

MAYTÊ KOCH BALARINI

**AVALIAÇÃO MORFOFUNCIONAL DO TESTÍCULO E DO PROCESSO  
ESPERMATOGÊNICO DOS ROEDORES SILVESTRES *Akodon cursor* E  
*Oligoryzomys nigripes* (RODENTIA: Cricetidae)**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2013

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

T

B171a  
2013

Balarini, Maytê Koch, 1982-

Avaliação morfofuncional do testículo e do processo  
espermatogênico dos roedores silvestres *Akodon cursor* e  
*Oligoryzomys nigripes* (RODENTIA : Cricetidae) / Maytê Koch  
Balarini. – Viçosa, MG, 2013.  
xi, 81 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

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

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

CDD 22. ed. 599.35

MAYTÊ KOCH BALARINI

**AVALIAÇÃO MORFOFUNCIONAL DO TESTÍCULO E DO PROCESSO  
ESPERMATOGÊNICO DOS ROEDORES SILVESTRES *Akodon cursor* E  
*Oligoryzomys nigripes* (RODENTIA: Cricetidae)**

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

APROVADA: 29 de maio de 2013.

---

João Bosco Gonçalves de Barros

---

Juliano Vogas Peixoto

---

Juliana Silva Rocha

---

Marcos de Lucca Moreira Gomes

---

Sérgio Luis Pinto da Matta  
(Orientador)

Dedico este trabalho às pessoas que sempre estiveram ao meu lado: Meus pais, meu esposo meu irmão e sobrinhos.

## **Agradecimentos**

Às pessoas mais importantes em minha vida agradeço: ao meu esposo Thiago, minha mãe Marlene e ao meu pai Adalto. É muito bom contar com vocês e tê-los por perto!

Ao meu irmão Thomaz, pelo apoio, e aos meus sobrinhos Caio e Davi pelo carinho.

À minha família e amigos de muitos anos.

A pessoas queridas que farão parte de minha vida para sempre: Annabella Freitas Alvim Andrade, seus filhos, noras e netos. Vocês foram minha família em Viçosa, tornando tudo mais aconchegante. Serei eternamente grata a vocês!

A Juliano Vogas, Danielle Morais, Ana Carolina Torre e Michele Santos. Amigos especiais que mesmo não estando mais tão perto, estão dentro do meu coração. A amizade continua!

Ao meu orientador Sérgio da Matta, agradeço por ter me acolhido e por tudo que me ensinou desde o mestrado. Agradeço também pelas conversas descontraídas e divertidas, pelo cafezinho sempre ótimo, pelas opiniões valiosas, importantes e bem vindas, e principalmente agradeço por sua paciência infinita... Teve ótimo Da Matta!

Aos queridos colegas de agora e de outras épocas: Ana Paula Matta, Antônio Carlos, Pamella Kelly e Bruno Edésio: obrigada pela amizade e pela convivência sempre boa.

À Tatiana e ao Fausto pela valiosa ajuda nas coletas e no manejo dos animais.

Aos colegas e amigos que fiz ao longo do percurso: Michele Castellano, Claudinha, Fernandinho, Arlete, Rômulo, Alex, Grazi, Mário, Kyvia, Suelen, Marli, Diane, Bruna Moraes, Bruna Thomazini, Reggiani, Glenda, Helen, Camilla, Suzana, Kenner, Edson, Daiane, Ítalo, Mateus, e a quem mais eu passa ter esquecido... Obrigada pelos bons momentos que compartilhamos ao longo desses anos.

A minha coorientadora: Mariana M. Neves pela disponibilidade em me ajudar sempre.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Geral, especialmente ao Alex, a Beth, Diana, Maristela e ao Mateus. Obrigada pela ajuda indispensável.

As professores do curso, em especial aqueles com quem tive maior convivência: Sérgio, Adilson, Clóvis, Izabel, Juliana, Lino, Mariana, Cláudio e Jorge. Vocês além de ótimos professores foram sempre muito simpáticos, disponíveis, prestativos e com ceteza acrescentaram muito para minha formação.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Geral onde tive uma ótima vivência.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos, que foi fundamental.

À FAPEMIG por financiar parte desta pesquisa, e pelo apoio para participação em diversos eventos científicos.

A ONG Ambiente Brasil principalmente ao Luiz Fontes que apoiou este projeto desde o início.

Agradeço a todos que contribuíram para que eu vivesse dias felizes e inesquecíveis na acolhedora cidade de Viçosa, aos fins de tarde muito divertidos no Moreira's com minhas queridas amigas "Doras e CarUrina", e a outros incríveis momentos que vivi e que guardarei para sempre em um lugar muito especial em meu coração.

Acredito que só alcançamos uma conquista, realizamos um sonho, chegamos ao final de um projeto ou a qualquer lugar, se Deus assim nos permitir. Agradeço a Deus por ter me concedido esta graça, por ter providenciado pessoas tão especiais para estarem ao meu lado, por me dar forças para seguir em frente e por estar sempre comigo.

Foi uma longa caminhada que chegou ao fim...

## **Biografia**

Maytê Koch Balarini, filha de Adalto de La Fuente Balarini e Marlene Koch de La Fuente Balarini, nasceu na cidade de Teófilo Otoni, Minas Gerais, em 28 de Setembro de 1982. Graduou-se em Ciências Biológicas em março de 2006, pelo Centro Universitário do Leste de Minas Gerais (UnilesteMG), Ipatinga-MG, onde também pós graduou-se em Saúde Pública e Meio Ambiente.

Em Outubro de 2006 ingressou no curso de Mestrado em Morfologia no Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, onde desenvolveu trabalhos na área de Morfofisiologia da reprodução de felinos silvestres, defendendo sua dissertação em Setembro de 2008.

Em Março de 2009 ingressou no curso de Doutorado em Biologia Celular e Estrutural da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, pleiteando defesa de tese em Maio de 2013.

## Sumário

Resumo.....	viii
Abstract .....	x
1. Introdução geral .....	1
2. Roedores Silvestres <i>Oligoryzomys nigripes</i> e <i>Akodon cursor</i> – Ordem RODENTIA, Família Cricetidae, Subfamília Sigmodontine .....	2
2.1. <i>Oligoryzomys nigripes</i> .....	2
2.2. <i>Akodon cursor</i> .....	4
3. Área de estudo.....	5
4. Função testicular .....	6
4.1. Os testículos .....	6
4.2. Compartimento tubular e a espermatogênese .....	7
4.3. Compartimento intertubular .....	10
5. Justificativas e Objetivos.....	11
Referências Bibliográficas .....	12
Artigo 1: Eficiência espermatogênica do roedor silvestre <i>Oligoryzomys nigripes</i> (RODENTIA: Cricetidae) .....	19
Paper 1: Spermatogenic efficiency of wild rodent <i>Oligoryzomys nigripes</i> (RODENTIA: Cricetidae).....	20
1. Introdução .....	21
2. Material e Métodos .....	22
3. Resultados .....	25
4. Discussão .....	32
5. Conclusões .....	37
Referências Bibliográficas .....	37
Artigo 2: Eficiência espermatogênica do roedor silvestre <i>Akodon cursor</i> (RODENTIA: Cricetidae) .....	44
Paper 2: Spermatogenic efficiency of wild rodent <i>Akodon cursor</i> (RODENTIA: Cricetidae).....	45
1. Introdução .....	45
2. Material e Métodos .....	47
3. Resultados e Discussão.....	49

4. Conclusão .....	60
Referências Bibliográficas .....	60
Artigo 3: Histometria do tecido intertubular dos roedores silvestres <i>Akodon cursor</i> e <i>Oligoryzomys nigripes</i> (RODENTIA: Cricetidae) .....	66
Paper 3: Histomorphometry of intertubular tissue components of wild rodents <i>Akodon cursor</i> and <i>Oligoryzomys nigripes</i> (RODENTIA: Cricetidae) .....	67
1. Introdução .....	68
2. Material e Métodos .....	69
3. Resultados .....	71
4. Discussão .....	74
5. Conclusão .....	77
Referências Bibliográficas .....	77
Conclusões Gerais .....	80

## Resumo

BALARINI, Maytê Koch, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2013. **Avaliação morfofuncional do testículo e do processo espermatogênico dos roedores silvestres *Akodon cursor* e *Oligoryzomys nigripes* (RODENTIA: Cricetidae).** Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta. Coorientadores: Tarcizio Antônio Rêgo de Paula e Mariana Machado Neves.

Os roedores formam o grupo com maior diversidade de espécies na Classe Mammalia, abrigando indivíduos de poucas gramas como o camundongo, até espécies de 90 quilos como a capivara. Apesar de sua diversidade e do elevado número de representantes, poucos se sabe sobre a biologia reprodutiva da maioria dos animais deste grupo, o que dificulta a aplicação de medidas de conservação e manejo das mesmas. Por sua diversidade e pela facilidade de serem amostrados sistematicamente, os roedores silvestres tornaram-se modelos muito úteis para investigações. Assim, objetivou-se realizar estudos do processo espermatogênico de *Oligoryzomys nigripes* e *Akodon cursor*, ambos endêmicos da Mata Atlântica, visando obter dados básicos sobre a reprodução de roedores silvestres. Fragmentos testiculares foram processados para análise morfológica, imunohistoquímica e ultraestrutural. O índice gonadossomático encontrado para *O. nigripes* e *A. cursor* foi, respectivamente, de 0,68% e 0,74% enquanto o índice tubulossomático foi de 0,58% e 0,66%. Cada grama de testículo de *O. nigripes* e de *A. cursor* apresentou cerca de 23 e 27 metros, respectivamente. Em ambas as espécies, o ciclo do epitélio seminífero foi caracterizado em oito estádios de acordo com o método da morfologia tubular, e a duração de um ciclo foi de 3,93 dias em *O. nigripes* e 4,26 dias em *A. cursor* sendo necessários 17,68 e 19,15 dias para a formação de espermatozoides a partir de espermatogônias, respectivamente. A produção espermática diária por grama de testículo foi  $148 \times 10^6$  células em *O. nigripes* e  $142 \times 10^6$  células em *A. cursor*. Em *O. nigripes* e *A. cursor*, o padrão de organização dos elementos constituintes do intertúbulo apresentou células de Leydig isoladas ou agrupadas, geralmente associadas ao tecido conjuntivo e vasos sanguíneos e separadas dos túbulos seminíferos por um espaço linfático. Embora seja o elemento mais abundante do intertúbulo nestas espécies, o volume individual das células de Leydig foi considerado baixo, sendo de  $804,60 \mu\text{m}^3$  em *O. nigripes* e  $858,7 \mu\text{m}^3$  em *A. cursor*. O número destas células por grama de testículo foi, respectivamente,  $25 \times 10^6$  e  $38 \times 10^6$  células. O índice Leydigossomático (ILG), foi de 0,026% em *O. nigripes* e 0,044% em *A. cursor*. Pode-se concluir que as espécies aqui estudadas apresentaram baixo percentual de tecido intertubular e elevado percentual volumétrico de túbulo seminífero

no parênquima testicular, o que juntamente com a curta duração do ciclo do epitélio seminífero, as coloca entre as espécies com produção espermática diária recorde entre os mamíferos. Tais características podem ter estreita relação com o sistema de acasalamento destas espécies, indicando atividade poliândrica ou promiscua.

## Abstract

BALARINI, Maytê Koch, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2013. **Morphofunctional evaluation of the testis and spermatogenesis of wild rodents *Akodon cursor* and *Oligoryzomys nigripes* (RODENTIA: Cricetidae).** Adviser: Sérgio Luis Pinto da Matta. Co-advisers: Tarcizio Antônio Rêgo de Paula and Mariana Machado Neves.

Rodents constitute the largest group of species diversity in the class Mammalia, individuals harboring a few grams such as the mouse, by species 90 kg as the capybara. Despite their diversity and high number of representatives, few is known about the reproductive biology of most animals of this group, which hinders the implementation of strategies for conservation and management of the same. For its diversity and the ease of being sampled systematically, wild rodents have become very useful models for research. Thus, the objective was to conduct studies of the spermatogenesis of *Oligoryzomys nigripes* and *Akodon cursor*, both endemic to the Atlantic Forest, in order to obtain basic data on the reproduction of wild rodents. Testicular fragments were processed for histological, immunohistochemical and ultrastructural. Gonadosomatic index found to *O. nigripes* and *A. cursor* was respectively 0.68% and 0.74%, while the index tubulossomatic was 0.58% and 0.66%. Each gram of testis of *O. nigripes* and *A. cursor* forward about 23 and 27 meters, respectively. In both species, the cycle of seminiferous epithelium were characterized in eight stages, according to the method of the tubular morphology and the cycle length was 3.93 days *O. nigripes* days and 4.26 *A. cursor* being required 17.68 and 19.15 days for the formation of spermatozoids from spermatogonia, respectively. The daily sperm production per gram of testis was  $148 \times 10^6$  cells in *O. nigripes* and  $142 \times 10^6$  células in *A. cursor*. In *O. nigripes* and *A. cursor*, the pattern of organization of elements of the intertúbulo presented Leydig cells isolated or grouped generally associated with connective tissue and blood vessels and the seminiferous tubules separated by a lymphatic space. Although it is the most abundant element in the intertúbulo these species, the volume of individual Leydig cells was considered low, being  $804.60 \mu\text{m}^3$  in *O. nigripes* and  $858.7 \mu\text{m}^3$  in *A. cursor*. The number of these cells per gram of testis were, respectively,  $25 \times 10^6$  e  $38 \times 10^6$  cells. The index leydigosomatic (ILG), was 0.026% in *O. nigripes* and 0.044% in *A. cursor*. It can be concluded that the species studied here showed a low percentage of intertubular tissue, and high volumetric percentage of seminiferous tubules in the testicular parenchyma, which together with the short duration of the seminiferous epithelium cycle, puts them among the species with daily sperm production record among

mammals. Such characteristics may be closely related to the mating system of these species, indicating activity polyandrous or promiscuous.

## 1. Introdução Geral

Os ecossistemas brasileiros estão atualmente passando por um acelerado processo de fragmentação, sendo que a maioria das espécies está representada por pequenos conjuntos de populações isoladas (Rambaldi, 2003). A rapidez da destruição, aliada à grande riqueza biológica, têm colocado as florestas tropicais no centro das atenções conservacionistas, uma vez que a fragmentação dos habitat tem sido reconhecida como uma das principais ameaças à biodiversidade global (Laurence e Bierregaard, 1997, Cox et al. 2003).

A ordem Rodentia agrega 40% dos representantes de mamíferos ainda existentes, sendo a maior ordem em número de espécies, com aproximadamente 29 famílias, 443 gêneros e 2021 espécies (Nowak, 1999; Lage e Schmidt, 2007). Particularmente no Brasil, foram registrados 71 gêneros e 235 espécies de roedores (Oliveira e Bonvicino, 2006), das quais pelo menos 79 são encontradas na Mata Atlântica, (Fonseca et al. 1996). A assembléia de pequenos mamíferos neotropicais desempenha diferentes e importantes funções na dinâmica das florestas contribuindo para regeneração e manutenção da diversidade genética das populações (Leite et al. 1994; Vieira, 1997; Carvalho et al. 1999; Cáceres e Monteiro-Filho, 2000; Cáceres, 2002). Como pertencem a níveis tróficos basais, tipicamente como presas, estes animais participam da estrutura do ecossistema refletindo em todos os níveis da cadeia alimentar, pois são tanto fonte de alimento para predadores de topo de cadeia, quanto consumidores e dispersores de sementes o que contribui para a regeneração florestal (Emmos, 1990). Sendo assim, a densidade populacional dessas espécies influencia diretamente a estrutura do bioma (Terborgh, 1988).

Além de sua importância numérica para manutenção do equilíbrio ambiental, o conjunto das informações sobre a ecologia das espécies e das comunidades de pequenos mamíferos indica que pequenos roedores e marsupiais exercem influência importante na dinâmica das florestas Neotropicais sendo bons indicadores, tanto de alterações locais do habitat como alterações da paisagem (Pizo, 1997; Sánchez-Cordero e Martinez-Gallardo, 1998; Vieira et al. 2003), uma vez que a influência na dinâmica da floresta se dá, principalmente, através da predação do banco de sementes e de plântulas além da dispersão de sementes e fungos micorrízicos (Pimentel e Tabarelli 2004). Como consequência, a complexidade da vegetação

parece estar relacionada positivamente ao número de espécies (Grelle 2003), o que indica a importância deste grupo dentro de um ecossistema.

Apesar de sua importância ecológica, conhecimentos básicos sobre a biologia e a fisiologia da reprodução em mamíferos são ainda muito limitados, em relação aos parâmetros reprodutivos mais elementares dos animais silvestres (Wildt, 2005). Sem considerar a importância em si do conhecimento comparativo e evolutivo da função reprodutiva, este aspecto torna-se ainda mais crítico pelo fato do conhecimento de parâmetros reprodutivos básicos serem muito importantes para a elaboração de políticas de conservação que previnam a extinção de espécies ou melhore o manejo das mesmas (Wildt, 2005).

## **2. Roedores silvestres *Oligoryzomys nigripes* e *Akodon cursor* - Ordem Rodentia, Família Cricetidae, Subfamília Sigmodontinae**

Os roedores formam o grupo com maior diversidade de espécies na Classe Mammalia, sendo a subfamília Sigmodontinae o clado mais diverso da família Cricetidae presente nos limites da América Neotropical (Musser e Carleton, 2005).

Além de serem importantes agentes ecológicos e frequentes itens na dieta de carnívoros e aves rapinantes (Scheibler e Christoff, 2004; Scheibler e Christoff, 2007), roedores de pequeno porte como *O. nigripes* e *A. cursor*, altamente sinantrópicos, são constantemente apontados como vetores de enfermidades por serem agentes reservatórios de hantavírus e se tornando táxons de relevante interesse médico (Larrieu et al. 2003; Suárez et al. 2003; Lemos et al. 2004).

### **2.1 *Oligoryzomys nigripes***

O gênero *Oligoryzomys* é o mais especioso dentre os *Oryzomyini* e possui ampla distribuição geográfica, incluindo a Mata Atlântica (Bonvicino et al. 2008). Seus representantes, são vulgarmente conhecidos como ratos-do-mato, são roedores de tamanho pequeno, comprimento da cauda maior que o do corpo, coloração do dorso variando de castanho-avermelhada a amarelada, com as laterais mais claras e ventre esbranquiçado ou amarelado. Os olhos são grandes, as patas longas e finas cobertas de pequenos pêlos claros, a cauda é fina e pouco pilosa e possuem quatro pares de mamas (Bonvicino et al. 2008). O *Oligoryzomys nigripes* ou ratinho-do-arroz (Figura.1) apresenta peso corporal médio de 20 gramas e possui dieta frugívora e granívora (Fonseca et al. 1996).



Figura 1. Representante da espécie *Oligoryzomys nigripes* em habitat natural. ([http:// www.ib.usp.br/ labecoaves/ Img/Fotos/](http://www.ib.usp.br/labecoaves/Img/Fotos/))

Apresentam hábitos terrestres com capacidade de escalar e ampla distribuição sendo encontrados desde o estado de Pernambuco até o norte do Rio Grande do Sul (Figura 2) (Weksler e Bonvicino, 2005). Entretanto, essa espécie tem sido associada a formações florestais secundárias e zonas de bordas entre florestas e áreas abertas (Eisenberg e Redford, 1999).

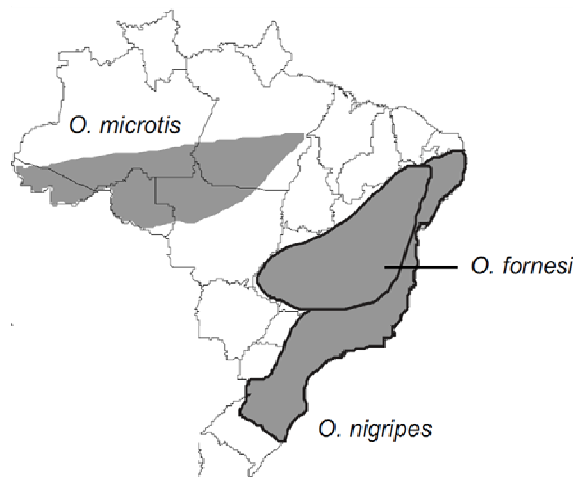


Figura 2. Área de ocorrência de espécies do Gênero *Oligoryzomys* no Brasil (Bonvicino et al. 2008).

A respeito de suas características reprodutivas, Graipel et al. (2006) relatam que em levantamentos populacionais em regiões de ocorrência desta espécie, houve maior incidência de fêmeas em período reprodutivo (que apresentavam vulva

dilatada, tampão vaginal ou prenhez) de maio a dezembro, enquanto Fonseca e Kierulff (1988) descrevem poliestria pan-estacional para *O. nigripes* ainda que, segundo os mesmos autores, possa haver aumento da frequência da reprodução em alguns períodos (principalmente no inverno). A gestação dura em média 21 dias, e o número médio de filhotes é de 5 filhotes por ninhada (Fonseca e Kierulff, 1988).

## 2.2 *Akodon cursor*

Segundo Bonvicino et al. (2008), os representantes do gênero *Akodon* apresentam comprimento da cauda pouco menor do que o do corpo, coloração dorsal variando do castanho-claro ao castanho-escuro sem limite definido com a coloração do ventre, orelhas grandes e pouco pilosas. Possuem quatro pares de mamas: peitoral, pós-axial, abdominal e inguinal.

Pelo menos 10 espécies pertencentes a este gênero são de ocorrência natural no Brasil, das quais *A. cursor* (Figura 3), *A. lindberghi*, *A. montensis* e *A. mystax* já foram relatadas em Minas Gerais (Bonvicino et al. 2008).



Figura 3. Representante da espécie *A. cursor* em habitat natural. ([http:// mikamienvironmentalblog. blogspot.com. br/2012/06/biodiversity-biodiversidade-105.html](http://mikamienvironmentalblog.blogspot.com.br/2012/06/biodiversity-biodiversidade-105.html))

O *A. cursor* é um roedor terrestre presente em formações florestais, áreas abertas adjacentes e campos de altitude ao longo de toda a Mata Atlântica (Figura 4) (Bonvicino et al. 2008). Essa espécie apresenta indivíduos em atividade reprodutiva contínua, independente da estação do ano ou do macrohabitat estudado, com intensificação entre os meses de agosto e março (Moojen, 1952). A duração da

gestação é de 21 dias, com ninhadas de 3 a 6 filhotes e período médio de amamentação de 28 dias (Fonseca e Kierulff, 1988).

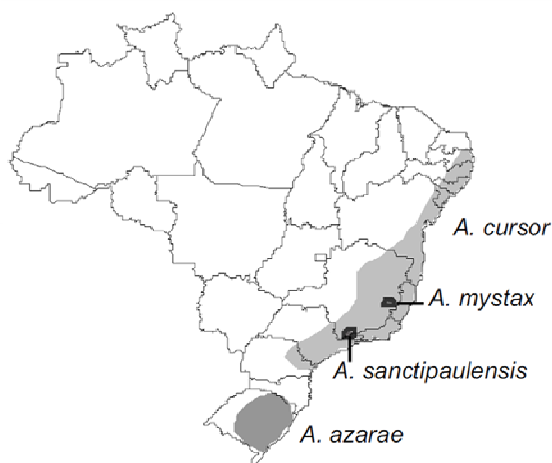


Figura 4. Gênero *Akodon* no Brasil (Bonvicino et al. 2008)

### 3. Área de estudo

A área utilizada para coleta dos animais apresenta cerca de 10 hectares de Mata Atlântica em regeneração ( $20^{\circ}81'S$ ,  $42^{\circ}85'W$ ) administrada pela ONG/OCIP Ambiente Brasil Centro de Estudos, conveniada com o Instituto Estadual de Florestas (IEF) e a Universidade Federal de Viçosa (UFV). Está localizada no Município de Viçosa (Figura 3) na Zona da Mata Mineira confrontante com a Mata do Paraíso, uma área de 120 hectares que constitui a maior reserva de Mata Atlântica de Viçosa.



Figura 5. Localização do Município de Viçosa - MG ( $20^{\circ}44'S$ ,  $42^{\circ}51'W$ ).

## **4. Função testicular e espermatogênese**

### **4.1 Os testículos**

A habilidade reprodutiva dos machos sexualmente maduros depende da capacidade dos testículos em produzir grande número de espermatozóides viáveis e também de concentrações adequadas de andrógenos para promover a libido e maturação dos órgãos reprodutivos (Gier e Marion, 1970). O testículo dos mamíferos é um órgão de formato oval a arredondado, geralmente localizado fora da cavidade abdominal, em uma prega cutânea denominada escroto (Kierszenbaum, 2008). O testículo está envolto pela albugínea testicular, uma cápsula constituída de tecido conjuntivo fibroso e, em algumas espécies, também por células contráteis. Esta túnica é contínua com trabéculas de tecido conjuntivo, os septos testiculares, que convergem para o interior do testículo no sentido do mediastino testicular (Setchell, 1991).

Funcionalmente o testículo dos mamíferos pode ser dividido em dois compartimentos: o tubular e o intertubular (Russell et al. 1990). O compartimento tubular é constituído pelos túbulos seminíferos e representa a maior parte do testículo ocupando, na maioria dos mamíferos, de 70 % a 90 % do parênquima testicular (França e Russell, 1998). Os túbulos seminíferos são constituídos por túnica própria, epitélio seminífero e lúmen tubular. A túnica própria envolve o túbulo externamente, sendo composta de células mioides, ou peritubulares, e membrana basal. O lúmen contém fluido testicular e, geralmente, espermatozoides (Russell, 1990). No epitélio seminífero são encontrados dois tipos celulares de origens embriológicas distintas: as células germinativas, originárias do epiblasto, e as células de Sertoli, provenientes do epitélio celomático (Karl e Capel, 1998).

No compartimento intertubular estão localizadas as células de Leydig, vasos sangüíneos e linfáticos, nervos, células e fibras do tecido conjuntivo, e uma população variável de outras células, principalmente macrófagos.

Os testículos apresentam tanto função endócrina quanto exócrina, ambas controladas pelos hormônios gonadotróficos hipofisários. O hormônio folículo estimulante (FSH) está diretamente relacionado com o início e manutenção da atividade gametogênica dos túbulos seminíferos. 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 responsável pelos caracteres sexuais secundários no macho adulto (Ashdown e Hancock, 1988).

Há correlação positiva entre o peso testicular e a produção espermática (Amann, 1970; Olar et al. 1983; França e Russell, 1998), porém, o tamanho testicular não acompanha proporcionalmente o tamanho corporal, ou seja, o investimento somático em massa gonadal é maior em animais de pequeno porte comparado àqueles de maior porte corporal (Kenagy e Trombulak, 1986). A quantidade de espermatozoides produzidos é sempre muito maior que o número necessário para a fecundação, e o fato de o tamanho do testículo não necessariamente acompanhar o tamanho corporal contribui para a economia energética uma vez que animais de grande porte produziram quantidades excessivamente grandes de espermatozoides (Paula, 1999).

A relação entre a massa dos testículos e a massa corporal é conhecida como índice gonadossomático (IGS). Este índice pode fornecer informações sobre a fisiologia reprodutiva e até mesmo sobre o sistema de acasalamento de uma espécie (Kenagy e Trombulak, 1986). O tamanho testicular está diretamente relacionado ao comportamento reprodutivo, uma vez que animais com comportamento monogâmicos e poligínicos apresentam menor índice gonadossomático em relação às espécies com comportamentos promíscuos ou poliândricos. No primeiro caso, o pequeno investimento testicular é reflexo da formação de casais ou haréns onde um único macho é responsável pela cópula. Nos animais promíscuos ou poliândricos, vários machos têm acesso à mesma fêmea, sendo os mais aptos à paternidade aqueles com produção espermática mais destacada e, conseqüentemente, maior tamanho testicular (Kenagy e Trombulak, 1986).

#### **4.2 Compartimento tubular a espermatogênese**

O túbulo seminífero apresenta grande variação na densidade volumétrica no testículo entre as diferentes espécies, porém este é o componente mais abundante do parênquima testicular em todas as espécies já estudadas (França e Russell, 1998). Parâmetros quantitativos diretamente relacionados com o túbulo seminífero, como diâmetro tubular, espessura do epitélio seminífero e comprimento total de túbulos seminíferos, apresentam relação positiva com a atividade espermatogênica, fornecendo informações que permitem a descrição da mesma em uma dada espécie (França e Russell, 1998; Paula, 1999).

A espermatogênese é um processo sincrônico e regular de divisão celular e diferenciação, pelo qual uma espermatogônia-tronco gradativamente origina uma célula haplóide altamente especializada, o espermatozoide (Johnson, 1991; França e

Russell, 1998). Esta origem complexa e organizada envolve três fases, baseando-se em considerações morfológicas e funcionais: (1) fase proliferativa (espermatogonial) na qual as células sofrem rápidas e sucessivas divisões mitóticas; (2) fase meiótica (espermatócitos), na qual o material genético é duplicado e passa por recombinação genética e por duas divisões celulares sequenciais e (3) fase de diferenciação ou espermiogênica, na qual as espermatídes sofrem intensas modificações, transformando-se em espermatozóides. A espermatogênese é um processo contínuo em que cada fase é caracterizada por mudanças morfológicas e bioquímicas dos componentes do citoplasma e do núcleo (Courot et al.1970).

O epitélio seminífero compõe-se de quatro camadas de células germinativas de gerações distintas. No ambiente basal do epitélio seminífero observam-se espermatogônias e espermatócitos primários iniciais; nas camadas intermediárias observam-se gerações de espermatócitos primários mais desenvolvidos e espermatócitos secundários; e na camada adluminal, encontram-se as espermatídes. Todas essas células estão organizadas numa série bem definida de associações celulares ou estádios. Estes estádios se sucedem numa determinada área do epitélio seminífero, com o decorrer do tempo. Esta seqüência, assim ordenada, constitui o processo denominado ciclo do epitélio seminífero (CES) (Leblond e Clermont, 1952; Swierstra, 1968; Berndtson, 1977; Ortavant et al. 1977; Russell et al.1990).

Entre os métodos utilizados para se estudar os estádios do CES, o mais empregado nos animais domésticos é aquele baseado na forma e na localização dos núcleos das espermatídes e na presença de figuras de divisões meióticas (Roosen-Runge e Giesel Jr. 1950; Courot et al. 1970; Ortavant et al. 1977; Guerra, 1983; França, 1991). Este método é designado como da morfologia tubular por Berndtson (1977). Entre quatro e cinco ciclos são necessários para que todo o processo espermatogênico se complete, ou seja, o processo espermatogênico total compreende o tempo decorrido entre a formação de uma geração de células germinativas na base do epitélio até a sua liberação no lume tubular como espermatozoides (Leblond e Clermont, 1952). Em mamíferos, o CES é considerado uma constante biológica, com variações apenas interespecíficas, estando sob controle do genótipo da célula germinativa, não sendo influenciado por qualquer fator conhecido (França e Russell 1998; Clermont, 1972; Amann e Schanbacher, 1983) em condições fisiológicas.

A sustentação e organização das células germinativas ao longo do epitélio seminífero são realizadas por uma célula somática denominada célula de Sertoli

(Russell et al. 1990). Esta desempenha papel fundamental na mediação da ação do FSH e da testosterona no processo espermatogênico, no suporte e nutrição das células germinativas em desenvolvimento, na compartimentalização do epitélio seminífero, na liberação de espermatozóides no lume tubular, na secreção de fluidos e na fagocitose de células germinativas em degeneração e do excesso de citoplasma das espermatídes em espermição (Russell e Griswold, 1993; França e Russell, 1998). As células de Sertoli têm sido utilizadas numericamente como ponto de referência para a quantificação e a correção de contagem de células germinativas (Clermont e Morgentaler, 1955; Bustos-Obregon, 1970; Shakkebak e Heller, 1973; França, 1991). Essas células constituem ainda, base para o estudo de alterações no processo espermatogênico, em decorrência de fatores patológicos e terapêuticos (Rowley e Heller, 1971; Russell e Clermont, 1977; Kumi-Diaka et al. 1983; Sinha-Hikim et al. 1991).

Para quantificação da espermatogênese é fundamental o conhecimento do ciclo do epitélio seminífero, a caracterização dos estádios que o compõe e a determinação da frequência destes estádios. O estudo quantitativo das células que compõem o epitélio seminífero é essencial para o entendimento do processo espermatogênico possibilitando valiosas correlações com achados fisiológicos e bioquímicos (Roosen-Runge e Giesel Jr. 1950; Wing e Christensen, 1982; Russell et al. 1990; França et al. 1994; França et al. 1995). Assim, além de permitir a determinação do rendimento intrínseco da espermatogênese (Berndtson e Desjardins, 1974; Cardoso e Godinho, 1985; França, 1991), a avaliação histológica quantitativa dos testículos torna possível a verificação de normalidade ou não da espermatogênese, a observação do tipo celular que está sofrendo degeneração, ou mesmo se ocorre degeneração (Amann, 1981; França, 1991; Russell et al. 1990; França et al. 1994).

Para o cálculo da duração do CES são utilizados marcadores celulares como a timidina triciada (Cardoso e Godinho 1982; França, 1991) ou a bromodeoxiuridina (BrdU) (Peixoto, 2010; Balarini et al. 2011; Morais et al. 2013) ambos injetados diretamente no parênquima testicular. O marcador é incorporado ao DNA de células em duplicação no momento da injeção, ou seja, os diferentes tipos de espermatogônias e os espermatócitos primários durante a prófase meiótica. Como os espermatócitos primários são as células mais avançadas no processo espermatogênico a incorporarem o marcador em seus núcleos, os mesmo são

utilizados como ponto de referência para a determinação do cálculo do ciclo do epitélio seminífero.

### **4.3 Compartimento intertubular**

O compartimento intertubular consiste de diferentes componentes localizados entre os túbulos seminíferos, dentre os quais se destacam tecido conjuntivo, nervos, vasos sanguíneos e linfáticos e as células de Leydig, principal componente deste compartimento (Hooker, 1970). As células de Leydig iniciam a secreção de testosterona ainda na vida fetal, para a diferenciação embriológica dos órgãos genitais masculinos. Porém, é durante a puberdade que as células intersticiais de Leydig tornam-se mais evidentes e funcionais (Russell, 1996).

A densidade populacional das células de Leydig pode variar entre indivíduos de espécies diferentes e mesmo entre indivíduos da mesma espécie. Dentre os inúmeros fatores que podem influenciar na sua população por animal, estão a quantidade de LH disponível, o número de receptores de LH por célula, a quantidade de testosterona que a célula de Leydig é capaz de secretar por uma unidade de tempo, a velocidade pela qual a testosterona deixa o testículo via vasos linfáticos, vasos sanguíneos e fluidos seminiais, o volume sanguíneo do animal e a taxa de metabolismo testosterona (Russell et al.1994; Russell, 1996).

Segundo Fawcett et al. (1973), a drenagem linfática, aliada à quantidade de células de Leydig e tecido conjuntivo frouxo no espaço intertubular, nas diferentes espécies de mamíferos segue, em geral, três padrões distintos: 1) espécies nas quais as células de Leydig e o tecido conjuntivo ocupam uma área muito pequena no compartimento intertubular, contrastando com extensos sinusoides ou espaços linfáticos interpostos aos túbulos seminíferos; 2) espécies que apresentam grupos de células de Leydig espalhados em abundante tecido conjuntivo frouxo edemaciado, o qual é drenado por um vaso linfático localizado central ou excentricamente no espaço intertubular; 3) espécies nas quais abundantes grupamentos de células de Leydig ocupam praticamente todo o compartimento intertubular, apresentando pouco tecido conjuntivo e vasos linfáticos. Apesar do pouco conhecimento a respeito das implicações fisiológicas destas variações, Fawcett et al. (1973) inferiram que as mesmas provavelmente estariam relacionadas com a habilidade dos vasos linfáticos de mover para fora dos testículos substâncias vascularmente secretadas, além de manter as concentrações adequadas de andrógenos no testículo e no sangue. Sabe-se que a concentração de testosterona,

principal produto da célula de Leydig, é de duas a três vezes maior no fluido intersticial do que nos vasos sanguíneos testiculares e de 40 a 250 vezes maior nestes em relação ao sangue periférico em diferentes espécies de mamíferos (Sharpe, 1994).

## **5. Justificativas e Objetivos**

Considerando-se a falta de informações básicas sobre a biologia reprodutiva da maioria das espécies de mamíferos silvestres, este estudo teve como objetivo descrever as características morfométricas e morfofisiológicas do testículo e do processo espermatogênico dos roedores silvestres *Oligoryzomys nigripes* e *Akodon cursor*, endêmicos da Mata Atlântica.

Estas informações, além de auxiliarem no controle populacional destas espécies altamente sinantrópicas, contribuem para o conhecimento da biologia reprodutiva dos mamíferos brasileiros, uma vez que o estudo da função testicular, especialmente dos aspectos relacionados à atividade espermatogênica, é essencial para o conhecimento do processo reprodutivo de qualquer espécie de vertebrado, seja ela de interesse econômico ou não (Amann e Schanbacher, 1983). Particularmente no caso de mamíferos silvestres, a enorme diversidade de espécies que ocorrem nos mais variados habitats, faz com que as mesmas utilizem estratégias reprodutivas bastante variadas (Weir e Rowlands, 1973). Assim, esses mamíferos pouco estudados são modelos experimentais muito atraentes em investigações que visem a melhor compreensão da biologia da reprodução.

### **Análises morfométricas:**

- Índice Gonadossomático (IGS);
- Proporção volumétrica e volume dos componentes do parênquima testicular;
- Diâmetro dos túbulos seminíferos e altura do epitélio seminífero;
- Comprimento dos túbulos seminíferos por testículo e por grama de testículo;
- Índice Tubulossomático (ITS);
- Caracterização dos estádios do ciclo do epitélio seminífero e suas frequências relativas;
- Estimativa da população celular do epitélio seminífero: Contagem de células do epitélio seminífero no estágio I;

- Rendimento intrínseco da espermatogênese:
  1. Coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais;
  2. Rendimento meiótico;
  3. Rendimento geral da espermatogênese;
  4. Índice de células de Sertoli;
  5. Número de células de Sertoli por testículo e por grama de testículo
- Reserva espermática testicular;
- Duração do ciclo do epitélio seminífero;
- Produção espermática diária;
- Proporção volumétrica e volume dos componentes intertubulares;
- Proporção nucleoplasmática de células de Leydig;
- Volume nuclear, citoplasmático e celular de Leydig;
- Volume total de células de Leydig por testículo;
- Índice Leydigossomático (ILS);
- Número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo.

### **Referência Bibliográfica**

Amann RP (1970) Sperm production rates. In: Johnson, AD, Gomes,WR, Vandemark, NL (Eds), The Testis. Academic Press, New York, pp. 433–482.

Amann RP (1981) A critical review of methods o evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. J Androl, v.2, p.37-58.

Amann RP, Schanbacher, BD (1983) Physiology of male reproduction. J Anim Sci Suppl. 57: 380-403.

Ashdown RR, Hancock JL (1988) Anatomia funcional da reprodução masculina, Reprodução Animal, 4ed. São Paulo, Manole, cap. 2, 7 - 31.

Balarini MK, Paula TAR, Matta SLP, Peixoto JV, Guião-Leite FL, Rossi Júnior JL, Czermak Jr AC, Walker NJ (2011) Stages and duration of the cycle of the seminiferous epithelium in oncilla (*Leopardus tigrinus*, Schreber, 1775). Theriogenology, 77-5,873-880.

Berndtson WE, Desjardins C (1974) The cycle of seminiferous epithelium and spermatogenesis in the bovine testis. A J Anato, V.140, p. 167-180.

Berndtson WE (1977) Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. J Anim Sci. 44, 818-883.

- Bonvicino CR, Oliveira JA, D'Andrea OS (2008) Guia dos roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos. Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa - OPAS/OMS 120 p.
- Brown KS, Brown GG (1992) Habitat alteration and species loss in Brazilian forests. In: Whitmore TC, Prance GT (editors). Tropical deforestation and species extinction. Clarendon Press, New York.
- Bustos-Obregon E (1970) On Sertoli cell number and distribution in rat testis. Arch Biol, v.81, p.99-180.
- Cáceres NC, Monteiro-Filho ELA (2000) The common opossum, *Didelphis aurita*, as a seed disperser of several plants in southern Brazil. Ciên Cult, 52: 41-44.
- Cáceres NC (2002) Food habits and seed dispersal by the White-eared opossum, *Didelphis albiventris*, in Southern Brazil. Stud Neotrop Faun Environ, 37: 97-104.
- Cardoso FM, Godinho HP (1982) Cycle of the epithelium and its duration in the zebu, *Bos indicus*. Anim Reprod Sci. 5, 231-245.
- Cardoso FM, Godinho HP (1985) Daily sperm production of zebus (*Bos indicus*) estimated by quantitative histology of the testis. Theriogenology. v.23, n.6, p.841-847.
- Carvalho FM, Pinheiro PS, Fernandez FAZ, Nessimian JL (1999) Diet of small mammals in Atlantic Forest fragments in southeastern Brazil. Rev Bras Zool, Juiz de Fora, 1: 91-101.
- Clermont Y, Morgentaler H (1955) Quantitative study of spermatogenesis in the hypophysectomized rat. Endocrinology, v.57, p.369-382.
- Clermont Y (1972) Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. Physiol Rev. 52, 198-236.
- Courot M, Hochereau-De-Reviers MT, Ortavant R (1970) Spermatogenesis. In: Johnson AD, Gomer WR, Vandemark NL (Eds.), The Testis. Academic Press, New York, pp. 399 -432.
- Cox MP, Dickman CR, Hunter J (2003) Effects of rainforest fragmentation on non-flying mammals of the Eastern Dorrigo Plateau, Australia. Biol Conserv, 115: 175-189.
- Eisenberg JF, Rerford KH (1999) Mammals of the Neotropics. The Central Neotropics, 3: Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil. University of Chicago Press, Chicago. 609 p.
- Emmons HE (1990) Neotropical rainforest mammals. The University of Chicago Press.

- Fawcett DW, Neaves WB, Flores MN (1973) Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biol Reprod*, 9: 500-532.
- Fonseca GAB, Herrmann G, Leite YLR, Mittermeier RA, Rylands AB, Patton JL (1996). Lista anotada dos mamíferos do Brasil. *Occas. Pap Conserv Biol*. 4:1-38.
- Fonseca GAB, Kierulff MCM (1988) Biology and natural history of Brazilian Atlantic Forest small mammals. *Bull Flo Mus Bio Sci*, 34 (3-4): 99-152.
- França LR (1991) Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. 185p. Tese (doutorado em ciências)- UFMG.
- França LR, Jackson A, Russell LD (1994) Hormone sensitivity of germ cells in stage XIV and in stage I of the rat spermatogenic cycle. *Tiss Cell*, v.26, n.3, p. 375-383.
- França LR, Ye S-J, Ying L, Sandberg M, Russell LD (1995) Morphometry of rat germs cells during spermatogenesis. *Anat Rec*, v.241, p. 181-204.
- França LR, Russell LD (1998) The testis of domestic animals. In: *Male Reproduction. A Multidisciplinary Overview*, 1st edn. (editors Martínez F, Regadera J), pp. 197–219, Madrid: Churchill Livingstone.
- Gier HT, Marion GB (1970) Development of mammalian testis. In: Johnson AD, Gomes WR, Van Der Mark NL (Editors) *The Testis*. Londres: Academic Press, pp. 2-45.
- Graipel ME, Cherem JJ, Monteiro-Filho ELA, Glock L (2006) Dinâmica populacional de marsupiais e roedores no Parque Municipal da Lagoa do Peri, Ilha de Santa Catarina, sul do Brasil. *Mastozool Neotrop*, vol. 13, nº1, 31-49.
- Grelle CEV (2003) Forest structure and vertical stratification of small mammals in a secondary Atlantic forest, southeastern Brazil. *Stud Neotrop Fauna Environ*, 38:81-85.
- Guerra MO (1983) Comparação entre dois métodos de determinação da frequência relativa dos estádios do ciclo do epitélio seminífero, em dados da literatura. *Rev Bras Biol*, v.43, n.4, p.385-394.
- Hooker CW (1970) The intertubular tissue of the testis. In: *The testis Development: Anatomy and Physiology* . Academic Press, Nova Iorque, (1):8 483 – 550.
- Johnson L (1991) Spermatogenesis. In: *Reproduction in domestic animals*. 4ªed . New York: Academic Press.p. 173 -219.

- Lage RR, Schmidt SEM (2006) Rodentia – Roedores Silvestres (Capivara, Cutia, Paca, Ouriço). In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL, editors. Tratado de animais selvagens–Medicina Veterinária Roca; pp. 475-491.
- Leblond CP, Clermont Y (1952). Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. Annual New York Academic Science, v.55, p.548-584.
- Karl J, Capel B (1998) Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. Dev Biol, 203 : 323–333.
- Kenagy GJ, Trombulak SC (1986) Size and function of mammalian testis in relation to body size. J Mammal. 67, 1-22.
- Kumi-Diaka J, Osori DIK, Njoku CO, Ogwli D (1983) Quantitative estimation of spermatogenesis in bulls (*Bos indicus*) in a tropical environment of Nigeria. Vet Res Commun, v.6, p.215-222.
- Laurence WF, Bierregaard, RO (1997) Tropical forest remnants. The University of Chicago Press, Chicago and London.
- Larrieu E, Herrero E, Cachau MG, Labanchi JL, Mancini S, Padula P, Cantoni G, Cavagion L, Alvarez E, Bruni M, Albarracin S, Arellano O (2003) Seroprevalencia de hantavirus em roedores y casos humanos en el sur de La Argentina. Rev Bras Epidem, 6:68-75.
- Lemos ERS, D’andrea PS, Bonvicino CR, Famadas KM, Padula P, Cavalcanti AA, Schatzmayr HG (2004) Evidence of hantavirus infection in wild rodents captured in a rural area of the state of Sao Paulo, Brazil. Pes Vet Bras, 24:71-73.
- Leite YLR, Stallings JR, Costa LP (1994) Partição de recursos entre espécies simpátricas de marsupiais na Reserva Biológica de Poço das Antas, Rio de Janeiro. Rev Bras Biol, 54: 525-536.
- Mittermeier RA, Coimbra-Filho AF, Constable ID, Rylands ABE, Valle CM (1982) Conservation of primates in the Atlantic Forests of Brazil. Int Zoo Yearbook. 22: 2-17.
- Moojen J (1952) Os Roedores do Brasil. Instituto Nacional do Livro, série A-II, Rio de Janeiro, 214p.
- Musser GG, Carleton MD (2005). Superfamily Muroidea. In: Wilson DE, Reeder DM. Mammal Species of the World: a Taxonomic and Geographic Reference. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, p. 1-2142.

- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403: 853- 858.
- Nowak RM (1999) Walker's mammals of the world. 6° ed. Vol 2. London: Johns Hopkins University Press, 1053-1062.
- Olar TT, Amann RP, Pickett BW (1983) Relationships among testicular size, daily production and output of spermatozoa and extragonadal spermatozoa reserves of the dog. *Biol Reprod*, v. 29, p. 1114-1120.
- Oliveira JA, Bonvicino CR (2006) Ordem Rodentia. In: Reis NR, Peracchi AL, Pedro WA, I.P. Lima, editors. *Mamíferos do Brasil*. Press UEL, Londrina, PR. p. 347-406.
- Ortavant R, Courot M, Hochereau-De-Reviere MT (1977) Spermatogenesis in domestic mammals. In: Cole HH, Cupps PT. *Reproduction in Domestic Animals*. Academic Press, New York, 203 -227.
- Paula TAR (1999) Avaliação Histológica e Funcional do Testículo de Capivaras Adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Belo Horizonte: UFMG, 84p. Tese (Doutorado em Morfologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.
- Peixoto JV (2010) Criopreservação de sêmen e avaliação histológica e funcional do testículo de periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus* SHAW, 1805). Tese de Doutorado. Departamento de Veterinária, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 78p.
- Pimentel DS, Tabarelli M (2004) Seed dispersal of the palm *Attalea oleifera* in a remnant of the Brazilian Atlantic Forest. *Biotrop* (36) 1: 74-84.
- Pizo MA (1997) Seed dispersal and predation in two populations of *Cabralea canjerana* (Meliaceae) in the Atlantic Forest of southeastern Brazil. *J Trop Ecol*, 13:559-578.
- Rambaldi DM In: Rambaldi DM, Oliveira DAS (2003) Fragmentação de ecossistemas - causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas. Brasília: MMA/SBF.
- Roosen-Runge EC, Giesel LO Jr (1950) Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. *Am J Anat* 87, 1-30.
- Rowley MJ, Heller CG (1971) Quantification of the cells of the human testis employing the Sertoli cells as a constant. *Zell Zellforsch*, v.115, p. 461-

- Russell LD, Clermont Y (1977) Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats. *Anat Rec*, v.187, p. 347-366.
- Russell LD, Ettlín RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED (1990) Mammalian spermatogenesis. In: Russell LD, Ettlín RA, Sinha Hikim A P, Clegg E D (Eds), *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. 1 Cache River Press, Clearwater, pp. 1-40.
- Russell LD, Griswold MD (1993) *The Sertoli Cell*. Cache River Press, Clearwater, 801p.
- Russell LD, Chandrashekar V, Bartke A, Sinha-Hikim AP (1994) The hamsters Sertoli cell in early testicular regression and early recrudescence: a stereological and endocrine study. *Int J Androl*, v. 17(2), p. 93-106.
- Russell LD (1996) Mammalian Leydig cell structure. In: Payne AH, Hardy MP, Russell LD (eds). *The Leydig cell*. Cache River Press. Vienna, IL., cap. 10, p. 218-222.
- Sánchez-Cordero V, Martínez-Gallardo R (1998) Postdispersal fruit and seed removal by forest-dwelling rodents in a lowland rainforest in México. *J Trop Ecol*, 14: 139-151.
- Scheibler DR, Christoff AU (2004) Small mammals in the diet of Barn Owls (*Tyto alba*) in a agroecosystems of southern Brazil. *Ornit Neo*, 15:65-70.
- Scheibler DR, e Christoff AU (2007) Habitat associations of small mammals in southern Brazil and use of regurgitated pellets of birds of prey for inventorying a local fauna. *Braz J Biol*, 67:619-625.
- Setchell BP (1991) Male reproductive organs and semen In: *Reproduction of domestic animals*. Academic Press, C PT (Ed), New York, 221-249.
- Sharpe RM (1994) Regulation of spermatogenesis. In: Knobil E, Neil JD (eds) *The physiology of reproduction*, 2ed. Raven Press, New York, p.1363-1434.
- Shakkebak NE, Heller CG (1973) Quantification of human seminiferous epithelium. *J Reproduc Fertil*, v. 32: 379-389.
- Sinha-Hikim AP, Sinha-Hikim IS, Amador AG, Bartke A, Woolf A, Russell LD (1991) Reinitiation of spermatogenesis by exogenous gonadotropins in a seasonal breeder, the woodchuck (*Marmota monax*), during gonadal inactivity. *Amer J Anat*, v. 192(2), p. 194-213.
- Suárez OV, Cueto GR, Cavia R, Villafane IEG, Bilenca DN, Edelstein A, Martínez P, Miguel P, Bellomo C, Hodara K, Padula PJ, Busch M (2003) Prevalence of

- infection with hantavirus in rodent populations of central Argentina. Mem Inst Osw C, 98:727-732.
- Swierstra EE (1968) Cytology and duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the boar; duration of spermatozoan transit through the epididymis. AnatRec, v.161, p.171-186.
- Terborgh J (1988) The big things that run the world - a sequel to E O Wilson. Conserv Biol, 2: 402-4038.
- Vieira RF, Silva AA, Ramos MM (2003) Aplicação de herbicidas em condições de pós-emergência via água de irrigação por aspersão- Revisão. Planta Daninha. Viçosa, 21: 495-506.
- Vieira MV (1997) Dynamics of a rodent assemblage in a Cerrado of southeast Brazil. Rev Brasil Biol, 57: 99-107.
- Weir BJ, Rowlands IW (1973) Reproductive strategies of mammals. Ann. Rev. Ecol. System, 4, 139-163.
- Weksler M, Bonvicino CR (2005) Taxonomy of pigmy rice rats genus *Oligoryzomys* Bangs, 1900 (Rodentia, Sigmodontinae) of the Brazilian Cerrado, with description of two new species. Arquivos do Museu Nacional 63(1): 113-130.
- Wildt DE (2005) Lions, Tigers, and Pandas, Oh My. J. Androl, 26(4):452-454, July/August.
- Wilson EO, Peter FM (1988) Biodiversity. National Academic Press, Washington, DC.521p.
- Wing TY, Christensen AK (1982) Morphometric studies on rat seminiferous tubules. Am J Anat. 165 : 13-25.

## Artigo 1

### Eficiência espermatogênica em roedor silvestre *Oligoryzomys nigripes* (Rodentia, Cricetidae)

#### Resumo

A insuficiência de estudos que forneçam conhecimentos básicos sobre grande parte das espécies de mamíferos brasileiros dificulta a aplicação de medidas de conservação e manejo das mesmas. Por sua diversidade e pela facilidade de serem amostrados sistematicamente, os roedores silvestres tornaram-se modelos muito úteis para tais investigações. Neste contexto realizou-se o estudo do processo espermatogênico de *Oligoryzomys nigripes*, endêmicos de Mata Atlântica, visando obter dados básicos sobre a reprodução de roedores silvestres. Fragmentos testiculares foram processados para análise morfológica e imunohistoquímica, bem como para análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão. O índice gonadossomático foi de 0,68%, e o índice tubulossomático de 0,58%. Em média, o diâmetro dos túbulos seminíferos foi de 205  $\mu\text{m}$ , altura do epitélio de 62  $\mu\text{m}$ , e cada grama de testículo apresentou 23,33 metros de túbulo seminífero. O ciclo do epitélio seminífero foi caracterizado em oito estádios de acordo com o método da morfologia tubular. A duração de um ciclo do epitélio seminífero foi 3,93 dias, e 17,68 dias foram necessários para a formação de espermatozoides a partir de espermatogônias. A reserva espermática testicular e a produção espermática diária por grama de testículo foram de  $584 \times 10^6$  e  $148 \times 10^6$  células, respectivamente. A espécie *O. nigripes* apresenta elevado investimento na reprodução devido ao alto percentual volumétrico de túbulo seminífero no parênquima testicular e curta duração do ciclo do epitélio seminífero refletindo em produção espermática diária recorde entre os mamíferos.

**Palavras-chave:** Espermatogênese, túbulo seminífero, imunohistoquímica, ciclos do epitélio seminífero.

## Paper 1

### Spermatogenic efficiency of wild rodent *Oligoryzomys nigripes* (Rodentia, Cricetidae)

#### Abstract

The lack of studies that provide basic knowledge about most species of Brazilian mammals difficult the application of actions on the conservation and management actions. For its diversity and by the ease of being sampled systematically, the wild rodents have become useful models for such investigations. In this context was held the study of spermatogenesis in *Oligoryzomys nigripes*, endemic to the Atlantic Forest in order to obtain basic data on the reproduction of wild rodents. Testicular fragments were processed for histological and immunohistochemical and ultrastructural analysis. The gonadosomatic and tubulesomatic indexes were, respectively, 0.68% and 0.58%. The diameter of seminiferous tubules was 205  $\mu\text{m}$ , the epithelial thickness of 62  $\mu\text{m}$ , and each gram of testis had 23.33 meters of seminiferous tubule. The cycle of seminiferous epithelium was characterized in eight stages, according to the method of the tubular morphology. The duration of a cycle of seminiferous epithelium was 3.93 days and 17.68 days were required for the formation of sperm as from spermatogonia. The testicular spermatid reserves and daily spermatid production per gram of testis were  $584 \times 10^6$  and  $148 \times 10^6$  cells, respectively. The species *O. nigripes* has a high investment in reproduction due to the high percentage of seminiferous tubule in testicular parenchyma and short duration of the cycle of the seminiferous epithelium reflected in daily sperm production record among mammals.

**Key words:** Spermatogenesis, seminiferous tubule, immunohistochemistry, cycle of epithelium seminiferous.

## 1. Introdução

Os roedores silvestres constituem um grupo muito rico em espécimes, com pelo menos 79 espécies encontradas na Mata Atlântica, das quais 39% são espécies endêmicas (Fonseca et al. 1996). Apesar do grande número de representantes da ordem Rodentia em nossa fauna, existem poucos dados na literatura sobre sua biologia reprodutiva (Duarte, 2003), e a insuficiência de estudos que forneçam conhecimento básico sobre grande parte das espécies de mamíferos brasileiros, dificulta a aplicação de medidas de conservação destas espécies (Fonseca et al. 1996).

A espermatogênese é um processo regular e sincrônico de diferenciação e divisão celular, pelo qual uma espermatogônia tronco gradualmente se transforma em células haplóides altamente especializadas, os espermatozóides (Johnson et al. 1981; França e Russell, 1998). Embora o tamanho testicular mostre relação direta com a produção de espermatozóides (Amann, 1970; França e Russell, 1998;), o rendimento intrínseco da espermatogênese e os índices de capacidade suporte das células de Sertoli são realmente os melhores indicadores da capacidade de produção de espermatozóides em uma determinada espécie (Berndtson, 1977; Russell e Peterson, 1984; França e Russell, 1998). O estudo quantitativo das células que constituem o epitélio seminífero também é essencial para a compreensão fisiológica, permitindo correlações valiosas com alterações morfológicas e bioquímicas (Roosen-Runge e Giesel, 1950; Wing e Christensen, 1982; Russell et al. 1990), permitindo a determinação dos índices de eficácia intrínseca da espermatogênese (Berndtson e Desjardins, 1974; Cardoso e Godinho, 1985).

Outro parâmetro de grande importância para o estudo da espermatogênese é a determinação da duração total do processo, que é considerado uma constante espécie específica (Clermont, 1972), controlado pelo genótipo das células germinativas (França et al, 1998). Este conhecimento permite o cálculo da produção espermática diária por testículo e por grama de testículo, que são parâmetros essenciais para a compreensão da produção de espermatozóides, e permitem correlações interespecíficas. A utilização de imunohistoquímica foi recentemente adaptada para o cálculo da duração da espermatogênese, utilizando-se a 5-bromodeoxiuridina (BrdU), uma pirimidina análoga da timidina que é seletivamente incorporada ao DNA celular durante a fase S do ciclo celular. Por meio de técnica imunohistoquímica com o uso de anticorpos anti-BrdU é possível a identificação das células que incorporaram este precursor *in vivo* (Fagerholm et al. 1994). Por ser uma técnica não radioativa, a

incorporação do BrdU é uma alternativa ao método da timidina triciada para estudos morfofuncionais, já que é uma técnica com abordagem adequada, precisa e rápida para determinar o CES (Rosiepen et al. 1997).

O estudo da morfofisiologia testicular, especialmente dos aspectos relacionados à atividade espermatogênica, é essencial para o conhecimento da biologia reprodutiva de qualquer espécie de vertebrado, seja ela de interesse econômico ou não (Amann e Schanbacher, 1983). Adicionalmente, fornece informações básicas para a elaboração de políticas de conservação que previnam a extinção de espécies ou melhore o manejo das mesmas (Wildt, 2005). Particularmente no caso de mamíferos silvestres, a enorme diversidade de espécies, que ocorrem nos mais variados habitats, faz com que as mesmas utilizem estratégias reprodutivas bastante variadas (Weir e Rowlands, 1973). Assim, esses animais pouco investigados são modelos experimentais muito atraentes em investigações visando compreender melhor a biologia da reprodução dos vários grupos de mamíferos.

## **2. Material e Métodos**

Foram utilizados 14 animais machos, adultos, coletados em uma área de Mata Atlântica de cerca de 10 hectares (20°81'S, 42°85'W), localizada no Município de Viçosa na Zona da Mata Mineira. As coletas foram autorizadas pelo ICMBio (n° 22289-1) e foram feitas ao longo de um ano, utilizando-se armadilhas tipo Sherman, Tomahawk e Pitfall.

Após a captura, os animais foram levados ao Laboratório de Biologia Estrutural da Universidade Federal de Viçosa onde foram pesados, medidos e submetidos à eutanásia por superdosagem anestésica pela associação de cloridrato de xilazina (150 mg/kg) e cloridrato de quetamina (10mg/kg) (Virbac do Brasil, São Paulo, SP, Brasil). Em seguida, os testículos foram removidos, pesados em balança de precisão e imediatamente imersos em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) por um período de 24 horas, sendo posteriormente transferidos para álcool 70% onde foram mantidos até o momento do processamento. Este experimento foi certificado pela comissão de ética para Uso de Animais (CEUA)/ UFV (Protocolo n° 083/2012).

Para análise histológica em microscopia de luz, fragmentos testiculares foram desidratados em série etanólica crescente procedendo-se a inclusão em glicol metacrilato (Historesin®, Leica. Leica Microsystems, Nussloch, Heidelberg, Germany). Foram obtidas secções semisseriadas de 3µm de espessura, em micrótomo

rotativo Leica RM2255 (Leica Microsystems, Nussloch, Heidelberg, Germany), respeitando-se um intervalo de 40µm entre os cortes aproveitados. As preparações foram coradas com azul de toluidina borato de sódio 1% e as análises morfométricas foram feitas utilizando o programa para análise de imagens *ImageJ* 1.43 (Rasband, 1997–2009, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA), aplicado em imagens capturadas em diferentes aumentos, utilizando-se fotomicroscópio Olympus BX-40 (Olympus, Tokyo, Japan).

Para microscopia eletrônica de transmissão, após 2 horas em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965), os fragmentos foram refixados por imersão em solução de glutaraldeído (EMS, USA) 2,5% em tampão cacodilato, por no mínimo mais 12h, e posteriormente armazenados em tampão cacodilato a 0,1 M, pH 7,4 a 4°C. Estas amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto de potássio 8% (1:1) por 2 horas, seguindo-se a desidratação em etanol e inclusão em resina Spurr (EMS). Cortes ultrafinos foram obtidos em ultramicrótomo (Sorvall Nt2-B), contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados em microscópio eletrônico de transmissão Jeol 1011 (Jeol Ltda.), no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa.

A proporção volumétrica dos compartimentos do parênquima testicular foi determinada a partir da contagem de 1000 pontos projetados sobre 10 imagens, obtidas das preparações histológicas de cada animal, em aumento de 100x. O volume de cada componente testicular, expresso em ml, foi estimado a partir do conhecimento desse percentual ocupado pelos compartimentos no testículo e do conhecimento da massa testicular, considerando-se que a densidade do testículo é em torno de 1 (Johnson et al. 1981; Costa et al. 2011; Balarini et al. 2011). Baseado no volume de túbulo seminífero e no peso corporal foi calculado o índice tubulossomático (ITS), dividindo-se o volume do túbulo pelo peso corporal e multiplicando-se este valor por 100. O diâmetro dos túbulos seminíferos e a altura do epitélio seminífero foram obtidos a partir da mensuração de 10 secções transversais, por animal, de túbulos que apresentavam contorno o mais circular possível, sem levar em consideração o estágio do ciclo.

Estimou-se o comprimento dos túbulos seminíferos (CT), expresso em metros, por testículo e por grama de testículo. O CT por testículo foi calculado a partir da fórmula  $CT = VTS / \pi R^2$ , onde VTS = volume dos túbulos seminíferos;  $\pi R^2$  = área da secção transversal dos túbulos seminíferos e R = raio tubular. Para cálculo do

comprimento por grama de testículo dividiu-se o valor anteriormente encontrado pelo peso testicular total.

Os estádios do ciclo do epitélio seminífero (CES) foram caracterizados com base no método da morfologia tubular descrito por Berndtson (1977), no qual 8 estádios são descritos baseando-se na forma e na localização do núcleo das espermatídes e espermatócitos e na ocorrência de figuras de divisão meiótica. As frequências relativas de cada um dos 8 estádios descritos foram obtidas a partir da contagem de 200 secções transversais de túbulos seminíferos, escolhidos ao acaso, em cada animal.

Para calcular a duração do CES, injeções testiculares de 0,2 ml de bromodeoxiuridina comercial (BrdU; Zymed Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, EUA), foram administradas nos animais 24, 48, 120 e 168 horas antes da coleta dos testículos. Um fragmento de testículo de cada um desses animais foi desidratado numa série de concentrações crescentes de álcool (70, 80, 95 e 100%) e, subsequentemente, limpo em dois banhos consecutivos de xileno antes de serem embebidos em Paraplast® (Sigma-Aldrich). Detecção de BrdU foi realizada por coloração de secções de 4 µm de espessura com um anticorpo monoclonal. Para isso, as secções foram desparafinadas e reidratadas, lavadas em tampão fosfato (PBS) e a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS, imersos em HCl e lavados outra vez em PBS. Procedeu-se o pretratamento enzimático com a incubação em solução de tripsina. Após lavagem em PBS, o material foi incubado em solução de bloqueio para evitar reações cruzadas. Em seguida, o material foi incubado com anticorpo monoclonal de rato biotinilado anti-BrdU (Zymed Laboratories, Inc.), sendo revelado com uma reação de estreptavidina peroxidase (Zymed Laboratories, Inc.). A estimativa da duração do CES foi realizada por meio da observação da célula mais avançada marcada pelo tratamento com BrdU presente no epitélio, relacionando-se à frequência dos estágios.

Em dez secções transversais de túbulos seminíferos, no estágio I do ciclo do epitélio seminífero (Berndtson, 1977), foram quantificadas as populações de: espermatogônias do tipo A (SGA), espermatócitos primários em preleptóteno (PL), espermatócitos primários em paquíteno (PQ), espermatídes arredondas (AR) e células de Sertoli (CS). Devido a diferenças no tamanho dos diversos tipos celulares, as contagens obtidas foram corrigidas numericamente considerando-se a espessura do corte e o diâmetro nuclear ou nucleolar, este último, no caso das células de Sertoli, utilizando-se para isto a fórmula de Abercrombie (1946) modificada por Amann (1962). A partir dessas populações foram determinados: coeficiente de eficiência de

mitoses espermatogoniais (PL/SGA), rendimento meiótico (AR/PQ), rendimento geral da espermatogênese (AR/SGA), índices de células de Sertoli por total de células espermatogênicas ((SGA + PL + PQ + AR) / CS) e índice de célula de Sertoli por espermátide arredondada (AR/S). Assumindo-se que a perda na espermiogênese não é significativa, a reserva espermática testicular total (RET), por testículo e por grama de testículo, foi calculada a partir da população celular de espermátides arredondadas no estágio 1 do CES. Deste modo, foi calculado o número médio de espermátides arredondadas em secções transversais de túbulos seminíferos de espessura conhecida, sendo este número corrigido para o comprimento total do túbulo por testículo ou por grama de testículo, a partir da fórmula:  $RET = (\text{comprimento dos túbulos seminíferos} / \text{espessura do corte}) \times \text{número corrigido de espermátides arredondadas por secção transversal}$  (Berndtson, 1977).

A produção espermática diária (PED) foi calculada utilizando-se a seguinte fórmula:  $PED = RET / \text{Duração do ciclo em dias}$ . Para se obter a PED/grama de testículo dividiu-se o resultado da PED pelo peso bruto testicular. Os dados foram analisados quanto à média, desvio padrão e, em alguns casos, quanto ao coeficiente de variação, segundo a função estatística do programa *Microsoft Office Excel® 2003*.

### 3. Resultados

A maior incidência de captura de *O. nigripes* machos adultos ocorreu entre os meses de outubro e março, sendo que nos demais meses houve grande incidência de animais jovens (impúberes), fêmeas, fêmeas adultas gestantes ou ausência completa de roedores dessa espécie. Os valores referentes aos dados morfométricos e volumétricos do testículo de *O. nigripes* estão evidenciados na Tabela 1.

Os estádios do CES acompanharam aqueles estudados para outros roedores e para os mamíferos em geral, exceto primatas. O processo espermatogênico em *O. nigripes* foi dividido em oito estádios (Figura 1, A-D e Figura 2, A-D), com base na forma, presença e localização dos núcleos das espermatogônias, espermatócitos primários e espermátides, bem como em figuras de divisão meiótica. Nesses roedores, observou-se ultraestruturalmente que os núcleos das células de Sertoli apresentaram um nucléolo principal altamente desenvolvido, com aproximadamente 2,02  $\mu\text{m}$  de diâmetro e cromatina frouxa (Figura 2. E). Em microscopia de luz, dois nucléolos menores também puderam ser observados próximos ao maior, o que se apresentou como característica constante desta célula em todos os estádios.

Tabela 1 - Parâmetros morfométricos e volumétricos do testículo e índices somáticos de *Oligoryzomys nigripes*

<b>Parâmetros</b>	<b>Média ± DV</b>	<b>CV(%)</b>
Peso corporal (g)	20,74 ± 4,03	19,44
Teso testicular (g)	0,14 ± 0,037	26,76
Peso médio por testículo (g)	0,069 ± 0,019	26,76
Parênquima testicular por testículo (g)	0,066 ± 0,018	25,42
Índice gonadossomático (%)	0,68 ± 0,16	23,01
Proporção volumétrica de albugínea testicular (%)	5,10 ± 0,50	9,87
Proporção volumétrica de túbulo (%)	93,78 ± 1,2	1,20
Proporção volumétrica de intertúbulo (%)	6,22 ± 1,2	18,90
Diâmetro médio de túbulo seminífero (µm)	205,8 ± 6,9	14,20
Espessura média de epitélio seminífero (µm)	62,2 ± 3,6	5,70
Volume tubular (ml)	0,13 ± 0,0015	1,25
Volume intertubular (ml)	0,0082±0,0015	18,88
Índice Tubulossomático (%)	0,58 ± 0,05	7,78
Comprimento de túbulo seminífero p/ testículo (m)	1,38 ± 0,26	18,88
Comprimento de túbulo seminífero p/ grama testículo (m/g)	23,33 ± 8,48	36,35

\*DV= desvio padrão    \*\* CV= coeficiente de variação (%)

Espermatogônias Tipo-A (Figura 1. A-1) estavam presentes em número crescente a partir do estágio I até a transição dos estádios V e VI, sempre próximas à lâmina basal. No estágio VII, espermatogônias intermediárias foram observadas (Figura 2.C-1). Estas células apresentaram núcleos menores em comparação com aquelas do tipo-A.

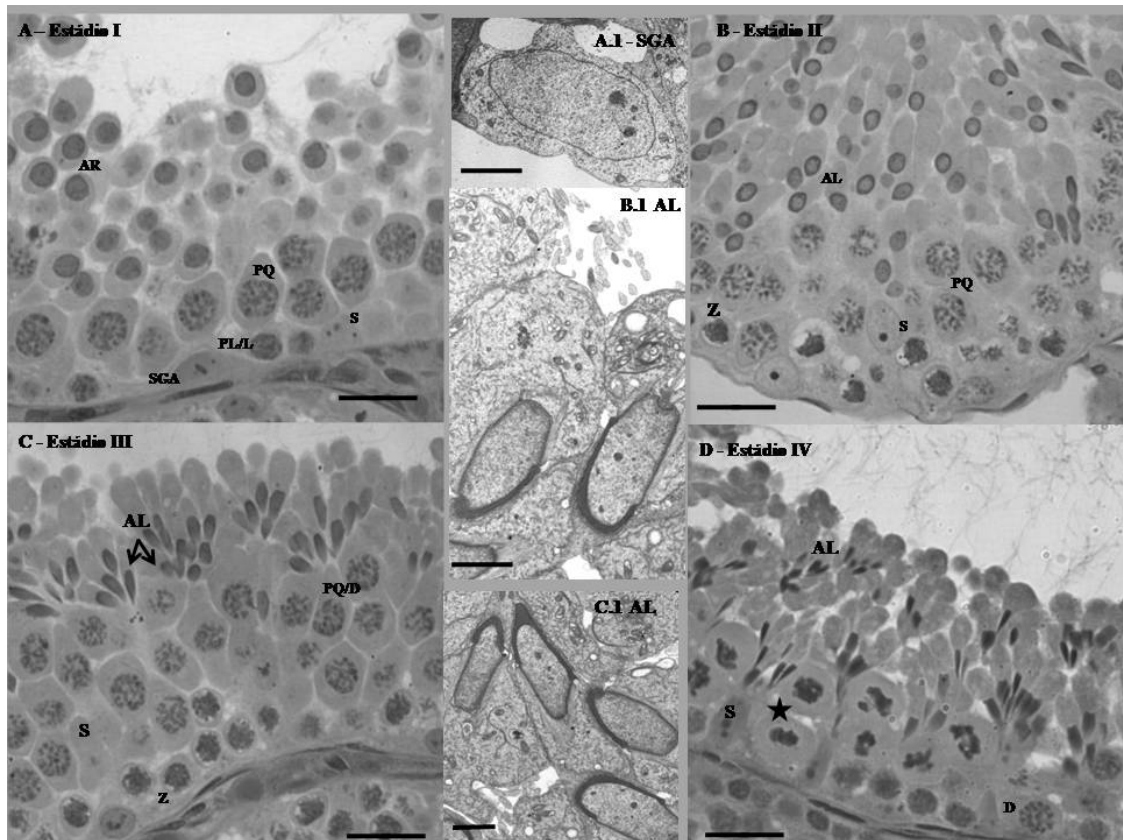


Figura 1. Estádios I a IV de (A a D) do CES em *Oligoryzomys nigripes* e suas respectivas figuras celulares: Espermatogônia Tipo-A (SGA); preleptóteno /leptóteno (PL/L), zigóteno (Z), paquíteno (PQ), espermatídes arredondadas (AR), espermatíde alongada (AL) e células de Sertoli (S). Estrela= figuras de divisão meiótica; setas= feixes de espermatídes alongadas. Barras=18 $\mu$ m. A-1 ultraestrutura de SGA no estágio I do CES (B=5 $\mu$ m); B-1 ultraestrutura de espermatídes em alongamento no estágio II do CES (B=4 $\mu$ m); C-1 ultraestrutura de espermatídes em alongamento e se organizando em feixes no estágio III do CES (B=5 $\mu$ m);

No estágio VIII, pôde-se notar a presença de espermatogônias tipo-B (Figura 2. D-1), que apresentavam núcleo de redondo a oval, e maior conteúdo de heterocromatina. Alguns espermatócitos primários em preleptóteno também estavam presentes (Figura 2.D). Essas células tinham núcleo menor, mais escuro, cromatina homogênea e presença um ou dois nucléolos. Espermatócitos primários em preleptóteno continuaram sendo vistos no estágio I, quando também se observou a presença de espermatócitos com características típicas de leptóteno, com citoplasma claro e núcleo apresentando grumos de heterocromatina periférica.

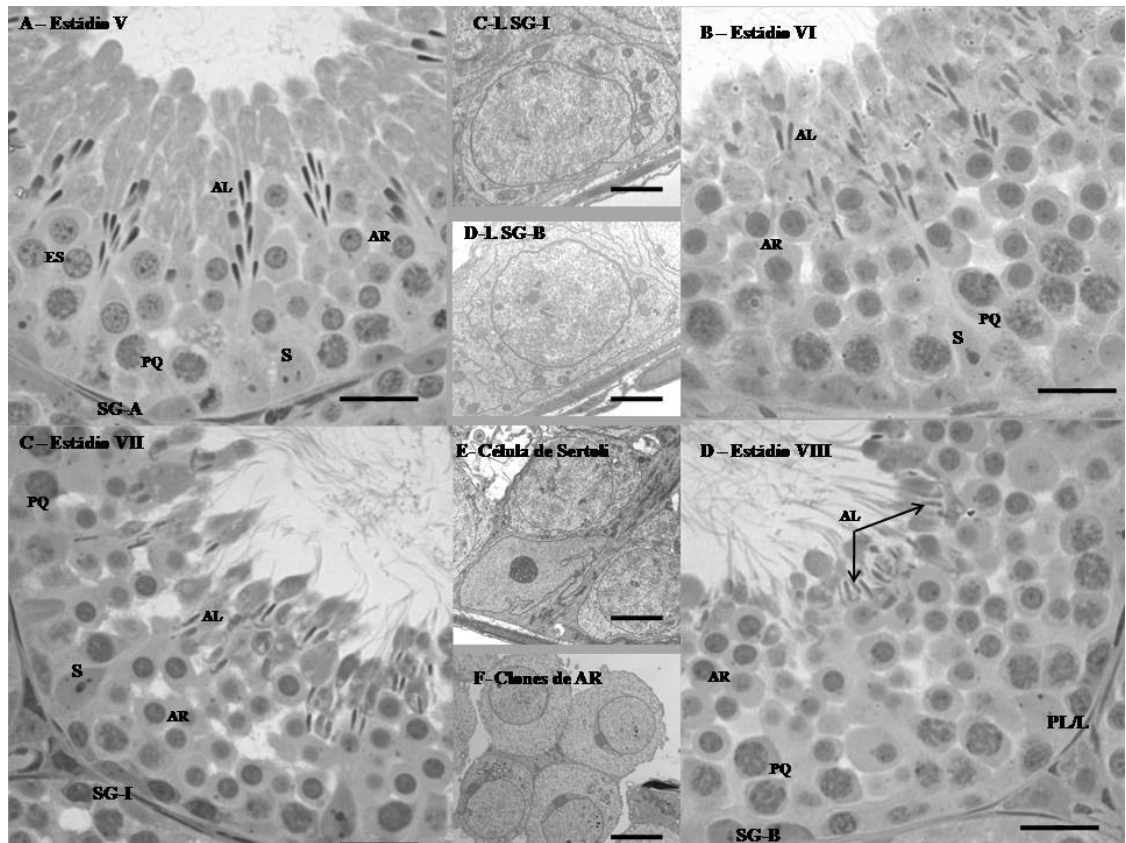


Figura 2. Estádios V a VIII (A a D) do CES em *Oligoryzomys nigripes* e suas respectivas figuras celulares: Espermatogônia intermediária (SGI); espermatogônia Tipo-B (SGB); preleptóteno/leptóteno (PL/L), paquíteno (PQ), espermatídes arredondadas (AR), espermatócito secundário (ES), espermatíde alongada (AL) e células de Sertoli (S). Barras=18 $\mu$ m. C-1 ultraestrutura de SGI típicas do estágio VII do CES (B=5  $\mu$ m); D.1- Ultraestrutura de SG-B típicas do estágio do VIII (B=5  $\mu$ m). E- ultraestrutura do núcleo de uma célula de Sertoli e suas projeções citoplasmáticas em contato com espermatócitos. (B=5  $\mu$ m); F- ultraestrutura de um clone de AR apresentando mesmo estágio de desenvolvimento do acrossoma. (B=5  $\mu$ m).

A presença de espermatócitos primários em zigóteno foi detectada no estágio I, em pequena quantidade, isoladamente ou em pequenos grupos, ocupando porções opostas em uma mesma seção transversal de túbulo seminífero. No estágio II espermatócitos primários em leptóteno, zigóteno e em paquíteno foram observados, e no estágio III além de espermatócitos primários em zigóteno, espermatócitos com núcleos grandes, típicos de paquíteno estavam presentes (Figura 1.C). Este tipo celular é o mais comum no epitélio seminífero e mostrou-se presente por um ciclo completo em todos os estádios seguintes, até a transição do próximo estágio III para IV, quando

então rapidamente diferencia-se em espermatócitos primários em diplóteno. Esta é a maior célula germinativa constituindo pelo menos uma camada do epitélio seminífero no estágio IV (Figura 1.D), quando ocorrem duas divisões meióticas, sendo observados espermatócitos primários com suas características placas metafásicas (Figura 1. D). Na transição dos estádios IV e V, núcleos de espermatócitos secundários foram identificados. Estas células apresentaram características semelhantes a paquíteno, só que de tamanho menor (Figura 1. D).

Após a segunda divisão meiótica, espermátides arredondadas começaram a ser observadas novamente, marcando o início do estágio V quando duas gerações de espermátides podem ser observadas no epitélio seminífero: aquelas que já estavam em avançado processo de diferenciação e que até o final do estágio VIII seriam espermiadas na luz do túbulo seminífero, e aquelas recém-divididas (Figura 2. A). As espermátides arredondadas são células pequenas que geralmente ocupam três ou quatro camadas na parte superior do ambiente adluminal e clones destas células, no mesmo estágio de desenvolvimento, são observadas do estágio V até o estágio I seguinte (Figura 2.F). A partir deste ponto, essas espermátides iniciam um elaborado processo de alongamento e diferenciação com características distintas. No estágio II essas células foram caracterizadas com base em seus núcleos em fase de alongamento, orientados em direção aos núcleos das células de Sertoli localizados na base do túbulo (Figura 1. B-1). No estágio III, espermátides alongadas formavam feixes compostos por poucos núcleos (Figura 1. C-1) e no estágio IV estes feixes continuaram sendo vistos nas camadas acima das figuras de divisão.

No estágio V, feixes de espermátides alongadas estavam localizados em criptas das células de Sertoli, sendo frequente a observação de alguns núcleos situados profundamente no epitélio seminífero (Figura 2. A). No estágio VI, espermátides alongadas estavam agrupadas mais próximas ao lume tubular, em feixes menos profundos no epitélio seminífero (Figura 2. B), evoluindo no estágio VII para feixes menos associados e núcleos ainda mais alongados. (Figura 2.C). Neste estágio foi possível verificar a presença de caudas de espermatozóides no lume tubular.

No estágio VIII os feixes de espermátides alongadas foram completamente desfeitos e estas células foram vistas pareadas e aderidas ao epitélio seminífero pela borda luminal, onde também foram vistos corpos residuais (Figura 2. D).

A frequência de cada um dos 8 estádios do CES é mostrada na Figura 3.

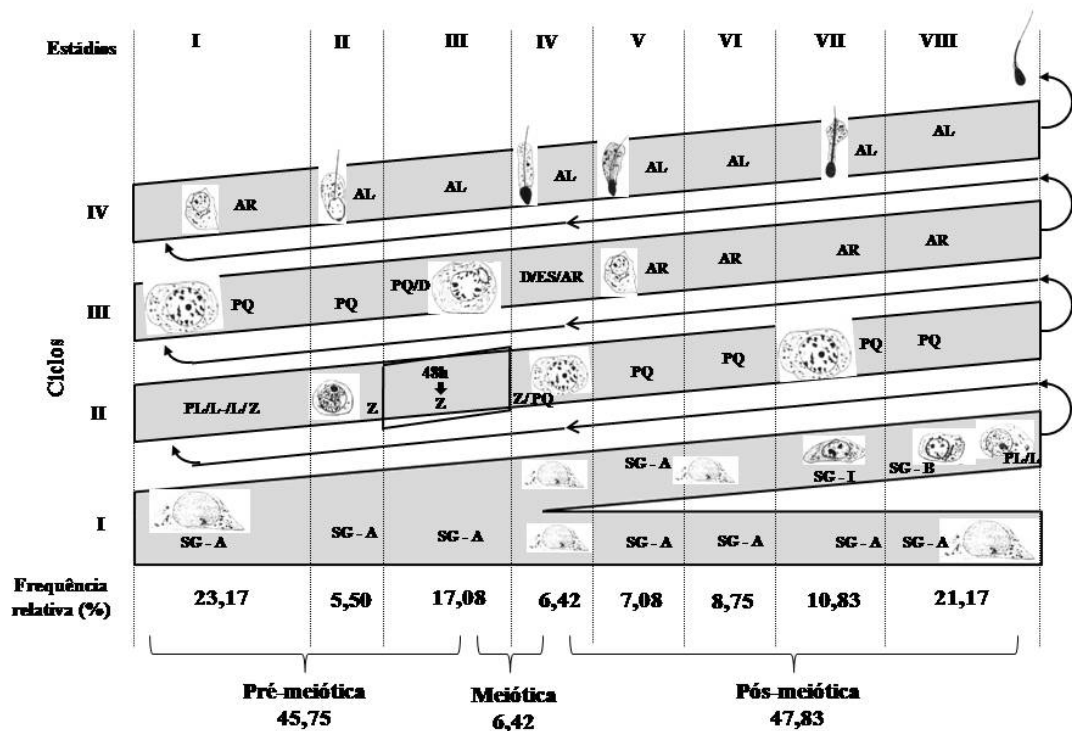


Figura 3. Frequências relativas (%) dos estágios do ciclo do epitélio seminífero de *Oligoryzomys nigripes*.

A Brdu é incorporada no núcleo das células germinativas, que estão sintetizando DNA no momento da injeção, especialmente espermatogônias e espermatócitos primários em preleptóteno / leptóteno no estágio I do CES. Assim, através da coleta dos testículos em intervalos bem definidos de tempo após o tratamento, é possível estimar o percentual do ciclo percorrido e assim determinar a sua duração. Neste estudo, os fragmentos testiculares foram recolhidos 24, 48, 120 e 168 horas após o tratamento com bromodeoxiuridina. As células mais avançadas, marcadas pela Brdu no epitélio seminífero destes animais, foram espermatócitos primários em zigóteno no estágio III-avançado do CES após 48h de aplicação. Assim, foram percorridos 45,75% (frequência média das Fases 1-3) do ciclo do epitélio seminífero e, portanto, o ciclo foi calculado em 3,93 dias (Fig. 4). Considerando-se que 4,5 CES são necessários para completar um ciclo espermatogênico, a espermatogênese total de *Oligoryzomys nigripes* foi estimada como sendo de 17,68 dias.

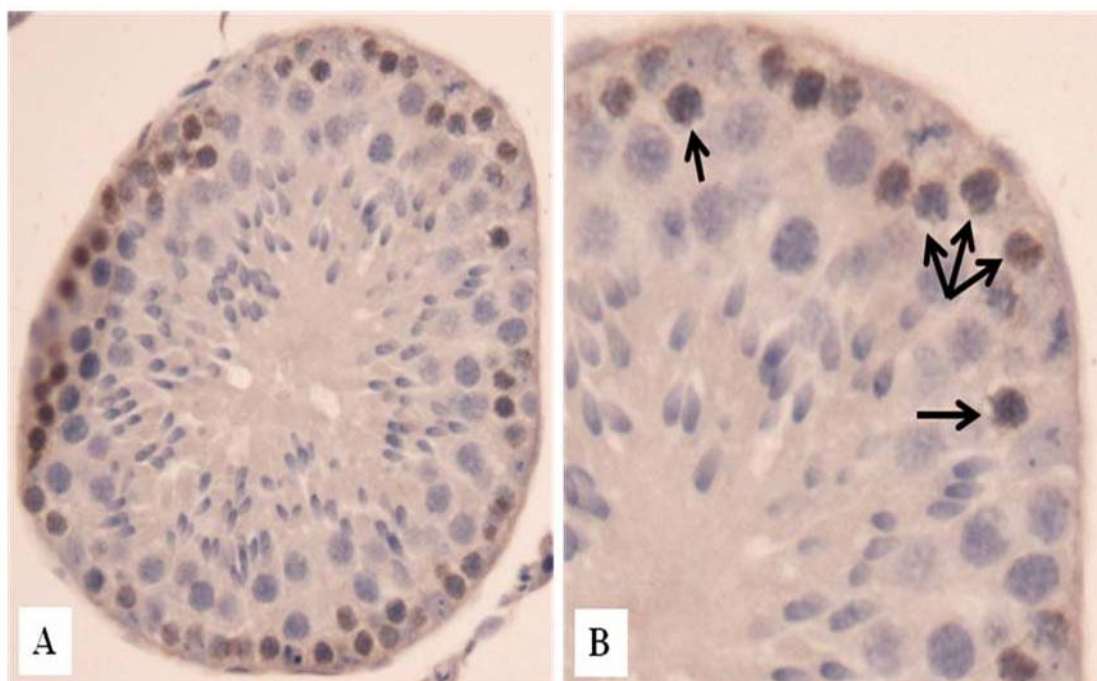


Figura 4. A e B- Túbulo seminífero de *O. nigripes* no estágio III do SEC mostrando marcação dos espermatócitos primários em zigoteno após 48h de aplicação do Brdu. Setas mostram células marcadas.

A população celular corrigida do estágio I do SEC está descrita na Tabela 2.

Tabela 2. População celular corrigida por secção transversal de túbulo, no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero de *Oligoryzomys nigripes*.

<b>Animals</b>	<b>SG A</b>	<b>PL</b>	<b>PQ</b>	<b>AR</b>	<b>S</b>
Média ±	2,25±0,4				5,51±0,9
*DP	2	32,86±5,80	33,01±8,23	82,22±16,43	6
** CV (%)	18,74	17,64	21,83	19,99	13,72

SG-A (espermatogônia do tipo A); PL (espermatócito primário em preleptóteno); PQ (espermatócito primário em paquíteno); AR (espermátides arredondadas); CS (células de Sertoli). \*DP desvio padrão  
 \*\*Coeficiente de variação.

Os índices de rendimento da espermatogênese de *O. Nigripes* estão listados na Tabela 3.

Tabela 3. Rendimento intrínseco da espermatogênese de *Oligoryzomys nigripes*.

<b>Parâmetros</b>	<b>Média ± DP*</b>	<b>CV**(%)</b>
CEME	14,60±3,11	24,93
RGE	36,54±9,85	2601
RM	2,49±0,48	14,01

CEME= coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais; RGE= rendimento geral da espermatogênese; RM= rendimento meiótico. \*DP=desvio padrão \*\*CV=coeficiente de variação.

Os valores referentes aos índices de célula de Sertoli e reserva espermática testicular estão listados na Tabela 4.

Tabela 4. Índices de células de Sertoli (ICS), número de células de Sertoli por testículo e por grama de testículo, reserva espermática testicular (RET) e produção espermática diária (PED) de *Oligoryzomys nigripes*.

<b>Parâmetros</b>	<b>Média ± DP*</b>	<b>CV**(%)</b>
ISC/espermátide arredondada	14,92 ± 3,64	24,05
ISC/célula germinativa	27,28 ± 6,19	21,75
Célula de Sertoli por testículo	2x10 <sup>6</sup> ± 4x10 <sup>5</sup>	18,93
Célula de Sertoli por grama de testículo	35x10 <sup>6</sup> ± 6x10 <sup>6</sup>	18,63
RET por testículo	40x10 <sup>6</sup> ± 8x10 <sup>6</sup>	22,12
RET por grama de testículo	584x10 <sup>6</sup> ±	22,12
PED por testículo	129x10 <sup>6</sup>	22,12
PED por grama de testículo	10x10 <sup>6</sup> ± 2x10 <sup>6</sup> 148x10 <sup>6</sup> ± 32x10 <sup>6</sup>	22,12

\*DP=desvio padrão \*\*CV=coeficiente de variação

#### 4. Discussão

Dados morfométricos corporais e testiculares fornecem informações fundamentais para o estabelecimento de padrões fisiológicos e comportamentais. O

índice gonadosomático (IGS), por exemplo, pode fornecer informações sobre a fisiologia reprodutiva e até mesmo sobre o sistema de acasalamento de uma espécie (Kenagy e Trombulak, 1986). O *O. nigripes* é um roedor de pequeno porte semelhante ao camundongo. As médias de peso corporal e testicular observadas no presente estudo estão de acordo com o descrito para esta espécie. O índice tubulossomático (ITS) apresentou valor mais elevado que em paca (0,24% - Costa et al. 2010b), veado (0,33% - Costa et al. 2011) e morcegos *M. molossus* (0,37% - Barros et al. 2013). O maior investimento tubulossomático pode estar relacionado ao sistema de acasalamento, sendo observados ITS mais elevados em espécies poliândricas e promíscuas (Caldeira et al. 2010).

Por representar a maior parte do parênquima testicular, o túbulo seminífero exerce grande influência sobre a massa testicular. Adicionalmente, a população celular do epitélio seminífero influencia diretamente seu diâmetro, a altura do epitélio, e os índices indicativos de produção espermática, sendo tais mensurações consideradas grandes indicadoras da atividade espermatogênica (Paula et al. 1999). As médias de diâmetro tubular e espessura do epitélio seminífero de *O. nigripes* são respectivamente 205,8 e 62,2 $\mu$ m, e estão dentro da amplitude descrita na literatura sendo o diâmetro tubular de 180 a 300 $\mu$ m na maioria dos amniotas (Roosen-Runge, 1977), e a espessura do epitélio seminífero 60 a 100 $\mu$ m na maioria das espécies descritas (França e Russell, 1998; Hess e França, 2007; Caldeira et al. 2010; Costa et al. 2010a; Costa et al. 2011). Estes dados além de serem indicativos de atividade testicular, são fundamentais para o cálculo do comprimento de túbulo seminífero que em *O. nigripes* foi de 23,33 metros por grama de testículo, acima da média encontrada para outros mamíferos descritos (15m - França e Russell, 1998; Paula et al. 2002; Leal e França, 2006; Costa et al. 2008; Costa et al. 2010a), mas comparando-se aos 39 metros descritos para *T. moojeni* (Cordeiro Jr. et al. 2010), observa-se que os roedores silvestres, especialmente os menor porte, apresentam maior investimento em túbulo seminífero, o que está de acordo com Kenagy e Trombulak (1986) que afirmam que espécies menores apresentam proporcionalmente maior investimento energético na reprodução.

Com base no método da morfologia tubular (Berndtson, 1977), o CES em *O. nigripes* foi dividido em 8 estádios, baseando-se na forma e localização dos núcleos das células germinativas e na presença de figuras de divisões meióticas, seguindo o padrão encontrado em outras espécies de mamíferos (França e Russell, 1998; Paula et al. 1999; Almeida et al. 2006; Guião-Leite et al. 2006). Há evidências conclusivas de

que a frequência relativa desses estádios apresenta diferenças interespecíficas, mas é um parâmetro relativamente constante entre indivíduos de uma mesma espécie, mesmo quando utilizando diferentes metodologias para sua identificação (Amann, 1962; Courot et al. 1970; Clermont, 1972; Ortavant et al. 1977). Independente dessas variações entre espécies, os estágios do CES são agrupados em três fases: pré-meiótica, meiótica e pós-meiótica. Embora a maioria dos animais domésticos apresente maior frequência de fase pré-meiótica em relação à fase pós-meiótica (França e Russell, 1998), em *O. nigripes*, a fase pré-meiótica foi um pouco mais curta, e tal fato pode estar relacionado ao tempo de diferenciação dos espermatócitos primários durante a prófase meiótica, uma vez que em *O. nigripes* a transição de preleptóteno para leptóteno foi observada, mesmo que em poucas células, no estágio VIII-terminal, e a transição de leptóteno para zigóteno parece começar discretamente ao final do estágio I/ início do estágio II, lembrando que na maioria das descrições, zigótenos só seriam esperados na transição do estágio II para estágio III.

A análise ultraestrutural do epitélio seminífero possibilitou a observação das interações entre as células germinativas bem como o desenvolvimento das mesmas. Pontes citoplasmáticas entre grupos de espermátides arredondadas foram observadas, como já descrito por Russell et al. (1990). Estas células estão no mesmo estágio de desenvolvimento, devido às características do capuz acrossômico. Espermátides também foram visualizadas em sua fase alongada, com presença de capuz acrossômico desenvolvido e início de formação do flagelo, na região oposta ao capuz. Três tipos de espermatogônias podem ser distinguidas no epitélio seminífero: Tipo-A, intermediária e Tipo-B (de Rooij e Russell, 2000). A espermatogônia tipo A pôde ser evidenciadas ultraestruturalmente apresentando características como forma, localização, características do núcleo e presença de nucléolos semelhantes às descritas em camundongos (Russell et al. 1990).

Assim como a frequência relativa dos estádios, a duração da espermatogênese é uma constante espécie específica controlada pelo genótipo de células germinativas (França et al. 1998). A duração de um ciclo encontrada para *O. nigripes* foi de 3,93 dias totalizando 17,68 dias para o ciclo completo. Esse valor é considerado bastante curto, principalmente quando comparado à maioria dos mamíferos, que varia entre 7 a 14 dias por ciclo, e de 30 a 75 dias no total (França e Russell, 1998; Leal e França, 2006; Hess e França 2007). O menor período de tempo previamente registrado havia sido para o roedor *Cletheriomys glareolus* com 6,7 dias (Grocock e Clark, 1976), mas recentemente foram relatados 3,45 dias em morcegos *Sturnira lilium* (Morais et al.

2013), e este foi considerado o menor período de tempo registrado em mamíferos. A duração de um ciclo em *O. nigripes* neste estudo foi menor que aquela descrita para a mesma espécie utilizando-se timidina H3 (Cordeiro Jr. 2009). Tal fato reflete na duração total do CES.

Cordeiro Jr. (2009) relatou recentemente que a duração do CES de *O. nigripes* foi de 7,9 e 35,6 dias, o que representa o dobro do valor observado no presente estudo. Diferenças nos resultados seriam esperadas porque o método utilizado neste trabalho foi o da morfologia tubular enquanto Cordeiro Jr. (2009) utilizou o método acrossômico. Apesar das diferenças metodológicas entre os trabalhos, não se esperavam variações ou se houvesse, que fossem menos acentuadas entre eles. Uma possível explicação para esta diferença seria o fato de Cordeiro Jr. (2009) ter se baseado na observação da marcação mais avançada aos 15 dias após a aplicação do marcador, o que de acordo com a duração descrita no presente trabalho, já teria resultado na espermição das células incorporadas durante a prófase meiótica. Intervalos mais curtos para detecção de progressão de células marcadas no epitélio seminífero, principalmente em espécies de menor porte, se fazem necessários, pois há uma correlação entre tamanho corporal e investimento energético na reprodução e assim, maior investimento energético pode aumentar a proliferação de células e a velocidade do ciclo celular (Peters, 1983; Schmidt-Nielsen, 1984; Calder, 1984; Kenagy e Trombulak, 1986)

A contagem da população celular que compõe o epitélio seminífero permite a estimativa da eficiência das distintas fases que constituem o processo espermatogênico (Russell et al. 1990). A população de células germinativas que compõem o epitélio seminífero no estágio I do CES em *O. nigripes* apresenta médias habituais. As razões numéricas entre as espermatogônias A e os demais tipos celulares foram utilizadas para caracterizar a eficiência do processo espermatogênico e quantificar as perdas ocorridas (Costa et al. 2004; França et al. 2005). Em *O. nigripes* o coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais e o rendimento meiótico estiveram dentro da faixa prevista para os animais já investigados (respectivamente 14,6 a 24,8 células - França e Russell, 1998 e 1,90 a 3,62 células - França e Russell, 1998; Guião-Leite e Paula, 2003; Bittencourt et al. 2004; Barros et al. 2007; Costa et al. 2007; Azevedo et al. 2010; Costa et al. 2010a; Costa et al. 2011), e o rendimento geral da espermatogênese, que mensura a eficiência do processo espermatogênico como um todo a partir da população de espermátides arredondadas, foi de 36,61 espermátides arredondadas produzidas a partir de cada espermatogônia A. A confiabilidade deste

índice como avaliação da produção de espermatozóides baseia-se no fato de que perdas durante o processo espermiogênico são consideradas pequenas e não significativas (Amann, 1970; Berndtson, 1977; Russell e Peterson, 1984; Johnson et al. 2000). O rendimento geral da espermatogênese encontrado em *O. nigripes* foi condizente ao observado em diversos mamíferos domésticos (26,2-74,2 - França e Russell, 1998) e maior que o já observado em roedores silvestres de maior porte como a paca e a capivara (19,8 e 21,12 – Carretta Jr. 2012).

As células de Sertoli desempenham papel fundamental na regulação do processo espermatogênico, coordenando-o tanto topograficamente como funcionalmente (Paula, et al. 1999). Cada célula de Sertoli apresenta relação morfofuncional com um número definido de células germinativas, e sua população no epitélio seminífero é constante ao longo de toda a vida do animal, já que estas células são mitoticamente inativas no organismo adulto (Wing e Christensen, 1982; Orth et al. 1988, Russell e Griswold, 1993; França e Russell, 1998, Nieschlag et al. 2010). Assim, o número de células germinativas que uma célula de Sertoli pode dar suporte estrutural e nutricional serve como um indicativo da eficiência funcional destas células (França e Russell, 1998). Em *O. nigripes*, cada célula de Sertoli é capaz de sustentar 28 células germinativas, valor aproximado para paca e cutia (22,09 e 24,36- Carretta Jr. 2012). Quanto à capacidade de suporte das células de Sertoli em relação às espermátides arredondadas, observou-se que *O. nigripes* é capaz de manter cerca de 12 destas células, igual ao valor encontrado em cutia e paca (Carretta Jr. 2012). O número de células de Sertoli por testículo e por grama de testículo foi, respectivamente de  $2 \times 10^6$  e  $35 \times 10^6$ , sendo este último um dado mais confiável para comparações entre espécies. Neste contexto, o número de células de Sertoli por grama de testículo em *O. nigripes* foi maior que nos demais mamíferos cuja média é de  $25 \times 10^6$  células de Sertoli (França e Russell, 1998; Melo et al. 2010; Costa et al. 2011), exceto para *T. moojeni* ( $50 \times 10^6$  - Cordeiro Jr. et al. 2010), o que pode ser uma tendência do grupo.

O cálculo da RET quantifica o número potencial de espermatozóides em produção no testículo ou por grama de testículo, a cada ciclo do epitélio seminífero de uma determinada espécie (Amann e Lambiase, 1969; Berndtson, 1977). Em *O. nigripes*, a RET encontrada por testículo e por grama de testículo foi  $40 \times 10^6$  e  $584 \times 10^6$  respectivamente, e a essa grande diferença entre os valores se deve o fato desses animais apresentarem peso testicular bastante inferior a um grama. Utilizando-se a RET por grama de testículo para comparações interespecíficas, observou-se que os valores aqui encontrados estão acima da média registrada para leões africanos

( $103,8 \times 10^6$  – Barros et al. 2007), puma ( $268 \times 10^6$  – Guião-Leite e Paula, 2003), e para a maioria dos animais domésticos ( $120-260 \times 10^6$  - França e Russell, 1998), mas relativamente próxima ao valor encontrado para cutia  $674 \times 10^6$  (Carretta Jr. 2012).

Embora a reserva testicular por grama de testículo seja válida em comparações interespecíficas, deve-se lembrar de que esta variável é relativa à duração de um CES, que é uma constante biológica espécie específica (Ortavant et al. 1977; Amann e Schanbacher, 1983). Assim, dividindo-se a reserva espermática pela duração do CES é possível calcular a produção espermática diária (PED). Em *O. nigripes* a PED encontrada foi de  $10 \times 10^6$  células por testículo e  $148 \times 10^6$  células por grama de testículo. Cordeiro Jr. (2009) registra que a PED em *O. nigripes* foi, respectivamente, de  $4,8 \times 10^6$  e  $74 \times 10^6$  células por testículo e por grama de testículo, ou seja, metade dos valores observados neste estudo. Tal resultado já era esperado uma vez que, como já discutido anteriormente, a duração descrita por Cordeiro Jr. (2009) foi o dobro do valor encontrado no presente estudo, justificando assim esta diferença.

Embora a PED observada em *O. nigripes* seja próxima a  $115 \times 10^6$  células por grama de testículo descritos para cutia (Carretta Jr. 2012), está bem acima do registrado para espécies com alta eficiência espermatogênica, que produzem cerca de vinte a trinta milhões de espermatozoides, incluindo-se aí animais domésticos como o suíno, equino, ovino e o coelho (França e Russell, 1998), e ainda acima dos valores descritos para o ratos, que se enquadram na amplitude dos animais com média eficiência espermatogênica, produzindo de dez a vinte milhões de espermatozoides (Robb et al. 1978). A elevada PED observada em *O. nigripes* parece refletir uma tendência para os roedores silvestres, uma vez que alguns autores relatam que em representantes deste grupo a PED pode ser de 2 a 4 vezes maior do que em camundongo, hamster e rato (Sharpe, 1994; Hess e França, 2007).

## 5. Conclusões

A espécie *O. nigripes* exibe alto investimento na reprodução, apresentando alta densidade volumétrica (%) de túbulos seminíferos, curta duração do CES e altos valores de produção espermática, resultando em elevada eficiência espermatogênica. A isto se relaciona o tamanho corporal, que se mostra inversamente proporcional ao investimento energético na reprodução e ainda o comportamento reprodutivo, sugestivo de o poliândrico ou promiscuo. Também é importante ressaltar que, apesar desses roedores serem animais silvestres prolíferos, eles compõem níveis basais da

cadeia alimentar, estando assim muito vulneráveis às pressões ambientais. Sugere-se que todos estes fatores relacionados exijam destes animais elevada eficiência espermatogênica para assegurar seu sucesso reprodutivo.

### **Agradecimentos**

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa de estudos, à FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) pelo apoio financeiro ao projeto, à ONG Ambiente Brasil pelo apoio logístico.

### **Referências Bibliográficas**

- Abercrombie M (1946) Estimation of nuclear populations from microtome sections. *Anat Rec.* 94, 239-247.
- Almeida FFL, Leal MC, França LR (2006) Testis morphometry, duration of spermatogenesis and spermatogenic efficiency in the wild boar (*Sus scrofa*). *Biol Reprod.* 75, 792-799.
- Amann RP (1962) Reproductive capacity of dairy bulls. IV. Spermatogenesis and testicular germ cell degeneration. *Am J Anat.* 110 (1), 69 -78.
- Amann RP, Lambiase JT (1969) The male rabbit III. Determination of daily sperm production by means of testicular homogenates. *J. Anim. Sci.* 28, 369-374.
- Amann RP (1970) Sperm production rates. In: Johnson, AD, Gomes,WR, Vandemark, NL (Eds), *The Testis*. Academic Press, New York, pp. 433–482.
- Amann RP, Schanbacher, BD (1983) *Physiology of male reproduction*. *J Anim Sci Suppl.* 57: 380-403.
- Azevedo MHF, Paula TAR, Matta SLP, Fonseca CC, Costa EP, Costa DS, Peixoto JV (2010) Cell population indexes of spermatogenic yield and testicular sperm reserves in adult jaguars (*Panthera onca*). *Anim Reprod Sci.* 118, 83-88.
- Balarini MK, Paula TAR, Matta SLP, Peixoto JV, Guião-Leite FL, Rossi Júnior JL, Czermak Jr AC, Walker NJ (2011) Stages and duration of the cycle of the seminiferous epithelium in oncilla (*Leopardus tigrinus*, Schreber, 1775). *Theriogenology*, 77-5,873-880.
- Barros JBG, Paula TAR, Matta SLP, Fonseca CC, Guião-Leite FL, Rossi JL, Oliveira PC, Costa EP (2007) Sertoli cell index and spermatogenic reserves in adult captive african lions (*Panthera leo*, Linnaeus, 1758). *Anim Reprod Sci.* 102, 350-356.

- Barros MS, Morais D B, Araújo MR, Carvalho TF, Matta SLP, Pinheiro EC, Freitas MB (*In press*) Seasonal variation of energy reserves and reproduction in neotropical free-tailed bats *Molossus molossus* (Chiroptera: Molossidae) Braz J Biol. Expected date for publication: August 2013, v 73.3.
- Berndtson WE, Desjardins C (1974) The cycle of seminiferous epithelium and spermatogenesis in the bovine testis. American Journal of Anatomy, V.140, p. 167-180.
- Berndtson WE (1977) Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. J Anim Sci. 44, 818-883.
- Bittencourt VL, Paula TAR, Matta SLP, Fonseca CC, Neves MTD, Costa MEL, Malta MCC, Coelho CM, Bastos, JAB (2004) Evaluation of the cell population of the seminiferous epithelium and an index indicative of sperm production through testicular biopsy in maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1811) adult. Rev Bras Reprod Anim. 28 (2), 108-113.
- Caldeira BC, Paula TAR, Matta SLP, Balarini MK, Campos PKA (2010) Morphometry of testis and seminiferous tubules of the adult crab-eating fox (*Cerdocyon thous*, Linnaeus, 1766). CERES 57 (5), 569-575.
- Calder WA (1984) Size, Function, and Life History. Cambridge: Harvard University Press.
- Cardoso FM, Godinho HP (1985) Daily sperm production of zebus (*Bos indicus*) estimated by quantitative histology of the testis. Theriogenology. v.23, n.6, p.841-
- Carretta Junior M (2012) Comparative study of spermatogenesis, and duration of seminiferous epithelium cycle through technical immunohistochemistry with bromodeoxyuridine in three different species of rodent the suborder hystricomorfa: *Dasyprocta leporina*, *Cuniculus paca* and *Hydrochoerus hydrochaeris*. Viçosa: UFV, PhD thesis, Federal University of Viçosa, 131pp.
- Clermont Y (1972) Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. Physiol Rev. 52, 198-236.
- Cordeiro-Jr DA (2009) Testicular Structure and Function in Rodents Wild of Families Echimyidae (*Trinomys moojeni*) and Cricetidae (*Akodon cursor*, *Akodon montensis*, *Necomys lasiurus* e *Oligoryzomys nigripes*), of Private Reserve of Natural Heritage of Caraça - MG. Ph.D. Thesis, Belo Horizonte Federal University of Minas Gerais.
- Courot M, Hochereau-De-Reviers MT, Ortavant R (1970) Spermatogenesis. In: Johnson AD, Gomer WR, Vandemark NL (Eds.), The Testis. Academic Press, New York, pp. 399 -432.

- Cordeiro-Jr DA, Costa GM, Talamoni SA, França LR (2010) Spermatogenic efficiency in the spiny rat, *Trinomys moojeni* (Rodentia: Echimyidae). *Anim Reprod Sci.* 119(1-2):97-105.
- Costa DS, Henry M, Paula TAR (2004) Espermatogênese de catetos (*Tayassu tajacu*). *Arq Bras Med Vet Zootec.* 56, 46 -51.
- Costa DS, Menezes CMC, Paula TAR (2007) Spermatogenesis in white-lipped peccaries (*Tayassu pecari*). *Anim Reprod Sci.* 98, 322-334.
- Costa GMJ, Chiarini-Garcia H, Morato RG, Alvarenga RL, França JR (2008) Duration of spermatogenesis and daily sperm production in the jaguar (*Panthera onca*). *Theriogenology*, 70:1136–46.
- Costa GMJ, Leal MC, Silva JV, Ferreira ACSF, Guimarães DA, França LR (2010a) Spermatogenic cycle length and sperm production in a feral pig species (Collared Peccary, *Tayassu tajacu*). *J. Androl.* 31 (2), 221-230.
- Costa GMJ, Leal MC, Ferreira ACSF, Guimarães DA, França LR (2010b) Duration of spermatogenesis and spermatogenic efficiency in two large neotropical rodent species: the agouti (*Dasyprocta leporina*) and paca (*Agouti paca*). *J Androl.* 31 (5), 489-499.
- Costa KLC, Matta SLP, Gomes MLM, Paula TAR, Freitas KM, Carvalho FAR, Silveira JA, Dolder H, Mendis-Handagama SLMC (2011) Histomorphometric evaluation of the neotropical brown brocket deer *Mazama gouazoubira* testis, with emphasis on cell population indexes of spermatogenic yield. *Anim Reprod Sci.* 127:202–212.
- de Rooij DG, Russell LD (2000) All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl.* 21(6):776-798.
- Duarte APG (2003) Reproductive aspects of *Akodon montensis* (Rodentia, Muridae) and *Artibeus lituratus* (Chiroptera, Phyllostomidae) in areas of forest in southeastern Brazil. 52p. Dissertation (MSc in Zoology), PUC-Minas,
- Fagerholm P, Hamberg-Nyström H, Tengroth B (1994) Wound healing and myopic regression following photorefractive keratectomy. *Acta Ophthalmologica (Copen)* 72 (2)229-234.
- Fonseca GAB, Herrmann G, Leite YLR, Mittermeier RA, Rylands AB, Patton, JL. (1996). Lista anotada dos mamíferos do Brasil. *Occas. Pap Conserv Biol.* 4:1-38.
- França LR, Avelar GF, Almeida FFL (2005) Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology.* 63, 300-318.

- França LR, Ogawa T, Avarbock MR, Brinster RL, Russell LD (1998) Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biol Reprod* 59, 1371–1377.
- França LR, Russell LD (1998) The testis of domestic animals. In: *Male Reproduction. A Multidisciplinary Overview*, 1st edn. (editors Martínez F, Regadera J), pp. 197–219, Madrid: Churchill Livingstone.
- Franca LR, Avelar GF, Almeida FF (2005) Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*; 63(2):300-318.
- Guião-Leite FL, Paula TAR (2003) Intrinsic efficiency of spermatogenesis, the Sertoli cell index and daily sperm production of the puma (*Puma concolor*) adult. *Rev Bras Reprod Anim.* 27(1), 21 -26.
- Guião-Leite FL, Paula TAR, Matta SL, Fonseca CC, Neves MT, Barros JB (2006) Cycle and duration of the seminiferous epithelium in puma (*Puma concolor*). *Anim Reprod Sci.* 9:307–16.
- Grocock CA, Clark JR (1976) Duration of spermatogenesis in the vole (*Microtus agrestis*) and the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *J Reprod Fertil* 47, 133–135.
- Hess RA, França LR (2007) Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis* (ed. Cheng CY), pp. 1–15, New York: Landes Bioscience.
- Johnson L, Petty CS, Neaves WB (1981) A new approach to qualification of spermatogenesis and its applications to germinal cell attrition during human spermatogenesis. *Biol Reprod.*25:217–26.
- Johnson L, Varner DD, Roberts ME, Smith TL, Keillor GE, Scruchfield WL (2000) Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. *Anim Reprod Sci.* 60-61,471-480.
- Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde -glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27, 137.
- Kenagy GJ, Trombulak SC (1986) Size and function of mammalian testis in relation to body size. *J Mamm.* 67, 1-22.
- Leal MC, França LR (2006) The seminiferous epithelium cycle length in the black tufted-ear marmoset (*Callithrix penicillata*) is similar to humans. *Biol Reprod.* 74, 616-624.

- Melo FCSA, Matta SLP, Paula TAR, Gomes MLM, Oliveira LC (2010) The effects of *Tynnanthus fasciculatus* (Bignoniaceae) infusion on testicular parenchyma of adult wistar rats. Biol Res. 43, 445 -450.
- Morais DB, Paula TAR, Barros MS, Balarini MK, Freitas MBD, Matta SLP (2013) Stages and duration of the seminiferous epithelium cycle in the bat *Sturnira lilium*. J Anat. 222:3, 372–379.
- Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S (2010) Physiology of testicular function. In: Weinbauer GF, Luetjens CM, Simioni M, Nieschlag E Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction. Springer, Berlin, pp. 15 -16.
- Ortavant R, Courrot M, Hochereau-De-Reviers MT (1977) Spermatogenesis in domestic mammals. In: Cole HH, Cupps PT. Reproduction in Domestic Animals. Academic Press, New York, 203 -227.
- Orth JM, Gunsalus GL, Lamperti AA (1988) Evidence 1 from Sertoli cell - depleted rats indicates that spermatids number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. Endocrinology. 122, 787-794.
- Paula TAR, França LR, Garcia HC (1999) Seminiferous epithelium cycle and its duration in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris* ). Tiss Cell. 31(3), 327-334.
- Paula TAR, Matta SLP, Costa DS (2002) Avaliação histológica e quantitativa do testículo de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris* ) adultas. Biosci J. 18 (1), 121-136.
- Peters RH (1983) The Ecological Implications of Body Size. Cambridge; Cambridge University Press.
- Rasband WS. Image J, US; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA. Available at: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.
- Robb GE, Amann RP, Killian GJ (1978). Daily sperm production and epididymal sperm reserves of puberal and adult rats. J Reprod Fertil. 54:103-107.
- Roosen-Runge EC, Giesel LO Jr (1950) Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. Am J Anat 87, 1–30.
- Roosen-Runge EC (1977) The process of spermatogenesis in animals. Cambridge: University Press.
- Rosiepen G, Arslan M, Clemen G, Nieschlag E, Weinbauer GF (1997). Estimation of the duration of the cycle of the seminiferous epithelium in the non-human primate *Macaca mulatta* using the 5-bromodeoxyuridine technique. Cell Tiss Resea. 288365-369.

- Russell LD, Ettlín RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED (1990) Mammalian spermatogenesis. In: Russell LD, Ettlín RA, Sinha Hikim A P, Clegg E D (Eds), *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. 1 Cache River Press, Clearwater, pp. 1-40.
- Russell LD, Griswold MD (1993) *The Sertoli Cell*. Cache River Press, Clearwater, 801p.
- Russell LD, Peterson RN (1984) Determination of the elongate spermatid - Sertoli cell ratio in various mammals. *J. Reprod. Fertil.* 70, 635 -641.
- Schmidt-Nielsen KS (1984) *Why Is Animal Size So Important?* Cambridge: Cambridge University Press.
- Sharpe RM (1994) Regulation of spermatogenesis. In: Knobil E, Neill JD. *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, New York, pp.1363 -1434.
- Weir BJ, Rowlands IW (1973) Reproductive strategies of mammals. *Ann. Rev. Ecol. System*, 4, 139-163.
- Wildt DE (2005) Lions, Tigers, and Pandas, Oh My. *J. Androl*, 26(4):452-454, July/August.
- Wing TY, Christensen AK (1982) Morphometric studies on rat seminiferous tubules. *Am J Anat.* 165 : 13-25.

## Artigo 2

### Eficiência espermatogênica do roedor silvestre *Akodon cursor* (RODENTIA: Cricetidae)

#### Resumo

O conhecimento das etapas que compõem o ciclo do epitélio seminífero (CES) e a determinação de sua duração são requisitos fundamentais para a quantificação precisa da dinâmica da espermatogênese. Apesar dos roedores silvestres serem excelente modelo de estudo pouco se conhece acerca da atividade testicular desses animais. O objetivo deste estudo foi descrever os padrões morfométricos e volumétricos do testículo de *Akodon cursor*, caracterizar os estádios que compõem o CES, verificar a frequência relativa dos estádios, calcular a duração do processo espermatogênico e os índices de produção e rendimento espermático, por meio de análises histológicas e imunohistoquímicas. O índice gonadossomático (IGS) foi de 0,74% e o índice tubulossomático (ITS) de 0,66%. Cerca de 27 metros de túbulos seminíferos são encontrados em cada grama de testículo de *A. cursor*, o que é considerado um valor elevado. De acordo com o método da morfologia tubular, o CES em *A.cursor* foi dividido em oito fases, seguindo o padrão encontrado em outros mamíferos. A fase pré-meiótica foi mais curta que a pós-meiótica e a duração do CES foi de 4,26 dias. Assim, 19,15 dias foram necessários para o desenvolvimento de espermatozoides a partir de espermatogônias iniciais. O número de células de Sertoli por grama de testículo foi  $48 \times 10^6$ . A produção espermática diária por grama de testículo foi de  $142 \times 10^6$  células sendo considerada alta até mesmo para os mamíferos com alto índice de produção. Conclui-se que *A.cursor* apresenta elevada eficiência espermatogênica, tendo grande investimento somático em túbulos seminíferos e em células de Sertoli, além de curta duração do CES e elevada produção espermática.

**Palavras-chave:** Produção espermática, imunohistoquímica, ciclo do epitélio seminífero, roedores silvestres.

## Paper 2

### **Spermatogenic efficiency of wild rodent *Akodon cursor* (RODENTIA: Cricetidae)**

#### **Abstract**

The knowledge of the stages that compose the cycle of the seminiferous epithelium (ESC) and the determination of its duration are essential for accurate quantification of the dynamics of spermatogenesis. Despite wild rodents are excellent study model little is known about, testicular activity in these animals. The aim of this study was to describe the patterns of morphometric and volumetric testicle *Akodon cursor*, characterize the stages that compose the ESC, verify the relative frequency of stages, calculate the duration of spermatogenesis and production indices and yields sperm through histological and immunohistochemical analyzes. The gonadosomatic index (GSI) was 0.74% and tubulossomatic index (TSI) of 0.66%. About 27 meters of seminiferous tubules are found in each gram of testis of *A. cursor*, which is considered a high value. According to the tubular morphology method, the ESC in *A.cursor* was divided into eight stages, following the pattern found in other mammals. The pre-meiotic was shorter than the post-meiotic and duration of CES was 4.26 days. Thus, 19.17 days were necessary for the development of sperm from initial spermatogonia. The number of Sertoli cells per gram of testis was  $48 \times 10^6$ . The daily spermatic production per gram of testis was  $142 \times 10^6$  cells is considered high even for mammals with high indexes of production. It is concluded that *A.cursor* showed spermatic efficiency high, presenting great investment somatic in seminiferous tubules and Sertoli cells, short duration of ESC and spermatic production high.

**Keywords:** Spermatic production, immunohistochemistry, cycle of the seminiferous epithelium, wild rodents.

## 1. Introdução

A ordem Rodentia representa 40% das espécies de mamíferos ainda existentes, sendo a maior ordem em número de espécies, com aproximadamente 29 famílias, 443 gêneros e 2021 espécies (Nowak, 1999; Lage e Schmidt, 2007). Particularmente no Brasil, foram registrados 71 gêneros e 235 espécies de roedores (Oliveira e Bonvicino, 2006). O gênero *Akodon* agrupa roedores de pequeno porte, com pelo menos 10 espécies de ocorrência natural no Brasil. São roedores terrestres, que habitam formações florestais, áreas abertas adjacentes e campos de altitude ao longo de toda a Mata Atlântica, Campos do Sul, áreas florestais da Caatinga e formações vegetais abertas e fechadas do Cerrado (Bonvicino et al. 2008). Apesar do grande número de representantes desta ordem em nossa fauna, existem poucos dados na literatura sobre sua biologia reprodutiva (Duarte, 2003), o que dificulta a aplicação de medidas de conservação e manejo (Fonseca et al. 1996).

O estudo dos estádios que compõem o ciclo do epitélio seminífero (CES) e a determinação de suas frequências, associado à morfometria testicular são fundamentais para compreender a dinâmica da espermatogênese (Roosen-Runge e Giesel, 1950; Courot et al 1970; Ortavant et al. 1977). Outro dado de grande importância é a estimativa de duração do processo espermatogênico, que permite o cálculo da produção espermática diária por grama de testículo, um parâmetro essencial para a compreensão da produção de espermatozoides e que permite correlações interespecíficas. A utilização de imunohistoquímica foi adaptada para o cálculo da duração da espermatogênese, utilizando-se a 5-bromodeoxiuridina (BrdU), uma pirimidina análoga da timidina que é seletivamente incorporada ao DNA celular durante a fase S do ciclo celular. Por meio do uso de anticorpos anti-BrdU é possível a identificação das células que incorporaram este precursor *in vivo* (Fagerholm et al. 1994). Por ser uma técnica não radioativa, a incorporação da BrdU é uma alternativa ao método da timidina H3 para estudos morfofuncionais, já que é uma técnica com abordagem adequada, precisa e rápida para determinar a duração do CES (Rosiepen et al. 1997).

Considerando-se que o conhecimento sobre a biologia e a fisiologia da reprodução em pequenos mamíferos é ainda muito limitado, principalmente em relação aos parâmetros reprodutivos mais elementares dos animais silvestres (Wildt, 2005), torna-se necessário incrementar as pesquisas nessa área. Assim, este estudo teve como objetivo verificar as características histológicas morfométricas e

volumétricas do testículo do roedor silvestre *Akodon cursor*, endêmico da Zona da Mata mineira, fornecendo informações referentes à produção espermática.

## 2. Material e Métodos

Foram utilizados 10 animais machos, adultos, coletados em uma área de Mata Atlântica de cerca de 10 hectares (20°81'S, 42°85'W), localizada no Município de Viçosa na Zona da Mata Mineira. As coletas foram autorizadas pelo ICMBio (n° 22289-1), e foram feitas ao longo de um ano, utilizando-se armadilhas tipo Sherman, Tomahawk e Pitfall.

Após a captura, os animais foram levados ao Laboratório de Biologia Estrutural da Universidade Federal de Viçosa sendo então pesados, medidos e submetidos à eutanásia por superdosagem anestésica pela associação de cloridrato de xilazina (150 mg/kg) e cloridrato quetamina (10mg/kg) (Virbac do Brasil, São Paulo, SP, Brasil). Os testículos foram removidos, pesados em balança de precisão e imediatamente imersos em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) por um período de 24 horas, sendo posteriormente transferidos para álcool 70% onde foram mantidos até o momento do processamento. Este experimento foi certificado pela comissão de ética para Uso de Animais (CEUA)/ UFV (Protocolo n° 083/2012).

Para análise histológica em microscopia de luz, fragmentos testiculares foram desidratados em série etanólica crescente procedendo-se a inclusão em glicolmetacrilato (Historessin®, Leica. Leica Microsystems, Nussloch, Heidelberg, Germany). Foram obtidas secções semisseriadas de 3µm de espessura, em micrótomo rotativo Leica RM2255 (Leica Microsystems, Nussloch, Heidelberg, Germany), respeitando-se um intervalo de 40µm entre os cortes aproveitados. As preparações foram coradas com azul de toluidina + borato de sódio 1% e as análises morfométricas foram feitas utilizando o programa para análise de imagens *ImageJ* 1.43 (Rasband, 1997–2009, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA), aplicado em imagens capturadas em diferentes aumentos, utilizando-se fotomicroscópio Olympus BX-40 (Olympus, Tokyo, Japan).

A proporção volumétrica dos compartimentos do parênquima testicular foi determinada a partir da contagem de 1000 pontos projetados sobre 10 imagens, obtidas das preparações histológicas de cada animal, em aumento de 100x. O volume de cada componente testicular, expresso em ml, foi estimado a partir do conhecimento desse percentual ocupado pelos compartimentos no testículo e do conhecimento da

massa testicular, considerando-se que a densidade do testículo é em torno de 1 (Johnson et al. 1981; Costa et al. 2011; Balarini et al. 2011). Baseado no volume de túbulo seminífero (VTS) e no peso corporal (PC) foi calculado o índice tubulossomático (ITS) pela fórmula:  $VTS / PC \times 100$ . O diâmetro dos túbulos seminíferos e a altura do epitélio seminífero foram obtidos a partir da mensuração de 10 secções transversais, por animal, de túbulos que apresentavam contorno o mais circular possível. O comprimento dos túbulos seminíferos (CT) foi calculado a partir da fórmula  $CT = VTS / \pi R^2$ , onde VTS=volume dos túbulos seminíferos;  $\pi R^2$ =área da secção transversal dos túbulos seminíferos e R= raio tubular.

Os estádios do CES foram caracterizados com base no método da morfologia tubular proposto por Berndtson (1977), no qual 8 estádios são descritos baseando-se na forma e na localização do núcleo das espermátides e espermatócitos e na ocorrência de figuras de divisão meiótica. As frequências relativas de cada um dos 8 estádios descritos foram obtidas a partir da contagem de 200 secções transversais de túbulos seminíferos, escolhidos ao acaso, em cada animal.

Para calcular a duração do CES, injeções testiculares de 0,2 ml de bromodeoxiuridina (BrdU; Zymed Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, EUA) foram administradas nos animais 1 e 24 horas antes da coleta dos testículos. Um fragmento de testículo de cada um desses animais foi desidratado em série etanólica crescente e, subsequentemente, lavados em xileno antes de serem embebidos Paraplast® (Sigma-Aldrich). Detecção de BrdU foi realizada por coloração de secções de 4 µm de espessura com anticorpo monoclonal. As secções foram desparafinadas e reidratadas, lavadas em tampão fosfato (PBS) e a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Em seguida, os cortes foram lavados em PBS, imersos em HCl (para desnaturar DNA), e novamente lavados em PBS. Procedeu-se o pré-tratamento enzimático com a incubação em solução de tripsina. Após lavagem em PBS, o material foi incubado em solução de bloqueio para evitar reações cruzadas. Em seguida, o material foi incubado com anticorpo monoclonal de rato biotinilado anti-BrdU (Zymed Laboratories, Inc.) e revelado com estreptavidina peroxidase (Zymed Laboratories, Inc.). A estimativa da duração do CES foi realizada por meio da observação da célula mais avançada marcada pelo tratamento com BrdU presente no epitélio, relacionando-se à frequência dos estágios.

Em dez secções transversais de túbulos seminíferos, no estádio I do CES (Berndtson, 1977), foram quantificadas as populações de espermatogônias do tipo A (SGA), espermatócitos primários em preleptóteno (PL), espermatócitos primários em

paquíteno (PQ), espermátides arredondadas (AR) e células de Sertoli (CS). Devido a diferenças no tamanho dos diversos tipos celulares, as contagens obtidas foram corrigidas numericamente considerando-se a espessura do corte e o diâmetro nuclear ou nucleolar, este último, no caso das células de Sertoli, utilizando-se para isto a fórmula de Abercrombie (1946) modificada por Amann (1962).

A partir dessas populações foram determinados o coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais (PL/SGA), rendimento meiótico (AR/PQ), rendimento geral da espermatogênese (AR/SGA), índices de células de Sertoli total ((SGA + PL + PQ + AR)/ CS) e índice de célula de Sertoli por espermátide arredondada (AR/S). Assumindo-se que a perda na espermiogênese não é significativa, a reserva espermática testicular total (RET), por testículo e por grama de testículo, foi calculada a partir da população celular de espermátides arredondadas no estágio 1 do CES. Deste modo, foi calculado o número médio de espermátides arredondadas em secções transversais de túbulos seminíferos de espessura conhecida, sendo este número corrigido para o comprimento total do túbulo por testículo ou por grama de testículo, a partir da fórmula:  $RET = (\text{comprimento dos túbulos seminíferos} / \text{espessura do corte}) \times \text{número corrigido de espermátides arredondadas por secção transversal}$  (Berndtson, 1977).

A produção espermática diária (PED) foi calculada utilizando-se a seguinte fórmula:  $PED = RET / \text{Duração do ciclo em dias}$ . Para se obter a PED por grama de testículo dividiu-se o resultado da PED pelo peso bruto testicular. Os dados foram analisados quanto à média e desvio padrão e, em alguns casos, quanto ao coeficiente de variação, segundo a função estatística do programa *Microsoft Office Excel® 2003*.

### **3. Resultados e Discussão**

Os parâmetros testiculares morfométricos e volumétricos estão apresentados na Tabela 1. A ordem Rodentia é a que apresenta a maior variação para o peso relativo dos testículos observando-se variações, de 0,05% em castor canadense a 8,41% em gerbil indiano (Kenagy e Trombulak, 1986). O IGS registrado para *A. cursor* foi de 0,74%, que é considerado elevado quando comparado a outros grupos como os carnívoros (Paula et al. 1999; Paula et al. 2002, Caldeira et al. 2010; Balarini et al, 2011) e até mesmo a roedores de maior porte como chinchilas (0,8%) (Leal e França, 2008). Pelo menos em parte, este resultado pode estar associado ao elevado investimento dessa espécie em túbulo seminífero que apresentou ITS de 0,66%, maior

que em paca (0,24% - Costa et al. 2010b), veado (0,33% - Costa et al. 2011) e morcegos *M. molossus* (0,37% - Barros et al. 2013). O elevado ITS encontrado em *A. cursor* acompanha o descrito para outro roedor silvestre, o *Trinomys moojeni*, que apresenta densidade volumétrica de túbulos seminíferos recorde entre os mamíferos estudados (97,6%, Cordeiro Jr. et al. 2010). Este parâmetro é de grande importância para avaliação do comportamento reprodutivo, uma vez que espécies promíscuas ou poliândricas apresentam maior investimento em túbulos seminíferos quando comparadas com espécies monogâmicas ou poligínicas (Kenagy e Trombulak, 1986; Caldeira et al. 2010), sugerindo-se assim que *A. cursor* se enquadra no primeiro grupo.

Seguindo o padrão observado para outros roedores silvestres, a proporção volumétrica de albugínea testicular de *A. cursor* foi de 7,48%, menor que o observado na maioria das espécies domésticas que é 10% (França e Russell, 1998), porém maior que a de roedor silvestre do mesmo porte (3,2% - *Hylaeamys megacephalus*, Melo et al. 2013).

Tabela 1- Parâmetros morfométricos e volumétricos testiculares e índices somático de *Akodon cursor*.

<b>Parâmetros</b>	<b>Média ± DV*</b>	<b>CV** (%)</b>
Peso corporal (g)	43,86 ± 7,69	17,54
Teso testicular (g)	0,33 ± 0,10	28,76
Peso médio por testículo (g)	0,16 ± 0,05	1,34
Índice Gonadossomático (%)	0,74 ± 0,13	18,23
Proporção volumétrica de albugínea testicular (%)	7,48 ± 2,65	35,47
Proporção volumétrica de túbulo (%)	90,70±4,59	5,06
Proporção volumétrica de intertúbulo(%)	9,30± 4,63	49,80
Diâmetro médio de túbulo seminífero (µm)	203,83 ±15,73	7,72
Espessura média de epitélio seminífero (µm)	93,08 ±3,37	3,62
Volume tubular (ml)	0,15 ± 0,04	26,28
Tubulossomático index (%)	0,66 ± 0,10	15,06
Comprimento de túbulo seminífero p/ testículo (m)	4,62 ± 1,21	26,28
Comprimento de túbulo seminífero p/ grama testículo (m/g)	27,54 ±2,29	8,31

\*DV= desvio padrão      \*\* CV= coeficiente de variação (%)

Por representar a maior parte do parênquima testicular, o túbulo seminífero exerce grande influência sobre a massa testicular. Adicionalmente, a população celular do epitélio seminífero influencia diretamente seu diâmetro, a altura do epitélio, e os índices indicativos de produção espermática, sendo tais mensurações consideradas grandes indicadoras da atividade espermatogênica (Paula et al. 1999). O diâmetro tubular e a espessura do epitélio seminífero de *A. cursor* foram, respectivamente, 203,83 $\mu$ m e 93,08 $\mu$ m (Tabela 1), estando dentro da amplitude descrita na literatura para a maioria dos amniotas (180 a 300 $\mu$ m - Roosen-Runge, 1977) e (60 a 100 $\mu$ m - França e Russell, 1998; Hess e França, 2007; Caldeira et al. 2010; Costa et al. 2010a; Costa et al. 2011) para a maioria das espécies descritas.

Em *A. cursor* observou-se 4,62 metros de túbulos seminíferos por testículos (Tabela 1). Sabendo-se que o tamanho dos testículos varia muito entre espécies, o comprimento tubular por grama de testículo é mais relevante para comparações interespecíficas. Neste caso, em *A. cursor* cada grama de testículo apresentou 27,54 metros, estando acima da média encontrada para outros mamíferos descritos (15m - França e Russell, 1998; Paula et al. 2002; Leal e França, 2006; Costa et al. 2008; Costa et al. 2010a), mas comparando-se aos 39 metros descritos para *T. moojeni* (Cordeiro Jr. et al. 2010). Observa-se então que os roedores silvestres, especialmente os de menor porte, apresentam maior investimento em túbulo seminífero, acompanhando a tendência observada em espécies menores, que apresentam proporcionalmente maior investimento energético na reprodução (Kenagy e Trombulak, 1986).

De acordo com o método da morfologia tubular (Berndtson, 1977), 8 estádios foram descritos no testículo de *A. Cursor* (Figura 1 A - H). A distribuição destes estádios é apresentada de forma segmentar ao longo do comprimento do túbulo seminífero, e geralmente há apenas um estádio por secção transversal. Além das células de Sertoli e espermatogônias, que estavam presentes em todos os estádios, diferentes arranjos de gerações de células germinativas foram observados em cada um dos 8 estádios e suas características são descritas a seguir.

Estádio I – Os núcleos das células de Sertoli apresentaram nucléolo bem desenvolvido e cromatina frouxa. Observou-se a presença de espermatogônias tipo-A próximas à lâmina basal, com núcleo de ovóide e citoplasma geralmente bem delimitado ao redor do núcleo. Espermatócitos primários em preleptóteno/leptóteno, apresentando núcleo esférico e bem corado estavam presentes no ambiente basal, sendo seguida por uma ou duas camadas de espermatócitos primários em paquíteno. A

principal característica deste estágio foi a presença de uma única geração de espermatídes, constituindo de 4 a 6 camadas no ambiente adluminal. Estas células apresentavam núcleos redondo, escuro e menor que os demais tipos celulares observados (Figura 1 A).

Estádio II – Espermatogônias tipo-A e células de Sertoli apresentaram características muito semelhantes às observadas no estágio anterior. Os espermatócitos primários em preleptóteno/leptóteno e em paquíteno continuaram presentes, e neste estágio observou-se o início do alongamento das espermatídes, orientando-se em direção ao núcleo das células de Sertoli (Figura 1 B).

Estádio III – Espermatócitos primários em leptóteno e em zigóteno juntamente com as espermatogônias tipo-A e os núcleos das células de Sertoli constituíam o ambiente basal. Espermatócitos com núcleos grandes típicos de diplótenos estavam presentes na região intermediária do epitélio seminífero. Os núcleos de espermatídes continuaram a alongar-se e formarem feixes inseridos profundamente no epitélio seminífero, com a cabeça orientada para o ambiente basal (Figura 1 C).

Estádio IV – Este estágio foi caracterizado pela presença de figuras de divisão meiótica (Figura 1 D). Observou-se que esta etapa de divisão ocorreu gradativamente, sendo possível encontrar uma mesma secção transversal de túbulo no estágio IV, ninhos de diplótenos seguidos por espermatócitos primários em metáfase seguidos de grupos de espermatócitos secundários. Feixes de espermatídes alongadas estavam presentes próximos ao lume tubular (Figura 1 D).

Estádio V – Duas gerações distintas de espermatídes estavam presentes: As arredondadas recém-formadas e as espermatídes em avançado estágio de alongamento, apresentando-se em feixes mais numerosos inseridos em criptas do citoplasma das células de Sertoli. Um claro aumento no número de espermatogônias foi observado próximo à membrana basal, e espermatócitos primários em zigóteno e em paquíteno foram observados no ambiente adluminal do epitélio (Figura 1 E).

Estádio VI – Células provenientes de espermatogônias do tipo-A com núcleos menores e mais escuros estavam presentes na base do túbulo, indicando espermatogônias intermediárias. Espermatócitos primários em zigóteno foram menos numerosos, e os demais tipos celulares observados no estágio anterior estavam presentes e em posicionamento similar. Os feixes de espermatídes alongadas se mostraram mais próximos ao lume tubular (Figura 1 F).

Estádio VII – Estiveram presentes espermatogônias intermediárias e do tipo-B, localizadas na base do epitélio, e núcleos de espermatócitos primários em paquíteno

ocupavam a região intermediária do epitélio. As espermátides alongadas apresentaram-se praticamente dissociadas e localizadas ainda mais próximas ao lume tubular que no estágio anterior (Figura 1 G).

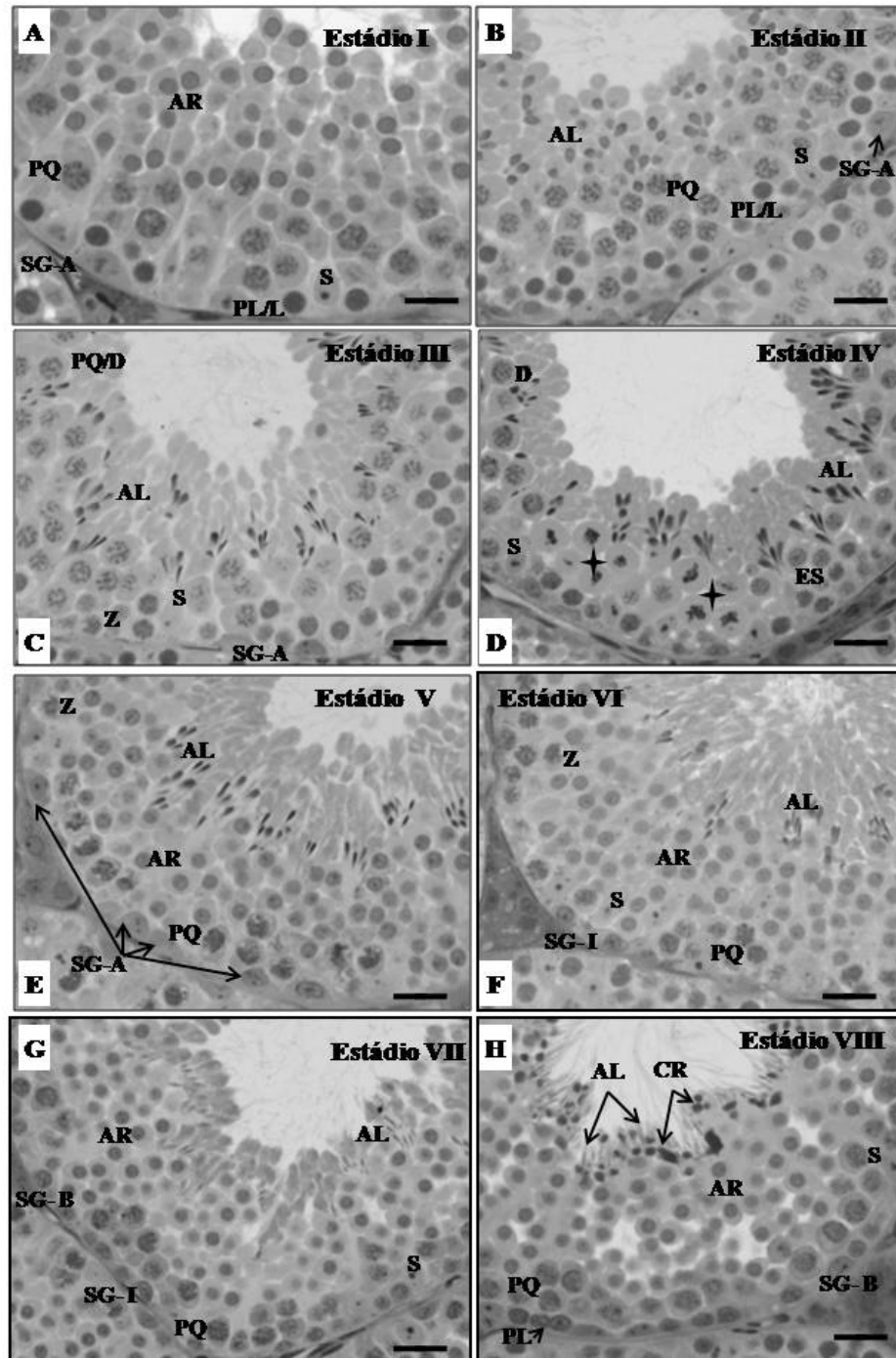


Figura 1. Estádios I a VIII de (A a H) do CES em *A. cursor* e suas respectivas figuras celulares: espermatogônia Tipo-A (SGA); Espermatogônia intermediária (SGI); Espermatogônia Tipo-B (SGB); preleptóteno /leptóteno (PL/L), preleptóteno (PL), leptóteno (L) zigóteno (Z), paquíteno (PQ), espermátides arredondadas (AR),

espermátide alongada (AL) e células de Sertoli (S); Corpos residuais (CR) Estrela= figuras de divisão meiótica; Barras=18µm.

Estádio VIII – Células de Sertoli, espermatogônias do tipo B e espermatócitos primários em preleptóteno são observados próximos à lâmina basal. Espermatócitos em paquíteno ocupam o ambiente adluminal do epitélio, seguidos de espermátides arredondadas. As espermátides alongadas estão totalmente dissociadas e aderidas apenas à borda luminal sendo evidenciados corpos residuais na mesma região (Figura 1 H).

A frequência relativa de cada um dos 8 estádios do CES acima descritos para *A. cursor* é apresentada na Figura 2 e usualmente, estes estádios são agrupados em três fases: pré-meióticas, meiótica e pós-meiótica. A maioria dos animais domésticos tem frequência mais elevada na fase pré-meióticas, em relação à fase pós-meiótica (França e Russell, 1998). Entretanto, em *A. cursor* estas fases representaram respectivamente 44,13%, 6,75% e 49,13%, sendo a fase pré-meióticas mais curta que a pós-meiótica. Considerando-se que a maior frequência de um determinado estágio indica que este tem uma duração mais longa dentro do CES (Morais et al. 2013), é possível relacionar a prevalência da fase posmeiótica em *A. cursor* a alta frequência relativa do estágio VIII que representou 21,13% (Figura 2). É importante considerar que, embora a frequência relativa dos estádios do CES seja constante entre indivíduos da mesma espécie (Amann, 1962; Courot et al. 1970; Clermont, 1972, Ortavant et al. 1977), ela é, assim como a duração do CES, uma constante espécie específica controlada pelo genótipo das células germinativas (França et al. 1998), e portanto, diferenças entre as frequências das fases é relativamente comum entre espécies.

A bromodeoxiuridina é incorporada pelo núcleo das células germinativas que estão realizando síntese de DNA no momento da aplicação, especialmente espermatogônias e espermatócitos primários em preleptóteno/leptóteno no estágio I do ciclo do epitélio seminífero. Assim, através da coleta de fragmentos de testículo em intervalos bem definidos de tempo após o tratamento, é possível estimar o percentual do ciclo percorrido e assim determinar a sua duração (Balarini et al. 2011) (Figura 2).

Neste estudo, as células marcadas que apresentavam maior progressão no epitélio seminífero de *A. cursor* foram espermatócitos primários em preleptóteno/leptóteno no estágio II terminal do CES (Figura 3). Dentro de 24 horas, houve uma progressão de 23,5% (frequência média das Fases 1-2) do CES. Portanto, a duração de cada ciclo correspondeu a 4,26 dias. Considerando-se que 4,5 CES são

necessários para completar todos os processos de espermatogênese, a duração total da espermatogênese em *A. cursor* foi estimada em 19,15 dias. Esta duração é considerada bastante curta, principalmente quando comparada à maioria dos mamíferos, que varia entre 7 e 14 dias por ciclo, e de 30 a 75 dias no total (França e Russell, 1998; Leal e França, 2006; Hess e França 2007).

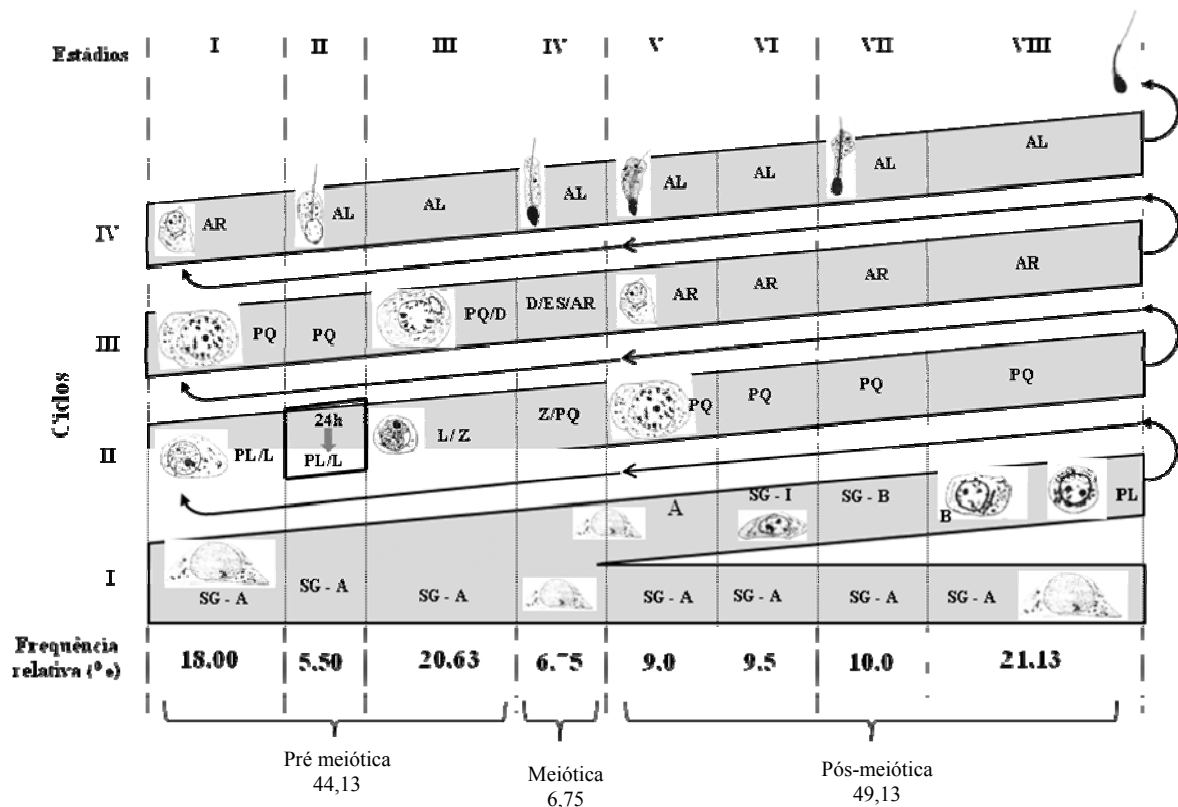


Figura 2. Diagrama do processo de espermatogênico de *A.cursor*, onde cada linha corresponde a uma geração de células e cada coluna corresponde a um dos 8 estádios do CES. Espermatogônia tipo A (SG - A), espermatogônia intermediária (SG - I) espermatogônias tipo-B (SG - B); espermatócitos primários em: preleptóteno (Pl); préleptóteno/leptóteno (PL/L); leptóteno (L), zigóteno (Z), paquíteno (PQ) e diplóteno (D); espermatócito secundário (ES); espermátides arredondadas (AR); espermátides alongadas (AL). Em destaque está representada a progressão celular (seta) 24h após o tratamento com bromodeoxiuridina. O maior avanço encontrado foi de espermatócitos primários em preleptóteno/leptóteno no estágio II terminal.

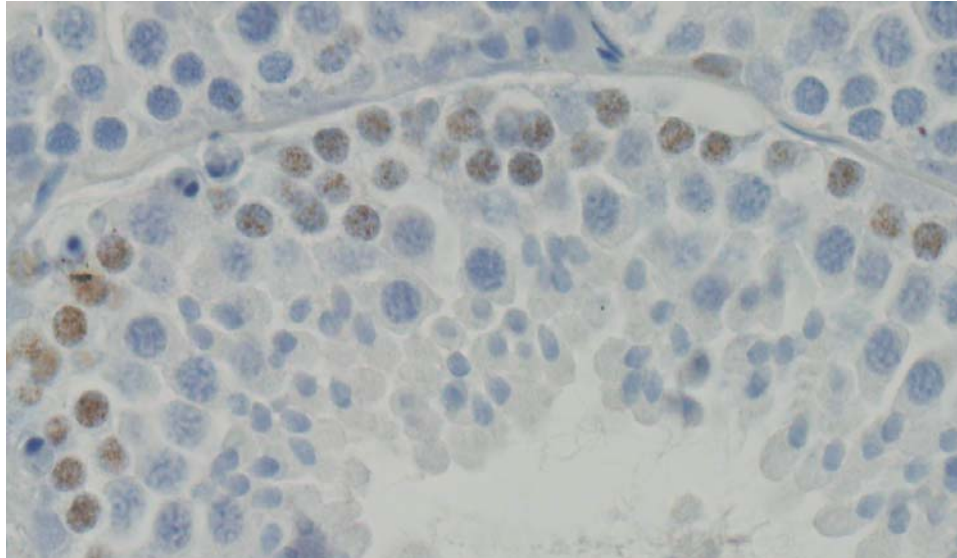


Figura 3. Túbulo seminífero de *A. cursor* no estágio II terminal do SEC mostrando marcação dos espermatócitos primários em preleptóteno/leptóteno, após 24h de aplicação do Brdu.

O menor período de tempo já registrado havia sido para o roedor *Cletheriomys glareolus* com 6,7 dias (Grocock e Clark, 1976), mas recentemente foram relatados 3,45 dias para morcegos *Sturnira lilium* (Morais et al. 2013), sendo este considerado o menor período registrado em mamíferos. Em estudo realizado com *A. cursor*, Cordeiro Jr. (2009) relata a duração do ciclo como sendo de 8,4 dias e 37,9 dias no total, o que corresponde praticamente ao dobro dos valores aqui relatados. As diferenças entre as metodologias utilizadas, como a utilização de imunohistoquímica em substituição à timidina triciada e a classificação dos CES segundo o método da morfologia tubular em substituição ao método acrossômico poderiam justificar diferenças nos resultados, embora menos acentuadas. Outra justificativa seria o fato de Cordeiro Jr. (2009) ter se baseado na observação da marcação mais avançada 20 dias após a aplicação do marcador, o que de acordo com a duração descrita no presente trabalho, já seria a fase final de espermição.

Considerando-se que há uma correlação entre tamanho corporal e investimento energético na reprodução (Kenagy e Trombulak, 1986), e que maior investimento energético pode aumentar a velocidade do ciclo celular e a proliferação tecidual (Schmidt-Nielsen, 1984; Calder, 1984; Peters, 1983), intervalos mais curtos para detecção de progressão de células marcadas no epitélio seminífero, principalmente em espécies de menor porte, se fazem necessários.

A população celular corrigida do estágio I do CES de *A. cursor* é apresentada na Tabela 2. A fase de proliferação da espermatogênese é decisiva para a quantidade de espermatócitos primários que serão disponibilizados para a prófase meiótica. O rendimento mitótico das espermatogônias é variável entre espécies e uma grande perda celular é observada (65-75%) (França e Russell, 1998). Em *A.cursor* 14,39 (Tabela 3) espermatócitos primários em preleptóteno são produzidos a partir de cada espermatogônias do tipo-A, o que está de acordo com o intervalo observado para a maioria dos animais domésticos, que varia 14,6 a 24,8 células (França e Russell, 1998).

A prófase meiótica é longa e claramente observada sendo seguida por duas divisões rápidas, resultando na produção de quatro células haplóide, as espermátides (Russell et al. 1990). Perdas pouco significativas são observadas durante a prófase meiótica em mamíferos domésticos (França e Russell, 1998), e é normalmente durante as duas divisões meióticas que as maiores perdas celulares ocorrem na maioria dos mamíferos (Roosen-Runge, 1973; França e Russell, 1998, França et al, 1999).

Tabela 2. População celular corrigida por secção transversal de túbulo, no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero de *A. cursor*.

<b>Animals</b>	<b>SG A</b>	<b>PL</b>	<b>PQ</b>	<b>AR</b>	<b>S</b>
Média	± 2.22	±	28.90	± 69.66	± 5.01±
*DP	0.35	31.96 ± 2.97	2.62	15.32	0.27
** CV (%)	15.79	9.28	9.08	21.99	5.38

SG-A (espermatogônia do tipo A); PL (espermatócito primário em preleptóteno); PQ (espermatócito primário em paquíteno); AR (espermátides arredondadas); CS (células de Sertoli). \*DP desvio padrão  
 \*\*Coeficiente de variação

Geralmente, em mamíferos, esta perda é de cerca de 25%, ou seja, para cada quatro espermátides arredondadas esperadas, três devem ser formados (França e Russell, 1998). Em *A.cursor* 2,41 espermátides são produzidas durante o processo meiótico (Tabela 3), estando este valor dentro da amplitude relatada para muitos animais domésticos e silvestres já estudados que é de 1,90 a 3,62 células (França e Russell, 1998; Guião-Leite e Paula, 2003; Bittencourt et al. 2004; Barros et al. 2007; Costa et al. 2007; Azevedo et al. 2010; Costa et al. 2010a; Costa et al. 2011).

O rendimento geral da espermatogênese, que mensura a eficiência deste processo como um todo a partir da população de espermátides arredondadas, foi de

31,38 espermátides arredondadas produzidas a partir de cada espermatogônia A (Tabela 3). Esse dado está condizente com o observado em diversos mamíferos domésticos (26,2-74,2 - França e Russell, 1998) e maior que o observado em roedores silvestres de maior porte como a paca e a capivara (19,8 e 21,12 – Carretta Jr. 2012), e de mesmo porte como *Hylaeamys megacephalus* (20,12 – Melo et al. 2013). A confiabilidade deste índice como avaliação da produção de espermatozóides se baseia no fato de que perdas durante o processo espermiogênico são consideradas pequenas e não significativas (Amann, 1970; Berndtson, 1977; Russell e Peterson, 1984; Johnson et al. 2000).

Tabela 3. Rendimento intrínseco da espermatogênese de *A. cursor*.

<b>Parâmetros</b>	<b>Média ± DP*</b>	<b>CV**(%)</b>
CEME	14.39±2,84	19.11
RGE	31.38±9,34	29.00
RM	2.41±0,37	15.35

CEME= coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais; RGE= rendimento geral da espermatogênese; RM= rendimento meiótico. \*DP=desvio padrão \*\*CV=coeficiente de variação

As interações entre a célula de Sertoli e as células germinativas são fundamentalmente importantes para a manutenção de uma produção espermática normal (Griswold, 1995). A célula de Sertoli executa algumas funções primordiais na morfofisiologia da espermatogênese porque promove sustento físico das células germinativas e, por isso, o número de células de Sertoli por testículo é um fator determinante para a produção espermática e o tamanho dos testículos (França e Russell, 1998). A célula de Sertoli tem capacidade de suporte relativamente fixa em cada espécie, e pelo fato de sua população não crescer após a puberdade e ao longo das diferentes estádios do CES, ela funciona como uma estrutura funcional quantitativa para avaliar o processo espermatogênico de uma determinada espécie (Russell e Peterson, 1984; Orth et al. 1988; França e Russell, 1998).

Em *A.cursor*, cada célula de Sertoli é capa de sustentar em média 26,67 células germinativas (Tabela 4), valor aproximado ao observado em paca e cutia (22,09 e 24,36 - Carretta Jr. 2012) e *Hylaeamys megacephalus* (22,44 – Melo et al. 2013). Quanto à capacidade de suporte das células de Sertoli em relação às espermátides arredondadas, observou-se que *A.cursor* foi capaz de manter cerca de 14 destas células

(Tabela 4), próximo ao valor encontrado em cutia e paca (Carretta Jr. 2012). O número de células de Sertoli por testículo e por grama de testículo foi, respectivamente de  $7 \times 10^6$  e  $48 \times 10^6$  (Tabela 4), sendo que este último é um dado mais acurado para comparações entre espécies. Assim, esse número em *A. cursor* foi maior que em vários mamíferos cuja média é de  $25 \times 10^6$  células de Sertoli por grama de testículo (França e Russell, 1998; Costa et al. 2011), mas muito próximo ao observado em outro roedor silvestre, o *T. moojeni* ( $50 \times 10^6$  – Cordeiro Jr. et al. 2010). Apesar de se apresentar menor que os valores registrados para *Hylaeamys megacephalus* (95,28 – Melo et al. 2013) entende-se que valores elevados para a quantidade de células de Sertoli podem ser uma tendência deste grupo.

O cálculo da RET quantifica o número potencial de espermatozóides em produção no testículo ou por grama de testículo, a cada ciclo do epitélio seminífero de uma determinada espécie (Amann e Lambiase, 1969; Berndtson, 1977). Em *A. cursor* a RET encontrada por testículo e por grama de testículo foi de  $102 \times 10^6$  e  $608 \times 10^6$ , respectivamente (Tabela 4). Utilizando-se a RET por grama de testículo para comparações interespecíficas, observou-se que os valores aqui encontrados foram maiores que a média encontrada em leões africanos ( $103,8 \times 10^6$  – Barros et al. 2007), puma ( $268 \times 10^6$  – Guião-Leite e Paula, 2003), e na maioria dos animais domésticos ( $120-260 \times 10^6$  - França e Russell, 1998), mas relativamente próxima ao valor encontrado em cutia  $674 \times 10^6$  (Carretta Jr. 2012).

Embora a reserva testicular por grama de testículo seja válida em comparações interespecíficas, deve-se lembrar de que esta variável é relativa à duração de um CES, que é uma constante biológica espécie específica (Ortavant et al. 1977; Amann e Schanbacher, 1983). Assim, dividindo-se a reserva espermática pela duração do CES é possível calcular a produção espermática diária (PED). Em *A. cursor* a PED encontrada foi de  $24 \times 10^6$  células por testículo e  $142 \times 10^6$  células por grama de testículo (Tabela 4).

A PED em *A. cursor*, em trabalho desenvolvido por Cordeiro Jr. (2009), foi respectivamente de  $18,5 \times 10^6$  e  $65,9 \times 10^6$  células por testículo e por grama de testículo, valores bem abaixo aos observados neste estudo. Tal resultado já era esperado, pois a duração obtida por Cordeiro Jr. (2009) foi quase o dobro do valor encontrado no presente estudo, o que justifica a diferença.

A PED observada em *A. cursor* foi maior que as  $115 \times 10^6$  células por grama de testículo observadas em cutia (Carretta Jr. 2012), estando bem acima do descrito para espécies com alta eficiência espermatogênica, incluindo-se aí animais domésticos

como o suíno, equino, ovino e o coelho (França e Russell, 1998). Dentre os fatores que contribuem para uma alta eficiência espermatogênica destacam-se, principalmente, a curta duração da espermatogênese, os elevados índices de célula de Sertoli e sua quantidade por testículo e a alta densidade volumétrica de túbulos seminíferos (França e Russell, 1998), sendo todos esses fatores destacados na espermatogênese de *A. cursor*.

Tabela 4. Índices de células de Sertoli (ICS), número de células de Sertoli por testículo e por grama de testículo, reserva espermática testicular (RET) e produção espermática diária (PED) de *A. cursor*.

<b>Parâmetros</b>	<b>Média ± DP*</b>	<b>CV**(%)</b>
ISC/espermátide arredondada	14.05±3.84	27.38
ISC/célula germinativa	26.67±4.58	17.18
Célula de Sertoli por testículo	7x10 <sup>6</sup> ± 1x10 <sup>6</sup>	24,81
Célula de Sertoli por grama de testículo	48x10 <sup>6</sup> ±12x10 <sup>6</sup>	24,81
RET por testículo	102x10 <sup>6</sup> ±30 x10 <sup>6</sup>	29,99
RET por grama de testículo	608x10 <sup>6</sup> ± 68x10 <sup>6</sup>	11,26
PED por testículo	24x10 <sup>6</sup> ±7x10 <sup>6</sup>	29,99
PED por grama de testículo	142x10 <sup>6</sup> ±16 x10 <sup>6</sup>	11,26

\*DP=desvio padrão \*\*CV=coeficiente de variação

#### **4. Conclusões**

A espécie *A. cursor* pode ser classificada entre as de maior eficiência espermatogênica dentre os mamíferos já investigados. Esta eficiência está principalmente relacionada à curta duração do CES, que foi uma das menores já relatadas entre os mamíferos. O sistema de acasalamento e outras estratégias reprodutivas também podem estar relacionados à elevada eficiência reprodutiva desta espécie.

#### **Referências Bibliográficas**

- [19] Abercrombie M (1946) Estimation of nuclear populations from microtome sections. *Anat Rec.* 94, 239-247.
- [20] Amann RP (1962) Reproductive capacity of dairy bulls. IV Spermatogenesis and testicular germ cell degeneration. *Am J Anat.* 110(1),69 -78.
- [57] Amann RP, Lambiase JT (1969) The male rabbit III. Determination of daily sperm production by means of testicular homogenates. *J Anim Sci.* 28, 369-374.
- [58] Amann RP, Schanbacher BD (1983) Physiology of male reproduction. *J Anim Sci Suppl;* 57: 380-403.
- [52] Amann RP (1970) Sperm production rates. In: Johnson, AD, Gomes,WR, Vandemark, NL (Editors), *The Testis.* Academic Press, New York; pp. 433–482.
- [50] Azevedo MHF, Paula TAR, Matta SLP, Fonseca CC, Costa EP, Costa DS, Peixoto JV (2010) Cell population indexes of spermatogenic yield and testicular sperm reserves in adult jaguars (*Panthera onca*). *Anim Reprod Sci;* 118, 83-88.
- [17] Balarini, MK, Paula, TAR, Matta, SLP, Peixoto, JV, Guião-Leite, FL, Rossi Júnior, JL, Czermak Jr, AC, Walker, NJ (2011) Stages and duration of the cycle of the seminiferous epithelium in oncilla (*Leopardus tigrinus*, Schreber, 1775). *Theriogenology;* 77-5,873-880.
- [48] Barros JBG, Paula TAR, Matta SLP, Fonseca CC, Guião-Leite FL, Rossi JL, Oliveira PC, Costa EP (2007) Sertoli cell index and spermatid reserves in adult captive african lions (*Panthera leo*, Linnaeus, 1758). *Anim Reprod Sci;* 102, 350-356.
- [27] Barros MS, Morais DB, Araújo MR, Carvalho TF, Matta SLP, Pinheiro EC, Freitas MB (*In press*) Seasonal variation of energy reserves and reproduction in neotropical free-tailed bats *Molossus molossus* (Chiroptera: Molossidae) *Brazilian Journal of Biology.* Expected date for publication: August 2013, v 73.3.
- [18] Berndtson WE (1977) Methods for quantifying mammalian spermatogenesis:A review. *J Anim Sci;*44:818–83.
- [47] Bittencourt VL, Paula TAR, Matta SLP, Fonseca CC, Neves MTD, Costa MEL, Malta MCC, Coelho CM, Bastos, JAB (2004) Evaluation of the cell population of the seminiferous epithelium and s index indicative of sperm production through testicular biopsy in maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1811) adult. *Rev Bras Reprod Anim;* 28 (2), 108-113.
- [4] Bonvicino CR, Oliveira JÁ, D’Andrea OS (2008) Guia dos roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos [Guide rodents in Brazil, with keys to genera based on external characters]. Rio de Janeiro: Centro Pan-

Americano de Febre Aftosa - OPAS/OMS [Pan American Foot and Mouth Disease - OPAS/OMS] 120 p.

[24] Caldeira BC, Paula TAR, Matta SLP, Balarini MK, Campos PKA (2010) Morfometria testicular e de túbulo seminífero do cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*, Linnaeus, 1766) adulto [testicular morphometry and the seminiferous tubule of the crabgrass (*Cerdocyon thous* Linnaeus, 1766) adult] *Ceres*;57:569–75.

[42] Calder WA (1984) Size, Function, and Life History. Cambridge: Harvard University Press.

[51] Carretta-Junior M (2012) Estudo comparativo do processo espermatogênico e duração do ciclo do epitélio seminífero através da técnica de imunohistoquímica com bromodeoxiuridina de três diferentes espécies de roedores da subordem hystricomorfa: cutia (*Dasyprocta leporina*), paca (*Cuniculus paca*) e capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) [Comparative study of spermatogenesis, and duration of seminiferous epithelium cycle through technical immunohistochemistry with bromodeoxyuridine in three different species of rodent the suborder hystricomorfa: *Dasyprocta leporina*, *Cuniculus paca* And *Hydrochoerus hydrochaeris*]. PhD thesis, Viçosa-MG; Federal University of Viçosa,131pp.

[37] Clermont Y (1972) Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev*; 52, 198-236.

[40] Cordeiro-Jr DA (2009) Estrutura e Função Testiculares em Roedores Silvestres das Famílias Echimyidae (*Trinomys moojeni*) e Cricetidae (*Akodon cursor*, *Akodon montensis*, *Necomys lasiurus* e *Oligoryzomys migripes*), da Reserva Particular do Patrimônio Natural do Caraça - MG [Testicular Structure and Function in Rodents Wild of Families Echimyidae (*Trinomys moojeni*) and Cricetidae (*Akodon cursor*, *Akodon montensis*, *Necomys lasiurus* e *Oligoryzomys migripes*), of Private Reserve of Natural Heritage of Caraça – MG]. Ph.D. Thesis. Belo Horizonte; Federal University of Minas Gerais.

[28] Cordeiro-Jr DA, Costa GM, Talamoni SA, França LR (2010) Spermatogenic efficiency in the spiny rat, *Trinomys moojeni* (Rodentia: Echimyidae). *Anim Reprod Sci*; 119(1-2):97-105.

[49] Costa DS, Menezes CMC, Paula TAR (2007) Spermatogenesis in white-lipped peccaries (*Tayassu pecari*). *Anim Reprod Sci*; 98, 322-334.

[35] Costa GMJ, Chiarini-Garcia H, Morato RG, Alvarenga RL, França LR (2008) Duration of spermatogenesis and daily sperm production in the jaguar (*Panthera onca*). *Theriogenology*; 70:1136–46.

- [26] Costa GMJ, Leal MC, Ferreira ACSF, Guimarães DA, França LR (2010b) Duration of spermatogenesis and spermatogenic efficiency in two large neotropical rodent species: the agouti (*Dasyprocta leporina*) and paca (*Agouti paca*). *J Androl*; 31 (5), 489-499.
- [33] Costa GMJ, Leal MC, Silva JV, Ferreira ACSF, Guimarães DA, França LR (2010a) Spermatogenic cycle length and sperm production in a feral pig species (Collared Peccary, *Tayassu tajacu*). *J Androl*; 31 (2) 221-230.
- [16] Costa KLC, Matta SLP, Gomes MLM, Paula TAR, Freitas KM, Carvalho FAR, Silveira JA, Dolder H, Mendis-Handagama SLMC (2011) Histomorphometric evaluation of the neotropical brown brocket deer *Mazama gouazoubira* testis, with emphasis on cell population indexes of spermatogenic yield. *Anim. Reprod. Sci*; 127:202–212.
- [8] Courot M, Hochereau-De-Reviere MT, Ortavant R (1970) Spermatogenesis. In: Johnson AD, Gomer WR, Vandemark NL (Editors). *The Testis*. Academic Press, New York, p 399 -432.
- [5] Duarte APG (2003) Aspectos reprodutivos de *Akodon montensis* (Rodentia, Muridae) e *Artibeus lituratus* (Chiroptera, Phyllostomidae) em áreas de floresta no sudeste do Brasil [Reproductive aspects of *Akodon montensis* (Rodentia, Muridae) and *Artibeus lituratus* (Chiroptera, Phyllostomidae) in areas of forest in southeastern Brazil]. 52p. Dissertation (MSc in Zoology).PUC-Minas.
- [10] Fagerholm, P, Hamberg-Nyström, H, Tengroth, B (1994) Wound healing and myopic regression following photorefractive keratectomy. *Acta Ophthalmologica (Copen)*; 72 (2)229-234.
- [6] Fonseca GAB, Herrmann G, Leite YLR, Mittermeier RA, Rylands AB, Patton JL (1996) Lista anotada dos mamíferos do Brasil [Annotated list of mammals of Brazil]. *Occas Pap Conserv Biol*, 4:1-38.
- [38] França LR, Ogawa T, Avarbock MR, Brinster RL, Russell LD (1998) Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biol Reprod*;59:1371–7.
- [29] França LR, Russell LD (1998) The testis of domestic animals. In: Martínez F, Regadera J, editors. *Male Reproduction. A multidisciplinary overview*. Madrid, Spain: Churchill Livingstone; 197–219.
- [45] França LR, Becker-Silva SC, Chiarini-Garcia H (1999) The length of the cycle of seminiferous epithelium in goats (*Capra hircus*). *Tissue Cell*;31, 274–280.

- [46] Guião-Leite FL, Paula TAR (2003) Intrinsic efficiency of spermatogenesis, the Sertoli cell index and daily sperm production of the puma (*Puma concolor*) adult. *Rev Bras Reprod Anim*; 27(1) 21 -26.
- [55] Griswold MD (1995) Interaction between germ cells and Sertoli cells in the testis. *Biol Reprod*; 52, 211–216.
- [39] Grocock CA, Clark JR (1976) Duration of spermatogenesis in the vole (*Microtus agrestis*) and the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *J Reprod Fertil*;47:133–5.
- [32] Hess RA, França LR (2007) Spermatogenesis. Cycle of the seminiferous epithelium. In: Cheng CY, editor. *Molecular mechanisms in spermatogenesis*. Austin: Landes Bioscience; p. 1–15.
- [15] Johnson L, Petty CS, Neaves WB (1981) A new approach to qualification of spermatogenesis and its applications to germinal cell attrition during human spermatogenesis. *Biol Reprod*;25: 217–26.
- [54] Johnson L, Varner DD, Roberts ME, Smith TL, Keillor GE, Scruchtfield WL (2000) Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. *Anim Reprod Sci*; 60-61,471-480.
- [13] Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J Cell Biol*; 27, 137.
- [21] Kenagy GJ, Trombulak SC (1986) Size and function of mammalian testes in relation to body size. *J Mamm*;67:1–22.
- [2] Lage RR, Schmidt EMS. Rodentia – Roedores Silvestres (Capivara, Cutia, Paca, Ouriço), [Wild rodents (Capybara, Agouti, Paca, hedgehog)]. In: Cubas ZS, Silva JCR, Catão-Dias JL, editors. *Tratado de animais selvagens–Medicina Veterinária [Treaty of wildlife– Veterinary Medicine]*. Roca; 2006, pp. 475-491
- [34] Leal MC, França LR (2006) The seminiferous epithelium cycle length in the black tufted-ear marmoset (*Callithrix penicillata*) is similar to humans. *Biol Reprod*; 74, 616-624.
- [25] Leal MC, França LR (2008) Postnatal Sertoli and Leydig cell proliferation and the establishment of puberty and sexual maturity in *Chinchilla lanigera* (Rodentia, Chinchillidae). *Reprod Fertil Dev*; 20, 665–673.
- [30] Melo FC, Sousa TP, Costa KLC, Matta SLP, Melo FR, Santa-Rita RM (2013) Descriptive morphometry and stereology of the tubular compartment in the wild rodent *Hylaeamys megacephalus* (Rodentia: Cricetidae) from Central Brazil. *Anim Reprod Sci*, *In press*.

- [36] Morais DB, Paula TAR, Barros MS, Balarini MK, Freitas MBD, Matta SLP (2013) Stages and duration of the seminiferous epithelium cycle in the bat *Sturnira lilium*. *J Anat*; 222:3, 372–379.
- [1] Nowak RM (1999) Walker's mammals of the world. 6° ed. Vol 2. London: Johns Hopkins University Press, 1053-1062.
- [3] Oliveira JA, Bonvicino CR (2006) Ordem Rodentia [Order Rodentia]. In: Reis NR, Peracchi AL, Pedro WA, I.P. Lima, editors. Mamíferos do Brasil [Mammals of Brazil]. Press UEL, Londrina, PR. p. 347-406.
- [9] Ortavant R, Courot M, Hochereau-De-Reviers MT (1977) Spermatogenesis in domestic mammals. In: Cole HH, Cupps PT (editors). *Reproduction in Domestic Animals*. Academic Press, New York, 203 -227.
- [56] Orth JM, Gunsalus GL, Lamperti AA (1988) Evidence from Sertoli cell - depleted rats indicates that spermatids number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology*; 122, 787-794.
- [22] Paula TAR, França LR, Garcia HC (1999) Seminiferous epithelium cycle and its duration in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris* ). *Tissue Cell*; 31(3), 327-334.
- [23] Paula TAR, Matta SLP, Costa DS (2002) Avaliação histológica e quantitativa do testículo de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris* ) adultas. *Biosci J*; 18 (1) 121-136.
- [43] Peters RH (1983) *The Ecological Implications of Body Size*. Cambridge; Cambridge University Press.
- [14] Rasband WS. Image J, US; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA. Available at: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.
- [7] Roosen-Runge EC, Giesel LO Jr (1950) Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. *Am J Anat* 87, 1–30.
- [44] Roosen-Runge EC (1973) Germinal-cell loss in normal metazoan spermatogenesis. *J Reprod Fertil*; 35, 339–348.
- [31] Roosen-Runge EC (1977) *The process of spermatogenesis in animals*. Cambridge: University Press.
- [11] Rosiepen G, Arslan M, Clemen G, Nieschlag E, Weinbauer GF(1997) Estimation of the duration of the cycle of the seminiferous epithelium in the non-human primate *Macaca mulatta* using the 5-bromodeoxyuridine technique. *Cell Tiss Research*; 288:365- 369.
- [53] Russell LD, Peterson RN (1984) Determination of the elongate spermatid - Sertoli cell ratio in various mammals. *J Reprod Fertil*; 70, 635 -641.

[41] Schmidt-Nielsen KS (1984) Why Is Animal Size So Important? Cambridge: Cambridge University Press.

[12] Wildt DE (2005) Lions, Tigers, and Pandas, Oh My. J Androl; 26(4):452-454, July/August.

### Artigo 3

#### **Histomorfometria dos componentes do tecido intertubular dos roedores silvestres *Akodon cursor* e *Oligoryzomys nigripes* (RODENTIA: Cricetidae)**

##### **Resumo**

A porção endócrina dos testículos é representada pelas células de Leydig que, juntamente com células conjuntivas como fibroblastos e macrófagos, vasos sanguíneos e linfáticos, formam o tecido intertubular. A distribuição e a proporção destes componentes no testículo de mamíferos variam, formando arranjos que auxiliam na drenagem de testosterona para fora do testículo e na manutenção do seu nível testicular. Em *O. nigripes* e *A. cursor* o padrão de organização destes elementos apresentou células de Leydig isoladas ou agrupadas, geralmente associadas ao tecido conjuntivo e vasos sanguíneos, separadas dos túbulos seminíferos por espaço linfático. O componente mais abundante no intertúbulo de *O. nigripes* e *A. cursor* foi a célula de Leydig representando, respectivamente, 65,97 e 67,15 % do intertúbulo. As proporções de núcleo e citoplasma dessa célula foram, respectivamente, 21,89% e 78,11% em *O. nigripes* e 21,52% e 78,48% em *A. cursor*, e o volume individual dessa célula foi, respectivamente, de 804,60 e 858,7  $\mu\text{m}^3$ . Relacionando-se o volume de uma célula com o volume total ocupado pelo seu conjunto nos testículos foram estimadas populações totais de  $3 \times 10^6$  células em *O. nigripes* e  $11 \times 10^6$  células em *A. cursor*, representando respectivamente  $25 \times 10^6$  e  $38 \times 10^6$  células por grama de testículo. O índice Leydigossomático (ILS), foi de 0,026% e 0,044% respectivamente para *O. nigripes* e *A. cursor*.

**Palavras-chave:** Células de Leydig, morfometria, espaço intersticial.

### Paper 3

#### **Histomorphometry of intertubular tissue components of wild rodents *Akodon cursor* and *Oligoryzomys nigripes* (Rodentia: Cricetidae)**

##### **Abstract**

The endocrine portion is represented by testicular Leydig cells, which together with connective cells such as fibroblasts and macrophages, blood and lymph vessels, form the intertubular tissue. The distribution and proportion of these components in varying testicle mammals, forming arrays which assist in draining out of testosterone in the testes and testicular maintaining its level. In *O. nigripes* and *A. cursor* the pattern of organization of these elements presented Leydig cells isolated or grouped generally associated with connective tissue and blood vessels, separated from seminiferous tubules by lymphatic space. The most abundant component of the intertubule of *O. nigripes* and *A. cursor* was Leydig cell representing respectively 65.97 and 67.15% of intertúbulo. The proportions of this cell nucleus and cytoplasm were respectively 21.89% and 78.11% in *O. nigripes* and 21.52% and 78.48% in *A. cursor*, and the individual volume of this cell was, respectively, 804.60 and 858.7  $\mu\text{m}^3$ . Relating the volume of a cell with the total volume occupied by the whole testes were estimated total population of  $3 \times 10^6$  cells in *O. nigripes* and  $11 \times 10^6$  Cells in *A. cursor*, representing respectively  $25 \times 10^6$  and  $38 \times 10^6$  cells per gram of testis. The index leydigosomatic (ILS) was 0.026% and 0.044% respectively for *O. nigripes* and *A. cursor*.

**Keywords:** Leydig cells, morphometry, interstitial space.

## 1. Introdução

O conjunto das informações sobre a ecologia das espécies e das comunidades de pequenos mamíferos indica que pequenos roedores e marsupiais exercem influência importante na dinâmica das florestas Neotropicais e são bons indicadores, tanto de alterações locais do habitat como alterações da paisagem (Pizo, 1997; Sánchez-Cordero e Martínez-Gallardo, 1998; Vieira et al. 2003). As espécies *Oligoryzomys nigripes* e *Akodon cursor* são roedores de pequeno porte, endêmicos da Mata Atlântica (Fonseca et al. 1996; Bonvicino et al, 2008). Apesar da importância ecológica dos roedores, conhecimentos básicos sobre sua biologia e a fisiologia da reprodução são ainda muito limitados, especialmente aqueles relacionados aos parâmetros reprodutivos mais elementares (Wildt, 2005).

Os testículos dos mamíferos podem ser morfofuncionalmente divididos em dois compartimentos principais: o tubular ou espermatogênico e o intertubular ou androgênico. Enquanto no compartimento tubular estão localizadas as células da linhagem espermatogênica, no compartimento intertubular há predominância, na maioria dos mamíferos, das células de Leydig que apresentam importante função androgênica (Fawcett et al. 1973; Payne et al. 1996). Além das células de Leydig, o compartimento intertubular é composto por vasos sanguíneos e linfáticos e uma população variável de células no tecido conjuntivo como fibroblastos e macrófagos. Alguns autores descrevem grande variação no percentual volumétrico e no arranjo entre os componentes do intertúbulo nas diferentes espécies de mamíferos já estudados, e estas diferenças estão relacionadas à quantidade e disposição das células de Leydig, de tecido conjuntivo e da localização e distribuição dos vasos linfáticos (Fawcett *et al.* 1973; França e Russell, 1998).

Segundo Fawcett et al. (1973), a drenagem linfática, aliada à quantidade de células de Leydig e tecido conjuntivo frouxo no espaço intertubular, segue, em geral, três padrões distintos nas diferentes espécies de mamíferos: 1) espécies nas quais as células de Leydig e o tecido conjuntivo ocupam uma área muito pequena

no compartimento intertubular, contrastando com extensos sinusóides linfáticos ou espaços linfáticos interpostos aos túbulos seminíferos; 2) espécies que apresentam grupos de células de Leydig espalhados em abundante tecido conjuntivo frouxo edemaciado, o qual é drenado por um vaso linfático localizado central ou excentricamente no espaço intertubular; 3) espécies nas quais abundantes grupamentos de células de Leydig ocupam praticamente todo o compartimento intertubular, apresentando pouco tecido conjuntivo e vasos linfáticos.

Segundo estes autores, apesar do pouco conhecimento a respeito das implicações fisiológicas desses diferentes arranjos, eles provavelmente estariam relacionados com a habilidade dos vasos linfáticos de remover, dos testículos, substâncias vascularmente secretadas, além de manter as concentrações adequadas de andrógenos no testículo e nos vasos sanguíneos. A testosterona é responsável pela diferenciação dos órgãos genitais masculinos e da genitália externa na fase fetal (Pelleniemi et al. 1996), pelo aparecimento de caracteres sexuais secundários, manutenção quantitativa da espermatogênese a partir da puberdade e pelo comportamento sexual (Sharpe, 1994). Deste modo, a quantificação dos elementos intersticiais, principalmente das células de Leydig, permite inferir sobre a dinâmica gonadal e até mesmo sobre a libido do animal, já que é a testosterona, seu principal produto de secreção, o hormônio responsável por desencadear, dentre outros fatores, o comportamento reprodutivo do animal (Payne et al. 1996; Ye et al. 2011).

O estudo da morfologia do espaço intertubular pode subsidiar maiores informações sobre a dinâmica circulatória dos fluidos testiculares, fundamentais tanto para manutenção de um nível fisiológico de andrógenos intratesticulares, requerido para o perfeito funcionamento do processo espermatogênico, quanto para o fornecimento de uma provisão regular de andrógenos séricos que influenciam diretamente no comportamento reprodutivo. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar o compartimento intersticial dos roedores silvestres *Oligoryzomys nigripes* e *Akodon cursor* de acordo com o arranjo de seus componentes no espaço intertubular testicular, além de quantificar os diferentes constituintes do espaço intertubular e determinar a sua volumetria.

## **2. Material e Métodos**

Foram utilizados 8 *Oligoryzomys nigripes* e 8 *Akodon cursor* machos, adultos, coletados em uma área de Mata Atlântica de cerca de 10 hectares (20°81'S,

42°85'W), localizada no Município de Viçosa na Zona da Mata Mineira. As coletas foram autorizadas pelo ICMBio (n° 22289-1) e foram feitas ao longo de um ano, utilizando-se armadilhas tipo Sherman, Tomahawk e Pitfall.

Após a captura, os animais foram levados ao Laboratório de Biologia Estrutural da Universidade Federal de Viçosa onde foram pesados, medidos e submetidos à eutanásia por superdosagem anestésica pela associação de cloridrato de xilazina (150 mg/kg) e cloridrato quetamina (10mg/kg) (Virbac do Brasil, São Paulo, SP, Brasil). Em seguida, os testículos foram removidos, pesados em balança de precisão e imediatamente imersos em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965) por um período de 24 horas. Posteriormente foram transferidos para álcool 70% permanecendo até o momento do processamento. Este experimento foi certificado pela comissão de ética para Uso de Animais (CEUA)/ UFV (Protocolo n° 083/2012).

Para análise histológica em microscopia de luz, fragmentos testiculares foram desidratados em série etanólica crescente procedendo-se a inclusão em glicol metacrilato (Historesin®, Leica. Leica Microsystems, Nussloch, Heidelberg, Germany). Foram obtidas secções semisseriadas de 3µm de espessura, em micrótomo rotativo Leica RM2255 (Leica Microsystems, Nussloch, Heidelberg, Germany), respeitando-se um intervalo de 40µm entre os cortes aproveitados. As preparações foram coradas com azul de toluidina / borato de sódio 1% e as análises morfométricas foram feitas utilizando o programa para análise de imagens *ImageJ* 1.43 (Rasband, 1997–2009, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA), aplicado em imagens capturadas em 10 e 40X, utilizando-se fotomicroscópio Olympus BX-40 (Olympus, Tokyo, Japan).

As proporções volumétricas entre túbulos seminíferos e intertúbulo foram estimadas contando-se 1.000 pontos projetados sobre 10 imagens para cada animal. O volume destes componentes foi estimado a partir do conhecimento do percentual ocupado pelos mesmos no testículo e do conhecimento do volume do parênquima testicular. Foram projetados 2.000 pontos sobre o compartimento intertubular, sendo registrados os pontos coincidentes sobre núcleo e citoplasma de células de Leydig, vasos sanguíneos, espaço linfático e tecido conjuntivo. Foram calculados os percentuais de cada componente no intertúbulo ( $n^{\circ}$  de pontos contados sobre o elemento  $\times 100 / 2000$ ) e nos testículos ( $\%$  intertúbulo  $\times \%$  do elemento no intertúbulo / 100). O volume que cada elemento ocupa no parênquima testicular foi

obtido multiplicando-se o percentual deste elemento no testículo pelo peso líquido testicular, dividindo-se este valor por 100.

Foi mensurado o diâmetro de 30 núcleos de células de Leydig escolhendo-se os núcleos que apresentavam contorno circular, cromatina perinuclear e nucléolos evidentes. Foram calculados os volumes nuclear (VN), citoplasmático (VC) e o volume de cada célula de Leydig por animal, sendo os valores expressos em  $\mu\text{m}^3$ . O volume nuclear foi obtido a partir da fórmula:  $\text{VN} = 4/3 \pi R^3$ , onde R = raio nuclear. Para cálculo do volume citoplasmático utilizou-se a fórmula:  $\text{VC} = \% \text{ citoplasma} \times \text{VN} / \% \text{ núcleo}$ . Finalmente o volume celular foi obtido somando-se o VN e o VC. Para cálculo do número total de células de Leydig (TCL) dividiu-se o volume total dessas células por parênquima testicular ( $\mu\text{m}^3$ ) pelo volume de cada célula ( $\mu\text{m}^3$ ). Para o cálculo do número destas células por grama de testículo dividiu-se TCL pelo peso gonadal total. O índice Leydigossomático (ILS) foi calculado a fim de se quantificar o investimento em células de Leydig em relação à massa corporal, utilizando-se a fórmula:  $\text{ILS} = \text{volume total de célula de Leydig} / \text{PC} \times 100$ , onde PC = peso corporal.

### 3. Resultados

Os pesos corporal e testicular, assim como os dados volumétricos dos componentes do parênquima testicular são mostrados na Tabela 1.

Em *O. nigripes* e *A. cursor* o padrão do arranjo dos elementos do intertúbulo segue o tipo I descrito por Fawcett et al. (1973), onde células de Leydig isoladas ou agrupadas e os vasos sangüíneos encontram-se separados dos túbulos seminíferos por um espaço linfático bem desenvolvido (Figura 1- A e B e Figura 2- A e B). O espaço linfático mostrou-se mais abundante em *A. cursor* representando 1,4% do parênquima testicular (Tabela 1).

Os dados referentes à volumetria e morfometria das células de Leydig, bem como o percentual do peso corporal referente a elas, estão apresentados na Tabela 2.

Nas espécies estudadas, o compartimento interubular foi predominantemente composto por células de Leydig, que apresentaram núcleo com formato usualmente arredondado e grande, com nucléolo bem evidenciado (Figura 1- A e B e Figura 2- A e B). Gotículas lipídicas foram mais evidentes no citoplasma das células de Leydig e, em ambas as espécies, o tecido conjuntivo pode ser identificado

formando uma malha frouxa entre as células de Leydig ou próximo à túnica própria que delimita o compartimento tubular. (Figura 1- A e B e Figura 2- A e B). Adicionalmente, os vasos sanguíneos puderam ser observados notando-se a presença de hemácias em alguns deles. Fibroblastos também foram visualizados, bem como fibras colágenas próximas a eles.

Tabela 1. Peso corporal, testicular total e do parênquima testicular, percentuais dos componentes do parênquima testicular e proporções volumétricas (PV) de células de Leydig, vasos sanguíneos, espaços linfáticos e tecido conjuntivo no intertúbulo, no testículo e seus volumes por parênquima testicular em *O. nigripes* e *A. cursor*. Média±DP.; n=8.

<b>Parâmetros</b>	<b><i>O.nigripes</i></b>	<b><i>A. cursor</i></b>
Peso corporal (g)	20,74 ± 4,03	43,86 ± 7,69
Peso testicular (g)	0,069 ± 0,019	0,162 ± 0,04
Peso do parênquima testicular (g)	0,066 ± 0,018	0,159 ± 0,04
Proporção volumétrica de túbulo (%)	93,78 ± 1,2	90,70 ± 4,59
Proporção volumétrica de intertúbulo (%)	6,22 ± 1,2	9,30 ± 4,63
Volume intertubular testicular (ml)	0,0082±0,0015	0,0288±0,005
PV no intertúbulo (%):		
Célula de Leydig	65,98 ± 2,18	67,15 ± 8,99
Tecido Conjuntivo	13,22 ± 2,89	8,83 ± 1,24
Vasos Sanguíneos	10,67 ± 1,19	8,82 ± 1,63
Vasos Linfáticos	10,13 ± 4,49	15,20 ± 1,20
Volume do parênquima p/ testículo em (ml):		
Célula de Leydig	0,0026±0,00008	0,0097±0,0022
Tecido Conjuntivo	0,0005±0,0002	0,0012±0,0004
Vasos Sanguíneos	0,0004±0,0001	0,0012±0,0004
Vasos Linfáticos	0,0004±0,0001	0,0020±0,0005
PV no parênquima testicular (%):		
Célula de Leydig	4,09 ± 0,14	6,30 ± 1,73
Tecido Conjuntivo	0,83 ± 0,32	0,84 ± 0,31
Vasos Sanguíneos	0,66 ± 0,20	0,83 ± 0,28
Vasos Linfáticos	0,64 ± 0,25	1,40 ± 0,25

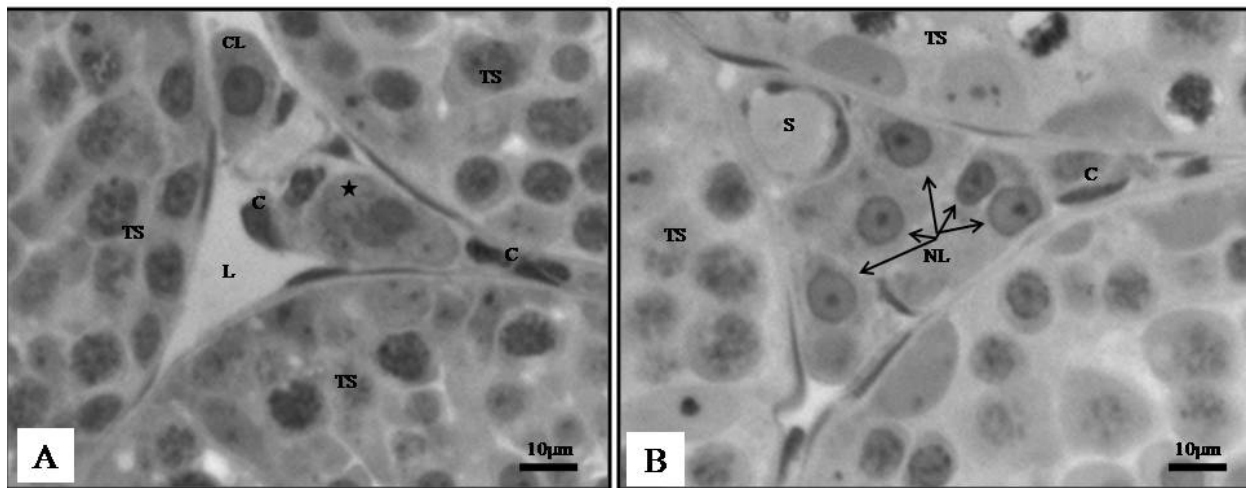


Figura 1– A e B: Compartimento intertubular de *O. nigripes*. A – Célula de Leydig (CL), túbulo seminífero (TS), espaço linfático (L), tecido conjuntivo (C), ★ = citoplasma de células de Leydig. B – Vaso sanguíneo (S), ↗ = núcleo de célula de Leydig.

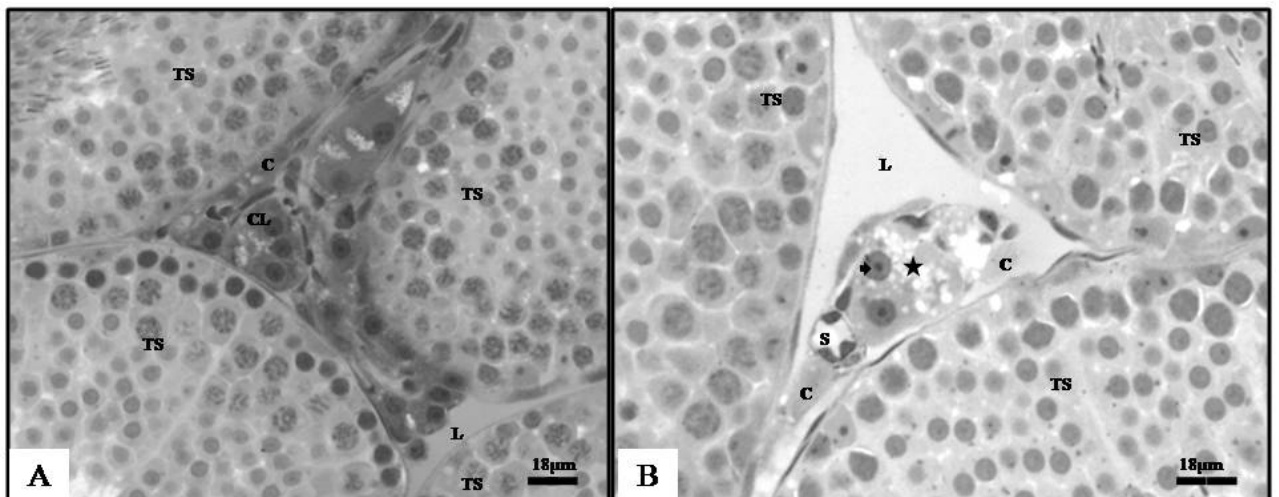


Figura 2 – A e B: Compartimento intertubular de *A. cursor*. A – Célula de Leydig (CL), túbulo seminífero (TS), espaço linfático (L), tecido conjuntivo (C), ★ = citoplasma de células de Leydig. B – Vaso sanguíneo (S), ◆ = núcleo de célula de Leydig.

Tabela 2. Morfometria das células de Leydig e índice Leydigossomático em *O. nigripes* e *A. cursor* Média  $\pm$  DP.

<b>Parâmetros</b>	<b><i>O.nigripes</i></b>	<b><i>A. cursor</i></b>
Diâmetro nuclear ( $\mu\text{m}$ )	6,96 $\pm$ 0,50	7,06 $\pm$ 0,60
Percentual de núcleo (%)	14,47 $\pm$ 0,80	14,50 $\pm$ 1,78
Volume de núcleo ( $\mu\text{m}^3$ )	176,16 $\pm$ 15,89	183,81 $\pm$ 20,98
Percentual de citoplasma (%)	51,50 $\pm$ 1,86	52,66 $\pm$ 73,06
Volume de citoplasma ( $\mu\text{m}^3$ )	628,44 $\pm$ 37,08	670,61 $\pm$ 78,89
Volume celular individual ( $\mu\text{m}^3$ )	894,60 $\pm$ 37,08	854,42 $\pm$ 65,36
Nº célula de Leydig p/ testículo	3x10 <sup>6</sup> $\pm$ 1x10 <sup>5</sup>	25x10 <sup>6</sup> $\pm$ 9x10 <sup>5</sup>
Nº célula de Leydig p/ grama de testículo	11x10 <sup>6</sup> $\pm$ 1x10 <sup>6</sup>	38x10 <sup>6</sup> $\pm$ 3x10 <sup>6</sup>
Índice Leydigossomático (%)	0,026 $\pm$ 0,0008	0,044 $\pm$ 0,010

#### 4. Discussão

As espécies *O. nigripes* e *A. cursor* apresentaram claramente o intertúbulo dentro do padrão I da classificação descrita por Fawcett et al. (1973), compartilhando com ratos, camundongos e hamster a mesma subdivisão proposta por Paula (1999), onde grupos de células de Leydig, juntamente com os vasos sanguíneos, encontram-se separados dos túbulos seminíferos por espaços linfáticos. O tecido conjuntivo em ambas as espécies aqui estudadas representaram cerca de 0,80% do parênquima testicular, e esteve mais próximo ao observado em morcegos *M. molossus* (0,4 %, Morais et al. 2012) do que ao encontrado em outras ordens de mamíferos, onde a média registrada para o tecido conjuntivo varia de 3 a 7 % (França e Godinho, 2003; Almeida et al. 2006; Costa et al. 2006). Uma grande variação no percentual volumétrico e no arranjo entre os componentes do intertúbulo é observada entre as diferentes espécies de mamíferos já estudados. Segundo Fawcett et al. (1973), estes diferentes arranjos podem ser definidos em três

diferentes padrões provavelmente relacionados com a habilidade dos vasos linfáticos em promover a circulação dos fluidos testiculares.

De modo geral, os roedores apresentam o padrão do tipo I descrito por Fawcett et al. (1973), onde células de Leydig e os vasos sanguíneos encontram-se separados dos túbulos seminíferos por um espaço linfático bem desenvolvido. Uma vez que uma grande variação no arranjo desses componentes é observada em roedores, Paula (1999) e Paula et al. (2007) sugeriram uma subdivisão do padrão tipo I descrito por Fawcett et al. (1973), onde a descontinuidade do endotélio linfático bem como a quantidade de células de Leydig determina três novos arranjos dentro deste padrão. Assim, ratos, camundongos e hamster seriam classificados em um subgrupo, cobaios e chinchilas em um segundo, e as capivaras seriam classificadas isoladamente em um terceiro.

Como na maioria dos mamíferos, nos roedores aqui estudados, o principal componente do compartimento intertubular é a célula de Leydig, representando no parênquima testicular em *O. nigripes* e *A.cursor* 4,09 e 6,30 %, respectivamente. Estes percentuais são maiores que os apresentados em cutia e paca (2,0 e 2,64 % - Carretta Jr, 2012), cobaio, rato e gerbil (2,82%; 2,48%; 2,63% -Romano et al. 2002), mas aproximam-se do percentual observado em camundongo, que é de cerca de 4 % do parênquima testicular (Romano et al. 2002).

A presença de gotículas lipídicas dispersas pelo citoplasma das células de Leydig foi observada em ambas as espécies aqui estudadas, sendo mais evidente em *A. cursor*. Estes lipídios constituem fonte de precursores para a biossíntese de andrógenos (Russell, 1996), já que estas células são responsáveis pela função endócrina testicular (Ye et al. 2011). Esta característica, observada em todos os animais destas espécies coletados ao longo do ano, indica atividade testicular constante, sem influencia sazonal.

A partir das médias de diâmetro e de volume nuclear das células de Leydig, foi possível calcular o volume individual destas células, sendo estes de aproximadamente  $800\mu\text{m}^3$  em *O. nigripes* e  $850\mu\text{m}^3$  em *A. cursor*. Estes valores mostraram-se inferiores aos observado em outros roedores ( $2169\mu\text{m}^3$  em capivaras,  $1125\mu\text{m}^3$  em cutias - Carretta Jr, 2012), ( $1500\mu\text{m}^3$  em camundongo, cobaio - Russell, 1996) e (rato - Russell & França, 1995), mas próximo ao valor descrito para o roedor *Trinomys moojeni* que foi de  $799\mu\text{m}^3$  (Cordeiro Jr. et al. 2010). A proporção volumétrica dos compartimentos testiculares está diretamente relacionada à espermatogênese e às contagens celulares. Assim como em *T.*

*moojeni*, os roedores silvestres aqui estudados apresentam baixo percentual volumétrico de tecido intertubular, o que justifica o baixo volume individual de células de Leydig quando comparado a outras espécies de mamíferos investigadas.

Um grande número de células de Leydig por grama de testículo é esperado em animais que apresentam baixo volume individual desta célula, o que refletiria um aumento numérico compensatório, para a produção de testosterona. Porém, o número de células de Leydig por grama de testículo observado em *O. nigripes* e em *A. cursor* encontra-se dentro da amplitude descrita para a maioria dos mamíferos, que é entre 20 e 40 milhões (Russell, 1996; França & Russell, 1998). A produção de testosterona para manutenção da espermatogênese e dos níveis periféricos de andrógenos pode estar relacionada com o tamanho do compartimento de células de Leydig. Porém, estudos correlacionando estrutura e função das células de Leydig, em várias espécies de mamíferos, mostraram que variações na secreção de testosterona resultam mais da capacidade individual desta célula em secretar andrógeno (Ewing et al. 1979), o que está altamente associada com a quantidade de retículo endoplasmático liso presente na célula de Leydig (Zirkin et al. 1980).

Vale ressaltar que a grande variação observada quanto ao percentual de células de Leydig no intertúbulo e nos testículos de diferentes espécies de mamíferos, assim como quanto ao percentual do compartimento intertubular, pode estar relacionado, dentre outros fatores, ao sistema de acasalamento apresentado pelo animal (Kenagy e Trombulak, 1986). Neste caso, ambas as espécies aqui estudadas têm sistema de acasalamento sugestivo de poliândrico ou promíscuo, e nesse caso, o maior investimento em túbulo seminífero e na produção de gametas se torna mais importante, não sendo prioritário o investimento em intertúbulo como o observado em espécies monogâmicas e poligínicas.

No intuito de se avaliar a variação individual das células de Leydig nas espécies estudadas, inferiu-se à massa corporal a proporção volumétrica de células de Leydig, obtendo-se o índice Leydigossomático, que representa o percentual da massa corporal alocada em células de Leydig. Em *O. nigripes* e em *A. cursor*, estas células representaram, respectivamente 0,026 e 0,044 % do peso corporal, que são valores compatíveis aos observados em capivara (0,037 % Carretta Jr. 2012), camundongo e gerbil (0,05%), rato (0,018%) e cobaio (0,011%) (Romano et al. 2002).

## 5. Conclusões

As espécies *O. nigripes* e *A. cursor* possuem arranjo intertubular dentro do padrão I de Fawcett, mas dentro do subgrupo de maior população proporcional de células de Leydig. Embora as células de Leydig sejam o elemento mais abundante do intertúbulo, as espécies aqui estudadas apresentam menor investimento na porção androgênica dos testículos, refletindo em baixa proporção volumétrica deste compartimento no parênquima testicular e baixo volume individual das células de Leydig. Estas características podem ser atribuídas ao comportamento reprodutivo poliândrico ou promíscuo, sendo nestes casos requerido maior investimento em túbulo seminífero que em interstício.

## Referências Bibliográficas

- Almeida FF, Leal MC, França LR (2006) Testis morphometry, duration of spermatogenesis, and spermatogenic efficiency in the wild boar (*Sus scrofa scrofa*). Biol Reprod 75, 792-799.
- Bonvicino CR, Oliveira JÁ, D'Andrea OS (2008) Guia dos roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos. Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa - OPAS/OMS 120 p.
- Carretta Junior M (2012) Comparative study of spermatogenesis, and duration of seminiferous epithelium cycle through technical immunohistochemistry with bromodeoxyuridine in three different species of rodent the suborder hystricomorfa: *Dasyprocta leporina*, *Cuniculus paca* and *Hydrochoerus hydrochaeris*. Viçosa: UFV, PhD thesis, Federal University of Viçosa, 131pp.
- Cordeiro-Jr DA, Costa GM, Talamoni SA, França LR (2010) Spermatogenic efficiency in the spiny rat, *Trinomys moojeni* (Rodentia: Echimyidae). Anim Reprod Sci. 119(1-2):97-105.

- Costa DS, Paula TAR, Matta SLP (2006) The intertubular compartment morphometry in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) testis. *Anim Reprod Sci* 91:173–179.
- Ewing LL, Zirkin BR, Cochran RC, Kromann N, Peters C, Ruiz-Bravo N (1979) Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cell mass. *Endocrinology* 105:1135–1142.
- Fawcett DW, Neaves WB, Flores MN (1973) Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biol Reprod*, 9: 500-532.
- Fonseca GAB, Herrmann G, Leite YLR, Mittermeier RA, Rylands AB, Patton JL (1996). Lista anotada dos mamíferos do Brasil. *Occas. Pap Conserv Biol*. 4:1-38.
- França LR, Russell LD (1998) The testis of domestic animals. In: *Male Reproduction. A Multidisciplinary Overview*, 1st edn. (editors Martínez F, Regadera J), pp. 197–219, Madrid: Churchill Livingstone.
- França LR, Godinho CL (2003) Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). *Biol. Reprod.* 68:1554-1561.
- Karnovsky MJ (1965) A formaldehyde -glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27, 137.
- Kenagy GJ, Trombulak SC (1986) Size and function of mammalian testis in relation to body size. *J Mamm.* 67, 1-22.
- Morais DB, Oliveira LC, Cupertino MC, Freitas KM, Freitas MBD, Paula TAR, Matta SLP (2012) Organization and Seasonal Quantification of the Intertubular Compartment in the Bat *Molossus molossus* (Pallas, 1776) Testis. *Mic Res Tec*, 76(1):94-101.
- Payne AH, Hardy MP, Russell LD (1996) *The Leydig cell*. Vienna: Cache River Press. p. 802.
- Pizo MA (1997) Seed dispersal and predation in two populations of *Cabranea canjerana* (Meliaceae) in the Atlantic Forest of southeastern Brazil. *J Trop Ecol*, 13:559-578.
- Rasband WS. Image J, US; National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA. Available at: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.
- Romano HS, Pereira T, Fonseca CC, Paula TAR, Neves MTD, Matta SLP (2002) Avaliação do testículo e do processo espermato gênico em 5 diferentes espécies de

- roedores. In: XI Simpósio de Iniciação Científica. Resumos... Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, v. 1. p. 352-353.
- Russell LD, França LR (1995) Building a testis, *Tissue Cell*, v. 27(2), p. 129-147.
- Russell LD (1996) Mammalian Leydig cell structure. In: Payne AH, Hardy MP, Russell LD (eds). *The Leydig cell*. Cache River Press. Vienna, IL., cap. 10, p. 218-222.
- Sánchez-Cordero V, Martínez-Gallardo R (1998) Post dispersal fruit and seed removal by forest dwelling rodents in a lowland rainforest in México. *J Trop Ecol*, 14: 139-151.
- Vieira RF, Silva AA, Ramos MM (2003) Aplicação de herbicidas em condições de pós-emergência via água de irrigação por aspersão- Revisão. *Planta Daninha*. Viçosa, 21: 495-506.
- Paula TAR (1999) Avaliação Histológica e Funcional do Testículo de Capivaras Adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Belo Horizonte: UFMG, 84p. Tese (Doutorado em Morfologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.
- Paula TAR, Matta SLP, Silva Júnior VA, Costa DS, Fonseca CC, Neves MTD (2007) Intertubular space characterization in adult capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) testis. *Braz Arch Biol Tech*, Curitiba, v.50 n 5, p. 289-297.
- Sharpe RM (1994) Regulation of spermatogenesis. In: Knobil E, Neil JD (eds) *The physiology of reproduction*, 2ed. Raven Press, New York, p.1363-1434.
- Zirkin BR, Ewing LL, Kromann N, Cochran RC (1980) Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog, and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cell ultrastructure. *Endocrinology* 107:1867–1874.
- Wildt DE (2005) Lions, Tigers, and Pandas, Oh My. *J. Androl*, 26(4):452-454, July/August.
- Ye L, Su ZJ, Ge RS (2011) Inhibitors of testosterone biosynthetic and metabolic activation enzymes. *Molecules*. 16(12):9983-10001.

## Conclusões Gerais

A partir do estudo do processo espermatogênico dos roedores silvestres *Oligoryzomys nigripes* e *Akodon cursor* foi possível observar que:

- A organização geral do parênquima testicular foi semelhante ao descrito para os demais mamíferos não-primatas;
- A proporção de massa corporal alocada em testículos (IGS) foi semelhante ao observado em roedores de menor porte.
- Os dados relativos a diâmetro de túbulo e espessura de epitélio estiveram dentro da amplitude descrita para a maioria dos mamíferos estudados.
- Há elevada proporção volumétrica de túbulo seminífero no parênquima testicular destas espécies, e elevado índice tubulossomático e elevado comprimento de túbulo seminífero;
- Estádios que compõem o ciclo do epitélio seminífero são semelhantes ao descrito para os demais mamíferos, segundo o método da morfologia tubular;
- A fase pré-meiótica foi mais curta que a pós-meiótica em ambas as espécies;
- A duração do CES foi de 3,9 dias em *O. nigripes* e 4,26 dias em *A. cursor*. Assim, 17,68 e 19,15 dias, respectivamente, foram necessários para o desenvolvimento de espermatozoides a partir de espermatogônias iniciais.
- Foram encontrados os maiores valores para a reserva espermática por grama de testículo;
- Foram observados elevado rendimento geral da espermatogênese e grande número de células de Sertoli;
- A produção espermática diária por grama de testículo foi de  $148 \times 10^6$  células em *O. nigripes* e  $142 \times 10^6$  células em *A. cursor*, sendo considerada alta até mesmo para os mamíferos com alto índice de produção;
- O compartimento intertubular representou menos de 10% em ambas as espécies aqui estudadas;
- O arranjo entre os componentes do tecido intertubular destes roedores segue o tipo 1 da classificação de Fawcett;
- O componente mais abundante no intertúbulo das duas espécies foi a célula de Leydig representando respectivamente 65,97 e 67,15 % do intertúbulo.

- O volume individual das células de Leydig em *O. nigripes* e *A. cursor* foi respectivamente  $804,60\mu\text{m}^3$  e  $858,7\mu\text{m}^3$ , o que é considerado baixo;
- A população total de células de Leydig nestes animais foi  $3 \times 10^6$  células em *O. nigripes* e  $11 \times 10^6$  células em *A. cursor*, representando respectivamente  $25 \times 10^6$  e  $38 \times 10^6$  células por grama de testículo.
- O percentual de massa corporal alocada em células de Leydig, o índice Leydigossomático (ILG), foi de 0,026% e 0,044%, respectivamente, para *O. nigripes* e *A. cursor*.
- As durações do CES estão entre as mais curtas já observadas entre os mamíferos.