 1999).

2.2.1. COMPARTIMENTO TUBULAR

Há grande variação na proporção volumétrica do túbulo seminífero no testículo entre as diferentes espécies, sendo esse componente o mais abundante do parênquima testicular em todas as espécies já estudadas (FRANÇA & RUSSELL, 1998). Parâmetros quantitativos diretamente relacionados com o túbulo seminífero, como o diâmetro tubular, a espessura do epitélio seminífero e o 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).

O epitélio seminífero é composto por 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; na camada apical encontram-se as 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 sequência, 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 os métodos utilizados para se estudar os estádios do ciclo do epitélio seminífero, o mais empregado nos animais domésticos é aquele baseado na forma e na localização dos núcleos das espermátides e na presença de figuras de divisões meióticas (ROOSEN-RUNGE & GIESEL Jr., 1950; COUROT et al., 1970; ORTAVANT et al., 1977; GUERRA, 1983; FRANÇA, 1991), método este designado como da morfologia tubular segundo Berndtson (1977).

Para quantificar a espermatogênese é fundamental o conhecimento do ciclo do epitélio seminífero, a caracterização dos estádios que o compõe e a determinação da frequência destes estádios. A espermatogênese é um processo sincrônico e regular de divisão celular e diferenciação, pelo qual uma espermatogônia-troncoorigina uma célula haplóide altamente especializada (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 sustentação e organização das células germinativas ao longo do epitélio seminífero são feitas por uma célula somática denominada célula de Sertoli (RUSSELL et al., 1990a). Esta desempenha papel fundamental na mediação da ação do FSH e da testosterona no processo espermatogênico, 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 de células germinativas em degeneração e do excesso de citoplasma das espermátides em espermição (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; KUMI-DIAKA 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 & CHRSTENSEN, 1982; RUSSELL et al., 1991; RUSSELL et al. 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 et al., 1995) 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).

Nos túbulos seminíferos de animais sexualmente maduros, as células espermatogênicas estão organizadas em estádios. Com exceção de algumas espécies de primatas, o arranjo dos estádios do ciclo do epitélio seminífero é segmentar em todos os mamíferos investigados, existindo somente um estágio por secção transversal de túbulo seminífero (LEBLOND & CLERMONT, 1952; RUSSELL et al., 1990a).

Amann e Almquist (1961) desenvolveram a metodologia para o acesso à reserva espermática testicular através da quantificação da população de espermátides no epitélio seminífero, ou seja, o número potencial de espermatozoides em produção no testículo, ou por grama de testículo a cada ciclo do epitélio seminífero de uma dada espécie (AMANN & LAMBIASE, 1969; BERNDTSON, 1977). Estes mesmos autores descreveram a produção espermática testicular como sendo a divisão da reserva espermática por um divisor de tempo, a duração do ciclo do epitélio seminífero (AMANN & ALMQUIST, 1962). Quando esta duração é calculada em relação ao peso do testículo, converte-se no mais importante parâmetro de comparação interespecífica da avaliação do processo espermatogênico (AMANN & LAMBIASE, 1969).

2.2.2. 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. Porém, 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 o seu número 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 unidade de tempo, a velocidade pela qual a testosterona deixa o testículo via vasos linfáticos, vasos sanguíneos e fluidos seminiais, 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 et al. 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.

2.3. BIOPSIA TESTICULAR

A biópsia testicular é utilizada em muitos casos para a avaliação de patologias relacionadas à infertilidade (NSEYO et al., 1984). Sendo as mais frequentemente observadas a aplasia de células germinativas, hipoespermatogênese, condições inflamatórias e neoplasias (LOPATE et al., 1989). A biópsia testicular é a técnica comumente utilizada pois permite adquirir amostras representativas do testículo para o estudo espermatogênico sem efeitos deletérios à produção espermática dos indivíduos (MASCARENHAS et al. 2006).

Os fragmentos testiculares obtidos por biópsia incisional também fornecem amostragem significativa de parênquima testicular (HUNT & FOOTE, 1997), provendo informações que são representativas para ambos os testículos quando estes apresentam tamanhos comparáveis (LOPATE et al., 1989). Assim, a biópsia testicular pode também ser usada na descrição histológica quantitativa e qualitativa do parênquima testicular em espécies silvestres, sem a necessidade de castração (BITTENCOURT, 2003; GUIÃO LEITE, 2002).

2.4. IMUNOHISTOQUÍMICA

A duração do ciclo do epitélio seminífero é uma constante biológica espécie específica, o que significa que não há variação significativa dentro de uma mesma espécie, porém, variações interespecíficas são marcantes (GUIÃO LEITE, 2002; BITTENCOURT, 2003; PARAPANOV et al., 2007).

Para o cálculo da duração do ciclo do epitélio seminífero são utilizados marcadores celulares, como a timidinatriada (CARDOSO & GODINHO, 1982; FRANÇA, 1991; PAULA, 1999; GUIÃO-LEITE et al., 2006; BITTENCOURT et al., 2007) ou a bromodeoxiuridina (BrdU) (BALARINI et al., 2011; VASCONCELOS, 2011) que permitem aplicações diretamente no parênquima testicular ou aplicações sistêmicas (ELLWART & DORMER, 1985; PEIXOTO, 2010).

Os métodos imunohistoquímicos estão cada vez mais difundidos nos laboratórios e já se encontram entre os mais úteis e comumente usados para avaliação da proliferação celular (MELLO & ALVES, 1999). A bromodeoxiuridina (5-bromo-2'-deoxiuridina), também designada por BrdU, é uma pirimidina análoga da timidina que é seletivamente incorporada ao DNA celular durante a fase S do ciclo celular, fase de duplicação do DNA. 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 timidinatriciada para estudos morfofuncionais, já que é uma técnica com abordagem adequada, precisa e rápida para determinar o ciclo do epitélio seminífero (ROSIEPEN et al., 1997).

3. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo descrever, através da biometria testicular e corporal, as características morfofuncionais do testículo em gato-mourisco, mais especificamente:

- Determinar as proporções volumétricas entre os componentes testiculares;
- Calcular os índices gonadossomático, tubulossomático e leydigossomático;
- Calcular a duração do ciclo do epitélio seminífero, índice de células de Sertoli, o rendimento intrínseco de cada fase do processo espermatogênico bem como a produção espermática diária, e as correlações destes itens com parâmetros biométricos corporais, testiculares e seminiais.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

Foram utilizados cinco gatos mouriscos machos adultos, mantidos em condições de cativeiro em dois centros devidamente regularizados pelo IBAMA, um animal do Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Viçosa e quatro do Parque Zoológico de São Paulo. Todos os procedimentos foram realizados com aprovação da Comissão de Ética no Uso Animal da Universidade Federal de Viçosa (CEUA-UFV), registro na CEUA número 36/2013, e do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (Sisbio – IBAMA/número 40034-1).

Estes animais foram submetidos à biópsia testicular, sendo inicialmente submetidos a jejum prévio de 12 horas à administração dos agentes anestésicos. Cada animal recebeu como medicação pré-anestésica sulfato de atropina (0,04 mg/kg), seguido da sedação com 1 mg/kg de cloridrato de xilazina e indução com anestesia geral através de anestesia inalatória com isoflurano a 1% de saturação. Os animais foram então pesados e tiveram as medidas de comprimento de corpo, comprimento de cauda, diâmetro torácico e a altura de membro torácico, mensuradas. Durante o procedimento a frequência cardíaca e a saturação de oxigênio foram aferidas com uso de oxímetro de pulso. A frequência respiratória foi aferida pela observação dos movimentos abdominais de inspiração e expiração. A temperatura retal foi mensurada com auxílio de um termômetro digital. Todos os parâmetros foram avaliados a cada 15 minutos. Após o fim dos procedimentos os animais tiveram os efeitos da xilazina revertidos através aplicação intravenosa de 20mg/kg de ioimbina. Os animais tiveram criterioso acompanhamento médico veterinário até poderem se manter em estação, possibilitando uma recuperação pós-anestésica confortável e segura. Como medidas profiláticas pós-operatórias os animais receberam terapia antibiótica e antiinflamatória.

O procedimento de biópsia testicular foi precedido de mensurações percutâneas de ambos os testículos, utilizando paquímetro digital, registrando-se largura, a espessura e o comprimento, para o cálculo dos respectivos volumes. Com a finalidade de se obter maior precisão do cálculo de volume testicular também foi mensurada a espessura de uma prega dupla de pele do escroto, para se descontar das demais medidas testiculares.

Um dos animais recebeu, diretamente na região média do parênquima testicular, uma aplicação de 0,1ml de 5-bromodeoxiuridina (BrdU).

4.2. COLETA E PROCESSAMENTO DE AMOSTRAS

Após tricotomia e antissepsia local, a pele do escroto foi incisada, e com o auxílio de um bisturi circular de 2 mm de diâmetro foi obtido um fragmento da região média do testículo direito ou esquerdo que foi imediatamente fixado, em solução de Karnovsky, 1965, em temperatura ambiente por um mínimo de duas horas, sendo posteriormente armazenados sob refrigeração em tampão fosfato 0,1M pH 7,4.

Os fragmentos foram incluídos em resina glicol metacrilato, sendo para isto desidratados em séries de concentrações crescentes de álcoois (70%, 80%, 90% e 100%) permanecendo meia hora em cada concentração, com posterior infiltração em resina plástica, e a seguir inclusão, na mesma resina, com a adição de catalisador. Com navalha de vidro foram obtidos tantos cortes histológicos quanto possíveis, com 3µm de espessura em intervalos de 30 µm, os quais foram corados com solução de azul de toluidina / borato de sódio (1%).

O animal que recebeu a aplicação de BrdU passou pelo mesmo procedimento de biopsia após 14 dias e 33 minutos da aplicação do imunomarcador, entretanto o fragmento coletado desse animal foi incluído em parafina, desidratado em série crescente de etanol (70, 80, 90% e absoluto) em banhos de 30 minutos cada e diafanizado 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-JungAmericaOpticalCompany), com navalha de aço, obtendo-se cortes semi-sequenciais de 4µm de espessura. Os cortes histológicos obtidos foram colocados em lâminas eletricamente carregadas, garantindo melhor adesividade dos mesmos (ImmunoSlide®- EasyPath). 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).

4.3. ANÁLISES REALIZADAS

Com os valores adquiridos da mensuração corporal, mais especificamente o diâmetro torácico e o peso corporal do animal, foi analisada a força da correlação entre esses valores, visto que o diâmetro torácico é um parâmetro rotineiramente empregado na biometria corporal de animais silvestres que pode auxiliar na previsão do peso corporal, em trabalhos a campo.

Utilizando as dimensões dos testículos,descontandos da prega dupla de pele, e através da fórmula do volume do elipsoide ($\frac{4}{3}\pi ABC$, onde A= metade da largura, B= metade da espessura e C= metade do comprimento) foi calculado o volume testicular em cada animal (GUIÃO-LEITE & PAULA, 2003; MASCARENHAS et al., 2006).

O índice gonadossomático(IGS) foi calculado dividindo-se o peso de ambos os testículos pelo peso corporal e o resultado multiplicado por 100. 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.

As preparações histológicas foram avaliadas em microscópio de luz com auxílio de uma ocular integradora dotada de 440 pontos em aumento de 400 vezes. Foi feita a avaliação da proporção volumétrica dos componentes do parênquima testicular, através da contagem dos elementos teciduais correspondentes aos pontos que situavam sobre espaços linfáticos, parede ou lúmen de vasos sanguíneos, núcleo ou citoplasma de células de Leydig, tecido conjuntivo e espaço tubular, em 20 campos aleatoriamente distribuídos para cada animal. Inferindo-se a estas proporções o volume total do parênquima testicular, calculado previamente, foram obtidos os volumes totais de cada componente testicular em todos os animais.

O diâmetro médio dos túbulos seminíferos e a espessura do epitélio seminífero foram obtidos pela média das mensurações, através de uma ocular micrométrica, em 20 secções transversais de túbulos seminíferos, o mais circular possível, em cada animal (BITENCOURT, 2003).

Com o volume de túbulos seminíferos do testículo e do diâmetro médio dos mesmos, foi possível a obtenção do comprimento total do túbulo seminífero por testículo através da fórmula do volume de um cilindro ($\text{volume} = \text{área da base} \times \text{altura}$). Associando-se o valor encontrado para o comprimento total de túbulo seminífero ao peso testicular foi possível obter o comprimento de túbulo seminífero por grama de testículo, medida está adequada para comparação entre animais de diferentes portes.

Ao microscópio de luz foram caracterizados os oito estádios do ciclo do epitélio seminífero pelo método da morfologia tubular. Também foi realizada a contagem das populações de espermatogônias do tipo A, espermatócitos primários em préleptóteno/leptóteno, espermatócitos primários em paquíteno, espermatídes arredondas e células de Sertoli em dez secções transversais de túbulos seminíferos em estágio 1. As populações celulares obtidas foram corrigidas numericamente quanto à espessura do corte e do diâmetro nuclear ou nucleolar, no caso das células de Sertoli, utilizando-se a fórmula de Abercrombie (1946) modificada por Amann e Almquist (1961) descrita abaixo.

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

Após as correções, as diferentes populações celulares foram utilizadas para os cálculos do coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais, rendimento meiótico, rendimento geral da espermatogênese e índices de células Sertoli. Assim, de posse da população dos diferentes tipos celulares, computados em uma secção transversal, foi calculada a população total de cada tipo celular, além da produção espermática diária por testículo e por grama de testículo, com a duração do ciclo espermático, em cada animal.

Para a estimativa das dimensões volumétricas da célula de Leydig foi realizada a mensuração do diâmetro de dez núcleos dessas, por animal, com auxílio de microscópio de luz em aumento de mil vezes com uma ocular micrométrica acoplada. Com o diâmetro médio do núcleo das células de Leydig foi calculado o seu volume utilizando-se a fórmula $4/3\pi r^3$, onde r é o raio nuclear médio obtido. Através do cálculo da proporção volumétrica dos componentes do tecido intertubular, foi calculada a relação núcleo x citoplasma das células de Leydig. 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 total de células de Leydig por testículo e conseqüentemente por grama de testículo. O índice Leydigossomático foi obtido ao inferir a massa corporal do gato mourisco ao volume total de células de Leydig.

A duração do ciclo do epitélio seminífero foi calculada através da observação da célula mais avançada no epitélio que apresentou marcação, de acordo com o método da morfologia tubular. Desta forma, foi calculada a frequência total dos estádios percorridos desde a incorporação do BrdU nos espermatócitos jovens na aplicação até a marcação da célula mais avançada, na coleta do material. A frequência dos estádios percorridos corresponde ao intervalo de tempo decorrido, sendo calculado o período relativo de um ciclo do epitélio seminífero e posteriormente do processo espermatogênico total.

Os estádios do ciclo do epitélio seminífero foram caracterizados com base no método da morfologia tubular (BERNDTSON, 1977). A frequência relativa dos estádios do ciclo do epitélio seminífero foi feita através da proporção de cada um dos oito estádio do CES, em 100

secções transversais de túbulos seminíferos em cada animal. Para tal utilizou-se microscópio de luz, com aumento de 200 X. Para registro e ilustração foram obtidas imagens digitais capturadas em fotomicroscópio de luz (Olympus CX31), equipado com câmera digital Olympus SC20.

Com base na população de espermátides por secção transversal do túbulo seminífero e no comprimento total de túbulos seminíferos, foi possível estimar a reserva espermática testicular, ou seja, estimar a população total de espermátides produzidas ao longo de todo o túbulo seminífero. Como estas espermátides são produzidas durante o período de um ciclo do epitélio seminífero, a partir do cálculo da duração do CES, é possível a estimativa da produção espermática por dia e mesmo por grama de testículo.

Os resultados foram avaliados quanto a média, desvio padrão e o coeficiente de variação segundo a função estatística do programa Excel/ Windows7

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os animais utilizados apresentaram um peso corporal médio de 6,56 Kg, enquanto na literatura consultada o gato mourisco é apresentando com peso médio máximo de 5,0 kg (CHEIDA et al., 2006). Provavelmente o maior peso observado nos animais utilizados seja devido às condições de manutenção em cativeiro, onde há uma tendência de sobrepeso devido a pouca atividade e alimentação regular. O diâmetro torácico foi de 36 cm, sendo esse um parâmetro rotineiramente empregado na biometria corporal de animais silvestres,

Ao correlacionar esse parâmetro com o peso corporal observamos um valor de 0,935 no gato mourisco, indicando que o diâmetro torácico tem uma forte correlação positiva com o peso corporal assim como descrito por Sarti e colaboradores (2008) em jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) adultas, tornando-se desta forma um dos parâmetro mais importantes para estimativa do peso corporal.

O volume médio de ambos os testículos foi de 2,22 ml por animal (Tab. 1), sendo este volume considerado como o peso, uma vez que a densidade volumétrica do testículo é muito próxima a 1,0 (JOHNSON et al., 1981). Assim, foi possível o cálculo do Índice Gonadossomático (IGS) do gato mourisco como 0,032% (Tab. 1). O índice gonadossomático é um importante parâmetro funcional, observando-se que espécies de menor tamanho corporal

tendem a apresentar maior alocação em massa testicular que aquelas de maior porte (KENAGY & TROMBULAK, 1986). Porém, a maior aplicabilidade do conhecimento do IGS se deve ao fato de que o sistema de acasalamento de uma determinada espécie estar altamente correlacionado com o IGS. Assim, espécies com sistemas poliândricos ou promíscuos apresentam maior investimento corporal relativo em massa testicular, uma vez que a competição pela progênie dá-se no interior dos órgãos genitais femininos, por meio da disputa entre os espermatozoides pela fecundação do gameta feminino. Já os animais com reprodução poligínica ou monogâmica apresentam menor investimento em massa testicular, uma vez que há uma competição entre machos e somente um terá acesso à fêmea (KENAGY & TROMBULAK, 1986).

Na família Felidae, para a maioria das espécies, há uma clara correlação do IGS com o tamanho corporal, ou seja, animais de grande porte apresentam IGS baixo [Puma concolor (suçuarana) 0,03% (GUIÃO-LEITE et al., 2006), Pantera onca (onça pintada), 0,034% (AZEVEDO et al., 2006)] e animais de pequeno porte IGS alto [Leopardustigrinus (gato do mato pequeno), 0,06% (BALARINI, 2008)]. Porém, o comportamento reprodutivo parece influenciar de alguma maneira algumas espécies, como por exemplo a jaguatirica, que por ser um animal de porte médio, teoricamente apresentaria valores intermediários. Entretanto Sarti e colaboradores (2008), descrevem os maiores valores já registrados para felinos (0,12%), implicando em um provável comportamento poliândrico ou promíscuo. Da mesma forma os valores de IGS, registrados no gato mourisco, não são correlacionados apenas ao tamanho corporal, uma vez que, por ser uma espécie de pequeno porte, deveria apresentar valores próximos ao 0,06% observado em *L. tigrinus* e aos 0,07% registrado em *Feliscatus* (gato doméstico) (GODINHO, 1999). Assim, com apenas 0,03% de IGS o *P. yagouaroundi* apresenta valor semelhante ao observado no seu parente mais próximo, o *P. concolor*, um felino de grande porte. A partir dos dados obtidos indica-se que o gato mourisco possivelmente apresenta comportamento reprodutivo compatível como IGS baixo, porém, não há relatos na literatura para tal.

Tabela 1: Parâmetros biométricos corporais testiculares e índice gonadossomático de *P. yagouaroundi*

Parâmetros	Médias ± Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
Peso corporal (g)	6560 ± 875	13,4

Comprimento do corpo (cm)	71,1 ± 8,5	12
Diâmetro torácico (cm)	36 ± 2	5,6
Volume de ambos os testículos (mL)	2,22 ± 0,55	24,7
Índice Gonadosomático (%)	0,032 ± 0,004	12,8

O testículo é composto por albugínea, parênquima e mediastino. A albugínea e o mediastino testiculares são porções estruturais e condutoras, sendo normalmente retirados das análises produtivas testiculares. O parênquima testicular, funcionalmete, representa o peso líquido do testículo e acumula as funções gametogênica e androgênica respectivamente nos compartimentos tubular e intertubular. São de grande importância para a descrição da fisiologia testicular as proporções volumétricas dos constituintes testiculares, uma vez que os diferentes componentes podem interferir direta e indiretamente nas predições e estimativas produtivas. Desta forma, embora o volume ocupado pela albugínea seja possível de cálculo a partir de fragmentos obtidos na biópsia, a proporção volumétrica do mediastino testicular só é possível a partir da dissecação testicular. Assim em um animal que veio a óbito, foi possível, a mensuração mediastínica e com isso a confecção de um parâmetro proporcional (1,15%) do volume testicular, para a estimativa nos demais animais. Este valor foi muito próximo ao observado por Balarini (2008), cerca de 1,81%, obtido nas mesmas condições no gato do mato pequeno.

A albugínea testicular nos animais estudados apresentou volume médio de aproximadamente 0,26 ml correspondendo a 13,6 % do volume testicular, valor muito semelhante ao relatado para o gato do mato pequeno (BALARINI, 2008). Desta forma, cerca de 14,75% do volume testicular de gato mourisco estão alocados em mediastino e albugínea testiculares e os demais 85,25% representam a porção produtiva testicular, e embora o termo não seja totalmente adequado, é comumente utilizado parênquima testicular para sua referência.

O parênquima testicular é dividido em dois compartimentos, o tubular e o intertubular (AMANN, 1970; FAWCET et al., 1973; RUSSELL et al., 1990a). O parênquima testicular do gato mourisco apresenta 82,01% de sua massa alocada em túbulos seminíferos, e 17,99% alocada em intertúbulo (Tab. 2).

Tabela 2: Proporção volumétrica dos componentes do parênquima testiculares de *P. yagouaroundi*

Parâmetros	Médias \pm Desvio Padrão
Compartimento Intertubular (%)	17,99 \pm 0,073
Compartimento tubular (%)	82,01 \pm 0,073

O compartimento intertubular é composto de pelas células de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, e uma variada população de células, entre elas macrófagos e mastócitos (RUSSELL, 1996). No *P. yagouaroundi* o tecido conjuntivo mostrou-se o componente mais abundante do tecido intertúbular, representando 6,95% do parênquima testicular, valor este menor que na maioria dos felinos silvestres, que possuem uma variação de 7,5% a 16,73% (BALARINI, 2008; SARTI et al, 2008; AZEVEDO et al, 2008; BARROS et al, 2005; GUIÃO LEITE et al., 2006). Apenas o gato doméstico (2,9%; GODINHO, 1999) apresentou proporção de tecido conjuntivo menor que a do gato mourisco.

Em relação às células de Leydig do gato mourisco, estas representam cerca de 4,44% do parênquima testicular (Tab. 3), valor menor do que as proporções encontradas em outros felinos: 6% no gato doméstico (GODINHO, 1999), 8% na suçuarana (GUIÃO LEITE, 2002) e 13% na onça pintada (AZEVEDO, 2004), e maior do que a encontrada na jaguatirica, 3,9% (SARTI et al., 2011). Em termos volumétricos cerca de 0,0845 ml em média são alocados em células de Leydig em ambos testículos no gato mourisco, perfazendo um índice leydigossomático (ILS) médio de 0,0013%. As células de Leydig apresentam uma importante função esteroidogênica, fundamental para a produção espermiática e determinação das características sexuais secundárias e comportamentais. Embora a função androgênica não seja apenas uma dependência do volume das células de Leydig, uma vez que a capacidade individual destas células na secreção androgênica tenha um peso espécie específico (EWING et al., 1979) em resposta à quantidade de retículo endoplasmático liso (ZIRKIN et al, 1980), a confecção do índice leydigossomático permite a comparação interespecífica do investimento androgênico testicular entre espécies de diferentes portes. Assim o ILS no gato mourisco está próximo ao do leão (*Pantheraleo*), que é de 0,0019% (BARROS et al 2004), porém é inferior ao encontrado em outros felinos, 0,005% em gato do mato pequeno (Balarini, 2008) e 0,0036% em jaguatirica (Sartiet al., 2011).

No gato mourisco o diâmetro nuclear médio nas células de Leydig foi de 6,95 μ m, valor muito próximo ao observado no gato do mato pequeno, 7 μ m (BALARINI, 2008), e do

leão, 7,1 μm (BARROS, 2005), e menor que o da jaguatirica, 8,48 μm (SARTI et al., 2008). Desta forma o a um volume nuclear médio destas células em gato mourisco corresponde a cerca de 176,53 μm^3 .

No presente estudo observou-se que o núcleo da célula de Leydig corresponde a 16,7% do volume total da célula, dentro da amplitude de 10 a 19% observada por França e Russell (1998), para animais domésticos. Comportamento semelhante foi registrado para gato doméstico 13% (GODINHO, 1999) e onça pintada 10% (AZEVEDO et al, 2008), porém valores menores foram registrados para a célula de Leydig do Leão 7,1% (BARROS, 2005), e valores percentuais maiores foram observados em gato do mato 23,9% (BALARINI, 2008) e jaguatirica 35,11% (SARTI, 2006).

Assim, com o volume total de células de Leydig correspondendo a cerca de 0,0845 ml foi possível o cálculo de cerca de $72,96 \times 10^6$ de células de Leydig em ambos os testículos de gato mourisco (tab. 3). O que corresponde a cerca de $38,78 \times 10^6$ células de Leydig por grama de testículo. Valores próximos foram registrados para a onça pintada $44,8 \times 10^6$ (AZEVEDO et al 2008), e para o leão 57×10^6 (BARROS, 2005). Entretanto valores muito acima foram registrados para o número de células de Leydig por grama de testículo no gato do mato pequeno (BALARINI, 2008). Os dados relativos à proporção e volumetria de células de Leydig não apresentam uma aplicabilidade funcional visto a grande variabilidade observada entre as espécies. Ou seja, inúmeros fatores podem influenciar a quantidade de células de Leydig, dentre eles: 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).

Tabela 3: Parâmetros biométricos e volumétricos referentes as células de Leydig de *P. yagouaroundi*

Parâmetros de células de Leydig	Médias \pm Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
Diâmetro nuclear (μm)	6,95 \pm 0,39	5,6
Volume nuclear (μm^3)	176,53 \pm 82,9	58,5
Proporção nuclear (% da célula)	16,7 \pm 0,03	27,5

Número de células nos testículos (10^6)	$72,96 \pm 184$	32
Número de células/ grama de testículo (10^6)	$38,78 \pm 38$	13,8
Índice Leydigossomático	$0,001 \pm 0,0004$	38,7

O compartimento tubular é o principal componente do testículo na grande maioria dos mamíferos, influenciando no peso testicular (AMANN, 1970; FRANÇA & RUSSELL, 1998; PAULA, 1999). Com exceção dos baixos valores descritos na marmota e na capivara (RUSSELL et al., 1990b; PAULA, 1999), a maioria dos animais investigados apresenta entre 70% e 90% de túbulo seminífero no parênquima testicular (GUIÃO LEITE & PAULA, 2003; BARROS et al., 2004; AZEVEDO et al., 2006; BITTENCOURT et al., 2007; SARTI et al., 2008; CALDEIRA et al., 2008). Dentre os felinos, a proporção de túbulo seminífero *P. yagouaroundi* (82,01%) está próxima ao observado no *L. tigrinus*, de 81,29% (BALARINI, 2008) e ao *L. pardalis*, de 80,75% (SARTI et al, 2008), porém superior aos valores descritos para os demais felinos estudados como o *P. concolor* 78% (GUIÃO LEITE & PAULA, 2003), o *P. onca* 77% (AZEVEDO et al, 2006) e o *P. leo* 75,6% (BARROS et al, 2004).

Na caracterização do compartimento tubular a medida do diâmetro tubular é uma abordagem classicamente utilizada como indicador da atividade espermatogênica em investigações envolvendo a função testicular (ATTAL & COUROT, 1963; GODINHO & CARDOSO, 1979; FRANÇA & CARDOSO, 1998; SINHA HIKIN et al, 1991; RUSSEL et al, 1994; MUÑOZ et al, 1998). O valor observado na maioria dos amniotas varia de 180 a 300 μm (ROOSEN-RUNGE, 1977), mas o gato-mourisco mesmo estando dentro dessa margem (198,93 μm), apresenta um diâmetro de túbulo seminífero (Tab. 4) inferior aos dos felinos já estudados que variam entre 228 à 257 μm (GODINHO, 1999; GUIÃO-LEITE & PAULA, 2003; AZEVEDO, 2004; BARROS, 2005; BALARINI, 2008). Em estudos com rato, Wing e Christensen (1982) reportaram diferenças significativas no diâmetro tubular ao longo do túbulo seminífero, acompanhando as variações do ciclo do epitélio seminífero, relacionadas com o aumento do lume tubular que precede a espermição. Assim, a mensuração da espessura do epitélio seminífero é mais efetiva para a avaliação da produção espermática do que o diâmetro tubular. O valor da espessura do epitélio seminífero no gato-mourisco foi de 81,48 μm , superior ao relatado em *L. tigrinus* (78,86 μm por BALARINI, 2008), em *P.*

concolor(67 μm por GUIÃO LEITE & PAULA, 2003) e em *L. pardalis*(75,4 μm por SARTI et al, 2008). Entretanto o valor encontrado nesta espécie foi inferior ao encontrado em *P. onca*(90,3 μm por AZEVEDO et al, 2006) e em *P. leo*(92,3 μm por BARROS et al, 2004) e próximo ao valor encontrado em *F. catus*(81 μm por GODINHO, 1999).

Na mensuração do compartimento tubular o gato mourisco apresenta 57,36 metros de túbulos seminíferos em ambos os testículos (Tab. 4). Porém há uma grande variação entre as diferentes espécies no tamanho testicular e por isso, não é significativa comparação quanto ao comprimento total de túbulo seminífero, sendo o comprimento tubular por grama de testículo um parâmetro mais significativo para comparação interespecífica (BALARINI, 2008). O comprimento de túbulo seminífero por grama de testículo do gato-mourisco é superior aos demais felinos estudados, sendo seu valor de 26,8 μm (Tab. 4) e variando de 12,2 a 23 μm para outras espécies de felinos, (BALARINI, 2008; SARTI et al, 2008; AZEVEDO et al, 2006; BARROS et al, 2004; GUIÃO LEITE & PAULA, 2003 e GODINHO, 1999).

O índice tubulossomático (ITS) descreve o investimento corporal em túbulos seminíferos e também adequa-se ao estudo comparativo entre espécies de diferentes portes físicos. Segundo Kenagy e Trombulak (1986), o investimento produtivo gametogênico reflete o comportamento reprodutivo, sendo que os animais promíscuos e poliândricos apresentam maior investimento em túbulos seminíferos que aqueles monogâmicos e poligínicos. Desta forma o gato-mourisco com valor médio registrado para o ITS de 0,027% (Tab. 4), aproximase aos valores observados para o *P. concolor* (0,02%; GUIÃO LEITE, 2002) e *P. onca* (0,02%; AZEVEDO, 2004). Apresentando valores aquém do observado para o *L. pardalis* (0,074%; SARTI et al, 2008), o *F. catus* (0,06%; GODINHO, 1999) e *L. tigrinus* (0,04%; BALARINI, 2008). Desta forma, embora o gato mourisco apresente proximidade filogenética com o *P. concolor*, seria esperado um comportamento morfométrico testicular próximo ao observado nos felinos de pequeno porte, o que não é observado.

Tabela 4:Dados sobre a biometria do compartimento tubular em *P. yagouaroundi*.

Parâmetros	Médias \pm Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
Túbulo seminífero (%)	85,5 \pm 0,0277	3,2
Diâmetro de túbulo seminífero (μm)	198,93 \pm 13,78	6,9

Espessura de epitélio seminífero (μm)	$81,48 \pm 4,13$	5,1
Comprimento total de túbulo seminífero (m)	$57,36 \pm 16,05$	28
Comprimento de túbulo seminífero por grama de testículo (m/g)	$26,8 \pm 5,29$	15,1
Índice Tubulossomático (%)	$0,027 \pm 0,003$	11,9

Três fases distintas podem ser observadas durante o processo espermatogênico: a fase proliferativa, na qual as espermatogônias sofrem rápidas e sucessivas divisões mitóticas; a fase meiótica, na qual o material genético é recombinado e segregado, e a fase espermiogênica, onde as espermátides se transformam em células estruturalmente equipadas para atingir e fertilizar o gameta feminino (RUSSELL et al., 1990b). Em todos os mamíferos investigados somente de 15% a 50% dos espermatozoides teoricamente esperados são produzidos (HUCKINS, 1978; CASTRO et al., 1997; FRANÇA & RUSSELL, 1998; SWERDLOFF et al., 1998). Isto provavelmente se deve a uma degeneração densidade dependente, onde a apoptose é o mecanismo homeostático utilizado para limitar as células germinativas a um número que possa ser suportado pelas células de Sertoli disponíveis (HUCKINS, 1978; DE ROOIJ & JANSSEN, 1987; DE ROOIJ & LOK, 1987; SHARPE, 1994; DE ROOIJ, 1998; SANTOS, 1999). Desta forma, as perdas celulares são um componente integrante do processo espermatogênico.

Tabela 5: População celular corrigida por secção transversal de túbulo seminífero

Parâmetros	Médias \pm Desvio Padrão	Coefficiente de Variação (%)
Espermatogônia A	$2,93 \pm 0,17$	6
Espermatócito primário em préleptóteno/leptóteno	$19,22 \pm 0,53$	18,61
Espermatócito primário em paquíteno	$17,86 \pm 1,25$	8,54
Espermátide arredondada	$55,44 \pm 3,64$	6,95

Nos animais domésticos é esperado um valor entre 14,6 a 24,8 espermatócitos primários em pré-leptóteno para cada espermatogônia tipo A (FRANÇA & RUSSELL, 1998), o gato mourisco apresentou 6,55 células (Tab. 6), um valor superior ao descrito para outras espécies de felinos que tem uma variação de 7,7 espermatócitos na suçuarana (GUIÃO LEITE, 2002) a 16,8 na jaguatirica (SARTI et al. 2008).

Na fase meiótica é onde geralmente ocorre a maior perda numérica de células nos mamíferos já estudados (ROOSEN-RUNGE, 1973, FRANÇA & RUSSELL, 1998; FRANÇA et al., 1999). A maior parte dos autores cita que as apoptoses que ocorrem na meiose fazem parte do mecanismo de eliminação de células com cromossomos anormais ou aberrantes (ROOSEN-RUNGE, 1973; SHARPE, 1994). No gato mourisco observou-se uma perda de 22,5% do número potencial máximo de espermátides produzidas a partir de espermatócitos primários (Tab. 6). Próximo aos valores registrados na onça pintada 20% (AZEVEDO et al, 2006), na jaguatirica 20% (SARTI, 2006) e suçuarana 25% (GUIÃO LEITE & PAULA, 2003) superior aos 12% do gato do mato (BALARINI, 2008) e inferior apenas aos valores descritos para o leão 33% (BARROS et al, 2007).

O rendimento geral da espermatogênese é uma mensuração da eficiência do processo espermatogênico como um todo, e é calculado a partir da população de espermátides arredondadas por secção transversal do túbulo seminífero. Sua confiabilidade como um índice de avaliação da produção de espermatozoides baseia-se no fato de que perdas durante o processo espermiogênico são consideradas pequenas e não significativas (AMANN, 1970; BERNDTSON, 1977; RUSSELL & PETERSON, 1984; JOHNSON et al., 2000). O rendimento geral da espermatogênese no gato mourisco foi 18,9 células, significando que, 18,9 espermatozoides foram produzidas a partir de cada espermatogônia tipo A (Tab. 6), um rendimento geral mais próximo ao do gato domésticos (16,3) encontrado por França e Godinho (2003), porém inferior ao de outros felinos selvagens como a jaguatirica (57,0) demonstrado por Sarti e colaboradores (2008).

Tabela 6: Dados de rendimento da espermatogênese

Rendimento da espermatogênese	
Coefficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais (Espermatogônia A: Espermatócito I PL/L)	1 : 6,55

Ocorrência de perdas celulares durante a prófase meiótica (Espermatócito I PL/L: Espermatócito I PQ)	1 : 0,93
Rendimento meiótico (Espermatócitos I PQ: Espermátides Arredondadas)	1 : 3,10
Rendimento geral de espermatogênese (Espermatogônia A: Espermátides Arredondadas)	1 : 18,90

A célula de Sertoli desempenha um papel fundamental na morfofisiologia da espermatogênese e suas funções incluem desde a sustentação física das células germinativas, até a produção de inúmeros fatores parácrinos/autócrinos que modulam a produção espermática. Desta forma, o número de células de Sertoli por testículo é o principal fator na determinação da produção espermática e no tamanho do testículo (FRANÇA et al., 1995). Cada célula de Sertoli tem uma capacidade de suporte de células germinativas relativamente fixa em cada espécie e como a sua população não aumenta após a puberdade e ao longo dos diferentes estádios do ciclo do epitélio seminífero, serve como referência para se quantificar e avaliar funcionalmente o processo espermatogênico (STEINBERGER & STEINBERGER, 1971; ORTH, 1982; ORTH et al., 1988; FRANÇA & RUSSELL, 1998).

Nas diferentes espécies estudadas a capacidade de suporte das células de Sertoli é variada sendo esta capacidade, uma relação espécie-específica (RUSSELL & PETERSON, 1984; FRANÇA & RUSSELL, 1998; FRANÇA et al., 1999). O gato mourisco apresenta uma capacidade de suporte de células de Sertoli para células germinativas de 24,3 células (Tab. 7), valor mais próximo ao do gato do mato pequeno, 21,57 células espermatogênica (BALARINI, 2008) e superior ao das outras espécies de felinos, 9,2 células descritas por Azevedo e equipe (2006) em onça pintada, 12,5 em suçuarana (GUIÃO LEITE & PAULA, 2003), 14,9 em leão africano (BARROS et al., 2007) e 14,38 para jaguatirica (SARTI, 2006).

Tabela 7: Capacidade de suporte das células de Sertoli

Capacidade de suporte das células de Sertoli	
Sertoli: Espermatogônia A	1 : 0,75

Sertoli:Espermatócito I PL/L	1 : 4,94
Sertoli:Espermatócito I PQ	1 : 4,60
Sertoli:Espermátide Arredondada	1 : 14,24

A reserva espermática testicular quantifica o número potencial de espermatozoides em produção no testículo no período de um ciclo do epitélio seminífero (AMANN & LAMBIASE, 1969; BERNDTSON, 1977). É um parâmetro bastante útil em experimentação intraespecífica envolvendo a produção espermática, visto que o tempo requerido para produção dos espermatozoides é uma constante biológica para membros da mesma espécie (BERNDTSON, 1977). Assim, naquelas experimentações interespecíficas, comparações na produção espermática devem considerar a duração do ciclo do epitélio seminífero, uma vez que indivíduos de espécies distintas, mesmo apresentando reserva espermática semelhante, apresentam diferentes velocidades no ciclo espermatogênico apresentando produções diárias distintas.

Assumindo-se que a perda na espermiogênese não é significativa, a reserva espermática do testículo (RET) é calculada com base na população de espermátides arredondadas contabilizadas por secção transversal de túbulos seminíferos no estágio 1. Como uma secção transversal compreende uma fração do túbulo seminífero limitada à espessura do corte histológico, a população calculada para o comprimento total do túbulo seminífero corresponde à reserva espermática testicular. Assim:

$$\text{RET} = \frac{\text{População de espermátides arredondada por secção transversal} \times \text{comprimento total de túbulos}}{\text{Espessura do corte histológico}}$$

No gato mourisco a reserva espermática de ambos os testículos foi calculada em 952,14 milhões de espermatozoides, o que corresponde a cerca de 432,79 espermatozoide por grama de testículo. Valor superior ao observado para a jaguatirica (356 milhões, CASTRO, 2012), suçuarana (268 milhões, GUIÃO LEITE & PAULA, 2003) e leão africano (103 milhões, BARROS, 2005).

As avaliações do processo espermatogênico são 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 específica de desenvolvimento, caracterizada por um acurado desenvolvimento sincrônico, uma vez que todas as células desta determinada geração apresentam-se interligadas por pontes citoplasmáticas (DE ROOIJ, 1998; PEIXOTO, 2010). Assim, é possível a identificação de aproximadamente quatro gerações distintas de células espermáticas ao longo da espessura do epitélio seminífero, sendo que as camadas próximas ao lume apresentam grau de desenvolvimento mais avançado do que as camadas basais. A medida que a geração mais avançada é liberada no lume como espermatozoide, uma nova geração é formada na base. Este mecanismo é denominado ciclo do epitélio seminífero, e há um sincronismo extremado do desenvolvimento celular entre as diferentes gerações. Devido a isto um arranjo repetitivo de inter relação é observado entre as camadas durante o ciclo do epitélio seminífero e são denominados estádios do ciclo do epitélio seminífero. Através do método da morfologia tubular, Berndtson (1977) descreve um arranjo constante de oito estádios para todos os mamíferos já estudados.

O ciclo do epitélio seminífero do gato mourisco foi descrito com base no método da morfologia tubular conforme abaixo:

Estádio I: foi caracterizado pela ausência de espermátides alongadas e pela presença de uma geração de espermátides com núcleos arredondados e escuros, os quais em geral formavam três a quatro camadas próximo ao lume do epitélio seminífero (Fig.3, Estádio I). O núcleo da célula de Sertoli apresenta um grande desenvolvimento do nucléolo e cromatina frouxa e as espermatogônias do tipo A e os espermatócitos primários se encontravam em transição de préleptóteno para leptóteno próximo a membrana basal. Os espermatócitos em paquíteno estavam entre as espermátides arredondadas e espermatócitos em pré-leptóteno/leptóteno.

Estádio II: caracterizado pela presença de espermátides com o núcleo em alongamento, direcionadas no sentido dos núcleos das células de Sertoli. Próximo à lâmina basal foram encontrados espermatócitos primários em leptóteno, em paquíteno e em transição para espermatócitos em diplótenos. Espermatogônia do tipo A, núcleos e nucléolos das células de Sertoli apresentaram morfologia semelhante ao estádio I (Fig. 3, Estádio II). As espermátides presentes no estádio II apresentavam-se em formato mais alongado.

Estádio III: foram observados feixes formados por espermátides, cujos núcleos apresentam um maior alongamento. Duas gerações de espermátócitos primários em zigóteno e em diplóteno, com seus núcleos caracteristicamente grandes, também foram visualizados (Fig. 3, Estádio III). As células de Sertoli apresentam um nucléolo proeminente e as espermatogônias do tipo A foram observadas próximas à lâmina basal.

Estádio IV: o aspecto mais característico é a ocorrência de duas divisões meióticas, observadas pela ocorrência de placas metafásicas em espermátócitos primários. Assim, os espermátócitos em diplóteno formam espermátócitos secundários que se dividem produzindo espermátides arredondadas. Os espermátócitos primários apresentavam-se em transição de zigóteno para paquíteno e feixes de espermátides alongadas com grande condensação cromossômica foram observados (Fig. 3, Estádio IV).

Estádio V: duas gerações de espermátides foram observadas neste estágio devido a presença das recém formadas espermátides arredondadas. Os espermátócitos primários em paquíteno foram observados na região intermediária do epitélio (Fig.1, Estádio V).

Estádio VI: todos os tipos celulares observados no estágio anterior estavam presentes nesse estágio. O aspecto característico desse estágio era que os feixes de espermátides alongadas estavam mais próximos do lume tubular. Os espermátócitos em paquíteno foram encontrados na região média do epitélio, e na região basal foram observadas espermatogônias (Fig. 3, Estádio VI).

Estádio VII: os feixes formados pelas espermátides alongadas apresentavam-se dissociados e localizados próximos ao lume tubular. Os núcleos dos espermátócitos primários em paquíteno ocupavam a região intermediária do epitélio (Fig. 3, Estádio VII).

Estádio VIII: o aspecto mais característico deste estágio foi a localização das espermátides alongadas bem próximas do lume tubular com flagelos bem evidentes e prontas para a espermição. Corpos residuais eram evidenciados próximos à borda luminal do epitélio. Espermátócitos em paquíteno e espermátides arredondadas ocupavam a região intermediária do epitélio e células de Sertoli, espermatogônias do tipo B e alguns espermátócitos primários em pré-leptóteno foram observados próximos à lâmina basal (Fig. 3, Estádio VIII).

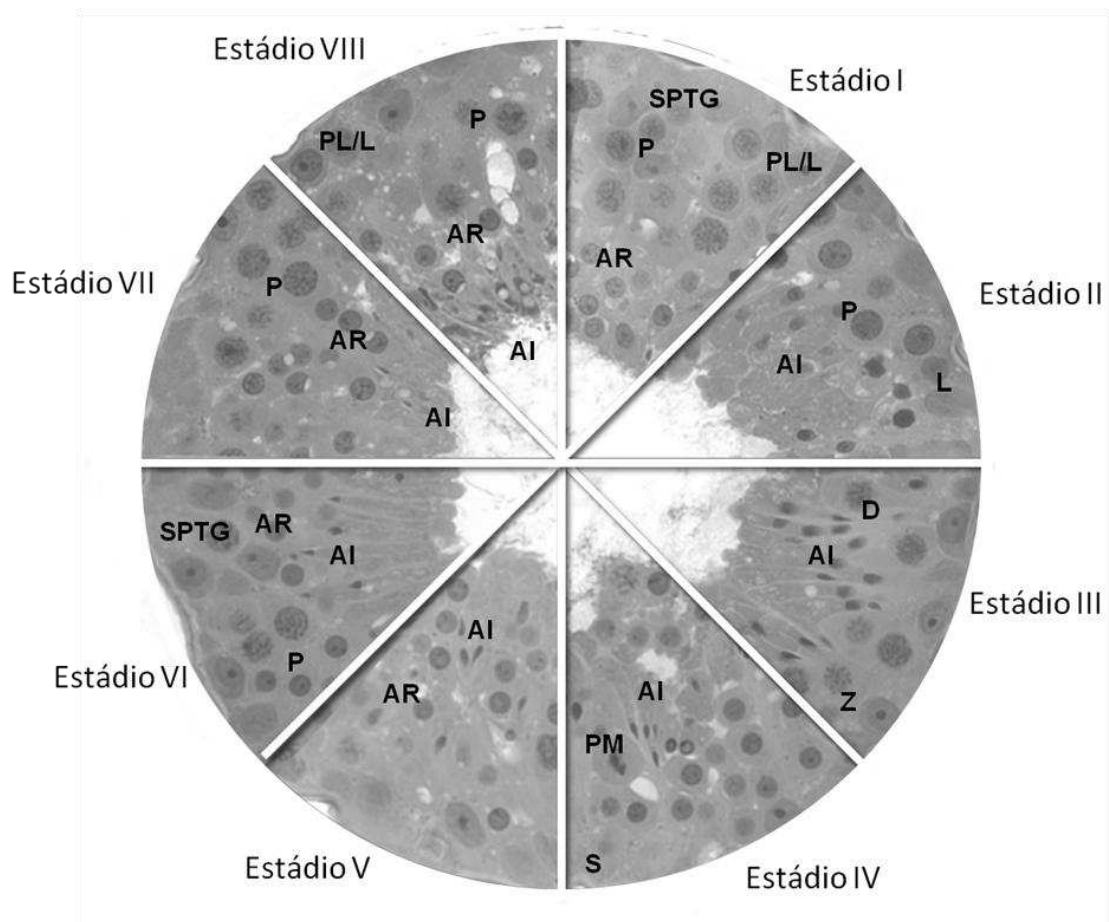


Figura 3: Montagem fotográfica contendo os oito estádios do ciclo do epitélio seminífero de gato mourisco (*Puma yagouaroundi*). Espermatogônia (SPTG); célula de Sertoli (S); espermatócito em transição pré-leptóteno/leptóteno (PL/L); leptóteno (L); zigóteno (Z); paquíteno (P); diplóteno (D); placa metafásica (PM); espermátide arredondada (Ar); espermátide em alongamento/alongada (AI). Azul de toluidina. 400 X.

A frequência relativa da ocorrência de cada estágio do ciclo do epitélio seminífero corresponde ao percentual de sua duração ao longo do desenvolvimento espermatogênico. Assim, o cálculo da frequência dos estádios é um procedimento fundamental para estimativa da duração do ciclo do epitélio seminífero, uma vez que a incorporação e o progresso do marcador celular utilizado podem ser rastreado e mensurado a partir do tempo de permanência 1no animal. Na tabela 8 estão descritos a frequência relativa dos oito estádios observados no 2gato mourisco.

Tabela 8: Frequência relativa e duração de cada estágio e das fases do ciclo do epitélio seminífero de gato-mourisco

Estádios	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Frequência (%)	18	13,33	17,33	12,34	11	10	7,33	10,67
Duração (dias)	1,51	1,12	1,46	1,04	0,92	0,84	0,62	0,89
Fases	Pré-meiótica		Meiótica		Pós-meiótica			
Frequência (%)	48,66		12,34		39,00			

Uma vez que as divisões meióticas concentram-se em uma fase intermediária do ciclo, especificamente no estágio 4, é possível a associação dos demais estágios em fases pré meiótica e pós meiótica. O gato mourisco apresenta uma concentração maior do ciclo nos estágios pré meióticos (Tab. 8), assim como ocorre na jaguatirica (CASTRO, 2012), porém nos felinos de grande porte (onça pintada e suçuarana) o ciclo do epitélio seminífero apresenta maior proporção nos estágio pós meióticos (LEITE et al, 2006; COSTA et al, 2008)

A duração do ciclo do epitélio seminífero é uma constante biológica espécie específica, que é controlada pelo genótipo da célula germinativa e não é afetado por qualquer outro fator conhecido (CLERMONT, 1972; AMANN & SCHANBACHER, 1983).

A duração do ciclo do epitélio seminífero é calculada através da observação da célula mais avançada no epitélio que apresentou marcação, de acordo com o método da morfologia tubular. Desta forma, foi calculada a frequência total dos estágios percorridos desde a incorporação do BrdU nos espermatócitos jovens, no estágio 1 no momento da aplicação, até a marcação da célula mais avançada, na coleta do material. A frequência dos estágios percorridos corresponde ao intervalo de tempo decorrido, sendo calculado o período relativo de um ciclo do epitélio seminífero e posteriormente do processo espermatogênico total. Assim, após 14 dias da aplicação intratesticular de BrdU no gato mourisco, foi realizada a coleta de fragmento através de biópsia testicular. Após processamento imunohistoquímico, foi observada marcação mais avançada em espermátides arredondadas no estágio 5, (Fig. 4) correspondendo a uma progressão entre 161 até 172% do CES, uma vez que não é possível precisar especificamente a progressão no estágio 5. Assim o valor intermediário de 166,5% foi considerado, correspondendo a duração do ciclo do epitélio seminífero de gato mourisco de aproximadamente 8,4 dias. Uma vez que cerca de 4,5 ciclos são necessários para que uma espermatogônia seja liberada no lume tubular como espermatozoide (BALARINI et al.,

2011), a duração do processo espermatogênico do gato mourisco foi calculado como 37,8 dias.

A duração do ciclo do epitélio seminífero de gato mourisco é próximo aos valores observados para o gato do mato pequeno (9,28 dias, BALARINI et al., 2011), e menor do que aqueles registrados para a suçuarana (9,8 dias, GUIÃO LEITE et al, 2006), onça pintada (12,8 dias, COSTA et al., 2008) e jaguatirica (11,3, CASTRO, 2012).

A eficiência espermatogênica em mamíferos é dependente principalmente da duração da espermatogênese, da densidade volumétrica (%) de túbulos seminíferos no testículo, do número de gerações de espermatogônias e da eficiência do processo espermatogênico (FRANÇA & RUSSELL, 1998). A produção espermática diária por grama de testículo é um dos parâmetros mais eficientes, que pode ser facilmente comparado entre as espécies porque elimina a disparidade no que envolve o peso testicular e a duração da espermatogênese (FRANÇA & RUSSELL, 1998). Estes parâmetros fornecem importantes dados biológicos que poderão auxiliar programas de reprodução assistida em espécies ameaçadas de extinção (AMANN, 1970; AMANN & SCHAMBACHER, 1983; FRANÇA, 1991).

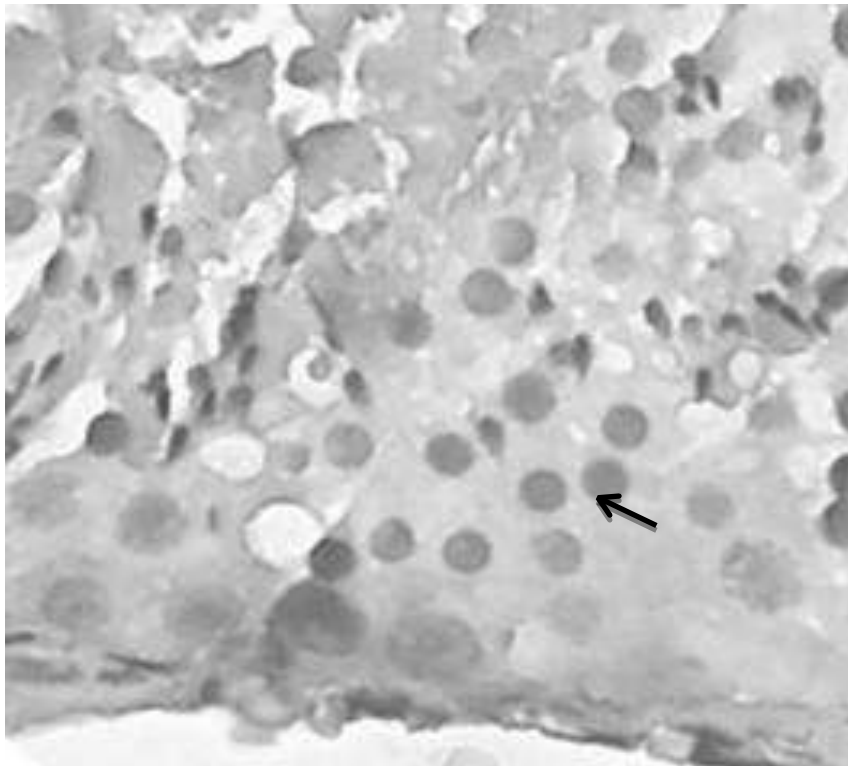


Figura 4: Marcação imunohistoquímica (seta) observada em espermatídeos arredondadas no estágio V do Ciclo do epitélio seminífero do gato mourisco, 400x

A produção espermática diária (PED) por grama de testículo é calculada através da divisão da reserva espermática testicular pela duração de um ciclo do epitélio seminífero. No gato mourisco, com uma reserva espermática estimada em 432,79 milhões de espermatozoide por grama de testículo, a produção espermática diária foi estimada em aproximadamente 51,52 milhões de espermatozoide produzidos em cada grama de testículo. Este valor está acima do registrado para a Jaguatirica com 31,5 milhões (CASTRO, 2012) e para a onça pintada com uma produção de apenas 16,9 milhões de espermatozoides ao dia por grama de testículo.

6. CONCLUSÃO

No presente estudo com o gato mourisco identificamos que os animais utilizados para a pesquisa apresentaram um peso médio de 6,5 Kg, peso esse um pouco acima do descrito na literatura, provavelmente por serem animais de cativeiro e possuírem uma atividade diária menor que em vida livre. O diâmetro torácico foi de 36cm caracterizando uma correlação forte entre esses parâmetros (0,93) o que possibilita a utilização da mensuração do diâmetro torácico para a estrapolação do peso do animal.

O testículo do gato mourisco apresentou um peso médio de 2,22g em ambos os testículos o que representou um IGS de 0,032% valor esse próximo ao encontrado em grandes felinos. Outros parâmetros comumente utilizados para comparação entre espécies de portes diferentes (ITS, ILS, comprimento de túbulo por grama de testículo, células de Leydig por grama de testículo), ou que têm suas medidas descritas em literaturas (volume e proporção de núcleo de célula de Leydig, proporção de túbulo seminífero no parênquima) tiveram seus valores próximos a um dos felinos silvestres já estudados ou dentro das médias descritas na literatura.

O que se destaca no gato mourisco são seus valores para a produção de espermatozoide, pois ele apresentou uma duração do ciclo do epitélio seminífero menor que a de outros felídeos silvestres, levando menos tempo para a produção de um espermatozoide. Também possui uma reserva espermática maior, o que leva a uma produção espermática diária também superior a dos felinos silvestres já estudados.

7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABERCROMBIE, M. 1946. Estimation of nuclear populations from microtome sections. **The Anatomical Record**, v.94, n.3 p.238-248.

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 of evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. **Journal of Andrology**, v.2, p.37-58.

AMANN, R. P., ALMQUIST, J.O. 1961. Reproductive capacity of dairy bulls I. Technique for direct measurement of gonadal and extra-gonadal and extra-gonadal sperm reserves. **Journal of Dairy Science**, n.44, p.1537-1543.

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**.v.45, n.6,p.774-781.

AMANN, R. P., LAMBIASE, J. T. 1969. The male rabbit III. Determination of daily sperm production by means of testicular homogenates. **Journal of Animal Science**.v.28. p.369-374

AMANN, R.P.; SCHANBACHER, B.D. 1983. Physiology of male reproduction. **Journal of Animal Science**,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.

ATTAL, J., COUROT, M. 1963. Développement testiculaire et établissement de la spermatogénèse chez le taureau. **Annales De Biologie Animale, Biochimie, Biophysique**.v.3, n.3, p.219- 241.

AZEVEDO, M. H. F. 2004. **Análise morfofuncional do testículo da onça pintada (Panthera onca) adulta**. 63p. Dissertação - Departamento de Veterinária, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da UFV. Mestrado em Morfologia.

AZEVEDO, M. H. F., PAULA, T. A. R., MATTA, S. L. P., FONSECA, C. C., NEVES, M. T. D. 2006. Morfometria testicular e o túbulo seminífero da onça pintada (Panthera onca). **Revista CERES**, v.53, n.307, p.374-381.

AZEVEDO, M. H. F., PAULA T. A. R., BALARINI, M. K., MATTA, S. L. P., PEIXOTO, J. V., GUIÃO-LEITE, F. L., ROSSI JÚNIOR, J. L., COSTA, E. P., 2008. Organization and quantification of the elements in the intertubular space in the adult jaguar testis (*Panthera onca*, LINNAEUS, 1758). **Micron**, v.39, n.8, p.1166-1170.

BALARINI, M. C. 2008. **Avaliação morfofuncional do testículo e do processo espermatogênico do gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus* Schreber, 1775) adulto**. 71p. Dissertação - Departamento de Veterinária, Centro de Ciências Biológicas da UFV. Mestrado em Morfologia.

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**, v.77, n.5, p.873-880.

BARROS, J. B. G. 2005. **Análise Morfofuncional do testículo e espermatogênese de leões africanos (*Panthera leo*, Linnaeus, 1758) adultos**. 64p. Dissertação - Departamento de Veterinária, Centro de Ciências Biológicas da UFV. Mestrado em Morfologia.

BARROS, J. B. G., PAULA, T. A. R., AZEVEDO, M.H.F., GUIÃO LEITE, F. L., ROSSI Jr, J., MATTA, S.L.P., OLIVEIRA, P.C. 2004. Population of the seminiferous epithelium, intrinsic yield of spermatogenesis and Sertoli cells index in adult lions (*Panthera leo*) raised in captivity. In: International Symposium on Canine and Feline Reproduction, 5. Rio de Janeiro, **Anais**.p.166-168.

BARROS, J. B. G, PAULA, T. A. R, MATTA, S. L. P, FONSECA, C. C., GUIÃO LEITE, F. L., ROSSI JÚNIOR, J. L., OLIVEIRA, P. C., COSTA, E. P., 2007. Intrinsic yield of spermatogenesis process, the Sertoli cell index and spermatid reserves in adult captive African lions (*Panthera leo*, Linnaeus, 1758). **Animal Reproduction Science**, v.102, n.3-4, p.350-356.

BENSUSAN, N. 2008. Seria melhor mandar ladrilhar? **Biodiversidade - como, para que e por quê**. 2ª edição - São Paulo: Peirópolis; Brasília, DF: Editora Universidade Brasileira, 428p.

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 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**. 65p.

Dissertação - Departamento de Veterinária, Centro de Ciências Biológicas da UFV. Mestrado em Morfologia.

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 spermatoc production in the adult maned wolf (*Chrysocyonbrachyurus*, Illiger, 1811). **Micron**.v.38, n.6, p.584-589.

BUSTOS-OBREGON, E. 1970. On Sertoli cell number and distribution in rat testis. **Archive of Biology**, v.81, p.99-180.

CALDEIRA, B. C., PAULA, T. A. R., MATTA, S. L. P., BALARINI, M. K., CAMPOS, P. K. A. 2008. Morfometria testicular e de túbulo seminífero do Cachorro-do-mato (*Cercopithecus*, LINNAEUS, 1766) adulto. **Revista Ceres**, v.57, n.5, p.569-575.

CARDOSO, F.M.; GODINHO, H.P. 1982. Cycle of the seminiferous epithelium and its duration in the zebu, *Bosindicus*. **Animal Reproduction Science**, v.5, n.4, p.231-245.

CARDOSO, F. M., GODINHO, H. P. 1985. Daily sperm production of zebus (*Bosindicus*) estimated by quantitative histology of the testis. **Theriogenology**. v.23, n.6, p.841-847.

CARRETTA JUNIOR, M. 2008. **Avaliação morfofuncional do processo espermatogênico de pacas (*Cuniculus paca*, Linnaeus, 1766) adultas**. Dissertação - Departamento de Veterinária, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 61p.

CASTRO, M. M. 2012. Descrição e duração do ciclo do epitélio seminífero de jaguatirica (*Leopardus pardalis*). In: **Duração do ciclo do epitélio seminífero e produção espermática de *Leopardus pardalis* (Linnaeus, 1758)**, Dissertação - Departamento de Veterinária, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

CASTRO, A. C. S., BERNDTSON, W. E., CARDOSO, F. M. 1997. Cinética e quantificação da espermatogênese: bases morfológicas e suas aplicações em estudo de reprodução de mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.21, n. 1, p. 25 – 34.

CHEIDA, C. C.; NAKANO-OLIVEIRA, E.; FUSCO-COSTA, R.; ROCHA-MENDES, F.; QUADROS, J., 2006. Ordem carnívora in: Reis et al, **Mamíferos do Brasil**. Londrina. Cap.8 p.231-276.

CITES (**Conservation on International Trade in Endangered Species**).Disponível em: <http://www.cites.org/eng/resources/species.html>. Acesso em 20 de março de 2008.

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

CLERMONT, Y., MORGENTALER, H. 1955. Quantitative study of spermatogenesis in the hypophysectomized rat. **Endocrinology**, v.57, p.369-382.

CORSON W. H. 1996. **Manual Global de Ecologia**. Ed. Augustus. 2ª ed., São Paulo.

COSTA, D. S., PAULA, T. A. R., MATTA, S. L. P. 2006. The intertubular compartment morphometry in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) testis. **Animal Reproduction Science**, 91, p. 173 – 179.

COSTA, G.M.J.; CHIARINI-GARCIA, H.; MORATO, R.G.; ALVARENGA, R.L.L.S.; FRANÇA, L.R. 2008. Duration of spermatogenesis and daily sperm production in the jaguar. **Theriogenology**, 70:1136-1146.

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.

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

DE ROOIJ, D. G.; JANSSEN, J. M. 1987. Regulation of the density spermatogonia in the seminiferous epithelium of the chinese hamster: I. Undifferentiated spermatogonia. **The Anatomical Record**, v.217, n.2, p.124-130.

DE ROOIJ, D. G.; LOK, D. 1987. Regulation of the density of spermatogonia in the seminiferous epithelium of the chinese hamster: II. Differentiating spermatogonia. **The Anatomical Record**, v.217, n.2, p.131-136.

DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. 2004, **Tratado de Anatomia Veterinária**, Rio de Janeiro: Elsevier. 663p.

EISENBERG, J. F., REDFORD, K. H. 1999. Mammals of the neotropics: the central neotropics (Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil). **Chicago and London: The University of Chicago Press**.p.609.

ELLWART, E.; DORMER, P. 1985. Effect of 5-Fluoro-2'-Deoxyuridine (FdUrd) on 5Bromo-2'-Deoxyuridine (BrdUrd) incorporation into DNA measured with monoclonal BrdUrd antibody and by the BrdUrd/H. **Cytometry**, V.6, N.6, P.513-520.

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,

FAGERHOLM, P.; HAMBERG-NYSTRÖM, H.; TENGROTH, B. 1994. Wound healing and myopic regression following photorefractive keratectomy. **Acta Ophthalmologica**, v.72, n.2, p.229-234.

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, 180p. Tese (Doutorado em Morfologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

FRANÇA, L.R., JACKSON, A., RUSSELL, 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., Y. E, S-J., YING, L., SANDBERG, M., RUSSELL, L.D. 1995. Morphometry of rat germ cells during spermatogenesis. **Anatomy Record**, v.241, p.181-204.

FRANÇA, L. R., BECKER-SILVA, S. C., CHIARINI-GARCIA, H. 1999. Spermatogenic cycle length in goats. **Tissue & Cell**, v.31, n.3, p.274-280.

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, 5: 573-582.

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, 197-219.

FRANÇA, L. R., GODINHO, C. L. 2003. Testis Morphometry, Seminiferous Epithelium Cycle Length, and Daily Sperm Production in Domestic Cats (*Feliscatus*). **Biology of Reproduction** v. 68, p.1554-1561.

GODINHO, C. L. 1999. **Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*) sexualmente maduros**. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais. 123p

GODINHO, H. P., CARDOSO, F. M. 1979. Desenvolvimento sexual de porcos Yorkshire. II. Estabelecimento e evolução da espermatogênese. **Arquivoda Escolade Veteterinaria - UFMG**. 31 v.3: 351-361.

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, Wozencraft, 1993) adulta**. Viçosa, MG: UFV, Tese (Mestrado em morfologia) Universidade Federal de Viçosa.

GUIÃO-LEITE, F. L.; PAULA T. A. R. 2003. Intrisec yield of spermatogenesis, Sertoli cell index and daily sperm production in cougar (Puma concolor). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, p.1-21.

GUIÃO-LEITE, F. L.; PAULA, T. A. R.; MATTA, S. L. P.; FONSECA, C. S.; DAS NEVES, M. T.; BARROS, J. B. G. 2006. Cycle and duration of the seminiferous epithelium in puma (Puma concolor). **Animal Reproduction Science**, v.91, n.3, p.307-316.

HOOKER, C. W. 1970. The intertubular tissue of the testis. In: **The testis Development: anatomy and physiology**. Nova Iorque: Academic Press, v.1, cap.8, p.483-550.

HUCKINS, C. 1978. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. **The Anatomical Record**, v.190, n.4, p.905-26.

HUNT, W. L., FOOTE, R.H. 1997. Effect of repeated testicular biopsy on testis function and semen quality in dogs. **Journal of Andrology**, v.8.n.6, p.740-744.

IUCN - International Union for Conservation of Nature and Natural Resources. Strategic planning for species conservation: an overview - version 1.0. (Species Survival Commission Gland). Switzerland: IUCN, 2008. 22 p.

JOHNSON, L. 1991. Spermatogenesis. In: **Reproduction in domestic animals**. 4 ed. New York: Academic Press. p.173-219.

JOHNSON, L., PETTY, C.S., NEVES, 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.471-180.

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**, v.67, p.1-22.

KUMI-DIAKA, J., OSORI, D.I.K., NJOKU, C.O., OGWLI, D. 1983.Quantitative estimation of spermatogenesis in bulls (*Bosindicus*) in a tropical environment of Nigeria.**Veterinaryresearch 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.

LEITE F. L. G., PAULA, T. A. R, MATTA, S. L. P., NEVES, M. T. D., BARROS, J. B. G. 2006. Cycle and duration of the seminiferous epithelium in puma (*Puma concolor*). **Animal Reproduction Science**v.91, n.3-4, p.307–316

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

MARQUES, A. A. B. 2002. **Lista de Referência da Fauna Ameaçada de Extinção no Rio Grande do Sul**. Decreto no 41.672, de 11 junho de 2002. Porto Alegre: FZB/MCT–PUCRS/PANGEA, 52p. (Publicações Avulsas FZB, 11).

MASCARENHAS R. M., PAULA T. A. R., CARRETA J. R. 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, n.305, p.100-105.

MCCARTHY, T. J. 1992. Notes concerning the jaguarundi cat (*Herpailurusyagouaroundsi*) in Caribbean lowlands of Belize and Guatemala.**Mammalia**, v.56, n.3, p.302306.

MELLO, E.S.; ALVES, V.A.F. 1999. Marcadores de proliferação celular. In: ALVES, V.A.F.; BACCHI, C.E.; VASSALO, J. **Manual de imunohistoquímica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 182-194.

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.

MOREIRA, N. 2001 **Reprodução e estresse em fêmeas de felídeos do gênero Leopardus**. 73p Tese. Universidade Federal do Paraná. Curitiba: CPGZOO/UFPR.

MOREIRA, N.; MONTEIRO-FILHO, E.L.A.; MORAES, W.; SWANSON, W.F.; GRAHAM, L.H.; PASQUALI, O.L.; GOMES, M.L.F.; MORAIS, R.N.; WILDT, D.E.; BROWN, J.L. 2001. Reproductive steroid hormones and ovarian activity in felids of the *Leopardus* genus. **Zoo Biology**, v.20, n.2, p. 103-106.

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 (*Lagostomusmaximulmaximus*). **The Anatomical Record**.v.252, n.1, p.8-16.

NOWELL, K.; JACKSON, P. 1996. Wild cats: Status Survey and Conservation Action Plan. Gland, Switzerland, **IUCN / SSC Cat Specialist Group**, 382p,

NSEYO, U.O., ENGLANDER, L.S., HUBEN, R.P., PONTES, J.E. 1984 Aspiration biopsy of testis: another method for histologic examination. **Fertility and Sterility**.v.42, n.2, p.281-284

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.

OLIVEIRA, T.G. 1994. Neotropical cats: ecology and conservation, **EDUFMA**. 221p. São Luís.

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.

ORTH, J.M. 1982. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. **The Anatomical Record**.v.203, n.4, p.485-492.

ORTH, J. M., GUNSALUS, G. L., LAMPERTI, A. A. 1988.Evidentce from Setolicelldepleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal desenvolvimento. **Endocrinol**. 122: 787-794.

PARANÁ. Lista vermelha de animais ameaçados de extinção no Estado do Paraná. **SECRETARIA DE ESTADO DO MEIO AMBIENE** Curitiba: SEMA/ GTZ.177p. 1995.

PARAPANOV, R., NUSSLE, S., VOGEL, P. 2007. Cycle length of spermatogenesis in shrews (Mammalia: Soricidae) with high and low metabolic rates and different mating systems. **Biology of Reproduction**.v.76, n.5, p.833-840.

PAULA, T. A. R. 1999. **Avaliação Histológica e Funcional do Testículo de Capivaras Adultas (Hydrochoerus hydrochaeris)**. Tese de Doutorado. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 84p.

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.

PITMAN, M. R. P. L., OLIVEIRA, T. G., PAULA, R. C., INDRUSIAK, C. 2002 **Manual de identificação, prevenção e controle de predação por carnívoros**. Brasília: Edições IBAMA, 11p.

RONDON, A. S.; RIBAS, J. A. S.; CAMARGO, L. M.; GERMINARO, A.; PERSONA, L. N.; SIMÕES, M. J.; FRANCO, P.C. 2000. Aspectos histológicos do testículo do lobinho do mato (Cerdocyonthous). **Arquivos do Instituto Biológico**, v.67, p.55-58.

ROOSEN-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.

ROOSEN-RUNGE, E. C. 1973. Germinal-cell loss in normal metazoan spermatogenesis. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.35, p.339-348. Roosen- Runge, EC, 1973. Germinal-cell loss in normal metazoan spermatogenesis. **J. Reprod. Fertil.**v.35, p.339-348.

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**, v.288, p.365-369.

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. 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.

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.

RUSSELL, L. D., GRISWOLD, M. D. 1993. **The Sertoli cell**. Cache River Press, Clearwater, Florida, 801 p.

RUSSELL, L. D., PETERSON, R. N. 1984. Determination of the elongate spermatid/Sertoli cell ratio in various mammals. **The Journal of the Reproduction and Fertility** v.70, p.635-641.

RUSSELL, L. D., REN, H. P., SINHA-HIKIN, I., SCHULZE, W., SINHA-HIKIN, A. P. 1990a. 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.

RUSSELL, L.D., ETTLIN, R.A., SINHA HIKIM, E.P., CLEGG, E.D. 1990b. **Histological and histopathological evaluation of the testis**. Clearwater, FL, Cache River Press, 286p.

RUSSELL, 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., 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.

SANTOS, R. L. 1999. Morte celular por apoptose no testículo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.23, n.4, p.486-499.

SARTI, P. 2006. **Avaliação Morfométrica do Testículo e da Espermatogênese de Jaguatiricas (Leopardus pardalis, Linnaeus, 1758) Adultas**. 66p. Dissertação. Departamento de Veterinária, Centro de Ciências Biológicas da UFV, Mestrado em Morfologia.

SARTI, P., PAULA, T. A. R., MATTA, S. L. P., FONSECA, C. C., POLLI, G. O., BALARINI, M. K., MASCARENHAS, R. M. 2008 Parâmetros biométricos corporais e testiculares de jaguatiricas (Leopardus pardalis) adultas. **Revista Ceres**, v.56, n.2, p.161-165.

SARTI, P.; PAULA, T.A.R.; POLLI, G.O.; DECO SOUZA, T.; ARAUJO, G.R. 2011. Morfofisiologia do tecido intertubular e das células de Leydig de jaguatirica (Leopardus pardalis) adulta. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.63, n.5, p.1060-1065.

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, p.379-389.
- SHARPE, R.M. 1994 Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL, E. & NEIL, J.D. **The physiology of reproduction**, 2ed. Raven Press, New York, p.1363-1434.
- SHORT, R.V. 1997. The testis: the witness of the mating system, the site of mutation and the engine of desire. **Acta Paediatrica, New York (Supplement)**, 422:3-7.
- SILVEIRA, L.1999. **Ecologia e conservação dos mamíferos carnívoros do parque nacional das emas, Goiás**. Dissertação. Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Goiás, Mestrado em Biologia (Ecologia). 125p,
- 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 (*Marmotamomax*), during gonadal inactivity. **American Journal of Anatomy**, v.192, n.2, p.194-213.
- STEINBERGER, A., STEINBERGER, E. 1971. Replication pattern of Sertoli cells in maturing rat testis in vivo and in organ culture. **Biology of Reproduction**,v.4, n.1, p.84-87.
- SWERDLOFF, R. S., LUE, Y., WANG, C., RAJAVASHISTH, T., SINHA-HIKIN, A. 1998.Hormonal regulation of germ cell apoptosis. In: ZIRKIN, B. R. (ed). **Germ cell development, division, disruption and death**. New York. Inc. Springer-Verlag.
- SWIERSTRA, E.E. 1968. Cytology and duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the boar; duration of spermatozoan transit through the epididymys. **Anatomical Record**, v.161, p.171-186.
- TEWES, M.E., EVERETT, D. D. 1986. Status and distribution of endangered ocelot and jaguarundi In: S.D. Miller e D. D. Everett, **Cats of the World: Biology, conservation and Management**. National Wildlife Federation, Washington, D.C. p.147-158.
- VASCONCELOS, G.S.C. 2011. **Ciclo do epitélio seminífero de quati (Nasuanasua Linnaeus, 1766)**. 59p. Dissertação - Departamento de Veterinária, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.
- 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**, v.37, n.2, p.161-184.
- WING, T.Y., CHRISTENSEN, A. K. 1982. Morphometric studies on rat seminiferous tubules. **American Journal of Anatomy**, v.165, p. 13-25.
- XIMENEZ, A. 1972. Notas sobre felidos neotropicales, V: Nueva ampliacion de la distribución del gato eira en Patagonia. **Comunicaciones Zoológicas del Museo de Historia Natural de Montevideo**, v.135, p.134-136.

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