

**ANA CAROLINA TORRE MORAIS**

**HISTOMORFOMETRIA TESTICULAR E CICLO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO  
NOS ROEDORES SILVESTRES *Oxymycterus rufus* E *Oxymycterus nasutus*  
(RODENTIA: CRICETIDAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2014**

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

T

M827h  
2014

Morais, Ana Carolina Torres, 1983-  
Histomorfometria testicular e ciclo do epitélio seminífero  
nos roedores silvestres *Oxymycterus rufus* e *Oxymycterus  
nasutus* (Rodentia: Cricetidae) / Ana Carolina Torres Moraes. –  
Viçosa, MG, 2014.  
xii, 83 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Sergio Luis Pinto da Matta.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Espermatogênese em animais. 2. Histologia. 3. Roedor.  
4. *Oxymycterus rufus*. 5. *Oxymycterus nasutus*. I. Universidade  
Federal de Viçosa. Departamento de Biologia Geral. Programa  
de Pós-Graduação Biologia Celular e Estrutural. II. Título.

CDD 22. ed. 599.35

**ANA CAROLINA TORRE MORAIS**

**HISTOMORFOMETRIA TESTICULAR E CICLO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO  
NOS ROEDORES SILVESTRES *Oxymycterus rufus* E *Oxymycterus nasutus*  
(RODENTIA: CRICETIDAE)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

APROVADA: 28 de março de 2014.

---

João Bosco Gonçalves de Barros

---

Fabiana Cristina Silveira Alves de Melo

---

Clóvis Andrade Neves

---

Juliana Silva Rocha

---

Sérgio Luis Pinto da Matta  
(Orientador)

O essencial não será tanto o que reténs.  
É o que dás de ti mesmo e a maneira como.  
    Não é tanto o que recebes.  
    É o que distribuis e como distribuis.  
    Não é tanto o que colhes.  
    É o que semeias e para que semeias.  
    Não é tanto o que esperas.  
    É o que realizas.  
    Não é tanto o que rogas.  
    É o que aceitas.  
    Não é tanto o que reclamas.  
    É o que suportas e como suportas.  
    Não é tanto o que falas.  
    É o que sentes e como sentes.  
    Não é tanto o que perguntas.  
    É o que aprendes e para que aprendes.  
    Não é tanto o que aconselhas.  
    É o que exemplificas.  
    Não é tanto o que ensinas.  
    É o que fazes e como fazes.  
Em suma, na vida do espírito, o essencial não é o que parece.  
O essencial será sempre aquilo que é.

Chico Xavier

Dedico esta tese a todos aqueles que amo, em especial:

Meus pais, J3sus e Graça;

Minhas irm3es, Adriana e Yasmim;

Ao Talles;

Ao Kayo (Pititico lindo!); e

Às verdadeiras amizades que perduram até hoje!!!

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela oportunidade de mais esta encarnação e por me permitir resgatar e aprender!

Aos meus amados pais, Jésus e Graça, por tudo que fizeram e fazem por mim até hoje. O amor incondicional de vocês me protege, me fortalece, me faz crescer e querer ser uma pessoa melhor a cada dia! Sem vocês eu não seria nada e não chegaria até aqui!!!

À minha querida avó Tide, que apesar dos seus 90 anos, partiu precocemente da minha vida... Esta conquista seria mais uma a dividir com você, minha coisa linda!!!

Às minhas irmãs, Adriana e Yasmim, e ao meu cunhado Fernando, pelo carinho e apoio durante toda esta jornada. Amo vocês!

Ao Talles, meu amor companheiro, por todo carinho, paciência, respeito e amizade. Você me faz muito feliz!!! Te amo japonês!

Aos amigos da graduação ao doutorado: Ariane, Danielle, Marcos, Maytê, Michele e Mônica. Vocês são especiais!!!

Às amigas da verdadeira república Aloha: Amanda Ribeiro, Ana Cristina, Ariane, Camila, Fernanda, Karine, Lenise e Mayra! Viçosa não seria a mesma coisa sem vocês!!!

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, pela oportunidade de realização do doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos, fundamental nestes quatro anos!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento que proporcionou a realização deste projeto.

À ONG Ambiente Brasil pelo apoio ao projeto e pela logística de amostragem.

Aos professores do departamento de Biologia Geral que compartilharam conhecimento, experiência e profissionalismo. Em especial a Izabel, Juliana, Sérgio, Leandro Licursi e à professora Gisele Lessa do departamento de Biologia Animal. No momento mais difícil da minha vida vocês me deram o tempo que precisava e o apoio para continuar minha caminhada! Muito obrigada!!!

Ao Sérgio Luis Pinto da Matta. Você foi mais que um orientador, foi pai, amigo e conselheiro. Acreditou em mim quando até eu duvidei! Muito obrigada por tudo!

Aos professores do Laboratório de Biologia Estrutural: Adilson Ariza Zácara, Clóvis Andrade Neves, Izabel Regina dos Santos Costa Maldonado, Juliana Silva Rocha, Mariana Machado Neves e Sérgio Luis Pinto da Matta. Obrigada por compartilharem mais que o saber e pelo privilégio da convivência com vocês.

À Ju (professora) por todos os momentos de alegrias, tristezas e pelos ensinamentos da vida. Aprendi e cresci muito com você!

Ao laboratorista Matheus Rangel Jotta da Silva por todo auxílio sempre que necessário e durante o experimento.

Aos amigos do laboratório Ana Cláudia, Ana Paula, Arlete, Bruno, Camila, Claudinha, Daiane, Danielle, Diane, Edson, Fabíola, Graziela, Glenda, Helen, Ítalo, Juliana Silveira, Kenner, Kyvia, Marcos, Mariana, Marli, Marta, Matheus, Maytê, Michele, Pamella, Priscila, Rômulo, Stéphanie, Suellen, Susana e Tatiana. Obrigada por compartilhar toda labuta da rotina laboratorial e pelos momentos de descontração.

À equipe do projeto de roedores silvestres: Elizabeth, Fausto, Maytê e Tatiana. Muitos outros ajudaram e sou muito grata, mas vocês permaneceram e foram até o fim! Esta tese também é de vocês!!!

Ao Fernando Marques Quintela pela parceria e coleta dos espécimes de *Oxymycterus nasutus*.

À Elizabeth Lopes de Oliveira por todo comprometimento com este projeto e ajuda em diversos momentos.

Ao Marcos de Lucca por todo incentivo e auxílio na reta final!

À Mariana Moraes pelo auxílio com a imunohistoquímica, conversas e incentivo. Apesar de nossa consanguinidade, nos tornamos primas em Viçosa. Valeu Mari!

Aos professores Jorge Abdala Dergam dos Santos e Sílvia das Graças Pompolo por gentilmente disponibilizarem o fotomicroscópio para capturas de imagens.

Aos funcionários do Núcleo de Microscopia e Microanálise, Karla, Gilmar e Arthur pela disponibilidade e ajuda de sempre.

À Dani, Marcos e Tati pelo auxílio com o material para a microscopia eletrônica.

A todos os espécimes de roedores coletados que contribuíram com suas vidas para realização deste trabalho, muito obrigada!

À secretária da pós-graduação do departamento de Biologia Geral, Beth, pelo profissionalismo e todas as informações relevantes que me auxiliaram nestes quatro anos.

Aos amigos que fiz no Cetas: Eduardo, Juliano, Moacir, Priscilla e Thais. Aprendi muito com todos vocês!!!

Aos professores que aceitaram gentilmente participar da banca examinadora e pela preciosa contribuição que engrandecerão este trabalho.

And last but not least important, a todas as pessoas que fizeram parte da minha história em Viçosa e a esta acolhedora cidade... Foi tudo muito especial e estará para sempre na memória e no meu coração, mas agora preciso ir, pois a Paraíba me aguarda!

## **BIOGRAFIA**

Ana Carolina Torre Morais, filha de J3sus Tarc3sio de Morais e Maria das Gra3as da Torre Morais, nasceu na cidade de Tim3teo, Minas Gerais, em 20 de Maio de 1983.

Graduou-se como Bacharel em Ci3ncias Biol3gicas em Dezembro de 2006, pelo Centro Universit3rio do Leste de Minas Gerais (Unileste, MG), Ipatinga-MG. Durante sua gradua3o desenvolveu trabalhos nas 3reas de morfologia e morfofisiologia reprodutiva, tendo sido bolsista de inicia3o cient3fica por um ano.

Iniciou o curso de Mestrado em Biologia Animal na Universidade Federal de Vi3osa, Vi3osa-MG, em Agosto de 2007, onde desenvolveu trabalhos na 3rea de toxicologia de metais pesados, defendendo a disserta3o em Dezembro de 2009.

Em Mar3o de 2010 ingressou no curso de Doutorado em Biologia Celular e Estrutural na Universidade Federal de Vi3osa, Vi3osa-MG, com defesa da tese em mar3o de 2014.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	xi
<b>1. Introdução</b> .....	1
<b>2. Objetivos</b> .....	2
<b>3. Revisão de Literatura</b> .....	3
<b>3.1. Ordem Rodentia</b> .....	3
<b>3.1.1. Família Cricetidae</b> .....	4
<b>3.1.2. Subfamília Sigmodontinae</b> .....	5
<b>3.1.3. Tribo Akodontini</b> .....	5
<b>3.1.4. O gênero Oxymycterus</b> .....	6
<b>3.2. A organização testicular</b> .....	10
<b>3.3. A espermatogênese</b> .....	12
<b>4. Referências Bibliográficas</b> .....	13
<b>Artigo 1: Morfometria e duração do ciclo do epitélio seminífero do roedor silvestre Oxymycterus rufus (Rodentia: Cricetidae)</b> .....	19
<b>1. Introdução</b> .....	20
<b>2. Materiais e Métodos</b> .....	21
<b>2.1. Coleta dos animais e preparação do tecido</b> .....	21
<b>2.2. Estádios do ciclo do epitélio seminífero (CES)</b> .....	22
<b>2.3. Administração da BrdU e duração do CES</b> .....	22
<b>2.4. Morfometria testicular</b> .....	23
<b>2.5. Contagem das células do epitélio seminífero</b> .....	24
<b>3. Resultados</b> .....	25
<b>3.1. Dados biométricos e morfometria testicular</b> .....	25
<b>3.2. Estádios do ciclo do epitélio seminífero e frequência relativa</b> .....	25
<b>3.3. Ultraestrutura das espermátides</b> .....	30
<b>3.4. Duração do ciclo do epitélio seminífero</b> .....	31
<b>3.5. Contagem das células germinativas</b> .....	31
<b>4. Discussão</b> .....	33
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	39

<b>Artigo 2: Morfometria do compartimento tubular e dinâmica da espermatogênese do roedor silvestre <i>Oxymycterus nasutus</i> (Rodentia: Cricetidae)</b> .....	45
<b>1. Introdução</b> .....	46
<b>2. Materiais e Métodos</b> .....	47
<b>2.1. Coleta dos animais</b> .....	47
<b>2.2. Morfometria e estereologia testicular</b> .....	48
<b>2.3. Estádios do ciclo do epitélio seminífero e frequência relativa</b> .....	48
<b>2.4. Contagem das células germinativas e índices de rendimento</b> .....	49
<b>3. Resultados e Discussão</b> .....	50
<b>3.1. Morfometria e esterologia testicular</b> .....	50
<b>3.2. Ciclo do epitélio seminífero e frequência relativa</b> .....	53
<b>3.3. Ultraestrutura das espermátides</b> .....	59
<b>3.4. Contagem das células germinativas e índices de rendimento</b> .....	61
<b>4. Conclusões</b> .....	64
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	64

<b>Artigo 3: Histomorfometria do compartimento intertubular dos testículos dos roedores silvestres <i>Oxymycterus rufus</i> e <i>Oxymycterus nasutus</i> (Rodentia: Cricetidae)</b> .....	70
<b>1. Introdução</b> .....	71
<b>2. Materiais e Métodos</b> .....	72
<b>2.1. Coleta dos animais</b> .....	72
<b>2.2. Processamento Histológico</b> .....	73
<b>2.3. Morfometria e estereologia testicular</b> .....	73
<b>3. Resultados</b> .....	74
<b>4. Discussão</b> .....	77
<b>5. Conclusões</b> .....	80
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	81
<b>Conclusões Gerais</b> .....	83

## RESUMO

MORAIS, Ana Carolina Torre. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2014.  
**Histomorfometria testicular e ciclo do epitélio seminífero nos roedores silvestres *Oxymycterus rufus* e *Oxymycterus nasutus* (Rodentia: Cricetidae).** Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta.

Os roedores constituem a ordem mais diversificada dos mamíferos e apresentam ampla distribuição mundial sendo encontrados em todos os habitats, desde a tundra ártica aos desertos. Porém, pouco se sabe ainda sobre a reprodução de espécies silvestres, o que justifica a realização deste estudo, visto que roedores, assim como outros mamíferos são peças importantes na dinâmica das florestas nas quais habitam. Assim, objetivou-se descrever o testículo e o processo espermatogênico dos roedores silvestres *Oxymycterus rufus* e *Oxymycterus nasutus*, visando a fornecer informações relevantes sobre a atividade testicular destas espécies. Cinco espécimes de *O. rufus* foram coletados em fragmento de Mata Atlântica em Minas Gerais, e 10 exemplares de *O. nasutus* no bioma Pampa, no Rio Grande do Sul, sendo todos os exemplares machos e sexualmente maduros. A eutanásia foi realizada por meio de superdosagem anestésica e os fragmentos testiculares foram coletados, fixados e processados rotineiramente, sendo destinados às análises em microscopia de luz e eletrônica de transmissão. O peso corporal de *O. rufus* e *O. nasutus* foi, respectivamente, 82,28 e 58,30 g, sendo que 0,47 e 0,89 % destes foram alocados em testículos, 0,40 e 0,82 % em túbulos seminíferos e 0,35 e 0,56 % alocados em epitélio seminífero. O comprimento dos túbulos foi de 34,93 e 18,62 metros por grama de testículo, respectivamente. Os estádios do ciclo do epitélio seminífero seguiram o padrão descrito para outros roedores silvestres. A duração do ciclo do epitélio seminífero foi determinada em *O. rufus*, sendo cada ciclo do epitélio seminífero correspondente a 6,58 dias enquanto todo o processo espermatogênico teve duração de 29,61 dias. O número de células de Sertoli por grama de testículo foi de  $232,40 \times 10^6$  em *O. rufus* e  $91,02 \times 10^6$  em *O. nasutus* e a reserva espermática por grama de testículo foi em média  $962 \times 10^6$  e  $849,64 \times 10^6$  espermátides, respectivamente. O compartimento intertubular ocupou 9,09 e 4,81 % dos testículos de *O. rufus* e *O. nasutus*, respectivamente. A organização dos componentes do compartimento intertubular corresponde ao padrão tipo I descrito por Fawcett. As células de Leydig foram o elemento mais abundante no compartimento intertubular totalizando  $117,23 \times 10^6$  e  $40,77 \times 10^6$  células por grama de testículo em *O. rufus* e *O. nasutus*, respectivamente. O índice

Leydigossomático foi 0,018 e 0,019 % em *O. rufus* e *O. nasutus*, respectivamente. Conclui-se que *O. rufus* e *O. nasutus* apresentam alta eficiência do processo espermatogênico, com elevada proporção de túbulos seminíferos no parênquima testicular, grande quantidade de células de Sertoli por grama de testículo e elevada reserva espermática testicular, demonstrando assim alto investimento energético no compartimento tubular e, conseqüentemente, na produção de espermatozoides. Esse padrão é compatível com animais que apresentam sistema de acasalamento promíscuo.

## ABSTRACT

MORAIS, Ana Carolina Torre. D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2014.  
**Testicular Spermatogenesis histomorphometry and seminiferous epithelium cycle in the wild rodents *Oxymycterus rufus* and *Oxymycterus nasutus* (Rodentia: Cricetidae).** Advisor: Sérgio Luis Pinto da Matta.

The rodents are the most diverse order of mammals. They are distributed worldwide, from arctic tundra to deserts. However, little is known about the reproduction of wild species, since rodents, as well as other mammals, are important parts in the dynamics of the forests they inhabit. Thus, the objective of the present study was to describe the process of spermatogenesis of the wild rodents *Oxymycterus rufus* and *Oxymycterus nasutus* in order to provide relevant information on testicular activity of these species. Five adult specimens of *O. rufus* were collected in an Atlantic Forest fragment, whereas 10 adult *O. nasutus* were collected in a Pampa biome. Euthanasia was performed by anesthetic overdose and testicular fragments were collected, fixed and routinely processed, being analyzed under light and transmission electron microscopy. The body weight of *O. rufus* and *O. nasutus* were 82.28 and 58.30 g, respectively, whereas 0.47 and 0.89 % of these were allocated into testes and 0.40 and 0.82 % into seminiferous tubules. The proportions of seminiferous epithelium were 0.35 to 0.56 %, respectively. The length of the seminiferous tubules were 34.93 and 18.62m/g, for *O. rufus* and *O. nasutus*, respectively, and the stages of the seminiferous epithelium cycle followed the pattern described for other wild rodents. For *O. rufus*, the duration of the seminiferous epithelium cycle was determined, being each cycle corresponding to 6.58 days while all the spermatogenic process lasted 29.61 days. The number of Sertoli cells per gram of testis was  $232.40 \times 10^6$  and  $91.02 \times 10^6$  in *O. rufus* and *O. nasutus* respectively, and the daily sperm reserve was  $962 \times 10^6$  and  $849.64 \times 10^6$ , respectively. The interstitium occupied 9.09 and 4.81 % of the testes of *O. rufus* and *O. nasutus*, respectively, and followed the type I organization pattern described by Fawcett. The Leydig cells were the most abundant element in the interstitium ( $117.23 \times 10^6$  per gram of testis in *O. rufus* and  $40.77 \times 10^6$  per gram of testis in *O. nasutus*), and the leydigomatic indexes were 0.018 and 0.019 % in *O. rufus* and *O. nasutus*, respectively. Therefore, we concluded that *O. rufus* and *O. nasutus* show high efficiency of spermatogenesis with high proportion of seminiferous tubules in the testicular parenchyma, abundant Sertoli cells per gram of

testis and high sperm reserve, thus demonstrating high energy investment in sperm production, which is compatible with animals displaying promiscuous mating system.

## 1. Introdução

Com cerca de 2280 espécies em todo o mundo, os roedores representam quase a metade dos mamíferos, constituindo a maior ordem da classe Mammalia. Ocorrem naturalmente em todos os continentes, exceto na Antártida, sendo encontrados também em ilhas (Sigrist, 2012). No Brasil, foram registrados 74 gêneros e 238 espécies de roedores, os quais se caracterizam por suas dimensões externas, coloração e tipo de pelagem (Reis et al., 2006; Reis et al., 2010).

Os roedores desempenham diversas funções ecológicas importantes nas florestas neotropicais e em outros habitats, contribuindo diretamente na dinâmica e na troca de energia dos ecossistemas, atuando como predadores, presas e consumidores primários, além de contribuírem para a ecologia vegetal na dispersão de sementes (Kuhnen et al., 2011).

São excelentes modelos animais para o estudo de doenças. Aproximadamente 95% dos animais utilizados em pesquisa são camundongos ou ratos. Camundongos transgênicos e knock-out representam linhagens geneticamente modificadas que são usadas em uma variedade de pesquisas sobre doenças humanas, como doenças de Parkinson, câncer e doenças cardíacas, sendo também utilizadas em testes de fármacos (Hutchins et al., 2004). Além da utilização de roedores em pesquisas voltadas à saúde humana, os roedores silvestres, devido à sua diversidade e facilidade de serem amostrados sistematicamente, tornaram-se modelos muito úteis para o estudo de fatores que afetam a diversidade de espécies em uma determinada área. Roedores, de maneira geral, não possuem a capacidade de ultrapassar grandes barreiras ambientais. Além disso, eles requerem áreas relativamente pequenas para manterem populações viáveis, facilitando o trabalho de amostragem (Herrmann, 1991).

A biologia reprodutiva das espécies fornecem informações importantes que podem auxiliar na conservação das mesmas (Paula et al., 2002), sendo que este conhecimento pode ser obtido a partir da quantificação histológica das gônadas, consistindo em um requisito básico para estudos que envolvam parâmetros reprodutivos (Guião-Leite et al., 2006). Além disso, a composição do parênquima testicular pode fornecer informações importantes sobre a fisiologia reprodutiva e o sistema de acasalamento de uma determinada espécie (Kenagy e Trombulak, 1986).

Nos últimos anos tem sido crescente o número de estudos que envolvem a biologia reprodutiva de roedores silvestres (Paula et al., 2002; Boiani et al., 2007; Cordeiro Júnior, 2009; Costa et al., 2010; Menezes, 2010; Santos et al., 2011; Carretta Júnior, 2012; Balarini, 2013; Melo et al., 2013). Entretanto, devido à grande diversidade

e ampla distribuição, muito pouco ainda é sabido acerca da reprodução das destes animais, o que justifica a realização deste estudo, lembrando que os roedores são peças importantes na dinâmica das florestas que habitam.

## 2. Objetivos

Neste estudo, objetivou-se descrever o testículo e o processo espermatogênico nos roedores silvestres *Oxymycterus rufus* e *Oxymycterus nasutus*, dando ênfase tanto ao compartimento tubular quanto o intertubular. Para isso, as seguintes análises morfométricas foram realizadas:

- Diâmetro dos túbulos seminíferos e altura do epitélio seminífero;
- Proporção volumétrica e volume dos componentes do parênquima testicular;
- Comprimento de túbulos seminíferos por testículo e por grama de testículo;
- Índice Gonadossomático;
- Índice Tubulossomático;
- Índice Epiteliossomático;
- Caracterização dos estádios do ciclo do epitélio seminífero e suas frequências relativas;
- Estimativa da população celular do epitélio seminífero:
  - Contagem de células do epitélio seminífero no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero (CES);
  - Mensuração dos diâmetros nucleares das células espermatogênicas e nucleolares das células de Sertoli no estágio 1 do CES;
- Rendimento intrínseco da espermatogênese:
  - Coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais;
  - Rendimento meiótico;
  - Rendimento geral da espermatogênese;
- Índice de células de Sertoli;
- Capacidade de suporte total das células de Sertoli;
- Número de células de Sertoli por testículo e por grama de testículo;
- Reserva espermática testicular;
- Duração do ciclo do epitélio seminífero;
- Produção espermática diária;
- Caracterização ultraestrutural das espermátides;
- Proporção volumétrica e volume dos componentes intertubulares;
- Diâmetro nuclear das células de Leydig;

- Proporção citoplasmática e nucleoplasmática das células de Leydig;
- Volume nuclear, citoplasmático e celular de Leydig;
- Número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo;
- Índice Leydigossomático.

### **3. Revisão de Literatura**

#### **3.1. Ordem Rodentia**

Os roedores constituem a ordem mais diversificada dos mamíferos, representando cerca de 44% das espécies dentro desta classe, sendo descritos no Brasil 74 gêneros e 238 espécies (Reis et al., 2010). Paleontologicamente, a ordem Rodentia tem aproximadamente 57 a 60 milhões de anos e datada no período do Paleoceno. A família mais antiga desta ordem é a Paramyidae e seus representantes eram roedores parecidos com esquilos (Hutchins et al., 2004). Aparentemente, os roedores primitivos evoluíram separadamente durante milhões de anos. Registros fósseis de roedores pertencentes à subordem Miomorfa, encontrados na América do Norte, datam de aproximadamente 25 milhões de anos. Enquanto, representantes da subordem Histricomorfa, os quais evoluíram na América do Sul, possui fósseis que datam de cerca de 35 milhões de anos (Sigrist, 2012).

A ordem Rodentia apresenta ampla distribuição mundial, com espécies encontradas em todos os habitats, desde a tundra ártica aos desertos (Honeycutt, 2004). Os representantes atuais desta ordem demonstram consideráveis variações no tamanho, desde espécies como o rato pigmeu (*Baiomys taylori*) medindo apenas poucos centímetros de comprimento, a roedores como a capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) que alcança aproximadamente 100 cm de comprimento e pesa cerca 50 kg. Entretanto, em linhagens já extintas, roedores da família Dinoyidae podiam pesar de 400 a 600 kg (Hutchins et al., 2004).

Roedores são caracterizados, sobretudo, por sua distinção original: a dentição. Os dentes mais importantes são os quatro incisivos, dois superiores e dois inferiores, que têm crescimento contínuo, e são, simultaneamente, desgastados quando raspam uns contra os outros e contra os alimentos duros que prevalecem na maioria das dietas dos roedores (Sigrist, 2012). Estes caracteres possibilitam a manipulação otimizada do alimento pelos incisivos, bem como a capacidade de roer, que é típica do grupo (Reis et al., 2010).

Em relação aos hábitos alimentares, muitas espécies de roedores são herbívoras e se alimentam de uma variedade de materiais de origem vegetal. Além destes, alguns

roedores como os do gênero *Onychomys* e *Oxymycterus* são insetívoros, enquanto outros se alimentam de insetos aquáticos, moluscos e peixes (Hutchins et al., 2004).

Todos os roedores têm agudo senso de olfato, o que é particularmente importante na comunicação e reprodução, pois odores de glândulas e urina podem revelar aos machos que fêmeas estão sexualmente receptivas (Sigrist, 2012). O sistema de reprodução em roedores varia dependendo da espécie, sendo muitos destes promíscuos. Recentes estudos genéticos confirmaram alta incidência de paternidade múltipla em muitas espécies promíscuas (Waterman, 2007).

Roedores proporcionam benefícios diretos e indiretos aos seres humanos. Desempenham diversas funções que são importantes para os ecossistemas em que vivem, atuando como dispersores de sementes, polinizadores de flores, predadores de invertebrados e também como alimento para uma grande quantidade de animais (Freitas e Silva, 2005). Além de servir como modelos de pesquisa, muitos roedores são animais de estimação populares, como ratos, camundongos, gerbil, hamsters e porquinhos da Índia. Roedores também são consumidos na alimentação humana em algumas partes do mundo, como no Equador, Peru e outros países sul-americanos (Hutchins et al., 2004). Entretanto, estes animais são potenciais reservatórios naturais de agentes causadores de doenças, com diferentes graus de risco para os seres humanos (Villafane et al., 2005).

A associação de roedores com a epidemiologia de diferentes patógenos tais como bactérias, vírus e parasitas diversos, é favorecida principalmente pela alta capacidade de dispersão e potencial reprodutivo dos mesmos, em particular para as espécies sinantrópicas. Em relação aos roedores silvestres, a febre hemorrágica e a síndrome pulmonar por hantavírus são zoonoses virais cujos reservatórios naturais têm sido identificados em espécies de roedores sigmodontíneos. No primeiro caso, o principal reservatório são espécies do gênero *Calomys*. Já a síndrome pulmonar por hantavírus é causada por diferentes linhagens do vírus e tem sido geralmente associada a roedores do gênero *Oligoryzomys* (Villafane et al., 2005).

### **3.1.1. Família Cricetidae (Rochebrune, 1883)**

A família Cricetidae é a mais diversificada dentre os roedores de ocorrência no Brasil, abrangendo 117 espécies, distribuídas em 36 gêneros, todos agrupados em uma única subfamília neotropical, a Sigmodontinae (Reis et al., 2006). Além desta subfamília, que compreende a maioria dos roedores da América do Sul, há também a Neotominae, com representantes na América do Norte (Kasahara e Yonenaga-Yassuda, 1984).

### **3.1.2. Subfamília Sigmodontinae (Wagner, 1843)**

Os sigmodontíneos são roedores de pequeno a médio porte que pesam entre 7 a 455 gramas. São extremamente diversificados quanto à forma do corpo, e a maioria destes possui hábitos terrestres, mas há espécies arbóreas, fossoriais e semiaquáticas. A maioria é ativa durante todo o ano, mas aqueles que habitam climas mais frios podem entrar em torpor durante os períodos frios. Nesta subfamília podem-se encontrar espécies de hábitos noturnos, diurnos, crepusculares ou ainda ativos a qualquer hora do dia e da noite (Sigrist, 2012). Os gêneros mais comuns desta subfamília são: o rato-canela *Orizomys* sp., de porte mediano e coloração amarelada ou avermelhada; o rato-do-mato *Oligoryzomys* sp., espécie de cor parda ou cinza escuro, muito pequena, do porte de um camundongo doméstico, com a cauda maior que o corpo; o rato-de-rabo-curto *Akodon* sp., espécie de cor escura e bem caracterizada por possuir a cauda pequena, geralmente pouco mais da metade do tamanho corporal; e o rato-da-caatinga *Wiedomys pyrrhorhinos* (Wied, 1821), espécie pequena que habita as caatingas e cerrados e que possui patas, orelhas e focinho alaranjados bem típicos do gênero (Freitas e Silva, 2005).

A maioria dos sigmodontíneos usa algum tipo de abrigo na forma de tocas, as quais são cavadas debaixo de pedras, troncos ou acima da terra em arbustos, fendas entre rochas ou ocos de árvores. Algumas espécies são territoriais e agressivas, outros vivem em abrigos coloniais com vários membros da mesma espécie. Há uma variedade de alimentos consumidos pelos sigmodontíneos, incluindo: gramíneas, sementes, frutos, fungos, insetos, crustáceos, outros artrópodes, moluscos, vermes, pequenos peixes, girinos, aves e seus ovos (Reis et al., 2010; Sigrist, 2012).

### **3.1.3. Tribo Akodontini**

A tribo Akodontini teve sua história inicialmente escrita por Felix de Azara em 1801 quando este descreveu *Rat roux* (Montes, 2007). Os akodontinos são roedores pertencentes à superfamília Muroidea, família Cricetidae, subfamília Sigmodontinae, e possuem tamanho corporal de pequeno a médio. Os hábitos alimentares são onívoros ou insetívoros, e o cariótipo constituído por no máximo 54 cromossomos. Além da tribo Akodontini, há outras duas tribos, *Oryzomyini* e *Phyllotini*, e estas seriam as três principais tribos da subfamília Sigmodontinae (Reig, 1987).

Atualmente, apenas 39 dos 74 gêneros reconhecidos para a tribo Akodontini possuem registro fóssil entre o Mioceno e o Holoceno. O registro fóssil dos sigmodontíneos não se restringe à América do Sul, sendo encontrado também na América do Norte e nas Antilhas (Pardinas et al., 2002).

Em relação à distribuição dos akodontinos acreditava-se que seria predominantemente andina, habitando principalmente regiões abertas. No entanto, algumas espécies são tipicamente de florestas tropicais e subtropicais e outras são encontradas em ambientes temperados (Montes, 2007). Reig (1987), analisando dados referentes às espécies e gêneros das tribos da subfamília Sigmodontinae, sugeriu que a Cordilheira dos Andes teria sido o eixo principal de dispersão, de norte a sul, destas tribos. Assim, os Oryzomyini apresentariam alta diversidade no norte dos Andes e os Akodontini e Phyllotini na região central dos Andes.

#### **3.1.4. O gênero *Oxymycterus* (Waterhouse, 1837)**

Animais pertencentes a este gênero são considerados de tamanho pequeno a médio, dentre os cricetídeos. Apresentam comprimento do corpo de 9,3 cm a 17 cm, comprimento da cauda de 7 a 14,5 cm e peso médio de 88g (Reis et al., 2010). A pelagem do corpo é longa com aspecto aveludado e a coloração do dorso varia de cinza-escuro, castanho-avermelhado a castanho-amarelado. Já as laterais do corpo são progressivamente mais claras em direção ao ventre, com o qual não há limites definidos. A coloração do ventre varia entre as diferentes espécies, de cinza-amarelado a laranja-escuro. As orelhas são recobertas por pelos curtos escuros, mais escassos na superfície externa. As garras são bem desenvolvidas e o focinho é longo, sendo estas as características comuns a todos os *Oxymycterus* (Gonçalves e Oliveira, 2004; Reis et al., 2010; Sigrist, 2012).

Os roedores *Oxymycterus* têm hábito semi-fossorial, com a dieta especializada em insetos, representando cerca de 70% desta, sendo os cupins os mais representativos (25%). Outros invertebrados também fazem parte da dieta, como anelídeos, aracnídeos, além de pequenos vertebrados, como filhotes de várias espécies (Reis et al., 2010). Habitam bordas de mata em formações florestais e áreas abertas, tais como veredas e campo de altitude no Cerrado, Caatinga, Floresta Amazônica e Mata Atlântica. Não são roedores comuns como outros sigmodontíneos, mas podem ser abundantes localmente (Bonvicino et al., 2005). A respeito de suas características reprodutivas, Reis et al. (2010) relatam que as espécies deste gênero atingem a maturidade sexual após 3 meses de vida e apresentam atividade reprodutiva contínua, independente da estação do ano, nascendo de 2 a 3 filhotes por ninhada, porém uma ninhada com 6 crias já foi observada.

No Brasil, são registradas nove espécies deste gênero, são elas: *O. amazonicus* (Hershkovitz, 1994), *O. caparaoe* (Hershkovitz, 1998), *O. dasytrichus* (Schinz, 1821), *O. delator* (Thomas, 1903), *O. inca* (Thomas, 1900), *O. judex* (Thomas, 1909), *O. nasutus*

(Waterhouse, 1837), *O. quaestor* (Thomas, 1903) e *O. rufus* (Fischer, 1814) (Reis et al., 2006; Reis et al., 2010).

De acordo com a lista da Iucn Red List (2014), as espécies de *Oxymycterus* que ocorrem no Brasil estão classificadas na categoria “pouco preocupante”, com exceção de *O. judex* que não consta na lista (Reis et al., 2010).

### ***Oxymycterus rufus* (Fischer, 1814)**

De acordo com Bonvicino et al. (2008) *O. rufus* (Figura 1) tem ocorrência tanto na Argentina quanto no Brasil. Entretanto, Gonçalves e Oliveira (2004) relatam que no Brasil, esta espécie foi registrada apenas em poucas localidades do sudeste do estado de Minas Gerais (Figura 2). Contrapondo o descrito acima, a distribuição relatada pela IUCN (2014) é que esta espécie ocorre apenas na Argentina (Figura 3).



Figura 1. Espécime de *Oxymycterus rufus* coletado em fragmento de Mata Atlântica em Minas Gerais.

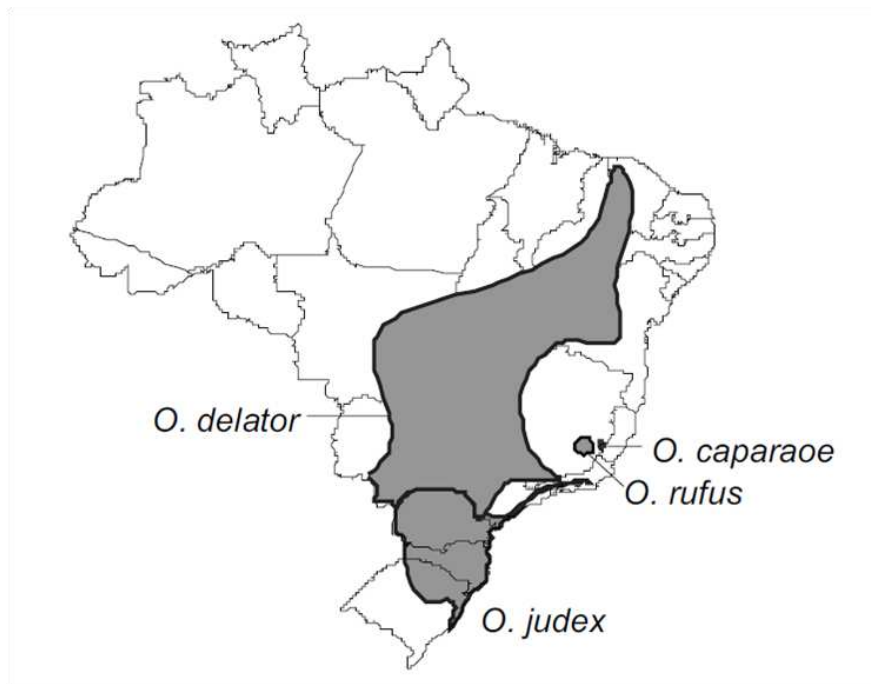


Figura 2. Mapa de distribuição de *Oxymycterus rufus* de acordo com o Guia dos Roedores do Brasil (Bonvicino et al., 2008).



Figura 3. Mapa de distribuição de *Oxymycterus rufus* de acordo com a IUCN (Iucnredlist, 2014a).

### ***Oxymycterus nasutus* (Waterhouse, 1837)**

A distribuição de *O. nasutus* (Figura 4) abrange o Uruguai e o Brasil, onde pode ser encontrado na região Sul. No Sul, ocorre no Rio Grande do Sul, do nível do mar até

altitudes elevadas da Serra Geral, além de Santa Catarina e no Paraná (Bonvicino et al., 2008) (Figuras 5 e 6).



Figura 4. Espécime de *Oxymycterus nasutus* coletado no bioma Pampa, Rio Grande do Sul.

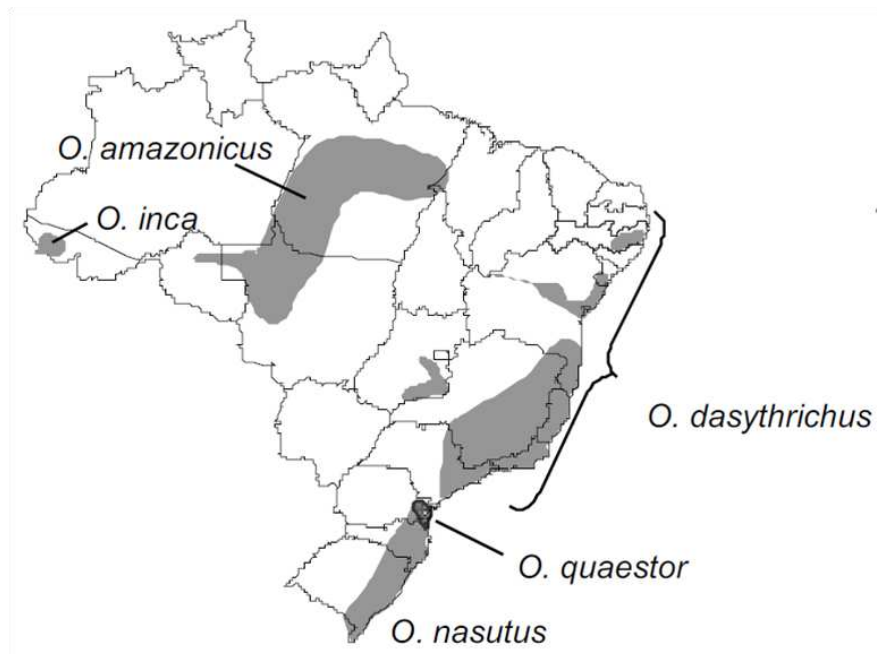


Figura 5. Mapa de distribuição de *Oxymycterus nasutus* de acordo com o Guia dos Roedores do Brasil (Bonvicino et al., 2008).



Figura 6. Mapa de distribuição de *Oxymycterus nasutus* de acordo com a IUCN (Iucnredlist, 2014b).

### 3.2. A organização testicular

O testículo é um órgão par, geralmente localizado no escroto e envolto por espessa cápsula de tecido conjuntivo, denominada albugínea testicular. A albugínea, por sua vez, emite septos para o interior desse órgão até a região do mediastino testicular, dividindo, assim, o testículo em lóbulos. No testículo dos mamíferos distinguem-se, do ponto de vista morfofuncional, dois compartimentos principais: o compartimento tubular ou espermatogênico e o compartimento intertubular ou androgênico (Russell et al., 1990).

O compartimento tubular, constituído pelos túbulos seminíferos, ocupa a maior parte do testículo dos mamíferos, sendo relatado para a maioria destes num percentual de 60 a 90 % do parênquima testicular (França e Russell, 1998). Os túbulos seminíferos são constituídos, de fora para dentro, pela túnica própria, epitélio seminífero e lume tubular. A túnica própria reveste o túbulo seminífero, sendo esta composta por células mioides ou peritubulares juntamente com a membrana basal. No epitélio seminífero são encontradas tanto as células germinativas originárias do epiblasto, quanto as células de Sertoli provenientes do epitélio celomático (Karl e Capel, 1998). As células mioides fornecem, juntamente com a membrana basal, a sustentação estrutural na qual as células de Sertoli e as células do ambiente basal se apoiam (Russell et al., 1990).

O epitélio seminífero pode ser dividido funcionalmente em dois ambientes (Costa et al., 2011), por meio das junções de oclusão entre as diversas células de Sertoli que o compõe: o ambiente basal, onde se localizam as espermatogônias e os espermatócitos primários na fase inicial da prófase meiótica (fase de preleptóteno), e o ambiente adluminal, no qual se encontram os espermatócitos primários a partir da fase de leptóteno, espermatócitos secundários e espermátides. Desta forma, as células de Sertoli propiciam ao ambiente adluminal uma microrregião isolada e protegida da ação do sistema imune, essencial para o desenvolvimento do processo espermatogênico (Russell et al., 1990; Russell e Griswold, 1993). As células germinativas do ambiente basal aparentemente têm livre acesso a substâncias difundidas do sistema linfático, enquanto aquelas que se encontram no ambiente adluminal somente recebem substâncias através das células de Sertoli, as quais estabelecem junções especiais com estas células (Russell et al., 1990). Além das funções desempenhadas pelas células de Sertoli, estas podem ser utilizadas como um ponto de referência para se quantificar e avaliar funcionalmente o processo espermatogênico, pois nos animais adultos, mesmo ao longo dos diferentes estádios do ciclo do epitélio seminífero, estas células apresentam uma população estável (Russell et al., 1990; França e Russell, 1998; Johnson et al., 2000).

O compartimento intertubular é constituído por vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, fibras e células do tecido conjuntivo como macrófagos e fibroblastos, além das células de Leydig. Apesar de existir grande variação entre as diversas espécies quanto à proporção volumétrica dos diferentes componentes do compartimento intertubular (Fawcett et al., 1973; França e Russell, 1998; Godinho, 1999), a célula de Leydig é usualmente o tipo celular mais frequente neste compartimento (Paula et al., 2007).

As células de Leydig são bastante conhecidas por sua marcante produção de andrógenos, os quais são sintetizados a partir de uma molécula base, o colesterol. Os andrógenos são responsáveis pela manifestação dos caracteres sexuais secundários e pela manutenção da espermatogênese em animais sexualmente maduros (Bardin, 1996; O'Donnell et al., 2001). Estudos correlacionando a estrutura e função das células de Leydig, em diferentes espécies de mamíferos demonstraram que variações na secreção de testosterona se devem mais à capacidade individual que as células de Leydig possuem em secretar o hormônio, do que a diferenças relacionadas ao volume que estas ocupam no testículo (Ewing et al., 1979). Segundo Zirkin et al. (1980), esta capacidade correlaciona-se com a quantidade de retículo endoplasmático liso presente nas células de Leydig. Além disso, Kerr et al. (1979) relataram que, em mamíferos, a organela citoplasmática mais abundante nas células de Leydig é o retículo endoplasmático liso, e que na

superfície desta organela se encontram vários sítios de ligação para grande quantidade de enzimas que são necessárias para conversão esteroidogênica realizada por essa célula (Costa, 2001). Adicionalmente, a secreção de testosterona pela célula de Leydig depende também da quantidade do hormônio luteinizante (LH) disponível e do número de receptores de LH em cada célula, da quantidade de testosterona que a célula de Leydig é capaz de secretar em determinado período de tempo, da velocidade pela qual a testosterona sai dos testículos via vasos linfáticos, vasos sanguíneos e fluido seminal e da taxa de metabolismo da testosterona (Russell, 1996).

### **3.3. A espermatogênese**

A espermatogênese é um processo complexo, cíclico e altamente organizado que ocorre no interior dos túbulos seminíferos de animais sexualmente maduros, no qual uma célula diploide, a espermatogônia, origina após divisões e diferenciação, espermatozoides haploides (França e Russell, 1998). Baseando-se em considerações morfológicas e funcionais, o processo espermatogênico pode ser dividido em três fases: (1) proliferativa ou spermatogonial, na qual as espermatogônias sofrem rápidas e sucessivas divisões mitóticas; (2) meiótica ou spermatocitogênica, quando o material genético passa por duas divisões celulares sucessivas e por recombinação genética durante a meiose; e (3) diferenciação ou spermiogênica, na qual as espermatídes haploides sofrem marcantes modificações, transformando-se em células muito especializadas e estruturalmente equipadas para alcançar e fertilizar os ovócitos. Assim, considerando-se estas três fases, o processo espermatogênico como um todo tem a duração de 40 a 60 dias na maioria dos mamíferos, sendo que cada fase que o compõe representa 1/3 dele (Russell et al., 1990; França e Russell, 1998).

Para que todas estas diferenciações ocorram no epitélio seminífero é necessário que as células germinativas se disponham rigorosamente organizadas em associações celulares, denominadas estádios (Leblond e Clermont, 1952). Dá-se o nome de ciclo do epitélio seminífero (CES) a uma série completa de alterações que ocorrem nestas associações celulares, as quais estão em uma sequência lógica de progressão de desenvolvimento (Ortavant et al., 1977; Russell et al., 1990). Com exceção de algumas espécies de primatas, o arranjo dos estádios do ciclo do epitélio seminífero é segmentar em todos os mamíferos investigados, e usualmente é visualizado apenas um estágio por secção transversal de túbulo seminífero (Leblond e Clermont, 1952; Russell et al., 1990).

O conhecimento dos estádios que compõem o CES e a duração deste, associados à morfometria testicular, são ferramentas fundamentais para o entendimento e a

mensuração do processo espermatogênico (Courot et al., 1970). Dentre os sistemas utilizados para se estudar os estádios do ciclo do epitélio seminífero, duas metodologias principais têm sido empregadas: a primeira, designada como "Método da Morfologia Tubular", por Berndtson (1977), permite a divisão em oito estádios por ciclo em todos os mamíferos, e se baseia nas alterações do núcleo das células espermatogênicas, na presença de figuras de divisões meióticas e no arranjo das espermatídes no epitélio seminífero (Roosen-Runge e Giesel Jr., 1950; Courot et al., 1970; Guerra, 1983). O segundo método de identificação é baseado na morfologia das espermatídes, em particular na formação do sistema acrossômico. Neste método, descrito primeiramente por Leblond e Clermont (1952), o número de estádios é variável para cada espécie, sendo descrito para mamíferos domésticos, em média, de 8 a 14 estádios (Russell et al., 1990; França e Russell, 1998). Segundo Costa (2001), apesar das características gerais da espermiogênese serem semelhantes entre as espécies, diferenças existirão nos detalhes do desenvolvimento do acrossoma entre estas, o que explicaria a variação no número de estádios.

Além da identificação e classificação dos estádios do ciclo do epitélio seminífero, a frequência relativa destes é um parâmetro fundamental no estudo da espermatogênese. Ela retrata a duração absoluta de cada estádio permitindo-se estimar a duração do ciclo do epitélio seminífero. Contudo, para que todo o processo espermatogênico se complete, são necessários entre quatro e cinco ciclos, ou seja, o processo espermatogênico como um todo compreende o tempo decorrido entre a formação de uma geração de células germinativas na base do epitélio até a sua liberação no lume tubular como espermatozoides (Leblond e Clermont, 1952).

#### **4. Referências Bibliográficas**

- Balarini MK (2013) Avaliação morfofuncional do testículo e do processo espermatogênico dos roedores silvestres *Akodon cursor* (Winge, 1887) e *Oligoryzomys nigripes* (Olfers, 1818) (Rodentia: Cricetidae). Tese (Doutorado). Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 81 p.
- Bardin CW (1996) Androgens: early attempts to evaluate Leydig cell function in man. In: Payne AH, Hardy M P, Russell LD (Eds.). *The Leydig cell*. Vienna: Cache River Press, Cap. 2, pp. 31-42.
- Berndtson WE (1977) Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *International Journal of Andrology*, 13 (4): 315-326.

- Boiani L, Casanova G, Oliveira A, Berois N (2007) Seminiferous epithelium cycle of a hantavirus reservoir, the long-tailed mouse *Oligoryzomys flavescens* (Rodentia – Cricetidae). *Tissue and Cell*, 39: 267-275.
- Bonvicino CR, Lemos B, Weksler M (2005) Small mammals of Chapada dos Veadeiros national park (Cerrado of central Brazil). Ecologic, karyologic and taxonomic considerations. *Brazilian Journal of Biology*, 65 (3): 395-406.
- Bonvicino CR, Oliveira JA, D'Andrea OS (2008) Guia dos roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos. Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa - OPAS/OMS, pp. 347-400.
- Carretta Júnior M (2012) Estudo comparativo do processo espermatogênico e duração do ciclo do epitélio seminífero através da técnica de imunohistoquímica com bromodeoxiuridina de três diferentes espécies de roedores da subordem Hystricomorpha: cutia (*Dasyprocta leporina*), paca (*Cuniculus paca*) e capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Tese (Doutorado). Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 131 p.
- Cordeiro Júnior DA (2009) Estrutura e função testiculares em roedores silvestres das famílias Echimyidae (*Trinomys moojeni*) e Cricetidae (*Akodon cursor*, *Akodon montensis*, *Necromys lasiurus* e *Oligoryzomys nigripes*), da Reserva Particular do Patrimônio Natural do Caraça - MG. Doutorado (Tese). Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. 109 p.
- Costa DS (2001) Análise morfofuncional da espermatogênese e características seminais de catetos (*Tayassu tajacu*). Tese (Doutorado), Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. 61p.
- Costa GM, Leal MC, Ferreira AC, Guimarães DA, França LR (2010) Duration of spermatogenesis and spermatogenic efficiency in two large neotropical rodent species: the agouti (*Dasyprocta leporina*) and paca (*Agouti paca*). *Journal of Andrology*, 31: 489-499.
- Costa KLC, Matta SLP, Gomes MLM, Paula TAR, Freitas KM, Carvalho FAR, Silveira JA, Dolder H, Mendis-Handagama SLMC (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* 127: 202-212.
- Courot M, Hochereau-de-Reviere MT, Ortavant R (1970) Spermatogenesis. In: Johnson AD, Gomer WR, Vandemark NL, editors. *The Testis*. New York: Academic Press. pp. 399-432.

- Ewing LL, Zirkin BR, Cochran RC, 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*, 105: 1135-1142.
- Fawcett DW, Neaves WB, Flores MN (1973) Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biology of Reproduction*, 9: 500-532.
- França LR, Russell LD (1998) The testis of domestic animals. In: Martínez F, Regadera J, editors. *A multidisciplinary overview*. Madrid, Spain: Churchill Livingstone. pp. 197-219.
- Freitas MA, Silva TFS (2005) Mamíferos na Bahia: espécies continentais. IN: Sigrist T (Ed.) *Mamíferos do Brasil – Uma Visão Artística*. 1ª edição, Vinhedo: São Paulo, pp. 168-207.
- Godinho CL (1999) Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*), sexualmente maduros. Dissertação (Mestrado). Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. 74 p.
- Gonçalves PR, Oliveira JA (2004) Morphological and genetic variation between two sympatric forms of the genus *Oxymycterus* (Rodentia: Sigmodontinae): an evaluation of hypothesis of differentiation within the genus. *Journal of Mammalogy*, 85: 148-161.
- Guerra M O (1983) Comparação entre dois métodos de determinação da frequência relativa dos estádios do ciclo do epitélio seminífero, em dados da literatura. *Revista Brasileira de Biologia*, 43(4): 385-394.
- Guião-Leite FL, Paula TAR, Matta SLP, Fonseca CC, Neves MTD, Barros JBG (2006) Cycle and duration of the seminiferous epithelium in puma (*Puma concolor*). *Animal Reproduction Science*, 90: 307–316.
- Herrmann G (1991) Estrutura de comunidades de pequenos mamíferos em áreas secundárias de Mata Atlântica. Mestrado (Dissertação). Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. 111 p.
- Honeycutt RL (2004) Order Rodentia. In: Kleiman DG, Geist V, McDade MC (Eds.) *Grzimek's Animal Life Encyclopedia*. 2<sup>nd</sup> Edition, v.16: Mammals V, pp. 121-473.
- Hutchins M, Kleiman DG, Geist V, McDade MC (Eds.) (2004) *Grzimek's Animal Life Encyclopedia*. Gale Group, 2<sup>nd</sup> Edition, volume 16, pp. 121-473.
- Iucn Red List (a), International Union for Conservation of Nature. Mapa de distribuição de *Oxymycterus rufus*. Disponível em: <http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=15792>. Acesso em: 31 jan. 2014.

- Iucn Red List (b), International Union for Conservation of Nature (b). Mapa de distribuição de *Oxymycterus nasutus*. Disponível em: <http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=15789>. Acesso em: 31 jan. 2014.
- Johnson L, Varner DD, Roberts ME, Smith TL, Keillor GE, Scrutchfield WL (2000) Efficiency of spermatogenesis a comparative approach. *Animal Reproduction Science*, 60-61: 471-480.
- Karl J, Capel B (1998) Sertoli cells of mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Developmental Biology*, 203: 323-333.
- Kasahara S, Yonenaga-Yassuda Y (1984) A progress report of cytogenetic data on Brazilian Rodents. *Revista Brasileira de Genética*, 7(3): 509-533.
- Kenagy GJ, Trombulak SC (1986) Size and function of mammalian testis in relation to body size. *Journal of Mammalogy*, 67: 1-22.
- Kerr JB, Rich KA, de Kretser DM (1979) Alteration of the fine structure and androgen secretion of the interstitial cells in the experimentally cryptorchid rat testis. *Biology of Reproduction*, 20: 409-422.
- Kuhnen VV, Lima REM, Santos JF, Graipel ME, Machado Filho LCP, Soriano-Sierra EJ (2011) First record of *Leopardus pardalis* (Linnaeus, 1758) at the State Park of the Serra do Tabuleiro. *Brazilian Journal of Biology*, 71 (1): 219-220.
- Leblond CP, 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*, 55: 548-584.
- Melo FCSA, Sousa TP, Costa KLC, Matta SLP, Melo FR, Santa-Rita RM (2013) Descriptive morphometry and stereology of the tubular compartment in the wild rodent *Hylaeamys megacephalus* (Rodentia: Cricetidae) from Central Brazil. *Animal Reproduction Science*, 138: 110-117.
- Menezes DJA (2010) Caracterização do ciclo reprodutivo anual de cutia macho (Rodentia: Dasyproctidae) criado em cativeiro: dinâmica testicular e avaliação hormonal. Tese (Doutorado), Teresina: Universidade Federal do Piauí. 78p.
- Montes MA (2007) Uma abordagem molecular na análise da filogenia e da filogeografia dos roedores Akodontinos do neotrópico. Tese (Doutorado), Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 192 p.
- O'Doneel L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER (2001) Estrogen and spermatogenesis. *Endocrine Reviews*, 22: 289-318.
- Ortavant R, Courot M, Hochereau-De-Reviers MT (1977) Spermatogenesis in domestic mammals. In: Cole HH, Cupps PT (Eds.) *Reproduction in domestic animals*. Academic Press, New York, pp. 203-227.

- Pardinas UFJ, D'Elia G, Ortiz PE (2002) Sigmodontinos fósiles (Rodentia: Muridae: Sigmodintinae) de América Del Sur: Estado actual de su conocimiento perspectiva. *Mastozoologia Neotropical*, 9: 209-252.
- Paula TAR, Matta SLP, Costa DS (2002) Avaliação histológica e quantitativa do testículo de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). *Bioscience Journal*, 18: 121-136.
- Paula TAR, Matta SLP, Silva Júnior VA, Costa DS, Fonseca CC, Neves MTD (2007) Intertubular space characterization in adult capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) testis. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50(2): 289-297.
- Reig AO (1987) An assessment of the systematics evolution of Akodontini, with the description of the new fossil species of *Akodon* (Rodentia: Cricetidae). *Fieldiana Zoology*, 39: 347-399.
- Reis NR, Peracchi AL, Pedro WA, Lima IP (Eds.) (2006) *Mamíferos do Brasil*. Londrina: Paraná, pp. 347-399.
- Reis NR, Peracchi AL, Fregonezi MN, Rossaneis BK (2010) *Mamíferos do Brasil – Guia de identificação*. 1º Ed. Rio de Janeiro: Technical Books, pp. 213-287.
- Roosen-Runge EC, Giesel Jr. L O (1950) Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. *American Journal of Anatomy*, 87 (1): 01-30.
- Russell LD, Ettlín RA, Sinha-Hikim AP, Clegg ED (1990) Mammalian spermatogenesis. In: Russell LD, Ettlín RA, Sinha-Hikim AP, Clegg ED (Eds.) *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. Bolesta: Cache River Press. pp. 1-40.
- Russell LD, Griswold MD (1993) *The Sertoli Cell*. Cache River Press, Clearwater, 801p.
- Russell LD (1996) Mammalian Leydig cell structure. In: Payne AH, Hardy MP, Russell LD (Eds.) *The Leydig Cell*. Cache River Press, Vienna, pp. 43-96.
- Santos PRS, Carrara TVB, Silva LCS, Silva AR (2011) Caracterização morfológica e frequência dos estádios do ciclo do epitélio seminífero em preás (*Galea spixii* Wagler, 1831) criados em cativeiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 31 (1): 18-24.
- Sigrist T (2012) *Mamíferos do Brasil – Uma Visão Artística*. 1ª edição, Vinhedo: São Paulo, pp. 168-207.
- Villafane GIE, Mino M, Cavia R, Hodara K, Courtalón P, Suarez O, Busch M (2005) *Guia de Roedores de La Provincia de Buenos Aires*. L.O.L.A., Buenos Aires, Argentina, 100 p.
- Waterman J (2007) Male mating strategies in rodents. In: Wolff JO, Sherman PW (Eds.) *Rodent Societies: An Ecological and Evolutionary Perspective*. London: The University of Chicago Press. pp. 27-41.

Zirkin BR, Ewing LL, Kromann N, Cochran RC (1980) Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog, and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cell ultrastructure. *Endocrinology*, 107: 1867-1874.

## Artigo 1

### **Morfometria e duração do ciclo do epitélio seminífero do roedor silvestre *Oxymycterus rufus* (Rodentia: Cricetidae)**

#### **Resumo**

*Oxymycterus rufus* é um roedor silvestre que habita a Zona da Mata mineira, localizada em um dos hotspots mundiais que é a Mata Atlântica. Devido à escassez de dados relacionados à reprodução dos machos desta espécie, objetivou-se realizar análises morfométricas e estereológicas dos testículos para se obter, assim, informações sobre o processo espermatogênico como um todo. Cinco machos sexualmente maduros foram utilizados, dos quais três receberam injeções intratesticulares de 5-bromodeoxiuridina (BrdU) para se determinar a duração do ciclo do epitélio seminífero. Fragmentos testiculares foram fixados e processados rotineiramente, sendo destinados às análises em microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão. Os oito estádios do ciclo do epitélio seminífero foram caracterizados de acordo com o Método da Morfologia Tubular. Cada ciclo do epitélio seminífero correspondeu a 6,58 dias enquanto todo o processo espermatogênico teve duração de 29,61 dias. O coeficiente de mitoses espermatogoniais foi 5,64 e 2,79 espermatídes foram produzidas de cada espermatócito primário em paquíteno. O rendimento geral da espermatogênese totalizou 11,98 células. O índice de célula de Sertoli foi 4,29 espermatídes enquanto sua capacidade de suporte total foi de 8,21 células germinativas. A reserva espermática testicular foi de  $183,5 \times 10^6$  células e  $962 \times 10^6$  espermatídes foram encontradas por grama de testículo. A produção espermática diária por testículo e por grama de testículo foi de  $28,56 \times 10^6$  e  $73,13 \times 10^6$  espermatozoides, respectivamente. Assim, a curta duração do ciclo do epitélio seminífero juntamente com a rápida produção de espermatozoides, indicam que *O. rufus* apresenta alta eficiência no processo espermatogênico.

**Palavras-chave:** testículo, morfometria, estereologia, células germinativas, células de Sertoli.

## 1. Introdução

A Mata Atlântica abriga uma rica mastofauna, composta por aproximadamente 250 espécies, e com alto grau de endemismo, onde 55 espécies são exclusivas deste bioma, composto principalmente por primatas e roedores [1-2]. Em abundância, diversidade e distribuição, a ordem Rodentia representa o grupo mais bem sucedido da classe Mammalia compreendendo 44% desta, e consistindo em mais de 2.000 espécies. No Brasil, a mais diversificada família de roedores é a Cricetidae, que apresenta 117 espécies agrupadas em 36 gêneros, todos representantes de uma única subfamília, a Sigmodontinae [3-4], sendo os espécimes do gênero *Oxymycterus*, objetos deste estudo, representantes desta subfamília.

As nove espécies do gênero *Oxymycterus* apresentam tamanho corporal variando de pequeno a grande (11,5 a 18 cm) e o comprimento da cauda menor que o do corpo. Possuem garras bem desenvolvidas e focinho longo, o que caracteriza as espécies deste gênero [5]. Têm hábitos terrestre e semi-fossorial, habitando bordas de matas em formações florestais na Mata Atlântica e Floresta Amazônica, além de áreas abertas como as veredas e os campos de altitude do Cerrado e da Caatinga [3,5]. Os *Oxymycterus* possuem dieta especializada, constituída na sua maior parte por insetos (70%), sendo os cupins os mais representativos (25%) [6], embora outros invertebrados e plantas também façam parte do seu hábito alimentar [7-8].

No Brasil, a ocorrência de *Oxymycterus rufus* foi registrada até os dias de hoje, apenas em poucas localidades do sudeste do estado de Minas Gerais [9]. Assim, de modo semelhante a outras espécies silvestres [10], dados sobre a biologia e fisiologia reprodutiva de *O. rufus* são escassos, e a avaliação de parâmetros testiculares destes animais podem fornecer informações importantes sobre a atividade reprodutiva desta espécie [11-12].

A espermatogênese é um processo complexo, cíclico e altamente organizado que ocorre no interior dos túbulos seminíferos de animais sexualmente maduros, onde uma célula diploide, a espermatogônia, origina após divisões e diferenciação, espermatozoides haploides [13]. Para que todos estes eventos ocorram, é necessário que as células germinativas se disponham rigorosamente organizadas em associações celulares, denominadas estádios [14]. Quando uma série completa de alterações ocorre nestas associações celulares, que estão em uma sequência lógica de progressão de desenvolvimento, dá-se o nome ciclo do epitélio seminífero (CES) [15].

O conhecimento dos estádios que compõem o CES e a duração deste, associados à morfometria testicular, são ferramentas fundamentais no entendimento e na mensuração

do processo espermatogênico como um todo [16]. Assim, objetivou-se com este trabalho obter dados sobre a espermatogênese de *O. rufus* por meio da morfometria, estereologia, duração do ciclo do epitélio seminífero e também de índices indicativos da produção espermática parâmetros estes que fornecem informações confiáveis sobre a atividade reprodutiva de uma espécie.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Coleta dos animais e preparação dos tecidos**

Foram coletados cinco espécimes de *Oxymycterus rufus* sexualmente maduros, capturados ao longo de um ano e meio. As coletas foram realizadas em um fragmento de Mata Atlântica de aproximadamente 10 hectares (S 20°81' e W 42°85'), localizado na Zona da Mata Mineira, no município de Viçosa, Estado de Minas Gerais, sendo as capturas autorizadas previamente pelo ICMBio/SISBIO (n° 22289-1). Os animais foram capturados em armadilhas tipo Sherman e Tomahawk, distribuídas na área de estudo. As campanhas de coletas foram realizadas mensalmente durante cinco dias e quatro noites. Os animais foram levados ao laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e abrigados em caixas de polipropileno, sendo ofertadas água e alimentação ad libitum até a eutanásia. Para estimar a duração do ciclo do epitélio seminífero, foi administrado em três espécimes, 0,4 mL de 5-bromodeoxiuridina (BrdU, Invitrogen) por meio de injeção intratesticular. Após 24, 48 e 72 h da administração da BrdU, os animais foram eutanasiados pela administração de superdosagem anestésica (cloridrato de Xilazina 150 mg/kg associado a cloridrato de Quetamina 10 mg/kg). Realizou-se então a pesagem e medição dos animais, seguidas da remoção e pesagem de ambos os testículos. A albugínea de um dos testículos foi dissecada e pesada, e seu peso subtraído do peso testicular para se obter o peso do parênquima testicular. Todo o procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV – n° 76/012).

Fragmentos testiculares destinados às análises histomorfométricas foram fixados em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) por 24 h, transferidos para etanol 70 % e posteriormente processados rotineiramente pela inclusão em glicol-metacrilato (Historesin®, Leica). Secções transversais semisseriadas de 3 µm de espessura foram realizadas em micrótomo rotativo (Leica, RM2255), respeitando-se intervalo mínimo de 40 µm entre os cortes, os quais foram corados com azul de toluidina/borato de sódio 1 % e posteriormente analisados. Para a realização da morfometria foram capturadas imagens

em diferentes aumentos, em fotomicroscópio (Olympus BX-40), que foram analisadas utilizando-se software Image-Pro Plus<sup>®</sup>.

Para análise da ultraestrutura das espermátides sob microscopia eletrônica de transmissão (MET), os fragmentos testiculares foram refixados em solução glutaraldeído 2,5 %, por no mínimo 12 h e posteriormente armazenados em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,4 a 4 °C. As amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1 % e ferrocianeto de potássio 8 % (1:1) durante 2 h e posteriormente desidratadas em etanol seguindo-se a inclusão em resina Spurr (EMS, USA). Cortes ultrafinos, obtidos em ultramicrótomo (Sorvall Nt2-B), foram contrastados com acetato de uranila 3 % e citrato de chumbo 3 % e observados em microscópio eletrônico de transmissão (Jeol 1011) no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa.

## **2.2. Estádios do ciclo do epitélio seminífero (CES)**

Os estádios do CES foram caracterizados pelo Método da Morfologia Tubular, o qual se baseia na forma e localização do núcleo das espermátides, na ocorrência de figuras de divisão meiótica e na composição geral do epitélio seminífero, caracterizando, assim, 8 estádios [17].

A frequência relativa dos 8 estádios do ciclo do epitélio seminífero foi determinada a partir da caracterização e contagem de 200 secções transversais de túbulos seminíferos para cada animal, escolhidos aleatoriamente.

## **2.3. Administração da BrdU e duração do CES**

Para se determinar a duração do CES, fragmentos testiculares dos animais que receberam BrdU foram incluídos em Paraplast<sup>®</sup> (Sigma) e secções de 4 µm de espessura foram utilizadas para sua detecção por meio de anticorpo monoclonal. As secções foram hidratadas e lavadas em tampão fosfato 0,1 M (PBS), seguindo-se o bloqueio da atividade da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio e metanol por 10 minutos. Após nova lavagem em PBS, as secções foram incubadas com tripsina por 10 minutos em câmara úmida a 37 °C. A seguir, foram lavadas em água destilada, realizando-se a desnaturação por 45 minutos em temperatura ambiente. Após nova lavagem em PBS, as secções foram incubadas com solução bloqueadora por 10 minutos permanecendo em temperatura ambiente. Procedeu-se então a incubação com anticorpo monoclonal biotilado anti-BrdU de camundongo por 2 h. Posteriormente foi realizada a lavagem em PBS, incubação com streptavidina-peroxidase por 10 minutos e a revelação com 3,3-diaminobenzidino tetracolorido (DAB) e peróxido de hidrogênio, por 5 minutos, ao abrigo

da luz. As secções foram contracoradas com hematoxilina, desidratadas em etanol, diafanizadas em xilol e montadas com Entellan<sup>®</sup> (Merck).

As secções histológicas foram analisadas para se detectar o tipo celular marcado mais avançado no epitélio seminífero desde a incorporação da BrdU. Assim, a frequência dos estádios percorridos neste período corresponde ao intervalo de tempo decorrido da incorporação até a coleta dos testículos, fornecendo portanto, o período correspondente a um ciclo do epitélio seminífero e ao processo espermatogênico total.

#### **2.4. Morfometria testicular**

A partir do peso corporal e do peso de ambos os testículos, foi calculado o índice gonadossomático (IGS), o qual expressa o investimento corporal em gônadas, utilizando-se a seguinte fórmula:  $(\text{peso gonadal}/\text{peso corporal}) \times 100$  [18]. A proporção volumétrica ocupada pelos componentes do parênquima testicular (túbulos seminíferos e tecido intertubular) foi determinada a partir da contagem de 2660 pontos projetados sobre 10 imagens obtidas ao acaso, quantificando-se assim o percentual de pontos sobre túbulos seminíferos (túnica própria, epitélio seminífero e lume) e intertúbulo.

O volume dos componentes do parênquima (mL) foi calculado a partir do conhecimento do volume testicular. Como a densidade volumétrica do testículo é próxima de 1, considera-se o peso testicular igual ao volume [19-20]. O volume dos túbulos seminíferos foi determinado a partir do conhecimento do percentual deste componente no parênquima testicular, utilizando-se para isso a seguinte fórmula:  $(\% \text{ de túbulos seminíferos}/100) \times \text{volume total do parênquima testicular}$ . O volume do epitélio seminífero foi obtido dividindo-se o percentual do epitélio por 100 e multiplicando-se pelo peso do parênquima testicular. O índice tubulossomático (ITS), o qual determina o investimento em túbulos seminíferos em relação à massa corporal, foi obtido dividindo-se o volume de túbulos seminíferos pelo peso corporal e multiplicando-se o valor resultante por 100. O diâmetro tubular médio foi obtido por animal em 30 secções transversais tubulares de contorno mais circular possível, independente do estádio do CES em que se encontravam. A altura do epitélio seminífero foi mensurada nas mesmas secções utilizadas para obtenção do diâmetro, sendo determinada pela distância entre a túnica própria e a borda luminal, realizando-se duas medidas diametralmente opostas. Como o epitélio é a parte funcional do túbulo, calculou-se o índice epiteliossomático (IES) dividindo o volume epitelial pelo peso corporal e multiplicando o resultado por 100.

O comprimento total (m) de túbulos seminíferos por testículo foi estimado a partir da fórmula:  $CT = VTS/\pi R^2$ , na qual VTS= volume dos túbulos seminíferos;  $\pi R^2$ = área da secção transversal dos túbulos seminíferos e R= diâmetro tubular/2. Para o cálculo do comprimento de túbulos seminíferos por grama de testículo, dividiu-se o valor do comprimento total de túbulos seminíferos de ambos os testículos, obtido anteriormente, pelo peso de ambos os testículos.

## **2.5. Contagem das células do epitélio seminífero**

As populações de células germinativas e células de Sertoli foram estimadas a partir da contagem de 10 secções transversais de túbulos seminíferos no estágio 1 do CES em cada animal. Foram quantificadas as populações de espermatogônias do tipo A (A), espermátocitos primários em preleptóteno/leptóteno (PL/L), espermátocitos primários em paquíteno (P), espermátides arredondadas (AR) e células de Sertoli (S). Foram obtidos também o diâmetro médio nuclear das células germinativas e o nucleolar das células de Sertoli, pela mensuração de 30 núcleos e nucléolos de cada tipo celular citado, respectivamente. Por existirem variações no tamanho das células que compõem o epitélio seminífero, as contagens obtidas foram corrigidas numericamente pela fórmula de Abercrombie [21] modificada por Amann [22], que considera o diâmetro nuclear/nucleolar médio e a espessura do corte.

A partir dos valores celulares corrigidos, calculou-se o rendimento intrínseco da espermatogênese. Assim, foram determinados: o coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais (PL/A), o qual quantifica as perdas celulares ocorridas durante a fase espermatogonial; o rendimento meiótico (AR/P) que quantifica a eficiência das divisões meióticas; o rendimento geral da espermatogênese (AR/A) que demonstra a eficiência deste processo como um todo. Também foram calculados os índices das células de Sertoli: a capacidade suporte total das células de Sertoli para com as células germinativas  $[(A + PL/L + P + AR) / S]$  e para com as espermátides arredondadas (AR/S). O número total de células de Sertoli por testículo foi determinado a partir do valor do comprimento de túbulos seminíferos multiplicado pelo número corrigido de nucléolos de Sertoli por secção transversal e o resultado dividido pela espessura do corte. Para o cálculo desse número por grama de testículo, dividiu-se o valor obtido para número de célula Sertoli por testículo pelo peso testicular.

A reserva espermática testicular (RET) total e por grama de testículo foi determinada a partir da população celular de espermátides arredondadas no estágio I do CES, considerando-se que a perda ocorrida na espermiogênese não é significativa. Para

isso, foi obtido o número médio de espermátides arredondadas em secções transversais de túbulos seminíferos, sendo este número corrigido para o comprimento total do túbulo por testículo ou por grama de testículo, a partir da fórmula:  $RET = (\text{comprimento dos túbulos seminíferos} / \text{espessura do corte}) \times \text{número corrigido de espermátides arredondadas por secção transversal}$  [17].

Para o cálculo da produção espermática diária (PED), dividiu-se a reserva espermática testicular pela duração de um CES, e para se determinar a PED por grama de testículo, dividiu-se o valor da produção espermática diária pelo peso dos testículos.

Os dados descritivos foram analisados utilizando a função estatística do software Excel/ Windows7 e estão representados como média e desvio padrão.

### **3. Resultados**

#### **3.1. Dados biométricos e morfometria testicular**

Os dados biométricos e das proporções volumétricas referentes ao compartimento tubular de *Oxymycterus rufus* se encontram na Tabela 1. O peso corporal foi de 82,28 g e o peso médio de ambos os testículos foi de 0,384 g, resultando num IGS de 0,47 %. O peso da albugínea testicular de 0,026 g foi utilizado para se obter o valor do parênquima testicular, que foi de 0,358 g. O compartimento tubular de *O. rufus* corresponde a 90,91% do parênquima testicular e o percentual restante (9,09 %) equivale ao compartimento intertubular. O volume do epitélio seminífero foi de 0,290 mL, obtendo-se a partir deste o índice epiteliossomático, de 0,35 %. O diâmetro tubular médio foi de 175,45  $\mu\text{m}$  enquanto a altura do epitélio seminífero alcançou 61,04  $\mu\text{m}$ . O comprimento total de túbulos seminíferos, por testículo e por grama de testículo, foi de 13,40 e 34,93 m, respectivamente.

#### **3.2. Estádios do ciclo do epitélio seminífero e frequência relativa**

##### **Estádio 1**

A composição do epitélio germinativo observada neste estágio é caracterizada por 3 a 4 camadas de espermátides arredondadas em torno da borda luminal. Abaixo dessas se encontram os espermatócitos em paquíteno, caracterizados pelo seu grande núcleo com evidentes grumos de cromatina. Próximo à túnica própria, localizam-se os espermatócitos primários em preleptóteno/leptóteno, e também as espermatogônias do tipo A, presentes em todos os estádios. Estas células apresentam o maior tamanho dentre os tipos de espermatogônias. Os núcleos das células de Sertoli, localizados próximos à

túnica própria, apresentam formato arredondado ou triangular, um nucléolo bem desenvolvido, além de dois outros nucléolos menores próximos ao maior (Figura 1A).

Tabela 1. Biometria e morfometria testicular de *Oxymycterus rufus*

<b>Parâmetros (n=5)</b>	<b>Média ± DP</b>
Peso corporal (g)	82,28 ± 36,52
Peso testicular (g)	0,38 ± 0,12
Peso do parênquima (g)	0,36 ± 0,11
Índice gonadossomático (%)	0,47 ± 0,16
Albugínea testicular (%)	6,77 ± 0,01
<b>Proporção Volumétrica (%)</b>	
Compartimento tubular	90,91 ± 4,09
Túnica própria	2,44 ± 1,01
Epitélio Seminífero	81,20 ± 6,54
Lume	7,27 ± 4,09
Diâmetro tubular (µm)	175,45 ± 18,48
Altura epitélio seminífero (µm)	61,04 ± 5,90
Volume tubular (mL)	0,33 ± 0,10
Volume epitélio seminífero (mL)	0,29 ± 0,10
Índice epiteliossomático (%)	0,35 ± 0,14
Índice tubulossomático (%)	0,40 ± 0,15
Comprimento total de túbulo seminífero (m)	13,40 ± 2,51
Comprimento tubular por grama de testículo (m)	34,93 ± 5,37

## **Estádio 2**

Neste estágio, as espermátides iniciam o processo de remodelação do núcleo e citoplasma, condensando a cromatina e alongando sua forma, sempre orientadas em direção aos núcleos das células de Sertoli na base do epitélio. Entre as espermátides em alongamento e os espermatócitos primários em preleptóteno/leptóteno, se encontram os espermatócitos primários em paquíteno, compondo uma camada intermediária no epitélio germinativo (Figura 1B).

### **Estádio 3**

As espermátides em processo de alongamento agrupam-se em feixes definidos, inseridos entre as camadas de espermatócitos primários em diplóteno, os quais são as maiores células do epitélio germinativo. Abaixo destes se encontram espermatócitos primários em zigóteno, formados a partir daqueles que estavam em transição preleptóteno / leptóteno no estágio anterior. Na base do epitélio encontram-se espermatogônias do tipo A e núcleos de células de Sertoli (Figura 1C).

### **Estádio 4**

A característica marcante do estágio IV são as figuras de divisão meiótica observadas nos espermatócitos primários exibindo placa metafásica, os quais representam a progressão do diplóteno da fase anterior. Assim, é possível identificar no epitélio germinativo os seguintes tipos celulares: dois tipos de espermatócitos primários, alguns na transição de zigóteno para paquíteno e outros em diplóteno; espermatócitos secundários e entre estes, as espermátides alongadas (Figura 1D).

### **Estádio 5**

Neste estágio, é possível encontrar duas gerações distintas de espermátides: aquelas que desde o estágio dois estão em processo de alongamento, e as recém-formadas ao final da meiose II. As espermátides alongadas encontram-se dispostas em feixes bem definidos e profundamente inseridos no epitélio germinativo. Observam-se espermatócitos primários na transição de zigóteno para paquíteno e também em paquíteno. Os núcleos das células de Sertoli estão localizados perpendicularmente à lâmina basal, próximos das espermatogônias do tipo A (Figura 1E).

### **Estádio 6**

Os grupos de espermátides alongadas começam a se desfazer, perdendo a característica de feixes. Estas apresentam citoplasma e núcleos mais delgados, devido às modificações morfológicas necessárias à espermição. As espermátides arredondadas recém-formadas encontram-se dispostas em 3 ou 4 camadas próximas ao lume tubular e abaixo destas, mais próximo ao ambiente basal, se encontram espermatócitos em paquíteno. As espermatogônias do tipo A originam, neste estágio, espermatogônias intermediárias que possuem núcleos menores e mais escuros (Figura 1F).

### Estádio 7

As espermátides alongadas apresentam-se mais dissociadas e mais próximas ao lume tubular, mostrando núcleos mais ovoides quando comparados àqueles no estágio 6. Além das células encontradas no estágio anterior, observam-se espermatogônias B, originadas das espermatogônias intermediárias (Figura 1G).

### Estádio 8

Na base do epitélio germinativo foram observadas espermatogônias do tipo A, células de Sertoli com seus núcleos triangulares e seus característicos nucléolos, além dos espermatócitos primários em preleptóteno originados a partir das espermatogônias B. Na porção mais interna do ambiente adluminal, encontram-se os espermatócitos primários em paquíteno, e mais próximo ao lume tubular, observam-se as camadas de espermátides arredondadas originadas no estágio cinco. Na borda luminal localizam-se as espermátides alongadas com suas respectivas caudas voltadas para o lume do túbulo, prontas para a espermição. Restos de membrana e citoplasma destas espermátides, resultantes da espermiogênese, se encontram também na borda do lume como corpos residuais (Figura 1H).

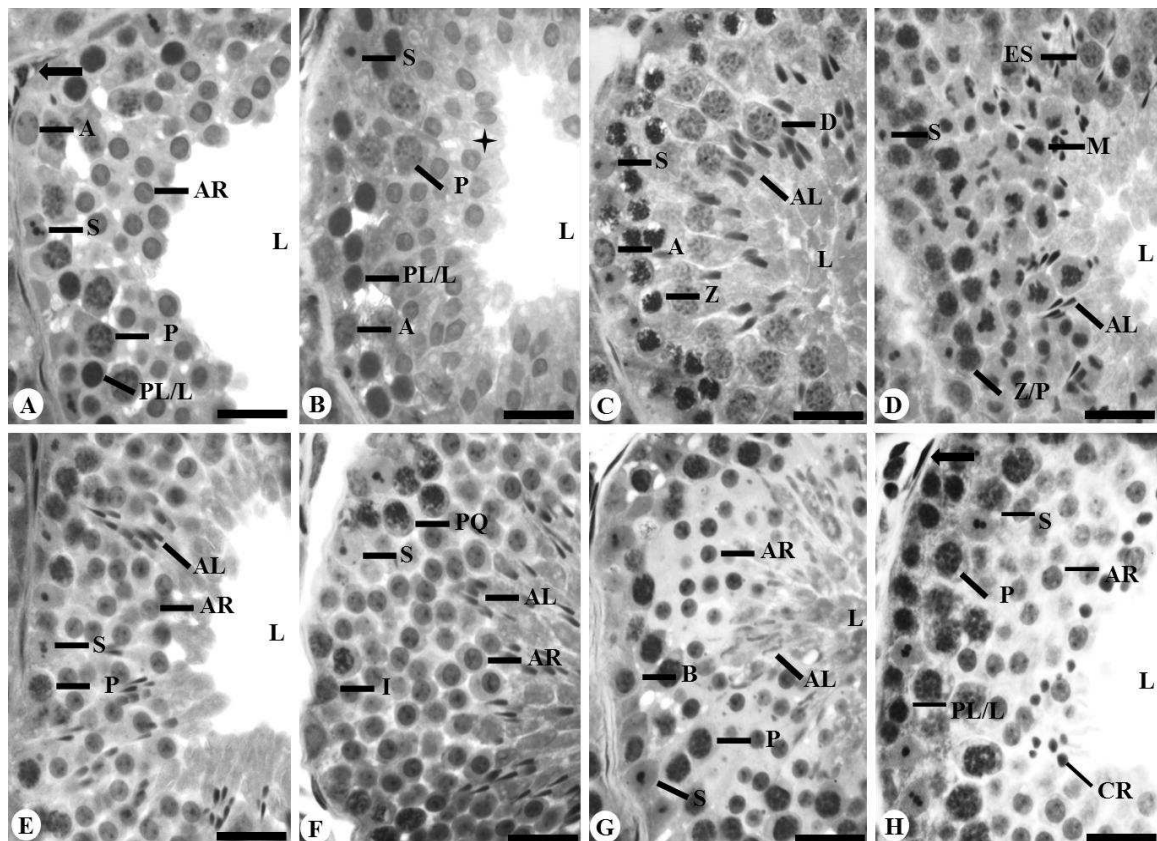


Figura 1. Estádios 1-8 do ciclo do epitélio seminífero em *Oxymycterus rufus* baseado no sistema da morfologia tubular: célula de Sertoli (S); espermatogônia do tipo A (A); espermatogônia intermediária (I); espermatogônia do tipo B (B); espermatócito em transição preleptóteno/leptóteno (PL/L); espermatócito em zigóteno (Z); espermatócito em transição zigóteno/paquítenu (Z/P); espermatócito em paquíteno (P); espermatócito em diplóteno (D); espermatócito secundário (ES); figura meiótica (M); espermatíde arredondada (AR); espermatíde alongada (AL); espermatíde em alongamento (↗); corpos residuais (CR); lume do túbulo seminífero (L); túnica própria (→). Azul de Toluidina/borato de sódio 1%. Barra: 20 μm.

A frequência relativa dos 8 estádios do CES de *O. rufus* se encontra ilustrada na Figura 2. O estágio 1 apresentou a maior frequência (18,0%) e sua duração foi estimada em 5,33 dias, enquanto o estágio 4 foi o menos frequente, com apenas 6,4% correspondendo a 1,9 dias. Quanto às fases do ciclo espermatogênico, a pré-meiótica representou 45,6%, a meiótica 6,4% e a pós-meiótica 48%, apresentando a duração de 13,5, 1,9 e 14,2 dias do ciclo, respectivamente.

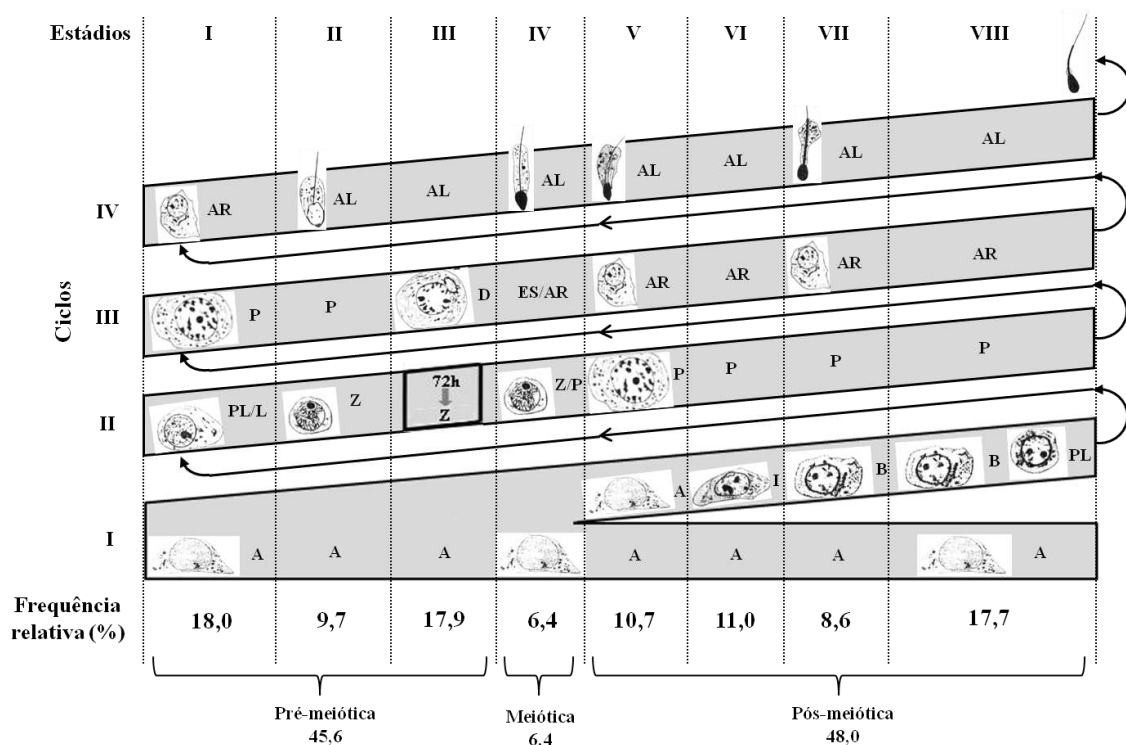


Figura 2. Frequência relativa do CES em *Oxymycterus rufus*. Cada linha corresponde a uma geração celular, enquanto cada coluna representa um dos oito estádios do CES: Espermatogônia do tipo A (A); espermatogônia intermediária (I); espermatogônia B (B); espermatócito em transição preleptóteno/leptóteno (PL/L); espermatócito em zigóteno

(Z); espermátocito em transição zigóteno/paquítenu (Z/P); espermátocito em paquíteno (P); espermátocito em diplóteno (D); espermátocito secundário (ES); espermátide arredondada (AR); espermátide alongada (AL).

### 3.3. Ultraestrutura das espermátides

Diferentes formas nucleares das espermátides, em diferentes fases do desenvolvimento acrossomal, são observadas na Figura 3. Destacam-se as espermátides arredondadas recém-formadas no estágio 5 do CES e ainda sem vesícula acrossomal (Figura 3A) e aquelas no estágio 1 (Figura 3B) com acrossoma em formação. Espermátides em fase de alongamento, o qual se inicia no estágio 2 do CES (Figura 3C), mostram o desenvolvimento gradual do acrossoma. Células com núcleo mais alongado no estágio 3 (Figura 3D) e em fase final de alongamento, com núcleo bastante elétron-denso, encontradas no estágio 7 (Figura 3E) também foram identificadas.

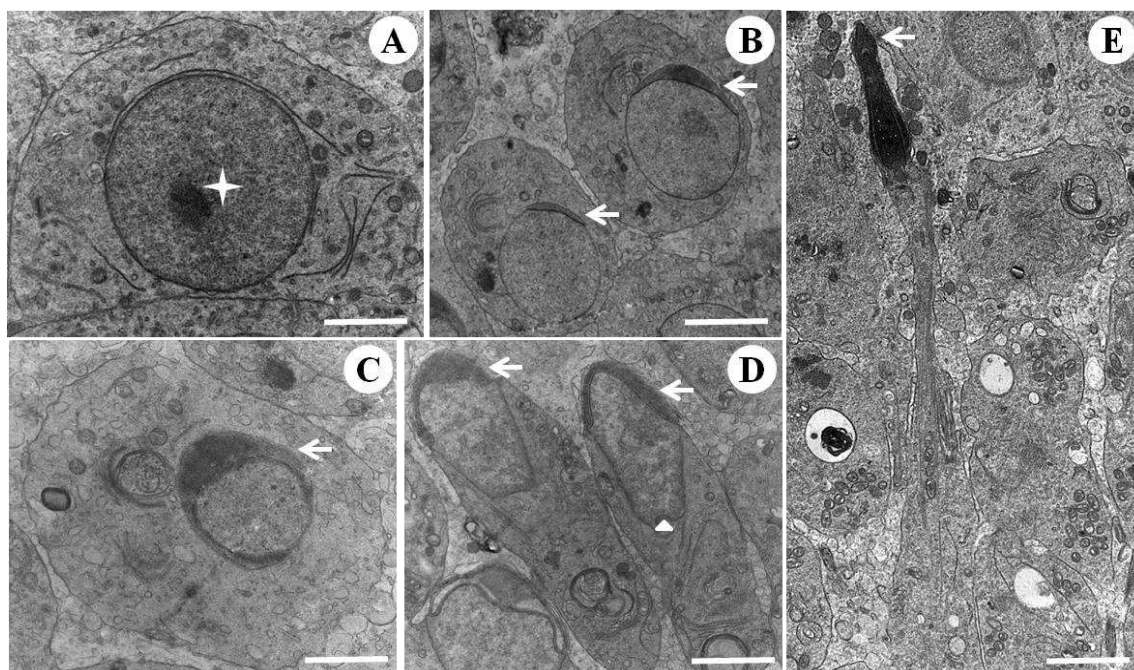


Figura 3. Ultraestrutura de espermátides destacando estágios do desenvolvimento do acrossoma em *Oxymycterus rufus*. (A) Espermátide arredondada sem acrossoma – estágio 5; (B) espermátide arredondada com acrossoma em diferentes graus de desenvolvimento – estágio 1; (C-D) espermátides em fase de alongamento com diferentes graus de desenvolvimento do acrossoma – estádios 2 e 3, respectivamente; (E) espermátide alongada com acrossoma formado – estágio 7; nucléolo (★); capuz acrossômico (→); formação do flagelo (▲). Barras: (A; C; D; E) 2  $\mu$ m; (B) 5  $\mu$ m.

### 3.4. Duração do ciclo do epitélio seminífero

Após 72 h de tratamento com a 5-bromodeoxiuridina (BrdU) as células germinativas mais avançadas que apresentaram marcação BrdU-positivas no epitélio seminífero de *O. rufus* foram os espermatócitos primários em zigóteno, no estágio 3 do CES (Figura 4). No período de três, dias o ciclo do epitélio seminífero progrediu 45,6 % (frequência média do estágio 1 ao 3) levando assim 6,58 dias para que um ciclo se completasse. Sabendo-se que 4,5 ciclos são necessários para que o processo de espermatogênico se complete, pode-se então estimar que a espermatogênese de *O. rufus* tem a duração de 29,61 dias.

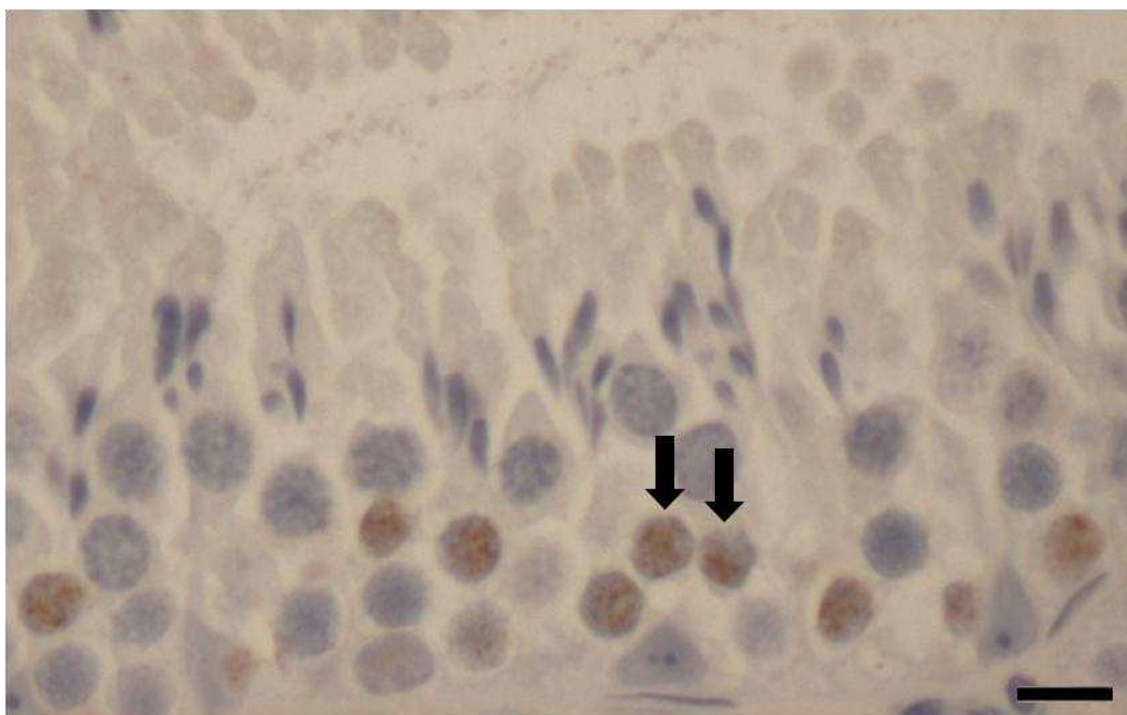


Figura 4. Espermatócitos primários em zigóteno marcados (setas) no estágio 3 do CES, 72 h após injeção de 5-bromodeoxiuridina no testículo de *Oxymycterus rufus*. Barra: 10  $\mu\text{m}$ .

### 3.5. Contagem das células germinativas

Cada secção transversal de túbulo seminífero no estágio 1 apresentou 3,43 espermatogônias do tipo A, 19,36 espermatócitos primários em preleptóteno/leptóteno, 14,70 espermatócitos primários em paquíteno, 41,09 espermátides arredondadas e 9,57 células de Sertoli (Tabela 2). Além da contagem das células do epitélio germinativo, também foi mensurado o diâmetro nuclear destas, registrando-se 8,52  $\mu\text{m}$  para espermatogônias do tipo A, 6,87  $\mu\text{m}$  para espermatócitos primários em preleptóteno/leptóteno, 9,28  $\mu\text{m}$  para espermatócitos primários em paquíteno, e 5,76  $\mu\text{m}$  para

espermátides arredondadas. As células de Sertoli apresentaram diâmetro nucleolar médio de 1,89  $\mu\text{m}$ .

Os índices referentes ao rendimento intrínseco da espermatogênese de *O. rufus* também se encontram na Tabela 2. O coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais revelou que, em média, cada espermatogônia do tipo A no início do processo espermatogênico produziu 5,64 espermátocitos primários em preleptóteno/leptóteno. Na prófase meiótica foram detectadas perdas celulares, pois a população de espermátocitos primários em paquíteno (14,70) reduziu quando comparada à população de espermátocitos primários em preleptóteno/leptóteno (19,36). O rendimento meiótico foi de 2,79 espermátides arredondadas por espermátocitos em paquíteno, representando, assim, eficiência de 69,75 %, e o rendimento geral da espermatogênese correspondeu a 11,97 espermátides arredondadas produzidas a partir de uma espermatogônia do tipo A.

Tabela 2. População celular corrigida e rendimento intrínseco da espermatogênese de *O. rufus*

<b>Parâmetros (n=5)</b>	<b>Média <math>\pm</math> DP</b>
Espermatogônia do tipo A	3,43 $\pm$ 0,68
Espermátocito em transição preleptóteno/leptóteno	19,36 $\pm$ 5,27
Espermátocito em paquíteno	14,70 $\pm$ 3,00
Espermátide arredondada	41,09 $\pm$ 9,96
Célula de Sertoli	9,57 $\pm$ 0,98
Coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais	5,64 $\pm$ 2,57
Rendimento meiótico	2,79 $\pm$ 0,71
Rendimento geral da espermatogênese	11,98 $\pm$ 3,15

Na Tabela 3 encontram-se os índices da célula de Sertoli e os indicativos da produção espermática. A célula de Sertoli apresentou a capacidade de suportar 4,29 espermátides arredondadas e, levando-se em consideração toda a linhagem de células germinativas, 8,21 células são suportadas por uma célula de Sertoli. Em relação ao número de células de Sertoli, cada testículo de *O. rufus* apresenta 42,21  $\times 10^6$  células de Sertoli atingindo 232,4  $\times 10^6$  células por grama de testículo.

A eficiência do processo espermatogênico foi mensurada por meio da reserva espermática testicular (RET) e da produção espermática diária (PED). A reserva

espermática por testículo e por grama de testículo foi de  $183,5 \times 10^6$  e  $962 \times 10^6$  espermátides, respectivamente. Sabendo-se que a duração do ciclo do epitélio seminífero corresponde a 6,58 dias, foi possível calcular a PED, que alcançou  $28,56 \times 10^6$  espermatozoides por testículo e  $73,13 \times 10^6$  por grama de testículo.

Tabela 3. Índices indicativos de produção espermática de *Oxymycterus rufus*

<b>Parâmetros (n=5)</b>	<b>Média ± DP</b>
Índice célula de Sertoli (espermátides arredondadas / Sertoli)	$4,29 \pm 1,50$
Capacidade suporte total das células de Sertoli	$8,21 \pm 1,77$
Célula de Sertoli por grama de testículo ( $\times 10^6$ )	$232,40 \pm 5,55$
Célula de Sertoli por testículo ( $\times 10^6$ )	$42,21 \pm 5,02$
Reserva espermática testicular por grama de testículo ( $\times 10^6$ )	$962 \pm 1,11$
Reserva espermática testicular por testículo ( $\times 10^6$ )	$183,50 \pm 7,41$
Produção espermática diária por grama de testículo ( $\times 10^6$ )	$73,13 \pm 8,40$
Produção espermática diária por testículo ( $\times 10^6$ )	$28,56 \pm 11,53$

#### 4. Discussão

Este é primeiro estudo que fornece dados completos sobre a espermatogênese do roedor silvestre *Oxymycterus rufus*. A ordem Rodentia foi caracterizada como aquela que apresenta maior variação em relação ao peso dos testículos/peso corporal (de 0,05 % *Castor canadensis* a 8,41 % Tatera indica) em estudo realizado com 133 espécies e, dentre estas, 62 roedores [11]. Além disso, estes mesmos autores observaram que a maior alocação e maior gasto de energia em massa testicular são encontrados em animais de pequeno porte, quando comparados com animais de grande massa corporal. Assim, o índice gonadossomático encontrado para *O. rufus* (0,47%), o qual é um roedor de pequeno porte da subordem Myomorpha, foi superior ao IGS de roedores de grande porte pertencentes à subordem Hystricomorpha, como a capivara *Hydrochoerus hydrochaeris* [23], a paca *Cuniculus paca* [24] e a cutia *Dasyprocta leporina* [25], em concordância com a descrição acima. Entretanto, o IGS mostrou-se inferior ao obtido para outros roedores de menor porte da mesma subordem à qual pertence *O. rufus*, tais como *Akodon cursor*, *Akodon montensis* e *Necomys lasiurus* [26]. Essas diferenças entre os IGS também podem ser explicadas devido ao sistema de reprodução das espécies, pois segundo Kenagy e Trombulak [11], o tamanho testicular também está relacionado ao

comportamento reprodutivo, sendo que espécies monogâmicas ou poligínicas, como *C. paca* [27] e *H. hydrochaeris* [28], apresentam o índice gonadossomático menor em relação àquelas com comportamentos promíscuos ou poliândricos. Isto corrobora a descrição do padrão de acasalamento para grande parte dos roedores, nos quais prevalece a promiscuidade [29], assim como na espécie em estudo.

Os túbulos seminíferos, locais de produção espermática, são os componentes mais abundantes do testículo na maioria dos mamíferos, apresentando assim grande influência no peso do parênquima testicular [13,18]. A proporção volumétrica de túbulos seminíferos em *O. rufus* (90,91 %) permaneceu dentro do percentual encontrado para a maioria dos mamíferos estudados (60 a 90 %) [13] e muito próximo à proporção de túbulos em *D. leporina* e *C. paca* [24-25]. Com exceção da capivara, que apresenta o parênquima testicular composto apenas por 52,09 % de túbulos seminíferos [23], o compartimento tubular de outros roedores da subordem Myomorpha apresenta percentual mais expressivo [26] do que o encontrado neste estudo. O ITS de *O. rufus* (0,40 %) foi superior ao de outras espécies silvestres [30,31], e de outros roedores como *H. hydrochaeris*, *D. leporina* e *Agouti paca* [24]. Assim, espera-se que animais com elevados índices tubulossomáticos apresentem maior investimento na produção de espermatozoides, corroborando assim com o que foi descrito por Kenagy e Trombulak [11].

Diversos fatores contribuem para constituição do diâmetro dos túbulos seminíferos, tais como o número de camadas de células mióides, constituintes da túnica própria, o tamanho e a população das células de Sertoli e das células germinativas, e o fluido secretado pelas células de Sertoli, fato este que determina o tamanho do lume tubular [23]. O diâmetro tubular de *O. rufus* (175,47  $\mu\text{m}$ ) apresentou-se próximo ao menor valor descrito para a maioria das espécies amniotas (180 a 300  $\mu\text{m}$ ) [32] e similar ao de roedores da subordem Hystricomorpha como o *T. moojeni* [33] e *D. leporina* [24]. Contudo, este parâmetro foi inferior ao de outras espécies de pequenos roedores da subordem Miomorpha [26,34] e de outros animais silvestres [20,35].

A altura do epitélio seminífero é uma mensuração mais fidedigna na avaliação da produção espermática, uma vez que acompanha diretamente as variações do ciclo do epitélio seminífero [36]. A altura de epitélio descrita para *O. rufus* (61,04  $\mu\text{m}$ ) se encontra dentro dos valores descritos para animais domésticos (60 a 100  $\mu\text{m}$ ) [13,37], apresentando-se similar à de roedores silvestres da subordem Hystricomorpha como *D. leporina* [24] e *T. moojeni* [33] e também a do canídeo *Cerdocyon thous* [38]. Por outro lado é inferior ao descrito para roedores da subordem Miomorpha [26,34]. O índice

epiteliossomático (IES) é um parâmetro utilizado para quantificar o investimento em epitélio seminífero em relação à massa corporal, estando diretamente associado com a produção espermática. *O. rufus* apresentou elevado IES (0,35 %), reforçando a tendência descrita anteriormente que atesta que animais menores investem mais energia em massa testicular apresentando maior produção espermática [11].

O comprimento de túbulos seminíferos relaciona-se a três parâmetros estruturais: o tamanho do testículo, o diâmetro tubular e a proporção volumétrica dos túbulos seminíferos no parênquima testicular [13,23,39]. Para que seja possível realizar uma precisa análise comparativa entre os diferentes grupos animais, utiliza-se o comprimento de túbulos seminíferos em grama por testículo [31]. O comprimento dos túbulos seminíferos por grama de testículo encontrado para a espécie (34,93 m) em estudo foi duas vezes maior que o descrito para a maioria dos mamíferos domésticos (10 a 15 m/g) [13], incluindo *H. hydrochaeris* [23]. Contudo, foi próximo ao registrado para roedores como *D. leporina* [25], *O. nigripes* [26] e *T. moojeni* [33].

Os oito estádios do CES apresentaram-se de forma segmentar ao longo dos túbulos seminíferos, nos quais apenas um estágio por secção transversal de túbulo foi observado, padrão este descrito na maioria dos mamíferos [13,24,34,35,40,41], exceto para alguns primatas, nos quais dois ou mais estádios são encontrados por secção transversal de túbulo, em um arranjo helicoidal [42]. A frequência média de cada um dos estádios do CES é um parâmetro relativamente constante entre indivíduos de uma mesma espécie, embora variações interespecíficas sejam perceptíveis [13]. Em *O. rufus* o estágio 1 foi o mais frequente, assim como observado em outros roedores *D. leporina* [24] e *A. paca* [25], e em outros animais silvestres [43,41].

A meiose pode ser uma boa referência quando compara-se o processo reprodutivo entre as espécies. Resumidamente, o ciclo do epitélio seminífero pode ser dividido em três fases distintas, tendo como referência a meiose. A fase pré-meiótica refere-se aos estádios do ciclo dispostos após a espermiacção e antes da metáfase da meiose (estádios 1 ao 3); a fase meiótica engloba o estágio 4 no qual as duas divisões meióticas ocorrem; a fase pós-meiótica compreende todos os estádios após a conclusão das divisões meióticas até a espermiacção (estádios 5 ao 8) [13,16]. Na espécie em estudo, as fases pré e pós-meióticas apresentaram frequência semelhante dentro do ciclo, similar ao descrito para os roedores como *D. leporina* e *A. paca* [25], *T. moojeni*, [33], *H. hydrochaeris* [44], assim como observado também em mamíferos não roedores [30]. Por outro lado, frequências diferentes foram descritas para outros roedores como *A. cursor*, *A. montensis*, *N. lasiurus*, *O. nigripes* [26] e *Oligoryzomys flavescens* [45]. A fase meiótica foi menor do

que normalmente é observado em mamíferos domésticos - 10% [13], mas similar ao descrito para os roedores *A. cursor* e *O. nigripes* [46].

A avaliação ultraestrutural dos diferentes tipos de espermatídes permite acompanhar a formação e desenvolvimento do acrossoma. A biogênese do acrossoma inicia-se por uma via de transporte de vesículas do retículo endoplasmático rugoso até o aparelho de Golgi, onde são produzidas dois tipos de vesículas: pro-acrossomal e não-acrossomal, que seguirão para polos opostos da superfície nuclear. O primeiro formará o acrossoma e o segundo contribuirá para a formação da cauda das espermatídes a partir do centrosomo [47]. As vesículas pro-acrossomais, com grânulos pro-acrossomais em seu interior, são transportadas por proteínas motoras, tal como a miosina, sobre os microtúbulos. Estas vesículas coalescem em um único grânulo, denominado vesícula acrossomal, a qual se achata no momento em que faz contato com a superfície nuclear [15], formando assim o capuz acrossômico. Este capuz, acoplado ao envoltório nuclear, inicia então sua descida ao longo do núcleo [48]. Desse modo, o núcleo progressivamente se alonga e o aparelho de Golgi afasta-se do acrossoma e migra para o polo caudal da célula. Neste ponto o acrossoma parece cessar seu crescimento, mas sofre um processo gradual de aumento em densidade [15]. O acrossoma toma forma característica em muitas espécies, podendo se projetar anteriormente e mesmo atingir dimensões superiores às do próprio núcleo [49].

A duração do CES é um parâmetro espécie específico que é controlado pelo genótipo das células germinativas, assim como a frequência relativa de cada estágio [13,50]. Segundo Costa et al. [25], a duração média de um ciclo espermatogênico em roedores é um pouco mais rápida (8 a 12 dias) quando comparada à duração em outras espécies de mamíferos, que ocorre num intervalo de 9 a 14 dias [13,15,25,37]. A duração do CES em *O. rufus* (6,58 dias) foi relativamente curta quando comparada às menores durações registradas até hoje para os roedores *D. leporina* [24] e *Cletherionomys glareolus* [51]. Apresentou-se ainda menor que em outros roedores pertencentes, tanto da subordem Hystricomorpha quanto Miomorpha [25,26,33,44]. Assim como a duração de um ciclo, a duração total do processo espermatogênico de *O. rufus* esteve abaixo do valor descrito para espécies de roedores e de mamíferos domésticos [13,25,26,33,44]. Adicionalmente, Peirce e Breed [52] relataram que o sistema de acasalamento das espécies também pode influenciar na duração do ciclo do epitélio seminífero. Estudo realizado com duas espécies de roedores com sistemas de acasalamento distintos, demonstrou que a espécie poligínica apresentou ciclo mais longo, enquanto aquela com sistema de acasalamento promíscuo (onde se encaixa *O. rufus*), apresentou ciclo com menor duração. A

justificativa seria que em ciclos de pequena duração, a produção de espermatozoides é mais rápida, o que pode refletir uma adaptação na competição entre machos pela fertilização.

Uma das formas de se determinar a eficiência do processo espermatogênico é através das razões numéricas entre a espermatogônia do tipo A e os outros tipos celulares componentes do epitélio seminífero [53-54]. Estas razões permitem comparações entre diferentes espécies, bem como a quantificação de perdas que normalmente ocorrem durante os processos de divisão celular [55]. O coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais representa o número de espermatócitos primários em preleptóteno/leptóteno derivados de cada espermatogônia do tipo A [56]. Geralmente, seis gerações de espermatogônias são descritas para a maioria dos mamíferos, a partir da espermatogônia tronco, possibilitando a origem de 64 células ao final da fase mitótica [13,15,44]. O coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais em *O. rufus* apresentou eficiência relativa de apenas 8,82 % em relação ao número máximo possível, podendo se estimar assim uma perda celular de aproximadamente 90 % nesta fase. Apesar deste valor ser expressivo, se encontra próximo da amplitude de perdas (60 a 90%) descrita para esta fase em mamíferos domésticos e silvestres [13,24,43,55,57].

A apoptose de células germinativas, durante estádios específicos do ciclo do epitélio seminífero, pode representar a remoção de células que apresentem componentes genéticos incompletos ou anormalidades cromossômicas [58-59]. Outro papel para a apoptose no túbulo seminífero inclui o mecanismo regulatório para manter o número apropriado de células germinativas por célula de Sertoli, além da arquitetura e posição das células germinativas no epitélio [60]. Na maioria dos mamíferos estudados, a menor perda celular registrada ocorre na fase meiótica (5 a 30%) [13] e, considerando a eficiência total desta fase, quatro espermátides arredondadas são esperadas para cada espermatócito primário (1:4). Em *O. rufus* o rendimento meiótico alcançou 69,75%, estando este dentro da faixa registrada para outros roedores *C. paca*, *D. leporina*, *H. hydrochaeris* [24], *A. cursor*, *A. montensis*, *N. lasiurus*, *O. nigripes* [26] e *T. moojeni* [33].

O rendimento geral da espermatogênese é obtido pela razão entre espermatogônias do tipo A e espermátides [13], sendo as perdas durante o processo espermiogênico consideradas pequenas e não significativas [13,17,18,53]. O alto número de espermatogônias do tipo A encontrada em *O. rufus* levou ao baixo rendimento geral da espermatogênese (11,98), quando comparado à *H. hydrochaeris*, *C. paca* e *D.*

leporina [24] pertencentes à subordem Hystricomorpha e também a outros roedores silvestres como *A. cursor* e *O. nigripes* [46] da subordem Miomorpha.

As células de Sertoli desempenham papel fundamental na regulação do processo espermatogênico, pois o coordenam tanto topograficamente quanto funcionalmente [13,36,61]. A população destas células é estável em animais adultos e ao longo dos diferentes estádios do CES, sendo assim utilizada como um ponto de referência para se quantificar e avaliar funcionalmente o processo espermatogênico [13,15,53]. Em *O. rufus*, o número de células de Sertoli por grama de testículo ( $232,4 \times 10^6$ ) se encontra muito acima do valor observado para pequenos roedores da subordem Miomorpha [26] e também acima do valor descrito para *A. paca*, *D. leporina* [25] e *H. hydrochaeris* [28], pertencentes à subordem Hystricomorpha. A célula de Sertoli apresentou baixa capacidade de suporte (8,21 células), sendo esta menor que o registrado para outras espécies de mamíferos (11 a 37 células) [13,20,24,43,55,57]. Assim, a baixa capacidade suporte das células de Sertoli parece ser compensada pelo maior número de células de Sertoli por grama de testículo, permitindo a eficiência do processo espermatogênico em *O. rufus*.

A reserva espermática testicular (RET) quantifica o número potencial de espermatozoides produzidos por testículo e por grama de testículo de determinada espécie, a cada ciclo do epitélio seminífero [17]. A RET em *O. rufus* ( $962 \times 10^6$ ) foi muito maior que a descrita para mamíferos domésticos [13] e também acima da registrada para outros roedores da subordem Hystricomorpha como *H. hydrochaeris*, *D. leporina* e *C. paca* [24]. Este fato pode ser explicado pelo expressivo comprimento de túbulos seminíferos observado em *O. rufus*, o qual está diretamente envolvido com a reserva espermática. Além disso, o alto valor da RET relaciona-se com o comportamento promíscuo em *O. rufus*, enquanto que *H. hydrochaeris* e *C. paca*, com sistemas de acasalamento poligínico e monogâmico, respectivamente [27,28], apresentam menor RET.

O cálculo da produção espermática diária (PED) é obtido a partir da duração de um ciclo do epitélio seminífero e do conhecimento da reserva espermática testicular, sendo este um parâmetro espécie específico. Além disso, a PED por grama de testículo é uma mensuração da eficiência da espermatogênese e pode ser utilizada em comparações interespecíficas [62-63]. Em *O. rufus*, a PED por grama de testículo é bastante elevada ( $73,13 \times 10^6$ ) quando comparada com roedores da subordem Hystricomorpha, *H. hydrochaeris* e *C. paca* [24], e similar à descrita para *A. cursor*, *A. montensis*, *N. lasiurus* e *O. nigripes*, pertencentes à subordem Miomorpha [26]. A alta eficiência

espermatogênica, correlaciona-se com os seguintes fatores: a curta duração da espermatogênese; proporção e o comprimento dos túbulos seminíferos; o número de células de Sertoli por grama de testículo e sua capacidade suporte [22, 37,54].

Portanto, fatores como: a curta duração do ciclo do epitélio seminífero, o que possibilita a rápida produção de espermatozoides; valores elevados da proporção de túbulos seminíferos no parênquima testicular; grande comprimento de túbulos seminíferos e elevado número de células de Sertoli por grama de testículo, proporcionam a *Oxymycterus rufus* alta eficiência no processo espermatogênico, mesmo que a espécie apresente baixa capacidade suporte das células de Sertoli.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem a ONG Ambiente Brasil pela logística de amostragem, a CAPES pela bolsa de doutorado, a FAPEMIG pelo apoio financeiro e ao Núcleo de Microscopia e Microanálise (UFV), pelo auxílio com a técnica de microscopia eletrônica de transmissão.

### **Referências Bibliográficas**

1. Drummond GM, Martins CS, Machado ABM, Sebaio FA, Antonini Y (2005) Biodiversidade em Minas Gerais. Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte. pp. 17-35.
2. Costa L, Leite YLR, Mendes SL, Ditchfield AD (2005) Conservação de mamíferos no Brasil. Megadiversidade 1: 103-112.
3. Oliveira JA, Bonvicino CR (2006) Ordem Rodentia. In: Reis N R, Peracchi AL, Pedro WA, Lima IP, editors. Mamíferos do Brasil. Londrina: Paraná. pp. 347-400.
4. Wolff JO, Sherman PW (2007) Rodent societies as model system. In: Wolff JO, Sherman PW, editors. Rodent Societies: An Ecological and Evolutionary Perspective. London: The University of Chicago Press. pp. 03-07.
5. Bonvicino CR, Oliveira JA, D'Andrea PS (2008) Guia dos roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos. Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa - OPAS/OMS. 120 p.
6. Bonvicino CR, Lemos B, Weksler M (2005) Small mammals of Chapada dos Veadeiros national park (Cerrado of Central Brazil). Ecologic, karyologic and taxonomic considerations. In: Reis N R, Peracchi AL, Pedro WA, Lima IP, editors. Mamíferos do Brasil. Londrina: Paraná. pp. 347-406.

7. Kravetz FO (1972) Estudio del régimen alimentario, períodos de actividad y otros rasgos ecológicos en una población de “ratón hocicudo” (*Oxymycterus rufus platensis*, Thomas) de Punta Lara. *Acta Zool Lill* 29: 201-212.
8. Dalby PL (1975) Biology of Pampa rodents, Balcarce area, Argentina. Publications of the Museum of Michigan State University. *Biol Ser* 5: 149-271.
9. Gonçalves PR, Oliveira JA (2004) Morphological and genetic variation between two sympatric forms of the genus *Oxymycterus* (Rodentia: Sigmodontinae): an evaluation of hypotheses of differentiation within the genus. *J Mammal* 85: 148-161.
10. Wildt DE (2005) Lions, Tigers, and Pandas, Oh My. *J Androl* 26: 452-454.
11. Kenagy GJ, Trombulak SC (1986) Size and function of mammalian testis in relation to body size. *J Mammal* 67: 1-22.
12. Azevedo MHF, Paula TAR, Matta SLP, Fonseca CC, Costa EP, Costa DS, Peixoto JV (2010) Cell population indexes of spermatogenic yield and testicular sperm reserves in adult jaguars (*Panthera onca*). *Anim Reprod Sci* 118: 83-88.
13. França LR, Russell LD (1998) The testis of domestic animals. In: Martínez F, Regadera J, editors. *A multidisciplinary overview*. Madrid, Spain: Churchill Livingstone. pp. 197-219.
14. Leblond CP, Clermont Y (1952) Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann. N. Y. Acad Sci* 55: 548-584.
15. Russell LD, Ettlín RA, Sinha-Hikim AP, Clegg ED (1990) Mammalian spermatogenesis. In: Russell LD, Ettlín RA, Sinha-Hikim AP, Clegg ED, editors. *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. Bolesta: Cache River Press. pp. 1-40.
16. Courot M, Hochereau-de-Reviers MT, Ortavant R (1970) Spermatogenesis. In: Johnson AD, Gomer WR, Vandemark NL, editors. *The Testis*. New York: Academic Press. pp. 399-432.
17. Berndtson WE (1977) Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *J Anim Sci* 44: 818-883.
18. Amann RP (1970) Sperm production rates. In: Johnson AD, Gomes WR, Vandemark NL, editors. *The testis*. New York: Academic Press. pp. 433-482.
19. Johnson L, Petty CS, Neaves WB (1981) A new approach to qualification of spermatogenesis and its application to germinal cell attrition during human spermatogenesis. *Biol Reprod* 25: 217-226.
20. Costa KLC, Matta SLP, Gomes MLM, Paula TAR, Freitas KM, Carvalho FAR, Silveira JA, Dolder H, Mendis-Handagama SLMC (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* 127: 202-212.
21. Abercrombie M (1946) Estimation of nuclear populations from microtome sections. *Anat Rec* 94: 239-247.
  22. Amann RP (1962) Reproductive capacity of dairy bulls. IV. Spermatogenesis and testicular germ cell degeneration. *Am J Anat* 110: 69-78.
  23. Paula TAR, Matta SLP, Costa DS (2002) Avaliação histológica e quantitativa do testículo de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). *Biosci J* 18: 121-136.
  24. Carretta Júnior M (2012) Estudo comparativo do processo espermatogênico e duração do ciclo do epitélio seminífero através da técnica de imunohistoquímica com bromodeoxiuridina de três diferentes espécies de roedores da subordem Hystricomorpha: cutia (*Dasyprocta leporina*), paca (*Cuniculus paca*) e capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Tese (Doutorado). Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 131 p.
  25. Costa GM, Leal MC, Ferreira AC, Guimarães DA, França LR (2010) Duration of spermatogenesis and spermatogenic efficiency in two large neotropical rodent species: the agouti (*Dasyprocta leporina*) and paca (*Agouti paca*). *J Androl* 31: 489-499.
  26. Cordeiro Júnior DA (2009) Estrutura e função testiculares em roedores silvestres das famílias Echimyidae (*Trinomys moojeni*) e Cricetidae (*Akodon cursor*, *Akodon montensis*, *Necromys lasiurus* e *Oligoryzomys nigripes*), da Reserva Particular do Patrimônio Natural do Caraça - MG. Doutorado (Tese). Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. 109 p.
  27. Carretta Júnior M (2008) Avaliação morfofuncional do processo espermatogênico de pacas (*Cuniculus paca*, Linnaeus, 1766) adultas. Dissertação (Mestrado). Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 61 p.
  28. Paula TAR (1999) Avaliação histológica e funcional do testículo de capivaras adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Doutorado (Tese). Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 84 p.
  29. Waterman J (2007) Male mating strategies in rodents. In: Wolff JO, Sherman PW, editors. *Rodent Societies: An Ecological and Evolutionary Perspective*. London: The University of Chicago Press. pp. 27-41.
  30. Balarini MK, Paula TAR, Matta SLP, Peixoto JV, Guião-Leite FL, Rossi Júnior JL, Czermak Júnior AC, Walker NJ (2012) Stages and duration of the cycle of the

- seminiferous epithelium in oncilla (*Leopardus tigrinus*, Schreber, 1775). *Theriogenology* 77: 873-880.
31. Sarti P (2006) Avaliação morfológica do testículo e da espermatogênese de jaguatiricas (*Leopardus pardalis*, Linnaeus, 1758) adultas. Dissertação (Mestrado), Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 56 p.
  32. Roosen-Runge EC (1977) The process of spermatogenesis in animals. Academic Press: Cambridge. 214 p.
  33. Cordeiro Júnior DA, Costa GMJ, Talamoni AS, França LR (2010) Spermatogenic efficiency in the spiny rat, *Trinomys moojeni* (Rodentia: Echimyidae). *Anim Reprod Sci* 119: 97-105.
  34. Melo FCSA, Sousa TP, Costa KLC, Matta SLP, Melo FR, Santa-Rita RM (2013) Descriptive morphometry and stereology of the tubular compartment in the wild rodent *Hylaeamys megacephalus* (Rodentia: Cricetidae) from Central Brazil. *Anim Reprod Sci* 138: 110-117.
  35. Oishi M, Takahashi M, Amasaki H, Janssen T, Johnston SD (2013) The seminiferous epithelial cycle and microanatomy of the koala (*Phascolarctos cinereus*) and southern hairy-nosed wombat (*Lasiorhinus latifrons*) testis. *J Anat* 222: 380-389.
  36. Wing TY, Christensen AK (1982) Morphometric studies on rat seminiferous tubules. *Am J Anat* 165: 13-25.
  37. Hess RA, França LR (2007) Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: Cheng CY, editors. *Molecular mechanisms in spermatogenesis*. New York: Landes Bioscience. pp. 1-15.
  38. Caldeira BC, Paula TAR, Matta SLP, Balarini MK, Campos PKA (2010) Morphometry of testis and seminiferous tubules of the adult crab-eating fox (*Cerdocyon thous*, Linnaeus, 1766). *Revista Ceres* 57: 569-575.
  39. Costa DS, Henry M, Paula TAR (2004) Espermatogênese de catetos (*Tayassu tajacu*). *Arq Bras Med Vet Zootec* 56: 46-51.
  40. Morais DB, Paula TAR, Freitas KM, Matta SLP (2012) Cycle of the seminiferous epithelium of the bat *Molossus molossus*, characterized by tubular morphology and acrosomal development. *Asian Pacific J Reprod* 1: 303-307.
  41. Morais DB, Paula TAR, Barros MS, Balarini MK, Freitas MBD, Matta SLP (2013) Stages and duration of the seminiferous epithelium cycle in the bat *Sturnira lilium*. *J Anat* 222: 372-379.

42. França LR, Cardoso FM (1998) Duration of spermatogenesis and sperm transit time through the epididymis in the piau boar. *Tissue Cell* 30: 573-582.
43. Castro MM (2012) Duração do ciclo do epitélio seminífero e produção espermática de *Leopardus pardalis* (Linnaeus, 1758). (Mestrado). Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 51 p.
44. Paula TAR, França LR, Garcia HC (1999) Seminiferous epithelium cycle and its duration in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). *Tissue Cell* 31: 327-334.
45. Boiani L, Casanova G, Olivera A, Berois N (2007) Seminiferous epithelium cycle of a hantavirus reservoir, the long-tailed mouse *Oligoryzomys flavescens* (Rodentia - Cricetidae). *Tissue Cell* 39: 267-275.
46. Balarini MK (2013) Morphofunctional evaluation of the testis and spermatogenesis of wild rodents *Akodon cursor* (Winge, 1887) and *Oligoryzomys nigripes* (Olfers, 1818) (Rodentia: Cricetidae). Tese (Doutorado), Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 81 p.
47. Kierszenbaum AL, Tres LL (2004) The acrosome–acroplaxome–manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Arch Histol Cytol* 67: 271-284.
48. Kierszenbaum AL, Tres LL (2011) Spermatogenesis. In: Kierszenbaum AL, Tres LL, editors. *Histology and Cell Biology: An introduction to pathology*. 3<sup>rd</sup> Ed, Philadelphia: Elsevier, pp. 587-615.
49. Garcia SML, Fernández GC (2012) Spermatogenesis. In: Garcia SML, Fernández GC, editors. *Embryology*. Porto Alegre: Artmed. pp. 26-50.
50. França LR, Ogawa T, Avarbock MR, Brinster RL, Russell LD (1998) Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biol Reprod* 59: 1371-1377.
51. Grocock CA, Clark JR (1976) Duration of spermatogenesis in the vole (*Microtus agrestis*) and the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *J Reprod Fertil* 47: 133-135.
52. Peirce EJ, Breed WG (2001) A comparative study of sperm production in two species of Australian arid zone rodents (*Pseudomys australis*, *Notomys alexis*) with marked differences in testis size. *Reproduction* 121: 239-247.
53. Johnson L, Varner DD, Roberts ME, Smith TL, Keillor GE, Scrutchfield WL (2000) Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. *Anim Reprod Sci* 60-61: 471-480.
54. França LR, Avelar GF, Almeida FFL (2005) Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology* 63: 300-318.

55. Costa DS, Menezes CMC, Paula TAR (2007) Spermatogenesis in white-lipped peccaries (*Tayassu peccary*). *Anim Reprod Sci* 98: 322-334.
56. Castro ACS, Berndtson WE, Cardoso FM (1997) Cinética e quantificação da espermatogênese: bases morfológicas e suas aplicações em estudos da reprodução de mamíferos. *Rev Bras Reprod Anim* 21: 25-34.
57. Costa DS, Macedo DB, Santos MD, Paula TAR, Faria FJC (2011) Intrinsic rate of spermatogenesis in free-ranging feral pigs (*Sus scrofa* sp). *Anim Reprod Sci* 125: 165-169.
58. Collins JA, Schandi CA, Young KK, Vesely J, Willingham MC (1997) Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J Histochem Cytochem* 45: 923-934.
59. Eaker S, Pyle A, Cobb J, Handel MA (2001) Evidence for meiotic spindle checkpoint from analysis of spermatocytes from Robertsonian-chromosome heterozygous mice. *J Cell Sci* 114: 2953-2965.
60. Chaturvedi PK, Johnson L (1993) Architectural arrangement of stages of the spermatogenic cycle within human seminiferous tubules is related to efficiency of spermatogenesis. *Cell Tissue Res* 273: 65-70.
61. Russell LD, Griswold M D (1993) *The Sertoli cell*. Cache River Press: Clearwater, Florida. 801 p.
62. Amann RP, Johnson L, Thompson DLJR, Pickett B W (1976) Daily spermatozoal production, epididymal spermatozoal reserves and transit time of spermatozoa through the epididymis of the Rhesus monkey. *Biol Reprod* 15: 586-592.
63. Johnson L (1986) Review article: spermatogenesis and aging in the human. *J Androl* 7: 331-354.

## Artigo 2

### **Morfometria do compartimento tubular e dinâmica da espermatogênese do roedor silvestre *Oxymycterus nasutus* (Rodentia: Cricetidae)**

#### **Resumo**

Apesar da ordem Rodentia apresentar ampla distribuição mundial e importante número de representantes na fauna brasileira, são escassos os estudos detalhados sobre a morfofisiologia testicular destes animais. Portanto, este estudo teve como objetivo analisar a dinâmica do processo espermatogênico de *Oxymycterus nasutus*, utilizando para isto ferramentas morfométricas e estereológicas. Testículos de 10 machos sexualmente maduros foram utilizados, obtendo-se índice gonadossomático médio de 0,89 %. O parênquima testicular é composto por 95,19% de túbulos seminíferos que totalizaram 18,62 metros por grama de testículo. Foram caracterizados 8 estádios do ciclo do epitélio seminífero de acordo com o Método da Morfologia Tubular. O estágio 1 foi utilizado para contagem da população de células germinativas, bem como das células de Sertoli. Em média, 3,47 espermatogônias do tipo A, 24,39 espermatócitos primários em preleptóteno na transição para leptóteno, 24,13 espermatócitos primários em paquíteno, 68,38 espermátides arredondadas e 7,33 células de Sertoli foram encontradas por secção transversal tubular. O número de células de Sertoli por grama de testículo foi de  $91,02 \times 10^6$  e cada célula foi capaz de suportar 9,34 espermátides e 16,42 células germinativas. O coeficiente de mitoses espermatogoniais foi 7,03, enquanto 2,83 espermátides foram produzidas de cada espermatócito primário em paquíteno. A eficiência do processo espermatogênico como um todo foi de 19,71 células, enquanto que a reserva espermática por grama de testículo foi em média  $849,64 \times 10^6$  espermátides. Conclui-se que *Oxymycterus nasutus* é uma espécie que tem alto investimento energético na reprodução, corroborando os achados para outras espécies da família Cricetidae.

**Palavras-chave:** células de Sertoli, espermiogênese, epitélio seminífero, morfologia, estereologia testicular.

## 1. Introdução

A ordem Rodentia apresenta ampla distribuição mundial, com representantes sendo encontrados em todos os habitats, desde a tundra ártica aos desertos (Honeycutt, 2004). São abundantes em florestas tropicais e desempenham diversas funções ecológicas importantes nestes locais, atuando como predadores de sementes e de plântulas (Vieira et al., 2003), dispersores de sementes (Cáceres e Monteiro-Filho, 2000), e ainda como base da cadeia alimentar de predadores como serpentes, aves de rapina e mamíferos carnívoros (Wang, 2002).

Os roedores cricetídeos da subfamília Sigmodontinae, constituem o grupo mais diverso de mamíferos do Novo Mundo (D'Elía, 2003), o qual é formado por 74 gêneros e aproximadamente 300 espécies (Musser e Carleton, 2005). O gênero *Oxymycterus* contém nove espécies registradas no Brasil, com tamanho corporal variando de 11,5 a 18 cm e o comprimento da cauda menor que o do corpo. Possui garras bem desenvolvidas e focinho longo, o mesmo padrão descrito para espécies dentro do gênero. A coloração da pelagem do dorso varia de cinza escuro ou castanho-avermelhado a castanho-amarelado (Bonvicino et al., 2008).

A espécie modelo deste estudo, *Oxymycterus nasutus* (Waterhouse, 1897), apresenta hábito terrestre e semi-fossorial, ocupando áreas de campos abertos dos estados da região Sul do Brasil. Além disso, possui uma dieta altamente insetívora (Paise e Vieira, 2006).

Apesar da ordem Rodentia possuir grande número de representantes na fauna brasileira, são escassos os dados na literatura sobre sua biologia reprodutiva (Duarte, 2003), o que nos motivou a realizar o presente estudo. Estudos quantitativos das células que compõem o epitélio germinativo de túbulos seminíferos fornecem dados importantes para o entendimento do processo espermatogênico (França e Russell, 1998). O epitélio germinativo é organizado em uma série de associações celulares ou estádios (Leblond e Clermont, 1952), os quais podem ser classificados de acordo com o Método da Morfologia Tubular, o qual permite a caracterização em oito estádios por ciclo (Berndtson, 1977). Outro importante parâmetro na avaliação da função testicular é o índice das células de Sertoli, pois este reflete diretamente a eficiência destas células em relação à espermatogênese (Russell e Peterson, 1984; Sinha-Hikim et al., 1989). Neste sentido, objetivou-se descrever a dinâmica da espermatogênese de *O. nasutus* através da quantificação de índices, rendimentos intrínsecos e reserva espermática testicular, além da descrição dos estádios do ciclo do epitélio seminífero.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Coleta dos animais**

Foram coletados 10 espécimes de *Oxymycterus nasutus* machos e sexualmente maduros. As coletas foram realizadas no bioma Pampa (S 30°23'01" e W 51°22'27"), em Barra do Ribeiro no Rio Grande do Sul, sendo previamente autorizadas pelo ICMBio/SISBIO (número do protocolo 29358-1).

Os espécimes foram capturados em armadilhas tipo Sherman e gaiolas com isca suspensa (live-trap) distribuídas na área de estudo e posteriormente levados ao laboratório de Biologia Animal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), onde foram submetidos à eutanásia por superdosagem anestésica, pela associação de cloridrato de Xilazina (150 mg/kg) associado a cloridrato de Quetamina (10 mg/kg). Realizou-se então a pesagem e medição dos animais, seguidas da remoção e pesagem de ambos os testículos. A albugínea de um dos testículos foi dissecada e pesada para obtenção do peso do parênquima testicular. Todo o procedimento realizado foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV – número do protocolo 28/013).

Para as análises histomorfométricas, fragmentos testiculares foram fixados em solução Karnovsky (Karnovsky, 1965) por 24h, transferidos para etanol 70 % e processados rotineiramente para inclusão em glicol-metacrilato (Historesin®, Leica). Foram realizadas secções semisseriadas de 3 µm de espessura em micrótomo rotativo (Leica, RM2255), respeitando-se intervalo mínimo de 40 µm entre os cortes, que foram corados com azul de toluidina/borato de sódio 1 % e posteriormente analisados. Para a realização da morfometria, foram capturadas imagens em diferentes aumentos, em fotomicroscópio (Olympus BX-40), as quais foram analisadas utilizando-se programa Image Pro Plus® (Media Cybernetics).

Para análise da ultraestrutura em microscopia eletrônica de transmissão (MET), os fragmentos testiculares foram refixados em solução glutaraldeído 2,5 %, por no mínimo 12 h e posteriormente armazenados em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,4 a 4 °C. As amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1 % e ferrocianeto de potássio 8 % (1:1) durante 2 h e posteriormente desidratadas em etanol, seguindo-se a inclusão em resina Spurr (EMS, USA). Cortes ultrafinos, obtidos em ultramicrótomo (Sorvall Nt2-B), foram contrastados com acetato de uranila 3 % e citrato de chumbo 3 % e observados em microscópio eletrônico de transmissão (Jeol 1011) no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa.

## **2.2. Morfometria e estereologia testicular**

O índice gonadossomático (IGS) foi calculado a partir do peso corporal e do peso de ambos os testículos, utilizando-se a seguinte fórmula: (peso gonadal/peso corporal) x 100 (Berndtson, 1977). A proporção volumétrica dos componentes do parênquima testicular (túbulos seminíferos e tecido intertubular) foi determinada a partir da contagem de 2660 pontos projetados sobre 10 imagens obtidas ao acaso, quantificando-se assim o percentual de pontos sobre túbulos seminíferos (túnica própria, epitélio seminífero e lume), e intertúbulo.

O peso do parênquima testicular foi calculado com base no peso testicular total, subtraindo-se deste o peso da albugínea testicular. O volume dos componentes do parênquima, expresso em mL, foi estimado a partir do conhecimento do volume testicular. Como a densidade volumétrica do testículo é próxima de 1, considerou-se o peso testicular igual ao volume (Johnson et al., 1981; França e Godinho, 2003; Costa et al., 2011). O volume do epitélio seminífero foi obtido dividindo-se o percentual do epitélio seminífero por 100 e multiplicando o resultado pelo peso do parênquima testicular. O índice tubulossomático (ITS), o qual determina o investimento em túbulos seminíferos em relação à massa corporal, foi obtido dividindo-se o volume de túbulos seminíferos pelo peso corporal e o valor resultante multiplicado por 100.

O diâmetro tubular médio e a altura do epitélio seminífero foram obtidos a partir da mensuração de 30 secções transversais tubulares, de contorno o mais circular possível, independente do estágio do ciclo do epitélio seminífero (CES) em que se encontravam. Como o epitélio é a parte funcional do túbulo, calculou-se o índice epiteliossomático (IES) utilizando-se a seguinte fórmula: (volume do epitélio seminífero/peso corporal) x 100.

O comprimento total de túbulos seminíferos por testículo, expresso em metros, foi estimado a partir da seguinte fórmula:  $CT = VTS/\pi R^2$ , onde VTS= volume dos túbulos seminíferos;  $\pi R^2$ = área da secção transversal dos túbulos seminíferos e R= diâmetro tubular/2. O comprimento total de túbulos seminíferos por grama de testículo foi calculado dividindo-se o valor do comprimento total de túbulos seminíferos por testículo pelo peso de ambos os testículos.

## **2.3. Estádios do ciclo do epitélio seminífero e frequência relativa**

Para caracterização dos estádios do CES, utilizou-se o método da morfologia tubular descrito por Berndtson (1977), o qual se baseia na forma e localização do núcleo das espermátides, na ocorrência de figuras de divisão meiótica e na composição geral do

epitélio seminífero, identificando-se 8 estádios. A frequência relativa de cada um dos 8 estádios do CES foi determinada a partir da caracterização e contagem de 200 secções transversais de túbulos seminíferos para cada animal, escolhidos aleatoriamente.

#### **2.4. Contagem de células germinativas e índices de rendimento**

As populações das células germinativas e células de Sertoli foram estimadas a partir da contagem de 10 secções transversais de túbulos seminíferos no estágio 1 do CES, por animal. Foram quantificadas as populações de espermatogônias do tipo A (A), espermatócitos primários em preleptóteno na transição para leptóteno (PL-L), espermatócitos primários em paquíteno (P), espermátides arredondadas (AR) e células de Sertoli (S).

O diâmetro nuclear médio das células germinativas e o nucleolar médio das células de Sertoli foram obtidos pela mensuração de 30 núcleos e 30 nucléolos de cada tipo celular citado. Por existirem variações no tamanho das células que compõem o epitélio seminífero, as contagens obtidas foram corrigidas numericamente pela fórmula de Abercrombie (1946), posteriormente modificada por Amann (1962), a qual considera o diâmetro nuclear/nucleolar médio e a espessura do corte. Baseado nos valores corrigidos, foi possível calcular os seguintes coeficientes: o coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais (PL-L/A), no qual se quantifica as perdas celulares ocorridas durante a fase espermatogonial; o rendimento meiótico (AR/P), que quantifica a eficiência das divisões meióticas; o rendimento geral da espermatogênese (AR/A), que demonstra a eficiência deste processo como um todo; a capacidade suporte total das células de Sertoli para com as células germinativas  $[(A + PL-L + P + AR) / S]$ , e para com as espermátides arredondadas (AR/S). O número total de células de Sertoli por testículo foi determinado a partir do valor do comprimento de túbulos seminíferos, multiplicado pelo número corrigido de nucléolos de Sertoli por secção transversal e o resultado dividido pela espessura do corte. Para o cálculo desse número por grama de testículo, dividiu-se o valor obtido para o número de células de Sertoli por testículo pelo peso testicular.

A reserva espermática testicular (RET) total e por grama de testículo foi determinada a partir da população celular de espermátides arredondadas no estágio 1 do CES, considerando-se para isto que a perda ocorrida na espermiogênese não é significativa. Para isso, foi obtido o número médio de espermátides arredondadas em secções transversais de túbulos seminíferos, sendo este número corrigido para o comprimento total do túbulo por testículo ou por grama de testículo, a partir da fórmula:

RET = (comprimento dos túbulos seminíferos / espessura do corte) x número corrigido de espermátides arredondadas por secção transversal (Berndtson, 1977). Os dados descritivos foram analisados utilizando a função estatística do software Excel/ Windows7 e estão representados como média e desvio padrão.

### **3. Resultados e Discussão**

Este é primeiro estudo que fornece dados do processo espermatogênico do roedor silvestre *Oxymycterus nasutus*.

#### **3.1. Morfometria e estereologia testicular**

Todos os valores referentes aos parâmetros biométricos, morfométricos e de estereologia testicular de *Oxymycterus nasutus* são encontrados na Tabela 1.

O peso testicular registrado para *O. nasutus* foi de 0,52 g, sendo superior ao de outros roedores cricetídeos tal como *Oligoryzomys nigripes* (0,14 g; Balarini, 2013), *Hylaeamys megacephalus* (0,19 g; Melo et al., 2013), *Akodon montensis* (0,22 g; Cordeiro Júnior, 2009) e *Akodon cursor* (0,33 g; Balarini, 2013). O testículo é um órgão envolvido por uma cápsula de tecido conjuntivo denominada albugínea testicular (Russell et al., 1990), a qual não participa diretamente do processo espermatogênico e da secreção androgênica (Johnson et al., 1981). A albugínea testicular em *O. nasutus* representou 3,84% do peso testicular, sendo este valor superior ao descrito para outras espécies de roedores como *Trynomys moojeni* (3,10 %; Cordeiro Júnior et al., 2010), *H. megacephalus* (3,33 %; Melo et al., 2013) e *Necomys lasiurus* (3,80 %; Cordeiro Júnior, 2009), mas inferior ao descrito para a maioria dos mamíferos domésticos estudados (10 %; França e Russell, 1998).

Tabela 1. Biometria, morfometria e estereologia testicular de *Oxymycterus nasutus*

<b>Parâmetros (n=10)</b>	<b>Média ± DP</b>
Peso corporal (g)	58,30 ± 7,27
Peso testicular (g)	0,52 ± 0,22
Peso do parênquima (g)	0,50 ± 0,22
Índice gonadossomático (%)	0,89 ± 0,43
Albugínea testicular (%)	3,84 ± 2,23
<b>Proporção Volumétrica (%)</b>	
Compartimento tubular	95,19 ± 1,60
Túnica própria	2,42 ± 0,90
Epitélio seminífero	65,09 ± 3,73
Lume	27,68 ± 3,62
Diâmetro tubular (µm)	249,89 ± 21,10
Altura do epitélio seminífero (µm)	62,47 ± 8,17
Volume tubular (mL)	0,48 ± 0,20
Volume do epitélio seminífero (mL)	0,33 ± 0,13
Índice epiteliossomático (%)	0,56 ± 0,27
Índice tubulossomático (%)	0,82 ± 0,43
Comprimento total de túbulo seminífero (m)	9,65 ± 3,64
Comprimento túbulo seminífero por grama de testículo (m)	18,62 ± 3,65

O IGS registrado para *O. nasutus* (0,89 %) foi superior ao descrito para *H. megacephalus* (0,40%; Melo et al., 2013), *O. nigripes* (0,68 %; Balarini, 2013), *A. cursor* (0,74 %; Balarini, 2013) e *N. lasiurus* (0,80%; Cordeiro Júnior, 2009), porém menor que o registrado para outros roedores, como *T. moojeni* (0,93 %; Cordeiro Júnior et al., 2010) e *A. montensis* (1,10 %; Cordeiro Júnior, 2009). Segundo Kenagy e Trombulak (1986), espécies de menor tamanho corporal apresentam maior alocação e gasto de energia na massa testicular. Além disso, segundo Setchell (1978), variações intra e interespecíficas

no tamanho relativo dos testículos são em grande parte reflexo da variação nos requisitos para a produção espermática.

O parênquima testicular, o qual representa a parte funcional do testículo, é composto por dois compartimentos: o tubular e o intertubular (Fawcett et al., 1973; Russell et al., 1990). O compartimento tubular usualmente ocupa mais do que dois terços do parênquima (Russell e França, 1995), o que pode ser evidenciado em *O. nasutus*: 95,19 %. Este valor é muito próximo à maior densidade volumétrica descrita para um roedor silvestre: *T. moojeni* com 97,60 % de túbulos seminíferos (Cordeiro Júnior et al., 2010). Além disso, a densidade volumétrica de *O. nasutus* foi superior à descrita para outros roedores cricetídeos como *A. cursor* (90,70 %; Balarini, 2013), *O. nigripes* (93,78 %; Balarini, 2013), *H. megacephalus* (94,46 %; Melo et al., 2013) e *Oligoryzomys flavescens* (95 %; Boiani et al., 2007). O compartimento tubular é de extrema importância pois está diretamente relacionado ao sucesso reprodutivo das espécies, devido à sua produção espermática (França e Russell, 1998). O *O. nasutus* alocou 0,82 % do seu peso corporal em túbulos seminíferos, sendo este um dos mais altos ITS já relatados dentre os roedores silvestres, comparando-se aos pequenos roedores *H. megacephalus* (0,36 %; Melo et al., 2013), *O. nigripes* (0,58 %; Balarini, 2013), *A. cursor* (0,66 %; Balarini, 2013) ou aos grandes roedores *Hydrochoerus hydrochaeris* (0,06 %; Carretta Júnior, 2012), *D. leporina* (0,23 %; Carretta Júnior, 2012) e *C. paca* (0,24 %; Carretta Júnior, 2012). Considerando-se os valores de IGS e ITS mencionados, sugere-se que *O. nasutus* é uma espécie de comportamento promíscuo, do tipo poliândrico, o qual favorece machos com maior investimento na produção de espermatozoides em relação àquelas espécies monogâmicas ou poligâmicas (Kenagy e Trombulak, 1986).

Há indicações de uma relação positiva entre o diâmetro do túbulo seminífero e a atividade espermatogênica testicular (Sinha-Hikim et al., 1988). O diâmetro do túbulo seminífero permanece relativamente constante nos animais sexualmente maduros não sazonais, mas grandes variações podem ser observadas em diversas espécies, especialmente sazonais (Paula et al., 2002). Em *O. nasutus*, o diâmetro tubular médio (249,89  $\mu\text{m}$ ) se encontra dentro dos valores observados para maioria dos amniotas: 180 a 300  $\mu\text{m}$  (Roosen-Runge, 1977). Entretanto, este valor foi superior ao de roedores cricetídeos como *A. cursor* (203,83  $\mu\text{m}$ ; Balarini, 2013), *H. megacephalus* (206,50  $\mu\text{m}$ ; Melo et al., 2013) e *A. montensis* (233  $\mu\text{m}$ ; Cordeiro Júnior, 2009), e maior que os descritos para grandes roedores como *Agouti paca* e *Dasyprocta leporina*, com 185 e 193  $\mu\text{m}$  (Costa et al., 2010a), respectivamente.

Um dos parâmetros utilizados para avaliação da produção espermática é a altura do epitélio seminífero, por ser uma mensuração que acompanha diretamente as variações do ciclo do epitélio seminífero (Wing e Christensen, 1982). Em *O. nasutus*, o valor médio da altura do epitélio seminífero (62,47  $\mu\text{m}$ ) ficou dentro da faixa observada para maioria dos mamíferos domésticos (60 - 100  $\mu\text{m}$ ), apresentando-se similar ao descrito para o roedor *O. nigripes* (62,20  $\mu\text{m}$ ; Balarini, 2013) e para outras espécies de animais silvestres (54 - 66  $\mu\text{m}$ ; Costa et al., 2004; Caldeira et al., 2010; Morais et al., 2013). O índice epiteliossomático (IES) avaliado neste estudo relaciona-se diretamente à atividade espermatogênica e mostrou que 0,56% do peso corporal de *O. nasutus* foi alocado em epitélio seminífero. Este resultado reforça a teoria de que animais de menor porte têm maior investimento em produção espermática (Kenagy e Trombulak, 1986).

O comprimento total de túbulos seminíferos em *O. nasutus* foi de 9,65 metros por testículo. Entretanto, como há diferenças quanto ao tamanho dos testículos entre as espécies, o comprimento de túbulos seminíferos por grama de testículo torna-se relevante para comparações interespecíficas (Sarti, 2006). Assim, cada grama de testículo apresentou 18,62 metros de túbulos seminíferos, sendo superior ao descrito para maioria dos mamíferos domésticos (10 a 15 m/g; França e Russell, 1998) e para *H. hydrochaeris* (12,46 m/g; Carretta Júnior, 2012), porém menor que o registrado para outros roedores silvestres (21 - 39 m/g; Cordeiro Júnior, 2009; Cordeiro Júnior et al., 2010; Carretta Júnior, 2012; Balarini, 2013; Melo et al., 2013). Variações interespecíficas estão relacionadas com três parâmetros estruturais: o tamanho do testículo, o diâmetro tubular e a proporção volumétrica dos túbulos seminíferos no parênquima testicular (França e Russell, 1998; Paula et al., 2002; Costa et al., 2004).

### **3.2. Ciclo do epitélio seminífero**

De acordo com o Método da Morfologia Tubular descrito por Berndtson (1977), oito estádios do CES foram descritos em *O. nasutus* (Figuras 1 e 2). Os estádios se apresentaram de forma segmentar ao longo do comprimento do túbulo seminífero, sendo observado apenas um estágio por secção transversal tubular. Além disso, diferentes arranjos de células germinativas se encontravam em cada estágio, juntamente com dois tipos celulares detectados constantemente nos oito estádios do CES: as células de Sertoli e as espermatogônias. Outros roedores como *A. cursor*, *O. nigripes* (Balarini, 2013), *H. megacephalus* (Melo et al., 2013), *A. paca*, *D. leporina* (Costa et al., 2010a) e *H. hydrochaeris* (Paula et al., 1999) também apresentaram o mesmo padrão descrito para a espécie em estudo.

Os núcleos das células de Sertoli próximos à túnica própria apresentavam formato arredondado ou triangular com três nucléolos, um bem desenvolvido, e, outros dois menores próximos ao maior. As espermatogônias do tipo A foram observadas do estágio 1 ao 8, sempre próximas à túnica própria, apresentando o maior tamanho dentre os tipos de espermatogônias (Figuras 1 e 2). No estágio 6, além da espermatogônia do tipo A, foram observadas espermatogônias intermediárias com núcleos menores e mais escuros (Figura 2B). Nos estádios 7 e 8, espermatogônias do tipo B apresentavam núcleo redondo ou ovoide com maior conteúdo de heterocromatina que as demais (Figuras 2C e 2D).

O estágio 1 caracterizou-se pela presença de espermátides arredondadas dispostas em 3 a 4 camadas em torno do lume tubular e logo abaixo de duas gerações de espermatócitos primários, uma em fase de paquíteno outra em preleptóteno na transição para leptóteno (Figura 1A). No estágio 2, as espermátides arredondadas iniciam o processo de alongamento e condensação de cromatina. Os espermatócitos primários em preleptóteno na transição para leptóteno apresentam agora característica de zigóteno, além daqueles em paquíteno que se encontram numa camada intermediária no epitélio (Figura 1B). O estágio 3 apresentou espermátides alongadas dispostas em feixes bem definidos e orientadas para o compartimento basal do epitélio, além de duas gerações de espermatócitos primários: uma em zigóteno e outra em diplóteno com seu núcleo caracteristicamente grande (Figura 1C). O estágio 4 caracterizou-se pelas divisões meióticas, nas quais os espermatócitos em diplóteno sofrem a primeira divisão meiótica, originando os espermatócitos secundários, e estes, por meio da segunda divisão meiótica, originam as espermátides haploides. Além das figuras de divisão, também se encontram no epitélio espermatócitos primários em zigóteno e os feixes de espermátides alongadas (Figura 1D). No estágio 5 encontram-se duas gerações de espermátides: as alongadas arranjadas em feixes bem definidos inseridos entre as arredondadas recém-formadas, além da população de espermatócitos primários em zigóteno na transição para paquíteno (Figura 2A). Já no estágio 6, os feixes de espermátides alongadas começam a se dissociar entre as espermátides arredondadas e se aproximam mais da borda luminal, se comparado ao estágio anterior. Além destas, encontram-se espermatócitos primários em paquíteno ocupando a parte intermediária do epitélio (Figura 2B). O estágio 7 apresentou espermátides alongadas individuais, alinhadas na borda do lume. Abaixo destas ficavam as espermátides arredondadas e espermatócitos primários em paquíteno (Figura 2C). E por último, no estágio 8 encontram-se espermatozoides no lume do túbulo seminífero, espermátides alongadas prontas para serem espermiadas e, junto a estas, corpos residuais na borda luminal. Numa camada intermediária foram encontrados espermatócitos

primários em paquíteno e na camada basal os espermatócitos primários em preleptóteno na transição para leptóteno (Figura 2D).

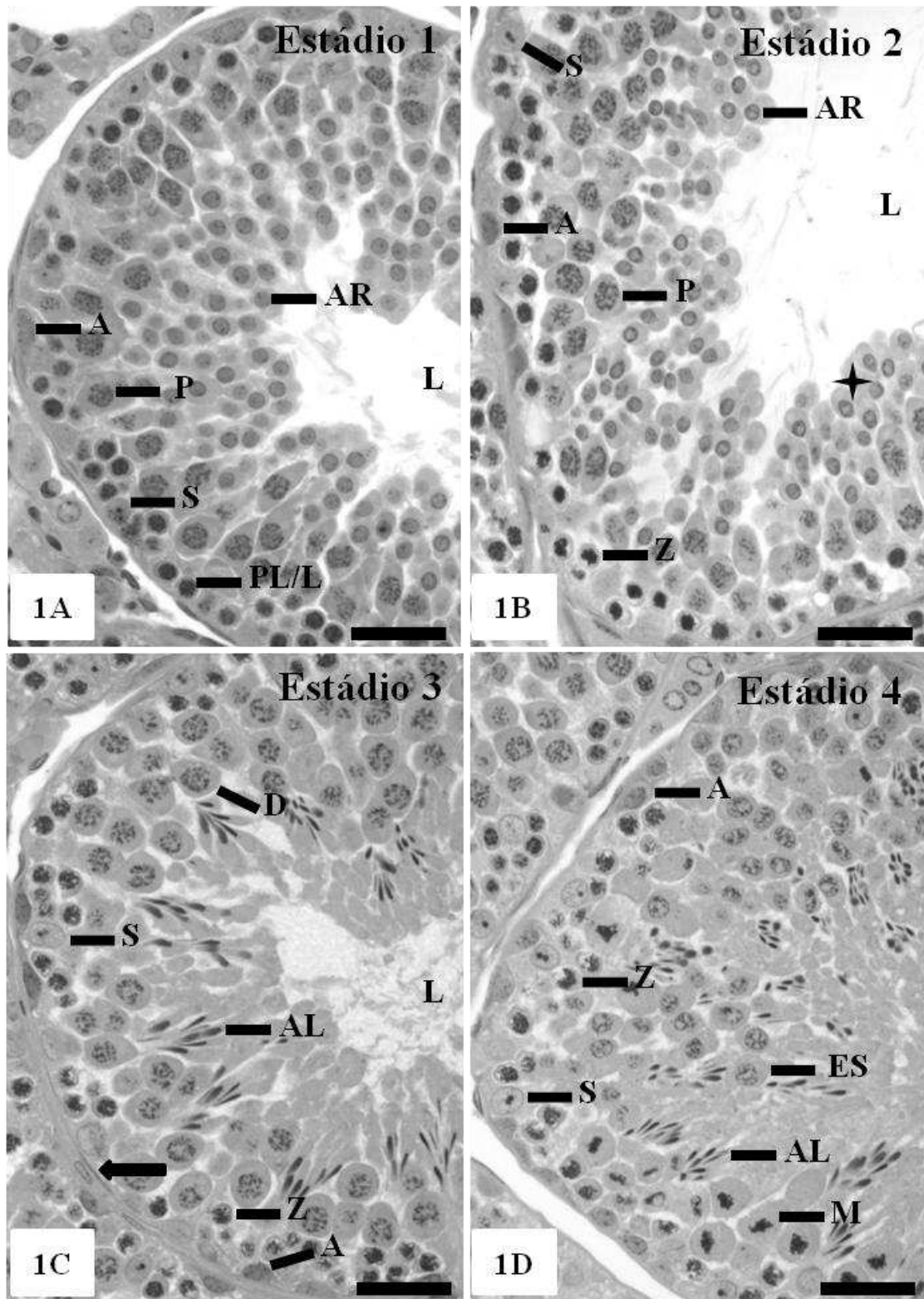


Figura 1. Secções histológicas de túbulos seminíferos representando os estádios de 1 a 4 do CES de *Oxymycterus nasutus*: célula de Sertoli (S); espermatogônia do tipo A (A); espermatócito em transição preleptóteno/leptóteno (PL/L); espermatócito em zigóteno

(Z); espermatócito em paquíteno (P); espermatócito em diplóteno (D); espermatócito secundário (ES); figura meiótica (M); espermátides arredondadas (ES); espermátides alongadas (AL); espermátides em alongamento (↔); lume (L); túnica própria (→). Azul de toluidina/borato de sódio 1%. Barra: 20 μm.

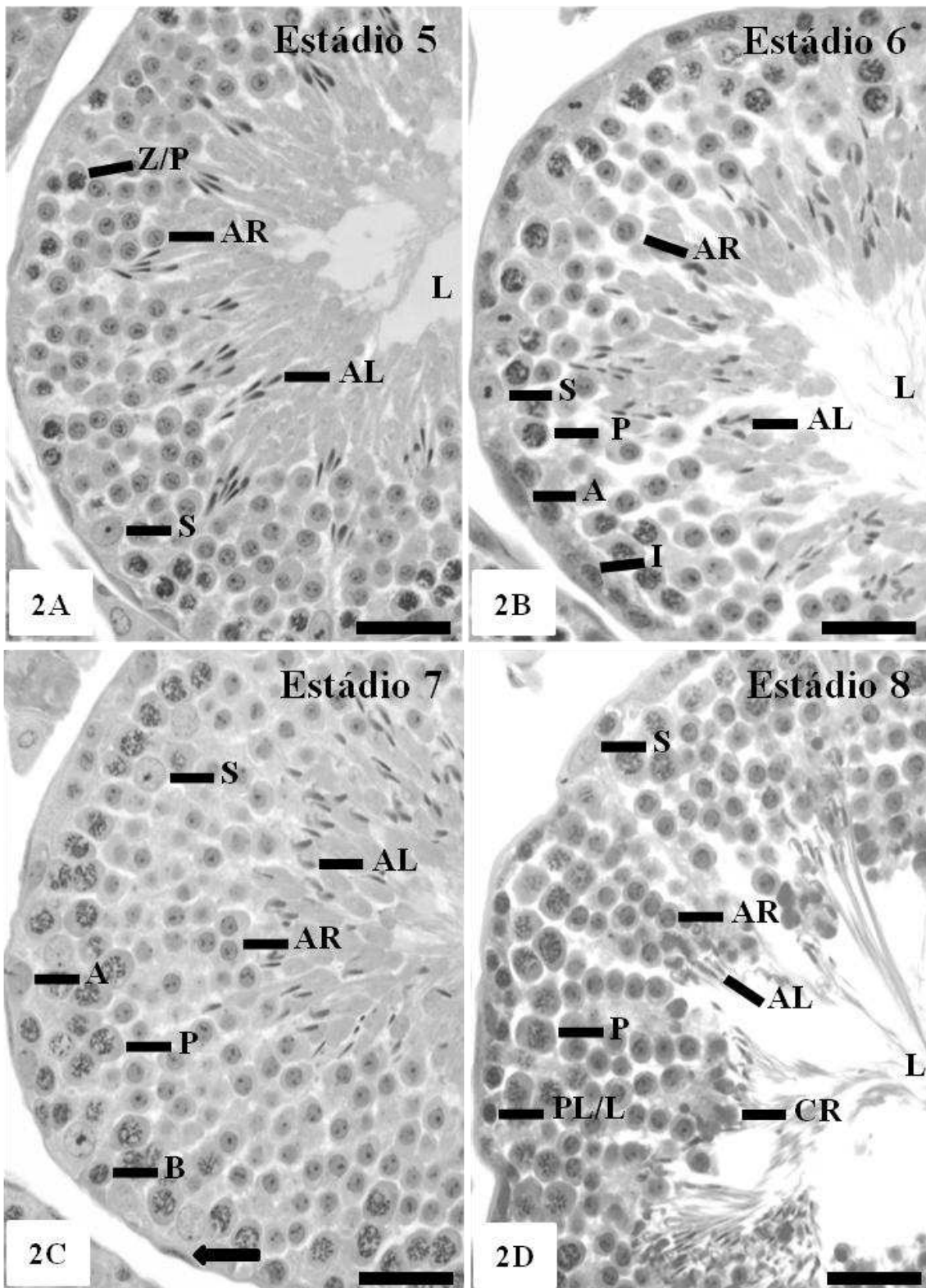


Figura 2. Seções histológicas de túbulos seminíferos dos estádios de 5 a 8 do CES de *Oxymycterus nasutus*: célula de Sertoli (S); espermatogônia do tipo A (A); espermatogônia intermediária (I); espermatogônia do tipo B (B); espermatócito em preleptótene/leptótene (PL/L); espermatócito em transição zigótene/paquítene (Z/P); espermatócito em paquítene (P); espermátides arredondadas (AR); espermátides

alongadas (AL); corpos residuais (CR); lume (L); túnica própria (→). Azul de toluidina/borato de sódio 1%. Barra: 20 µm.

A frequência relativa dos estádios do CES é uma constante espécie específica controlada pelo genótipo das células germinativas (França et al., 1998), essencial para a estimativa da duração de cada estágio (Costa et al., 2011b). O estágio 8 apresentou a maior frequência relativa, representando 22,55 % do ciclo, enquanto a menor frequência - 7,10 % - foi descrita para o estágio 4. O estágio 8 também se mostrou o mais frequente em outros roedores cricetídeos como *A. cursor* (21,13 %; Balarini, 2013) e *H. megacephalus* (23,3 %; Melo et al., 2013), além de ter sido descrito como o mais frequente também no cateto *Tayassu tajacu* (17,3 %; Costa et al., 2010b) e na onça pintada *Panthera onca* (25 %; Costa et al., 2008). A menor frequência do estágio 4 em *O. nasutus* também foi observado em outras espécies silvestres (Bitencourt et al., 2007; Portas et al., 2012; Oishi et al., 2013).

Além de se dividir o CES em oito estádios, pode-se classificar a espermatogênese dividindo o ciclo em três fases, utilizando a meiose como referência (Figura 3). A primeira fase, pré-meiótica, refere-se aos estádios do CES que ocorrem logo após a espermiacão e antes da metáfase da meiose e corresponde aos estádios 1, 2 e 3. A fase meiótica refere-se ao estágio no qual duas divisões meióticas ocorrem (estádio 4). A fase pós-meiótica é constituída pelos estádios de 5 a 8, a partir do final das divisões meióticas até a espermiacão (Courot et al., 1970; França e Russell, 1998). Assim, os estádios pré-meióticos caracterizam-se pela presença de uma geração de espermátides, enquanto os pós-meióticos por duas gerações destas células (Ortavant et al., 1977). Em relação às fases do ciclo espermatogênico em *O. nasutus*, a pré-meiótica representou 41,6 %, a meiótica 7,1 % e a pós-meiótica 51,3 % (Figura 3). O maior percentual da fase pós-meiótica em *O. nasutus* provavelmente se dá pelo fato da grande frequência apresentada pelo estágio 8. A fase pós-meiótica também representou o maior percentual do ciclo em outros roedores cricetídeos como *A. cursor* (Balarini, 2013), *H. megacephalus* (Melo et al., 2013), *O. flavescens* (Boiani et al., 2007) e *O. nigripes* (Balarini, 2013). Contudo, padrão diferente foi descrito para roedores de grande porte como *A. paca*, *D. leporina* (Costa et al., 2010a) e *H. hydrochaeris* (Paula et al., 1999), nos quais a fase pré-meiótica foi superior às demais.

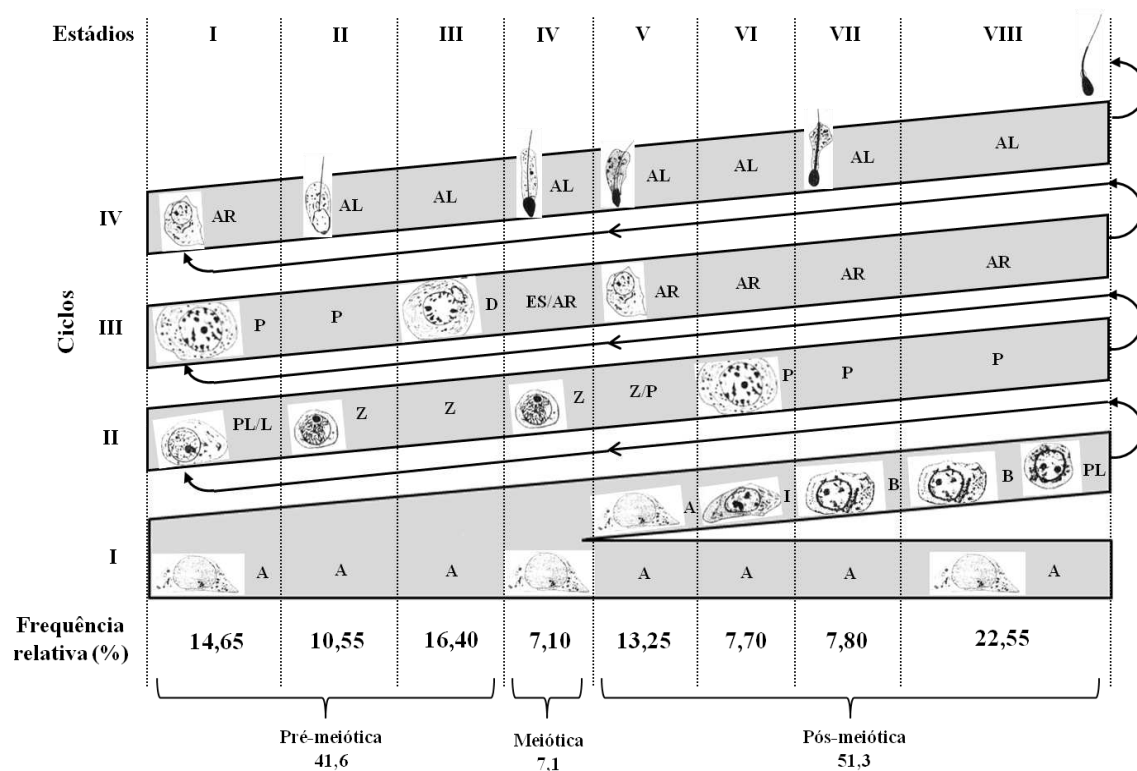


Figura 3. Frequência relativa do CES de *Oxymycterus nasutus*. Cada linha corresponde a uma geração celular, enquanto cada coluna representa um dos 8 estádios do CES. Espermatogônia do tipo A (A); espermatogônia I (I); espermatogônia do tipo B (B); espermátocito em preleptóteno/leptóteno (PL/L); espermátocito em zigóteno (Z); espermátocito em zigóteno/paquítenu (Z/P); espermátocito em paquíteno (P); espermátocito em diplóteno (D); espermátocito secundário (ES); espermátides arredondadas (AR); espermátides alongadas (AL).

### 3.3. Ultraestrutura das espermátides

Espermátides em diferentes fases do desenvolvimento acrossomal estão evidenciadas na Figura 4, onde se destacam espermátides arredondadas recém-formadas no estágio 5 do CES, sem vesícula acrossomal (Figura 4A). O início da formação do acrossoma pode ser acompanhado em espermátides no estágio 1 do CES (Figuras 4B e 4C). Nos estádios 2 e 3, tem-se início o alongamento das espermátides (Figura 4D) e na figura 4E encontram-se espermátides com núcleos bastante elétron-densos, em diferentes graus de alongamento, próximos à espermiacão, nos estádios 6 e 7 (Figura 4E).

Os espermatozoides de todos os mamíferos contêm na parte anterior da cabeça uma única vesícula secretora, denominada acrossoma (Florman et al., 2008). O acrossoma é uma organela derivada do aparelho de Golgi e sua biogênese inicia-se quando vesículas pro-acrossomais são formadas na região perinuclear próxima do

aparelho de Golgi de espermatócitos primários em paquíteno. Como resultado das divisões meióticas celulares, estas vesículas são distribuídas para as quatro espermátides filhas. No início da espermiogênese, essas vesículas se fundem em um único grânulo que se liga ao núcleo da espermátide arredondada. Este grânulo continua a aumentar de tamanho devido à adição de material oriundo do complexo de Golgi (Buffone et al., 2008).

O transporte de vesículas pro-acrossomais requer proteínas motoras, tanto de actina (miosina) quanto de microtúbulos (cinesina e dineína) (Kierszenbaum e Tres, 2004). Como o processo de alongamento das espermátides continua durante a espermiogênese, o aparelho de Golgi cessa o fornecimento de glicoconjugados ao acrosssoma. Finalmente, o complexo núcleo/acrosssoma passa por alterações morfológicas para assumir a forma característica do espermatozoide da espécie (Buffone et al., 2008).

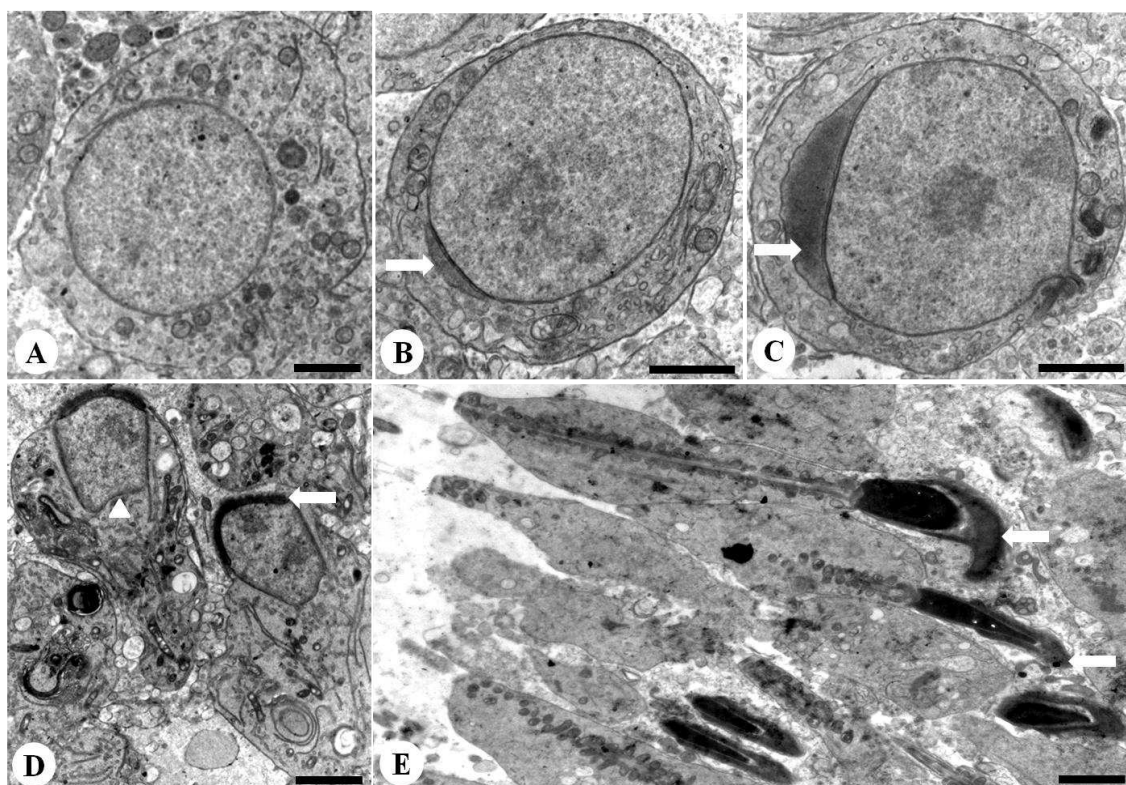


Figura 4. Ultraestrutura de espermátides de *Oxymycterus nasutus* em diferentes fases de desenvolvimento do acrosssoma. (A) Espermátide arredondada no estágio 5 sem acrosssoma visível; (B-C) espermátides arredondadas com acrosssoma em estágio inicial de formação no estágio 1 do CES; (D) espermátides em fase de alongamento - estádios 2 e 3; (E) espermátides alongadas em diferentes fases do acrosssoma – estádios 6 e 7; capuz acrossômico (→); local de formação do flagelo (▲). Barras: (A; D; E) 5  $\mu\text{m}$ ; (B; C) 2  $\mu\text{m}$ .

### 3.4. Contagem das células germinativas e índices de rendimento

Cada secção transversal de túbulo seminífero no estágio 1 continha 3,47 espermatogônias do tipo A, 24,39 espermatócitos primários em preleptóteno na transição para leptóteno, 24,13 espermatócitos primários em paquíteno, 68,38 espermátides arredondadas e 7,33 células de Sertoli (Tabela 2).

Tabela 2. Número corrigido da população de células germinativas no estágio 1 do CES e rendimento geral da espermatogênese de *Oxymycterus nasutus*

Parâmetros (n=10)	Média ± DP
Espermatogônia do tipo A	3,47 ± 0,73
Espermatócitos em preleptóteno	24,39 ± 2,18
Espermatócitos primário em paquíteno	24,13 ± 3,33
Espermátides arredondadas	68,38 ± 12,34
Células de Sertoli	7,33 ± 0,92
Coefficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais	7,03 ± 1,68
Rendimento meiótico	2,83 ± 0,26
Rendimento geral da espermatogênese	19,71 ± 6,72

O número de células germinativas dentro do epitélio seminífero permite-nos estimar a eficiência das diferentes fases ou estádios que constituem o processo espermatogênico (Russell et al., 1990). O coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais quantifica as perdas celulares que ocorrem durante a fase proliferativa ou espermatogonial (França e Russell, 1998). Em *O. nasutus*, este coeficiente indicou que 7,03 espermatócitos primários em preleptóteno na transição para leptóteno foram produzidos por cada espermatogônia do tipo A, apresentando uma perda de aproximadamente 90 % nesta fase (Tabela 2). Apesar de alto, este percentual encontra-se dentro da amplitude descrita para outros roedores *H. hydrochaeris* (84,29 %; Carretta Júnior, 2012), *H. megacephalus* (84,74 %; Melo et al., 2013), *C. paca* (86,73 %; Carretta Júnior, 2012) e *D. leporina* (87,52 %; Carretta Júnior, 2012), bem como em outros mamíferos domésticos e silvestres (França e Russell, 1998; Costa et al., 2007; Costa et al., 2011a; Costa et al., 2011b; Morais, 2012; Morais et al., 2013).

O rendimento meiótico, que quantifica a eficiência das divisões meióticas, foi de 2,83 espermátides arredondadas produzidas por cada espermatócito primário em *O. nasutus* (Tabela 2), corroborando o resultado relatado para outros roedores - de 2,11 a 3,10 espermátides (Cordeiro Júnior, 2009; Cordeiro Júnior et al., 2010; Carretta Júnior, 2012; Balarini, 2013; Melo et al., 2013). Na maioria dos mamíferos estudados até o momento, a perda celular nesta fase varia de 5 a 30 % (França e Russell, 1998), ou seja, para cada quatro espermátides arredondadas esperadas, apenas três devem ser formadas. Isto se dá devido às apoptoses que ocorrem no epitélio seminífero, necessárias para manutenção de um número apropriado de células germinativas, além de eliminar aquelas pouco viáveis ou geneticamente anormais (Chatuverdi e Johnson, 1993; Eaker et al., 2001). Assim, a perda celular durante esta fase em *O. nasutus* foi 29,25 %.

A eficiência do processo espermatogênico como um todo é mensurada por meio do rendimento geral da espermatogênese, uma vez que esta se baseia no número de espermátides arredondadas produzidas a partir de uma espermatogônia do tipo A (Tabela 2). Assim, o rendimento do processo espermatogênico em *O. nasutus* (19,71) encontra-se próximo ao descrito para roedores como *C. paca* (19,80; Carretta Júnior, 2012), *H. megacephalus* (20,12; Melo et al., 2013), *H. hydrochaeris* (21,12; Carretta Júnior, 2012) e *D. leporina* (22,68; Carretta Júnior, 2012), contudo, abaixo do rendimento descrito para outros mamíferos silvestres (Azevedo et al., 2010; Costa et al., 2011a; Costa et al., 2011b; Morais et al., 2013). Como as perdas durante a espermiogênese são consideradas pequenas e não significativas e por basear-se na população de espermátides arredondadas, este índice torna-se confiável para a avaliação da produção espermática nas espécies (Johnson et al., 2000).

O número de células de Sertoli é um fator crucial tanto para a capacidade espermatogênica, quanto para se determinar o tamanho dos testículos nas espécies de mamíferos em geral (Orth et al., 1988; Hess et al., 1993; Griswold, 1998). Cada célula de Sertoli suporta um número limitado de células germinativas de uma forma espécie-específica (Russell e Peterson, 1984). Em *O. nasutus* a capacidade suporte total da célula de Sertoli foi de 16,42 células germinativas (Tabela 3), valor este superior ao registrado para duas espécies de morcego, *Sturnira lilium* (7,0; Morais, 2012) e *M. molossus* (8,5; Morais et al., 2013), para capivara *H. hydrochaeris* (11,25; Carretta Júnior, 2012) e para o veado catingueiro *Mazama gouazoubira* (13,2; Costa et al., 2011b), porém inferior ao registrado para outros roedores e mamíferos silvestres (Costa et al., 2007; Azevedo et al., 2010; Costa et al., 2011a; Carretta Júnior, 2012; Balarini, 2013; Melo et al., 2013). Outro índice que mede a capacidade suporte das células de Sertoli está relacionado à população

de espermátides. Foi observado que em *O. nasutus*, cada célula de Sertoli suporta 9,34 espermátides (Tabela 3). Este valor é muito superior às 5,63 espermátides suportadas pela célula de Sertoli relatado para *H. hydrochaeris* (Carretta Júnior, 2012). O número médio de células de Sertoli por grama de testículo registrado em *O. nasutus* -  $91,02 \times 10^6$  (Tabela 3) esteve muito acima do encontrado em outros roedores cricetídeos como *O. nigripes* ( $35 \times 10^6$ ; Balarini, 2013), *A. cursor* ( $48 \times 10^6$ ; Balarini, 2013), *A. montensis* ( $54,7 \times 10^6$ ; Cordeiro Júnior, 2009) e também para grandes roedores como *A. paca* ( $43 \times 10^6$ ; Costa et al., 2010a) e *D. leporina* ( $57 \times 10^6$ ; Costa et al., 2010a). Comparando a capacidade suporte das células de Sertoli e o número de células de Sertoli por grama de testículo, pode-se inferir que grande quantidade de células de Sertoli é necessária para sustentar o processo espermatogênico de *O. nasutus*.

Tabela 3. Índices de célula de Sertoli e reserva espermática testicular em *Oxymycterus nasutus*

<b>Parâmetros (n=10)</b>	<b>Média ± DP</b>
Índice de célula de Sertoli (espermátides arredondadas/Sertoli)	9,34 ± 1,48
Capacidade suporte total das células de Sertoli	16,42 ± 2,90
Célula de Sertoli por grama de testículo ( $\times 10^6$ )	91,02 ± 2,79
Célula de Sertoli por testículo ( $\times 10^6$ )	23,57 ± 9,32
Reserva espermática testicular por grama de testículo ( $\times 10^6$ )	849,64 ± 13,96
Reserva espermática testicular por testículo ( $\times 10^6$ )	220,02 ± 12,58

Berndtson (1977) relata que por meio da mensuração da reserva espermática total (RET) torna-se possível quantificar o número potencial de espermatozoides produzidos por testículo e por grama de testículo em determinada espécie, a cada ciclo do epitélio seminífero. A RET observada em *O. nasutus* foi de  $220,02 \times 10^6$  e  $849,64 \times 10^6$  por testículo e por grama de testículo, respectivamente (Tabela 3), sendo este último um dado mais preciso na comparação interespecífica. Assim, a RET por grama de testículo em *O. nasutus* foi muito superior ao descrito para o morcego *M. molossus* ( $5,66 \times 10^6$ ; Morais et al., 2013), acima do descrito para os roedores cricetídeos como *O. nigripes* ( $584 \times 10^6$ ; Balarini, 2013) e *A. cursor* ( $608 \times 10^6$ ; Balarini, 2013), e também para a maioria dos

mamíferos domésticos ( $120 - 260 \times 10^6$ ; França e Russell, 1998), demonstrando que *O. nasutus* tem alta produção de espermatozoides a cada CES.

#### **4. Conclusões**

Considerando a elevada proporção de túbulos seminíferos no parênquima testicular; a grande quantidade de células de Sertoli por grama de testículo; e ainda, a alta produção de espermatozoides a cada CES; pode-se concluir que, assim como outros roedores cricetídeos, *Oxymycterus nasutus* apresenta alto investimento energético na reprodução.

#### **Agradecimentos**

Os autores agradecem a ONG Ambiente Brasil, pela logística de amostragem, a CAPES pela bolsa de doutorado, a FAPEMIG pelo apoio financeiro e ao Núcleo de Microscopia e Microanálise (UFV), pelo auxílio com a técnica de microscopia eletrônica de transmissão.

#### **Referências Bibliográficas**

- Abercrombie, M., 1946. Estimation of nuclear populations from microtome sections. *Anat. Rec.* 94, 239-247.
- Amann, R.P., 1962. Reproductive capacity of dairy bulls. IV. Spermatogenesis and testicular germ cell degeneration. *Am. J. Anat.* 110, 69-78.
- 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, 83-88.
- Balarini, M.K., 2013. Avaliação morfofuncional do testículo e do processo espermatogênico dos roedores silvestres *Akodon cursor* (Winge, 1887) e *Oligoryzomys nigripes* (Olfers, 1818) (Rodentia: Cricetidae). PhD Thesis. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 81 p.
- Berndtson, W.E., 1977. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *J. Anim. Sci.* 44, 818-883.
- Bittencourt, V.L., Paula, T.A.R., Matta, S.L.P., Fonseca, C.S., Benjamin, L.A., Costa, D.S., 2007. The seminiferous epithelium cycle and daily spermatid production in the adult maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1811). *Micron.* 38, 584-589.

- Boiani, L., Casanova, G., Oliveira, A., Berois, N., 2007. Seminiferous epithelium cycle of a hantavirus reservoir, the long-tailed mouse *Oligoryzomys flavescens* (Rodentia – Cricetidae). *Tissue Cell* 39, 267-275.
- Bonvicino, C.R., Oliveira, J.A., D'Andrea, P.S., 2008. Guia dos roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos. Centro Pan-Americano de Febre Aftosa - OPAS/OMS, Rio de Janeiro.
- Buffone, M.G., Foster, J.A., Gerton, G.L., 2008. The role of the acrosomal matrix in fertilization. *Int. J. Dev. Biol.* 52, 511-522.
- Cáceres, N.C., Monteiro-Filho, E.L.A., 2000. The common opossum, *Didelphis aurita*, as a seed disperser of several plants in southern Brazil. *Ciência Cultura*, 52, 41-44.
- 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* 57, 569-575.
- Carretta Júnior M (2012) Estudo comparativo do processo espermatogênico e duração do ciclo do epitélio seminífero através da técnica de imunohistoquímica com bromodeoxiuridina de três diferentes espécies de roedores da subordem Hystricomorpha: cutia (*Dasyprocta leporina*), paca (*Cuniculus paca*) e capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Tese (Doutorado). Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 131 p.
- Chaturvedi, P.K., Johnson, L., 1993. Architectural arrangement of stages of the spermatogenic cycle within human seminiferous tubules is related to efficiency of spermatogenesis. *Cell Tissue. Res.* 273, 65-70.
- Cordeiro Júnior, D.A., Costa, G.M.J., Talamoni, A.S., França, L.R., 2010. Spermatogenic efficiency in the spiny rat, *Trinomys moojeni* (Rodentia: Echimyidae). *Anim. Reprod. Sci.* 119, 97-105.
- Cordeiro Júnior, D.A., 2009. Estrutura e função testiculares em roedores silvestres das famílias Echimyidae (*Trinomys moojeni*) e Cricetidae (*Akodon cursor*, *Akodon montensis*, *Necomys lasiurus* e *Oligoryzomys nigripes*), da Reserva Particular do Patrimônio Natural do Caraça - MG. Doutorado (Tese). Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. 109 p.
- Costa, D.S., Henry, M., Paula, T.A.R., 2004. Espermatogênese de catetos (*Tayassu tajacu*). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 56, 46-51.
- 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, 1136-1146.

- Costa, G.M., Leal, M.C., Ferreira, A.C., Guimarães, D.A., França, L.R., 2010a. Duration of spermatogenesis and spermatogenic efficiency in two large neotropical rodent species: the agouti (*Dasyprocta leporina*) and paca (*Agouti paca*). *J. Androl.* 31, 489-499.
- Costa, G.M., Leal, M.C., Silva, J.V., Ferreira, A.C., Guimarães, D.A., França, L.R., 2010b. Spermatogenic cycle length and sperm production in a Feral pig species (Collared Peccary, *Tayassu tajacu*). *J. Androl.* 31, 221-230.
- Costa, D.S., Menezes, C.M.C., Paula, T.A.R., 2007. Spermatogenesis in white-lipped peccaries (*Tayassu peccary*). *Anim. Reprod. Sci.* 98, 322-334.
- Costa, D.S., Macedo, D.B., Santos, M.D., Paula, T.A.R., Faria, F.J.C., 2011a. Intrinsic rate of spermatogenesis in free-ranging feral pigs (*Sus scrofa* sp). *Anim. Reprod. Sci.* 125, 165-169.
- Costa, K.L.C., Matta, S.L.P., Gomes, M.L.M., Paula, T.A.R., Freitas, K.M., Carvalho, F.A.R., Silveira, J.A., Dolder, H, Mendis-Handagama, S.L.M.C., 2011b. Histomorphometric evaluation of the neotropical brown brocket deer *Mazama gouazoubira* testis, with an emphasis on cell population indexes of spermatogenic yield. *Anim. Reprod. Sci.* 127, 202-212.
- Courot, M., Hochereau-de-Reviere, M.T., Ortavant, R., 1970. Spermatogenesis, in: Johnson, A.D., Gomer, W.R., Vandemark, N.L. (Eds.), *The Testis*. New York, Academic Press. pp. 399-432.
- D'Elia, G., 2003. Phylogenetics of Sigmodontinae (Rodentia, Muroidea, Cricetidae), with special reference to the akodont group, and with additional comments on historical biogeography. *Cladistics*, 19, 307-323.
- Duarte, A.P.G., 2003. Reproductive aspects of *Akodon montensis* (Rodentia, Muridae) and *Artibeus lituratus* (Chiroptera, Phyllostomidae) in areas of forest in southeastern Brazil. Dissertation, PUC Minas, 52 p.
- Eaker, S., Pyle, A., Cobb, J., Handel, M.A., 2001. Evidence for meiotic spindle checkpoint from analysis of spermatocytes from Robertsonian-chromosome heterozygous mice. *J. Cell. Sci.* 114, 2953-2965.
- 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. *Biol. Reprod.* 9, 500-532.
- Florman, H.M., Jungnickel, M.K., Sutton, K.A., 2008. Regulating the acrosome reaction. *Int. J. Dev. Biol.* 52, 503-510.

- França, L.R., Ogawa, T., Avarbock, M.R., Brinster, R.L., Russell, L.D., 1998. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biol. Reprod.* 59, 1371-1377.
- França, L.R., Russell, L.D., 1998. The testis of domestic animals, in: Martínez, F., Regadera, J. (Eds.), A multidisciplinary overview. Churchill Livingstone, Madrid, Spain.
- França, L.R., Godinho, C.L., 2003. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). *Biol. Reprod.* 68, 1554-1561.
- Griswold, M.D., 1998. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Cell Develop. Biol.* 9, 411-416.
- Hess, R.A., Cooke, P.S., Bunick, D., Kirby, J.D., 1993. Adult testicular enlargement induced by neonatal hypothyroidism is accompanied by increase Sertoli cell and germ cell numbers. *Endocrinology.* 132, 2607-2613.
- Honeycutt, R.L., 2004. Order Rodentia. In: Kleiman, D.G., Geist, V., Mcdade, M.C. (Eds.) *Grzimek's Animal Life Encyclopedia*, second edition, Mammals V.
- 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.
- 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.
- Karnovsky, M.J., 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27, 137.
- Kenagy, G.J., Trombulak, S.C., 1986. Size and function of mammalian testis in relation to body size. *J. Mammal.* 67, 1-22.
- Kierszenbaum, A.L., Tres, L.L., 2004. The acrosome–acroplaxome–manchette complex and the shaping of the spermatid head. *Arch. Histol. Cytol.* 67, 271-284.
- Leblond, C.P., Clermont, Y., 1952. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann. NY. Acad. Sci.* 55, 548-584.
- Melo, F.C.S.A., Sousa, T.P., Costa, K.L.C., Matta, S.L.P., Melo, F.R., Santa-Rita, R.M., 2013. Descriptive morphometry and stereology of the tubular compartment in the wild rodent *Hylaeamys megacephalus* (Rodentia: Cricetidae) from Central Brazil. *Anim. Reprod. Sci.* 138, 110-117.
- Morais, D.B., Cupertino, M.C., Goulart, L.S., Freitas, K.M., Freitas, M.B.D., Paula, T.A.R., Matta, S.L.P., 2013. Histomorphometric evaluation of the *Molossus molossus*

- (Chiroptera, Molossidae) testis: The tubular compartment indices of sperm production. *Anim. Reprod. Sci.* 140, 268-278.
- Morais, D.B., 2012. Espermatogênese no morcego *Sturnira lilium* (Chiroptera: Phyllostomidae): aspectos morfológicos, morfométricos e ultraestruturais. Tese (Doutorado), Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 83 p.
- Musser, G.M., Carleton, M.D., 2005. Superfamily Muroidea, in: Wilson, D.E., Reeder, D.M. (Eds.) *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*, Johns Hopkins University Press, third edition, Baltimore.
- Oishi, M., Takahashi, M., Amasaki, H., Janssen, T., Johnston, S.D., 2013. The seminiferous epithelial cycle and microanatomy of the koala (*Phascolarctos cinereus*) and southern hairy-nosed wombat (*Lasiorninus latifrons*) testis. *J. Anat.* 222, 380-389.
- Ortavant, R., Courot, M., Hochereau-de-Reviere, M.T., 1977. Spermatogenesis in domestic animals, in: Cole, H.H., Cupps, P.T. (Eds.), *Reproduction in domestic animals*. Academic Press, New York.
- Orth, J.M., Gunsalus, G.L., Lamperti, A.A., 1988. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology*. 122, 787-794.
- Paise, G., Vieira, E.M., 2006. Daily activity of a neotropical rodent (*Oxymycterus nasutus*): seasonal changes and influence of environmental factors. *J. Mammal.* 87, 733-739.
- Paula, T.A.R., França, L.R., Garcia, H.C., 1999. Seminiferous epithelium cycle and its duration in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). *Tissue Cell* 31, 327-334.
- Paula, T.A.R., Matta, S.L.P., Costa, D.S., 2002. Avaliação histológica e quantitativa do testículo de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). *Biosci. J.* 18, 121-136.
- Portas, T., Evans, G., Graaf, S., 2012. The seminiferous cycle of the rhinoceros. *Anim. Reprod. Sci.* 136, 128-132.
- Roosen-Runge, E.C., 1977. *The process of spermatogenesis in animals*. Academic Press, Cambridge, London.
- Russell, L.D., Ettlín, R.A., Sinha-Hikim, A.P., Clegg, E.D., 1990. Mammalian spermatogenesis, in: Russell, L.D., Ettlín, R.A., Sinha-Hikim, A.P., Clegg, E.D. (Eds.), *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. Bolesta, Cache River Press.
- Russell, L.D., Peterson, R.N., 1984. Determination of the elongate spermatid-Sertoli cell ratio in various mammals. *J. Reprod. Fertil.* 70, 635-641.
- Russell, L.D., França, L.R., 1995. Building a testis. *Tissue Cell*. 27, 129-147.
- Setchell, B.P., 1978. *The mammalian testis*. Paul Elek, London.

- Sarti, P., 2006. Avaliação morfométrica do testículo e da espermatogênese de jaguatiricas (*Leopardus pardalis*, Linnaeus, 1758) adultas. Dissertação (Mestrado). Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 56 p.
- Sinha-Hikim, A.P., Amador, A.G., Klemecke H.G., Bartke, A., Russell, L.D., 1989. Correlative morphology and endocrinology of Sertoli cells in hamster testes in active and inactive states of spermatogenesis. *Endocrinology*. 125, 1829-1843.
- Sinha-Hikim, A.P., Bartke, A., Russell, L.D., 1988. Morphometric studies on hamster testes in gonadally active and inactive state: light microscope findings. *Biol. Reprod.* 39, 1225-1237.
- Vieira, M.V., Faria, D., Fernandez, F., Ferrari, S., Freitas, S., Gaspar, D.A., Moura, R., Olifiers, N., de Oliveira, P.P., Pardini, R., Pires, A., Ravetta, A., de Mello, M.A. R., Ruiz, C., Setz, E., 2003. Mamíferos, in: Rambaldi, D.M., Oliveira, D.A.S. (Eds.), *Fragmentação de Ecossistemas: Causas, Efeitos sobre a Biodiversidade e Recomendações de Políticas Públicas*. Brasília.
- Wang, E., 2002. Diets of Ocelots (*Leopardus pardalis*), Margays (*Leopardus wiedii*), and Oncillas (*Leopardus tigrinus*) in the Atlantic Rainforest in Southeast Brazil. *Stud. Neotrop. Fauna E.* 37, 207-212.
- Wing, T.Y., Christensen, A.K., 1982. Morphometric studies on rat seminiferous tubules. *Am. J. Anat.* 165, 13-25.

### Artigo 3

#### **Histomorfometria do compartimento intertubular dos testículos dos roedores silvestres *Oxymycterus rufus* e *Oxymycterus nasutus* (Rodentia: Cricetidae)**

##### **Resumo**

Os roedores constituem a maior ordem da classe Mammalia. Apesar disto, são ainda escassas as informações sobre a morfologia e morfometria dos componentes do compartimento intertubular de roedores silvestres. Deste modo, objetivou-se caracterizar o compartimento intertubular dos testículos dos roedores silvestres *Oxymycterus rufus* e *Oxymycterus nasutus* através da quantificação dos seus elementos constituintes. Foram utilizados cinco espécimes de *O. rufus* e 10 de *O. nasutus* machos e sexualmente maduros. Secções histológicas testiculares foram avaliadas em microscopia de luz. O compartimento intertubular ocupou em média 9,09 % e 4,81 % dos testículos de *O. rufus* e *O. nasutus*, respectivamente, e o componente mais abundante foram as células de Leydig. As células de Leydig representaram 4,11 % e 2,12 % do parênquima testicular de *O. rufus* e *O. nasutus*, respectivamente. Os componentes do compartimento intertubular foram caracterizados como correspondentes ao padrão tipo I de Fawcett. As células de Leydig apresentaram volume de 352,81 e 572,82  $\mu\text{m}^3$  em *O. rufus* e *O. nasutus*, respectivamente. Deste valor, 213,41 e 399,63  $\mu\text{m}^3$  correspondem ao volume ocupado pelo citoplasma e o volume restante equivale ao núcleo, para *O. rufus* e *O. nasutus*, respectivamente. O número total de células de Leydig por grama de testículo foi de  $117,23 \times 10^6$  em *O. rufus* e de  $40,77 \times 10^6$  em *O. nasutus*. O índice Leydigossomático, referente à massa corporal alocada exclusivamente em células de Leydig, foi de 0,018 % e 0,019 % da massa corporal de *O. rufus* e *O. nasutus*, respectivamente. Portanto, ambas as espécies utilizadas neste estudo parecem demandar grande quantidade de energia na produção de gametas ao invés de maior investimento no compartimento intersticial, característica típica observada em animais promíscuos.

**Palavras-chave:** interstício, células de Leydig, índice Leydigossomático, reprodução.

## 1. Introdução

Roedores representam cerca de metade dos mamíferos catalogados, com cerca de 2200 espécies em todo o mundo, constituindo a maior ordem da classe Mammalia. Exceto para as espécies maiores, como pacas e cutias, os períodos de gestação de roedores envolvem semanas e não meses, e suas grandes ninhadas requerem um tempo relativamente pequeno para atingir a maturidade sexual (Sigrist, 2012). O sistema de reprodução em roedores varia dependendo das espécies, podendo ser promíscuos, com alta incidência de paternidade múltipla em muitas espécies (Hutchins et al., 2004).

A avaliação dos parâmetros histológicos das gônadas ou outros órgãos reprodutivos são importantes ferramentas para a análise das condições reprodutivas de um animal em seu habitat. Estes parâmetros podem estar relacionados a fatores ambientais e contribuem para a conservação dos mamíferos (Paula et al., 2002).

O testículo é um órgão com funções exócrina e endócrina e, nos mamíferos, pode ser morfofuncionalmente dividido em dois compartimentos: o compartimento tubular ou espermatogênico e o compartimento intersticial ou androgênico (Russell et al., 1990; França e Russell, 1998), sendo este último constituído por vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, células e fibras do tecido conjuntivo e células de Leydig (Russell et al., 1990). As células de Leydig sintetizam testosterona, hormônio que sustenta a espermatogênese, promove a diferenciação do trato genital masculino, mantém os caracteres sexuais secundários e a função das glândulas acessórias (O'Donnel et al., 2001).

Dentre as diferentes espécies de mamíferos observa-se grande variação no percentual volumétrico e no arranjo entre os componentes do compartimento intertubular (França e Russell, 1998). Estes arranjos são definidos em três padrões distintos, possivelmente relacionados à habilidade dos vasos linfáticos em promover a circulação dos fluidos testiculares e em manter as concentrações adequadas de andrógenos nos testículos e vasos sanguíneos (Fawcett et al., 1973). O padrão I engloba as espécies nas quais as células de Leydig e o tecido conjuntivo ocupam uma área muito pequena no compartimento intertubular, contrastando com extensos sinusoides ou espaços linfáticos interpostos aos túbulos seminíferos. As espécies que apresentam grupos de células de Leydig espalhados em abundante tecido conjuntivo frouxo edemaciado, o qual é drenado por um vaso linfático localizado central ou excêntrica no espaço intertubular, encaixam-se no padrão II. Diferentemente dos padrões anteriores, o padrão III refere-se às espécies nas quais abundantes agrupamentos de células de Leydig ocupam praticamente todo o compartimento intertubular, apresentando pouco tecido conjuntivo e vasos linfáticos.

Escassas são ainda as informações sobre o processo espermatogênico de roedores silvestres e, particularmente, sobre a quantificação dos componentes do compartimento intersticial. Assim, objetivou-se neste estudo caracterizar o compartimento intertubular dos testículos dos roedores silvestres *Oxymycterus rufus* e *Oxymycterus nasutus* através da quantificação dos elementos deste compartimento.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Coleta dos animais**

Neste estudo, foram utilizados cinco espécimes de *Oxymycterus rufus* e 10 de *Oxymycterus nasutus* machos e sexualmente maduros.

Os espécimes de *O. rufus* foram coletados em fragmento de Mata Atlântica de aproximadamente 10 hectares (S 20°81' e W 42°85'), localizado na Zona da Mata Mineira, no município de Viçosa, no Estado de Minas Gerais, sendo as capturas autorizadas previamente pelo ICMBio/SISBIO (n° 22289-1). Os animais foram capturados em armadilhas tipo Sherman e Tomahawk distribuídas na área de estudo. Posteriormente foram levados ao laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa (UFV) e abrigados em caixas de polipropileno, sendo ofertadas água e alimentação ad libitum até a eutanásia, que se deu pela administração de superdosagem anestésica (cloridrato de Xilazina 150mg/kg associado a cloridrato de Quetamina 10 mg/kg). Realizou-se então a pesagem e medição dos animais, seguidas da remoção e pesagem de ambos os testículos. A albugínea de um dos testículos foi dissecada e pesada e teve seu peso subtraído do peso testicular para se obter o peso do parênquima testicular. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV – n° 76/012).

As coletas dos espécimes de *O. nasutus* foram realizadas em borda de banhado (S 30°23'01" e W 51°22'27") localizada no bioma Pampa, em Barra do Ribeiro no Rio Grande do Sul, sendo estas previamente autorizadas pelo ICMBio/SISBIO (número do protocolo 29358-1). As capturas foram realizadas em armadilhas tipo Sherman e em gaiolas com isca suspensa (live-trap) distribuídas na área de estudo. Os espécimes foram levados ao laboratório de Biologia Animal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), onde foram submetidos à eutanásia por superdosagem anestésica, pela associação de cloridrato de Xilazina (150 mg/kg) associado a cloridrato de Quetamina (10 mg/kg). Posteriormente realizou-se a pesagem e medição dos animais e os testículos foram coletados e pesados. Para se obter o peso do parênquima testicular, a albugínea de

um dos testículos foi dissecada, pesada, e teve seu peso subtraído do peso testicular. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Viçosa (CEUA/UFV – número do protocolo 28/013).

## **2.2. Processamento Histológico**

Para as análises histomorfométricas, fragmentos testiculares foram fixados em solução Karnovsky (Karnovsky, 1965) por 24 h, transferidos para etanol 70 % e processados rotineiramente pela inclusão em glicol-metacrilato (Historesin<sup>®</sup>, Leica). Foram realizadas secções transversais semisseriadas de 3 µm de espessura em micrótomo rotativo (Leica, RM2255), respeitando-se intervalo mínimo de 40 µm entre os cortes, que foram corados com azul de toluidina/borato de sódio 1 % e posteriormente analisados. Para a realização da morfometria foram capturadas imagens digitais em diferentes aumentos, em fotomicroscópio (Olympus BX-40), as quais foram analisadas utilizando-se o software Image Pro Plus<sup>®</sup> (Media Cybernetics).

## **2.3. Morfometria Testicular e Estereologia**

As proporções volumétricas entre túbulos seminíferos e interstício foram estimadas a partir da contagem de 2660 pontos projetados, com um grid quadrangular, sobre cada uma das 10 imagens digitais por animal. O volume destes componentes foi determinado a partir do percentual ocupado por eles no testículo e do volume do parênquima testicular.

Para proporção dos componentes do intertúbulo, foram contados 1000 pontos sobre este compartimento, registrando-se os pontos coincidentes sobre núcleo e citoplasma das células de Leydig, vasos sanguíneos, espaço linfático e tecido conjuntivo. A partir da proporção volumétrica, os percentuais de cada componente no intertúbulo foram calculados utilizando-se a fórmula: (nº de pontos contados sobre o elemento x 100) /1000. Para o conhecimento dos percentuais destes elementos nos testículos, utilizou-se a seguinte fórmula: (% intertúbulo x % do elemento no intertúbulo) /100. O volume que cada elemento ocupa no parênquima testicular foi calculado multiplicando-se o percentual deste elemento no testículo pelo peso líquido dos testículos e dividindo-se o resultado por 100.

Para a estimativa das dimensões volumétricas das células de Leydig foi mensurado o diâmetro de 30 núcleos com contorno circular, cromatina perinuclear e nucléolos evidentes. A partir do diâmetro nuclear médio das células de Leydig foi possível calcular os volumes nuclear (VN), citoplasmático (VC) e o volume de cada

célula de Leydig por animal, sendo os resultados expressos em  $\mu\text{m}^3$ . O volume nuclear foi obtido por meio da seguinte fórmula:  $VN = 4/3\pi R^3$  ( $R$  = raio nuclear). O volume citoplasmático foi calculado utilizando-se a fórmula:  $VC = \% \text{ citoplasma} \times VN / \% \text{ núcleo}$ . O volume celular foi obtido pela soma do VN e o VC. O número total de células de Leydig (TCL) foi calculado pela divisão do volume total dessas células no parênquima testicular ( $\mu\text{m}^3$ ) pelo volume de cada célula de Leydig ( $\mu\text{m}^3$ ) e para estimativa do número destas células por grama de testículo, dividiu-se o TCL pelo peso gonadal. O índice Leydigossomático (ILS) foi calculado a fim de se quantificar o investimento em células de Leydig em relação à massa corporal, utilizando-se a fórmula: volume total de célula de Leydig por parênquima testicular / peso corporal x 100.

Os dados descritivos foram analisados utilizando a função estatística do software Excel/ Windows7 e estão representados como média e desvio padrão.

### **3. Resultados**

Este é primeiro estudo que fornece dados sobre o compartimento intertubular testicular dos roedores silvestres *Oxymycterus rufus* e *Oxymycterus nasutus*. Todos os dados foram demonstrados comparativamente entre as duas espécies. Os pesos corporais e testiculares, bem como a volumetria dos componentes do parênquima testicular de *O. rufus* e *O. nasutus* estão dispostos na Tabela 1.

O percentual do parênquima testicular ocupado pelo compartimento intertubular foi maior em *O. rufus* quando comparado a *O. nasutus*, e conseqüentemente, o contrário foi observado em relação ao percentual de túbulos seminíferos. O mesmo padrão foi encontrado para o volume dos dois compartimentos.

Dentre os componentes do interstício, o mais frequente foi a célula de Leydig, ocupando cerca de 45 % deste compartimento em ambas as espécies. Em relação ao parênquima testicular, as células de Leydig representaram 4,11 % deste em *O. rufus* e 2,12 % em *O. nasutus*. Além destas células, vasos sanguíneos, espaço linfático e tecido conjuntivo também compunham o compartimento intertubular dos roedores estudados.

Tabela 1. Biometria e proporção volumétrica testicular de *Oxymycterus rufus* e *O. nasutus*

<b>Parâmetros</b>	<b>Oxymycterus rufus</b>	<b>Oxymycterus nasutus</b>
Peso corporal (g)	82,28 ± 36,52	58,30 ± 7,27
Peso testicular (g)	0,38 ± 0,12	0,52 ± 0,22
Peso do parênquima (g)	0,36 ± 0,11	0,50 ± 0,22
Compartimento tubular (%)	90,91 ± 4,09	95,19 ± 1,60
Compartimento intertubular (%)	9,09 ± 4,09	4,81 ± 1,60
Volume dos túbulos seminíferos (mL)	0,33 ± 0,10	0,48 ± 0,20
Volume intersticial (mL)	0,032 ± 0,01	0,024 ± 0,01
<b>Interstício (%)</b>		
Célula de Leydig	46,80 ± 11,74	43,68 ± 10,33
Vaso sanguíneo	19,73 ± 3,94	14,43 ± 10,48
Espaço linfático	16,21 ± 9,60	27,37 ± 12,68
Tecido conjuntivo	17,27 ± 2,69	14,52 ± 5,84
<b>Parênquima testicular (%)</b>		
Célula de Leydig	4,11 ± 1,74	2,12 ± 0,80
Vaso sanguíneo	1,73 ± 0,66	0,67 ± 0,45
Espaço linfático	1,67 ± 1,36	1,34 ± 0,90
Tecido conjuntivo	1,58 ± 0,74	0,68 ± 0,32
<b>Volume total por parênquima testicular (µL)</b>		
Célula de Leydig	0,0140 ± 0,0040	0,0106 ± 0,0060
Vaso sanguíneo	0,0063 ± 0,0320	0,0037 ± 0,0037
Espaço linfático	0,0058 ± 0,0039	0,0067 ± 0,0058
Tecido conjuntivo	0,0055 ± 0,0026	0,0034 ± 0,0019

O compartimento intertubular de *O. rufus* e *O. nasutus* apresentou células de Leydig com núcleos grandes, com formato variando de redondo a oval, localizados excentricamente no citoplasma e com nucléolos evidentes. Além disso, uma delicada camada de cromatina condensada encontrava-se presente ao longo do envoltório nuclear.

As células de Leydig não se distribuíam dentro de um padrão regular, podendo ser observadas em grupos ou isoladas, próximas a túnica própria dos túbulos seminíferos ou próximas aos vasos sanguíneos. Outra característica marcante deste compartimento são os extensos espaços linfáticos encontrados em ambas as espécies, embora sejam mais evidentes em *O. nasutus* (Figuras 1 e 2).

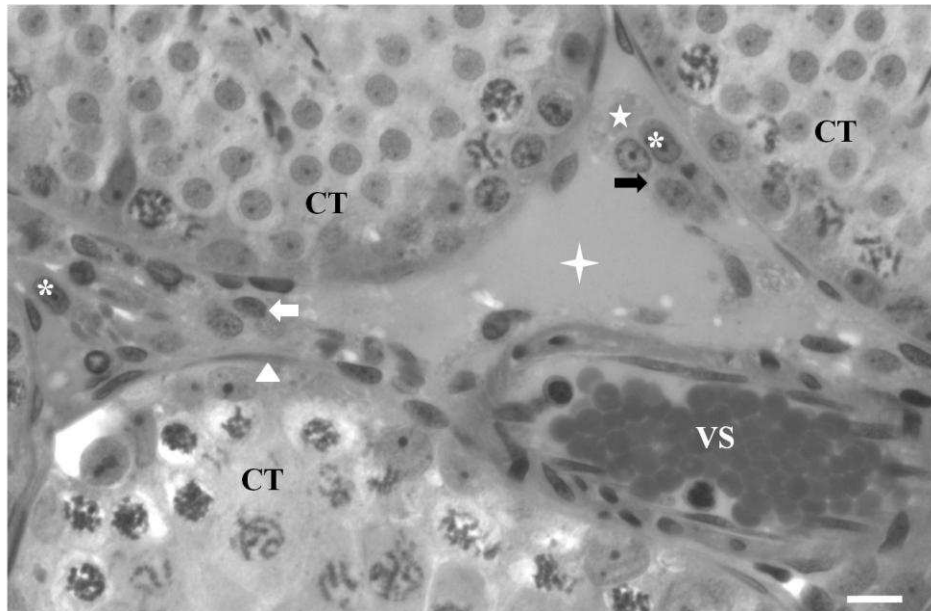


Figura 1. Compartimento intertubular do roedor silvestre *Oxymycterus rufus*. Célula de Leydig (→); núcleo de Leydig (\*); citoplasma de Leydig (☆); vaso sanguíneo (VS); espaço linfático (↔); tecido conjuntivo (⇔); compartimento tubular (CT); célula mioide na túnica própria (▲). Azul de toluidina/ borato de sódio 1%. Barra: 10  $\mu$ m.

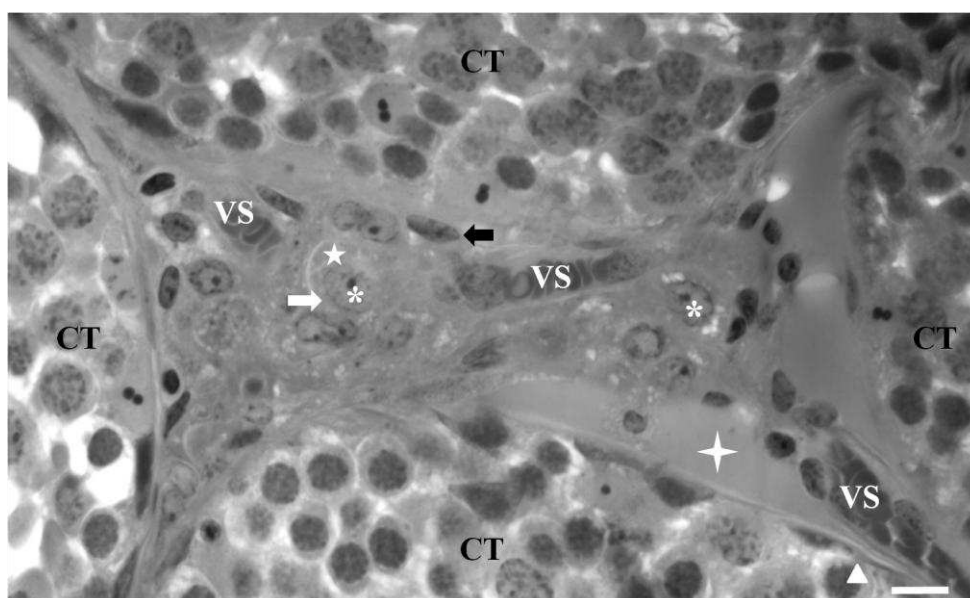


Figura 2. Compartimento intertubular do roedor silvestre *Oxymycterus nasutus*. Célula de Leydig ( $\rightleftharpoons$ ); núcleo de Leydig (\*); citoplasma de Leydig ( $\star$ ); vaso sanguíneo (VS); espaço linfático ( $\blackleftarrow$ ); tecido conjuntivo ( $\blackrightarrow$ ); compartimento tubular (CT); célula mioide na túnica própria ( $\blacktriangle$ ). Azul de toluidina/ borato de sódio 1%. Barra: 10  $\mu\text{m}$ .

O intertúbulo de ambas as espécies foi caracterizado como correspondente ao padrão tipo I descrito por Fawcett et al. (1973), apresentando as células de Leydig e os vasos sanguíneos separados dos túbulos seminíferos por extensos espaços linfáticos.

As células de Leydig apresentaram volume de 352,81 e 572,82  $\mu\text{m}^3$  em *O. rufus* e *O. nasutus*, respectivamente. Deste valor 213,41 e 399,63  $\mu\text{m}^3$  correspondem ao volume ocupado pelo citoplasma e o volume restante equivale ao núcleo, respectivamente (Tabela 2). Outros dados referentes às células de Leydig e o índice Leydigossomático se encontram na Tabela 2.

Tabela 2. Morfometria e estereologia das células de Leydig e ILS em *Oxymycterus rufus* e *O. nasutus*

Parâmetros	<i>Oxymycterus rufus</i>	<i>Oxymycterus nasutus</i>
Diâmetro nuclear ( $\mu\text{m}$ )	6,40 $\pm$ 0,47	6,87 $\pm$ 0,59
Percentual do núcleo (%)	18,60 $\pm$ 1,98	14,32 $\pm$ 5,27
Volume do núcleo ( $\mu\text{m}^3$ )	139,40 $\pm$ 31,04	173,19 $\pm$ 42,64
Percentual do citoplasma (%)	28,20 $\pm$ 10,76	29,36 $\pm$ 6,21
Volume do citoplasma ( $\mu\text{m}^3$ )	213,41 $\pm$ 92,26	399,63 $\pm$ 189,80
Volume individual da célula ( $\mu\text{m}^3$ )	352,81 $\pm$ 113,24	572,82 $\pm$ 228,74
Número total de células de Leydig ( $\times 10^6$ )	43,15 $\pm$ 19,32	20,06 $\pm$ 11,37
Número de células de Leydig / g / testículo ( $\times 10^6$ )	117,23 $\pm$ 52,98	40,77 $\pm$ 24,75
Índice Leydigossomático (%)	0,018 $\pm$ 0,005	0,019 $\pm$ 0,01

#### 4. Discussão

A proporção entre os compartimentos do parênquima testicular é bastante variável entre as espécies de mamíferos e constitui um dos principais fatores responsáveis pela eficiência diferenciada na produção de espermatozoides observada em várias espécies (Russell et al., 1990; França e Russell, 1998). O percentual ocupado pelo interstício em

*O. rufus* (9,09) e *O. nasutus* (4,81) foi semelhante ao descrito para outros roedores cricetídeos como *Oligoryzomys flavescens* (5 %; Boiani et al., 2007), *Hylaeamys megacephalus* (5,54 %; Melo et al., 2013), *Oligoryzomys nigripes* (6,22 %; Balarini, 2013) e *Akodon cursor* (9,30 %; Balarini, 2013), mas bastante inferior ao descrito para *Hydrochoerus hydrochaeris*, no qual aproximadamente 50% do parênquima testicular era composto pelo espaço intersticial (Carretta Júnior, 2012).

O interstício de *O. rufus* e *O. nasutus* assemelha-se ao descrito para outros roedores silvestres e outros mamíferos (Paula et al., 2007; Sarti et al., 2011; Carretta Júnior, 2012; Morais et al., 2012; Balarini, 2013), sendo este compartimento tipicamente composto pelas células de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, e uma população variável de células do tecido conjuntivo como fibroblastos e macrófagos (França e Russell, 1998). Segundo Paula et al. (2007), em uma ampla variedade de mamíferos, o principal elemento constituinte do interstício é a célula de Leydig. Nas espécies de roedores estudadas, as células de Leydig ocuparam grande parte deste espaço. Entretanto, o percentual encontrado em *O. rufus* (46,80) e *O. nasutus* (43,68) foi menor que o descrito para outros roedores cricetídeos como *O. nigripes* (65,98 %; Balarini, 2013) e *A. cursor* (67,15 %; Balarini, 2013), além de outros mamíferos como as espécies de morcego *Sturnira lilium* e *Molossus molossus* que apresentaram, respectivamente, 83,19 % (Morais et al., 2014) e 87 % (Morais et al., 2012) do interstício composto por células de Leydig. Em *O. rufus* e *O. nasutus* a proporção de outros componentes do compartimento intertubular, como vasos sanguíneos e espaço linfático, foi semelhante ao descrito para os roedores silvestres *Akodon montensis*, *Necomys lasiurus* (Cordeiro Júnior, 2009) e *Trinomys moojeni* (Cordeiro Júnior et al., 2010). Quanto à proporção volumétrica dos diferentes componentes intersticiais, Fawcett et al. (1973) relatam que este parâmetro apresenta grande variação entre as diversas espécies de mamíferos.

Variações observadas em relação ao percentual de células de Leydig no interstício, e mesmo o percentual deste compartimento nos testículos das diversas espécies de mamíferos também pode estar relacionados ao sistema de acasalamento apresentado pelas espécies (Kenagy e Trombulak, 1986). Assim, espécies com sistema de acasalamento poliândrico ou promíscuo apresentariam maior investimento em túbulos seminíferos e na produção de gametas quando comparadas à espécies poligínicas que apresentariam maior demanda energética na produção androgênica, pois estas necessitam de grande concentração de testosterona, para por exemplo, manter e proteger seu harém

(Paula et al., 2002). Esta teoria explicaria os resultados encontrados para as espécies de roedores aqui estudados.

O arranjo e a proporção dos elementos constituintes do compartimento intertubular foi descrito por Fawcett et al. (1973) em três padrões diferentes. *O. rufus* e *O. nasutus* apresentaram o padrão do tipo I, segundo a descrição mencionada, no qual as células de Leydig e os vasos sanguíneos encontram-se separados dos túbulos seminíferos por um espaço linfático bem desenvolvido. Este padrão é idêntico ao descrito em outros roedores silvestres como *A. cursor* e *O. nigripes* (Balarini, 2013), corroborando assim, a afirmação de Paula et al. (2007), que relatam que roedores em geral apresentam o padrão I.

As células de Leydig representam a porção endócrina dos testículos, a qual fornece o suporte andrógeno necessário para manutenção da espermatogênese e do trato reprodutor como um todo (O'Donnel et al., 2001). Estudos correlacionando a estrutura e função das células de Leydig em diferentes espécies de mamíferos, demonstraram que variações na secreção de testosterona resultam principalmente da capacidade individual que as células de Leydig possuem em secretar o hormônio do que às diferenças relacionadas ao volume que estas ocupam no testículo (Ewing et al., 1979). Segundo Zirkin et al. (1980), a capacidade de secreção das células de Leydig está altamente correlacionada com a quantidade de retículo endoplasmático liso presente nestas células. O volume médio das células de Leydig foi muito superior em *O. nasutus* (572,82) quando comparado a *O. rufus* (352,81), sendo que o volume de Leydig em *O. rufus* foi similar ao descrito para o roedor cricetídeo *O. nigripes* (393  $\mu\text{m}^3$ ; Cordeiro Júnior, 2009), e o volume descrito para as duas espécies deste estudo se encontram abaixo dos valores descritos para outros roedores silvestres como *Cuniculus paca* (690  $\mu\text{m}^3$ ; Carretta Júnior, 2012), *T. moojeni* (799  $\mu\text{m}^3$ ; Cordeiro Júnior et al., 2010), *A. montensis* (807  $\mu\text{m}^3$ ; Cordeiro Júnior, 2009), *A. cursor* (854,42  $\mu\text{m}^3$ ; Balarini, 2013), e *N. lasiurus* (967  $\mu\text{m}^3$ ; Cordeiro Júnior, 2009). Vale ressaltar que *O. rufus* e *O. nasutus* apresentaram baixo percentual volumétrico de interstício e, conseqüentemente, baixo volume das células de Leydig neste compartimento, fato este descrito também por Balarini (2013) quando relacionou a proporção do interstício ao volume das células de Leydig nos roedores *O. nigripes* e *A. cursor*.

O número de células de Leydig por grama de testículo foi maior em *O. rufus* (117,23) quando comparado a *O. nasutus* (40,77), o que se deve ao menor volume individual da célula de Leydig apresentado por *O. rufus*. Isto foi também descrito para outro roedor cricetídeo, *O. nigripes*, o qual apresentou reduzido volume da célula de

Leydig e maior número destas células por grama de testículo (Cordeiro Júnior, 2009). Apesar de apresentar menor quantidade de células de Leydig por grama de testículo, a média descrita para *O. nasutus* encontra-se dentro da amplitude descrita para mamíferos domésticos ( $20-87 \times 10^6$ ; França e Russell, 1998) e acima do descrito para outros roedores silvestres como *T. moojeni* ( $3,8 \times 10^6$ ; Cordeiro Júnior et al., 2010), *O. nigripes* ( $11 \times 10^6$ ; Balarini, 2013), *Dasyprocta leporina* ( $16,2 \times 10^6$ ; Carretta Júnior, 2012), *C. paca* ( $35,88 \times 10^6$ ; Carretta Júnior, 2012) e *A. cursor* ( $38 \times 10^6$ ; Balarini, 2013).

O índice Leydigossomático (ILS) refere-se à massa corporal alocada exclusivamente em células de Leydig. Segundo Fawcett et al. (1973), a quantidade de células de Leydig parece variar bastante entre indivíduos e entre espécies de mamíferos, não sendo esta variação detectada para outras glândulas endócrinas. Assim, o ILS torna-se uma importante ferramenta que permite comparações entre indivíduos de tamanhos corporais diversos. Os valores de *O. rufus* (0,018) e *O. nasutus* (0,019) foram superiores aos dos roedores *C. paca* (0,005 %; Carretta Júnior, 2012) e *D. leporina* (0,007 %; Carretta Júnior, 2012). Entretanto, este índice encontra-se dentro da amplitude descrita para outros mamíferos silvestres (0,02-0,04 %; Paula et al., 2007; Carretta Júnior, 2012; Morais et al., 2012; Balarini, 2013; Morais et al., 2014).

## **5. Conclusões**

O interstício de *O. rufus* e *O. nasutus* assemelha-se ao descrito para outros roedores silvestres e outros mamíferos. O arranjo dos componentes deste compartimento se enquadra no padrão tipo I descrito por Fawcett, sendo as células de Leydig o elemento intersticial mais abundante, apesar de seu baixo volume individual. Embora *O. rufus* e *O. nasutus* tenham apresentado maior número de células de Leydig, o índice Leydigossomático encontrou-se dentro da amplitude apresentada por outros roedores. Assim, as espécies aqui estudadas parecem demandar menor investimento de energia no compartimento intertubular, fato este explicado pelo provável comportamento promíscuo adotado por estas.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem a ONG Ambiente Brasil pela logística de amostragem, a CAPES pela bolsa de doutorado e a FAPEMIG pelo auxílio financeiro ao projeto.

## Referências Bibliográficas

- Balarini, M. K. (2013) Avaliação morfofuncional do testículo e do processo espermatogênico dos roedores silvestres *Akodon cursor* (Winge, 1887) e *Oligoryzomys nigripes* (Olfers, 1818) (Rodentia: Cricetidae). Tese (Doutorado). Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 81 p.
- Boiani L, Casanova G, Oliveira A, Berois N (2007) Seminiferous epithelium cycle of a hantavirus reservoir, the long-tailed mouse *Oligoryzomys flavescens* (Rodentia – Cricetidae). *Tissue Cell* 39: 267-275.
- Carretta Júnior M (2012) Estudo comparativo do processo espermatogênico e duração do ciclo do epitélio seminífero através da técnica de imunohistoquímica com bromodeoxiuridina de três diferentes espécies de roedores da subordem Hystricomorpha: cutia (*Dasyprocta leporina*), paca (*Cuniculus paca*) e capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Tese (Doutorado). Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 131 p.
- Cordeiro Júnior DA, Costa GMJ, Talamoni AS, França LR (2010) Spermatogenic efficiency in the spiny rat, *Trinomys moojeni* (Rodentia: Echimyidae). *Anim. Reprod. Sci.* 119: 97-105.
- Cordeiro Júnior DA (2009) Estrutura e função testiculares em roedores silvestres das famílias Echimyidae (*Trinomys moojeni*) e Cricetidae (*Akodon cursor*, *Akodon montensis*, *Necomys lasiurus* e *Oligoryzomys nigripes*), da Reserva Particular do Patrimônio Natural do Caraça - MG. Doutorado (Tese). Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. 109 p.
- Ewing LL, Zirkin BR, Cochran RC, 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*, 105: 1135-1142.
- Fawcett DW, Neaves WB, Flores MN (1973) Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biol. Reprod.*, 2: 500-532.
- França LR, Russell LD (1998) The testis of domestic animals. In: Martínez F, Regadera J, editors. A multidisciplinary overview. Madrid, Spain: Churchill Livingstone. pp. 197-219.
- Hutchins M, Kleiman DG, Geist V, McDade MC (Ed.) 2004 Grzimek's Animal Life Encyclopedia. Gale Group, 2<sup>nd</sup> Edition, volume 16, pp. 121 – 473.
- Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27, 137.

- Kenagy GJ, Trombulak SC (1986) Size and function of mammalian testis in relation to body size. *J Mammal* 67: 1-22.
- Melo FCSA, Sousa TP, Costa KLC, Matta SLP, Melo FR, Santa-Rita RM (2013) Descriptive morphometry and stereology of the tubular compartment in the wild rodent *Hylaeamys megacephalus* (Rodentia: Cricetidae) from Central Brazil. *Anim. Reprod. Sci.* 138: 110-117.
- Morais DB, Oliveira LC, Cupertino MC, Freitas KM, Freitas MBD, Paula TAR, Matta SLP (2012) Organization and seasonal quantification of the intertubular compartment in the bat *Molossus molossus* (Pallas, 1776) testis. *Microsc. Res. Tech.*, 76(1): 94-101.
- Morais DB, Barros MS, Freitas MBD, Paula TAR, Matta SLP (2104) Histomorphometric characterization of the intertubular compartment in the testes of the bat *Sturnira lilium*. *Anim. Reprod. Sci.* (in press).
- O'Doneel L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER (2001) Estrogen and spermatogenesis. *Endocrinol. Rev.*, 22: 289-318.
- Paula TAR, Costa DS, Matta SLP (2002) Avaliação histológica do testículo de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) adultas. *Biosci. J.*, 18 (1), 121–136.
- Paula TAR, Matta SLP, Silva Júnior VA, Costa DS, Fonseca CC, Neves MTD (2007) Intertubular space characterization in adult capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) testis. *Braz. Arch. Biol. Tech.*, 50(2): 289-297.
- Russell LD, Ettlín RA, Sinha-Hikim AP, Clegg ED (1990) Mammalian spermatogenesis. In: Russell LD, Ettlín RA, Sinha-Hikim AP, Clegg ED, editors. *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. Bolesta: Cache River Press. pp. 1-40.
- Sarti, P, Paula TAR, Polli GO, Deco Sousa T, Araújo GR (2011) Morfofisiologia do tecido intertubular e das células de Leydig de jaguatirica (*Leopardus pardalis*) adulta. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 63(5): 1060-1065.
- Sigrist, T (2012) *Mamíferos do Brasil – Uma Visão Artística*. 1ª edição, Vinhedo: São Paulo, p. 168 – 207.
- Zirkin BR, Ewing LL, Kromann N, Cochran RC (1980) Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog, and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cell ultrastructure. *Endocrinology*, 107: 1867-1874.

## Conclusões Gerais

Conclui-se que o processo espermatogênico dos roedores silvestres *Oxymycterus rufus* e *Oxymycterus nasutus* assemelham-se bastante. Assim, *O. rufus* e *O. nasutus* apresentam:

- Organização do parênquima testicular semelhante ao descrito para outros roedores silvestres, bem como os demais mamíferos;
- Grande percentual do parênquima testicular ocupado por túbulos seminíferos, abrangendo 90 e 95%, respectivamente;
- Elevado percentual de massa corporal alocado em túbulos seminíferos, com destaque para o índice tubulossomático de *O. nasutus*, um dos mais altos já relatados dentre os roedores silvestres;
- Grande quantidade de células de Sertoli por grama de testículo, muito acima dos valores descritos para outros roedores silvestres;
- Elevados valores da reserva espermática testicular por grama de testículo podendo esta ser considerada o número potencial de espermatozoides produzidos por estas espécies;
- Os 8 estádios que compõem o ciclo do epitélio seminífero, descrito de acordo com o método da morfologia tubular, semelhantes ao apresentado em outros roedores silvestres e outros mamíferos não primatas;
- Uma das menores durações do ciclo do epitélio seminífero, registrada entre roedores silvestres e outros mamíferos em *Oxymycterus rufus*;
- O compartimento intertubular semelhante ao descrito para outros roedores silvestres e demais mamíferos;
- O arranjo dos elementos do compartimento intertubular de acordo com o padrão do tipo I da classificação de Fawcett;
- As células de Leydig como o elemento mais abundante do compartimento intertubular, com valores elevados por grama de testículo;
- Grande investimento de energia na produção de gametas, quando comparado, ao investimento destinado ao compartimento intertubular, estando coerente com o provável sistema de acasalamento adotado por estas espécies, a promiscuidade.