

FERNANDA DE FÁTIMA RODRIGUES DA SILVA

**ESTUDO DO PROCESSO ESPERMATOGÊNICO EM SAGUIS-DA-CARA-BRANCA (*Callithrix geoffroyi*) (HUMBOLDT, 1812) ADULTOS**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2019

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

T

S586e  
2019

Silva, Fernanda de Fátima Rodrigues da, 1988-  
Estudo do processo espermato gênico em  
saguis-da-cara-branca (*Callithrix geoffroyi*) (Humboldt, 1812)  
adultos / Fernanda de Fátima Rodrigues da Silva. – Viçosa, MG,  
2019.  
ix, 78 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

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

1. *Callithrix geoffroyi*. 2. Primatas. 3. Espermatogênese em  
animais. 4. Reprodução animal. I. Universidade Federal de  
Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de  
Pós-Graduação em Medicina Veterinária. II. Título.


CDD 22. ed. 636.985

FERNANDA DE FÁTIMA RODRIGUES DA SILVA

**ESTUDO DO PROCESSO ESPERMATOGÊNICO EM SAGUIS-DA-CARA-BRANCA (*Callithrix geoffroyi*) (HUMBOLDT, 1812) ADULTOS**

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

APROVADA: 22 de fevereiro de 2019.

  
Fabrício Luciani Valente

  
Fabiano Rodrigues de Melo

  
Marli do Carmo Cupertino

  
Moacir Carretta Júnior

  
Tarcízio Antônio Rego de Paula  
(Orientador)

**Dedico esta tese:**

Aos que se tornaram família,  
Aos que nasceram família  
E aos que conheci antes de ontem.

Dedico tanto aos que me deixam louca,  
Quanto aos que enlouqueço.

Aos que me criticam em tudo,  
E aos que aturam minha “chatura”

Aos amigos que correm,  
Aos amigos que contemplam.

Aos que me consideram muito,  
E aos que, com razão, fazem pouco.

Aos que conhecem o que penso,  
E aos que só conhecem o que faço.

Aos que passam o dia comigo,  
E aos que estão todo o tempo em mim.

Esta tese é, sem dúvida nenhuma, a soma de todos vocês.

E se ela não foi melhor,  
Foi por falta de memória ou por cansaço.  
Mas não por falta de amigo.

(Adaptado de Primack e Rodrigues, 2001).

## AGRADECIMENTOS

Todo o trabalho que levou a conclusão desta tese não foi realizado apenas por mim, tive muita ajuda e apoio durante todo processo... Sendo assim, tenho muito a agradecer:

Agradeço a Deus que me guiou até aqui;

À minha família: meus pais, Maria das Graças e João Gualberto, meu irmão Gustavo, minha cunhada Vanessa e à tia Conceição que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e ajudando no que fosse preciso;

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, pela contribuição na minha formação acadêmica;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro;

Aos professores Moacir Carretta Jr, Fabiano de Melo, Fabrício Valente e Marli Cupertino que aceitaram participar da minha banca contribuindo com essa importante etapa de minha formação acadêmica;

Ao professor Tarcízio, não apenas pela orientação durante o doutorado, mas por lá em 2007 ter me aceitado como estagiária no CETAS-UFV, que foi onde tudo começou... todo amor por fauna silvestre e por primatologia. Obrigada por sempre estar presente na vida acadêmica e profissional, sendo um exemplo a se admirar e a se seguir;

Ao professor Claudio Fonseca por toda ajuda e ensinamentos durante esses anos de doutorado;

Aos professores Sérgio da Matta, Claudio Fonseca, Abelardo e Cidinha por terem cedido a utilização de equipamentos que propiciaram o desenvolvimento deste trabalho;

Aos diversos funcionários da UFV que ajudaram em alguma fase do desenvolvimento deste trabalho;

À Rosi por ser a melhor secretária que a veterinária podia ter;

À toda equipe do SEST-SENAT, IEMA, Parque da Manteigueiras e Zoo Park da Montanha por todo apoio e auxílio durante as coletas;

Ao Moacir e à Ayisa, não apenas pela amizade, mas por terem aberto a sua casa para mim durante as viagens de campo. E terem fornecido todo apoio logístico durante os dias de coleta;

À Milene e ao Vini por serem minha equipe de campo e de laboratório, por estarem ao meu lado nos dias bons e nos dias ruins, por terem paciência comigo nos dias em que nem eu mesmo tinha. Enfim, agradeço a vocês por ter conseguido chegar ao fim do doutorado... sem vocês dois, isso não seria possível;

À toda equipe do REPAAS (Mayra, Leanes, Letícia, Lina, Moema, Marcelo, Milene e Vini) por todos momentos compartilhados, amizade, apoio e ajuda durante esses últimos anos;

A todos que passaram pelo CEPAS-UFV pela ajuda no cuidado com os animais, pelas conversas, pelo conhecimento aprendido e pela simples companhia;

À equipe do Projeto Aurita – UFV por todo aprendizado, macaquices e rocks;

Aos amigos de longe e de perto por todo apoio e torcida;

À Chiquinha por ser a responsável por despertar o amor pelos macacos e pela primatologia;

E a todos os saguis, lobos, jaguatiricas, gatos e cachorros que passaram pela minha vida nos últimos anos. Todos vocês ajudaram a amenizar as tensões e angustias do dia-a-dia.

Ficam aqui meus sinceros agradecimentos a todos vocês!

## SUMÁRIO

<b>Resumo.....</b>	<b>vi</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>viii</b>
<b>Revisão Bibliográfica .....</b>	<b>1</b>
Primatas.....	1
Testículo.....	5
Espermatogênese.....	8
Espermatogênese em mamíferos.....	9
Referências.....	12
<b>Artigo 1: Morfometria testicular e dos túbulos seminíferos de saguis-da-cara-branca (<i>Callithrix geoffroyi</i>) adultos.....</b>	<b>20</b>
Resumo.....	20
Introdução.....	20
Materiais e Métodos.....	22
Resultados e Discussão.....	24
Conclusão.....	30
Referências.....	30
<b>Artigo 2: Morfofisiologia do tecido intertubular e das células de Leydig de <i>Callithrix geoffroyi</i> adultos.....</b>	<b>35</b>
Resumo.....	35
Introdução.....	35
Materiais e Métodos.....	37
Resultados e Discussão.....	39
Conclusão.....	43
Referências.....	43
<b>Artigo 3: Rendimento intrínseco do processo espermatogênico e índices de células de sertoli em saguis-da-cara-branca, <i>Callithrix geoffroyi</i>.....</b>	<b>48</b>
Resumo.....	48
Introdução.....	48
Materiais e Métodos.....	50
Resultados e Discussão.....	52
Conclusão.....	59
Referências.....	59
<b>Artigo 4: Descrição dos estádios do ciclo do epitélio seminífero e caracterização do seu arranjo topográfico em saguis-da-cara-branca (<i>Callithrix geoffroyi</i>).....</b>	<b>64</b>
Resumo.....	64
Introdução.....	64
Materiais e Métodos.....	66
Resultados e Discussão.....	68
Conclusão.....	76
Referências.....	76

## RESUMO

SILVA, Fernanda de Fátima Rodrigues da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **Estudo do processo espermatogênico em saguis-da-cara-branca (*Callithrix geoffroyi*) (Humboldt, 1812) adultos.** Orientador: Tarcízio Antônio Rêgo de Paula.

Estudos sobre a espermatogênese e as funções testiculares de diferentes espécies têm um importante papel em trabalhos de reprodução com foco conservacionista, além disso algumas espécies podem ser usadas em pesquisas relacionados à saúde humana. O processo espermatogênico dos saguis do gênero *Callithrix*, por exemplo, tem sido descrito por alguns autores como sendo semelhante àquele observado no homem, e devido a isso esses animais podem ser usados como modelo experimental em pesquisas biomédicas envolvendo funções testiculares. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi descrever e caracterizar diversos parâmetros relacionados ao processo de espermatogênese para o *C. geoffroyi*. Para tal, utilizou-se fragmentos testiculares de cinco animais adultos para confecção e análise de lâminas histológicas. Os animais desse estudo apresentaram peso corporal médio de 396 g, peso testicular de 603 mg, índices gonadossomático de 0,15%, tubulossomático de 0,14% e intertubulossomático de 0,016%. Em comparação a outros primatas, apresentaram baixo investimento corporal em massa testicular, e mais especificamente em túbulos seminíferos. Do mesmo modo, observou-se baixo rendimento geral do processo espermatogênico (4,7%), que indicou que ao longo do processo 95,3% do seu potencial produtivo foi eliminado ou deixou de ser produzido. Esse reduzido investimento produtivo está de acordo com o sistema de acasalamento do tipo *single-male* (monogamia e poliginia), visto que nesta estratégia reprodutiva a competição pela prole ocorre no acesso à fêmea e não através de competição espermática no interior dos órgãos reprodutivos femininos. O intertúbulo testicular dos saguis estudados apresentaram organização tipo II de Fawcett et al. (1973), similar ao descrito para humanos e macacos rhesus. E de modo geral, os valores apresentados para os parâmetros morfométricos quantitativos de células de Leydig são próximos aos descritos para o *C. penicillata*, porém o índice leydigossomático encontrado para os saguis-da-cara-branca estudados neste trabalho (0,0017%) é mais baixo. Com relação ao arranjo topográfico dos estádios do ciclo do epitélio seminífero, em torno de 60% das secções transversais de túbulo seminífero analisadas apresentaram apenas um único estádio, e as demais secções tubulares (40%) apresentaram dois ou três estádios. Estes, entretanto, eram sempre estádios sequenciais de desenvolvimento. Sendo assim, a

espermatogênese dos animais de estudo parece se aproximar mais da espermatogênese tipo segmentar do que da espermatogênese helicoidal, desse modo os múltiplos estádios encontrados podem ser consequência de um atraso da comunicação entre as células de Sertoli em segmentos adjacentes, ou mesmo da presença de segmentos menores ao longo do túbulo seminífero.

## ABSTRACT

SILVA, Fernanda de Fátima Rodrigues da, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2019. **Spermatogenic process study in Geoffroy's marmoset (*Callithrix geoffroyi*) (Humboldt, 1812) adults.** Advisor: Tarcízio Antônio Rêgo de Paula.

Studies on spermatogenesis and testicular functions of different species play an important role in breeding work with a conservationist focus, and some species can be used in research related to human health. The spermatogenic process of *Callithrix* marmosets, for example, has been described by some authors as being similar to that observed in man, and because of this, these animals may be used as an experimental model in biomedical research involving testicular functions. Therefore, the objective of this work was to describe and characterize several parameters related to the spermatogenesis process for *C. geoffroyi*. For this purpose, testicular fragments of five adult animals were used for the preparation and analysis of histological slides. The animals in this study presented a body weight of 396 g, a testicular weight of 603 mg, a gonadosomatic index of 0.15%, a tubulosomatic index of 0.14% and an intertubulosomatic index of 0.016%. In comparison to other primates, studied Geoffroy's marmosets presented a low body investment in testicular mass, and more specifically in seminiferous tubules. Similarly, there was a low yield of the spermatogenic process (4.7%), indicating that throughout the process 95.3% of its productive potential was eliminated or failed being produced. This reduced productive investment is in line with the single-male mating system (monogamy and polygyny), since in this reproductive strategy competition for offspring occurs during female access and not through sperm competition within the female reproductive organs. The testicular intertubule of studied Geoffroy's marmosets presented a type II organization according to Fawcett et al. (1973), similar to that described for humans and rhesus monkeys. In general, the values presented for the quantitative morphometric parameters of Leydig cells are close to those described for *C. penicillata*, but the leydigosomatic index of *C. geoffroyi* studied (0.0017%) is lower. Regarding the topographic arrangement of the stages of the seminiferous epithelium cycle, about 60% of the seminiferous tubule cross sections analyzed presented only a single stage, and the remaining tubular sections (40%) had two or three stages. These, however, were always sequential stages of development. Such, the spermatogenesis of this species seems to be closer to segmental than to helical. Thus the multiple stages may be result from a delayed

communication between the Sertoli cells in adjacent segments or even from the presence of smaller segments along the seminiferous tubule.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### PRIMATAS

Taxonomicamente os mamíferos são agrupados na classe Mammalia, sendo que as linhagens viventes são ainda separadas em duas subclasses, a Prototheria que inclui os monotremados, como o ornitorrinco, e a Theria que abrange as demais espécies. Esta última inclui os marsupiais (infraclasse Metatheria), como os gambás e cuícas, e os eutérios (infraclasse Eutheria), como primatas, canídeos e roedores (Pough et al., 2006).

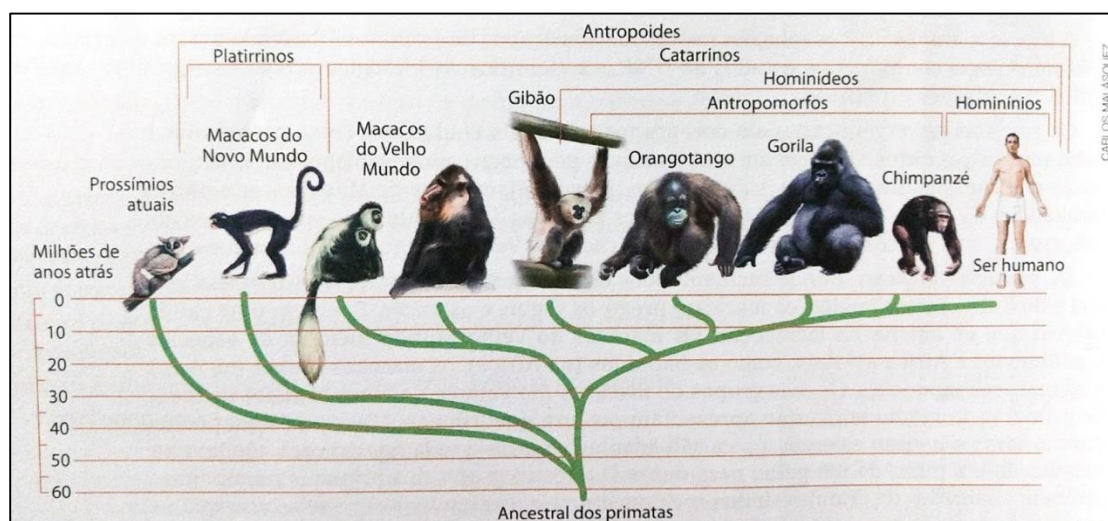
Dentre as diferentes ordens de mamíferos viventes, a ordem Primates se destaca pela composição variada em tamanhos, formas, comportamentos e hábitos ecológicos de seus integrantes (Bicca-Marques et al., 2011). Há animais de pequeno porte, como o sagui-pigmeu que pesa aproximadamente 100 g, e animais de grande porte, como o gorila com massa corporal acima de 150 kg (Fleagle, 1998). Há diferentes sistemas de acasalamento, como a monogamia (gênero *Callicebus*) (Spence-Aizenberg et al., 2016), a poligamia (gênero *Gorilla*) (Harcourt et al., 1981), e promiscuidade (gênero *Brachyteles*) (Strier, 1997).

Os primatas ainda podem ser diurnos (gêneros *Callithrix*) (Hershkovitz, 1977) ou noturnos (gênero *Aotus*) (Fernandez-Duque et al., 2008); arborícolas (gênero *Allouata*) (Estrada e Coates-Estrada, 1985) ou terrestres (gênero *Pan*) (Kleiman et al., 2003). E podem apresentar diferentes hábitos alimentares: frugívoros (gênero *Hylobates*) (Suwanvecho et al., 2018), onívoros (gênero *Saimiri*) (Lima e Ferrari, 2003), ou insetívoros (*Tarsius spectrum*) (Gursky, 2000).

A ordem Primates pode ser subdividida em duas subordens: a Strepsirrhini (ou Prosimii) composta pelos lêmures, lórisés e társios, e a Haplorhini (ou Anthropoidea) composta pelos micos, bugios, gorilas e seres humanos. A subordem Haplorhini é ainda subdividida em duas infraordens: a Platyrrhini formada pelos primatas do Novo Mundo, como os macacos-prego e saguis, e a Catarrhini formada pelos primatas do Velho Mundo, como chimpanzés e humanos (Figura 1) (Pough, 2006; Ravosa e Dagosto, 2007).

Os primatas neotropicais (infraordem Platyrrhini) compreendem as espécies que vivem exclusivamente nas florestas tropicais do México, Américas do Sul e Central. São animais de pequeno a médio porte (de 100 g a pouco mais de 10 kg), arborícolas, com locomoção predominantemente quadrúpede, e algumas espécies apresentam cauda preênsil (Reis et al., 2011). Eles são agrupados em cinco famílias (Callitrichidae, Cebidae,

Aotidae, Pitheciidae e Atelidae), em torno de 20 gêneros e 152 espécies (Rylands et al., 2012).



**Figura 1:** Árvore filogenética representando uma hipótese da relação evolutiva entre os principais grupos de primatas atuais (Fonte: Klein, 2009).

A família Callitrichidae é composta pelos menores primatas antropoideos do mundo, variando de 100 g (*Cebuella*) a 700 g (*Leontopithecus*). Todos integrantes dessa família são adaptados à vida saltatória arbórea, não possuem cauda preênsil, apresentam unhas com formato de garras em todos os dedos, com exceção apenas do hálux. São animais onívoros, se alimentam de uma grande variedade de itens como goma, frutos, sementes, artrópodes e filhotes de aves (Sussman e Kinzey, 1984; Auricchio, 1995). Alguns representantes dessa família são os gêneros *Cebuella*, *Saguinus*, *Leontopithecus* e *Callithrix* (Rylands e Mittermeier, 2009; Rylands et al., 2012).

Os saguis do gênero *Callithrix* (Erxleben, 1777) são animais de pequeno porte, sendo que o peso de um animal adulto pode variar entre 350 g a 450 g (Stevenson e Rylands, 1988). Esse gênero é formado por seis espécies nativas da região centro-leste do Brasil: *Callithrix jacchus* (Linnaeus, 1758), naturalmente encontrado em áreas de Caatinga, *Callithrix penicillata* (Geoffroy Saint-Hilaire, 1812), naturalmente encontrado em regiões do Cerrado, e *Callithrix kuhlii* (Coimbra-Filho, 1985), *Callithrix geoffroyi* (Humboldt, 1812), *Callithrix aurita* (Geoffroy Saint-Hilaire, 1812) e *Callithrix flaviceps* (Thomas, 1903) que são nativos de diferentes áreas de Mata Atlântica (Rylands et al., 2009).

O *Callithrix geoffroyi*, popularmente conhecido como sagui-de-cara-branca, ocupa originalmente áreas de Mata Atlântica do estado do Espírito Santo, estendendo-se

para o sul da Bahia e partes adjacentes de Minas Gerais (Rylands et al., 1993; Rylands e Mendes, 2018; Pereira, 2015) (Figura 2). Essa espécie apresenta tufos pré-auriculares negros; face, testa, metade anterior do vértice e garganta inteiramente brancos; dorso com padrão estriado de coloração; e cauda anelada (Vivo, 1991) (Figura 3). Sendo seu status de conservação considerado com *least concern* (“pouco preocupante”) pela *The IUCN Red List of Threatened Species* (Rylands e Mendes, 2018). A introdução de espécies, a hibridação e a destruição de habitat, de modo geral, são as principais ameaças a todas espécies desse gênero (Rylands e Mendes, 2018; Silva et al., 2018).



**Figura 2:** Distribuição geográfica natural de *Callithrix geoffroyi* abrangendo os estados de Minas Gerais, Espírito Santo e Bahia (Fonte: Pereira, 2015).



**Figura 3:** *Callithrix geoffroyi* naturalmente encontrado no município de Cariacica, Espírito Santo, Brasil (Foto: Milene Figueira).

Normalmente, as espécies do gênero *Callithrix* apresentam a gestação de gêmeos, sendo a maturidade sexual dos animais atingida por volta dos 18 meses. A constituição familiar do grupo é conhecida como família estendida, sendo formada por animais de ambos os sexos, de diversas idades e por imigrantes não aparentados, sendo que todos os membros do grupo carregam e cuidam dos filhotes (Stevenson e Rylands, 1988). O sistema de acasalamento desse gênero, segundo diferentes autores, implica em distintos padrões de acasalamento que podem variar de monogamia e poliginia à poliandria (Abbott, 1984; Stevenson e Rylands, 1988; Coutinho e Corrêa, 1995; Ferrari e Digby, 1996; Nievergelt et al., 2000). Essas diferentes estratégias reprodutivas podem refletir em alterações morfométricas, principalmente, em relação ao tamanho corporal e testicular das espécies (Kenagy e Trombulak, 1986).

Os diferentes tipos de sistemas de acasalamento estão diretamente correlacionados com o investimento corporal em massa testicular (Kenagy e Trombulak, 1986), sendo que espécies que apresentam sistema de acasalamento do tipo *single-male* (monogamia e poliginia), em que normalmente um único macho tem acesso à fêmea durante o período reprodutivo, possuem menor investimento testicular, uma vez que a competição para a produção de progênie ocorre através de disputas no acesso à fêmea. Por outro lado, espécies com acasalamento do tipo *multi-male* (promiscuidade e poliandria), em que mais

de um macho tem acesso à fêmea durante o período reprodutivo, a competição espermática juntamente com a intensa atividade copulatória podem ter favorecido a seleção de animais com maior volume testicular (Harcourt et al., 1981; Harvey e Harcourt, 1984; Kenagy e Trombulak, 1986).

Se por um lado espera-se que espécies tipo *single-male* apresentem um menor investimento testicular e, conseqüentemente, baixa produção espermática (Kenagy e Trombulak, 1986; Firman et al., 2015), por outro lado espera-se que sua produção de andrógenos seja alta, uma vez que estes são responsabilizados pelo aumento de comportamentos agressivos, e a maior agressividade favorece o acesso à fêmea durante disputas entre machos por parceiras reprodutivas (Cavigelli e Pereira, 2000; Muller e Wrangham, 2004).

## **TESTÍCULO**

Nos mamíferos o testículo é um órgão de formato oval a arredondado, geralmente localizado fora da cavidade abdominal, em uma prega cutânea denominada escroto. Essa localização testicular é importante na maioria das espécies de mamíferos devido à necessidade de uma temperatura inferior à temperatura abdominal para a manutenção das funções testiculares (Junqueira e Carneiro, 2011).

O testículo é envolto pela túnica albugínea, uma cápsula constituída de tecido conjuntivo fibroso e, em algumas espécies, também por células contráteis. Essa túnica é contínua com trabéculas de tecido conjuntivo, os septos testiculares, que convergem para o interior do testículo no sentido do mediastino testicular (Dyce et al., 2010). A túnica albugínea e o mediastino são parte da morfologia testicular, mas não participem diretamente do processo espermatogênico ou da secreção de andrógenos (Azevedo et al., 2006; Costa et al., 2011).

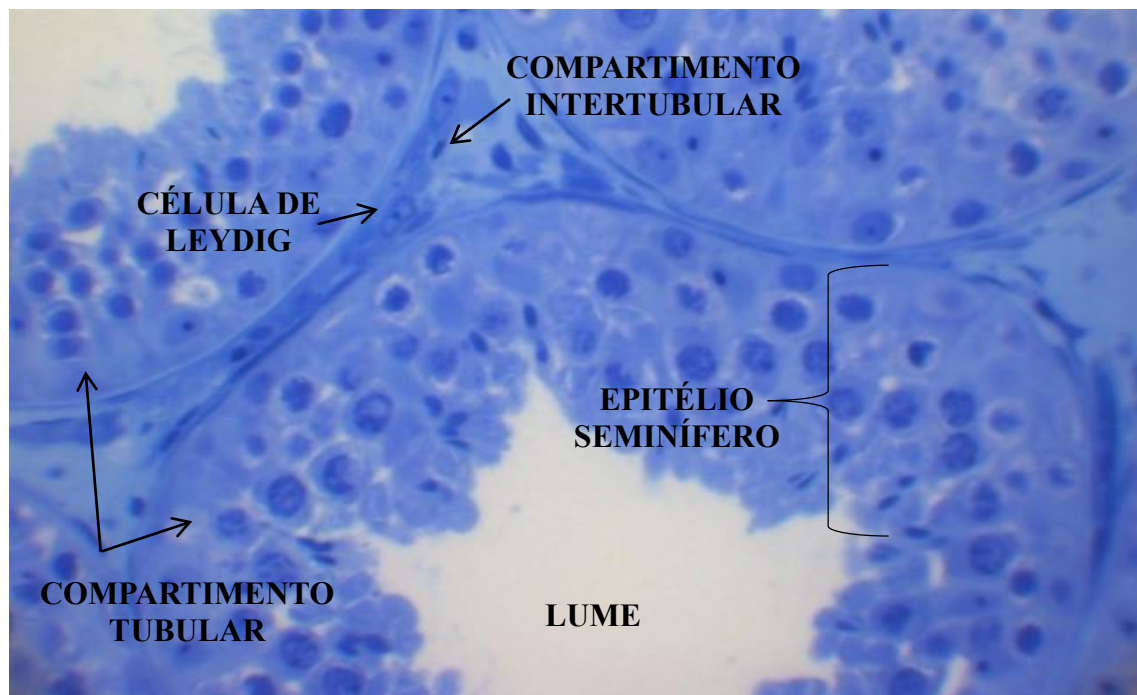
O termo parênquima testicular, embora não seja totalmente adequado, tem sido amplamente mencionado na literatura para se referir ao testículo desprovido de albugínea e mediastino (Johnson et al., 1981; Azevedo et al., 2006; Mascarenhas et al., 2006; Costa et al., 2011). O parênquima testicular, na verdade, seria composto apenas pela parte produtiva desse órgão, ou seja, pelas células germinativas do epitélio seminífero e pelas células de Leydig, responsáveis pela produção de testosterona. Os demais componentes do testículo formam o estroma testicular, que é o tecido de sustentação do órgão. (Junqueira e Carneiro, 2011). Dessa forma, um outro termo utilizado para se referir ao

testículo desprovido de albugínea e mediastino seria peso líquido testicular (Silva Jr et al., 2006; Tenorio et al., 2011; Bringel et al., 2013).

O testículo é responsável por duas funções básicas: produção de espermatozoides e a secreção hormonal (Amann e Schanbacher, 1983; Junqueira e Carneiro, 2011). A produção espermática é altamente correlacionada com o peso testicular (Amann, 1970; França e Russell, 1998), porém, o tamanho do testículo não acompanha proporcionalmente o tamanho corporal, uma vez que mamíferos de pequeno porte tendem a apresentar maior proporção de massa corporal alocada em testículo do que mamíferos de grande porte (Kenagy e Trombulak, 1986; França e Russell, 1998), por exemplo, o gorila (*Gorilla gorilla*), que é o primata de maior porte existente, é uma das espécies que apresenta menor investimento corporal na forma de massa testicular (Harcourt et al., 1981; Kenagy e Trombulak, 1986). Proporcionalmente, o investimento apresentado pelo sagui-comum em massa gonadal é cerca de 20 vezes maior que o investimento do gorila (Harcourt et al., 1981; Kenagy e Trombulak, 1986). O fato de o tamanho testicular não necessariamente acompanhar o tamanho do corpo contribui para uma economia energética, uma vez que animais de grande porte produziram quantidades excessivamente grandes de espermatozoides (Paula, 1999).

A relação entre o peso dos testículos e o peso corporal é conhecida como índice gonadossomático (IGS). Este índice fornece informações importantes a respeito do grau de investimento corporal que uma determinada espécie apresenta em massa testicular, sendo esse um dado que está diretamente relacionado ao sistema de acasalamento das espécies, como mencionado anteriormente (Harcourt et al., 1981; Kenagy e Trombulak, 1986).

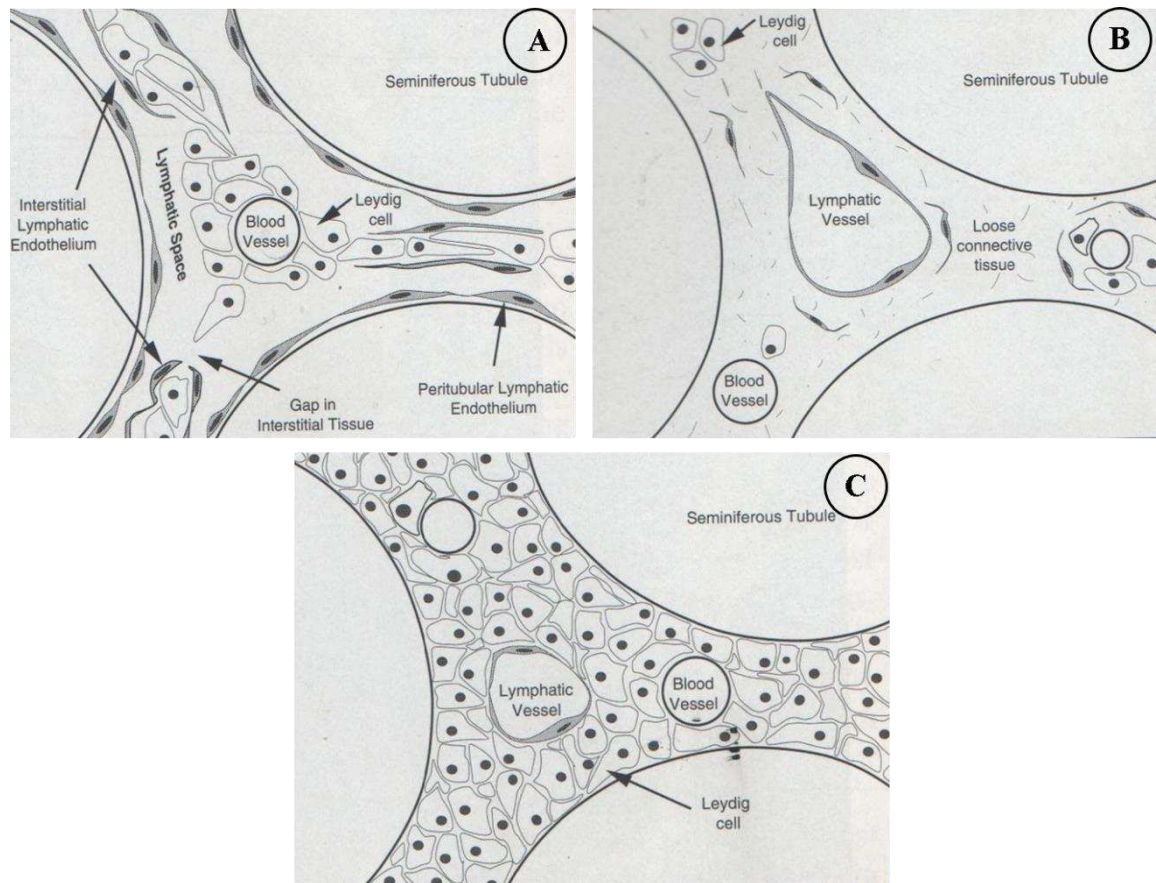
O testículo pode ser dividido em dois compartimentos principais, o tubular e o intertubular (Russell et al., 1990) (Figura 4). O compartimento tubular é composto pelos túbulos seminíferos e representa, em geral, cerca de 60 a 90% do volume testicular total, sendo o local onde o processo espermatogênico acontece (Leal e França 2006; Silva et al., 2010; Weinbauer et al., 2010). Os túbulos seminíferos são constituídos por um epitélio germinativo, ou epitélio seminífero, que é formado por dois tipos celulares principais: as células de Sertoli e as células da linhagem espermatogênica (Russell et al., 1990).



**Figura 4:** Corte transversal de testículo de *Callithrix geoffroyi* com destaque para os compartimentos tubular e intertubular. Objetiva de 40x. Coloração azul de toluidina (Fonte: Arquivo pessoal).

No compartimento intertubular observa-se grande quantidade de tecido conjuntivo, constituindo o estroma do órgão e dando suporte ao parênquima testicular, a ele soma-se também vasos sanguíneos, linfáticos e nervos (Hooker, 1970). O tecido intertubular do testículo contém ainda diversas células, como fibroblastos, células reticulares, macrófagos, células plasmáticas, linfócitos e mastócitos, mas o tipo celular mais frequentemente encontrado nessa região é a célula de Leydig, a principal responsável pela função androgênica do testículo (Russell et al., 1990).

Segundo Fawcett et al. (1973), as diferentes espécies de mamíferos geralmente seguem três padrões distintos de organização dos componentes do compartimento intertubular: no arranjo do tipo I existem extensos espaços linfáticos, uma pequena proporção de células de Leydig (1-5% do volume testicular) e pouco tecido conjuntivo (Figura 5A), como exemplo o rato; no arranjo tipo II existem grupos de células de Leydig espalhados em um vasto tecido conjuntivo frouxo, com capilares sanguíneos e vasos linfáticos localizados centralmente (Figura 5B), como exemplo o homem; e no arranjo tipo III existem grandes quantidades de células de Leydig (20-60% do volume do testículo) que ocupam quase todo compartimento intertubular, apresentando também pouco tecido conjuntivo e vasos linfáticos de pequeno calibre e em baixa quantidade (Figura 5C), como exemplo o javali.



**Figura 5:** Padrões distintos de organização dos componentes do compartimento intertubular das diferentes espécies de mamíferos (A) arranjo tipo I; (B) arranjo tipo II; (C) arranjo tipo III (Fonte: Russell, 1996).

Fawcett et al. (1973) e Russell (1996) especularam que essa variação na proporção e organização dos componentes do intertúbulo testicular está provavelmente relacionada com a capacidade dos vasos linfáticos em remover para fora dos testículos os materiais vascularmente secretados e com a manutenção das concentrações apropriadas de andrógenos tanto no testículo quanto nos vasos sanguíneos.

## ESPERMATOGÊNESE

O desenvolvimento e maturação das células germinativas nos vertebrados, de modo geral, ocorrem de forma semelhante, uma vez que espermatogônias tronco se dividem para produzir mais gerações de espermatogônias, algumas destas entram no ciclo espermatogênico e se transformam em espermatócitos que passam por meiose e geram espermátides; e estas, por sua vez, sofrem uma série de mudanças morfológicas e se transformam em espermatozóides (Pudney, 1995). Entretanto, quando o processo espermatogênico é detalhadamente comparado entre as diferentes classes de vertebrados,

notam-se singularidades no processo. Entre outros aspectos, isto pode ser devido as diferenças que as espécies apresentam na organização do testículo; na relação entre as células de Sertoli e as células germinativas; nas formas de fertilização (externa ou interna); e nas formas de manutenção da temperatura corporal (endotermia ou ectotermia) (Pudney, 1995).

Em anamniotas (peixes e anfíbios) a espermatogênese desenvolve-se no interior de unidades funcionais, conhecidas como cistos ou espermatocistos, formadas por células de Sertoli que envolvem e nutrem as células germinativas em desenvolvimento (Grier et al., 1980; Rastogi et al., 1988; Pudney, 1995; Matta et al., 2009). Em cada cisto as células germinativas apresentam desenvolvimento sincrônico, estando essas no mesmo estágio de maturação (Pudney, 1995; Matta et al., 2009). Esses cistos se desenvolvem dentro de lóbulos, e os lóbulos se originam a partir de ductos coletores de esperma no testículo (Pudney, 1995). Em condrictes (peixes cartilagosos), e em algumas espécies de osteíctes (peixes ósseos) e de anfíbios esses cistos espermatogênicos se movem pelo testículo à medida que amadurecem durante a espermatogênese (Pudney, 1995; Billard, 1986; Rojas, 2013). Essa movimentação ocorre de forma passiva, uma vez que a formação contínua de cistos ou o alongamento dos canais espermáticos promovem o seu deslocamento ao longo do lóbulo (Pudney, 1995).

Já os amniotas (répteis, aves e mamíferos) não apresentam cistos espermatogênicos, e sim túbulos seminíferos constituídos por um epitélio seminífero onde populações estáveis de células de Sertoli proporcionam o ambiente necessário para a manutenção de células germinativas em sucessivos estádios de maturação (Guraya, 1987; Lin e Jones, 1990; Pudney, 1993; Gribbins, 2011). Este arranjo em que as células de Sertoli estão sempre associadas com várias camadas de células germinativas em diferentes gerações contrasta com o padrão apresentado pelos anamniotas, onde as células germinativas de um determinado cisto estão todas em uma mesma fase de maturação (Pudney, 1993).

## **ESPERMATOGÊNESE EM MAMÍFEROS**

Em mamíferos a espermatogênese é um processo altamente sincronizado e complexo de diferenciação celular, que se inicia a partir de mitoses de células tronco espermatogoniais, presentes na base do epitélio seminífero (Guraya, 1987). Além de manterem sua população constante, as espermatogônias tronco produzem novas gerações de células diretamente implicadas no processo espermatogênico durante a sua fase

proliferativa. A fase seguinte, denominada fase meiótica, é caracterizada pela ocorrência de duas divisões meióticas, onde os espermatócitos geram espermátides haploides. Essas, por sua vez, sofrem uma série de mudanças morfológicas durante a fase espermiogênica, como: alterações nucleares; formação do acrossoma; desenvolvimento flagelar e redistribuição citoplasmática; e são liberadas como espermatozoides no lume tubular (Russell et al., 1990).

A sincronia entre as células é garantida pela persistência de pontes citoplasmáticas, assim as diferentes fases de desenvolvimento da espermatogênese acontecem linearmente em todas as células de uma mesma geração (Ren e Russell, 1991). Sendo cada geração definida como um grupo de células na mesma etapa de desenvolvimento e que evoluem sincronicamente ao longo do processo espermatogênico (Clermont, 1972).

O epitélio seminífero dos mamíferos apresenta uma produção cíclica e contínua de espermatozoides, o que promove uma produção espermática constante ao longo de todo período reprodutivo (Roosen-Runge, 1962; Russell et al., 1990). Neste sentido, em um mesmo segmento de epitélio seminífero são observadas gerações espermáticas em fases distintas de desenvolvimento e, graças à presença das células de Sertoli, uma sincronia vertical no epitélio também pode ser observada. Assim, em uma mesma secção tubular transversal é observado uma organização em camadas de desenvolvimento crescente de gerações espermáticas da base em direção ao lume tubular (Ren e Russell, 1991; Pudney 1993). À medida que novas gerações de espermatogônias e espermatócitos são produzidas na base do epitélio as gerações mais desenvolvidas são deslocadas em direção ao lume, culminando com a liberação dos espermatozoides; a este processo denomina-se ciclo do epitélio seminífero (CES). Cerca de 4,5 ciclos são necessários para que a mesma geração, formada na base do epitélio, seja liberada como espermatozoide no lume tubular (Russell et al., 1990).

As células de Sertoli são as únicas células somáticas observadas no epitélio seminífero e são responsáveis pela formação de um microambiente específico onde são mantidas de forma integrada diferentes gerações de células germinativas. Para tal, essas células atuam diretamente no suporte físico e nutricional das células germinativas atentando ainda para o fornecimento de elementos específicos demandados por cada uma destas gerações (Guraya, 1987; Russell et al., 1990). A abrangência do controle realizado pela célula de Sertoli sobre o epitélio seminífero é praticamente geral, ou seja, a população das diferentes gerações germinativas é regulado de acordo com a sua

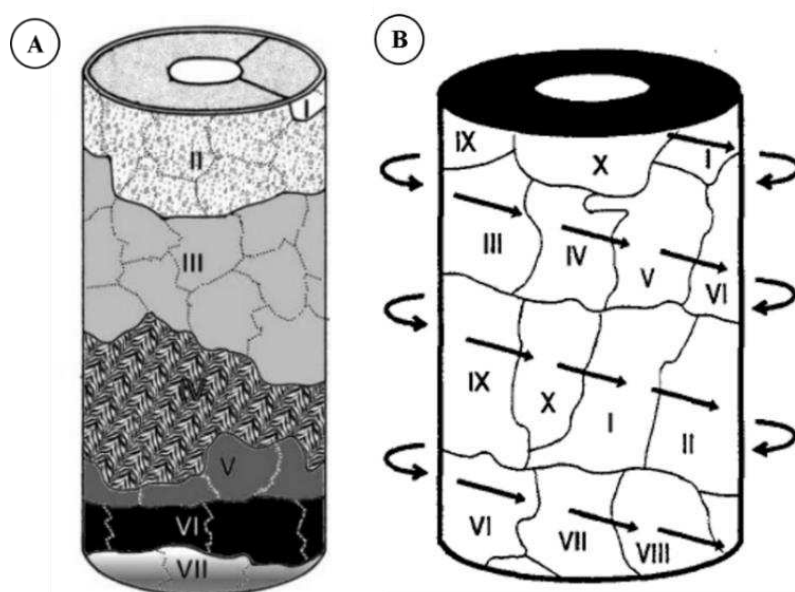
capacidade suporte, para isto as células de Sertoli controlam o número de células produzido pelas mitoses espermatogoniais e acompanham o processo meiótico eliminando células germinativas excedentes e degeneradas ao longo destes processos, por outro lado atuam ainda diretamente na espermição, fagocitando o excesso de citoplasma das espermátides (Russell et al., 1990; França et al., 2016).

As várias gerações de células germinativas distribuídas em camadas em uma secção transversal do túbulo seminífero, formam associações celulares pré determinadas ao longo do CES (Clermont, 1972; Guraya, 1987). Essas diferentes associações celulares são denominadas estádios do CES, sendo que a forma mais comumente utilizada de caracterização desses estádios é feita a partir do método da morfologia tubular; este leva em consideração: as alterações do formato do núcleo das células espermatogênicas; a ocorrência de divisões meióticas nos espermátocitos; e o arranjo e disposição das espermátides ao longo do epitélio seminífero (Clermont, 1972; Guraya, 1987; Costa e Paula, 2003). Segundo este método, oito estádios distintos do CES são descritos para as diferentes espécies de mamíferos já estudadas (Paula et al., 1999; França e Godinho, 2003; Leal e França, 2006; Bitencourt et al., 2007; Costa et al., 2008).

Na maioria dos mamíferos a espermatogênese é classificada como segmentar, o que significa que apenas um único estádio do CES está presente em cada segmento de túbulo seminífero (Figura 6A) (Leblond e Clermont, 1952; Russell et al., 1990; Paula et al., 1999; França e Godinho, 2003; Bitencourt et al., 2007). Assim, no mesmo segmento do túbulo há uma evolução cíclica dos estádios, ou seja, periodicamente todo o processo espermatogênico ocorre neste segmento (Perey et al., 1961; Russell et al., 1990). Adicionalmente observa-se uma organização sequenciada na distribuição dos estádios nos segmentos adjacentes, ou seja, um segmento no estádio I precede um segmento no estádio VIII e antecede um segmento no estádio II, e assim sucessivamente. Essa organização dos segmentos ao longo do comprimento do túbulo seminífero é chamada de onda espermatogênica (Perey et al., 1961; Guraya, 1987; Russell et al., 1990).

Uma onda espermatogênica é resultado de uma sincronia no desenvolvimento dos estádios que se dissemina progressivamente ao longo do túbulo seminífero, o que possivelmente é reflexo da comunicação linear entre as células de Sertoli que, ao criar o microambiente necessário para o desenvolvimento do estádio em um determinado segmento, influencia o segmento subsequente (Roosen-Runge, 1962; Russell et al., 1990; Cheng e Mruk, 2002).

A espermatogênese de algumas poucas espécies de primatas e das aves segue um arranjo topográfico distinto, conhecido como espermatogênese do tipo helicoidal (Schulze e Rehder, 1984; Jones e Lin, 1993). Neste arranjo, os estádios do CES também estão ordenados sequencialmente, porém em faixas espermatogênicas longitudinais independentes que se distribuem em ondas oblíquas e paralelas ao longo do eixo tubular longitudinal (Schulze e Rehder, 1984; Lin e Jones, 1990) (Figura 6B), neste sentido normalmente são observadas dois ou mais estádios distintos em cada secção transversal de túbulo seminífero (Guraya, 1987; Schulze e Rehder, 1984; Jones e Lin, 1993; Smithwick e Young, 1996).



**Figura 6:** Diagrama representando os estádios do ciclo do epitélio seminífero em diferentes porções do túbulo seminífero. (A) Espermatogênese tipo segmentar (Amann, 2008) e (B) espermatogênese tipo helicoidal (Jones e Lin, 1993).

## REFRÊNCIAS

Abbott, D.H. (1984) Behavioral and physiological suppression of fertility in subordinate marmoset monkeys. *American Journal of Primatology*, v.6, n.3, p.169-186.

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. (2008) The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit? *Journal of andrology*, v. 29, n.5, p.469-487.

Amann, R.P.; Schanbacher B.D. (1983) Physiology of male reproduction. *Journal of Animal Science*, v. 57, n.2, p.380-403.

Auricchio, P. (1995) *Primatas do Brasil*. São Paulo: Terra Brasilis. 184 p.

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*) adulta. *Ceres*, v.53, n.307, p.374-381.

Bicca-Marques, J.C.; Silva, V.M.; Gomes, D.F. (2011) *Ordem Primates*. In: Reis, N.R.; Peracchi, A.L.; Pedro, W.A.; Lima, I.P. *Mamíferos do Brasil*. 2ed. Londrina: Technical Books. p.107-150.

Billard, R. (1986) Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reproduction Nutrition Développement*, v.26, n.4, p.877-920.

Bittencourt, V.L.; Paula, T.A.R.; Matta, S.L.P.; Fonseca, C.C.; Costa, D.S.; Costa, E.P.; Benjamin, L.A. (2007) Biometria macro e microscópica dos componentes testiculares em lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1811) adulto. *Ceres*, n.313, v.54, p.324-329.

Bringel, S.S.; Amorim Júnior, A.A.; Amorim, M.J.A.A.L.; Brito, L.T.; Morais, R.N., Torres, S.M.; Tenorio, M.M.; Silva Junior, V.A. (2013) Endocrine and testicular changes induced by olanzapine in adult Wistar rats. *Journal of Applied Toxicology*, n. 33, v.1, p.24-31.

Cavigelli, S.A.; Pereira, M.E. (2000) Mating season aggression and fecal testosterone levels in male ring-tailed lemurs (*Lemur catta*). *Hormones and Behavior*, n.3, v.37, p.246-255.

Cheng, C.Y.; Mruk, D.D. (2002) Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. *Physiological reviews*, n.82, v.4, p.825-874.

Clermont, Y. (1972) Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiological reviews*, n.52, v.1, p.198-236.

Costa, D.S.; Paula, T.A.R. (2003) Espermatogênese em mamíferos. *Scientia Vila Velha*, n.4, v.1-2, p.53-72.

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 (*Panthera onca*). *Theriogenology*, n.70, v.7, p.1136-1146.

Costa, K.L.C.; Matta, S.L.P.; Gomes, M.D.L.M.; Paula, T.A.R.; Freitas, K.M.; Carvalho, F.D.A.R.; Silveira, J.A.; Dolder, H.; Mendis-Handagama, S.C. (2011) Histomorphometric evaluation of the neotropical brown brocket deer *Mazama*

*gouazoubira* testis, with an emphasis on cell population indexes of spermatogenic yield. *Animal reproduction science*, n. 3-4, v.127, p.202-212.

Coutinho, P.E.; Corrêa, K.M. (1995) Polygyny in a free-ranging group of buffy-tufted-ear marmosets, *Callithrix aurita*. *Folia primatologica*, n.65, v.1, p.25-29.

Dyce, K.M; Sack, W.O.; Wensing, C.J. (2010) *Tratado de anatomia veterinária*. 4ed. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 856p.

Estrada, A.; Coates-Estrada, R. (1985) A preliminary study of resource overlap between howling monkeys (*Alouatta palliata*) and other arboreal mammals in the tropical rain forest of Los Tuxtlas, Mexico. *American Journal of Primatology*, v.9, n.1, p.27-37.

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

Fernandez-Duque, E.; Di Fiore, A.; Carrillo-Bilbao, G. (2008) Behavior, ecology, and demography of *Aotus vociferans* in Yasuní National Park, Ecuador. *International Journal of Primatology*, v. 29, n. 2, p.421-431.

Ferrari, S.F.; Digby, L.J. (1996) Wild *Callithrix* groups: stable extended families? *American Journal of Primatology*, n. 1, v. 38, p.19-27.

Firman, R.C.; Garcia-Gonzalez, F.; Thyer, E.; Wheeler, S.; Yamin, Z.; Yuan, M., Simmons, L.W. (2015) Evolutionary change in testes tissue composition among experimental populations of house mice. *Evolution*, v.69, n.3, p.848-855.

Fleagle, J.G. (1998) *Primate adaptation and evolution*. Second edition. Academic Press. 596p.

França, L.R.; Godinho, C.L. (2003) Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). *Biology of Reproduction*, n.68, v.5, p.1554-1561.

França, L.R.; Hess, R.A.; Dufour, J.M.; Hofmann, M.C.; Griswold, M.D. (2016) The Sertoli cell: one hundred fifty years of beauty and plasticity. *Andrology*, n.4, v.2, p.189-212.

França, L.R.; Russell, L.D. (1998) The testis of domestic animals In: Regadera, J.M.G. (eds). *Male reproduction: A multidisciplinary overview*. Madrid: Churchill Livingstone. p.197-219.

Gribbins, K. (2011) Reptilian spermatogenesis: a histological and ultrastructural perspective. *Spermatogenesis*, v.1, n.3, p.250-269.

Grier, H.J.; Linton, J.R.; Leatherland, J.F.; De Vlaming, V.L. (1980) Structural evidence for two different testicular types in teleost fishes. *Developmental Dynamics*, n.159, v.3, p.331-345.

Guraya, S.S. (1987) *Biology of spermatogenesis and spermatozoa in mammals*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 430p.

Gursky, S. (2000) Effect of seasonality on the behavior of an insectivorous primate, *Tarsius spectrum*. *International Journal of Primatology*, v.21, n.3, p.477-495.

Harcourt, A.H.; Harvey, P.H.; Larson, S.G.; Short, R.V. (1981) Testis weight, body weight and breeding system in primates. *Nature*, n.5827, v.293, p.55-57.

Harvey, P.H.; Harcourt, A.H. (1984) Sperm competition, testes size and breeding systems in primates. In: Smith, R.L. (ed). *Sperm competition and the evolution of animal mating systems*. New York: Academic Press. p.589-600.

Hershkovitz, P. (1977) *Living New World monkeys (Platyrrhini) with an introduction to primates*. Chicago University Press, Chicago, vol. 1.

Hooker, C.W. (1970) The intertubular tissue of the testis. In: Johnson, A.D.; Gomes, W.R.; Vandermark, N.L. (eds) *The testis: development, anatomy, and physiology*. New York and London: Academic Press, v.1, cap.8, p.483-550.

Johnson, L.; Petty, C.S.; Neaves, W.B. (1981) A new approach to qualification of spermatogenesis and its application to germinal cell attrition during human spermatogenesis. *Biology Reproduction*, v.25, p.217-226.

Jones, R.C.; Lin, M. (1993) Spermatogenesis in birds. In: Milligan, S.R. *Oxford reviews of reproductive biology*, v.15, p.233-264.

Junqueira, L.C.; Carneiro, J. (2011) *Aparelho Reprodutor Masculino*. In: Junqueira, L.C.; Carneiro, J. *Histologia básica*. 11ed. Rio de Janeiro: Guanabara, cap.21. p.414-430.

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.

Kleiman, D.G.; Geist, V.; Mcdade, M.C. (2003) *Grzimek's Animal Life Encyclopedia, Mammals III*. Michael Hutchins Series Editor., 2ed. v.14.

Klein, R.G. (2009) The human career: human biological and cultural origins. 3ed. Chicago: The University of Chicago Press.

Leal, M.C.; França, L.R. (2006) The seminiferous epithelium cycle length in the black tufted-ear marmoset (*Callithrix penicillata*) is similar to humans. *Biology of reproduction*, n.4, v.74, p.616-624.

Leblond, C.P.; Clermont, Y. (1952) Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Annals of the New York Academy of Sciences*, n.55, v.1, p.548-573.

Lima, E.M.; Ferrari, S.F. (2003) Diet of a free-ranging group of squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) in eastern Brazilian Amazonia. *Folia Primatologica*, v.74, n.3, p.150-158.

Lin, M.; Jones, R.C. (1990) Spatial arrangement of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the Japanese quail, *Coturnix coturnix japonica*. *Journal of reproduction and fertility*, n.90, v.2, p.361-367.

Mascarenhas, R.M.; Paula, T.A.R.; Matta, S.L.P.; Lanna, L.L.E.; Fonseca, C.C.; Neves, M.T.D.D. (2006) Morfometria macro e microscópica e índices somáticos dos componentes testiculares de cães sem raça definida, da puberdade à senilidade. *Ceres*, n.305, v.53, p.113-119.

Matta, S.L.P.; Gomes, M.L.M.; Andrade, D.R. (2009) Reproductive biology of *Oligosarcus argenteus* (Gunther, 1864) adult males and description of the gonadal maturation stages. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.52, n.1, p.119-126.

Muller, M.N.; Wrangham, R.W. (2004) Dominance, aggression and testosterone in wild chimpanzees: a test of the 'challenge hypothesis'. *Animal Behaviour*, n.1, v.67, p.113-123.

Nievergelt, C.M.; Digby, L.J.; Ramakrishnan, U.; Woodruff, D.S. (2000) Genetic analysis of group composition and breeding system in a wild common marmoset (*Callithrix jacchus*) population. *International Journal of Primatology*, n.1, v.21, p.1-20.

Paula, T.A.R. (1999) Avaliação histológica e funcional do testículo de capivaras adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Tese (Doutorado em Morfologia). Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 84p.

Paula, T.A.R.; Chiarini-Garcia, H.; França, L.R. (1999) Seminiferous epithelium cycle and its duration in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). *Tissue and Cell*, n.31, v.3, p.327-334.

Pereira, D. G. (2015) Avaliação do Risco de Extinção de *Callithrix geoffroyi* (É. Geoffroy in Humboldt, 1812) no Brasil. Processo de avaliação do risco de extinção da fauna brasileira. ICMBio. Disponível em: <http://www.icmbio.gov.br/portal/faunabrasileira/estado-de-conservacao/7203-mamiferos-callithrix-geoffroyi-sagui-da-cara-branca>. Acessado em 06 de dezembro de 2018.

Perey, B.; Clermont, Y.; Leblond, C.P. (1961) The wave of the seminiferous epithelium in the rat. *Developmental Dynamics*, n.108, v.1, p.47-77.

Pough, F.H.; Janis, C.M.; Heiser, J.B. (2006) A vida dos vertebrados. Atheneu Editora São Paulo. 684p.

Pudney, J. (1993) Comparative cytology of the non-mammalian Sertoli cell. In: Russell, L.D.; Griswold, M.D. (eds). *The Sertoli Cell*. Clearwater: Cache River Press, p.611-657.

Pudney, J. (1995) Spermatogenesis in non-mammalian vertebrates. *Microscopy research and technique*, n.32, v.6, p.459-497.

Rastogi, R.K.; Bagnara, J.T.; Iela, L.; Krasovich, M.A. (1988) Reproduction in the Mexican leaf frog, *Pachymedusa dacnicolor*. IV. Spermatogenesis: a light and ultrasonic study. *Journal of Morphology*, v.197, n.3, p.277-302.

Ravosa, M.J.; Dagosto, M. (2007) *Primate origins: adaptations and evolution*. Springer Science+ Business Media, LLC. 829p.

Reis, N.R.; Peracchi, A.L.; Pedro, W.A.; Lima, I.P. (2011) *Mamíferos do Brasil*. Londrina: Technical Books, 439 p.

Ren, H.P.; Russell, L.D. (1991) Clonal development of interconnected germ cells in the rat and its relationship to the segmental and subsegmental organization of spermatogenesis. *American journal of anatomy*, n.192, v.2, p.121-128.

Rojas, F.O. (2013) Testicular histology of *Mustelus schmitti* Springer, 1939 (Elasmobranchii, Triakidae). *BioScriba*, v.6, n.1, p.16-32.

Roosen-Runge, E.C. (1962) The process of spermatogenesis in mammals. *Biological reviews*, n.37, v.3, p.343-376.

Russell, L.D. (1996) Mammalian Leydig cell structure. In: Payne, A.H.; Hardy, M.P.; Russell, L.D. (eds). *The Leydig cell*. Vienna: Cache River Press, cap. 3, p. 43-96.

Russell, L.D.; Ettlin, R.A.; Hikim, A.P.S.; Clegg, E.D. (1990) *Histological and histopathological evaluation of the testis*, Florida: Cache River Press. 286p.

Rylands, A.B.; Coimbra-Filho, A.F.; Mittermeier, R.A. (1993) Systematics, geographic distribution, and some notes on the conservation status of the Callitrichidae. In: Rylands, A.B. (ed), Marmosets and tamarins: systematics, behaviour, and ecology, Oxford: Oxford University Press, p.11-77.

Rylands, A.B.; Coimbra-Filho, A.F.; Mittermeier, R.A. (2009) The Systematics and Distributions of the Marmosets (*Callithrix*, *Callibella*, *Cebuella*, and *Mico*) and *Callimico* (*Callimico*) (Callitrichidae, Primates). In: Ford, S.M.; Porter, L.M.; Davis, L.C. (eds). The Smallest Anthropoids: The Marmoset/Callimico Radiation. Springer, p.25-61.

Rylands, A.B.; Mendes, S.L. (2018) *Callithrix geoffroyi*. The IUCN Red List of Threatened Species 2018. e.T3572A17936610. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T3572A17936610.en>. Acessado em 26 de janeiro de 2019.

Rylands, A.B.; Mittermeier, R.A. (2009) The Diversity of the New World Primates (Platyrrhini): An Annotated Taxonomy. In: Garber P.A., Estrada, A., Bicca-Marques, J.C., Heymann, E.W., Strier, K.B. South American Primates: Comparative, perspectives in the study of behavior, ecology, and conservation. Springer, p.23-54.

Rylands, A.B.; Mittermeier, R.A.; Silva, J.S. (2012) Neotropical primates: taxonomy and recently described species and subspecies. International Zoo Yearbook, n.46, p.11-24.

Schulze, W.; Rehder, U. (1984) Organization and morphogenesis of the human seminiferous epithelium. Cell and tissue research, n.237, v.3, p.395-407.

Silva Jr, V. A.; Vieira, A. C. S.; Pinto, C. F.; Paula, T. A. R.; Palma, M. B.; Amorim, M. J. A. L.; Amorim Jr, A. A.; Manhães-de-Castro, R. (2006). Neonatal treatment with naloxone increases the population of Sertoli cells and sperm production in adult rats. Reproduction Nutrition Development, v.46, n.2, p.157-166.

Silva, F.F.R.; Malukiewicz, J.; Silva, L.C.; Carvalho, R.S.; Ruiz-Miranda, C.R.; Coelho, F.A.S.; Figueira, M.P.; Boere, V.; Silva, I.O. (2018) A Survey of Wild and Introduced Marmosets (*Callithrix*: Callitrichidae) in the Southern and Eastern Portions of the State of Minas Gerais, Brazil. Primate Conservation, n.32, p.1-18.

Silva, R.C.; Costa, G.M.J.; Andrade, L.M.; França, L.R. (2010) Testis stereology, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in the ocelot (*Leopardus pardalis*). Theriogenology, n.73, v.2, p.157-167.

Smithwick, E.B.; Young, L.G. (1996) Germ cell maturation and cellular associations in the seminiferous epithelial cycle of the chimpanzee. Tissue and Cell, n.28, v.2, p.137-148.

Spence-Aizenberg, A.; Di Fiore, A.; Fernandez-Duque, E. (2016) Social monogamy, male–female relationships, and biparental care in wild titi monkeys (*Callicebus discolor*). *Primates*, v.57, n.1, p.103-112.

Stevenson, M.; Rylands, A.B. (1988) The marmosets, genus *Callithrix*. In: Mittermeier, R.A.; Rylands, A.B.; Coimbra-Filho, A.; Fonseca, G.A.B. (eds). *Ecology and behavior of Neotropical Primates*. Washington, DC: World Wildlife Fund, p.131-222.

Strier, K.B. (1997) Mate preferences of wild muriqui monkeys (*Brachyteles arachnoides*): reproductive and social correlates. *Folia Primatologica*, v.68, n.3-5, p.120-133.

Suwanvecho, U.; Brockelman, W. Y.; Nathalang, A.; Santon, J.; Matmoon, U.; Somnuk, R.; Mahannop, N. (2018) High interannual variation in the diet of a tropical forest frugivore (*Hylobates lar*). *Biotropica*, v.50, n.2, p.346-356.

Sussman, R. W.; Kinzey, W. G. (1984). The ecological role of the Callitrichidae: a review. *American Journal of Physical Anthropology*, v.64, n.4, p.419-449.

Tenorio, B. M.; Jimenez, G. C.; Morais, R. N.; Torres, S. M.; Albuquerque Nogueira, R.; Silva Junior, V. A. (2011). Testicular development evaluation in rats exposed to 60 Hz and 1 mT electromagnetic field. *Journal of applied toxicology*, v.31, n.3, p.223-230.

Vivo, M. (1991) *Taxonomia de Callithrix Erxleben, 1777 (Callitrichidae, Primates)*. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 105p.

Weinbauer, G.F.; Luetjens, C.M.; Simoni, M.; Nieschlag, E. (2010) *Physiology of testicular function*. *Andrology*. Springer.

## MORFOMETRIA TESTICULAR E DOS TÚBULOS SEMINÍFEROS DE SAGUIS-DA-CARA-BRANCA (*Callithrix geoffroyi*) ADULTOS

### RESUMO

A morfologia do testículo, a composição do parênquima testicular, o estabelecimento de índices somáticos e de parâmetros quantitativos do túbulo seminífero podem fornecer informações valiosas quanto à produção espermática, fisiologia reprodutiva e sistema de acasalamento das espécies. Sendo assim, o objetivo desta pesquisa foi descrever parâmetros básicos relacionados aos índices somáticos e à morfofisiologia testicular de *Callithrix geoffroyi* adultos. Para tal, foram utilizados fragmentos testiculares de cinco animais adultos de vida livre para confecção e análise de lâminas histológicas. Os animais de estudo apresentaram peso corporal médio de  $396,20 \pm 43,71$  g, peso testicular de  $603 \pm 151,02$  mg, índices gonadossomático de 0,15%, tubulossomático de 0,14% e intertubulossomático de 0,016%. Apresentaram também aproximadamente  $69,12 \pm 4,95$   $\mu\text{m}$  de altura de epitélio,  $232,38 \pm 17,48$   $\mu\text{m}$  de diâmetro tubular e  $10,79 \pm 1,86$  m de túbulo seminífero por grama de testículo. Em comparação a outros primatas, os indivíduos de *C. geoffroyi* estudados apresentaram baixo investimento corporal em massa testicular, e mais especificamente em túbulos seminíferos. Sendo os valores de altura de epitélio, diâmetro e comprimento tubular considerados baixos. Desse modo, há um indicativo de que a produção espermática desses animais seja baixa, o que condiz com o sistema de acasalamento tipo *single-male* (monogamia e poliginia), visto que nesta estratégia de acasalamento uma grande produção espermática poderia ser um desperdício energético, uma vez que a competição para a produção de progênie ocorre no acesso à fêmea e não no interior dos órgãos genitais femininos.

### INTRODUÇÃO

Os primatas neotropicais compõem um grupo de mamíferos muito abundante e diversificado (Bicca-Marques et al., 2011; Rylands et al., 2012), entretanto, para diversas espécies poucas informações sobre aspectos relacionado à morfologia testicular, aos índices somáticos e ao processo espermatogênico são encontradas na literatura científica como é o caso, por exemplo, do sagui-da-cara-branca, *Callithrix geoffroyi*. Este é um pequeno primata endêmico do Brasil (Rylands et al., 1993; Rylands e Mendes, 2018), que vive em grupos familiares formados por animais de ambos os sexos, de diversas idades e

por imigrantes não aparentados, atingindo a maturidade sexual por volta dos 18 meses (Stevenson e Rylands, 1988).

A morfologia do testículo, a composição do parênquima testicular, o estabelecimento de índices somáticos e de parâmetros quantitativos do túbulo seminífero podem fornecer informações valiosas quanto à produção espermática, fisiologia reprodutiva, sistema de acasalamento, auxiliando também no estabelecimento de protocolos de reprodução assistida (Kenagy e Trombulak, 1986; França e Russell, 1998; Barros et al., 2006; Mascarenhas et al., 2006).

O índice gonadossomático (IGS), relação entre o peso dos testículos e o peso corporal, fornece informações a respeito do grau de investimento corporal que uma determinada espécie apresenta em massa testicular, sendo este um dado que está diretamente relacionado ao sistema de acasalamento das espécies, uma vez que espécies com comportamentos monogâmicos e poligínicos apresentam menor índice gonadossomático que as espécies com comportamentos promíscuos ou poliândricos (Harcourt et al., 1981; Kenagy e Trombulak, 1986).

Já os índices tubulossomático e intertubulossomático, apresentam uma subdivisão dos compartimentos testiculares, e visam quantificar o investimento especificamente em túbulos seminíferos e tecido intertubular, em relação à massa corporal (Azevedo et al., 2006; Barros et al., 2006). O testículo apresenta fisiologia distinta entre os componentes tubular e intertubular, quais sejam: gonadogênese e androgênese respectivamente (Junqueira e Carneiro, 2011). O túbulo seminífero é o principal componente do testículo da maioria das espécies de mamíferos, porém a sua variação proporcional volumétrica em relação ao tecido intertubular influencia na fisiologia produtiva testicular com reflexos comportamentais (Russell, 1996; França e Russell, 1998; Dixson, 2012). A determinação de índices somáticos geral e relativos aos componentes testiculares, torna possível comparações entre indivíduos de diferentes espécies, diferentes faixas etárias e com massas corporais distintas (Barros et al., 2006; Mascarenhas et al., 2006; Bittencourt et al., 2007).

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo descrever os parâmetros básicos relacionados aos índices somáticos e à morfofisiologia testicular de *Callithrix geoffroyi* adultos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos realizados tiveram aprovação da Comissão de Ética no Uso Animal da Universidade Federal de Viçosa (CEUA-UFV), protocolo n° 70/2015, e do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (SISBIO - IBAMA), licença n° 50717-1. As capturas dos animais e coletas de material ocorreram nos meses de outubro e novembro de 2015.

O presente trabalho utilizou amostra testicular de cinco saguis-da-cara-branca (*Callithrix geoffroyi*) adultos de vida livre que foram capturados em grupos de animais já habituados à presença humana nos municípios de Cariacica e Vila Velha, Espírito Santo, Brasil. Os animais foram capturados com o auxílio de armadilhas iscadas com pedaços de banana. Sendo, posteriormente, anestesiados com quetamina (10 mg/kg) e xilazina (0,5mg/kg) (Carpenter, 2005); pesados em balança digital; mensurados: com fita métrica quanto ao comprimento do corpo e da cauda, e com paquímetro digital (Starfer®) quanto ao comprimento, largura e espessura dos testículos. A espessura de uma prega dupla de pele do escroto foi ainda mensurada.

Um dos testículos foi coletado através de cirurgia de hemicastração. A técnica cirúrgica utilizada foi baseada nos procedimentos utilizados em animais domésticos, com a incisão cirúrgica realizada na região inguinal pré-púbica, remoção do testículo e epidídimo em técnica aberta com ligadura pedicular com fio de nylon 3-0 e sutura de pele com ponto U deitado separado com fio de nylon 3-0. Como medidas profiláticas pós-operatórias, os animais receberam antibiótico (oxitetraciclina, 10 mg/kg) e anti-inflamatório (meloxicam, 0,2 mg/kg). Os animais foram soltos próximos ao local de captura após a completa recuperação dos efeitos anestésicos.

Após a coleta, e antes de serem imersos em solução fixadora de Karnovsky (Karnovsky, 1965), os testículos tiveram a albugínea perfurada em diversos pontos com o uso de uma agulha hipodérmica com o objetivo de melhorar a perfusão do fixador. Posteriormente, os testículos foram seccionados longitudinalmente e mantidos em solução de Karnovsky por 24 horas. Após este período o material foi transferido e armazenado em álcool 70% até o momento do processamento histológico.

O volume dos testículos foi calculado através de suas dimensões a partir da fórmula do volume do elipsoide:  $\frac{4}{3} \pi ABC$ , onde A = metade da largura, B = metade da espessura, C = metade do comprimento, como as mensurações foram realizadas percutaneamente foi descontada das dimensões testiculares o valor relativo à espessura

de uma prega de pele escrotal (Mascarenhas et al., 2006; Araujo et al., 2013). E, uma vez que a densidade volumétrica do tecido testicular de mamíferos é aproximadamente 1 g/mL, o volume testicular foi considerado igual ao peso testicular (Johnson et al., 1981). O índice gonadossomático (IGS) pôde ser calculado através da seguinte forma:  $IGS = (\text{peso de ambos os testículos} / \text{peso corporal}) \times 100$  (Kenagy e Trombulak, 1986; Mascarenhas et al., 2006; Morais et al., 2012).

Foi considerado como peso líquido testicular o volume testicular descontado o volume da albugínea (Bringel et al., 2013). Para tal, foi calculada a espessura média da albugínea, por meio de mensuração em três pontos distintos com o uso de um paquímetro digital (Starfer<sup>®</sup>), e este valor descontado das mensurações testiculares, obtendo assim o volume do parênquima testicular.

Retirou-se um fragmento de cada testículo coletado, e estes foram submetidos à desidratação em série crescente de álcoois (70, 80, 90% e absoluto) e incluídos em resina de metacrilato (Leica Historessin<sup>®</sup>). Posteriormente, foram realizados cortes histológicos de 3 µm de espessura, seriados e em intervalos de 30 µm, em micrótomo rotativo com navalha de vidro, para a confecção de lâminas histológicas, as quais foram coradas com azul de toluidina / borato de sódio 1%, e montadas com lamínulas de vidro com o uso de resina (Entelan<sup>®</sup>).

Para o cálculo da proporção volumétrica de cada compartimento testicular foram fotografados 20 campos aleatórios do parênquima testicular, em imagens digitais com o auxílio de um fotomicroscópio (Motic BA410) equipado com câmera digital Moticom Pro 252B, com objetiva de 40x. Por meio do programa Microsoft Office Power Point<sup>®</sup> foram sobrepostas grades com 500 pontos em cada imagem, sendo contabilizados os pontos coincidentes sobre o compartimento tubular e sobre o compartimento intertubular. Desse modo, pôde-se inferir suas proporções volumétricas ao peso calculado para o parênquima testicular obtendo-se assim o volume total de túbulos seminíferos e do tecido intertubular no testículo. Os índices tubulossomático (ITS) e intertubulossomático (IIS) foram calculados através da fórmula:  $ITS \text{ ou } IIS = (\text{peso total do compartimento} / \text{peso corporal}) \times 100$  (Barros et al., 2006; Mascarenhas et al., 2006; Morais et al., 2012).

Foram calculados o diâmetro dos túbulos seminíferos e a espessura do epitélio seminífero a partir da média de mensurações em 20 secções transversais de túbulos seminíferos o mais circular possível, na objetiva de 40x, para isso utilizou-se o programa de análise de imagem Motic Images Plus 2.0. Em cada secção transversal de túbulo

seminífero foram realizadas duas medidas de diâmetro tubular e quatro de epitélio (medida desde a membrana basal até a borda luminal), diametralmente opostas.

Considerando o formato cilíndrico do túbulo seminífero foi calculado seu comprimento total através da adaptação da fórmula do volume de um cilindro, onde: Comprimento tubular = (volume total de túbulos seminíferos / área da secção transversal do túbulo seminífero), sendo a área da secção transversal calculada através da fórmula  $\pi r^2$ , onde r é igual à metade do diâmetro médio dos túbulos seminíferos (Morais et al., 2017). Os dados para o *Callithrix geoffroyi* foram analisados segundo estatística descritiva quanto à média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O peso corporal, peso testicular e morfometria corporal dos animais de estudo estão apresentados na tabela 1. Apesar de serem animais de vida livre, estes eram habituados a presença humana, uma vez que muitas pessoas da região apresentavam o costume de alimentá-los. O peso corporal médio apresentado pelos animais estudados ( $396,20 \pm 43,71$ ) está dentro da faixa descrita para o gênero *Callithrix* (300 a 450 g) (Stevenson e Rylands, 1988; Bicca Marques et al., 2011).

**Tabela 1:** Morfometria corporal, peso corporal e testicular de machos adultos de *Callithrix geoffroyi*.

Parâmetro	Média ± DP	CV (%)
Comprimento corpo (cm)	17,98 ± 0,71	3,9
Comprimento cauda (cm)	32,12 ± 2,56	7,9
Peso corporal (g)	396,20 ± 43,71	11,0
Peso testicular (mg)	603 ± 151,02	25,0
Testículo direito	302,10 ± 88,92	29,4
Testículo esquerdo	300,91 ± 68,85	22,8

DP: Desvio padrão; CV: coeficiente de variação

O peso corporal dos indivíduos de *C. geoffroyi* estudados é maior que o descrito para o *C. penicillata* (Leal e França, 2006), entretanto seu peso testicular é menor. A produção espermática está altamente correlacionada com peso testicular (Amann, 1970; França e Russell, 1998), porém, o tamanho do testículo não acompanha proporcionalmente o tamanho corporal, uma vez que mamíferos de pequeno porte tendem a alocar maior proporção de massa corporal e despreendimento energético no tecido

testicular do que mamíferos de maior porte (Kenagy e Trombulak, 1986; França e Russell, 1998).

Dentre os primatas já estudados, o gorila (*Gorilla gorilla*) é a espécie de maior porte e, interessante, é a que apresenta menor investimento corporal na forma de massa testicular (Harcourt et al., 1981; Kenagy e Trombulak, 1986). Essa espécie tem peso corporal acima de 160 kg e apenas cerca de 0,02% desse valor está alocada em massa gonadal, ao passo que o sagui-comum (*Callithrix jacchus*) pesa cerca de 320 g e tem cerca de 0,41% deste valor alocado nos testículos. Proporcionalmente, o investimento desse sagui em massa gonadal é cerca de 20 vezes maior que o investimento do gorila (Harcourt et al., 1981; Kenagy e Trombulak, 1986). O fato de o tamanho testicular não necessariamente acompanhar o tamanho do corpo contribui para uma economia energética, uma vez que animais de grande porte produziram quantidades excessivamente grandes de espermatozoides (Paula, 1999).

Os percentuais de túbulo seminífero e intertúbulo, IGS, ITS, IIS e sistema de acasalamento de diferentes espécies de primatas estão apresentados na tabela 2. Os animais estudados apresentaram IGS igual a 0,15%. Segundo Kenagy e Trombulak (1986), mamíferos que apresentam acasalamento do tipo *single-male* (monogamia e poliginia) tendem a apresentar IGS mais baixo, uma vez que a competição para a produção de progênie ocorre no acesso à fêmea. Por outro lado, espécies com acasalamento do tipo *multi-male* (promiscuidade e poliandria), em que mais de um macho tem acesso à fêmea durante o período reprodutivo, a competição pela progênie ocorre diretamente no interior dos órgãos genitais femininos, ou seja, a competição espermática juntamente com a intensa atividade copulatória podem ter favorecido a seleção de animais com maior volume testicular (Harcourt et al., 1981; Harvey e Harcourt, 1984). Dentro da ordem Primates, por exemplo, os chimpanzés (*Pan troglodytes*) são altamente promíscuos e os gorilas (*Gorilla gorilla*) vivem em sistemas poligínicos, enquanto os chimpanzés apresentam aproximadamente um quarto do peso corporal dos gorilas, seu peso testicular é cerca de quatro vezes maior, sendo o IGS dos chimpanzés cerca de 13 vezes maior que o dos gorilas (Harcourt et al., 1981).

O sistema reprodutivo do gênero *Callithrix*, segundo diferentes autores, implica em padrões de acasalamento que podem variar de monogamia, poliandria a poliginia (Abbott, 1984; Stevenson e Rylands, 1988; Coutinho e Corrêa, 1995; Ferrari e Digby, 1996; Nievergelt et al., 2000). Em certos grupos sociais apenas o casal dominante se reproduz, pois este inibe fisiológica e comportamentalmente os outros membros do grupo,

mantendo-se desse modo um sistema monogâmico de acasalamento (Abbott, 1984), porém, essa inibição as vezes é falha. A inibição que o macho dominante impõe sobre os seus subordinados é apenas comportamental, ou seja, quando o macho dominante não está próximo os machos subordinados podem tentar acasalar com a fêmea dominante (Stevenson e Rylands, 1988). E, mesmo que a inibição induzida pela fêmea dominante sobre suas subordinadas seja fisiológica e comportamental, isso não impede totalmente a reprodução das subordinadas (Coutinho e Corrêa, 1995; Arruda et al., 2005).

Harcourt et al. (1981) e Kenagy e Trombulak (1986) definem o IGS do *C. jacchus* como sendo 0,41%, e tratam esta espécie como sendo monogâmica, este valor é cerca de três vezes maior do que o encontrado para os indivíduos de *C. geoffroyi* estudados. Um valor próximo ao descrito aqui para o sagui-da-cara-branca foi também descrito para uma espécie de macaco-da-noite (*Aotus trivirgatus*), um pequeno primata monogâmico (Harcourt et al., 1981).

A proporção de túbulos seminíferos presente no testículo é diretamente relacionada à produção espermática (França e Russell, 1998), sendo esperado, portanto, que espécies promíscuas e poliândricas apresentem uma maior proporção somática de túbulo seminífero, conseqüentemente maior produção espermática, que espécies monogâmicas e poligínicas. Já a relação entre a proporção de tecido intertubular e o sistema de acasalamento não é tão direta, ou seja, a concentração de testosterona influencia diretamente o comportamento do animal, mas a sua produção pelas células de Leydig no intertúbulo sofre variações resultantes mais especificamente da capacidade individual da célula em secreta-la do que das variações relativas à proporção somática destas células no testículo (Ewing et al., 1979; Russell, 1996). Estudos mostram que o aumento dos níveis de testosterona pode levar ao aumento de comportamentos agressivos, e essa maior agressividade favorecer o acesso à fêmea durante disputas entre machos por parceiras reprodutivas (Cavigelli e Pereira, 2000; Muller e Wrangham, 2004).

Como já mencionado, animais de pequeno porte tendem a apresentar maior investimento corporal em massa testicular que animais de grande porte (Kenagy e Trombulak, 1986), da mesma forma o investimento corporal na forma de túbulos seminíferos (ITS) parece também seguir essa tendência. Neste sentido na maioria dos primatas de pequeno porte analisados observa-se uma maior proporção testicular e somática de túbulos seminíferos em relação aos animais de grande porte (Tabela 2).

O *Gorilla gorilla*, além de ser o maior primata existente, apresenta sistema de acasalamento poligínico (*single-male*), características confluentes para um menor

investimento testicular somático, e desta forma é a espécie que apresenta os menores valores de IGS, ITS e IIS já calculados (Tabela 2) (Harcourt et al., 1981; Kenagy e Trombulak, 1986; Leal e França, 2006; Fujii-Hanamoto et al., 2011; Dixson, 2012). Já os índices somáticos testiculares médios dos indivíduos de *C. geoffroyi* estudados apresentam-se entre os valores mais baixos registrados para as espécies de primatas neotropicais. Baseado no tamanho corporal esta é uma informação atípica, porém a característica monogâmica (*single-male*) parece influenciar fortemente no sentido deste baixo investimento testicular.

**Tabela 2:** Espécies de primatas do Novo e Velho Mundo e seus respectivos pesos corporais e testiculares; percentuais testiculares de túbulo seminífero (TS) e intertúbulo (IT); índices gonadossomático (IGS), tubulossomático (ITS) e intertubulossomático (IIS); e sistema de acasalamento (SA).

<b>Espécie</b>	<b>Corpo (g)</b>	<b>Testículo (mg)</b>	<b>TS (%)</b>	<b>IT (%)</b>	<b>IGS (%)</b>	<b>ITS (%)</b>	<b>IIS (%)</b>	<b>SA</b>	<b>Ref.</b>
<i>C. jacchus</i>	3,2x10 <sup>2</sup>	1300	90	10	0,4	0,36	0,04	SM*	Harcourt et al., 1981 e Dixson, 2012
<i>C. penicillata</i>	3x10 <sup>2</sup>	1077	92,4	7,6	0,36	0,33	0,02	SM*	Leal e França, 2006
<i>C. geoffroyi</i>	3,96x10 <sup>2</sup>	603	90,07	9,93	0,15	0,14	0,016		Presente estudo
<i>M. fascicularis</i>	5,6x10 <sup>3</sup>	17500	82,5	17,5	0,31	0,26	0,055	MM <sup>o</sup>	Zhengwei et al., 1997
<i>P. troglodytes</i>	4,43 x10 <sup>4</sup>	118800	76,6	23,4	0,27	0,21	0,063	MM <sup>o</sup>	Harcourt et al., 1981 e Fujii-Hanamoto et al., 2011
<i>G. gorilla</i>	1,69x10 <sup>5</sup>	29600	59,8	40,2	0,017	0,01	0,007	SM <sup>o</sup>	Harcourt et al., 1981 e Fujii-Hanamoto et al., 2011

\*(SM) *single-male*: monogamia ou poliginia; <sup>o</sup>(MM) *multi-male*: promiscuidade ou poliandria

O parênquima testicular é envolto pela túnica albugínea que emite septos que dividem o parênquima em lobos. Esses septos não estão sempre evidentes, porém nas espécies em que são bem desenvolvidos eles podem ser observados convergindo no sentido do mediastino testicular (Dyce et al., 2010). A túnica albugínea e o mediastino são parte da morfologia testicular, embora não participem diretamente do processo espermatogênico ou da secreção de andrógenos (Azevedo et al., 2006; Costa et al., 2011). Em vários estudos o peso do parênquima testicular é considerado como sendo o peso testicular descontado os valores de albugínea e mediastino testiculares (Johnson et al., 1981; Azevedo et al., 2006; Mascarenhas et al., 2006; Costa et al., 2011), esse também pode ser chamado de peso líquido testicular (Bringel et al., 2013).

Com relação às proporções desses componentes no testículo dos indivíduos de *C. geoffroyi* estudados observou-se que a albugínea ocupa um percentual médio de 7% de seu volume testicular, sendo a mesma proporção também descrita para o *C. penicillata* (Leal e França, 2006). Não foi possível observar macroscopicamente o mediastino testicular nos animais de estudo, sendo assim a mensuração deste componente não pôde ser realizada. O volume do testículo, da albugínea e o volume líquido testicular estão apresentados na tabela 3.

**Tabela 3:** Volume testicular e morfometria de túbulo seminífero de *Callithrix geoffroyi* adultos.

<b>Parâmetro</b>	<b>Média ± DP</b>	<b>CV (%)</b>
Volume testicular (ml)	0,603 ± 0,151	25,04
Volume albugínea (ml)	0,042 ± 0,010	25,04
Volume líquido testicular (ml)	0,561 ± 0,140	25,04
Altura de epitélio seminífero (µm)	69,12 ± 4,95	7,16
Diâmetro tubular (µm)	232,38 ± 17,48	7,52
Comprimento tubular por grama de testículo (m/g)	10,79 ± 1,86	17,21
Comprimento tubular por testículo (m)	6,37 ± 1,25	19,65

DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação

Certos parâmetros quantitativos relacionados ao túbulo seminífero, como diâmetro tubular, altura de epitélio, comprimento tubular total e por grama de testículo, apresentam uma correlação positiva com a atividade espermatogênica (Tingari et al., 1984; França e Russell, 1998; Souza et al., 2005). Os valores encontrados para esses parâmetros para os saguis-da-cara-branca estudados também estão descritos na tabela 3.

O diâmetro do túbulo seminífero em mamíferos tende a variar de 171 a 287  $\mu\text{m}$  (França e Russell, 1998; Azevedo et al. 2006; Caldeira et al., 2010; Morais et al., 2017). Sendo que, o valor encontrado para os animais estudados é menor que o descrito por Leal e França (2006) para *C. penicillata* e por Hodges e Hearn (1977) para *C. jacchus*, e maior que o descrito para *M. fascicularis* por Zhengwei et al. (1997), porém está dentro da faixa de variação apresentada acima.

A altura de epitélio encontrada para os indivíduos de *C. geoffroyi* estudados é menor que o apresentado para o *C. penicillata* (Leal e França, 2006), porém faz parte da amplitude de variação observada para animais domésticos e selvagens, que seria de 60 a 100  $\mu\text{m}$  (França e Russell 1998; Azevedo et al., 2006; Barros et al., 2006; Caldeira et al., 2010). Os saguis-da-cara-branca estudados apresentam comprimento de túbulo seminífero por testículo e por grama de testículo menor que o descrito para a maioria dos animais domésticos já estudados (França e Russell 1998), e menor também que o apresentado para alguns mamíferos selvagens, como *Panthera onca* (Azevedo et al., 2006), *C. penicillata* (Leal e França, 2006), *Chrysocyon brachyurus* (Bittencourt et al., 2007) e *Cerdocyon thous* (Caldeira et al., 2010).

## CONCLUSÃO

Os saguis-da-cara-branca estudados apresentaram pequena proporção do peso corporal alocado em massa testicular, sendo que em comparação a outros primatas, de modo geral, eles apresentaram valores baixos de IGS, ITS e IIS. Apresentaram também redução dos valores relacionados aos parâmetros quantitativos dos túbulos seminíferos quando comparado a outros mamíferos.

Esses valores baixos estão de acordo com o sistema de acasalamento tipo *single-male*, pois neste tipo de estratégia de acasalamento uma grande produção espermática poderia ser considerada como um desperdício energético, uma vez que a competição para a produção de progênie ocorre no acesso à fêmea e não no interior dos órgãos genitais femininos.

## REFERÊNCIAS

- Abbott, D.H. (1984) Behavioral and physiological suppression of fertility in subordinate marmoset monkeys. *American Journal of Primatology*, v.6, n.3, p.169-186.
- 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.

Araujo, G.R.; Paula, T.A.R.; Deco-Souza, T.; Garay, R.M.; Bergo, L.C.F.; Silva, L.C.; Csermak Júnior, A.C.; Ferrer, J.B.S.; Barros, J.B.G. (2013) Criptorquidismo em jaguatirica de vida livre capturada no Parque Estadual do Rio Doce, Brasil. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, n.65, v.1, p.1-5.

Arruda, M.F.; Araújo, A.; Sousa, M.B.C.; Albuquerque, F.S.; Albuquerque, A.C.S.R.; Yamamoto, M.E. (2005) Two breeding females within free-living groups may not always indicate polygyny: alternative subordinate female strategies in common marmosets (*Callithrix jacchus*). Folia Primatologica, n.76, v.1, p.10-20.

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*) adulta. Ceres, n.307, v.53, p.374-381.

Barros, J.B.G.; Paula, T.A.R.; Matta, S.L.P.; Fonseca, C.C.; Melo, F.R.; Benjamim, L.A. (2006) Morfometria testicular e dos túbulos seminíferos de leões-africanos (*Panthera leo*, Linnaeus, 1758) adultos, em cativeiro. Ceres, n.310, v.53, p.523-530.

Bicca-Marques, J.C.; Silva, V.M.; Gomes, D.F. (2011) Ordem Primates. In: Reis, N.R.; Peracchi, A.L.; Pedro, W.A.; Lima, I.P. Mamíferos do Brasil. 2ed. Londrina: Technical Books. p.107-150.

Bittencourt, V.L.; Paula, T.A.R.; Matta, S.L.P.; Fonseca, C.C.; Costa, D.S.; Costa, E.P.; Benjamin, L.A. (2007) Biometria macro e microscópica dos componentes testiculares em lobo guará (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1811) adulto. Ceres, n.313, v.54, p.324-329.

Bringel, S.S., Amorim Júnior, A.A., Amorim, M.J.A.A.L., Brito, L.T., Morais, R.N., Torres, S.M., Tenorio, M.M., Silva Junior, V.A. (2013) Endocrine and testicular changes induced by olanzapine in adult Wistar rats. Journal of Applied Toxicology, n. 33, v.1, p.24-31.

Caldeira, B.C.; Paula, T.A.R.; Matta, S.L.P.; Balarini, M.K.; Campos, P.K.A. (2010) Morphometry of testis and seminiferous tubules of the adult crab-eating fox (*Cerdocyon thous*, Linnaeus, 1766). Ceres, n.5, v.57, p.569-575.

Carpenter, J.W. (2005) Exotic animal formulary. Elsevier Saunders, 3ed. 564p.

Cavigelli, S.A.; Pereira, M.E. (2000) Mating season aggression and fecal testosterone levels in male ring-tailed lemurs (*Lemur catta*). Hormones and Behavior, n.3, v.37, p.246-255.

Costa, K.L.C.; Matta, S.L.P.; Gomes, M.D.L.M.; Paula, T.A.R.; Freitas, K.M.; Carvalho, F.D.A.R.; Silveira, J.A.; Dolder, H.; Mendis-Handagama, S.C. (2011)

Histomorphometric evaluation of the neotropical brown brocket deer *Mazama gouazoubira* testis, with an emphasis on cell population indexes of spermatogenic yield. *Animal reproduction science*, n. 3-4, v.127, p.202-212.

Coutinho, P.E.; Corrêa, K.M. (1995) Polygyny in a free-ranging group of buffy-tufted-ear marmosets, *Callithrix aurita*. *Folia Primatologica*, n.65, v.1, p.25-29.

Dixson, A.F. (2012) *Primate Sexuality. Comparative Studies of Prosimians, Monkeys, Apes, and Humans*. 2ed. Oxford: Oxford University Press, 642p.

Dyce, K.M.; Sack, W.O.; Wensing, C.J. (2010) *Tratado de anatomia veterinária*. 4ed. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 856p.

Ewing, L.L.; Zirkin, B.R.; Cochran, R.C.; Kromann, N.; Peters, C.; Ruiz-Bravo, N. (1979) Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog, and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cell mass. *Endocrinology*, n.5, v.105, p.1135-1142.

Ferrari, S.F.; Digby, L.J. (1996) Wild *Callithrix* groups: stable extended families? *American Journal of Primatology*, n. 1, v. 38, p.19-27.

França, L.R.; Russell, L.D. (1998) The testis of domestic animals In: Regadera, J.M.G. (eds). *Male reproduction: A multidisciplinary overview*. Madrid: Churchill Livingstone. p.197-219.

Fujii-Hanamoto, H.; Matsubayashi, K.; Nakano, M.; Kusunoki, H.; Enomoto, T. (2011) A comparative study on testicular microstructure and relative sperm production in gorillas, chimpanzees, and orangutans. *American Journal of Primatology*, n.6, v.73, p.570-577.

Harcourt, A.H.; Harvey, P.H.; Larson, S.G.; Short, R.V. (1981) Testis weight, body weight and breeding system in primates. *Nature*, n.5827, v.293, p.55-57.

Harvey, P.H.; Harcourt, A.H. (1984) Sperm competition, testes size and breeding systems in primates. In: Smith, R.L. (ed). *Sperm competition and the evolution of animal mating systems*. New York: Academic Press. p.589-600.

Hodges, J.K.; Hearn, J.P. (1977) Effects of immunisation against luteinising hormone releasing hormone on reproduction of the marmoset monkey *Callithrix jacchus*. *Nature*, n.5596, v.265, p.746-747.

Johnson, L.; Petty, C.S.; Neaves, W.B. (1981) A new approach to qualification of spermatogenesis and its application to germinal cell attrition during human spermatogenesis. *Biology Reproduction*, v.25, p.217-226.

Junqueira, L.C.; Carneiro, J. (2011) Aparelho Reprodutor Masculino. In: Junqueira, L.C.; Carneiro, J. Histologia básica. 11ed. Rio de Janeiro: Guanabara, cap.21. p.414-430.

Karnovsky, M.J. (1965) A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. Journal of Cellular Biology, v.27, p.137-139.

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.

Leal, M.C.; França, L.R. (2006) The seminiferous epithelium cycle length in the black tufted-ear marmoset (*Callithrix penicillata*) is similar to humans. Biology of Reproduction, n.4, v.74, p.616-624.

Mascarenhas, R.M.; Paula, T.A.R.; Matta, S.L.P.; Lanna, L.L.E.; Fonseca, C.C.; Neves, M.T.D.D. (2006) Morfometria macro e microscópica e índices somáticos dos componentes testiculares de cães sem raça definida, da puberdade à senilidade. Ceres, n.305, v.53, p.113-119.

Morais, D.B.; Barbosa, L.P.; Melo, B.E.S.; Matta, S.L.P.; Neves, M.M.; Balarini, M.K.; Rodrigues, M.V. (2012) Microscopia e morfometria de componentes tubulares de testículos de coelhos suplementados com geleia real. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, n.4, v.64, p.810-816.

Morais, D.B.; Puga, L.C.H.P.; Paula, T.A.R.; Freitas, M.B.D.; Matta, S.L.P. (2017) The spermatogenic process of the common vampire bat *Desmodus rotundus* under a histomorphometric view. PloS one, n.3, v.12, p.1-18.

Muller, M.N.; Wrangham, R.W. (2004) Dominance, aggression and testosterone in wild chimpanzees: a test of the 'challenge hypothesis'. Animal Behaviour, n.1, v.67, p.113-123.

Nievergelt, C.M.; Digby, L.J.; Ramakrishnan, U.; Woodruff, D.S. (2000) Genetic analysis of group composition and breeding system in a wild common marmoset (*Callithrix jacchus*) population. International Journal of Primatology, n.1, v.21, p.1-20.

Paula, T.A.R. (1999) Avaliação histológica e funcional do testículo de capivaras adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Tese (Doutorado em Morfologia). Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 84p.

Russell, L.D. (1996) Mammalian Leydig cell structure. In: Payne, A.H.; Hardy, M.P.; Russell, L.D. (eds). The Leydig cell. Vienna: Cache River Press, cap. 3, p. 43-96.

Rylands, A.B.; Mendes, S.L. (2018) *Callithrix geoffroyi*. The IUCN Red List of Threatened Species 2018. e.T3572A17936610. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T3572A17936610.en>. Acessado em 26 de janeiro de 2019.

Rylands, A.B.; Coimbra-Filho, A.F.; Mittermeier, R.A. (1993) Systematics, geographic distribution, and some notes on the conservation status of the Callitrichidae. In: Rylands, A.B. (ed), Marmosets and tamarins: systematics, behaviour, and ecology, Oxford: Oxford University Press, p.11-77.

Rylands, A.B.; Mittermeier, R.A.; Silva, J.S. (2012) Neotropical primates: taxonomy and recently described species and subspecies. *International Zoo Yearbook*, n.46, p.11-24.

Souza, P.C.; Paula, T.A.R.; Natali, A.J.; Matta, S.L.P.; Costa, D.S.; Fonseca, C.C.; Sarti, P. (2005) Efeito do exercício crônico voluntário e do sedentarismo, com e sem o uso do esteróide anabólico nandrolona, sobre os componentes do parênquima testicular de ratos adultos. *Ceres*, n.300, v.52, p.305-316.

Stevenson, M.; Rylands, A.B. (1988) The marmosets, genus *Callithrix*. In: Mittermeier, R.A.; Rylands, A.B.; Coimbra-Filho, A.; Fonseca, G.A.B. (eds). *Ecology and behavior of Neotropical Primates*. Washington, DC: World Wildlife Fund, p.131-222.

Tingari, M.D.; Ramos, A.S.; Gaili, E.S.; Rahma, B.A.; Saad, A.H. (1984) Morphology of the testis of the one-humped camel in relation to reproductive activity. *Journal of Anatomy*, n.139, v.1, p.133-143.

Zhengwei, Y.; McLanchlan, R.I.; Bremner, W.J.; Wreford, N.G. (1997) Quantitative (stereological) study of normal spermatogenesis in the adult monkey (*Macaca fascicularis*). *Journal of Andrology*, n.6, v.18, p.681-687.

## MORFOFISIOLOGIA DO TECIDO INTERTUBULAR E DAS CÉLULAS DE LEYDIG DE *Callithrix geoffroyi* ADULTOS

### RESUMO

O compartimento intertubular do testículo é formado por tecido conjuntivo frouxo, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e diversos tipos celulares, como fibroblastos, células plasmáticas, linfócitos e, principalmente, células de Leydig. A organização quantitativa e o arranjo desses componentes no tecido intertubular é bem variável entre as espécies. Deste modo, o objetivo desta pesquisa foi descrever o arranjo histológico do tecido intertubular de saguis-da-cara-branca, *Callithrix geoffroyi*, a partir da quantificação dos diferentes componentes desse tecido e da caracterização das células de Leydig. Para tal, foram utilizados fragmentos testiculares de cinco animais adultos de vida livre para confecção e análise de lâminas histológicas. Grande parte do tecido intertubular do testículo dos animais estudados é constituído por tecido conjuntivo (79,26%), e o restante por células de Leydig (11,5%), vasos sanguíneos (7,59%) e linfáticos (1,65%). O intertúbulo desses indivíduos apresentou organização tipo II de Fawcett et al. (1973), similar ao descrito para humanos e macacos rhesus. Os saguis-da-cara-branca estudados apresentaram também 7,28 µm de diâmetro nuclear médio, volume médio individual de célula de Leydig de 916,32 µm<sup>3</sup>, número de células de Leydig por grama de testículo de 13,7x10<sup>6</sup> e por testículo de 4x10<sup>6</sup>, e índice leydigossomático (ILS) de 0,0017%. De modo geral, os valores apresentados pelos animais de estudo para os parâmetros morfométricos quantitativos de células de Leydig são próximos aos descritos para o *C. penicillata*, porém seu ILS está abaixo do descrito para esta e outras espécies de mamíferos. Um valor mais baixo de ILS não implica necessariamente que sua produção de testosterona seja baixa, uma vez que as poucas células de Leydig existentes no testículo dessa espécie podem ser altamente produtivas.

### INTRODUÇÃO

Os primatas do gênero *Callithrix* são nativos da região centro-leste do Brasil, sendo o *Callithrix jacchus* naturalmente encontrado na Caatinga, o *Callithrix penicillata* naturalmente encontrado no Cerrado, e os *Callithrix kuhlii*, *Callithrix geoffroyi*, *Callithrix aurita* e *Callithrix flaviceps* nativos da Mata Atlântica (Rylands et al., 2009). Historicamente, essas espécies eram isoladas uma das outras por barreiras físicas, como grandes rios e cadeias montanhosas, o que impedia o contato entre elas, entretanto, o isolamento que existia entre essas espécies foi rompido por interferência humana,

principalmente através da introdução de espécies fora de sua área de ocorrência natural (Rylands et al., 1996; Silva et al., 2018). Apesar de cada espécie de *Callithrix* apresentar características morfométricas, padrão de coloração da pelagem e vocalização únicas, isso não impede que indivíduos de diferentes espécies dentro desse gênero se reconheçam como parceiros reprodutivos, ocorrendo desse modo eventos de hibridação (Mendes et al., 2009; Fuzessy et al., 2014).

De acordo com diferentes autores, o sistema de acasalamento dos animais desse gênero pode variar de monogamia e poliginia (*single-male*) à poliandria (*multi-male*) (Abbott, 1984; Stevenson e Rylands, 1988; Coutinho e Corrêa, 1995; Ferrari e Digby, 1996; Nievergelt et al., 2000). Segundo Kenagy e Trombulak (1986), em estudo realizado com diferentes espécies de mamíferos, existe uma correlação entre os diferentes tipos de sistemas de acasalamento e o investimento corporal em massa testicular e, uma vez que a produção espermática está altamente correlacionada com peso testicular (Amann, 1970; França e Russell, 1998), espécies com comportamento tipo *single-male* (monogamia e poliginia) tendem a apresentar menor investimento corporal em gônada, uma vez que a competição para a produção de progênie ocorre no acesso à fêmea, enquanto que em espécies com comportamento tipo *multi-male* (promiscuidade e poliandria) é esperado um maior investimento corporal em massa testicular, visto que a competição pela progênie ocorre diretamente no interior dos órgãos genitais femininos (Kenagy e Trombulak, 1986).

Se por um lado é esperado que espécies tipo *single-male* apresentem baixa produção espermática (Kenagy e Trombulak, 1986; Firman et al., 2015), por outro lado espera-se que sua produção de andrógenos seja alta, uma vez que estes são responsabilizados pelo aumento de comportamentos agressivos, e a maior agressividade favorece o acesso à fêmea durante disputas entre machos por parceiras reprodutivas (Cavigelli e Pereira, 2000; Muller e Wrangham, 2004).

A produção de testosterona é realizada pelas células de Leydig que estão alocadas no interior do compartimento intertubular do testículo (Amann e Schanbacher, 1983; Russell, 1996). Esse compartimento é formado também por tecido conjuntivo frouxo, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e diversos outros tipos celulares, como fibroblastos, células plasmáticas, linfócitos e mastócitos (Hooker, 1970; Weinbauer et al., 2010). A organização quantitativa e o arranjo desses componentes no intertúbulo é bem variável interespecificamente e foi classificada em diferentes padrões por Fawcett et al. (1973), porém a correlação destes padrões com a produtividade, o armazenamento e o transporte

da testosterona ainda não é totalmente esclarecida. Segundo Zirkin et al. (1980) há também uma grande variação fisiológica individual na produtividade de testosterona pela célula de Leydig, estes autores relacionam a composição citoplasmática como sendo uma característica produtiva mais relevante que simplesmente a sua proporção volumétrica testicular.

O *C. geoffroyi* é uma das espécies de primatas que apresenta menor investimento corporal em massa testicular, mais especificamente em túbulos seminíferos, indicando, portanto, uma baixa produção espermática, o que condiz com a estratégia de acasalamento tipo *single-male* (Silva et al., *in prep.*), porém este mesmo estudo indica que a relação intertubulossomática dessa espécie também é baixa. Sendo assim, o objetivo desta pesquisa foi descrever o arranjo histológico do tecido intertubular de saguis-da-cara-branca, *Callithrix geoffroyi*, a partir da quantificação dos diferentes componentes desse tecido e da caracterização das células de Leydig.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Os procedimentos realizados tiveram aprovação da Comissão de Ética no Uso Animal da Universidade Federal de Viçosa (CEUA-UFV), protocolo n° 70/2015, e do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (SISBIO - IBAMA), licença n° 50717-1. As capturas dos animais e coletas de material ocorreram nos meses de outubro e novembro de 2015.

O presente trabalho utilizou amostra testicular de cinco saguis-da-cara-branca (*Callithrix geoffroyi*) adultos de vida livre que foram capturados em grupos de animais já habituados à presença humana nos municípios de Cariacica e Vila Velha, Espírito Santo, Brasil. Os animais foram capturados com o auxílio de armadilhas iscadas com pedaços de banana. Sendo, posteriormente, anestesiados com quetamina (10 mg/kg) e xilazina (0,5 mg/kg) (Carpenter, 2005); pesados em balança digital; mensurados com paquímetro digital (Starfer®) quanto ao comprimento, largura e espessura dos testículos. A espessura de uma prega dupla de pele do escroto foi ainda mensurada.

Um dos testículos foi coletado através de cirurgia de hemicastração. A técnica cirúrgica utilizada foi baseada nos procedimentos realizados em animais domésticos, com a incisão cirúrgica realizada na região inguinal pré-púbica, remoção do testículo e epidídimo em técnica aberta com ligadura pedicular com fio de nylon 3-0 e sutura de pele com ponto U deitado separado com fio de nylon 3-0. Como medidas profiláticas pós-operatórias, os animais receberam antibiótico (oxitetraciclina, 10 mg/kg) e anti-

inflamatório (meloxicam, 0,2 mg/kg). Os animais foram soltos próximos ao local de captura após a completa recuperação dos efeitos anestésicos.

Após a coleta, e antes de serem imersos em solução fixadora de Karnovsky (Karnovsky, 1965), os testículos tiveram a albugínea perfurada em diversos pontos com o uso de uma agulha hipodérmica com o objetivo de melhorar a perfusão do fixador. Posteriormente, os testículos foram seccionados longitudinalmente e mantidos em solução de Karnovsky por 24 horas. Após este período o material foi transferido e armazenado em álcool 70% até o momento do processamento histológico.

O volume dos testículos foi calculado através de suas dimensões a partir da fórmula do volume do elipsoide:  $\frac{4}{3} \pi ABC$ , onde A = metade da largura, B = metade da espessura, C = metade do comprimento, como as mensurações foram realizadas percutaneamente foi descontada das dimensões testiculares o valor relativo à espessura de uma prega de pele escrotal (Mascarenhas et al., 2006; Araujo et al., 2013). E, uma vez que a densidade volumétrica do tecido testicular de mamíferos é aproximadamente 1g/mL, o volume testicular foi considerado igual ao peso testicular (Johnson et al., 1981).

Foi considerado como peso líquido testicular o volume testicular descontado o volume da albugínea (Bringel et al., 2013). Para tal, foi calculada a espessura média da albugínea, por meio de mensuração em três pontos distintos com o uso de um paquímetro digital (Starfer<sup>®</sup>), e este valor descontado das mensurações testiculares, obtendo assim o volume líquido testicular.

Retirou-se um fragmento de cada testículo coletado, e estes foram submetidos à desidratação em série crescente de álcoois (70, 80, 90% e absoluto) e incluídos em resina de metacrilato (Leica Historessin<sup>®</sup>). Posteriormente, foram realizados cortes histológicos de 3µm de espessura, em micrótomo rotativo com navalha de vidro, para a confecção de lâminas histológicas, as quais foram coradas com azul de toluidina / borato de sódio 1%, e montadas com lamínulas de vidro com o uso de resina (Entelan<sup>®</sup>).

Para o cálculo da proporção volumétrica de cada componente do parênquima testicular foram fotografados, em imagens digitais com o auxílio de um fotomicroscópio (Motic BA410) equipado com câmera digital Moticom Pro 252B, 20 campos aleatórios do parênquima testicular com aumento de 400x e por meio do programa Microsoft Office Power Point<sup>®</sup> foram sobrepostas grades com 500 pontos em cada imagem. Posteriormente, foram contabilizados pontos coincidentes sobre o compartimento tubular e sobre o compartimento intertubular (células de Leydig, vasos sanguíneos, vasos

linfáticos e tecido conjuntivo). Desse modo pôde-se inferir suas proporções volumétricas ao peso calculado para o parênquima testicular obtendo-se assim os valores relativos aos seus volumes no testículo.

O diâmetro médio dos núcleos das células de Leydig foi obtido através da mensuração do diâmetro de 20 células diferentes, por animal, em aumento de 1000x, sendo selecionadas as células que possuíam melhor contorno nuclear e nucléolo evidente. Para o cálculo do volume nuclear das células de Leydig foi utilizado a fórmula do volume da esfera ( $\frac{4}{3}\pi r^3$ , onde r = metade do diâmetro nuclear). Pela razão núcleo/citoplasma, calculou-se o volume do citoplasma e conseqüentemente o volume de uma célula de Leydig. Inferindo-se o volume de uma célula pelo volume total de células de Leydig, calculou-se o número destas células por testículo, e dividindo-se pela massa testicular, obteve-se o seu número por grama de testículo (Sarti et al., 2011). O índice leydigossomático (ILS) foi calculado a partir do volume total de células de Leydig e do peso corporal, através da fórmula:  $ILS = (\text{peso de células de Leydig} / \text{peso corporal}) \times 100$  (Mascarenhas et al., 2006; Sarti et al., 2011; Morais et al., 2017).

Os dados obtidos para o *Callithrix geoffroyi* foram analisados segundo estatística descritiva quanto à média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV).

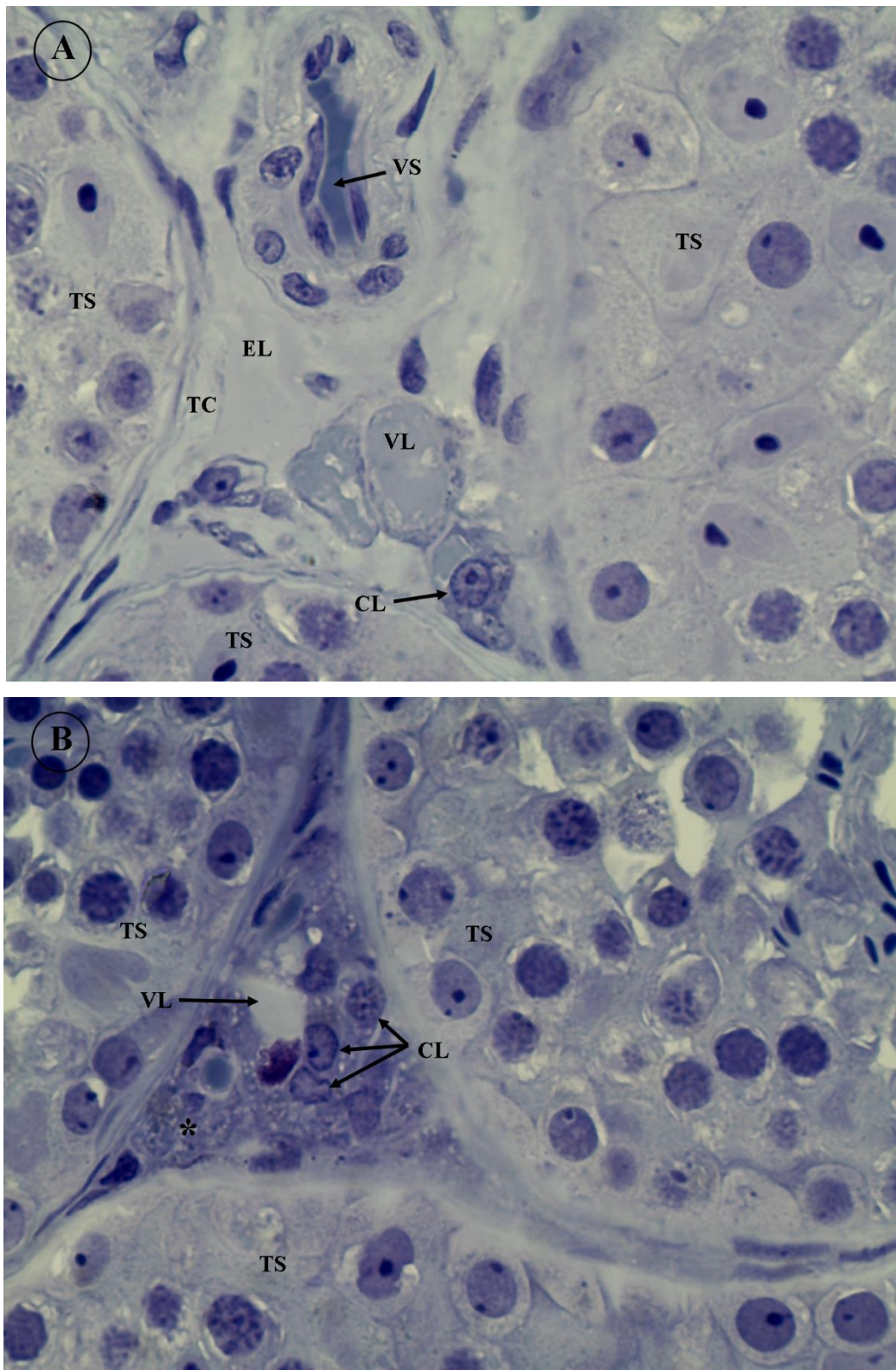
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O compartimento intertubular do testículo dos saguis-da-cara-branca estudados ocupa cerca de 10% do volume líquido testicular, enquanto o compartimento tubular ocupa aproximadamente 90%. Grande parte de seu tecido intertubular é constituído por tecido conjuntivo (79,26%), e o restante é composto por células de Leydig (11,5%), vasos sanguíneos (7,59%) e linfáticos (1,65%).

O tecido conjuntivo frouxo é responsável pelo estabelecimento e manutenção da estrutura física do parênquima testicular, e graças a sua composição flexível ele é capaz de suportar pressão e manter-se edemaciado (Fawcett et al., 1973; Junqueira e Carneiro, 2011). Segundo Sharpe (1994), um edema tecidual é fisiologicamente observado no tecido intertubular em mamíferos, sendo este imprescindível para a manutenção local de altos níveis da testosterona produzidos pelas células de Leydig e requeridos no processo espermatogênico, por outro lado, é necessário ainda a manutenção regular de concentrações séricas de testosterona, indispensável para as características sexuais secundárias espécie-específicas.

Os componentes do compartimento intertubular do testículo são os mesmos entre as diferentes espécies de mamíferos, entretanto eles estão organizados em diferentes arranjos quanto a proporção de células de Leydig, vasos linfáticos e tecido conjuntivo (Fawcett et al.,1973; Russell, 1996). Os mamíferos geralmente seguem três padrões distintos de organização do intertubulo: no arranjo do tipo I existem extensos espaços linfáticos, uma pequena proporção de células de Leydig e pouco tecido conjuntivo; no arranjo tipo II existem grupos de células de Leydig espalhados em um vasto tecido conjuntivo frouxo, com capilares sanguíneos e vasos linfáticos localizados centralmente; e no arranjo tipo III existem grandes quantidades de células de Leydig que ocupam quase todo compartimento intertubular, apresentando também pouco tecido conjuntivo e vasos linfáticos (Fawcett et al.,1973).

Grande parte do intertubulo testicular dos saguis-da-cara-branca estudados apresenta uma organização do tipo II, semelhante ao descrito para humanos por Fawcett et al. (1973), com áreas intertubulares espaçosas contendo abundante tecido conjuntivo frouxo edematoso, presença de linfáticos, vasos sanguíneos e pequenos grupos de células de Leydig (Figura 1A), porém, em algumas regiões deste espaço (em torno de 20%) o arranjo observado, embora ainda com característica do padrão tipo II, é mais similar ao retratado para o macaco rhesus (Fawcett et al., 1973), com áreas menos espaçosas, tecido conjuntivo frouxo pouco evidente, presença de linfáticos e células de Leydig, isoladas ou em aglomerados, contendo numerosas gotículas lipídicas (Figura 1B).



**Figura 1:** (A) e (B) Corte transversal de testículo de *Callithrix geoffroyi* adultos, com destaque para os (TS) túbulos seminíferos e os componentes do compartimento intertubular: tecido conjuntivo (TC), espaço linfático (EL), vaso sanguíneo (VS), vaso linfático (VL), célula de Leydig (CL) e gotículas lipídicas presentes no citoplasma das células de Leydig (\*). Coloração azul de toluidina, objetiva 100x.

A proporção de células de Leydig no parênquima testicular, assim como diâmetro nuclear da célula de Leydig, o volume celular, o número de células no testículo e por grama de testículo e o índice leydigossomático estão apresentados na tabela 1.

**Tabela 1:** Proporção de células de Leydig, diâmetro nuclear de células de Leydig, volume de célula de Leydig, número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo e índice leydigossomático de *Callithrix geoffroyi* adultos.

<b>Parâmetros de células de Leydig</b>	<b>Média ± DP</b>	<b>CV (%)</b>
Proporção células no testículo (%)	1,14 ± 0,45	39,50
Proporção núcleo células de Leydig (%)	0,27 ± 0,12	44,90
Proporção citoplasma células de Leydig (%)	0,87 ± 0,37	42,42
Diâmetro nuclear (µm )	7,28 ± 0,26	3,58
Volume da célula (µm <sup>3</sup> )	916,32 ± 285,30	31,13
Volume nuclear (µm <sup>3</sup> )	202,88 ± 22,10	10,89
Volume citoplasma (µm <sup>3</sup> )	713,44 ± 276,71	38,78
Nº células por testículo (x10 <sup>6</sup> )	4 ± 1,81	45,17
Nº células por grama testículo (x10 <sup>6</sup> )	13,7 ± 6,28	45,75
Índice leydigossomático (%)	0,0017 ± 0,0005	30,16

DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação

O diâmetro nuclear é usado para se calcular o volume nuclear da célula de Leydig e, conhecendo-se a proporção núcleo-citoplasma desta célula, pode-se estimar também o seu volume celular, os valores desses parâmetros apresentam grande variação interespecífica. No presente trabalho, o *C. geoffroyi* apresentou 7,28 µm de diâmetro nuclear médio, o que permitiu a estimativa de um de volume médio individual de célula de Leydig de 916,32 µm<sup>3</sup> (Tabela 1), ao passo que no *C. penicillata* é descrito, respectivamente, valores médios de 8,6 µm e 1416 µm<sup>3</sup> (Leal e França, 2006). Curiosamente valores se aproximam aos observados em jaguatirica (*Leopardus pardalis*), 8,48 µm e 913,39 µm<sup>3</sup>, respectivamente (Sarti et al., 2011). Já no morcego (*Desmodus rotundus*) o diâmetro médio nuclear é muito maior (20,31 µm), porém com volume celular semelhante (1053,88 µm<sup>3</sup>) (Morais et al., 2017).

Os níveis de andrógenos em uma determinada espécie são determinados por inúmeros requerimentos fisiológicos, dentre eles os comportamentos social e reprodutivo são extremamente relevantes (McDonnell, 1995; Cavigelli e Pereira, 2000). Espécies com sistemas de acasalamento que necessitam de maior interação agonística na disputa de acesso reprodutivo à fêmea exigem maiores investimentos androgênicos em relação

àqueles sistemas em que há apenas competição espermática no interior do trato genital feminino (Moreira et al., 1997; Muller e Wrangham, 2004). No primeiro caso, esse maior investimento androgênico pode-se apresentar sob diferentes aspectos espécie-específicos, por exemplo, na capivara a proporção volumétrica testicular de células de Leydig é a maior já registrada em mamíferos (Costa e Paula, 2006; Paula et al., 2007), por outro lado Ewing et al. (1979) implicam a capacidade produtiva individual da célula de Leydig como sendo mais relevante do que o seu volume celular total no testículo. Neste sentido, Zirkin et al. (1980) correlacionam altamente a produção androgênica à quantidade de retículo endoplasmático liso presente no citoplasma das células de Leydig.

O número de células de Leydig por grama de testículo encontrado para os indivíduos de *C. geoffroyi* estudados ( $13,7 \times 10^6$ ) é similar ao descrito por Leal e França (2006) para o *C. penicillata* ( $13,9 \times 10^6$ ). Por outro lado, o seu valor de ILS (0,0017%) é um dos menores valores já descritos para mamíferos, independente do sistema de acasalamento adotado, por exemplo, em *C. penicillata*, espécie monogâmica, esse índice é 0,0072% (Leal e França, 2006), em *Hydrochoerus hydrochaeris*, espécie poligínica, é 0,0411% (Paula et al., 2007) e em *Desmodus rotundus*, espécie promíscua, é 0,015% (Morais et al., 2017). Mesmo que o *C. geoffroyi* apresente valores mais baixos de ILS que outras espécies de mamíferos, isso não implica necessariamente que sua produção de testosterona seja baixa, uma vez que as poucas células de Leydig existentes no testículo dessa espécie podem ser altamente produtivas.

## CONCLUSÃO

A organização dos componentes do intertúbulo testicular dos indivíduos de *C. geoffroyi* estudados se assemelha ao padrão tipo II descrito por Fawcett et al. (1973), que é também descrito para outras espécies de primatas. E, de modo geral, os valores encontrados para os parâmetros morfométricos quantitativos de células de Leydig para os animais estudados são próximos aos descritos para o *C. penicillata*, porém seu ILS está abaixo do descrito para esta e outras espécies de mamíferos.

## REFERENCIA

Abbott, D.H. (1984) Behavioral and physiological suppression of fertility in subordinate marmoset monkeys. *American Journal of Primatology*, v.6, n.3, p.169-186.

Amann R.P.; Schanbacher B.D. (1983) Physiology of male reproduction. *Journal of Animal Science*, v. 57, n.2, p.380-403.

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.

Araujo, G.R.; Paula, T.A.R.; Deco-Souza, T.; Garay, R.M.; Bergo, L.C.F.; Silva, L.C.; Csermak Júnior, A.C.; Ferrer, J.B.S.; Barros, J.B.G. (2013) Criptorquidismo em jaguatirica de vida livre capturada no Parque Estadual do Rio Doce, Brasil. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, n.65, v.1, p.1-5.

Bringel, S.S., Amorim Júnior, A.A., Amorim, M.J.A.A.L., Brito, L.T., Morais, R.N., Torres, S.M., Tenorio, M.M., Silva Junior, V.A. (2013) Endocrine and testicular changes induced by olanzapine in adult Wistar rats. Journal of Applied Toxicology, n. 33, v.1, p.24-31.

Carpenter, J.W. (2005) Exotic animal formulary. Elsevier Saunders, 3ed. 564p.

Cavigelli, S.A.; Pereira, M.E. (2000) Mating season aggression and fecal testosterone levels in male ring-tailed lemurs (*Lemur catta*). Hormones and Behavior, n.3, v.37, p.246-255.

Costa, D.S.; Paula, T.A.R. (2006) Testosterone level, nasal gland volume and Leydig cell morphometry in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.58, n.6, p.1086-1091.

Coutinho, P.E.; Corrêa, K.M. (1995) Polygyny in a free-ranging group of buffy-tufted-ear marmosets, *Callithrix aurita*. Folia primatologica, n.65, v.1, p.25-29.

Ewing, L.L.; Zirkin, B.R.; Cochran, R.C.; Kromann, N.; Peters, C.; Ruiz-Bravo, N. (1979) Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog, and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cell mass. Endocrinology, n.5, v.105, p.1135-1142.

Fawcett, D.W.; Neaves, W.B.; Flores, M.N. (1973) Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. Biology of Reproduction, v.9, n.5, p.500-532.

Ferrari, S.F.; Digby, L.J. (1996) Wild *Callithrix* groups: stable extended families? American Journal of Primatology, n. 1, v. 38, p.19-27.

Firman, R.C.; Garcia-Gonzalez, F.; Thyer, E.; Wheeler, S.; Yamin, Z.; Yuan, M., Simmons, L.W. (2015) Evolutionary change in testes tissue composition among experimental populations of house mice. Evolution, v.69, n.3, p.848-855.

França, L.R.; Russell, L.D. (1998) The testis of domestic animals In: Regadera, J.M.G. (eds). Male reproduction: A multidisciplinary overview. Madrid: Churchill Livingstone. p.197-219.

Fuzessy, L.F.; Silva, I.O.; Malukiewicz, J.; Silva, J.; Pônzio, M.C.; Boere, V.; Ackermann, R. R. (2014) Morphological variation in wild marmosets (*C. penicillata* and *C. geoffroyi*) and their hybrids. *Evolution. Biology*, v.41, n.3, p.480–493.

Hooker, C.W. (1970) The intertubular tissue of the testis. In: Johnson, A.D.; Gomes, W.R.; Vandermark, N.L. (eds) *The testis: development, anatomy, and physiology*. New York and London: Academic Press, v.1, cap.8, p.483-550.

Johnson, L., Thompson Jr, D.L. (1986) Seasonal variation in the total volume of Leydig cells in stallions is explained by variation in cell number rather than cell size. *Biology of reproduction*, v.35, n.4, p.971-979.

Johnson, L.; Petty, C.S.; Neaves, W.B. (1981) A new approach to qualification of spermatogenesis and its application to germinal cell attrition during human spermatogenesis. *Biology Reproduction*, v.25, p.217–226.

Junqueira, L.C.; Carneiro, J. (2011) *Aparelho Reprodutor Masculino*. In: Junqueira, L.C.; Carneiro, J. *Histologia básica*. 11ed. Rio de Janeiro: Guanabara, cap.21. p.414-430.

Karnovsky, M.J. (1965) A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of cellular Biology*, v.27, p.137-139.

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.

Leal, M.C.; França, L.R. (2006) The seminiferous epithelium cycle length in the black tufted-ear marmoset (*Callithrix penicillata*) is similar to humans. *Biology of reproduction*, n.4, v.74, p.616-624.

McDonnell, S.M. (1995) Stallion behavior and endocrinology: what do we really know? In *Proc Amer Assoc Equi Pract*, v.4, p.18–29.

Mascarenhas, R.M.; Paula, T.A.R.; Matta, S.L.P.; Lanna, L.L.E.; Fonseca, C.C.; Neves, M.T.D.D. (2006) Morfometria macro e microscópica e índices somáticos dos componentes testiculares de cães sem raça definida, da puberdade à senilidade. *Ceres*, n.305, v.53, p.113-119.

Mendes, S.L.; Vielliard, J.M.E.; Marco Jr, P. (2009) The vocal identity of the *Callithrix* species (Primates, Callitrichidae). In: Ford, S.M.; Porter, L.M.; Davis, L.C. (eds). *The Smallest Anthropoids: The Marmoset/Callimico Radiation*. Boston: Springer, p.63-84.

Morais, D.B.; Barbosa, L.P.; Melo, B.E.S.; Matta, S.L.P.; Neves, M.M.; Balarini, M.K.; Rodrigues, M.V. (2012) Microscopia e morfometria de componentes tubulares de

testículos de coelhos suplementados com geleia real. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, n.4, v.64, p.810-816.

Moreira, J.R.; Macdonald, D.W.; Clarke, J.R. (1997) Correlates of testis mass in capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*): dominance assurance or sperm production? Journal of Zoology, v.241, n.3, p.457-463.

Muller, M.N.; Wrangham, R.W. (2004) Dominance, aggression and testosterone in wild chimpanzees: a test of the 'challenge hypothesis'. Animal Behaviour, n.1, v.67, p.113-123.

Nievergelt, C.M.; Digby, L.J.; Ramakrishnan, U.; Woodruff, D.S. (2000) Genetic analysis of group composition and breeding system in a wild common marmoset (*Callithrix jacchus*) population. International Journal of Primatology, n.1, v.21, p.1-20.

Paula, T.A.R.; Matta, S.L.P.; Silva Jr, V.A.D.; Costa, D.S.; Fonseca, C.C.; Neves, M.T.D.D. (2007) Interbular space characterization in adult capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) testis. Brazilian Archives of Biology and Technology, v.50, n.2, p.289-297.

Russell, L.D. (1996) Mammalian Leydig cell structure. In: Payne, A.H.; Hardy, M.P.; Russell, L.D. (eds). The Leydig cell. Vienna: Cache River Press, cap. 3, p. 43-96.

Rylands, A.B.; Coimbra-Filho, A.F.; Mittermeier, R.A. (2009) The Systematics and Distributions of the Marmosets (*Callithrix*, *Callibella*, *Cebuella*, and *Mico*) and Callimico (*Callimico*) (Callitrichidae, Primates). In: Ford, S.M.; Porter, L.M.; Davis, L.C. (eds). The Smallest Anthropoids: The Marmoset/Callimico Radiation. Springer, p.25-61.

Rylands, A.B.; da Fonseca, G.A.B.; Leite, Y.L.R.; Mittermeier, R.A. (1996) Primates of the Atlantic Forest: origin, distributions, endemism, and communities. In: Norconk, M.A.; Rosenberger, A.L.; Garber, P.A. (eds.) Adaptive Radiations of Neotropical Primates, New York: Plenum Press, p.21-51.

Sarti, P.; Paula, T.A.R.; Polli, G.O.; Souza, T.D.; 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.

Sharpe, R.M. (1994) Regulation of spermatogenesis. In: Knobil, E.; Neil, J.D. (eds) The physiology of reproduction, New York: Raven Press, p.1363-1434.

Silva, F.F.R.; Malukiewicz, J.; Silva, L.C.; Carvalho, R.S.; Ruiz-Miranda, C.R.; Coelho, F.A.S.; Figueira, M.P.; Boere, V.; Silva, I.O. (2018) A Survey of Wild and Introduced Marmosets (*Callithrix*: Callitrichidae) in the Southern and Eastern Portions of the State of Minas Gerais, Brazil. Primate Conservation, n.32, p.1-18.

Silva, F.F.R.; Paula, T.A.R.; Silva, V.H.D.; Figueira, M.P.; Silva, L.C.; Zerlotini, M.F. (in prep.) Morfometria testicular e dos túbulos seminíferos de saguis-da-cara-branca (*Callithrix geoffroyi*) adultos.

Stevenson, M.; Rylands, A.B. (1988) The marmosets, genus *Callithrix*. In: Mittermeier, R.A.; Rylands, A.B.; Coimbra-Filho, A.; Fonseca, G.A.B. (eds). Ecology and behavior of Neotropical Primates. Washington, DC: World Wildlife Fund, p.131-222.

Weinbauer, G.F.; Luetjens, C.M.; Simoni, M.; Nieschlag, E. (2010) Physiology of testicular function. *Andrology*. Springer Berlin Heidelberg, p.11-59.

Zirkin B.R, Ewing L.L.; Kromann N.; Cochran R.C.; (1980) Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog, and hamster testes perfused in vitro: Correlation with Leydig cell ultrastructure. *Endocrinology*, v.107, n.6, p.1867-1874.

# RENDIMENTO INTRÍNSECO DO PROCESSO ESPERMATOGÊNICO E ÍNDICES DE CÉLULAS DE SERTOLI EM SAGUIS-DA-CARA-BRANCA,

*Callithrix geoffroyi*

## RESUMO

O conhecimento sobre a biologia reprodutiva das espécies tem importante papel em trabalhos de reprodução com foco conservacionista, entretanto essas informações são escassas para muitas espécies, como é o caso de diversos primatas, dentre eles o *Callithrix geoffroyi*. A quantificação histológica testicular é importante para o entendimento da biologia reprodutiva de uma espécie. Em adição, o conhecimento da cinética do epitélio seminífero é uma estratégia de avaliação da capacidade espermatogênica, que pode ser realizada a partir da quantificação das células germinativas em diferentes fases de desenvolvimento ao longo do ciclo do epitélio seminífero, desse modo, o objetivo desta pesquisa foi descrever e quantificar, para o *C. geoffroyi*, os rendimentos intrínsecos da espermatogênese, assim como os índices de capacidade suporte das células de Sertoli e as reservas espermáticas testiculares. Para tal, utilizou-se fragmentos testiculares de cinco animais adultos para confecção e análise de lâminas histológicas. O rendimento geral da espermatogênese dos animais estudados foi de 4,7%, ou seja, ao longo do processo 95,3% do seu potencial de produção foi eliminado ou deixou de ser produzido. A capacidade de suporte das células de Sertoli foi semelhante ao descrito para outras espécies de *Callithrix*, porém apresentou uma baixa reserva espermática por grama de testículo. De modo geral, os animais estudados apresentaram reduzido investimento produtivo, o que condiz com o sistema de acasalamento tipo *single-male* (monogamia e poliginia), visto que nesta estratégia reprodutiva a competição pela prole ocorre no acesso à fêmea e não através de competição espermática no interior dos órgãos genitais femininos.

## INTRODUÇÃO

Os primatas neotropicais compõem um grupo de mamíferos muito abundante e diversificado (Rylands et al., 2012), sendo que para diversas espécies poucas informações sobre aspectos relacionado à biologia reprodutiva, e mais especificamente ao processo espermatogênico, são encontradas na literatura científica. Este é o caso do sagui-da-cara-branca, *Callithrix geoffroyi*, um dos menores primatas endêmicos da Mata Atlântica brasileira, que é naturalmente encontrado nos estados do Espírito Santo, Bahia e Minas Gerais (Rylands et al., 1993; Rylands e Mendes, 2018).

O conhecimento a respeito da cinética do epitélio seminífero, assim como da morfometria testicular fornecem informações importantes para o entendimento da biologia reprodutiva de uma determinada espécie (Kenagy e Trombulak, 1986; Azevedo et al., 2010). A quantificação histológica do testículo é um instrumento importante de avaliação da capacidade espermatogênica de mamíferos tanto em condições normais como experimentais (Morais et al., 2012), no entanto para que isso ocorra é necessário o conhecimento básico da cinética do processo espermatogênico e o entendimento do ciclo do epitélio seminífero (Castro et al., 1997).

A produção espermática é uma atividade fisiologicamente dispendiosa para o organismo, porém a alta produção de espermatozoides, antes que um gasto energético demasiado, pode ser uma vantagem reprodutiva estratégica (Firman et al., 2013; Firman et al., 2015). Em animais com sistemas de acasalamento do tipo *multi-male* (promiscuidade e poliandria), ocorrem uma intensa competição espermática no interior dos órgãos reprodutivos da fêmea, sendo assim, é favorecida a seleção de indivíduos com maior produção de espermatozoides (Firman e Simmons, 2011; Firman et al., 2013), por outro lado em sistemas de acasalamento do tipo *single-male* (monogamia e poliginia), a principal vantagem seletiva é decorrente da capacidade de acesso exclusivo à fêmea, uma vez que ocorre pouca ou nenhuma competição espermática no interior da fêmea (Firman et al., 2013).

A quantificação das células germinativas em suas diferentes fases de desenvolvimento é usualmente empregada no estudo da dinâmica espermatogênica, uma vez que permitem estimar a eficiência das diferentes etapas deste processo (Russell et al., 1990; Castro et al., 1997). A ocorrência de degenerações e mortes celulares durante o processo espermatogênico é um fenômeno natural, ou seja, durante as suas etapas de desenvolvimento nunca é atingido uma eficiência total (França e Russell, 1998). As células de Sertoli são as únicas células somáticas observadas no epitélio seminífero sendo encarregadas da sustentação, da nutrição e da organização das células germinativas ao longo do epitélio seminífero, e com ação direta no controle da sua viabilidade (Russell et al., 1990; França et al., 2016).

Dentro do gênero *Callithrix*, o *C. geoffroyi* é uma das espécies que apresenta menor investimento corporal em massa testicular, mais especificamente em túbulos seminíferos, o que é compatível com a sua estratégia de acasalamento tipo *single-male* (Silva, 2019), neste sentido o objetivo desta pesquisa foi descrever e quantificar para o sagui-da-cara-branca, *C. geoffroyi*, os rendimentos intrínsecos da espermatogênese, os

índices de capacidade suporte de células de Sertoli, e as reservas espermáticas testiculares.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos realizados tiveram aprovação da Comissão de Ética no Uso Animal da Universidade Federal de Viçosa (CEUA-UFV), protocolo n° 70/2015, e do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (SISBIO - IBAMA), licença n° 50717. As capturas dos animais e coletas de material ocorreram nos meses de outubro e novembro de 2015.

Foram capturados cinco saguis-da-cara-branca (*Callithrix geoffroyi*) adultos de vida livre nos municípios de Cariacica e Vila Velha, Espírito Santo, Brasil. Após a captura os animais foram então anestesiados com quetamina (10 mg/kg) e xilazina (0,5 mg/kg) (Carpenter, 2005) e os testículos foram medidos com paquímetro digital (Starfer®) quanto ao comprimento, largura e espessura. A espessura de uma prega dupla de pele do escroto foi ainda mensurada. Desse modo, o volume dos testículos pode ser calculado através da fórmula do volume do elipsoide:  $\frac{4}{3} \pi ABC$ , onde A = metade da largura, B = metade da espessura, C = metade do comprimento. Como as mensurações foram realizadas percutaneamente foi descontada das dimensões testiculares o valor relativo à espessura de uma prega de pele escrotal (Mascarenhas et al., 2006; Araujo et al., 2013).

Uma vez que a densidade volumétrica do tecido testicular de mamíferos é aproximadamente 1 g/mL, o volume testicular foi considerado igual ao peso testicular (Johnson et al., 1981). Foi considerado como peso líquido testicular o volume testicular descontado o volume da albugínea (Bringel et al., 2013). Para tal, foi calculada a espessura média da albugínea, por meio de mensuração em três pontos distintos com o uso de um paquímetro digital (Starfer®), e este valor descontado das mensurações testiculares, obtendo assim o volume líquido testicular.

Coletou-se um testículo de cada animal através de cirurgia de hemicastração. A técnica cirúrgica utilizada foi baseada nos procedimentos utilizados em animais domésticos, com a incisão cirúrgica realizada na região inguinal pré-púbica, remoção do testículo e epidídimo em técnica aberta com ligadura pedicular com fio de nylon 3-0 e sutura de pele com ponto U deitado separado com fio de nylon 3-0. Como medidas profiláticas pós-operatórias, os animais receberam antibiótico (oxitetraciclina, 10 mg/kg)

e anti-inflamatório (meloxicam, 0,2 mg/kg). Os animais foram soltos próximos ao local de captura após a completa recuperação dos efeitos anestésicos.

Após a coleta, os testículos foram mantidos em solução fixadora de Karnovsky (Karnovsky, 1965) por 24 horas, sendo posteriormente transferidos e armazenados em álcool 70%. Para o processamento histológico foi retirado um fragmento de cada um dos testículos coletados, e esses foram submetidos à desidratação em série crescente de álcoois (70, 80, 90% e absoluto) e incluídos em resina de metacrilato (Leica Historesin<sup>®</sup>). Posteriormente, foram realizados cortes histológicos de 3µm de espessura, em micrótomo rotativo com navalha de vidro, para a confecção de lâminas histológicas, as quais foram coradas com azul de toluidina / borato de sódio 1%, e montadas com lamínulas de vidro com o uso de resina (Entelan<sup>®</sup>).

Para o cálculo da proporção volumétrica dos compartimentos testiculares foram fotografados, em imagens digitais com o auxílio de um fotomicroscópio (Motic BA410) equipado com câmera digital Moticom Pro 252B, 20 campos aleatórios com aumento de 400x e por meio do programa Microsoft Office Power Point<sup>®</sup> foram sobrepostas grades com 500 pontos em cada imagem. Posteriormente, foram contabilizados pontos coincidentes sobre o compartimento tubular e intertubular.

Para o cálculo dos coeficientes de eficiência das diferentes fases do processo espermatogênico e da capacidade de suporte das células de Sertoli foram fotografadas 10 secções transversais de túbulos seminíferos, em aumento de 400x em cada animal, em que apenas o estágio I do ciclo do epitélio seminífero, avaliado pelo método da morfologia tubular (Guraya, 1987), estava presente. Nestes foram contabilizadas as populações: de espermatogônia do tipo A (A), de espermatócitos primários em pré-leptoteno/leptoteno (PL), de espermatócitos primários em paquíteno (Pq), de espermátides arredondas (Ar) e de células de Sertoli (CS). As populações celulares obtidas foram corrigidas numericamente quanto à espessura do corte e diâmetro nuclear, utilizando-se a fórmula de Abercrombie (1946) modificada por Amann (1962). Pelo fato de as células de Sertoli apresentarem núcleo irregular, a contabilização e a correção populacional foram feitas a partir do diâmetro nucleolar médio (Costa e Paula, 2006).

O rendimento intrínseco da espermatogênese e os índices de capacidade suporte das células de Sertoli foram determinados pelas razões obtidas entre as populações médias estimadas nas secções transversais de túbulos, assim, foram calculados: o coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais (PL:A); coeficiente de manutenção da prófase meiótica (Pq:PL); o rendimento meiótico (Ar:Pq); o rendimento geral da

espermatogênese (Ar:A). Os índices de células de Sertoli, abrangeram as seguintes razões: A:CS; PL:CS; Pq:CS; Ar:CS e total de células germinativas:CS (Costa et al., 2004; Mascarenhas et al., 2006).

Ao assumir que a perda celular durante a espermiogênese não é significativa (Johnson et al., 2000) a reserva espermática dos testículos (RET) pôde ser calculada através da seguinte fórmula:  $RET = (Ar \times \text{comprimento total de túbulo seminífero}) / \text{espessura do corte}$  (Barros et al., 2007; Morais et al., 2013). Considerando o formato cilíndrico do túbulo seminífero, o seu comprimento total pôde ser calculado através da adaptação da fórmula do volume de um cilindro, na qual:  $\text{Comprimento tubular} = (\text{volume total de túbulos seminíferos} / \text{área da secção transversal do túbulo seminífero})$ , sendo a área da secção transversal calculada através da fórmula  $\pi r^2$ , onde  $r$  é igual à metade do diâmetro médio dos túbulos seminíferos (Morais et al., 2017). O diâmetro médio dos túbulos seminíferos foi mensurado a partir de 20 secções transversais de túbulos seminíferos o mais circular possível, na objetiva de 40x, para isso utilizou-se o programa de análise de imagem Motic Images Plus 2.0. Em cada secção transversal foi realizado a mensuração de dois diâmetros, considerando-se como medida representativa a média destes (Costa et al., 2004). Os dados obtidos foram analisados segundo estatística descritiva quanto à média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O testículo mamífero apresenta dupla função no processo reprodutivo masculino, sendo para isto constituído de um sistema tubular gametogênico, ladeado de um tecido intertubular androgênico. Adicionalmente a túnica albugínea e o mediastino testicular, embora constituintes testiculares, não participam diretamente do processo espermatogênico ou da secreção hormonal (Azevedo et al., 2006; Costa et al., 2011), neste sentido, considerando as funções testiculares, torna-se adequado o conceito de um peso líquido testicular no qual é considerado apenas a porção produtiva do peso testicular, descontando-se assim os valores de albugínea e mediastino testiculares (Azevedo et al., 2006; Costa et al., 2011; Bringel et al., 2013).

Não foi possível observar macroscopicamente a presença do mediastino testicular nos indivíduos avaliados, já a albugínea testicular apresentou volume médio de  $0,042 \pm 0,010$  ml correspondendo a cerca de 7% do volume testicular total. Esta mesma proporção também foi descrita para o *C. penicillata* (Leal e França, 2006). Neste sentido, o volume

líquido testicular médio foi calculado em  $0,561 \pm 0,140$  ml, uma vez que o volume médio testicular total foi de  $0,603 \pm 0,151$  ml nos animais estudados.

O compartimento tubular dos animais de estudo ocupa cerca de 90% de seu peso líquido testicular, em mamíferos domésticos e selvagens em geral esse compartimento abrange por volta de 60 a 92% (França e Russell, 1998; Barros et al., 2006; Leal e França 2006; Caldeira et al., 2010; Silva et al., 2010). Em torno de 79% do compartimento tubular dos *C. geoffroyi* estudados é composto pelo epitélio seminífero, 16% pelo lume tubular e 5% pela túnica própria. O epitélio seminífero, ou epitélio germinativo é caracterizado pela presença de células de Sertoli e de diferentes gerações de células germinativas, estas se apresentam em camadas em fases crescentes de desenvolvimento, em direção ao lume tubular. Assim ao completar seu desenvolvimento os gametas são liberados no lume tubular, e conseqüentemente há uma migração das gerações subsequentes induzida pela formação de nova geração na região basal do túbulo.

As populações médias das diferentes gerações celulares observadas em secções transversais no estágio I do ciclo do epitélio seminífero, bem como as reservas espermáticas testiculares do *C. geoffroyi* estão apresentados na tabela 1. O ciclo do epitélio seminífero (CES) pode ser classificado em oito estádios distintos e sequenciais (Bitencourt et al., 2007), sendo que no estágio I são observadas, no sentido base-lume: uma geração de espermatogônias do tipo A, duas gerações de espermatócitos primários (pré-leptóteno e paquíteno) e uma geração de espermátides arredondadas. Uma vez que estas gerações são interdependentes a relação entre suas populações reflete diretamente o rendimento intrínseco do processo espermatogênico (Castro et al., 1997).

**Tabela 1:** Populações celulares corrigidas em estágio I do ciclo do epitélio seminífero e reservas espermáticas de *Callithrix geoffroyi* adultos.

<b>Parâmetros</b>	<b>Média ± DP</b>	<b>CV (%)</b>
Espermatogônia tipo A	$4,00 \pm 0,62$	15,42
Espermatócito primário em pré-leptoteno/leptoteno	$12,98 \pm 4,54$	35,01
Espermatócito primário em paquíteno	$15,98 \pm 2,78$	17,39
Espermátide arredondada	$48,28 \pm 7,32$	15,15
Células de Sertoli	$6,27 \pm 0,74$	11,72
Reserva espermática testicular ( $\times 10^6$ )	$104 \pm 31,8$	30,48
Reserva espermática por grama de testículo ( $\times 10^6$ )	$173 \pm 36,2$	20,93

DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação

O desenvolvimento e maturação das células germinativas nos vertebrados ocorre de forma semelhante, ou seja, a partir de mitoses espermatogoniais as células tronco mantêm o seu número enquanto produzem novas células diretamente implicadas no processo espermatogênico (Russell et al., 1990; Pudney, 1995). Estas espermatogônias, comprometidas com a espermatogênese, dão origem a espermatócitos primários após uma série de mitoses envolvendo um número espécie-específico de gerações. Os espermatócitos primários passam então por um processo meiótico gerando as espermatídes que, por sua vez, sofrem uma série de mudanças morfológicas e se transformam em espermatozóides (Pudney, 1995). O rendimento espermatogênico, entretanto, não atinge a eficiência máxima de 100%, pois além das perdas celulares que naturalmente ocorrerem durante o processo, as células de Sertoli regulam suas populações de acordo com a sua capacidade de suporte (Clermont, 1972). Desse modo, as razões numéricas entre os tipos celulares por secção transversal de túbulo seminífero constituem uma forma acurada para se estimar a eficiência da espermatogênese, permitindo ainda comparações entre diferentes espécies uma vez que é possível mapear as fases onde ocorrem perdas celulares significativas e quantificá-las em termos percentuais (Russell et al., 1990; Costa et al., 2004). Os rendimentos intrínsecos do processo espermatogênico de *C. geoffroyi* estão descritos na tabela 2.

**Tabela 2:** Rendimentos intrínsecos da espermatogênese em *Callithrix geoffroyi* adultos.

<b>Parâmetro</b>	<b>Relação teórica</b>	<b>Média ± DP</b>	<b>CV (%)</b>
Coeficiente de eficiência das mitoses espermatogoniais (Espermatogônia A : Espermatócitos I PL)	1:64	3,2 ± 0,82 (1:3,2)	25,51
Coeficiente de manutenção da prófase meiótica (Espermatócitos I Pq : Espermatócitos I PL)	1:1	0,8 ± 0,16 (1:0,8)	19,53
Rendimento meiótico (Espermatócito I Pq : Espermatídes Ar)	1:4	3,04 ± 0,33 (1:3,04)	10,92
Rendimento geral da espermatogênese (Espermatogônia A : Espermatídes Ar)	1:256	12,16 ± 1,74 (1:12,16)	14,33

DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação

O coeficiente de eficiência das mitoses espermatogoniais, ou índice mitótico, representa o número de espermátocitos primários em pré-leptóteno/leptóteno derivado de cada espermatogônia do tipo A (Castro et al., 1997). A interpretação desse parâmetro depende do número de gerações de espermatogônias envolvidas em cada espécie, porém sabe-se que em média seis gerações espermatogoniais são geralmente descritas para a maioria dos mamíferos nesta etapa, assim a produção, teoricamente esperada, seria de 64 espermátocitos primários produzidos por espermatogônia (Clermont, 1972; Russell et al., 1990). Na presente pesquisa apenas 5% deste número teoricamente esperado foi contabilizado nos saguis-da-cara-branca estudados, ou seja, foi observado em torno de 95% de perda celular. Em outros mamíferos essa perda é em torno de 90% em *Oxymycterus rufus* (Morais et al., 2016), 83% em *Desmodus rotundus* (Morais et al., 2017), e em animais domésticos pode variar entre 65 e 75% (França e Russell, 1998).

Durante a prófase meiótica I há um aumento progressivo do tamanho dos espermátocitos devido às alterações nucleares preparatórias para as divisões meióticas, esta fase é excepcionalmente longa, sendo claramente observadas as suas subdivisões: pré-leptoteno, leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno ao longo do CES (Russell et al., 1990). Especificamente no estágio I do CES, duas destas subdivisões se apresentam em camadas distintas nas regiões intermediária e basal do epitélio seminífero, e embora pertencentes a diferentes gerações, a relação entre a população de espermátocitos primários em paquíteno e de espermátocitos primários em pré-leptóteno/leptóteno permite a estimativa da manutenção numérica durante a prófase meiótica I. Este coeficiente de manutenção da prófase meiótica é geralmente próximo a 1:1, uma vez que a fase de prófase é naturalmente conservativa (Courot et al., 1970). Durante a prófase meiótica do processo espermatogênico em *C. geoffroyi* não foram detectadas alterações substanciais neste coeficiente, sendo que o mesmo também é relatado para mamíferos domésticos (França e Russell, 1998) e selvagens (Costa et al., 2004; Costa e Silva, 2006).

O número teoricamente esperado durante a meiose é de quatro espermátides arredondadas produzidas a cada espermátocito primário, porém perdas espécies específicas também são computadas nesta fase (França e Russell, 1998; Costa et al., 2004; Morais et al., 2016). Assim, o rendimento meiótico avalia a eficiência das duas divisões meióticas durante o CES, e assim como o observado durante as mitoses espermatogoniais, as perdas no processo meiótico são significativas e funcionam como mecanismo de eliminação de células com cromossomas anormais e aberrações, normalmente produzidas (Costa et al., 2004). O rendimento meiótico encontrado para os *C. geoffroyi* estudados foi

de 1:3, ou seja, cada espermatócito primário gerou três espermátides arredondadas. Sendo assim, seu rendimento meiótico é 76% do número teoricamente esperado, o que, conseqüentemente, gera uma perda celular de 24%. Valores menores de perda celular (15%) foram registrados em *C. penicillata* (Leal e França, 2006), e em outros animais, silvestres e domésticos, essa perda é descrita em torno de 5 a 30% (França e Russell, 1998; Costa et al., 2004; Barros et al., 2007).

A fase de espermiogênese ocorre na porção adluminal do epitélio seminífero e assim como o observado durante a prófase meiótica envolve grandes modificações fisiológicas, porém de forma conservativa, não ocorrendo perdas populacionais significativas, assim, a população de espermátides arredondadas pode ser considerada como o número de espermatozoides produzido ao final do processo (Johnson et al., 2000; Azevedo et al., 2010). Neste sentido, o rendimento geral da espermatogênese é o parâmetro estimador da sua eficiência geral, esse pode ser estimado a partir da relação entre as populações de espermátides arredondadas e de espermatogônias tipo A observadas no estágio I do CES (Costa et al., 2004; Barros et al., 2007). Dentro de um modelo teórico geral para a maioria dos mamíferos, se durante o processo espermatogênico não fossem observadas perdas significativas, cerca de 256 espermatozoides seriam produzidos por cada espermatogônia (Russell et al., 1990; Costa e Silva, 2006), porém, como descrito anteriormente perdas significativas naturalmente são observadas nas diferentes fases do processo. Assim, os saguis-da-cara-branca estudados apresentaram um rendimento geral da espermatogênese de 4,7%, ou seja, ao longo do processo 95,3% da sua produção foi eliminada ou deixou de ser produzida. Em animais domésticos essa perda gira em torno de 70 a 85% (França e Russell, 1998), já em animais selvagens perdas maiores são observadas, como em javalis de 88% (Costa e Silva, 2006), e em leões africanos e onças-pintadas é em torno de 91% (Barros et al., 2007; Azevedo et al., 2010).

Essa ocorrência de perdas celulares ao longo do processo espermatogênico pode ser um mecanismo para limitar o número de células germinativas a uma quantidade que pode ser suportada pelas células de Sertoli disponíveis, dessa forma, mesmo em espécies com alto potencial de produção espermática, as perdas celulares, em especial durante as divisões espermatogoniais, podem ser altas (Sharpe, 1994). As células de Sertoli são as únicas células somáticas observadas no epitélio seminífero, são conhecidas como “células enfermeiras”, pois são responsáveis pela formação de um micro ambiente específico onde são mantidas de forma integrada diferentes gerações de células germinativas, para tal,

essas células atuam diretamente no suporte físico e nutricional das células germinativas atentando ainda para o fornecimento de elementos específicos demandados por cada uma destas gerações (Guraya, 1987; Russell et al., 1990). A abrangência do controle realizado pela célula de Sertoli sobre o epitélio seminífero é praticamente total, ou seja a população das diferentes gerações germinativas é regulada de acordo com a sua capacidade suporte, para isto as células de Sertoli controlam o número de células produzido pelas mitoses espermatogônias e acompanham o processo meiótico eliminando células germinativas excedentes e degeneradas ao longo desses processos, por outro lado atuam ainda diretamente na espermição, fagocitando o excesso de citoplasma das espermátides (Russell et al., 1990; França et al., 2016).

As razões entre o número de células de Sertoli e de células germinativas de *C. geoffroyi* estão apresentadas na tabela 3. Essas razões podem ser interpretadas como a eficiência individual da célula de Sertoli na manutenção integrada de diferentes gerações de células germinativas ao longo do epitélio seminífero (França e Russell, 1998).

**Tabela 3:** Índices de célula de Sertoli de *Callithrix geoffroyi* adultos.

<b>Tipo celular</b>	<b>Razão</b>
Espermatogônia A : Célula de Sertoli	0,64 : 1
Espermatócito PL : Célula de Sertoli	2,11 : 1
Espermatócito Pq : Célula de Sertoli	2,59 : 1
Espermátide Ar : Célula de Sertoli	7,87 : 1
Total células germinativas : Célula de Sertoli	13,22 : 1

O número de espermátides arredondadas suportadas por cada célula de Sertoli nos *C. geoffroyi* estudados (7,9:1) é similar ao do *C. penicillata*, 8:1 (Leal e França, 2006), e o seu total de células germinativas por célula de Sertoli (13:1) é próximo também ao descrito para *C. jacchus*, 16,5:1 (Weinbauer et al., 2001). A capacidade de suporte das células de Sertoli é variável entre as espécies, sendo que sua habilidade em suportar espermátides está diretamente correlacionada com a produção espermiática diária, ou seja, normalmente, quando a relação células de Sertoli : espermátides arredondadas é alta a produção espermiática diária também é alta (França e Russell, 1998).

A produção espermiática diária é calculada com base na população total de espermátides arredondadas produzidas diariamente, para isto o cálculo da duração do ciclo do epitélio seminífero é fundamental uma vez que as espermátides são produzidas

apenas uma vez a cada ciclo (Bittencourt et al., 2007). Com base no peso testicular é possível ainda a estimativa do número de espermatozoides produzidos diariamente a cada grama de testículo (Costa et al., 2008).

Uma forma simplificada de estimativa da produção espermática é o cálculo da reserva espermática testicular. A reserva espermática refere-se ao potencial quantitativo de espermatozoides produzidos a cada ciclo do epitélio seminífero em todo o testículo. Ou seja, em algum momento do CES, cada segmento tubular estará no estágio I, assim, a partir da extrapolação da sua população média de espermátides arredondadas para todo o comprimento tubular é possível a estimativa da produção de espermatozoides por testículo ao longo da duração de um CES. Embora a duração do CES seja uma constante biológica espécie-específica ainda sim é possível a comparação do potencial produtivo por grama de testículo entre diferentes espécies (Barros et al., 2007; Morais et al., 2017).

No presente experimento os saguis-da-cara-branca apresentaram uma reserva espermática testicular total de  $104 \times 10^6$  espermatozoides, como o peso de ambos os testículos destes animais é em média apenas 0,6 g a reserva espermática por grama de testículo seria de  $173 \times 10^6$  espermatozoides. Neste sentido, Moller (1989) e Firman et al. (2013) descrevem que espécies que apresentam sistema de acasalamento do tipo monogâmico ou poligínico (*single-male*) apresentam menor investimento em produção espermática visto que a competição pela progênie ocorre fisicamente no acesso à fêmea e não quanto ao número de espermatozoides no interior do genital feminino, como em espécies promíscuas ou poliândricas (*multi-male*). O sistema de acasalamento do gênero *Callithrix*, segundo diferentes autores, implica em distintos padrões de acasalamento que podem variar de monogamia e poliginia à poliandria (Abbott, 1984; Stevenson e Rylands, 1988; Coutinho e Corrêa, 1995; Ferrari e Digby, 1996; Nievergelt et al., 2000). Silva (2019) sugere, a partir de dados morfométricos, que diferente das demais espécies do gênero, o *C. geoffroyi* tende mais fortemente aos sistemas *single-male*. Também neste sentido, a reserva espermática testicular por grama de testículo dos saguis-da-cara-branca estudados é menor que o observado em híbridos de *Callithrix* ( $531,16 \times 10^6$ , Ferraz, 2015), revelando um menor investimento produtivo. A reserva espermática testicular por grama de testículo em animais sabidamente dos sistemas *multi-male* exige maiores investimentos, como observado no morcego *Desmodus rotundus* ( $714,4 \times 10^6$  espermatozoides/ g de testículo/ CES, Morais et al., 2017). Da mesma forma, Morais et al. (2014) sugerem a classificação do roedor *Oxymycterus nasutus* como sendo promíscuo

a partir do alto investimento produtivo espermático ( $849,63 \times 10^6$  espermatozoides/g testicular/CES).

## CONCLUSÃO

Os saguis-da-cara-branca estudados apresentaram um rendimento geral da espermatogênese de apenas 4,7%, o que indica que 95,3% do potencial produtivo do processo espermatogênico foi eliminado ou deixou de ser produzido, embora a capacidade de suporte de suas células de Sertoli tenha sido semelhante ao descrito para outras espécies de *Callithrix*. Ainda neste sentido, com uma baixa reserva espermática por grama de testículo ( $173 \times 10^6$  espermatozoides) estimada, os animais estudados apresentaram reduzido investimento produtivo, o que condiz com o sistema de acasalamento tipo *single-male*, onde não há a necessidade de grande volume espermático ejaculado no interior dos órgãos reprodutivos femininos, visto que a competição pela prole ocorre anteriormente no acesso à fêmea.

## REFERÊNCIAS

- Abbott, D.H., 1984. Behavioral and physiological suppression of fertility in subordinate marmoset monkeys. *Am. J. Primatol.* 6(3), 169-186. <https://doi.org/10.1002/ajp.1350060305>.
- Abercrombie, M., 1946. Estimation of nuclear populations from microtome sections. *Anat. Rec.* 94(3), 238-248. <https://doi.org/10.1002/ar.1090940210>.
- Amann, R.P., 1962. Reproductive capacity of dairy bulls. IV. Spermatogenesis and testicular germ cell degeneration. *Am. J. Anat.* 110(1), 69-78. <https://doi.org/10.1002/aja.1001100107>
- Araujo, G.R., Paula, T.A.R., Deco-Souza, T., Garay, R.M., Bergo, L.C.F., Silva, L.C., Csermak Júnior, A.C., Ferrer, J.B.S., Barros, J.B.G., 2013. Criptorquidismo em jaguatirica de vida livre capturada no Parque Estadual do Rio Doce, Brasil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 65(1), 1-5. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352013000100001>.
- Azevedo, M.H.F., Paula, T.A.R., Matta, S.L.P., Fonseca, C.C., Costa, E.P., Costa, D.S., Peixoto, J.V., 2010. Cell population indexes of spermatogenic yield and testicular sperm reserves in adult jaguars (*Panthera onca*). *Anim. Reprod. Sci.* 118 (1), 83-88. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.05.018>.
- 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*) adulta. *Rev. Ceres.* 307 (53), 374-381.
- Barros, J.B.G., Paula, T.A.R., Matta, S.L.P., Fonseca, C.C., Leite, F.L.G., Rossi Jr, J.L., Oliveira, P.C., Costa, E.P., 2007. Sertoli cell index and spermatid reserves in adult captive

African lions (*Panthera leo*, Linnaeus, 1758). Anim. Reprod. Sci. 2 (3-4), 350-356. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.04.002>

Barros, J.B.G., Paula, T.A.R., Matta, S.L.P., Fonseca, C.C., Melo, F.R., Benjamim, L.A., 2006. Morfometria testicular e dos túbulos seminíferos de leões-africanos (*Panthera leo*, Linnaeus, 1758) adultos, em cativeiro. Rev. Ceres. 310 (53), 523-530.

Bittencourt, V.L., Paula, T.A.R., Matta, S.L.P., Fonseca, C.C., Costa, D.S., Costa, E.P., Benjamin, L.A., 2007. Biometria macro e microscópica dos componentes testiculares em lobo guará (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1811) adulto. Rev. Ceres. 313 (54), 324-329.

Bringel, S.S., Amorim Júnior, A.A., Amorim, M.J.A.A.L., Brito, L.T., Morais, R.N., Torres, S.M., Tenorio, M.M., Silva Junior, V.A., 2013. Endocrine and testicular changes induced by olanzapine in adult Wistar rats. J. Appl. Toxicol. 33 (1), 24-31. <https://doi.org/10.1002/jat.1702>.

Caldeira, B.C., Paula, T.A.R., Matta, S.L.P., Balarini, M.K., Campos, P.K.A., 2010. Morphometry of testis and seminiferous tubules of the adult crab-eating fox (*Cerdocyon thous*, Linnaeus, 1766). Rev. Ceres. 5 (57), 569-575.

Carpenter, J.W., 2005. Exotic animal formulary. Elsevier Saunders, 3ed. 564p.

Castro, A.C.S., Berndtson, W.E., Cardoso, F.M., 1997. Cinética e quantificação da espermatogênese: bases morfológicas e suas aplicações em estudos da reprodução de mamíferos. Rev. Bras. Reprod. Anim. 21(1), 25-34.

Clermont, Y., 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. Physiol. Rev. 52(1), 198-236. <https://doi.org/10.1152/physrev.1972.52.1.198>

Costa, D.S., Henry, M.R.G.M., Paula, T.A.R., 2004. Espermatogênese de catetos (*Tayassu tajacu*). Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 56(1), 46-51. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352004000100008>.

Costa, D.S., Paula, T.A.R., 2006. Cinética da espermatogênese de catetos (*Tayassu tajacu*). Rev. Ceres. 53 (310), 512-522.

Costa, D.S., Silva, J.F.S., 2006. Wild boars (*Sus scrofa scrofa*) seminiferous tubules morphometry. Braz. Arch. Biol. Technol. 49(5), 739-745. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132006000600008>.

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 (*Panthera onca*). Theriogenology. 70 (7), 1136-1146. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.06.035>.

Costa, K.L.C., Matta, S.L.P., Gomes, M.D.L.M., Paula, T.A.R., Freitas, K.M., Carvalho, F.D.A.R., Silveira, J.A., Dolder, H., Mendis-Handagama, S.C., 2011. Histomorphometric evaluation of the neotropical brown brocket deer *Mazama gouazoubira* testis, with an emphasis on cell population indexes of spermatogenic yield. Anim. Reprod. Sci. 3-4 (127), 202-212. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.07.016>

- Courot, M., Hochereau-de Reviers, M.T., Ortavant, R., 1970. Spermatogenesis, in: Johnson, A.D., Gomes, W.R., Vandermark, N.L. (Eds.), *The testis: development, anatomy, and physiology*. New York and London: Academic Press, pp.339-432.
- Coutinho, P.E., Corrêa, K.M., 1995. Polygyny in a free-ranging group of buffy-tufted-ear marmosets, *Callithrix aurita*. *Folia Primatol.* 65(1), 25-29. <https://doi.org/10.1159/000156863>.
- Ferrari, S.F., Digby, L.J., 1996. Wild *Callithrix* groups: stable extended families? *Am. J. Primatol.* 1(38), 19-27. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2345\(1996\)38:1<19::AID-AJP3>3.0.CO;2-W](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2345(1996)38:1<19::AID-AJP3>3.0.CO;2-W).
- Ferraz, F.S., 2015. Morfofisiologia testicular de saguis híbridos de vida livre (Callitricidae: Primatas), Rio de Janeiro-RJ, Brasil. Dissertação (Mestrado em Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- Firman, R.C., Garcia-Gonzalez, F., Thyer, E., Wheeler, S., Yamin, Z., Yuan, M., Simmons, L.W., 2015. Evolutionary change in testes tissue composition among experimental populations of house mice. *Evolution.* 69 (3), 848-855. <https://doi.org/10.1111/evo.12603>.
- Firman, R.C., Klemme, I., Simmons, L.W., 2013. Strategic adjustments in sperm production within and between two island populations of house mice. *Evolution.* 67 (10), 3061-3070. <https://doi.org/10.1111/evo.12164>.
- Firman, R.C., Simmons, L.W., 2011. Experimental evolution of sperm competitiveness in a mammal. *BMC Evol. Biol.* 11,19. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-19>.
- França, L.R., Hess, R.A., Dufour, J.M., Hofmann, M.C., Griswold, M.D., 2016. The Sertoli cell: one hundred fifty years of beauty and plasticity. *Andrology.* 4 (2), 189-212. <https://doi.org/10.1111/andr.12165>.
- França, L.R., Russell, L.D., 1998. The testis of domestic animals, in: Regadera, J.M.G. (Ed.), *Male reproduction: A multidisciplinary overview*. Madrid: Churchill Livingstone, pp.197-219.
- Guraya, S.S., 1987. *Biology of spermatogenesis and spermatozoa in mammals*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 430p.
- Johnson, L., Petty, C.S., Neaves, W.B., 1981. A new approach to qualification of spermatogenesis and its application to germinal cell attrition during human spermatogenesis. *Biol. Reprod.* 25, 217–226. <https://doi.org/10.1095/biolreprod25.1.217>.
- Johnson, L., Varner, D.D., Roberts, M.E., Smith, T.L., Keillor, G.E., Scrutchfield, W.L., 2000. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61, 471-480. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00108-1](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00108-1).
- Karnovsky, M. J., 1965. A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. Cell. Biol.* 27 (2), 137-139.
- Kenagy, G.J., Trombulak, S.C., 1986. Size and function of mammalian testes in relation to body size. *J. Mammal.* 67 (1), 1-22. <https://doi.org/10.2307/1380997>.

Leal, M.C., França, L.R., 2006. The seminiferous epithelium cycle length in the black tufted-ear marmoset (*Callithrix penicillata*) is similar to humans. *Biol. Reprod.* 74 (4), 616-624. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.048074>.

Mascarenhas, R.M., Paula, T.A.R., Matta, S.L.P., Lanna, L.L.E., Fonseca, C.C., Neves, M.T.D.D., 2006. Morfometria macro e microscópica e índices somáticos dos componentes testiculares de cães sem raça definida, da puberdade à senilidade. *Rev. Ceres.* 305 (53), 113-119.

Moller, A.P., 1989. Ejaculate quality, testes size and sperm production in mammals. *Funct. Ecol.* 1 (3), 91-96. DOI: 10.2307/2389679.

Morais, A.C.T., Balarini, M.K., Lopes, E.O., Menezes, T.P., Quintela, F.M., Morais, D.B., Gomes, M.L.K., Matta, S.L.P., 2014. The tubular compartment and the spermatogenic dynamics of the wild rodent *Oxymycterus nasutus* (Rodentia: Cricetidae). *Anim. Reprod. Sci.* 149(3-4), 249-258. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.06.027>.

Morais, A.C.T., Balarini, M.K., Menezes, T.P., Ferraz, F.S., Gomes, M.L., Morais, D.B., Paula, T.A.R., Matta, S.L., 2016. Germ cells and the seminiferous epithelium cycle in the wild rodent *Oxymycterus rufus* (Rodentia: Cricetidae). *J. Pharm. Biol. Sci.* 11 (4), 61-71. DOI: 10.9790/3008-1104036171.

Morais, D.B., Barbosa, L.P., Melo, B.E.S., Matta, S.L.P., Neves, M.M., Balarini, M.K., Rodrigues, M.V., 2012. Microscopia e morfometria de componentes tubulares de testículos de coelhos suplementados com geleia real. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 4 (64), 810-816. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352012000400004>.

Morais, D.B., Cupertino, M.C., Goulart, L.S., Freitas, K.M., Freitas, M.B., Paula, T.A., Matta, S.L., 2013. Histomorphometric evaluation of the *Molossus molossus* (Chiroptera, Molossidae) testis: The tubular compartment and indices of sperm production. *Anim. Reprod. Sci.* 140 (3-4), 268-278. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.06.003>.

Morais, D.B., Puga, L.C.H.P., Paula, T.A.R., Freitas, M.B.D., Matta, S.L.P., 2017. The spermatogenic process of the common vampire bat *Desmodus rotundus* under a histomorphometric view. *PloS One.* 3(12), 1-18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173856>.

Nievergelt, C.M., Digby, L.J., Ramakrishnan, U., Woodruff, D.S., 2000. Genetic analysis of group composition and breeding system in a wild common marmoset (*Callithrix jacchus*) population. *Int. J. Primatol.* 21(1), 1-20. <https://doi.org/10.1023/A:1005411227810>.

Pudney, J., 1995. Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. *Microsc. Res. Tech.* 32 (6), 459-497. <https://doi.org/10.1002/jemt.1070320602>.

Russell, L.D., Ettlin, R.A., Hikim, A.P.S., Clegg, E.D., 1990. Histological and histopathological evaluation of the testis, Florida: Cache River Press.

Rylands, A.B., Coimbra-Filho, A.F., Mittermeier, R.A., 1993. Systematics, geographic distribution, and some notes on the conservation status of the Callitrichidae, in: Rylands, A.B. (Ed.), *Marmosets and tamarins: systematics, behaviour, and ecology*, Oxford: Oxford University Press, pp.11-77.

- Rylands, A.B., Mendes, S.L., 2018. *Callithrix geoffroyi*. The IUCN Red List of Threatened Species 2018. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T3572A17936610.en> (accessed 26 January 2019).
- Rylands, A.B., Mittermeier, R.A., Silva, J.S., 2012. Neotropical primates: taxonomy and recently described species and subspecies. *Int. Zoo. Yearb.* 46, 11-24. DOI:10.1111/j.1748-1090.2011.00152.x.
- Sharpe, R.M., 1994. Regulation of spermatogenesis, in: Knobil, E., Neil, J.D. (Eds.) *The physiology of reproduction*, New York: Raven Press, pp.1363-1434.
- Silva, F.F.R., 2019. Estudo do processo espermatogênico em saguis-da-cara-branca (*Callithrix geoffroyi*) (Humboldt, 1812) adultos. Tese, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 78p.
- Silva, R.C., Costa, G.M.J., Andrade, L.M., França, L.R., 2010. Testis stereology, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in the ocelot (*Leopardus pardalis*). *Theriogenology.* 73 (2), 157-167. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.08.009>.
- Stevenson, M., Rylands, A.B., 1988. The marmosets, genus *Callithrix*, in: Mittermeier, R.A., Rylands, A.B., Coimbra-Filho, A., Fonseca, G.A.B. (Eds.), *Ecology and behavior of Neotropical Primates*. Washington, D.C.: World Wildlife Fund, pp.131-222.
- Weinbauer, G.F., Aslam, H., Krishnamurthy, H., Brinkworth, M.H., Einspanier, A., Hodges, J.K., 2001. Quantitative analysis of spermatogenesis and apoptosis in the common marmoset (*Callithrix jacchus*) reveals high rates of spermatogonial turnover and high spermatogenic efficiency. *Biol. Reprod.* 64 (1), 120-126. <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.1.120>.

**DESCRIÇÃO DOS ESTÁDIOS DO CICLO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO E  
CARACTERIZAÇÃO DO SEU ARRANJO TOPOGRÁFICO  
EM SAGUIS-DA-CARA-BRANCA (*Callithrix geoffroyi*)**

**RESUMO**

A espermatogênese da maioria das espécies de mamíferos é classificada como segmentar, em que normalmente apenas um único estágio do ciclo do epitélio seminífero está presente em cada secção transversal de túbulo seminífero. Por outro lado, em aves e em algumas poucas espécies de primatas, a espermatogênese é classificada como helicoidal, em que são observadas dois ou mais estágios distintos a cada secção tubular transversal. Neste sentido, o objetivo do presente trabalho é descrever os estágios do ciclo do epitélio seminífero no sagui-da-cara-branca (*Callithrix geoffroyi*) e, a partir de suas frequências relativas e distribuição, classificar o tipo de espermatogênese observada. Para tal, foram utilizados fragmentos testiculares de cinco animais adultos de vida livre para confecção e análise de lâminas histológicas. Os oito estágios do ciclo do epitélio seminífero descritos para o *C. geoffroyi*, segundo o método da morfologia tubular, apresentaram organização semelhante à apresentada para outras espécies de mamíferos, sendo a fase pré-meiótica (estádios I, II e III) a fase que apresentou maior frequência e a meiótica (estádio IV) a que apresentou menor frequência em relação as três fases do processo espermatogênico. Em torno de 60% das secções transversais de túbulo seminífero analisadas para o sagui-da-cara-branca apresentaram apenas um único estágio do ciclo do epitélio seminífero, as demais secções tubulares (40%) apresentaram dois ou três estágios. Estes, entretanto, eram sempre estágios sequenciais de desenvolvimento. Sendo assim, os múltiplos estágios encontrados podem ser consequência de um atraso da comunicação entre as células de Sertoli em segmentos adjacentes ou mesmo da presença de segmentos menores ao longo do túbulo seminífero. Portanto, acredita-se que a espermatogênese dos animais de estudo se aproxime mais da espermatogênese segmentar que da espermatogênese helicoidal.

**INTRODUÇÃO**

A espermatogênese é um processo altamente sincronizado e complexo de desenvolvimento e diferenciação de células germinativas, que se inicia a partir de mitoses de células tronco espermatogoniais na base do epitélio seminífero (Guraya, 1987). Além de manterem sua população constante, as espermatogônias tronco produzem novas

gerações de células diretamente implicadas no processo espermatogênico durante a sua fase proliferativa. A fase seguinte envolve processos meióticos onde os espermatócitos geram espermátides que, por sua vez, sofrem uma série de mudanças morfológicas e se transformam em espermatozoides durante a fase de espermiogênese (Russell et al., 1990). A sincronia entre as células é garantida pela persistência de pontes citoplasmáticas, assim as diferentes fases de desenvolvimento da espermatogênese acontecem linearmente em todas as células de uma mesma geração (Ren e Russell, 1991).

Nos amniotas, a estratégia reprodutiva masculina envolve uma produção espermática constante ao longo de todo o período de reprodução, assim o epitélio seminífero apresenta uma produção cíclica e contínua de espermatozoides (Russell et al., 1990; Pudney, 1995). Neste sentido, no mesmo segmento de epitélio seminífero são observadas gerações espermáticas em fases distintas de desenvolvimento do processo espermatogênico. Graças à presença das células de Sertoli uma sincronia vertical no epitélio também pode ser observada, assim, em uma secção transversal do túbulo seminífero é observado uma organização em camadas de desenvolvimento crescente de gerações espermáticas, da base em direção ao lume tubular (Ren e Russell, 1991; Pudney 1993). À medida que novas gerações de espermatogônias e espermatócitos são produzidas na base do epitélio as gerações mais desenvolvidas são deslocadas em direção ao lume culminando com a liberação dos espermatozoides, a este processo denomina-se ciclo do epitélio seminífero (CES). Cerca de 4,5 ciclos são necessários para que a mesma geração, formada na base do epitélio, seja liberada como espermatozoide no lume tubular (Russell et al., 1990).

Em mamíferos, oito associações distintas podem ser observadas entre as diferentes gerações celulares dispostas em camadas concêntricas transversais no epitélio seminífero, essas são denominadas estádios do CES (Clermont, 1972; Amann e Schanbacher, 1983; Guraya, 1987). A descrição desses estádios pode ser feita com base nas alterações do formato do núcleo das células espermatogênicas, na ocorrência de divisões meióticas nos espermatócitos e no arranjo e disposição das espermátides ao longo do epitélio seminífero, esta forma de classificação é denominada método da morfologia tubular (Clermont, 1972; Guraya, 1987; Costa e Paula, 2003).

Na maioria dos mamíferos a espermatogênese é classificada como segmentar, o que significa que apenas um único estádio do CES está presente em cada segmento de túbulo seminífero (Russell et al., 1990). A distribuição longitudinal ao longo do túbulo destes segmentos é organizada de forma sequencial quanto ao desenvolvimento dos

estádios do CES, sendo isto denominado onda espermatogênica (Clermont, 1972; Russell et al., 1990). Por outro lado, em aves e em algumas poucas espécies de primatas, a espermatogênese pode ser classificada como helicoidal, neste caso os estádios estão ordenados também sequencialmente, porém em faixas espermatogênicas longitudinais paralelas e independentes ao longo do eixo tubular, neste sentido normalmente são observadas dois ou mais estádios distintos a cada secção transversal de túbulo seminífero (Guraya, 1987; Schulze e Rehder, 1984; Jones e Lin, 1993; Smithwick e Young, 1996). O termo helicoidal é uma referência à disposição oblíqua e espiral das diferentes ondas espermatogênicas observadas paralelas nas faixas espermatogênicas ao longo do túbulo seminífero (Lin e Jones, 1990; Jones e Lin, 1993).

Algumas espécies de primatas, como o homem e o chimpanzé, são claramente descritas como apresentando espermatogênese do tipo helicoidal (Schulze e Rehder, 1984; Smithwick e Young, 1996), já para os primatas do gênero *Callithrix* a descrição é variada como sendo helicoidal (Millar et al., 2000) ou intermediária, uma vez que foram observadas secções transversais contendo apenas um estágio bem como secções com mais de um estágio do CES (Leal e França, 2006). Neste sentido, o presente trabalho objetiva descrever os estádios do ciclo do epitélio seminífero no sagui-da-cara-branca (*Callithrix geoffroyi*) e, a partir de suas frequências relativas e distribuição, classificar o tipo de espermatogênese observada.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

Os procedimentos realizados tiveram aprovação da Comissão de Ética no Uso Animal da Universidade Federal de Viçosa (CEUA-UFV), protocolo nº 70/2015, e do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (SISBIO - IBAMA), licença nº 50717-1. As capturas dos animais e coletas de material ocorreram nos meses de outubro e novembro de 2015.

O presente trabalho utilizou amostra testicular de cinco saguis-da-cara-branca (*Callithrix geoffroyi*) adultos de vida livre que foram capturados em grupos de animais já habituados à presença humana nos municípios de Cariacica e Vila Velha, Espírito Santo, Brasil. Os animais foram capturados com o auxílio de armadilhas iscadas com pedaços de banana. Os animais foram então anestesiados com quetamina (10 mg/kg) e xilazina (0,5 mg/kg) (Carpenter, 2005). Um dos testículos foi coletado através de cirurgia de hemicastração. A técnica cirúrgica utilizada foi baseada nos procedimentos realizados em animais domésticos, com a incisão cirúrgica realizada na região inguinal pré-púbica,

remoção do testículo e epidídimo em técnica aberta com ligadura pedicular com fio de nylon 3-0 e sutura de pele com ponto U deitado separado com fio de nylon 3-0. Como medidas profiláticas pós-operatórias, os animais receberam antibiótico (oxitetraciclina, 10 mg/kg) e anti-inflamatório (meloxicam, 0,2 mg/kg). Os animais foram soltos próximos ao local de captura após a completa recuperação dos efeitos anestésicos.

Após a coleta, e antes de serem imersos em solução fixadora de Karnovsky (Karnovsky, 1965), os testículos tiveram a albugínea perfurada em diversos pontos com o uso de uma agulha hipodérmica com o objetivo de melhorar a perfusão do fixador. Posteriormente, os testículos foram seccionados longitudinalmente e mantidos em solução de Karnovsky por 24 horas. Após este período o material foi transferido e armazenado em álcool 70% até o momento do processamento histológico.

Retirou-se um fragmento de cada testículo coletado, e estes foram submetidos à desidratação em série crescente de álcoois (70, 80, 90% e absoluto) e incluídos em resina de metacrilato (Leica Historessin<sup>®</sup>). Posteriormente, foram realizados cortes histológicos de 3 µm de espessura, em micrótomo rotativo com navalha de vidro, para a confecção de lâminas histológicas, as quais foram coradas com azul de toluidina / borato de sódio 1%, e montadas com lamínulas de vidro com o uso de resina (Entelan<sup>®</sup>).

Para a caracterização dos oito estádios do CES (método morfologia tubular) diferentes secções transversais de túbulos seminíferos foram analisadas quanto: ao formato do núcleo das células espermatogênicas, à ocorrência de divisões meióticas e ao arranjo e disposição das espermátides ao longo do epitélio seminífero. Neste sentido o epitélio seminífero foi dividido em três regiões: porção basal, que é a região mais próxima à lamina basal; porção intermediária, localizada na região média do epitélio; e porção adluminal próxima ao lume tubular.

Imagens digitais foram utilizadas para o cálculo da frequência relativa dos oito estádios do CES, para tal 100 secções transversais aleatórias de túbulo seminífero por animal foram fotografadas em imagens digitais, em aumento de 400 vezes, com o auxílio de um fotomicroscópio (Motic BA410) equipado com câmera digital Moticom Pro 252B. Através do programa Microsoft Office Power Point<sup>®</sup> sobre cada imagem de secção transversal de túbulo seminífero foi inserida linhas perpendiculares subdividindo a imagem em quatro quadrantes, sendo contabilizado para estimativa da frequência relativa dos estádios apenas o estágio presente no quadrante superior direito de cada imagem. A frequência dos estádios foi calculada através da seguinte fórmula: (número túbulos contabilizados em determinado estágio / número total de túbulos contabilizados) x 100.

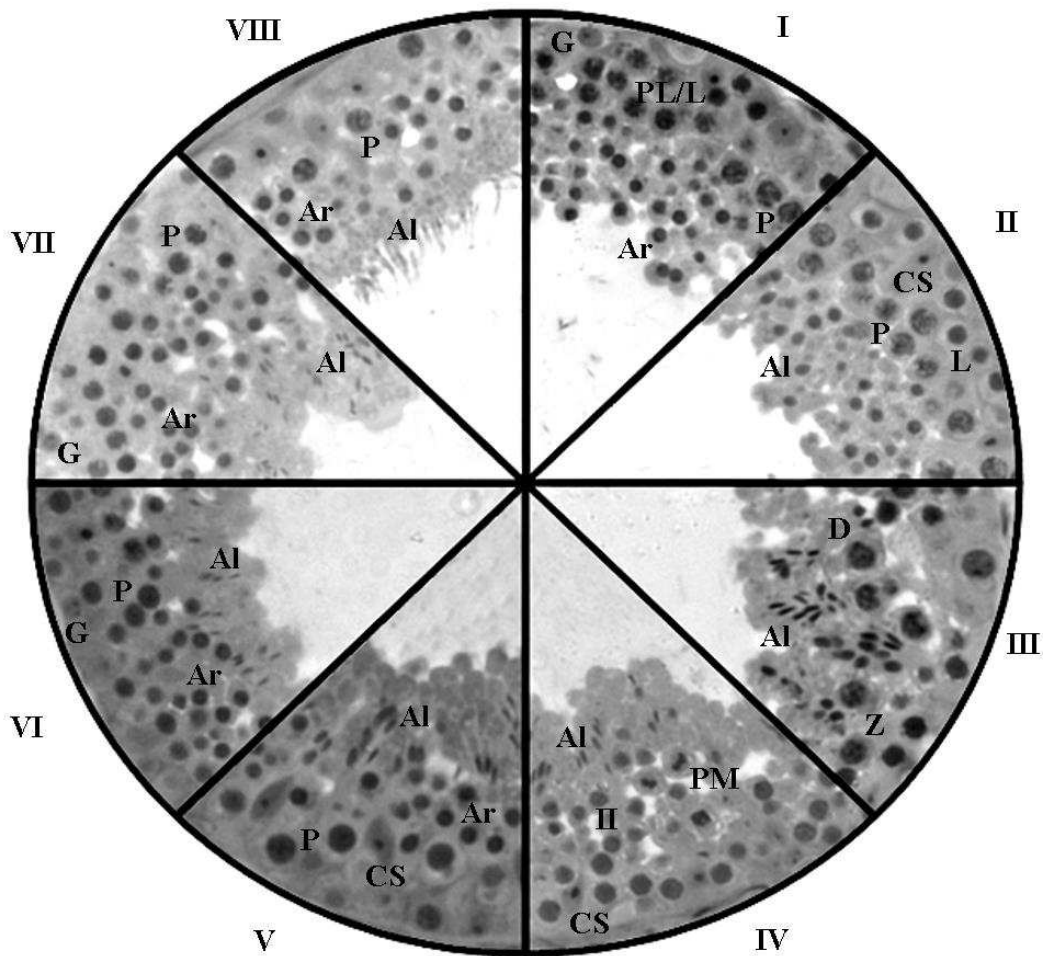
As mesmas imagens obtidas foram utilizadas ainda para o cálculo do percentual de secções tubulares apresentando múltiplos estádios. Quando observado a presença de diferentes estádios na mesma secção tubular estes estádios foram caracterizados e observada a associação sequencial ou aleatória dos mesmos.

Os dados obtidos foram analisados segundo estatística descritiva quanto à média, desvio padrão (DP).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O processo espermatogênico no sagui-comum (*Callithrix jacchus*) é descrito por alguns autores como sendo semelhante àquele observado no homem, e devido a isso essa espécie tem sido usada como um modelo experimental recorrente em pesquisas biomédicas envolvendo as funções testiculares (Hearn, 1983; Millar et al., 2000; Hecht et al., 2009). A precisa identificação e caracterização dos diferentes estádios do CES são essenciais para a realização de estudos quantitativos do processo espermatogênico, sendo importantes não apenas para a compreensão da espermatogênese normal, mas também para a determinação das fases específicas desse processo que podem ser afetadas por um determinado tratamento ou droga (Berndtson, 1977; Almeida et al., 2000).

Uma forma de se caracterizar os estádios do CES é através da utilização do método da morfologia tubular que define oito estádios de desenvolvimento do CES para diferentes espécies de mamíferos (Paula et al., 1999; França e Godinho, 2003; Leal e França, 2006; Bitencourt et al., 2007; Costa et al., 2008). Os oito estádios do CES dos animais de estudo, caracterizados a partir do método da morfologia tubular, estão apresentados na figura 1.



**Figura 1:** Montagem fotográfica contendo os oito estádios do ciclo do epitélio seminífero (em algarismos romanos) de *Callithrix geoffroyi*. Espermatogônia (G); célula de Sertoli (CS); espermatócito primário em pré-leptóteno/leptóteno (PL); espermatócito primário em (L); espermatócito primário em zigóteno (Z); espermatócito primário em paquíteno (P); espermatócito primário em diplóteno (D); placa metafásica (PM); espermatócitos secundários (II); espermátide arredondada (Ar); espermátide em alongamento/alongada (Al). Azul de toluidina. Objetiva de 40x.

Os estádios do CES dos indivíduos de *C. geoffroyi* estudados foram caracterizados da seguinte forma: no estágio I (Figura 1 – I) foi detectada a presença, na porção adluminal do epitélio seminífero, de uma geração de espermátides arredondadas, as quais ocupavam, em geral, de três a quatro camadas próximas ao lume tubular. Não houve presença de espermátides alongadas. Os espermatócitos primários em paquíteno se encontravam na camada intermediária do epitélio. Na camada basal se encontravam as

espermatogônias do tipo A, os espermatócitos primários em transição de pré-leptóteno para leptóteno e as células de Sertoli com nucléolo evidente.

O estágio II (Figura 1 – II) foi caracterizado principalmente pela presença de espermátides com o núcleo em alongamento na porção adluminal do epitélio seminífero. Na porção intermediária foram encontrados espermatócitos primários em paquíteno, sendo que alguns já estavam em transição para espermatócitos primários em diplótenos. Na camada basal do epitélio observaram-se espermatócitos primários em leptóteno, além de espermatogônias e células de Sertoli.

O estágio III (Figura 1 – III) apresentou como característica marcante a presença de apenas uma geração de espermátides, alongadas e formando feixes, na porção adluminal do epitélio seminífero. Na porção intermediária do epitélio foram observadas duas gerações de espermatócitos primários, em zigóteno e diplóteno, com seus núcleos caracteristicamente grandes. Na camada basal do epitélio observaram-se basicamente espermatogônias e células de Sertoli.

O estágio IV (Figura 1 – IV) apresentou espermátides alongadas em feixes na porção adluminal do epitélio seminífero e na porção intermediária encontrou-se o aspecto mais característico deste estágio, que é a presença de placas metafásicas, estas são correspondentes às duas divisões meióticas sendo observadas tanto na transição dos espermatócitos primários em diplóteno para espermatócitos secundários, como destes para espermátides arredondadas. Na porção basal do epitélio seminífero pôde-se observar basicamente as espermatogônias e células de Sertoli.

O estágio V (Figura 1 – V) foi caracterizado pela presença, na porção adluminal do epitélio seminífero, de duas gerações de espermátides, as recém-formadas espermátides arredondadas e a geração mais avançada de espermátides alongadas no formato de feixes bem definidos. Os espermatócitos primários em paquíteno foram observados na região intermediária do epitélio e na porção basal observou-se espermatogônias e células de Sertoli.

O estágio VI (Figura 1 – VI) apresentou os mesmos tipos celulares observados no estágio anterior, entretanto os feixes de espermátides alongadas começaram a se dissociar e estavam mais próximos do lume tubular.

No estágio VII (Figura 1 – VII) os feixes de espermátides alongadas já se apresentavam dissociados e localizados ainda mais próximos do lume tubular que no estágio anterior, observou-se também a formação de uma “névoa” de flagelos bem próximo ao lume. Notou-se ainda a presença de corpos residuais, ou seja, restos

citoplasmáticos que se desprenderam das espermatídes em desenvolvimento. Na porção intermediária do epitélio seminífero haviam espermatócitos primários em paquíteno e na porção basal pôde-se observar espermatogônias e células de Sertoli.

No estágio VIII (Figura 1 – VIII) as espermatídes alongadas estavam totalmente dissociadas e localizadas na borda do epitélio seminífero, com flagelos bem evidentes, e prontas para a espermição. Uma grande quantidade de corpos residuais também foi observada próximos à borda luminal do epitélio. Na porção intermediária do epitélio seminífero notou-se a presença de espermatócitos primários em paquíteno e espermatídes arredondadas. E na porção basal foram observadas células de Sertoli, espermatogônias e alguns espermatócitos primários em pré-leptóteno.

A frequência com que os estádios do ciclo espermatogênico aparecem nas seções transversais de túbulos seminíferos é uma indicação da duração relativa de cada estágio, sendo essencial para se estimar a duração total do ciclo do epitélio seminífero, e importante também para o monitoramento da duração dos efeitos de agentes lesivos sobre a espermatogênese (Castro et al., 1997; Costa e Paula, 2003). As frequências relativas dos estádios do CES, assim como das fases da espermatogênese, dos saguis-da-cara-branca estudados estão apresentadas na tabela 1. As fases do processo espermatogênico no epitélio seminífero têm como referência o processo meiótico, assim a fase pré-meiótica (proliferativa) envolve os estádios antes da metáfase da meiose I (estádios I, II e III), as quais são caracterizadas pela presença de uma única geração de espermatídes; a fase meiótica resume-se ao período relativo ao estágio IV, onde todo o processo meiótico se desenvolve; e a fase pós-meiótica (espermiogênica) engloba desde a formação de novas espermatídes arredondadas até a espermição das espermatídes alongadas no lume tubular (estádios V, VI, VII e VIII) (França e Russell, 1998).

**Tabela 1:** Frequência relativa dos estádios e das fases do ciclo do epitélio seminífero em *Callithrix geoffroyi* adultos.

<b>Estádios</b>	<b>Frequência (%) (média ± DP)</b>	<b>Fases</b>	<b>Frequência (%) (média ± DP)</b>
<b>I</b>	36,48±8,07	<b>Pré-meiótica</b>	67,58±10,57
<b>II</b>	12,96±2,68		
<b>III</b>	18,14±6,62		
<b>IV</b>	6,96±3,37	<b>Meiótica</b>	6,96±3,37
<b>V</b>	6,18±3,23	<b>Pós-meiótica</b>	25,46±8,84
<b>VI</b>	4,16±2,45		
<b>VII</b>	9,16±3,33		
<b>VIII</b>	5,96±2,54		

DP: desvio padrão

As frequências relativas dos estádios e das fases do ciclo do epitélio seminífero dos animais de estudo estão em geral próximas às descritas para o *C. penicillata* (Leal e França, 2006), apresentando uma maior frequência da fase pré-meiótica em relação às outras fases, o que está de acordo também com o descrito por França e Russell (1998) para a maioria das espécies de mamíferos domésticos. A fase meiótica do *C. geoffroyi* foi a que apresentou menor frequência relativa entre as três fases da espermatogênese, indicando que essa foi a fase mais rápida do processo espermatogênico, sendo o mesmo descrito para outras espécies de mamíferos (França e Russell, 1998; Leal e França, 2006; Morais et al., 2017). Devido a isto, e ao fato do estágio IV envolver as divisões meióticas I e II, as secções transversais envolvendo este estágio bem comumente apresentavam características transitórias.

O túbulo seminífero, na grande maioria das espécies de mamíferos, é organizado em segmentos contendo apenas um estágio do CES (Leblond e Clermont, 1952; Russell et al., 1990; Bitencourt et al., 2007; Silva et al., 2010). Esta espermatogênese segmentar apresenta uma onda onde estes segmentos se apresentam organizados sequencialmente, assim, após um segmento no estágio I espera-se observar o arranjo correspondente ao estágio II, e assim sucessivamente (Russell et al., 1990). Neste sentido, podem ser observadas áreas de transição entre os segmentos, que podem exibir características comuns a ambos os estádios do CES (Perey et al., 1961; Guraya, 1987).

Já na espermatogênese do tipo helicoidal observa-se a presença de diferentes estádios em uma mesma secção transversal do túbulo seminífero, uma vez que faixas espermatogênicas independentes, características deste tipo de espermatogênese,

distribuem-se em ondas oblíquas e paralelas ao longo do eixo tubular longitudinal (Schulze e Rehder, 1984; Lin e Jones, 1990). Millar et al. (2000) caracterizam a espermatogênese do *C. jacchus* como sendo helicoidal, semelhante à humana, por outro lado, Leal e França (2006) descrevem a espermatogênese do *C. penicillata* como intermediária entre as espermatogêneses segmentar e helicoidal, uma vez que em 70% das secções tubulares transversais analisadas foram observados a presença de apenas um estágio do CES, e em 30% foram observados dois ou mais estádios concomitantes. As frequências relativas do número de estádios do CES presente por secção transversal do túbulo seminífero nos saguis-da-cara-branca estudados estão apresentadas na tabela 2, nesta, observa-se que cerca de 60% das secções transversais de túbulo seminífero apresentam estágio único, enquanto aproximadamente 40% apresentam múltiplos estádios.

**Tabela 2:** Frequência relativa do número de estádios do ciclo do epitélio seminífero presente em cada secção transversal de túbulo seminífero em *Callithrix geoffroyi* adultos.

<b>Número de estádios por secção transversal tubular</b>	<b>Frequência (%) Média ± DP</b>
Apenas um estágio	59,78 ± 8,63
Dois estádios	31,85 ± 7,04
Três estádios	8,37 ± 3,49

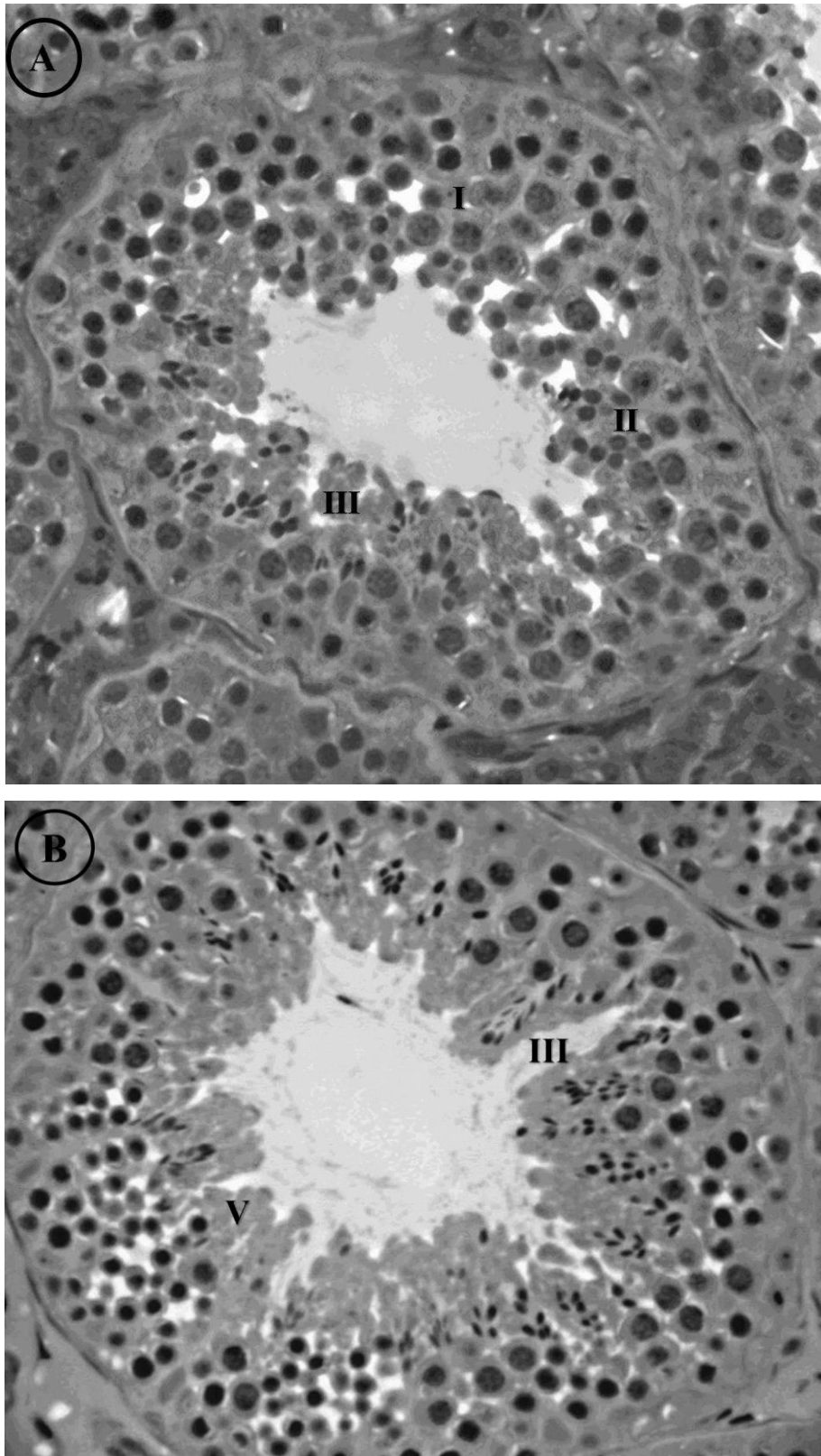
DP: desvio padrão

A presença de mais de um estágio do CES em uma mesma secção transversal pode ser observada também no túbulo seminífero de espécies que apresentam sabidamente espermatogênese do tipo segmentar, neste caso os segmentos são ordenados em sequência de desenvolvimento dos estádios. Esta onda espermatogênica é resultado de uma sincronia no desenvolvimento dos estádios que se dissemina progressivamente ao longo do túbulo seminífero, isto possivelmente é resultado da comunicação linear entre as células de Sertoli que, ao criar o microambiente necessário para o desenvolvimento do estágio em um determinado segmento, influencia o segmento subsequente (Roosen-Runge, 1962; Russell et al., 1990; Cheng e Mruk, 2002). Assim as regiões de transição entre segmentos distintos, e conseqüentemente entre estádios subsequentes, podem apresentar características dos dois estádios dentro de um mesmo corte transversal de túbulo seminífero (Perey et al., 1961; Hess, 1990). Isto parece ser também o caso dos animais de estudo, uma vez que os múltiplos estádios encontrados dentro de uma mesma

secção transversal de túbulo seminífero foram caracterizados como sendo estádios sequenciais de desenvolvimento em todas as situações (Figura 2A), ou seja, não foram encontradas secções transversais que abrigassem estádios completamente distintos, neste sentido os múltiplos estádios podem representar na verdade fases de transição de um estádio tardio de desenvolvimento para um estádio mais avançado.

Das secções transversais que apresentavam mais de um estádio do CES nos indivíduos de *C. geoffroyi* estudados, apenas o caso da associação entre os estádios III e V foi observado como não sequencial, esse fato pode estar relacionado com a rapidez dos eventos observados durante o estádio IV. Ou seja, os eventos envolvidos nas divisões meióticas durante o estádio IV, como a formação das placas metafásicas e de espermatócitos secundários, podem não ser captados em toda a secção transversal do túbulo nas áreas de transição entre segmentos, levando à presença de porções do epitélio ainda no estádio III e já no estádio V.

O simples fato dos saguis-da-cara-branca estudados apresentarem secções transversais com múltiplos estádios pode não caracterizar uma espermatogênese do tipo helicoidal. Em análise das fotografias apresentadas em trabalhos com outras espécies do gênero *Callithrix* (Millar et al., 2000; Leal e França, 2006) esse parece também ser o caso, uma vez que praticamente todos os registros apresentados referem-se a estádios subsequentes de desenvolvimento. Assim, os múltiplos estádios encontrados em uma mesma secção transversal de túbulo seminífero podem, nos animais do gênero *Callithrix*, ser consequência de: um atraso da comunicação entre as células de Sertoli em segmentos adjacentes; ou mesmo da presença de segmentos menores ao longo do túbulo seminífero, sendo neste caso mais frequente a captura de estádios transicionais.



**Figura 2:** Cortes de túbulo seminífero de *Callithrix geoffroyi* contendo vários estádios sequenciais por secção transversal. (A) estádios I, II e III; (B) estádios III e V. Azul de toluidina. Objetiva de 40x.

## CONCLUSÃO

Os oito estádios do CES descritos para o *C. geoffroyi*, segundo o método da morfologia tubular, apresentaram de modo geral organização semelhante à apresentada para outros mamíferos. Durante o CES, os estádios correspondentes à fase pré-meiótica apresentaram frequência relativa de 67,6%, enquanto aqueles correspondentes à fase pós-meiótica 25,5 %. A fase meiótica foi caracterizada como a mais rápida do processo espermatogênico, apresentando frequência relativa de 7,0%.

Em torno de 60% das secções transversais de túbulo seminífero do sagui-da-cara-branca apresentaram apenas um único estádio do CES, sendo que naquelas em que se observou dois ou três estádios (40%) estes apresentavam-se organizados de forma sequencial de desenvolvimento, correspondendo a porções transicionais na evolução da onda espermatogênica, neste sentido sugere-se que a espermatogênese do gênero *Callithrix* se aproxime mais do arranjo do tipo segmentar do que helicoidal.

## REFERÊNCIAS

- Almeida, L.M.; Weiss, R.R.; Castro, C.S.; Büchele, J. (2000) Quantificação histológica da espermatogênese de ratos Wistar tratados com dimetil sulfóxido. Archives of Veterinary Science, n.5, v.1, p.129-135.
- Amann R.P.; Schanbacher B.D. (1983) Physiology of male reproduction. Journal of Animal Science, n. 57, v.2, p.380-403.
- Berndtson, W.E. (1977) Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. Journal of Animal Science, n.44, v.5, p.818-83.
- Bitencourt, V.L.; Paula, T.A.R.; Matta, S.L.P.; Fonseca, C.C.; Anjos, L.B.; Costa, D.S. (2007) The seminiferous epithelium cycle and daily spermatid production in the adult maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1811). Micron, n.38, v.6, p.584-589.
- Carpenter, J.W. (2005) Exotic animal formulary. Elsevier Saunders, 3ed. 564p.
- Castro, A.C.S.; Berndtson, W.E.; Cardoso, F.M. (1997) Cinética e quantificação da espermatogênese: bases morfológicas e suas aplicações em estudos da reprodução de mamíferos. Revista Brasileira de Reprodução Animal, n.21, v.1, p.25-34.
- Cheng, C.Y.; Mruk, D.D. (2002) Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. Physiological reviews, n.82, v.4, p.825-874.
- Clermont, Y. (1972) Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. Physiological reviews, n.52, v.1, p.198-236.

- Costa, D.S.; Paula, T.A.R. (2003) Espermatogênese em mamíferos. Vila Velha: Scientia, n.4, v.1-2, p.53-72.
- 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 (*Panthera onca*). *Theriogenology*, n.70, v.7, p.1136-1146.
- França, L.R.; Russell, L.D. (1998) The testis of domestic animals In: Regadera, J.M.G. (eds). *Male reproduction: A multidisciplinary overview*. Madrid: Churchill Livingstone. p.197-219.
- França, L.R.; Godinho, C.L. (2003) Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). *Biology of Reproduction*, n.68, v.5, p.1554-1561.
- Guraya, S.S. (1987) *Biology of spermatogenesis and spermatozoa in mammals*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 430p.
- Hearn, J.P. (1983) The common marmoset (*Callithrix jacchus*). In: Hearn, J.P. *Reproduction in new world primates*. Lancaster: MTP Press, p.181-251.
- Hecht, N.; Behr, R.; Hild, A.; Bergmann, M.; Weidner, W.; Steger, K. (2008) The common marmoset (*Callithrix jacchus*) as a model for histone and protamine expression during human spermatogenesis. *Human reproduction*, n.24, v.3, p.536-545.
- Hess, R.A. (1990) Quantitative and qualitative characteristics of the stages and transitions in the cycle of the rat seminiferous epithelium: light microscopic observations of perfusion-fixed and plastic-embedded testes. *Biology of reproduction*, n.43, v.3, p.525-542.
- Jones, R.C.; Lin, M. (1993) Spermatogenesis in birds. In: Milligan, S.R. *Oxford reviews of reproductive biology*, v.15, p.233-264.
- Karnovsky, M.J. (1965) A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of cellular Biology*, v.27, p.137-139.
- Leal, M.C.; França, L.R. (2006) The seminiferous epithelium cycle length in the black tufted-ear marmoset (*Callithrix penicillata*) is similar to humans. *Biology of reproduction*, n.4, v.74, p.616-624.
- Leblond, C.P.; Clermont, Y. (1952) Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Annals of the New York Academy of Sciences*, n.55, v.1, p.548-573.
- Lin, M.; Jones, R.C. (1990) Spatial arrangement of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the Japanese quail, *Coturnix coturnix japonica*. *Journal of reproduction and fertility*, n.90, v.2, p.361-367.

- Millar, M.R.; Sharpe, R.M.; Weinbauer, G.F.; Fraser, H.M.; Saunders, P.T. (2000) Marmoset spermatogenesis: organizational similarities to the human. *International journal of andrology*, n.23, v.5, p.266-277.
- Morais, D.B.; Puga, L.C.H.P.; Paula, T.A.R.; Freitas, M.B.D.; Matta, S.L.P. (2017) The spermatogenic process of the common vampire bat *Desmodus rotundus* under a histomorphometric view. *PloS one*, n.3, v.12.
- Paula, T.A.R.; Chiarini-Garcia, H.; França, L.R. (1999) Seminiferous epithelium cycle and its duration in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). *Tissue and Cell*, n.31, v.3, p.327-334.
- Perey, B.; Clermont, Y.; Leblond, C.P. (1961) The wave of the seminiferous epithelium in the rat. *Developmental Dynamics*, n.108, v.1, p.47-77.
- Pudney, J. (1993) Comparative cytology of the non-mammalian Sertoli cell. In: Russell, L.D.; Griswold, M.D. (eds). *The Sertoli Cell*. Clearwater: Cache River Press, p.611-657.
- Pudney, J. (1995) Spermatogenesis in non-mammalian vertebrates. *Microscopy research and technique*, n.32, v.6, p.459-497.
- Ren, H.P.; Russell, L.D. (1991) Clonal development of interconnected germ cells in the rat and its relationship to the segmental and subsegmental organization of spermatogenesis. *American journal of anatomy*, n.192, v.2, p.121-128.
- Roosen-Runge, E.C. (1962) The process of spermatogenesis in mammals. *Biological reviews*, n.37, v.3, p.343-376.
- Russell, L.D.; Ettlin, R.A.; Hikim, A.P.S.; Clegg, E.D. (1990) *Histological and histopathological evaluation of the testis*, Florida: Cache River Press. 286p.
- Schulze, W.; Rehder, U. (1984) Organization and morphogenesis of the human seminiferous epithelium. *Cell and tissue research*, n.237, v.3, p.395-407.
- Silva, R.C.; Costa, G.M.J.; Andrade, L.M.; França, L.R. (2010) Testis stereology, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in the ocelot (*Leopardus pardalis*). *Theriogenology*, n.73, v.2, p.157-167.
- Smithwick, E.B.; Young, L.G. (1996) Germ cell maturation and cellular associations in the seminiferous epithelial cycle of the chimpanzee. *Tissue and Cell*, n.28, v.2, p.137-148.