

GRAZIELLA DE SOUZA CORREIA VASCONCELOS

**CICLO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO DE QUATI
(*Nasua nasua* LINNAEUS, 1766).**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

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

T

V331c
2011

Vasconcelos, Graziella de Souza Correia, 1981-
Ciclo do epitélio seminífero de quati (*Nasua nasua*
LINNAEUS, 1766) / Graziella de Souza Correia Vasconcelos.
– Viçosa, MG, 2011.
ix, 48f. : il. (algumas color.) ; 29cm.

Orientador: Tarcízio Antônio Rêgo de Paula
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. *Nasua nasua*. 2. Quati - Reprodução. 3. Espermatogênese
em animais. 4. Quati - Morfologia. 5. Imunohistoquímica.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária. II. Título.

CDD 22. ed. 636.97632

GRAZIELLA DE SOUZA CORREIA VASCONCELOS

CICLO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO DE QUATI
(*Nasua nasua* Linnaeus, 1766)


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

APROVADA: 28 de fevereiro de 2011.


José Domingos Guimarães
(Coorientador)


Juliano Vargas Peixoto


Sérgio Luís Pinto da Matta


Tarcízio Antonio Rego de Paula
(Orientador)

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, com quem compartilho desde criança o amor pelos animais.

À minha mãe, por compartilhar comigo esse sonho, que é tão meu quanto dela.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado, desde criança, a sensibilidade de entender e compartilhar o sofrimento dos animais, mesmo quando ainda não entendia o significado de palavras como respeito e dignidade.

Agradeço aos meus pais, Abner e Marilúcia, cujos esforços jamais foram medidos em se tratando de transformar meus sonhos em realidade. Por me ampararem nos momentos difíceis e me darem força interior para superar as dificuldades, mostrando-me sempre o caminho nas horas incertas.

Aos melhores avós do mundo, meu avô Lauriano e minha avó Nise, os mais amorosos e fiéis “colaboradores” de muitos dos meus sonhos.

Ao meu tio-pai Júnior e minha tia-mãe Kátia por estarem sempre presentes na minha vida, compartilhando as minhas vitórias.

Sou muito grata a todos os meus queridos familiares, meus tios (as) e primos (as) pelo incentivo recebido ao longo destes anos. Amo muito a minha família “calma e tranqüila”!

Ao prof. Tarcízio, meu orientador, um profissional exemplar e inspirador. Obrigada pela oportunidade oferecida, pela orientação e principalmente por nos fazer acreditar que os sacrifícios que fazemos pelos animais valem à pena.

Ao meu coorientador, o prof. José Domingos Guimarães, por ter me orientado quando cheguei à Viçosa, ainda na graduação, e pela paciência e disponibilidade sempre quando solicitado.

Ao prof. Sérgio e o pessoal do Laboratório de Biologia Estrutural, Marli e Alex, pela força dada à minha falta de “jeito” com os procedimentos laboratoriais.

Aos meus braços direito e esquerdo, cúmplices e salva-vidas nesses últimos meses de trabalho: Mari, Baiano, Moacir e Juliano.

A todos os queridos amigos do Cetas – UFV pelos ótimos momentos de trabalho que me fazem aprender a cada dia um pouco mais sobre os animais silvestres ou “bichinhos coloridos”. Obrigada também pelos momentos de descontração, muito importantes principalmente quando a saudade de casa aperta.

A todos da Diretoria de Reprodução: Aysa, Moacir, Baiano, Anderson, Vinícius, Mariana, Gê, Thyara, Mão, Carlão, Leanes, Magaldi e Lucas.

Aos amigos feitos em Viçosa: Renato, Daniel (batráquio), Renan, João, Rogério, Léo, Caio, Thiago, Newton, Emílio, Rodrigo, Leandro, Natália, Raoni, Paulinho, Lili, Rômulo, Gustavo, Fred, Natasha, Mari, Margareth e Geraldinho.

A Rose pela presteza nos trâmites regimentais inerentes à Pós-Graduação e pela solicitude e paciência de sempre.

A minha filha felina Greta, que transforma meus dias e minha casa num reboiço enorme.

Meus sinceros agradecimentos aos animais do Cetas, que nos ensinam todos os dias a unir determinação, amor e dignidade à nossa capacidade de ser racional.

Enfim, meu profundo e sentido agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a concretização desta dissertação, estimulando-me intelectual e emocionalmente.

BIOGRAFIA

GRAZIELLA DE SOUZA CORREIA VASCONCELOS, filha de Abner de Oliveira Vasconcelos e Marilúcia de Souza Correia Vasconcelos, nasceu em 05 de novembro de 1981, em Petrolina, estado de Pernambuco.

Residente em Petrolina, concluiu o Ensino Fundamental no Colégio Nossa Senhora Auxiliadora em 1997 e, entre os anos 1998 e 2000, ingressou nos Colégios Dom Bosco e Contato, quando concluiu os estudos do Ensino Médio.

Em 2002 ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no qual se graduou em 2007.

Em março de 2009 ingressou no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária com área de concentração em Morfologia, pelo Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa – Minas Gerais.

“O destino dos animais é muito mais importante para mim do que o medo de parecer ridículo”. Émile Zola

SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. QUATI (NASUA NASUA LINNAUS, 1766).....	3
2.2. CONFLITO HOMEM-ANIMAL.....	5
2.3. TESTÍCULOS.....	8
2.4. COMPARTIMENTO TUBULAR E CÉLULAS DE SERTOLI.....	9
2.5. PROCESSO ESPERMATOGÊNICO.....	10
2.6. CICLO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO.....	11
2.7. IMUNOHISTOQUÍMICA (BRDU).....	12
2.8. ESTÁDIOS DO EPITÉLIO SEMINÍFERO.....	13
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	14
Artigo	
Ciclo do Epitélio Seminífero de Quatis (<i>Nasua nasua</i> Linnaeus, 1766).....	24
RESUMO.....	24
ABSTRACT.....	25
1. INTRODUÇÃO	26
2. MATERIAL E MÉTODOS	28
2.1 ANIMAIS	28
2.2 COLETA DOS FRAGMENTOS TESTICULARES	28
2.3 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO	29
2.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA	29
2.5 PROCESSAMENTO IMUNOHISTOQUÍMICO	30
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4. CONCLUSÕES	41
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

RESUMO

VASCONCELOS, Graziella de Souza Correia, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2011. **Ciclo do Epitélio Seminífero de Quati (*Nasua nasua* LINNAEUS, 1766)**. Orientador: Tarcízio Antônio Rêgo de Paula. Coorientador: José Domingos Guimarães.

O quati (*Nasua nasua*) pertencente a ordem Carnívora e a família Procyonidae, não configura a Lista das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção do Ministério do Meio Ambiente (MMA). Pelo contrário, seu desenfreado crescimento populacional próximo à áreas urbanas, vem causando transtornos de ordem econômica, ambiental e sanitária. O estudo detalhado acerca das características reprodutivas desta espécie é uma potencial ferramenta na aplicação de biotécnicas reprodutivas voltadas a programas tanto de conservação quanto para seu controle populacional em locais onde atuam sinantropicamente. Os objetivos deste estudo foram descrever os estádios do ciclo do epitélio seminífero associando as primícias do método da morfologia tubular com o método do sistema acrossômico, além de calcular a duração total do ciclo do epitélio seminífero (CES) com incorporação da bromodeoxiuridina (BrdU). Foram utilizados seis animais machos adultos provenientes de cativeiro. Todos os animais foram utilizados na descrição dos estádios, mas somente dois destes para o cálculo da duração do CES. A duração total do ciclo do epitélio seminífero foi calculada em 8,13 dias e com aproximadamente 4,5 ciclos do epitélio seminífero são necessários para que todo o processo espermatogênico seja completado, cerca de 36,58 dias são despendidos na produção de espermatozóides a partir de uma espermatogônia.

Palavras chave: *Nasua nasua*, espermatogênese, imunohistoquímica, BrdU, duração do ciclo do epitélio seminífero.

ABSTRACT

VASCONCELOS, Graziella de Souza Correia, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, february 2011. **Cycle of the seminiferous epithelium of coatis (*Nasua nasua* LINNAEUS, 1766)**. Adviser: Tarcízio Antônio Rêgo de Paula. Co-adviser: José Domingos Guimarães.

The coati (*Nasua nasua*) belonging the order Carnivora and the family Procyonidae, does not configure the List of species in Brazilian fauna threatened of extinction from the Ministry of the Environment. On the contrary, its unstoppable population growth near urban areas has been causing economic, environmental and sanitary problems. The detailed study about reproductive characteristics of this species proves to be an important tool in reproductive biotechnologies application concerning to conservation as well as to its population control. The objectives on this work were to describe the stages of the seminiferous epithelium combining the techniques of tubular morphology method and acrossomic system method, besides determining the total duration of seminiferous epithelium cycle (SEC) with the incorporation of bromodeoxyuridine (BrdU). In this experiment six captive adult male animals were used. All six animals were used in the description of the stages, but only two were used in the measurement of SEC duration. The total duration of the seminiferous epithelium cycle in this species was calculated in 8,13 days and, as long as it takes approximately 4,5 cycles so that the whole spermatogenic process is complete, about 36,58 days are spent in the production of spermatozoa from a spermatogonia.

Keywords: *Nasua nasua*, spermatogenesis, imunohistochemistry, BrdU, seminiferous epithelium cycle duration

1. INTRODUÇÃO GERAL

O quati (*Nasua nasua*) pertence ao Filo Chordata, à Classe Mammalia, à Ordem Carnivora e à Família Procyonidae. Exclusiva da América do Sul, exceto no Chile, a espécie *Nasua nasua* pode ser encontrada nos biomas Amazônia, Cerrado, Caatinga, Pantanal, Mata Atlântica e Campos Sulinos. Morfologicamente, suas características mais marcantes são o estreito e prolongado focinho com nariz muito saliente e pontiagudo que o ajuda a escavar em busca de alimentos, e a longa cauda listrada, a qual é geralmente mantida em posição perpendicular ao corpo (Russell, 1996; Emmons & Feer, 1997; Zeller, 1999; Cheida et al., 2006). Os quatis não figuram na Lista das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçados de Extinção do Ministério do Meio Ambiente – MMA (MMA, 2003), ao contrário, seu excesso populacional tem ocasionado consequências ambientais danosas e de saúde pública (Francioli et al., 2007).

Os conhecimentos morfofisiológicos reprodutivos em animais silvestres e selvagens, mesmo os parâmetros mais elementares, são ainda extremamente limitados, dificultando assim a implementação de programas de reprodução assistida voltados à conservação (Wildt, 2005). O estudo detalhado acerca das características morfofisiológicas testiculares é importante para a compreensão detalhada da espermatogênese, servindo como importante ferramenta para o desenvolvimento de técnicas reprodutivas voltadas a programas conservacionistas de material genético, assim como para aplicação em programas de controle populacional de espécies problema (Asano et al., 2003; Silva et al., 2004; Filho, 2004).

Biópsias testiculares têm fornecido material representativo no estudo do processo espermatogênico, uma vez que essa técnica permite que a capacidade reprodutiva de potenciais reprodutores seja mantida, sem efeitos deletérios a sua produção espermática (Mascarenhas et al., 2006).

A espermatogênese é um complexo, sincronizado e bem organizado processo cíclico que ocorre no interior dos túbulos seminíferos, podendo ser dividida didaticamente em três fases: a fase proliferativa ou espermatogonial, quando células germinativas sofrem sucessivas e rápidas mitoses formando os espermátócitos primários; a fase meiótica onde o material genético é duplicado e passa por recombinação genética originando quatro espermátides arredondadas haplóides de

cada espermatócito primário; e a fase de diferenciação ou espermiogênica, na qual as espermátides arredondadas passam por severas modificações, diferenciando-se continuamente e transformando-se em espermatozóides (Russell et al., 1990a; Guião Leite, 2002; Bittencourt, 2003; Kerr et al., 2006).

A duração do ciclo do epitélio seminífero (CES) é uma constante biológica espécie específica, não significando a impossibilidade de haver variações significativas dentro de uma mesma espécie, porém, as variações interespecíficas demonstram-se mais marcantes (Guião Leite, 2002; Bittencourt, 2003; Parapanov et al., 2007). Atualmente, as metodologias mais empregadas para se estimar a duração do CES utilizam a timidina triciada e a bromodeoxiuridina (BrdU) como marcadores celulares. A utilização da timidina triciada já é bastante difundida e inúmeros são os estudos utilizando esse marcador em espécies silvestres, como a onça parda (*Puma concolor*) (Guião Leite, 2002), o lobo guará (*Chrysocyon brachyurus*) (Bittencourt, 2003) e o jaguar (*Panthera onca*) (Costa et al., 2008). Pesquisas mais recentes, têm utilizado o BrdU, mais ainda são escassas, limitando-se ao estudo do ciclo espermatogênico do ferret doméstico (*Mustela putorius furo*) (Nakai et al., 2004), musaranho (*Neomys fodiens*) (Parapanov et al., 2008) e do gato do mato pequeno (*Leopardus pardalis*) (Balarini et al., 2011).

As espécies mamíferas apresentam diferentes gerações de células de linhagem espermatogênica do epitélio seminífero, ocorrendo simultaneamente em diferentes fases de desenvolvimento. Didaticamente, essas fases são organizadas em dois métodos taxonômicos: o método da morfologia tubular, em que os arranjos repetitivos, observados em corte transversal dos túbulos seminíferos, são organizados em oito estádios (Berndtson, 1977; Costa et al., 2004) e o método do sistema acrossômico, em que as diferenças espécie específicas das etapas de formação acrossomal, permitem que se obtenham em torno de 8 a 16 estádios na maioria das espécies já estudadas (Russell et al., 1990b; Sarti, 2006; Parapanov et al., 2007).

Uma nova linha de abordagem taxonômica espécie específica, mais acurada, e que permite ainda uma comparação interespecífica, é proposta pela associação entre ambas as metodologias, reunindo características acrossomais com os diferentes estádios do método da morfologia tubular.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 QUATI (*Nasua nasua* LINNAEUS, 1766)

O quati (*Nasua nasua*) pertence ao Filo Chordata, Classe Mammalia, Ordem Carnivora e Família Procyonidae. A família Procyonidae possui seis gêneros e quatorze espécies, cuja distribuição abrange todo o continente americano. Os espécimes da família Procyonidae (*Bassaricyon*, *Bassariscus*, *Nasua*, *Nasuella*, *Potos* e *Procyon*) habitam o Novo Mundo, no entanto, as espécies *Bassariscus* e *Nasuella* não ocorrem no Brasil (Mehren, 1986; Zeller, 1999; Eisenberg & Redford, 1999).

Os procionídeos, em sua maioria, são geralmente solitários e têm hábitos noturnos. São animais basicamente onívoros, alimentando-se de frutos, néctar e pequenos invertebrados. Uma característica comum aos exemplares desse grupo é a sua capacidade de escalar árvores, criando seus filhotes em ninhos arbóreos. São animais adaptados a uma grande variedade de habitats, que vão desde florestas tropicais, onde se observa sua maior ocorrência, até regiões semi-áridas (Mehren, 1986; Eisenberg & Redford, 1999; Cheida et al., 2006; Teixeira & Ambrósio, 2007). Exclusiva da América do Sul, exceto Chile, a espécie *Nasua nasua* pode ser encontrada nos biomas Amazônia, Cerrado, Caatinga, Pantanal, Mata Atlântica e Campos Sulinos (Figura 01) (Emmons & Feer, 1997).

A espécie *Nasua nasua* é facilmente identificada por possuir cabeça alargada, com um estreito e prolongado focinho, cauda listrada, medindo cerca de 42,0 a 55,0 cm, que normalmente se mantêm em posição perpendicular ao corpo (Cabrera & Yepes, 1960; Eisenberg & Redford, 1999; Cheida et al., 2006; Teixeira & Ambrósio, 2007). Ao contrário da maioria dos procionídeos, são essencialmente diurnos, além de terrestres, podendo chegar a 30,5 cm de altura, variando entre 43 – 66 cm de comprimento corpóreo e pesando até 11 kg (Beisiegel, 2001; Francioli, 2007). Possuem membros torácicos mais curtos com longas unhas e membros pélvicos mais longos com unhas fortes e mais curvadas (Emmons & Feer, 1997; Nowak, 1991).



Figura 01. Distribuição geográfica da espécie *Nasua nasua* na América do Sul (área destacada em vermelho) (IUCN, 2011).

Diferentes colorações de suas pelagens são observadas de acordo com as áreas de distribuição, variando do cinza ao marrom-claro. Na região do dorso apresentam coloração avermelhada a marrom-escuro e nas regiões do peito e abdômen, coloração amarelada. No estado de Minas Gerais, apresentam-se geralmente acinzentados (Figura 02) (Cheida et al., 2006; Teixeira & Ambrósio, 2007).



Figura 02. *Nasua nasua* macho mantido em cativeiro no CETAS – UFV

Os machos atingem maturidade sexual em torno dos três anos de idade e ao tornarem-se adultos passam a viver isolados. Em época de acasalamento, habitualmente no final da primavera, o macho dominante no centro do território de cada grupo de fêmeas, aproxima-se do grupo. O acasalamento geralmente ocorre em árvores, e após seu término, o macho é expulso pelas fêmeas. As fêmeas são matriarcas, vivendo com seus filhotes em grupos de até 30 indivíduos (Russell, 1996; Gompper et al., 1997; Beisiegel, 2001; Gompper, 2004). O período de gestação é de 10 a 11 semanas, nascendo de dois a sete filhotes, que pesam em torno de 140g (Cheida et al., 2006; Teixeira e Ambrósio, 2007).

2.2 CONFLITO HOMEM-ANIMAL

O avanço da urbanização sobre os ecossistemas remanescentes tem exercido extrema pressão sobre os animais silvestres. A expansão territorial, em que a zona

urbana se aproxima dos últimos fragmentos de mata virgem e os corredores ecológicos tornam-se escassos aumentam de forma dramática, o contato entre os seres humanos e os animais silvestres (Clark Jr., 1999). Centros urbanos são cada vez mais noticiados na mídia devido à presença e a adaptação de inúmeras espécies da fauna silvestre. Neste contexto, o quati (*Nasua nasua*) tem se encaixado perfeitamente por ser um animal de alta adaptabilidade, capaz de promover um grande aumento de sua população. Esta situação tem ocorrido especialmente em áreas florestais protegidas próximas a cidades, acarretando em conflitos homem-animal, principalmente quanto ao risco na transmissão de zoonoses como a leptospirose e tripanossomíase (Ramirez et al., 1997; Rodrigues et al., 2006; Souza Júnior et al., 2006). Inúmeros são os casos e notícias de superpopulações de quatis atuando como animais sinantrópicos (Figura 03) em diferentes cidades. Esses animais são avistados revirando lixeiras e invadindo residências em busca de alimento, gerando conflitos, visto que inúmeros ataques com ferimentos são registrados em pessoas que tentam aproximar-se, além do grande número registrado de atropelamentos desses animais (Campos, 2009). Segundo a Instrução Normativa Nº 141 de 19 de dezembro de 2006, do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA, 2010) que regulamenta o controle e o manejo ambiental da fauna nociva, a fauna sinantrópica é constituída por populações de animais silvestres, nativas ou exóticas, que utilizam recursos de áreas antrópicas de forma transitória ou permanente, como área de vida. A fauna sinantrópica pode ser ainda dividida em nociva e não nociva, sendo fauna sinantrópica nociva aquela que causa transtornos significativos à população humana ou que representa riscos à saúde pública.

A espécie *Nasua nasua* não é apontada na Lista das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção do Ministério do Meio Ambiente – MMA (MMA, 2003). De fato, situação antagônica ocorre com esses animais, tornando-se necessário viabilizar o controle populacional em áreas de conflito, evitando maiores danos ambientais e de saúde pública, (Franciulli et al., 2007). A União Internacional para a Conservação da Natureza (Glatston, 1994) não demonstra muita preocupação com o estado de conservação do *N. nasua*, porém, sugere atenção ao estado de conservação de outras espécies de quatis como: o quati de nariz branco

(*N. narica*), do quati da ilha de Cozumel (*N. nelsoni*) e do quati das montanhas (*Nasuella olivace*) (Bonatti, 2006).



Figura 03. Exemplos de quatis atuando sinantropicamente.

Em seu habitat natural, as espécies de quatis atuam como dispersores efetivos de sementes após a remoção da polpa durante a passagem pelo aparelho digestório, reduzindo o ataque de fungos e a competição entre plântulas, já que essas sementes são removidas para longe da planta-mãe (Santos & Beisiegel, 2006). Isto evidencia sua importância na natureza, realizando papel de destaque na dinâmica das florestas e influenciando diretamente na regeneração do ambiente (Alves-Costa et al., 2004). Neste sentido, informações obtidas por meio do estudo dos aspectos morfofuncionais de *N. nasua* podem ser direcionadas a programas de conservação de outras espécies de procionídeos com algum grau de ameaça populacional (Lima et al., 2009).

As biotecnologias reprodutivas têm sido apontadas pela comunidade científica como soluções potenciais para a conservação da biodiversidade. Técnicas como

inseminação artificial, transferência de embriões, criopreservação de gametas e embriões, fertilização *in vitro*, injeção intracitoplasmática de espermatozóide e sexagem de espermatozóide já vêm sendo implantadas com sucesso em animais silvestres (Sadalla Filho, 2004). Porém, para que ocorra uma utilização eficaz dessas técnicas é necessário o conhecimento prévio da biologia reprodutiva básica, seja de parâmetros anatômicos ou mesmo morfofisiológicos. Desta forma, dados detalhados dos padrões morfofisiológicos testiculares e do processo espermatogênico são importantes ferramentas para o estabelecimento de protocolos de reprodução assistida (Azevedo, 2004).

Tendo como alvo o desenvolvimento de biotécnicas reprodutivas que auxiliem a conservação, diferentes espécies silvestres já tiveram seus parâmetros morfofisiológicos testiculares e da produção de gametas masculinos definidos, entre elas: lobo guará (*Chrysocyon brachyurus*) (Bittencourt, 2007), jaguatirica (*Leopardus pardalis*) (Sarti, 2006), paca (*Cuniculus paca*) (Carreta Jr., 2008), gato do mato pequeno (*Leopardus tigrinus*) (Balarini, 2008) e quati (Campos, 2009)

2.3 TESTÍCULOS

Os testículos são órgãos que apresentam formato oval a arredondado, localizados permanentemente, na maioria dos mamíferos, em um prega cutânea denominada escroto, situada fora da cavidade abdominal, localização importante devido à necessidade de uma temperatura inferior à temperatura abdominal para a manutenção de suas funções fisiológicas normais (Konig & Liebich, 2002; Campos, 2009). Os testículos apresentam função tanto endócrina quanto exócrina, e ambas são controladas pelos hormônios gonadotróficos hipofisários, sendo o hormônio folículo estimulante (FSH) diretamente relacionado com o início e a manutenção da atividade gametogênica dos túbulos seminíferos. Já o hormônio luteinizante (LH) controla a atividade endócrina das células de Leydig, as quais produzem a testosterona, que além de dar suporte à atividade gametogênica, é envolvido indiretamente no desenvolvimento e manutenção dos caracteres sexuais secundários no macho adulto (Ashdown & Hancock, 1988).

A estrutura testicular é composta pelo parênquima, envolto pela albugínea testicular que é contínua com trabéculas de tecido conjuntivo que convergem para o

interior do parênquima testicular, formando o mediastino e dividindo o testículo em lóbulos (Gartner & Hiatt, 1993; Dyce et al., 2004). A albugínea testicular é composta por colágeno, fibras elásticas e uma rede de vasos sanguíneos. O parênquima testicular ocupa entre 80 e 90% da massa testicular total. Os túbulos seminíferos representam em torno de 70% desse parênquima (Costa & Paula, 2003; Carreta Jr., 2008). Morfofisiologicamente, o parênquima testicular dos mamíferos pode ser dividido em dois compartimentos: o intertubular ou intersticial e o tubular. No compartimento intertubular estão localizadas as células de Leydig, além de nervos, vasos linfáticos e sanguíneos, tecido conjuntivo e uma população celular variável constituída principalmente de fibroblastos, macrófagos e mastócitos, enquanto que o compartimento tubular é basicamente formado pelos túbulos seminíferos, principal componente quantitativo testicular, constituídos por túnica própria, epitélio seminífero e lúmen tubular (Russell et al., 1990a; Azevedo, 2004).

2.4 COMPARTIMENTO TUBULAR E CÉLULAS DE SERTOLI

A mensuração do diâmetro do túbulo seminífero e da espessura do seu epitélio seminífero, assim como a quantificação da proporção volumétrica dos diferentes componentes do parênquima testicular representam os parâmetros mais abordados como indicadores da atividade espermatogênica, uma vez que estes estão diretamente relacionados com a produção espermática (Russell et al., 1994; Muñoz et al., 1998; Peixoto, 2010). A proporção volumétrica dos túbulos seminíferos apresenta grande variação interespecífica, sendo este um dos principais fatores responsáveis pela diferença observada para a produção espermática nas diferentes espécies (Paula, 1999; Guião-Leite, 2002). Assim, a amplitude observada na volumetria testicular dos túbulos seminíferos, na maioria dos mamíferos já estudados, varia entre 70 a 90% (França e Russell, 1998; Paula, 1999; Godinho, 1999), e em quatis essa proporção foi observada ocupando em média 77,6% do parênquima testicular (Campos, 2009), dentro do intervalo descrito para os mamíferos em geral e em especial os carnívoros silvestres: 79,33% para lobo guará (Bittencourt, 2003), 78% para onça parda (Guião Leite & Paula, 2003), 77,7% para onça pintada (Azevedo, 2004) e 81,29% para gato do mato pequeno (Balarini, 2008).

O túbulo seminífero apresenta um epitélio constituído de quatro a cinco camadas de células germinativas, entremeadas por células piramidais, alongadas, com contorno irregular, cujas bases largas apoiam sobre a membrana basal, denominadas células de sustentação ou células de Sertoli (Russell et al., 1990b). Essas células, dentre outras funções, são responsáveis pela nutrição das células germinativas, pela secreção de fluidos e proteínas, pela liberação de espermatozoides no lúmen tubular e pela fagocitose de células germinativas em apoptose e do excesso de citoplasma das espermatídes durante a espermiogênese, além de também exercerem importante função mediadora na ação do FSH e testosterona no processo espermatogênico (França & Russell, 1998).

As células de Sertoli são contíguas e apresentam reentrâncias citoplasmáticas onde se alojam células da linhagem espermatogênica, formando junções intercelulares, acima das espermatogônias, dividindo assim o epitélio seminífero em dois compartimentos: o basal, onde se encontram as espermatogônias e os espermatócitos primários em fase inicial de desenvolvimento (pré-leptóteno e leptóteno) e o adluminal onde se localizam os espermatócitos primários a partir de zigóteno, espermatócitos secundários e espermatídes (Sharpe, 1994; Guião Leite & Paula, 2003). A principal ação dessa complexa ligação entre as células de Sertoli adjacentes é a formação de uma barreira testicular, denominada barreira hematotesticular, responsável por promover um ambiente constante no compartimento adluminal, sem interferências externas, além de manter as concentrações específicas de enzimas inibidoras, hormônios gonadotróficos e da proteína ligadora de andrógeno, a ABP (Dellmann & Wrobel, 1982; Garner & Hafez, 1988).

2.5 PROCESSO ESPERMATOGÊNICO

A espermatogênese é um complexo, sincronizado e bem organizado processo que ocorre ciclicamente no interior dos túbulos seminíferos e pode ser dividida morfológica e funcionalmente em três fases: (1) fase proliferativa (espermatogonial), na qual as células germinativas mais jovens se dividem por meio de rápidas e sucessivas mitoses para a formação de espermatócitos primários. Os citoplasmas destes continuam unidos devido à formação de pontes intercelulares, as quais

permitem comunicação direta entre as células irmãs, o que lhes garante um desenvolvimento sincronizado; (2) fase meiótica (espermatocitária ou espermatogênica), que é uma fase de multiplicação na qual o material genético é duplicado e passa por recombinação genética, culminando com duas divisões meióticas que originam quatro espermátides arredondadas haplóides de cada espermatócito primário. Os espermatócitos primários iniciam a fase meiótica no compartimento basal do epitélio seminífero (espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno) e passam pela barreira hematotesticular em direção ao compartimento adluminal onde darão origem às espermátides arredondadas; e (3) fase de diferenciação ou espermiogênica (espermátides), na qual as espermátides arredondadas sofrem severas modificações, diferenciando-se continuamente com a compactação da cromatina, a formação do flagelo e do acrossoma, alojamento nuclear e considerável perda citoplasmática, transformando-se assim em espermatozóides, células altamente especializadas e estruturalmente equipadas para alcançar e fertilizar os ovócitos (Russell et al., 1990a; Sharpe, 1994; França & Russell, 1998).

2.6 CICLO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO

Nos mamíferos, diferentes gerações de células da linhagem espermatogênica, em fases distintas de desenvolvimento, são observadas concomitantemente ao longo do epitélio seminífero, formando de quatro a cinco camadas concêntricas, devido ao fluxo contínuo e extremamente regular das gerações recém formadas na base para o lume do epitélio (Russell et al., 1990a). Desta forma, este fluxo pode ser acompanhado desde uma geração recém formada, que necessitará de quatro a cinco etapas ao longo do epitélio para a sua liberação como espermatozóide no lume tubular. A cronologia observada entre cada uma destas etapas, assim como as interrelações entre as diferentes gerações de células germinativas, são pré determinadas e constantes, constituindo o ciclo do epitélio seminífero (CES). Desta forma, entre quatro e cinco ciclos são necessários para que uma geração complete todo o seu processo espermatogênico (Leblond & Clermont, 1952).

A duração do ciclo do epitélio seminífero é uma constante biológica espécie específica, o que significa que não há variação significativa dentro de uma mesma

espécie, porém, variações interespecíficas são marcantes (Guião Leite, 2002; Bittencourt, 2003; Parapanov et al., 2007). Diversas metodologias tais como irradiações por raios X ou raios gama, injeções de radioisótopos e imunohistoquímica têm sido empregadas para se estimar a duração do CES. As metodologias mais utilizadas atualmente são aquelas que empregam a inoculação de timidina triciada e bromodeoxiuridina (BrdU) como marcadores celulares injetados diretamente no parênquima testicular. Em ambas as técnicas, estes marcadores são incorporados no núcleo das células germinativas que estão sintetizando DNA no momento da injeção, especificamente espermatogônias e espermatócitos primários em pré-leptóteno e leptóteno (Cardoso & Godinho, 1982; Ellwart & Dormer, 1985). Bastante difundidos, trabalhos com a timidina triciada possibilitaram definir a duração do CES em espécies silvestres como a onça parda (*Puma concolor*) (Guião Leite, 2002), o lobo guará (*Chrysocyon brachyurus*) (Bittencourt, 2003), e o jaguar (*Panthera onca*) (Costa et al., 2008).

2.7 – IMUNOHISTOQUÍMICA (BrdU)

Os marcadores de proliferação celular mais utilizados na prática clínica atualmente são: Bromodeoxiuridina (BrdU), Ki-67(MIB-1) e AgNOR. Importante marcador celular não-radiotivo, a bromodeoxiuridina (5-bromo-2'-deoxiuridina) ou simplesmente BrdU, é uma pirimidina análoga da timidina e é seletivamente incorporada ao DNA celular, sendo desta forma, um marcador de células em proliferação. As vantagens desse marcador é que ele permite que as células marcadas possam ser visualizadas por técnicas imunohistoquímicas com o uso de anticorpos anti-BrdU e coloração pelo sistema *streptavidin-biotin* (Nowakowski et al., 1989; Fagerholm et al., 1994; Gauthier et al., 1995; Peixoto, 2010). A incorporação do BrdU surge como alternativa vantajosa sobre a técnica de radioautografia com o uso da timidina triciada, pois não possui a inconveniente utilização de marcadores radioativos e permite a identificação de síntese de DNA em células em secções de tecido e ainda em suspensão e esfregaço (Givan, 1992; Szerenyi et al., 1994).

A bromodeoxiuridina tem se mostrado muito útil em estudos da cinética do ciclo celular, na detecção de alterações cromossômicas, na avaliação da sensibilidade de células tumorais à quimioterapia ou radioterapia, na detecção da reatividade de

linfócitos estimulados por antígenos e na avaliação dos efeitos inibitórios ou estimulatórios de substâncias na proliferação celular, tais como, fatores de crescimento ou citocinas (Van Diest et al., 1999).

Pesquisas mais recentes, voltadas para o cálculo da duração do CES por meio do uso da bromodeoxiuridina são ainda escassas, limitando-se apenas ao estudo do ciclo espermatogênico do gato do mato pequeno (*Leopardus pardalis*) (Balarini et al., 2011) do musaranho (*Neomys fodiens*) (Parapanov et al., 2008) e do ferret doméstico (*Mustela putorius furo*) (Nakai et al., 2004). Aplicado diretamente no parênquima testicular, esse marcador age incorporando-se ao DNA em duplicação no núcleo das células em interfase, no momento da injeção, ou seja, nos diferentes tipos espermatogoniais e nos espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno. Como os pré-leptótenos/leptótenos são os últimos tipos celulares a incorporarem o BrdU em seus núcleos, os mesmos são utilizados como ponto de referência para a determinação do cálculo da duração do ciclo do epitélio seminífero, em associação com a frequência dos estádios percorridos após diferentes tempos de injeção do radioisótopo (Parapanov et al., 2008; Peixoto, 2010; Balarini et al., 2011).

2.8 ESTÁDIOS DO EPITÉLIO SEMINÍFERO

Nos túbulos seminíferos de animais sexualmente maduros, as células espermatogênicas não estão arranjadas ao acaso, mas sim organizadas numa série bem definida de associações celulares ou estádios. Na grande maioria dos mamíferos estudados, o arranjo dos estádios do ciclo do epitélio seminífero é segmentar e usualmente existe somente um estágio por secção transversal de túbulo seminífero (Leblond & Clermont, 1952). Neste sentido, arranjos repetitivos podem ser observados em corte transversal dos túbulos seminíferos, estando estes organizados em oito estádios a partir da composição e associação das diferentes gerações espermatogênicas observadas. Esse método taxonômico, denominado método da morfologia tubular, pode ser aplicado a qualquer espécie mamífera e é o método de eleição em estudos comparativos interespecíficos. (Leblond & Clermont, 1952; França & Russell, 1998; Costa & Paula, 2003).

A morfologia descritiva do desenvolvimento acrossômico, ao longo da espermiogênese, pode ser também utilizada como metodologia taxonômica dos

diferentes estádios do CES, denominada método do sistema acrossômico. Diferente do método da morfologia tubular, onde sempre observam-se oito estádios em qualquer espécie, no método do sistema acrossômico, devido às diferenças espécie específicas nas etapas de formação acrossomal, se obtém entre 8 a 16 estádios na maioria dos animais já estudados (Leblond & Clermont, 1952; Russell et al., 1990b). Embora seja um método mais apurado, o desenvolvimento do acrossoma é muito particular entre as diferentes espécies, gerando um número diferenciado de passos acrossomais e conseqüentemente de estádios, dificultando estudos comparativos interespecíficos (Munoz et al., 1998; Sarti, 2006; Parapanov et al. 2007; Silva, et al., 2009).

Propomos então uma nova linha de abordagem para a taxonomia do ciclo do epitélio seminífero através da associação de ambas as metodologias, descrevendo-se o CES por meio do método da morfologia tubular associando-se às definições das diferentes etapas do desenvolvimento acrossômico em cada estádio. Reunir as características acrossomais com os diferentes estádios do método da morfologia tubular representa uma opção mais acurada espécie específica, permitindo ainda uma comparação interespecífica do processo espermatogênico.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves-Costa, C. P., Da Fonseca, G. A. B., Christófaró, C. 2004. Variation in the diet of the Brown-nosed coati (*Nasua nasua*) in southeastern Brazil. *Journal of Mammalogy*. 85: 478-482.
- Asano, M., Matoba, Y., Ikeda, T., Suzuki, M., Asakawa, M., Ohtaishi, N. 2003. Reproductive characteristics of the feral raccoon (*Procyon lotor*) in Hokaido. *Jpn. Journal of Veterinary Medical Science*. 65: 369–373.
- Ashdown, R.R., Hancock, J.L. 1988. *Anatomia funcional da reprodução masculina. Reprodução Animal*. São Paulo: Manoel. p.7-31.

- Azevedo, M.H.F. 2004. *Análise morfofuncional do testículo da onça pintada (Panthera onca) adulta*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 63p. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária).
- Balarini, M.K. 2008. *Avaliação morfofuncional do testículo e do processo espermatogênico do gato-do-mato-pequeno (Leopardus tigrinus Schreber, 1775) adulto*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 60p. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária).
- Balarini, M.K., Paula, T.A.R., Matta, S.L.P., Peixoto, J.V. Guião-Leite, F.L., Rossi Jr, J.L., Czermak Jr, A.C. Walker, N.J. Stages and duration of the cycle of the seminiferous epithelium in onçilla (*Leopardus tigrinus*, SCHREBER, 1775). 2001. *Theriogenology*. No prelo.
- Beisiegel, B.M. 2001. Notes on the coati, *Nasua nasua* (Carnivora: Procyonidae) in Atlantic Forest area. *Brazilian Journal of Biology*. 61: 689-692.
- Berndtson, W.E. 1977. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *Journal of Animal Science*. 44: 818-883.
- Bittencourt, V.L. 2003. *Avaliação morfofuncional do testículo e do processo espermatogênico do lobo guará (Chrysocyon brachyurus, Illiger, 1811), adulto*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 57p. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária).
- Bittencourt, V.L., Paula T.A.R., Matta, S.L.P., Fonseca, C.C., Costa, D.S., Benjamim, L.A., Costa, E.P. 2007. The seminiferous epithelium cycle and daily spermatid production in the adult maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*, ILIGER, 1811). *Micron*. 38: 584-589.
- Bonatti, J. 2006. *Uso e Seleção de Habitat, Atividade Diária e Comportamento de Nasua nasua (Linnaeus, 1966) na Ilha Campeche, Florianópolis, Santa Catarina*.

Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Tese (Mestrado em Ecologia). Instituto de Biociências.

Cabrera, A., Yepes, J. 1960. *Mamíferos sul-americanos*. Buenos Aires: Editora Ediar. 187p.

Campos, P.K.A. 2009. *Avaliação Morfofuncional do Testículo de quatis (Nasua nasua, Linnaeus 1966) adultos*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 75p. Tese (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural).

Cardoso, F.M., Godinho, H.P. 1982. Cycle of the seminiferous epithelium and its duration in the zebu, *Bos indicus*. *Animal Reproduction Science*. 5: 231-245.

Carreta Jr., M. 2008. *Avaliação morfofuncional do processo espermatogênico de paca (Cuniculus paca)*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 61p. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária).

Cheida, C.C., Nakano-Oliveira, E., Fusco-Costa, R., Rocha-Menders, F. Quadros, J. 2006. Ordem Carnívora. In: Reis, N.R., Peracchi, A.L., Pedro, W.A., Lima, I.P. (Eds.). *Mamíferos do Brasil*. Londrina: Editora da Universidade Estadual de Londrina. p. 231-275.

Clark Jr, E. E. 1999. El papel potencial de la rehabilitación em la conservación de vida silvestre em las Américas. In: Drews, C. (Ed.) *Rescate de fauna em El Neotrópico*. Heredia. Euna. p. 89-105.

Costa, D. S., Paula, T. A. R. 2003. Espermatogênese em mamíferos. *Scientia*. 4: 53-72.

Costa, D. S., Henry, M., Paula, T. A. R. 2004. Espermatogênese de catetos (*Tayassu tajacu*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 56: 46-51.

Costa, G. M. J., Chiarini-Garcia, H., Morato, R. G., Alvarenga, R., França, L. R. 2008. Duration of spermatogenesis and daily sperm production in the jaguar (*Panthera onca*). *Theriogenology*. 70: 1136-1146.

- Dellman, H., Wrobel, K. 1982. Sistema reprodutor masculino. In: Dellmann, H., Brown, E.M. (Eds.) *Histologia Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. p. 232-253.
- Dyce, K.M., Sack, W.O., Wensing, C.J.G. 2004. *Tratado de anatomia veterinária*. Rio de Janeiro: Elsevier. p.663.
- Eisenberg, J. F., Redford, K. H. 1999. *Mammals of the neotropics: the central neotropics (Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil)*. Chicago and London: The University of Chicago Press. p. 609.
- Ellwart, E.; Dormer, P. 1985. Effect of 5-Fluoro-2'-Deoxyuridine (FdUrd) on 5-Bromo-2'-Deoxyuridine (BrdUrd) incorporation into DNA measured with monoclonal BrdUrd antibody and by the BrdUrd/H. *Cytometry*. 6: 513-20.
- Emmons, L. H.; Feer, F. 1997. *Neotropical rainforest mammals: A field guide*. Chicago: The University of Chicago Press. p.307.
- Fagerholm, P., Hamberg-Nyström, H., Tengroth, B. 1994. Wound healing and myopic regression following photorefractive keratectomy. *Acta Ophthalmology*. 72:229-34.
- Franciulli, A.L.R., Costa, G.M., Mançanares, C.A.F., Martins, D.S., Ambrósio, C.E., Miglino, M.A., Carvalho, A.F. 2007. Morfologia dos órgãos genitais masculinos de quati (*Nasua nasua*, Linnaeus 1766). *Biotemas*. 20: 27-36.
- França, L.R., Cardoso, F.M. 1998. Duration of spermatogenesis and sperm transit time through the epididymis in the piau boar. *Tissue and Cell*. 30: 573-582.
- Givan, A. L. 1992. Flow Cytometry: First Principles. *Clinical Pathology*. p. 116-118.

- Gartner, L.P., Hiatt, J.L. 1993. *Atlas de histologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.322.
- Garner, D.L., Hafez, E.S.E. 1988. Espermatozoides. In: Hafez, E.S.E. (Ed.) *Reprodução Animal*. São Paulo: Editora Manole. p. 187-211.
- Gauthier, C.A., Epstein, D., Holden, B.A., Tengroth, B., Fagerholm, P., Hamberg-Nyström, H., Sievert, R. 1995. Epithelial alterations following photorefractive keratectomy for myopia. *Journal of Refractive Surgery*. 11: 113-8.
- Godinho, C.L. 1999. *Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (Felis domestica) sexualmente maduros*. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 123p. Tese (Mestrado em Morfologia). Instituto de Ciências Biológicas.
- Gompper, M. E., Gittleman, J. L., Wayne, R. K. 1997. Genetic relatedness, coalitions and social behavior of white-nosed coatis, *Nasua narica*. *Animal Behaviour*. 53: 781-797.
- Gompper, M. E. 2004. Correlations of coati (*Nasua narica*) social structure with parasitism by ticks and chiggers. In: Sánchez-Cordero, V., Medellín, R.A. (Eds.). *Contribuciones Mastozoológicas em Homenaje a Bernardo Villa*. México: Instituto de Biología e Instituto de Ecología. UNAM. pp.527-534.
- Guião-Leite, F.L. 2002. *Análise morfológica do testículo e do processo espermatogênico da onça parda (Puma concolor) adulta*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 64p. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária).
- Guião Leite, F.L., Paula, T.A.R. 2003. Rendimento intrínseco da espermatogênese, o índice de células de Sertoli e a reprodução espermática diária da onça-parda (*Puma concolor*). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 27: 21-26.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis. Instrução Normativa Nº 141 de 19 de dezembro de 2006. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br>>Acessado em 11 de janeiro de 2011.

Glatston, A. R. 1994. *Status survey and conservation action plan for Procyonids and Ailurids: The pad panda, olingos, raccons and their relatives*. IUCN: Gland, Switzerland. 103p.

IUCN - Internacional Union for Conservation of Nature Resources. IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em <<http://www.iucnredlist.org>>. Acessado em 13 de dezembro de 2010.

Kerr, J. B., Loveland, K. L., O'Bryan, M. K., Kretser, D. M. 2006. Cytology of the Testis and Intrinsic Control Mechanisms. In: Neill, J. D. (ed.) *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. New York: Elsevier Academic Press. p. 827-947.

Konig, H.E; Liebich, H.G. 2002.*Anatomia dos animais domésticos*. São Paulo: Artmed. p.292.

Junqueira, L.C., Carneiro, J. 2004. Aparelho Reprodutor Masculino. In: Junqueira, L.C., Carneiro, J. (Eds.)*Histologia básica*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara. p. 89-105.

Leblond, C.P., Clermont, Y. 1952. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann. New York Academy of Sciences*. 55: 548-584.

Lima, G.L.,Barros, F.F.P.C.,Costa, L.L.M.,Castelo, T.S.,Fontenele-Neto, J.D.,Silva A.R.2009. Determination of semen characteristics and sperm cell ultrastructure of captive coatis (*Nasua nasua*) collected by electroejaculation. *Animal Reproduction Science*. 115: 225–230.

- Mascarenhas, R.M., Paula, T.A.R., Carreta, J.R.M., Ribeiro, E.C.S., Borboleta, L.R., Matta, S.L.P. 2006. Efeitos da biópsia incisional testicular sobre o rendimento intrínseco da espermatogênese e índices de células de Sertoli em cães. *CERES*. 53: 100-105.
- Mehren, K.G. 1986. Carnivores (Carnivora) – Procyonidae. In: Murray, E., Fowler, D.V.M. (Eds.). *Zoo & Wild Animal Medicine*. Denver: Morris Animal Foundation. p. 816-820.
- MMA – Ministério do Meio Ambiente. Lista das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção. Instrução Normativa nº 3, de 27 de maio de 2003. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/179/arquivos/vol_ii_mamiferos.pdf> Acessado em 28 de novembro de 2010.
- Muñoz, E., Fogal, T., Dominguez, S., Scardapane, L., Guzmán, J.A., Piezzi, R.S. 1997. Seasonal changes of the Leydig cells of viscacha (*Lagostomus maximus maximus*): a light and electron microscopy study. *Tissue Cell*.29: 119–128.
- Nakai, M., Van Cleeff, J. K., Bahr, J. M. 2004. Stages and duration of spermatogenesis in the domestic ferret (*Mustela putorius furo*). *Tissue Cell*.36: 439-446.
- Nowak, R. M. 1991. *Walker's mammals of the world*. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press. 12: 643-656.
- Nowakowski, R.S., Lewin, S.B., Miller, M.W. 1989. Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *Journal of Neurocytology*. 18:311-3118.

- Parapanov, R., Nussle, S., Vogel, P. 2007. Cycle length of spermatogenesis in shrews (Mammalia: Soricidae) with high and low metabolic rates and different mating systems. *Biology of Reproduction*. 76: 833-840.
- Parapanov, R., Nussle, S., Hausser, J., Vogel, P. 2008. Histological description of seminiferous epithelium and cycle length of spermatogenesis in the water shrew *Neomys fodiens* (Mammalia: Soricidae). *Animal Reproduction Science*. 107: 148–160.
- Paula, T.A.R. 1999. *Avaliação histológica e funcional do testículo de capivaras adultas (Hydrochoerus hydrochaeris)*. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 84p. Tese (Doutorado em Morfologia). Instituto de Ciências Biológicas.
- Peixoto, J.V. 2010. *Criopreservação de sêmen e avaliação histológica e funcional do testículo de periquitos australianos (Melopsittacus undulatus Shaw, 1805)*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 78p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária).
- Rodrigues, A.F.S.F., Daemon, E., Massard, C.L. 2006. Ectoparasitos de quatis *Nasua nasua* (Carnivora, Procyonidae) em uma floresta urbana no sudeste brasileiro. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 58: 969-971.
- Ramirez, L., Dávila, A.M.R., Victório, A.M., Silva, R.A.M.S., Trajano, V., Jansen, A.M. 1997. Measurements of *Trypanosoma evansi* from the Pantanal. Rio de Janeiro: Memórias Instituto Oswaldo Cruz. p.483-484
- Russell, L.D., Griswold, M.D. 1993. *The Sertoli cell*. Florida: Cache River Press. 801p.
- Russell, L.D., Ettlin, R.A., Sinha-Hikim, A.P., Clegg, E.D. 1990a. *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Cache River Press, Clearwater, Florida. 286 p.
- Russell, L.D., Ren, H.P., Sinha-Hikin, I., Schulze, W., Sinha-Hikin, A.P. 1990b. A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes and

numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell. *American Journal of Anatomy*. 188: 21-30.

Russell, L. D., Chandrashekar, V., Bartke, A., Sinha-Hikim, A. P. 1994. The hamsters Sertoli cell in early testicular regression and early recrudescence: a stereological and endocrine study. *International Journal of Andrology*. 17: 93-106.

Russell, J. K. 1996. Timing of reproduction by coatis (*Nasua narica*) in relation to fluctuations in food resources. In: Leigh Jr., E. G.; Rand, A. S.; Windsor, D. M. (Eds.). *The ecology of a tropical forest*. Washington: Smithsonian Institution Press. pp.413-431.

Sadalla Filho, E. 2004. *Bioteχνologias de Reprodução na Conservação de Espécies Animais Selvagens: São realmente importantes?* São Paulo: PUC, 94p. Monografia (Título de Especialista em Manejo de Animais Silvestres). Pontifícia Universidade Católica.

Santos, V.A., Beisiegel, B.M. 2006. A dieta de *Nasua nasua* (Linnaeus, 1766) no Parque Ecológico do Tietê, SP. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 8: 199-203.

Sarti, P. 2006. *Avaliação Morfométrica do Testículo e da Espermatogênese de Jaguatiricas (Leopardus pardalis, Linnaeus, 1758) Adultas*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 66p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).

Sharpe, R.M. 1994. Regulation of spermatogenesis. In. Knobil, E.; Neil, J.D. (Eds) *The physiology of reproduction*. Raven Press. N.Y. p. 1363-1434.

Silva, A.R., Morato, R.G., Silva, L.D.M. 2004. The potential for gamete recovery from non-domestic canids and felids. *Animal Reproduction Science*. 81: 159–175.

Silva, R.C., Costa, G.M.J., Andrade, L.M., França, L.R. 2009. Testis stereology, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in the ocelot (*Leopardus pardalis*). *Theriogenology* 73: 157–167.

- Souza Júnior, M.F., Lobato, Z.I.P., Lobato, F.C.F., Moreira, E.C., Oliveira, R.R., Leite, G.G., Freitas, T.D., Assis, R.A. 2006. Presença de anticorpos da classe IgM de *Leptospira interrogans* em animais silvestres do Estado de Tocantins, 2002. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 39: 292-294.
- Szerenyi, K., Wang, X., Gabrielian, K., LaBree, L., McDonnell, P.J. 1994. Immunocytochemistry with 5-bromo-2-deoxyuridine for visualization of mitotic cells in the corneal epithelium. *Cornea*. 13:487-92.
- Teixeira, F., Ambrósio, S.R. 2007. Carnívora – Procyonidae (Quati, Mão-pelada, Jupará). In: Cubas, Z.S., Jean, C.R., Silva, J.L., Catão-Dias. (Eds.) *Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária*. São Paulo: Editora Roca. p. 571-583.
- Van Diest, P.J., Brugal, G., Baak, J.P. 1999. Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. *Journal of Clinical Pathology*. 51:716-24.
- Varner, D. D.; Johnson, L. 2007. From a Sperm's Eye View—revisiting our perception of this intriguing cell. In: Varner, D. D.; Johnson, L. 2007. (Eds.) *Proceedings of the American Association of Equine Practitioners*. 53: 104-177.
- Wildt, D. E. 2005. Lions, Tigers, and Pandas, Oh My. *Journal of Andrology*. 26: 452-454.
- Zeller, U. 1999. Mammalian reproduction: origin and evolutionary transformations. *Zoologischer Anzeiger*. 238: 117-130.

ARTIGO

CICLO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO DE QUATI (*Nasua nasua* LINNAEUS, 1766).

RESUMO

O quati (*Nasua nasua*), pertencente a ordem Carnívora e a família Procyonidae, não configura a Lista das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção do Ministério do Meio Ambiente (MMA). Pelo contrário, seu desenfreado crescimento populacional próximo à áreas urbanas, vem causando transtornos de ordem econômica, ambiental e sanitária. O estudo detalhado acerca das características reprodutivas desta espécie é uma potencial ferramenta na aplicação de técnicas reprodutivas voltadas a programas tanto de conservação quanto para seu controle populacional. Os objetivos deste estudo foram descrever os estádios do ciclo do epitélio seminífero associando as primícias do método da morfologia tubular com o método do sistema acrossômico, além de calcular a duração total do ciclo do epitélio seminífero (CES) com incorporação da bromodeoxiuridina (BrdU). Foram utilizados seis animais machos adultos provenientes de cativeiro. Para a descrição dos estádios do epitélio seminífero, somente dois destes para o cálculo da duração do CES. A duração total do ciclo do epitélio seminífero foi calculada em 8,13 dias e com aproximadamente 4,5 ciclos do epitélio seminífero necessários para que todo o processo espermatogênico seja completado, cerca de 36,58 dias são despendidos na produção de espermatozóides a partir de uma espermatogônia.

Palavras chave: *Nasua nasua*, espermatogênese, imunohistoquímica, BrdU, duração do ciclo do epitélio seminífero.

ABSTRACT

CYCLE OF THE SEMINIFEROUS EPITHELIUM OF COATI (*Nasua nasua* LINNAEUS, 1766).

The coati (*Nasua nasua*), belonging to the order Carnivora and the family Procyonidae, does not figure in the List of species in Brazilian fauna threatened of extinction from the Ministry of the Environment. On the contrary, its unstoppable population growth near urban areas has been causing economic, environmental and sanitary problems. The detailed study about reproductive characteristics of this species proves to be an important tool in reproductive biotechnologies application concerning to conservation as well as to its population control. The objectives of this work were to describe the stages of the seminiferous epithelium combining the techniques of tubular morphology method and acrossomic system method, besides determining the total duration of seminiferous epithelium cycle (SEC) with the incorporation of bromodeoxyuridine (BrdU). In this experiment six captive adult male animals were used. For the description of the stages of seminiferous epithelium, only two of these were used in the measurement of SEC duration. The total duration of the seminiferous epithelium cycle in this species was calculated in 8,13 days and with approximately 4.5 cycles of the seminiferous epithelium necessary for the whole spermatogenic process is complete, about 36,58 days are spent in the production of spermatozoa from a spermatogonia.

Keywords: *Nasua nasua*, spermatogenesis, immunohistochemistry, BrdU, seminiferous epithelium cycle duration

1. INTRODUÇÃO

O quati (*Nasua nasua*) pertence ao Filo Chordata, Classe Mammalia, Ordem Carnivora e Família Procyonidae. Exclusiva da América do Sul, exceto Chile, a espécie *Nasua nasua* pode ser encontrada nos biomas Amazônia, Cerrado, Caatinga, Pantanal, Mata Atlântica e Campos Sulinos. Morfologicamente, suas características mais marcantes são o focinho com nariz muito saliente e pontiagudo que o ajuda a escavar em busca de alimentos, e a longa cauda listrada, a qual é geralmente mantida em posição perpendicular ao corpo (Emmons & Feer, 1997; Russell, 1996; Zeller, 1999). Os quatis (*Nasua nasua*) não configuram a Lista das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçados de Extinção do Ministério do Meio Ambiente – MMA (MMA, 2003). Ao contrário, seu excesso populacional, próximo às áreas urbanas, tem gerado consequências danosas ambientais e de saúde pública (Francioli et al., 2007).

O estudo detalhado acerca das características da reprodução de uma espécie se faz importante principalmente para a aplicação de biotécnicas reprodutivas voltadas a programas de conservação de material genético originado de espécies animais silvestres, assim como para aplicação de programas de controle populacional em espécies consideradas pragas (Asano et al., 2003; Sadalla Filho, 2004; Silva et al., 2004). Em andrologia, o processo espermatogênico é a base para a formação dos gametas masculinos e apresenta-se de forma complexa, sincronizada e bem organizada, sendo um processo cíclico que ocorre no epitélio seminífero no interior dos túbulos seminíferos, podendo ser dividida em três fases: a fase proliferativa ou espermatogonial, a fase meiótica e a fase de diferenciação ou espermiogênica (Russell et al., 1990a; Sharpe, 1994).

Nos mamíferos, diferentes gerações de células da linhagem espermatogênica, em fases distintas de desenvolvimento, são observadas concomitantemente ao longo do epitélio seminífero, fato que se deve a um fluxo contínuo e extremamente regular das gerações recém formadas na base para o lume do epitélio (Russell et al., 1990a). Uma vez que a cronologia e as interrelações entre as diferentes gerações de células germinativas são pré determinadas e constantes, oito estádios podem ser registrados a partir da composição e associação entre estas camadas celulares ao longo do epitélio, em cortes transversais do túbulo seminífero. Esse método

taxonômico, denominado método da morfologia tubular, pode ser aplicado a qualquer espécie mamífera e é o método de eleição quando em estudos comparativos interespecíficos (Leblond & Clermont, 1952; França & Russell, 1998; Costa & Paula, 2003). A morfologia descritiva do desenvolvimento acrossômico ao longo da espermiogênese pode ser também utilizada como metodologia taxonômica dos diferentes estádios do CES, porém, neste caso, devido às diferenças espécie específicas nas etapas de formação acrossomal, pode-se obter de 8 a 16 estádios no ciclo do epitélio seminífero para a maioria dos animais já estudados, dificultando estudos comparativos interespecíficos (Leblond & Clermont, 1952; Russell et al., 1990b; Muñoz et al. 1998; Parapanov et al. 2007; Silva, et al., 2009).

Uma nova linha de abordagem para a taxonomia do ciclo do epitélio seminífero é a associação entre ambas as metodologias, descrevendo-se o CES por meio do método da morfologia tubular associando-se às definições das diferentes etapas do desenvolvimento acrossômico em cada estádio (Lin & Jones, 1990). Reunir características acrossomais com os diferentes estádios do método da morfologia tubular representa uma opção mais acurada espécie específica e permite ainda uma comparação interespecífica do processo espermatogênico.

A duração dos eventos ocorridos durante o ciclo do epitélio seminífero (CES) são constantes biológicas espécie específicas, porém com variações interespecíficas, sendo este um dado de supra importância para o entendimento da biologia reprodutiva em uma dada espécie além de importante subsídio para a aplicação de biotécnicas reprodutivas e contraceptivas (Costa & Paula, 2003; Bittencourt, 2003; Parapanov et al., 2008). A bromodeoxiuridina (5-bromo-2'-deoxiuridina), ou simplesmente BrdU, é uma pirimidina análoga da timidina e um eficaz marcador de células em proliferação e permite visualização por técnicas imunohistoquímicas usando anticorpos anti-BrdU e coloração pelo sistema *streptavidin-biotin* (Nowakowski et al., 1989; Fagerholm et al., 1994; Gauthier et al., 1995). O BrdU pode ser incorporado pelas células germinativas mais basais do epitélio seminífero, podendo ser identificada em períodos de tempo conhecidos para a determinação da duração do ciclo do epitélio seminífero (Peixoto, 2010).

Nesse sentido, o presente estudo objetivou estudar a caracterização do processo espermatogênico em quatis (*Nasua nasua*), quanto à descrição dos seus estádios associando os métodos de morfologia tubular e sistema acrossômico.

Objetivou ainda a determinação da duração do ciclo do epitélio seminífero com o uso de imunohistoquímica com aplicação prévia intratesticular de BrdU.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Foram utilizados seis quatis (*Nasua nasua*) machos adultos, dois deles provenientes do Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Viçosa (CETAS – UFV), dois do Centro de Reabilitação de Animais Silvestres (CRAS-MT) e outros dois do Zoológico Municipal de Alfenas – MG. Todos os procedimentos foram devidamente autorizados pelo IBAMA (sob registro número 15.282-1), concedido em 23/06/2008. O estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética do Departamento de Veterinária (protocolo nº 03/2011) e registrado no Sistema de Pesquisa e Pós Graduação (nº 50557260356) da UFV.

2.2 COLETA DOS FRAGMENTOS TESTICULARES

Dois animais foram contidos fisicamente com auxílio de puçá, para a administração de uma única injeção intratesticular de 0,2 mL de bromodeoxiuridina (BrdU). Decorridos seis dias, foram realizadas biópsias testiculares em todos os animais, tendo o cuidado de observar o a exata região de aplicação do BrdU, nestes dois animais. Para tal procedimento foi realizado um jejum prévio de 12 horas, após o qual, cada animal foi contido fisicamente, com auxílio de puçá, para aplicação intramuscular de uma associação anestésica de cloridrato de quetamina (10 mg/kg) e cloridrato de xilazina (1 mg/kg). Durante todo o procedimento os animais foram monitorados, aferindo-se a temperatura, movimentos respiratórios e batimentos cardíacos em intervalos de 10 minutos.

Foi realizada a tricotomia do escroto na região média do testículo com posterior antisepsia. A pele escrotal e a túnica fibrosa foram então incisionadas, expondo a albugínea testicular e a coleta do fragmento de 5 mm de comprimento foi realizada utilizando um *punch* (bisturi circular) de 4 mm de diâmetro no parênquima testicular. O fragmento foi removido e imediatamente imerso em solução fixadora de Karnovsky

(Karnovsky, 1965) durante 24 horas, sendo posteriormente transferido para solução de álcool 70%. A incisão foi suturada em planos distintos, onde albugínea testicular, túnica fibrosa e pele foram suturadas separadamente utilizando-se fio sintético absorvível (Vicryl®).

Ao final do procedimento, todos os animais foram medicados com agentes antiinflamatórios (Flunixin Meglumine, Banamine – Schering-Plough S/A, 1,1 mg/Kg de peso vivo) e antibioticoterapia profilática (penicilina, 20.000 UI/kg de peso vivo) em dose única.

2.3 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Os fragmentos testiculares para análise histológica foram incluídos em resina glicolmetacrilato (Historesin[®] Leica) e para isto, foram desidratados em bateria de etanol em concentrações crescentes (80, 90 e 100° GL) permanecendo meia hora em cada banho, com posterior infiltração na resina em dois banhos distintos e incluídos, na mesma resina, com a adição de endurecedor. O material foi seccionado com navalha de vidro em micrótomo rotativo (Leica RM2155), obtendo-se cortes semi-sequenciais de 4 µm de espessura. Posteriormente, as preparações foram coradas com solução de azul de toluidina/borato de sódio 1% por um minuto e posteriormente lavados em água corrente. Para a coloração do acrossoma, algumas preparações foram coradas com ácido periódico e Schiff (PAS). Para tal foram hidratadas por 2 minutos, incubadas em ácido periódico por 15 minutos em abrigo de luz. Em seguida, foram lavadas com água destilada e imersas em reativo de Schiff, em temperatura ambiente, por 2 horas, também em abrigo de luz. Finalizando o processo, as preparações foram lavadas em água corrente por 10 minutos e água destilada por 1 minuto sendo então coradas com hematoxilina por 1 minuto, para destacar os núcleos, e lavadas uma última vez em água corrente.

2.4 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Para identificação dos estádios do CES foi utilizado o método da morfologia tubular, o qual baseia-se no arranjo e morfologia das células das diferentes gerações de linhagens espermatogênicas em secção transversal de um túbulo seminífero. Ao

longo da descrição de cada um dos oito estádios foram também caracterizadas as diferentes etapas do desenvolvimento do acrossoma. Para tal, foi descrita a morfologia e a área de ocupação do acrossoma sobre a superfície nuclear das espermatídes arredondadas e alongadas presentes em cada estágio do ciclo. Para registro e ilustração foram obtidas imagens digitais capturadas em fotomicroscópio de luz Eclipse E600 (Nikkon) no Laboratório de Biologia e Controle de Hematozoários e Vetores do Departamento de Veterinária/Bioagro.

A frequência dos estádios do ciclo do epitélio seminífero foi determinada por meio da contagem aleatória dos estádios exibidos em 100 secções transversais de túbulos seminíferos, o mais circular possível, ao longo do fragmento testicular em cada animal. A seguinte equação foi utilizada para o cálculo da frequência relativa de cada estágio:

$$\text{Frequência do Estádio (\%)} = \frac{\text{número de túbulos no estágio}}{\text{número total de túbulos}} \times 100$$

2.5 PROCESSAMENTO IMUNOHISTOQUÍMICO

Os fragmentos testiculares dos animais previamente injetados com BrdU foram incluídos em parafina. Desta forma, foram submetidos à desidratação em série crescente de álcoois (70, 80, 95 e 100° GL) com posterior diafanização em três banhos de xilol consecutivos seguindo-se a inclusão em parafina. O bloco resultante foi seccionado em micrótomo rotativo, no Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral da UFV, obtendo-se cortes sequenciais de 4 µm de espessura.

As preparações foram então submetidas à detecção por anticorpo monoclonal e reveladas usando coloração pelo sistema *streptavidin-biotin*, com o kit de coloração BrdU (Zymed®-Invitrogen). As lâminas foram inicialmente submetidas ao processo de desparafinização e reidratadas, lavadas em tampão fosfato (PBS) e a atividade peroxidase bloqueada endogenamente com H₂O₂. O material foi então, submetido a novo banho com PBS para posterior desnaturação do DNA por 2N HCl,

e novamente lavado em PBS para o pré tratamento enzimático, realizado com incubação em solução de tripsina. Após mais um banho com PBS foi realizado o procedimento de bloqueio de reações cruzadas com soro de cabra a 5%, para a incubação com anticorpo monoclonal biotinilado anti-BrdU de camundongo, revelado com reação *streptavidin peroxidase*.

A duração do ciclo do epitélio seminífero foi calculada por meio da observação da geração da célula e estágio mais avançados do ciclo a apresentar a marcação. Como a fase de síntese de DNA das espermatogônias incorpora o BrdU rapidamente na formação de espermátocitos primários no início do estágio um do CES, o tempo decorrido da aplicação até o momento da biópsia é relativo ao somatório das frequências dos estádios percorridos. Desta forma é possível estimar o tempo gasto ao longo de um ciclo completo do epitélio seminífero

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O epitélio seminífero do quati (*Nasua nasua*) apresenta-se dentro do mesmo padrão descrito nas demais espécies estudadas quanto à formação de distintos e repetitivos arranjos entre as diferentes gerações de células germinativas. Desta forma, podem ser observadas diferentes gerações de células germinativas a cada secção transversal do túbulo seminífero. Há claramente uma compartimentalização destas células ao longo do epitélio de forma que as espermatogônias são observadas junto à túnica própria assim como as gerações mais jovens de espermátocitos primários. Já os espermátocitos primários de gerações mais antigas compõem uma camada intermediária e as espermátides são observadas distribuídas na camada mais próxima ao lúmen tubular (Figura 01). As células de Sertoli foram observadas em todas as secções transversais do epitélio seminífero com núcleo próximo ao seu compartimento basal, apresentando-se frequentemente com formato arredondado ou oval, com cromatina frouxa e nucléolo bem desenvolvido, muito semelhante ao observado nos diferentes carnívoros silvestres estudados (Russell & Peterson, 1984; Barros et al., 2004; Bittencourt et al., 2004).

A distribuição destes arranjos ou estádios de forma segmentada ao longo do túbulo seminífero apresenta-se neste animal, semelhante ao observado em todos os mamíferos descritos (Russell et al., 1990b; Guião Leite e Paula, 2003; Barros et al.,

2004; Azevedo et al., 2006; Sarti, 2006; Bittencourt et al., 2007; Caldeira, 2007), com exceção de algumas espécies de primatas (Leal e França, 2006). Assim, apenas um estágio é observado a cada secção transversal do túbulo seminífero, qualificando o quati como representante da modalidade segmentar da espermatogênese, com o desenvolvimento de uma onda sequenciada dos estádios do ciclo do epitélio seminífero ao longo do comprimento do túbulo seminífero (Russell et al., 1990a).

4.1 Ciclo do epitélio seminífero (CES)

Nas secções transversais do epitélio seminífero do quati, foi possível a caracterização dos 8 estádios distintos (Figura01), semelhante ao descrito em mamíferos domésticos e silvestres com base nos arranjos da morfologia epitelial (Paula et al., 1999; Guião-Leite et al., 2006; Bittencourt et al., 2007). Esta metodologia taxonômica do CES baseia-se no arranjo entre as diferentes gerações de células germinativas e é denominado método da morfologia tubular (Paula et al., 1999) e, por descrever características comuns entre os mamíferos, é o método de eleição para estudos comparativos interespecíficos.

Outra metodologia bastante difundida na taxonomia do CES é o sistema acrossômico, o qual baseia-se na descrição morfológica dos diferentes passos ao longo do desenvolvimento acrossômico nas espermátides. Isto é possível visto que as combinações ou arranjos entre as diferentes gerações de células espermatogênicas, que definem os estádios do CES, são extremamente constantes e estáveis, permitindo assim que a identificação da fase de desenvolvimento de uma única geração de espermátide seja suficiente para a determinação do estágio. É uma metodologia bastante minuciosa, porém muito particular a cada espécie, uma vez que o desenvolvimento acrossômico apresenta características espécie específicas. Assim, é uma metodologia acurada para estudos intraespecíficos, mas não adequada para estudos comparativos interespecíficos (Russell et. al., 1990b).

No presente estudo optou-se por uma associação de ambas as metodologias taxonômicas, descrevendo o CES do quati por meio da metodologia da morfologia tubular (estádios grafados com algarismos arábicos), com a descrição do desenvolvimento acrossômico associado (passos acrossômicos grafados em algarismos romanos). Assim, ao longo dos 8 estádios descritos pelo método da

morfologia tubular em quatis, foram descritos 10 diferentes passos acrossomais no desenvolvimento das espermátides (Figura 02). A seguir encontram-se dessas associações:

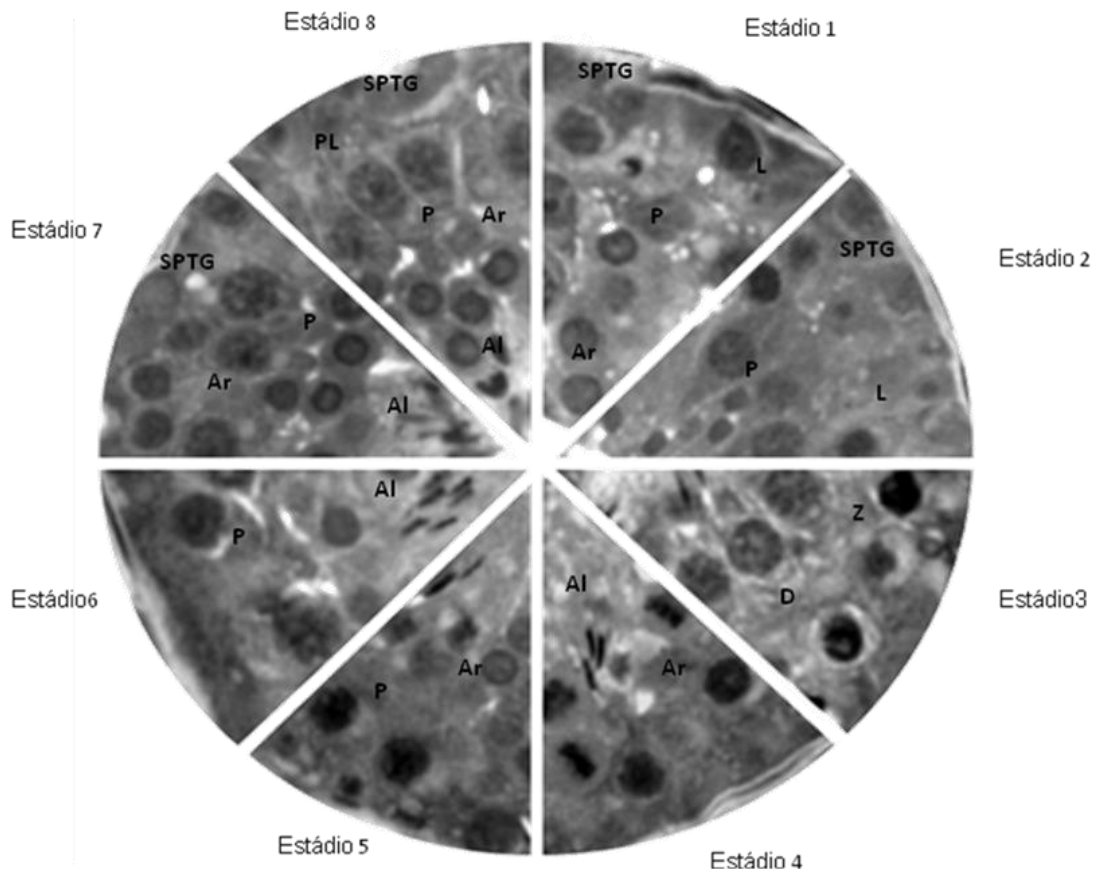


Figura01 – Montagem fotográfica contendo os oito estádios do ciclo do epitélio seminífero do quati segundo o método da morfologia tubular. Estádio 1 (1), estágio 2 (2), estágio 3 (3), estágio 4 (4), estágio 5 (5), estágio 6 (6), estágio 7 (7) e estágio 8 (8). Espermatogônia (SPTG), pré-leptóteno (PL), leptóteno (L), zigóteno (Z), paquíteno (P), diplóteno (D), placa metafásica (PM), espermátide arredondada (Ar) e espermátide alongada (AI). Borato de toluidina (40x)

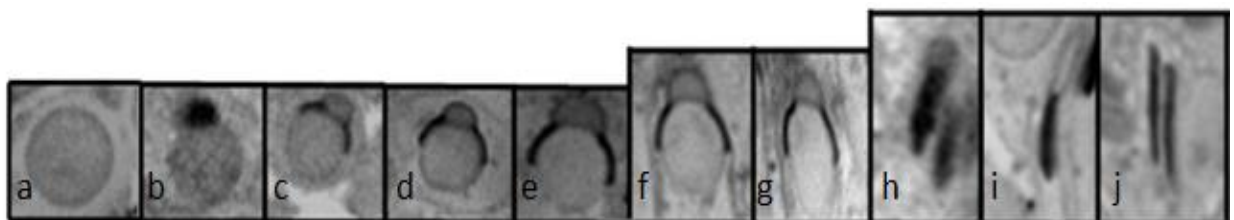


Figura 02 – Montagem fotográfica contendo os dez passos acrossomais de acordo com a metodologia do sistema acrossômico dos estádios do CES de quati. Espermátide arredondada recém-formada com passo acrossomal 1 (a), passo acrossomal 2 (b) passo acrossomal 3 (c), passo acrossomal 4 (d), passo acrossomal 5 (e), passo acrossomal 6 (f), passo acrossomal 7 (g), passo acrossomal 8 (h), passo acrossomal 9 (i), passo acrossomal 10 (j).PAS (1000x)

Estádio I

Neste estágio verificou-se a presença de espermatogônias do tipo A e duas gerações de espermatócitos primários, sendo que uma geração na fase de leptóteno, próximo a túnica própria, e outra em paquíteno em uma localização intermediária no epitélio. As espermatídes observadas neste estágio apresentam-se arredondadas e dispostas em pelo menos 2 camadas de células próximas ao lume (Figura 1-I). Estas células apresentaram formação do acrossoma em etapa avançada de desenvolvimento, passo acrossomal 5, com a presença de um capuz acrossômico contendo uma grande vesícula central e extensões laterais envolvendo cerca de 50% da superfície nuclear (Figura 2-e), orientando-se em direção à base do túbulo seminífero.

Estádio II

Além da presença de espermatogônias do tipo A, observou-se neste estágio espermatócitos primários estão em leptóteno ou em transição (leptóteno/zigóteno), próximos à lâmina basal e espermatócitos primários em paquíteno na região intermediária do epitélio. O aspecto mais marcante foi o início do alongamento dos núcleos das espermatídes arredondadas (Figura 1-II), e no acrossoma observar-se ainda a presença de uma grande vesícula central e seu prolongamento ocupando uma área maior que 50% da superfície nuclear, características que definem o passo acrossomal 6 (Figura 2-f).

Estádio III

Dois gerações de espermatócitos primários estavam presentes neste estágio: espermatócitos em zigóteno e em diplóteno. Os núcleos das espermatídes continuaram a alongar-se com a formação de feixes (Figura 1-III). As espermatídes já encontram-se bem alongadas e com um grau mais avançado de condensação cromossômica. O acrossoma demonstra-se mais alongado que o passo anterior, ainda com a presença da vesícula acrossômica central e maior ocupação da superfície nuclear, caracterizando o passo acrossomal 7 (Figura 2-g).

Estádio IV

Caracteristicamente no estágio IV são observadas figuras de divisão meiótica, assinalando a transição de espermátocitos primários em diplóteno para espermátocitos secundários, e destes para espermátides arredondadas (Figura 1-IV). Assim como no estágio anterior, foram observados feixes de espermátides, agora ainda mais alongadas, com grande condensação cromossômica e cobertura quase completa da superfície nuclear pelo acrossoma. Observa-se ainda a vesícula acrossômica bem destacada na extremidade da espermátide, caracterizando o passo acrossomal 8 (Figura 2-h).

Estádio V

Neste estágio observa-se apenas uma geração de espermátocitos primários na transição de zigóteno para paquíteno, uma vez que a geração mais tardia de espermátocitos deu origem a uma nova geração de espermátides arredondadas. Estas espermátides arredondadas, recém formadas, apresentam as características do passo acrossomal 1, não apresentando acrossoma em suas superfícies, já que as vesículas pró-acrossômicas estão sendo formadas no citoplasma e ainda não fizeram contato com o núcleo da espermátide (Figura 2-a). A geração mais tardia das espermátides, presentes neste estágio, apresenta-se em feixes mais compactos, localizados profundamente no epitélio seminífero. Nestas células o acrossoma já recobre toda a superfície nuclear, sendo a vesícula acrossomal bem visível e destacada na extremidade da espermátide, caracterizando o passo acrossomal 9 (Figura 2-i).

Estádio VI

Neste estágio pode-se observar a presença de espermatogônias intermediárias com núcleo menor e mais escuro quando comparadas às espermatogônias A. A geração de espermátocito primário presente neste estágio ainda se apresenta em paquíteno, sendo observados feixes de espermátides mais superficiais no epitélio seminífero (Figura 1-VI). Uma vez que todas as gerações de células germinativas apresentam-se muito semelhantes ao estágio anterior, torna-se difícil a sua distinção. Porém, a espermátide arredondada já apresenta característica do passo acrossomal 2, com a presença de uma vesícula acrossômica bem desenvolvida e

em contato com a superfície do núcleo (Figura 2-b). Já as espermatídes alongadas da geração mais tardia estão no passo acrossomal 10, quando seus núcleos embora ainda em processo de alongamento e condensação, foram considerados em etapa completa, ou quase completa de formação, sem a observação da vesícula acrossomal de forma destacada (Figura 2-j).

Estádio VII

No estágio VII foram encontradas espermatogônias do tipo A e espermatogônias do tipo B, cujos núcleos apresentaram-se arredondados ou ovóides, espermatócitos primários em paquíteno e espermatídes arredondadas e alongadas (Figura 1-VII). A geração de espermatíde arredondada apresenta vesícula acrossomal e uma ocupação acrossômica de aproximadamente 30% na superfície nuclear, considerada passo acrossomal 3 (Figura 2-c) e a geração de espermatídes alongadas foram consideradas no passo acrossomal 10 (Figura 2-j).

Estádio VIII

Na região basal do epitélio seminífero foram observadas espermatogônias do tipo A e algumas células da nova geração de espermatócitos primários em fase pré-leptóteno, já podem ser observadas. Espermatócitos primários em paquíteno e espermatídes arredondadas estavam presentes na região intermediária do epitélio e o aspecto mais característico deste estágio foi a presença das espermatídes alongadas bem próximas ao lúmen tubular e prontas para espermiação, com flagelos bem evidentes, e a presença de corpos residuais bem corados na borda luminal do epitélio (Figura 1-VIII). As espermatídes arredondadas presentes no estágio VIII apresentavam ocupação pelo acrossoma na superfície nuclear entre 30 e 50%, caracterizando o passo acrossomal 4 (Figura 2-d), enquanto as espermatídes alongadas foram consideradas também no passo acrossomal 10 (Figura 2-j).

O método da morfologia tubular, independente da espécie analisada, é normatizado, ou seja, é sempre possível a caracterização dos 8 estádios distintos. Porém, a grande dificuldade utilizando-se esta metodologia consiste na descrição acurada dos estádios com a presença de duas gerações de espermatídes, (estádios V ao VIII), devido à semelhança na morfologia nuclear destas células entre estes

estádios. Neste sentido, o método do sistema acrossômico, por basear-se especificamente no desenvolvimento do acrossoma, fornece um fator diferencial para a identificação das espermatídes nestes estádios.

Os passos do desenvolvimento acrossômico nas espermatídes durante a espermiogênese podem ser agrupados em quatro fases distintas: a fase de Golgi, a fase de capuz, a fase do acrossoma e a fase de maturação (Morigaki et al., 2001). O desenvolvimento acrossomal inicia-se na fase de Golgi onde é observado o aparecimento dos primeiros grânulos proacrossômicos a partir do complexo de Golgi. Estes grânulos fundem-se, formando a vesícula acrossômica caracterizando assim a fase de capuz, que se estende até ocupar cerca de 50% da superfície nuclear, quando tem início a fase do acrossoma propriamente dita. Nesta fase, ocorre mudança no formato do núcleo da espermatíde, que passa a ser alongada. Uma vez que o acrossoma atinge toda a superfície nuclear inicia-se a fase de maturação, culminando na espermição (Russell et al., 1990a).

Por meio da descrição do desenvolvimento acrossômico em espermatídes de uma determinada espécie é possível a subdivisão didática bastante acurada do CES. Devido a isto é a metodologia ideal para estudos intraespecíficos (Morigaki et al., 2001; Parapanov et al., 2007), porém com notada dificuldade comparativa interespecífica. No presente trabalho foi definida a subdivisão de 10 passos acrossomais do ciclo do epitélio seminífero de quatis, porém esta classificação sugerida é diretamente em função do método da morfologia tubular, uma vez que o objetivo seria a combinação de ambas as metodologias. Em estudos descritivos do processo espermatogênico com o uso exclusivo do método do sistema acrossômico, um número bastante variado de passos acrossomais e estádios do CES são definidos em diferentes espécies, como por exemplo, 14 passos para o rato (Leblond & Clermont, 1952), 12 passos para o camundongo (Oakberg, 1956), 8 passos foram sugeridos para o cão (Ibach, et al., 1976), 16 passos para o microquiróptero *Rhinopoma kinneari* (Singwi & Lall, 1983) e 10 passos para o musaranho (*Neomys fodiens*) (Parapanov et al., 2008).

Alguns autores desenvolveram metodologias próprias com o intuito de tornar compatível a comparação do CES interespecificamente, como por exemplo, Beguelini et al. (2009) na tentativa de uniformizar a descrição do ciclo do epitélio seminífero em 6 espécies de morcegos da subordem microquiróptera (*Artibeus*

lituratus, *Artibeus planirostris*, *Carolia perspicillata*, *Platyrrhinus lineatus*, *Sturnira liliium* e *Myotis nigricans*). Estes autores desenvolveram uma metodologia descritiva paralela que, embora não seja especificamente baseada no método do sistema acrossômico ou no método da morfologia tubular, permitem a comparação interespecífica nestes microquirópteros. Embora bem intencionada, a proposição de novas metodologias descritivas terminam por acrescentar parâmetros, dificultando ainda mais a comparação em especial de animais já caracterizados pelos métodos convencionais. Neste sentido, a proposição do presente estudo, com descrição dos passos acrossomais em função dos diferentes estádios do método da morfologia tubular, apresenta ser uma alternativa de maior acurácia espécie específica, permitindo ainda a comparação interespecífica do processo espermatogênico.

4.2 Duração do ciclo

Assim como as outras espécies estudadas, o quati apresenta os diferentes estádios do CES agrupados em três fases tomando-se como ponto de referência a meiose. Estas três fases são denominadas: pré meiótica ou pré divisional, que possui uma geração de espermátides e inclui os estádios do ciclo compreendidos entre o final da espermiacção e antes das divisões meióticas; fase meiótica, que compreende o estágio IV, na qual ocorrem as duas divisões meióticas; e a fase pós meiótica ou pós divisional, que contém duas gerações de espermátides e vai desde a formação de novas espermátides arredondadas até a espermiacção das espermátides alongadas (Russell et al., 1990a). A frequência relativa de cada um dos estádios do ciclo do epitélio seminífero é um parâmetro importante na predição da duração do ciclo, uma vez que a frequência da ocorrência de cada estágio é diretamente relacionada com a sua duração. Assim, estádios mais frequentemente observados são também aqueles mais demorados. A maioria dos animais domésticos mostra maior frequência dos estádios da fase pré meiótica, em relação à fase de pós meiótica (França & Russell, 1998). A frequência relativa de cada estágio e das fases do ciclo do epitélio seminífero no quati está descrito na Figura 3. Observa-se nesta espécie que a fase pós meiótica é mais duradora que a fase pré meiótica, o que não ocorre com a maioria dos carnívoros estudados, onde a frequência da fase pré meiótica é equivalente ou ligeiramente superior à fase pós

meiótica (Kennelly, 1972; Guião Leite et al., 2006; Bittencourt et al., 2007; Balarini et al., 2011).

A duração do ciclo do epitélio seminífero e a frequência relativa de seus estádios são constantes biológicas espécie específicas, ambas controladas pelo genótipo da célula germinativa (França et al., 1998; Parapanov et al., 2008), e não são afetadas por qualquer fator conhecido (Clermont, 1972; Amann & Schanbacher, 1983). O BrdU utilizado é incorporado no núcleo das células germinativas que estão sintetizando DNA no momento da injeção, especificamente espermatogônias e espermatócitos primários em pré leptoteno/leptoteno no estágio I do CES. Assim, ao coletar os fragmentos testiculares em um período de tempo conhecido após a injeção de BrdU, e identificar as células marcadas mais avançadas no epitélio seminífero destes animais, é possível estimar o percentual do ciclo percorrido, bem como calcular a sua duração.

Os fragmentos de testículo do quati foram coletados cerca de 6 dias após a aplicação da injeção de bromodeoxiuridina. As células marcadas que se encontravam em estado mais avançado no epitélio seminífero foram espermatócitos primários em paquíteno, no estágio VI do ciclo do epitélio seminífero (Figura 04). Assim, no prazo de 6 dias, houve uma progressão de cerca de 73,93% (frequência média das etapas 1 a 6) no ciclo do epitélio seminífero e portanto, um ciclo corresponde a 8,13 dias, em média. Considerando-se que 4,5 ciclos do epitélio seminífero são necessários para que todo o processo espermatogênico seja concluído, a estimativa da duração total do processo espermatogênico em quatis foi de 36,58 dias.

Nas espécies mamíferas relatadas, a menor duração do CES (6,7 dias) ocorre no roedor *Clethrionomys glareolus* (Grocock & Clarke, 1976), enquanto que os mais longos ciclos foram registrados em gambá (17,3 dias) (*Didelphis albiventris*) (Queiroz & Nogueira, 1992) e no hamster chinês (17,0 dias) (*Cricetulus griseus*) (Oud & De Rooij, 1977). Na maioria dos animais já estudados, a duração do ciclo espermatogênico variou de 7 a 14 dias (França & Godinho, 2003; Bittencourt et al., 2006; Guião Leite et al., 2006; Parapanov et al., 2008; Balarini et al., 2011). Assim, a duração da espermatogênese no quati, encontra-se dentro da faixa observada para a maioria dos mamíferos já investigados.

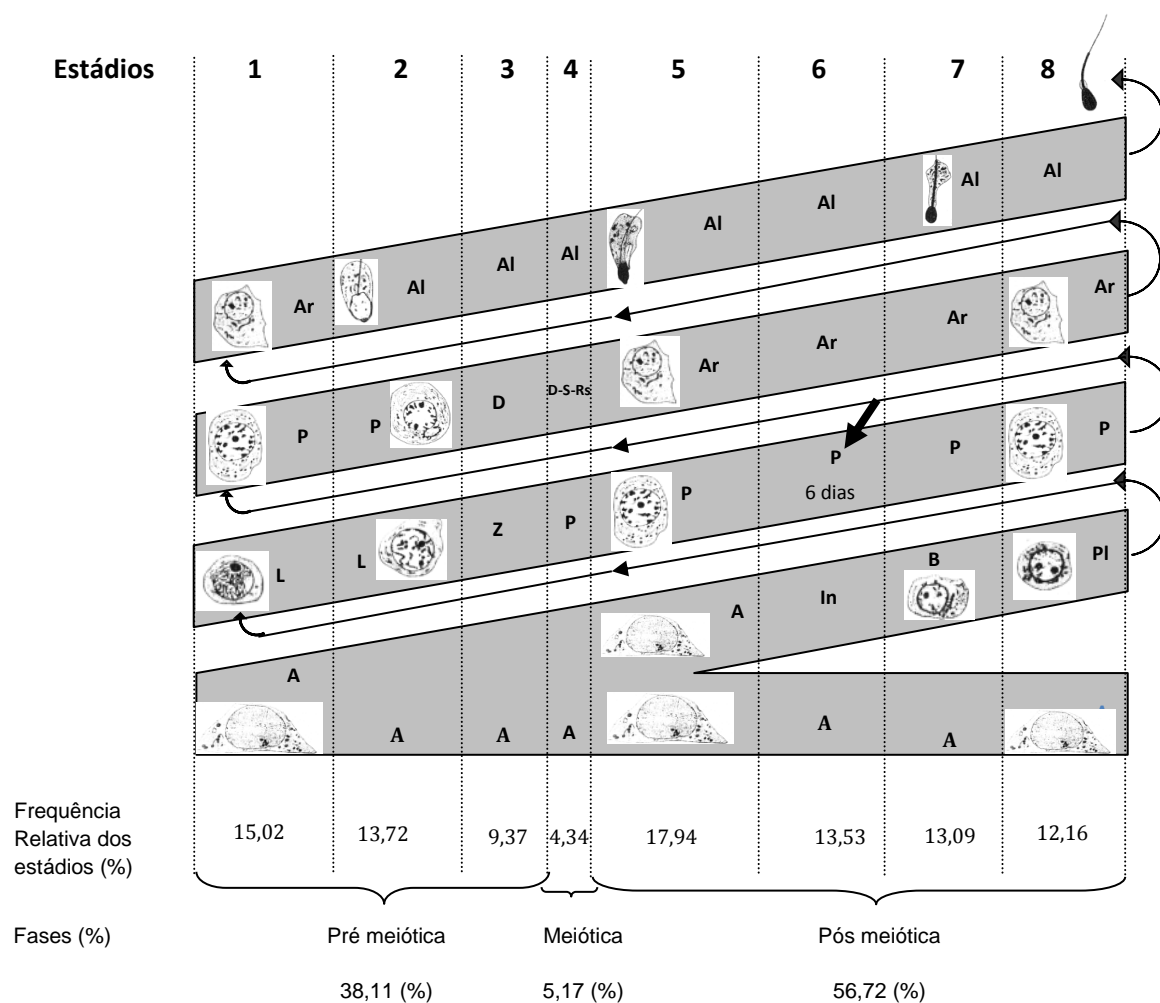


Fig. 03. Diagrama do processo espermatogênico, onde os números arábicos (colunas) indicam os 8 estádios do ciclo do epitélio seminífero. A célula germinativa marcada mais avançada (seta) nos oito estádios do ciclo, após seis dias da injeção com BrdU, foi o espermatócito primário em paquíteno no estágio VI. Espermatogônia do tipo A(A), espermatogônia do tipo Intermediária (In), espermatogônia do tipo B (B), espermatócito primário: em preleptóteno (PI), em leptóteno (L), em zigóteno (Z), em paquíteno (P), em diplóteno (D); placa metafásica das divisões meióticas diplóteno e espermatócito secundário (D-S-Ar), espermatócito secundário (S), espermatíde arredondada (Ar), espermatíde alongada (Al) espermatozóide (SPTZ).

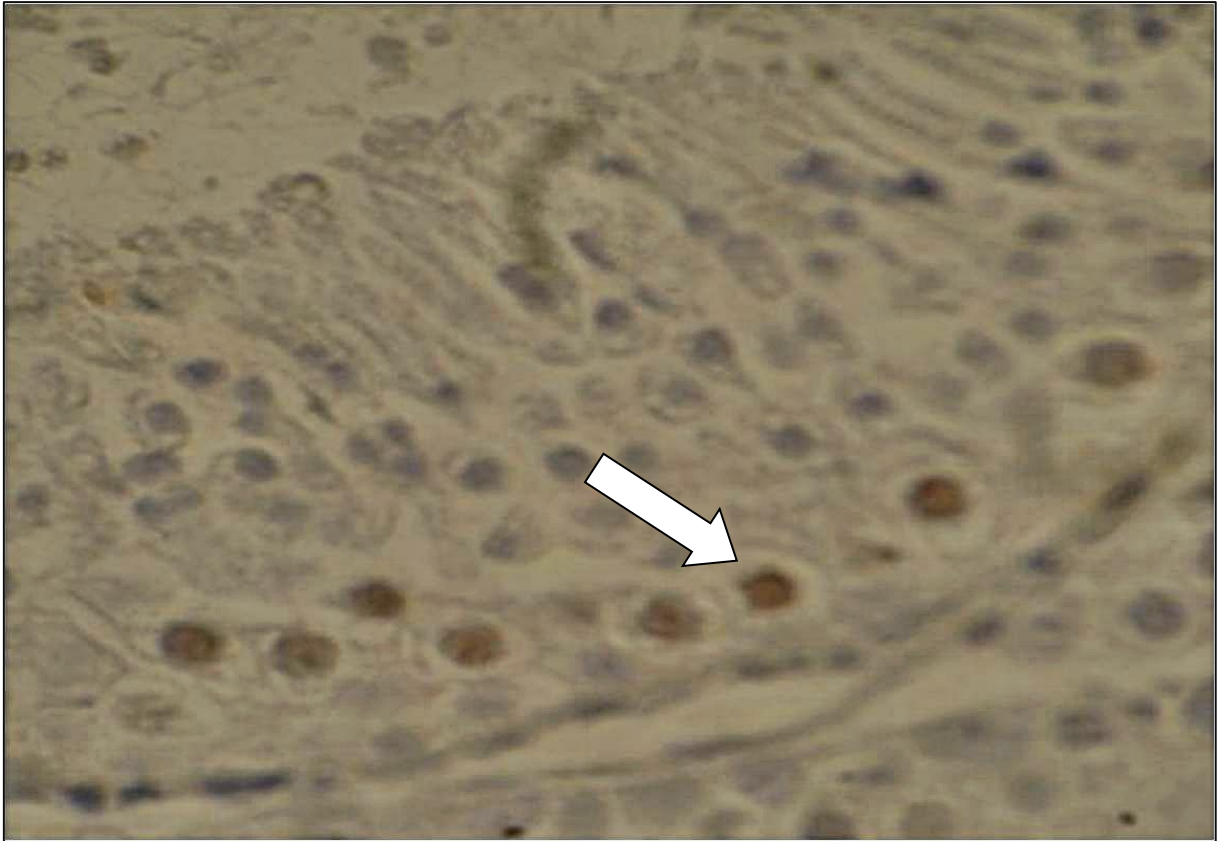


Figura 04- Fotomicrografia da lâmina histológica evidenciando a marcação da bromodeoxiuridina em núcleos de espermatócitos primários em paquíteno no estágio VI do ciclo do epitélio seminífero de quati. BrDU(40 x).

5 – CONCLUSÕES

- Em secções transversais dos túbulos seminíferos foi possível a descrição dos oito estádios do ciclo do epitélio seminífero de acordo com o método de morfologia tubular.
- Foram identificados 10 passos distintos no desenvolvimento do acrossoma das espermátides no epitélio seminífero de quatis.
- Um ciclo do epitélio seminífero de quatis dura cerca de 8,13 dias e o processo espermatogênico dura cerca de 36,58 dias.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amann, R.P., Schanbacher, B.D. 1983. Physiology of male reproduction. *Journal of Animal Science*. 57: 380-403.
- Asano, M., Matoba, Y., Ikeda, T., Suzuki, M., Asakawa, M., Ohtaishi, N. 2003. Reproductive characteristics of the feral raccoon (*Procyon lotor*) in Hokaido. *Journal of Veterinary Medical Science*. 65: 369–373.
- Azevedo, M.H.F., Paula, T.A.R., Matta, S.L.P., Fonseca, C.C., Neves, M.T.D. 2006. Morfometria testicular e o túbulo seminífero da onça-pintada (*Panthera onca*). *Ceres*. 53: 374-381.
- Balarini, M.K., Paula, T.A.R., Matta, S.L.P., Peixoto, J.V. Guião-Leite, F.L., Rossi Jr, J.L., Czermak Jr, A.C. Walker, N.J. Stages and duration of the cycle of the seminiferous epithelium in onçilla (*Leopardus tigrinus*, SCHREBER, 1775). 2001. *Theriogenology*. No prelo.
- Barros, J.B.G., Paula, T.A.R., Azevedo, M.H.F., Guião-Leite, F.L., Rossi Jr, J., Matta, S.L.P., Oliveira, P.C. 2004. Population of the seminiferous epithelium, intrinsic yield of spermatogenesis and Sertoli cells index in adult lions (*Panthera leo*) raised in captivity. 5th International Symposium on Canine and Feline Reproduction. Rio de Janeiro. p. 166-168.
- Beguelini, M.R., Moreira, P.R.L., Faria, K.C., Marchesin, S.R.C., Moriellevsute, E. 2009. Testicular morphology and the seminiferous epithelium cycle in six species of Neotropical bats. *Journal of Morphology*. 270: 943–953.
- Berndtson, W.E. 1977. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *Journal of Animal Science*. 44: 818-883.
- Bittencourt, V.L. 2003. *Avaliação morfofuncional do testículo e do processo espermatogênico do lobo guará (Chrysocyon brachyurus, Illiger, 1811), adulto.*

Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 57p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária).

Bittencourt, V.L., Paula T.A.R., Matta, S.L.P., Fonseca, C.C., Costa, D.S., Benjamim, L.A., Costa, E.P. 2007. The seminiferous epithelium cycle and daily spermatogenic production in the adult maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*, ILIGER, 1811). *Micron*. 38: 584-589.

Caldeira, B.C. 2007. *Análise morfofuncional do testículo e do processo espermatogênico do cachorro-do-mato (Cerdocyon thous, Linnaeus, 1766) adulto*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 48p. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária).

Clermont, Y. 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammals, seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiological Reviews*. 52: 198-236.

Cordeiro Jr, D. A. 2009. *Estrutura e função testiculares em roedores silvestres das famílias Echimyidae (Trinomys moojeni) e Cricetidae (Akodon cursor, Akodon montensis, Necromys lasiurus e Oligoryzomys migripes), da Reserva Particular do Patrimônio Natural do Caraça – MG*. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 109p . Tese (Doutorado em Biologia Celular) Instituto de Ciências Biológicas.

Costa, D. S., Paula, T. A. R. 2003. Espermatogênese em mamíferos. *Scientia*. 4: 53-72.

Emmons, L. H.; Feer, F. 1997. *Neotropical rainforest mammals: A field guide*. Chicago: The University of Chicago Press. p. 307.

Fagerholm, P., Hamberg-Nyström, H., Tengroth, B. 1994. Wound healing and myopic regression following photorefractive keratectomy. *Acta Ophthalmology* 72:229-34.

- Filho, E.S. 2004. *Bioteχνologias de Reprodução na Conservação de Espécies Animais Selvagens: São realmente importantes?* São Paulo: PUC, 94p. Monografia (Título de Especialista em Manejo de Animais Silvestres). Pontifícia Universidade Católica.
- Franciulli, A.L.R., Costa, G.M., Mançaneres, C.A.F., Martins, D.S., Ambrósio, C.E., Miglino, M.A., Carvalho, A.F. 2007. Morfologia dos órgãos genitais masculinos de quati (*Nasua nasua*, Linnaeus 1766). *Biotemas*. 20: 27-36.
- França, L.R., Ogawa, T., Avarbock, M.R., Brinster, R.L., Russell, L.D. 1998. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biology of Reproduction*. 59: 1371-1377.
- França, L.R., Russell, L.D. 1998. The testis of domestic animals. In: Regadera, J., Martinez-Garcia, F. (Eds.). *Male Reproduction – A multidisciplinary Overview*. Madrid: Churchill Livingstone. p. 197-219.
- Gauthier, C.A., Epstein, D., Holden, B.A., Tengroth, B., Fagerholm, P., Hamberg-Nyström, H., Sievert, R. 1995. Epithelial alterations following photorefractive keratectomy for myopia. *Journal of Refractive Surgery*. 11: 113-8.
- Godinho, C.L. 1999. *Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (Felis domestica) sexualmente maduros*. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 123p. Tese (Mestrado em Morfologia). Instituto de Ciências Biológicas.
- Grocock, C.A.; Clarke, J.R. 1976. Duration of spermatogenesis in the vole (*Microtus agrestis*) and bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Journal of Reproduction and Fertility*. 47: 133-135.
- Guião-Leite, F.L. 2002. *Análise morfológica do testículo e do processo espermatogênico da onça parda (Puma concolor) adulta*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 64p. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária).

- Guião Leite, F.L., Paula, T.A.R. 2003. Rendimento instrínseco da espermatogênese, o índice de células de Sertoli e a reprodução espermática diária da onça-parda (*Puma concolor*). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 27: 21-26.
- Ibach, B., Weissbach, L., Hilscher, B. 1976. Stages of the cycle of the seminiferous in the dog. *Andrologia*. 8: 297-307.
- Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cellular Biology*. 27: 137-138,
- Kennelly, J.J., 1972. Coyote reproduction. I. The duration of the spermatogenic cycle and epididymal sperm transport. *Journal of Reproduction and Fertility*. 31: 163-170.
- Leal, M. C., Franca, L. R. 2006. The seminiferous epithelium cycle length in the black tufted-ear marmoset (*Callithrix penicillata*) is similar to humans. *Biology of Reproduction*. 74: 616-624.
- Leblond, C.P., Clermont, Y. 1952. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *New York Academy of Sciences*. 55: 548-584.
- Lin, M., Jones, R.C. 1990. Spatial arrangement of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the Japanese quail. *Coturnix coturnix japonica*. *Journal of Reproduction and Fertility*. 90: 361-367.
- MMA – Ministério do Meio Ambiente. Lista das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçados de Extinção. Instrução Normativa nº 3, de 27 de maio de 2003. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/179/arquivos/vol_ii_mamiferos.pdf> Acessado em 28 de novembro de 2010.

- Morigaki, T., Kurohmaru, M., Kanai, Y., Mukohyama, M., Hondo, E., Yamada, J., Agungpriyono, S., Hayashi, Y. 2001. Cycle of the seminiferous epithelium in the Java Fruit Bat (*Pteropus vampyrus*) and the Japanese Lesser Horseshoe Bat (*Rhinolophus cornutus*). *Journal of Veterinary Medical Science*. 63: 773-779.
- Muñoz, E., Fogal, T., Dominguez, S., Scardapane, L., Guzmán, J.A., Piezzi, R.S. 1997. Seasonal changes of the Leydig cells of viscacha (*Lagostomus maximus maximus*): a light and electron microscopy study. *Tissue Cell*. 29: 119–128.
- Nowakowski, R.S., Lewin, S.B., Miller, M.W. 1989. Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *Journal of Neurocytology*. 18:311-3118.
- Oakberg, E.F. 1956. Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *American Journal of Anatomy*. 99: 597-516.
- Oud, J.L., De Rooij, D. G. 1977. Spermatogenesis in Chinese hamster. *Anatomical Record*. 187: 113-124.
- Paula, T.A.R. 1992. *Estudo histológico quantitativo da atividade espermatogênica de cães s.r.d. em diferentes faixas etárias após a puberdade*. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 62p. Tese (Mestrado em Morfologia). Instituto de Ciências Biológicas.
- Parapanov, R., Nussle, S., Vogel, P. 2007. Cycle length of spermatogenesis in shrews (Mammalia: Soricidae) with high and low metabolic rates and different mating systems. *Biology of Reproduction*. 76: 833-840.
- Parapanov, R., Nussle, S., Hausser, J., Vogel, P. 2008. Histological description of seminiferous epithelium and cycle length of spermatogenesis in the water shrew

Neomys fodiens (Mammalia: Soricidae). *Animal Reproduction Science*. 107: 148–160.

Peixoto, J.V. 2010. *Criopreservação de sêmen e avaliação histológica e funcional do testículo de periquitos australianos (Melopsittacus undulatus Shaw, 1805)*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 78p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária).

Queiroz, G.F., Nogueira, J.C.1992. Duration of the cycle of the epithelium and quantitative histology of the testis of the south american white belly opossum (*Didelphis albiventris*), Marsupialia. *Journal of Reproduction and Fertility*. 4:213-222.

Russell, L.D., Peterson, R.N. 1984. Determination of the elongate spermatid-Sertoli cell ratio in various mammals. *Journal of Reproduction and Fertility*. 70: 635-641.

Russell, L.D., Ettlin, R.A., Sinha-Hikim, A.P., Clegg, E.D. 1990a. *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Cache River Press, Clearwater, Florida. 286 p.

Russell, L.D., Ren, H.P., Sinha-Hikin, I., Schulze, W., Sinha-Hikin, A.P. 1990b. A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell. *American Journal of Anatomy*. 188: 21-30.

Russell, J. K. 1996. Timing of reproduction by coatis (*Nasua narica*) in relation to fluctuations in food resources. In: Leigh Jr., E. G.; Rand, A. S.; Windsor, D. M. (Eds.). *The ecology of a tropical forest*. Washington: Smithsonian Institution Press. pp.413-431.

Sarti, P. 2006. *Avaliação Morfométrica do Testículo e da Espermatogênese de Jaguatiricas (Leopardus pardalis, Linnaeus, 1758) Adultas*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 66p. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária).

- Sharpe, R.M. 1994. Regulation of spermatogenesis. In. Knobil, E.; Neil, J.D. (Eds) *The physiology of reproduction*. Raven Press. N.Y. p. 1363-1434.
- Silva, A.R., Morato, R.G., Silva, L.D.M. 2004. The potential for gamete recovery from non-domestic canids and felids. *Animal Reproduction Science*. 81: 159–175.
- Silva, R.C., Costa, G.M.J., Andrade, L.M., França, L.R. 2009. Testis stereology, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in the ocelot (*Leopardus pardalis*). *Theriogenology* 73: 157–167.
- Singwi, M.S., Lall, S.B. 1983. Spermatogenesis in the non-scrotal bat – *Rhinopoma kinneari* Wroughton (Microchiroptera: Mammalia). *Acta Anatomica*. 116: 136-145.
- Zeller, U. 1999. Mammalian reproduction: origin and evolutionary transformations. *Zoologischer Anzeiger*. 238: 117-130.