

**ANA LUIZA PEREIRA MARTINS**

**HISTOMORFOMETRIA TESTICULAR E DINÂMICA DA ESPERMATOGÊNESE  
DE *Oecomys bicolor* (TOMES, 1860) (RODENTIA: CRICETIDAE) E *Monodelphis  
americana* (MÜLLER, 1776) (DIDELPHIMORPHIA: DIDELPHIDAE)**

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*.

Orientador: Sérgio Luís Pinto da Matta

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2022**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

M386h  
2022  
Martins, Ana Luiza Pereira, 1992-  
Histomorfometria testicular e dinâmica da espermatogênese  
de *Oecomys bicolor* (Tomes, 1860) (Rodentia: Cricetidae) e  
*Monodelphis americana* (Müller, 1776) (Didelphimorphia:  
Didelphidae) / Ana Luiza Pereira Martins. – Viçosa, MG, 2022.  
1 tese eletrônica (78 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Biologia Geral, 2022.  
Inclui bibliografia.  
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.420>  
Modo de acesso: World Wide Web.

1. *Oecomys bicolor*. 2. *Monodelphis americana*. 3.  
Espermatogênese em animais. 4. Testículos - Morfometria.  
5. Leydig, Células de . I. Matta, Sérgio Luis Pinto da, 1950-.  
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia  
Geral. Doutorado em Biologia Celular e Estrutural. III. Título.

CDD 22. ed. 599.35

ANA LUIZA PEREIRA MARTINS


**HISTOMORFOMETRIA TESTICULAR E DINÂMICA DA ESPERMATOGÊNESE  
DE *Oecomys bicolor* (TOMES, 1860) (RODENTIA: CRICETIDAE) E *Monodelphis  
americana* (MÜLLER, 1776) (DIDELPHIMORPHIA: DIDELPHIDAE)**

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: 26 de maio de 2022.

Assentimento:

  
\_\_\_\_\_  
Ana Luiza Pereira Martins  
Autora

  
\_\_\_\_\_  
Sérgio Luís Pinto da Matta  
Orientador

## AGRADECIMENTOS

A Deus.

À minha família.

À Universidade Federal de Viçosa que desde 2012 me recebeu e graças a ela pude ter várias oportunidades e experiências que me formaram como pessoa e como profissional.

A todos os professores desde a graduação até a pós-graduação. Em especial ao meu orientador Prof. Sérgio pela parceria, paciência, conversas importantes, mas também pelas conversas fiadas e pelo café desde 2013. E a professora Gleide pela disponibilidade durante parte da caminhada do doutorado que foi muito importante.

À Grasielle por ter cedido parte do material biológico para a realização das análises, e especialmente a Adrielle pela companhia e pela presteza de sempre durante as semanas de campo.

A Fernanda e Beth pelo apoio moral, intelectual e pelas hospedagens.

Ao Laboratório de Biologia Celular da UFMG e principalmente a Mara pela acolhida e ajuda.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

## RESUMO

MARTINS, Ana Luiza Pereira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2022. **Histomorfometria testicular e dinâmica da espermatogênese de *Oecomys bicolor* (Tomes, 1860) (Rodentia: Cricetidae) e *Monodelphis americana* (Müller, 1776) (Didelphimorphia: Didelphidae).** Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta.

As análises histomorfométricas geram parâmetros espermatogênicos que podem ser usados para compreensão da biologia reprodutiva das espécies. Esses dados, aplicados aos componentes testiculares, permitem a descrição da espermatogênese das espécies e, a partir deles, é possível elencar informações precisas dos processos reprodutivos intraespecíficos. O testículo é dividido em compartimento tubular, onde acontece a espermatogênese, e compartimento intertubular onde as células de Leydig produzem a testosterona. *Oecomys bicolor* é um roedor de pequeno porte encontrado no cerrado brasileiro e *Monodelphis americana* é um marsupial, também de pequeno porte, presente na Mata Atlântica. *Oecomys bicolor* tem 89,72% do parênquima testicular alocado em túbulos seminíferos e 10,28% em compartimento intertubular, enquanto *Monodelphis americana* apresenta 83,16% do parênquima testicular alocado em túbulos seminíferos e 16,84% alocados em compartimento intertubular. Em ambas as espécies, pela distribuição dos componentes testiculares, os machos foram descritos tendo comportamento sexual promíscuo. Pela descrição dos estádios pelo método do desenvolvimento acrossômico foram descritos 12 estádios para *Oecomys bicolor* e 10 estádios para *Monodelphis americana*.

Palavras-chave: Espermatogênese. Biologia reprodutiva. Túbulo seminífero. Célula de Sertoli. Célula de Leydig.

## ABSTRACT

MARTINS, Ana Luiza Pereira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2022. **Testicular histomorphometry and spermatogenesis dynamics of *Oecomys bicolor* (Tomes, 1860) (Rodentia: Cricetidae) e *Monodelphis americana* (Müller, 1776) (Didelphimorphia: Didelphidae).** Adviser: Sérgio Luis Pinto da Matta.

Histomorphometric analyzes produces spermatogenic parameters that can be used to understand the reproductive biology of the species. These data applied to testicular components allow the description of the spermatogenesis of the species and from them it is possible to list precise information about the intraspecific reproductive processes. The testis is divided into a tubular compartment where spermatogenesis occurs and an intertubular compartment where Leydig cells produce testosterone. *Oecomys bicolor* is a small rodent found in the Brazilian cerrado and *Monodelphis americana* is a small marsupial present in the Atlantic Forest. *Oecomys bicolor* has 89.72% of the testicular parenchyma allocated in the seminiferous tubules and 10.28% in the intertubular compartment. *Monodelphis americana* presents 83.16% of the testicular parenchyma allocated in the seminiferous tubules and 16.84% allocated in the intertubular compartment. In both species, by the distribution of testicular components, males were described as having promiscuous sexual behavior. By the description of the stages by the method of acrosomal development, 12 stages were described for *Oecomys bicolor* and 10 stages for *Monodelphis americana*.

Keywords: Spermatogenesis. Reproductive biology. Seminiferous tubule. Sertoli cell. Leydig Cell.

## SUMÁRIO

1.	Revisão de literatura.....	7
1.1.	Ordem Rodentia.....	7
1.2.	Família Cricetidae – Subfamília Sigmodontinae.....	7
1.3.	Gênero <i>Oecomys</i> .....	7
1.4.	<i>Oecomys bicolor</i> .....	8
1.5.	Ordem Didelphimorphia.....	9
1.6.	Família Didelphidae.....	10
1.7.	Gênero <i>Monodelphis</i> .....	10
1.8.	<i>Monodelphis americana</i> .....	10
1.9.	Os testículos.....	11
1.10.	Túbulos seminíferos.....	12
1.11.	Espermatogênese.....	12
1.12.	Compartimento Intertubular.....	13
2.	Objetivos.....	13
2.1.	Objetivos específicos.....	14
ARTIGO 1.....		18
1.	Introdução.....	19
2.	Material e métodos.....	20
3.	Resultados.....	25
4.	Discussão.....	27
5.	Conclusões.....	32
ARTIGO 2.....		43
1.	Introdução.....	44
2.	Material e métodos.....	45
3.	Resultados.....	50
4.	Discussão.....	53
5.	Conclusões.....	57
ARTIGO 3.....		66
1.	Introdução.....	67
2.	Material e métodos.....	68
3.	Resultados.....	69
4.	Discussão.....	72
5.	Conclusões.....	73

## 1. Revisão de literatura

### 1.1. Ordem Rodentia

A ordem Rodentia é a maior dentre os mamíferos com 9 famílias, 74 gêneros e 234 espécies descritas e representam 33% das espécies de mamíferos seguido pela ordem Chiroptera. Dentre as espécies descritas, 12 são ameaçadas (MMA, 2002; PAGLIA et al., 2012). Para determinação dos gêneros dos roedores brasileiros são consideradas a cor e o tipo da pelagem, as dimensões externas e a dentição, sendo que a maioria possui 22 dentes, com um único par de incisivos de lâmina afiada e ausência dos caninos. Apresentam baixa variação morfológica quanto ao desenho corporal, em comparação com as outras ordens de mamíferos (REIS et al., 2006; BONVICINO et al., 2008).

Quanto ao hábito de vida os roedores são majoritariamente noturnos a fim de escaparem de predadores terrestres e aves, estando presentes em todos os biomas terrestres e a maioria tem hábitos oportunistas. Entretanto, é difícil encontrar uma correlação entre um certo tipo de estrutura social e as condições de habitat (GROMOV, 2013).

A biologia social e reprodutiva dos roedores envolve padrões complexos de encontro e acasalamento para fêmeas e machos, sendo que esses animais usam o próprio cheiro para estabelecerem identidade e sinalizarem sua condição reprodutiva. O hábito reprodutivo mais comum entre os roedores é a promiscuidade, sendo raros os casos de monogamia. Os hábitos reprodutivos são ditados pelo comportamento das fêmeas que tendem a se dispersar mais que os machos sendo que esses tendem a encontrar e a defender uma fêmea para garantir um acasalamento bem sucedido (WOLFF, 2008).

### 1.2. Família Cricetidae – Subfamília Sigmodontinae

A família Cricetidae é a mais diversa dos roedores brasileiros, com 117 espécies divididas em 36 gêneros, todas agrupadas na única subfamília neotropical, a Sigmodontinae (REIS et al., 2006).

### 1.3. Gênero *Oecomys*

*Oecomys* é o mais diverso dos gêneros pertencentes à tribo Oryzomyini, que possui 34 gêneros, uma das oito tribos dentro da sub família Sigmodontinae (GOMES JÚNIOR et al., 2016). O gênero *Oecomys* tem ao todo 16 espécies sendo 12 delas encontradas no Brasil (SUÁREZ-VILLOTA et al., 2017). As espécies desse gênero têm porte de pequeno a médio, sendo a cauda maior que o comprimento do corpo, possuem hábito arborícola e frugívoro,

habitam o Cerrado, Floresta Amazônica, Mata Atlântica e formações florestais do Pantanal (REIS et al., 2006).

#### 1.4. *Oecomys bicolor*

A espécie *Oecomys bicolor* é comumente conhecida no Brasil como Rato-da-árvore (Figura 1). Trata-se de uma espécie silvestre encontrada em florestas secas, decíduas e tropicais. Apresentam hábitos noturnos, têm porte pequeno com comprimento corporal de 90-150 mm. Tem vibrissas compridas, pés largos, dedos mais longos e tamanho da cauda próximo ao tamanho do corpo. Estas características permitem que essa espécie tenha maior equilíbrio para explorar a mata verticalmente, apesar de virem ao solo para forrageio, sendo por isso uma espécie semi-arborícola (PARDIÑAS et al., 2016; PAES, 2017).

Em relação à sua morfologia, a espécie apresenta dimorfismo sexual, no macho as orelhas e as patas são maiores, o que deve estar associado à sinalização entre os indivíduos e trocas de calor. O pico da atividade reprodutiva da espécie *Oecomys bicolor* é observado durante a época quente e úmida. Sua ninhada é pequena quando comparada a outros animais da mesma família, seus ninhos são feitos em buracos de árvores, emaranhado de trepadeiras, copas de palmeiras ou em ninhos de pássaros abandonados (MALLMANN, 2007).

Sua distribuição geográfica é abundante na América do Sul, sendo encontrado do Panamá à Colômbia, Equador, Peru, Bolívia, Venezuela, Guianas e no Brasil (Figura 2) nos estados do Amapá, Roraima, Amazonas, Pará, Acre, Rondônia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Goiás, Bahia e Distrito Federal (PARDIÑAS et al., 2016; BONVICINO et al., 2008).

Quanto à sua conservação, *Oecomys bicolor* está listada como pouco preocupante, tendo em vista sua ampla distribuição, nem mesmo sendo constada na edição de 2018 do Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (ICMBIO, 2018).



Figura 1. *Oecomys bicolor* em habitat natural.

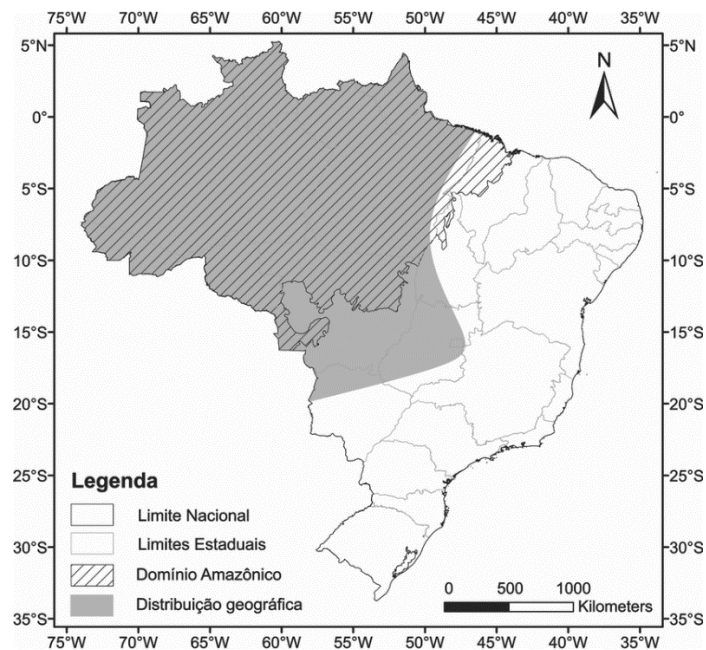


Figura 2. Mapa de distribuição geográfica de *Oecomys bicolor* no Brasil (PERCEQUILLO et al., 2015).

### 1.5. Ordem Didelphimorphia

A Ordem Didelphimorphia pertence à subclasse Theria dentro da infraclasse Marsupialia. Existem três ordens de marsupiais americanos: Didelphimorphia, Paucituberculata e Microbiotheria (BRITO et al., 2009). Didelphimorphia é a ordem mais diversa e as espécies são popularmente conhecidas por cuícas e gambás. Apresenta distribuição desde o extremo sul da América do Sul até o leste do Canadá (REIS et al., 2006; GARDNER, 2008).

Os marsupiais são distinguidos dos demais mamíferos principalmente pelo seu modo reprodutivo e pela anatomia do trato urogenital, pois os dutos urinários passam no meio dos

duto genitais, enquanto nos eutérios estes passam lateralmente. Nos machos, o pênis é bifurcado e o escroto, ao contrário dos eutérios, localiza-se à frente do pênis. Nas fêmeas, o trato reprodutivo consiste de duas vaginas laterais. São caracterizados por um curto período de gestação intrauterina. Os filhotes nascem em um estágio imaturo e, dependendo da espécie, são mantidos do lado de fora do corpo ou no marsúpio, onde os mamilos estão implantados (JANSEN et al., 2002).

A ordem Didelphimorphia possui 19 gêneros, 97 espécies e uma única família, Didelphidae (VOSS e JANSA, 2003), dividida em duas subfamílias: Caluromyinae e Didelphinae. A maioria das espécies ocupa ambientes de floresta, mas também ocorrem em áreas mais abertas incluindo a Caatinga, o Cerrado, e habitats montanhosos arbustivos (GARDNER, 2008). Alimentam-se principalmente de pequenos vertebrados, artrópodes, frutas e néctar e a importância relativa destes itens varia de espécie para espécie. A maior parte apresenta hábitos noturnos, podem ser arborícolas, terrestres, fossoriais e até mesmo semiaquáticos (FINOTTI et al., 2018).

#### 1.6.Família Didelphidae

São animais de pequeno a médio porte, com comprimento corpóreo variando de 10 a 50cm. Há adaptações para o hábito terrícola como maior massa muscular nas patas posteriores e cauda curta, enquanto para animais de hábito arbóreo a massa muscular é maior nas patas anteriores com cauda mais longa para facilitar o equilíbrio durante a escalada (REIS et al., 2006).

#### 1.7.Gênero *Monodelphis*

O gênero possui 15 espécies e todos habitam a América do sul, sendo animais de pequeno porte (REIS et al., 2006). Não possuem máscara facial característica, a cauda é mais curta que o comprimento da cabeça ao corpo, com escamas, pouco pilosa e não modificada para preensão. Possuem orelhas sem pelos e arredondadas (CÁCERES, 2012).

A espécie *Monodelphis domestica* teve seu genoma sequenciado e por isso, está passando a ser modelo para pesquisas na área biomédica nas áreas de desenvolvimento neural e terapia oncológica (PAVAN et al., 2014).

#### 1.8.*Monodelphis americana*

Popularmente conhecida como cuíca-de-três-listras, possui porte pequeno, entre 100 e 105mm. Essa espécie tem a pelagem dorsal marrom acinzentada com três listras pretas horizontais, sendo que a do meio parte do focinho e vai até a base da cauda, enquanto as laterais

partem dos ombros (Figura 3). É uma espécie essencialmente terrestre e mais ativa durante o dia (REIS et al., 2006).

São encontrados na Mata Atlântica e no Cerrado e, apesar de terrestres, seus ninhos já foram encontrados em galhos com até cinco metros do chão (Figura 4). Alimentam-se de pequenos invertebrados, frutas e sementes. O desmatamento e a fragmentação de habitats da Mata Atlântica e do Cerrado são as principais ameaças a essa espécie (MORAES et al., 2016).



Figura 3. Espécime de *Monodelphis americana* da Mata do Paraíso.



Figura 4. Distribuição geográfica de *Monodelphis americana* (Moraes et al., 2016).

### 1.9. Os testículos

Os testículos são órgãos pares localizados no escroto que se comunicam com a cavidade abdominal através do canal inguinal. São envoltos externamente pela túnica vaginal e

internamente pela albugínea testicular, uma espessa cápsula de tecido conjuntivo denso que emite septos para o interior do parênquima até a região do mediastino formando os lóbulos. Cada lóbulo é composto por túbulos seminíferos e pelo espaço intersticial, também denominado de intertúbulo (HEDRISH e BULLOCK, 2004).

Os testículos são órgãos com função exócrina e endócrina, responsáveis pela produção de espermatozoides e andrógenos, os quais mantêm a função reprodutiva e as características sexuais secundárias (HERMO et al., 2010).

#### 1.10. Túbulos seminíferos

Os túbulos seminíferos, que constituem o compartimento tubular, são estruturas enoveladas em que ambas as extremidades chegam à rede testicular. Constituem a maior parte do testículo, ocupando cerca de 70 a 90% do parênquima testicular (RUSSELL et al., 1990; HERMO et al., 2010) na maioria dos mamíferos.

Os túbulos seminíferos são delimitados pela túnica própria composta por células mioídes que possuem capacidade contrátil, fibras colágenas e elásticas. O epitélio seminífero é composto por duas populações celulares: as células germinativas que se dividem e diferenciam formando os espermatozoides e as células de Sertoli que sustentam o processo da espermatogênese. Na parte central dos túbulos encontra-se o lúmen tubular que contém fluido secretado pelas células de Sertoli (RUSSELL et al., 1990; HERMO et al., 2010).

A célula de Sertoli tem o formato colunar e estende-se da base do túbulo seminífero até o lume, envolve as células germinativas com seu citoplasma e forma junções de adesão e GAP entre elas (FRANÇA et al., 2016). As células de Sertoli formam junções de oclusão com células de Sertoli adjacentes, constituindo a barreira da célula de Sertoli que segrega as espermatogônias e espermatócitos na fase de preleptóteno no ambiente basal e o restante das células no ambiente adluminal, protegendo as células haploides do reconhecimento do sistema imune. Suas funções incluem proporcionar estrutura, suporte e nutrição para as células germinativas, fagocitose de corpos residuais e células germinativas que morreram durante a mitose, regulação da espermiogênese e produção de proteínas, além da produção do fluido luminal (RUSSELL et al., 1990; JOHNSON et al., 2008; STANTON, 2016).

#### 1.11. Espermatogênese

Espermatogênese é o processo de formação dos espermatozoides (haploides) a partir das espermatogônias (diploides), que dura cerca de 40 a 60 dias na maioria dos mamíferos. Envolve divisão mitótica e meiótica e remodelação celular, distribuídas em três fases: a primeira é a fase proliferativa ou espermatogonial, na qual as espermatogônias passam por sucessivas divisões

mitóticas; a segunda é a fase meiótica ou espermatocitogênica, onde o material genético é recombinado e segregado; a terceira é a fase da espermiogênese, na qual as espermátides sofrem modificações morfológicas resultando na formação dos espermatozoides (RUSSELL et al., 1990; SHARPE et al., 1990; SHARMA, 2011)

A espermatogênese é um processo altamente preciso que ocorre de forma ordenada, sendo composta de processos cíclicos repetitivos subdivididos em estádios (LEBLOND e CLERMONT, 1952; SHARPE et al., 1990; PHILLIPS et al., 2010). Os estádios são classificados por dois métodos: o da morfologia tubular, que se baseia na morfologia e a posição das células germinativas, sendo descritos oito estádios para a maioria das espécies (ROOSEN-RUNGE e GIESEL, 1950; ROOSEN-RUNGE, 1955; BERNDSTON, 1977); e o método do sistema acrossômico, onde o número de estádios varia de acordo com a espécie (LEBLOND e CLERMONT, 1952).

A reprodução é controlada pelos hormônios do eixo hipotálamo-hipófise-gônada. Nos machos é essencial a manutenção da produção de testosterona e para a espermatogênese, para a produção de LH (Hormônio Luteinizante) e FSH (Hormônio Folículo Estimulante). O LH tem como alvo as células de Leydig e age estimulando a produção de testosterona, enquanto o FSH estimula as células de Sertoli em sinergia com a testosterona a produzir moléculas reguladoras e nutrientes necessários para a espermatogênese. Desse modo, tanto o LH, por meio da testosterona, quanto o FSH regulam a espermatogênese atuando na célula de Sertoli (ODUWOLE et al., 2018).

#### 1.12. Compartimento Intertubular

O tecido intersticial, intertúbulo ou compartimento intertubular contém estruturas essenciais para o funcionamento gonadal que ocupa os espaços entre os túbulos seminíferos no parênquima testicular. Possui pequenos vasos e capilares que trazem e levam metabólitos e hormônios. Contém as células de Leydig que sintetizam e secretam hormônios, além de possuir células do tecido conjuntivo como fibroblastos e macrófagos, vasos linfáticos e nervos (HERMO et al., 2010).

Pela estimulação do hormônio luteinizante (LH), a testosterona é produzida pela célula de Leydig, se difunde para dentro do túbulo seminífero e atua na espermatogênese. As células de Leydig são responsáveis pela produção de estrógenos através da P450 aromatase na fase adulta, produzindo também a diidrotestosterona, hormônio essencial para manutenção funcional das glândulas sexuais acessórias e do epidídimo (GOYAL et al., 1999; GE et al., 2008)

## 2. Objetivos

Objetivou-se com este estudo descrever o compartimento tubular e intertubular das espécies *Oecomys bicolor* e *Monodelphis americana*, caracterizar as células que compõem o epitélio seminífero e determinar os estádios do ciclo do epitélio seminífero.

### 2.1. Objetivos específicos

- Obter valores biométricos corporais e testiculares;
- Determinar a proporção volumétrica e volume dos componentes tubulares e intertubulares;
- Calcular os índices gonadossomático (IGS), parenquimossomático (IPS), tubulossomático (ITS), epiteliossomático (IES), Leydigossomático (ILS);
- Mensurar o diâmetro dos túbulos seminíferos e a altura do epitélio seminífero;
- Calcular o comprimento total dos túbulos seminíferos e o comprimento total de túbulo por grama de testículo;
- Calcular a área tubular, luminal e epitelial;
- Caracterizar os estádios do epitélio seminífero;
- Estimar a população celular do epitélio seminíferos: contagem de células do epitélio seminífero no estágio 1;
- Calcular o rendimento intrínseco da espermatogênese;
- Estimar a reserva espermática;
- Mensurar o diâmetro, volume nuclear e número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo;
- Descrever os estádios do ciclo seminífero pelo método morfológico e acrossômico.
- Avaliar os espermatozoides durante o trânsito epididimário.
- 

### 3. Referências bibliográficas

- BERNDSTON, W. E. Methods for Quantifying Mammalian Spermatogenesis: a Review1. **Journal of Animal Science**, v. 44, n. 5, p. 818–833, 1977.
- BONVICINO, C.; OLIVEIRA J. A.; D’ANDREA P. S. Guia dos Roedores do Brasil. **Rio de Janeiro**, p. 120, 2008.
- BRITO, D.; OLIVEIRA, L. C.; OPREA, M.; MELLO, M. A. R. An overview of Brazilian mammalogy: trends, biases and future directions. **Zoologia (Curitiba)**, v. 26, n. 1, p. 67–73, 2009.
- CÁCERES, N. C. Os Marsupiais do Brasil: Biologia, Ecologia e Conservação. **Editora UFMS**, p. 500, 2012.

- FINOTTI, R.; CERQUEIRA R.; VIEIRA, M. V. Frugivory vs. Insectivory in marsupials of the Atlantic forest: Trade-offs in the use of vertical strata. **Oecologia Australis**, v. 22, n. 2, p. 191–200, 2018.
- FRANÇA, L.R., HESS, R.A., DUFOUR, J.M., HOFMANN, M.C., GRISWOLD, M.D. The Sertoli cell: One hundred fifty years of beauty and plasticity. **Andrology**, v. 4, p. 189–212, 2016.
- GARDNER, A. L. Mammals of South America: Marsupials, Xenarthrans, Shrews, and Bats. **Acta Theriologica**, v.53, n.4, 2008.
- GE, R.; CHEN, G.; HARDY, M. P. The role of the Leydig cell in spermatogenic function. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 636, p. 255–269, 2008.
- GOMES JÚNIOR, R. G.; SCHNEIDER, C. H.; LIRA, T.; CARVALHO, N. D.M.; FELDBERG, E.; SILVA, M. N. F.;GROSS, M. C. Intense genomic reorganization in the genus *Oecomys* (Rodentia, Sigmodontinae): Comparison between DNA barcoding and mapping of repetitive elements in three species of the Brazilian Amazon. **Comparative Cytogenetics**, v. 10, n. 3, p. 401–426, 2016.
- GOYAL, H. O.; WILLIAMS, C. S; KHALIL, M. K.; VIG, M. M.; MALONEY, M. A. Postnatal differentiation of the ductus deferens, tail of the epididymis, and distal body of the epididymis in goats occurs independently of rete testis fluid. **Anatomical Record**, v. 254, n. 4, p. 508–520, 1999.
- GROMOV, V. S. The evolution of sociality in rodents: Is the traditional socioecological approach universal? **Biology Bulletin Reviews**, v. 3, n. 4, p. 312–324, 2013.
- HERMO, L.; PELLETIER, R. M.; CYR, D, G.; SMITH, C.E. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: Background to spermatogenesis, spermatogonia, and spermatocytes. **Microscopy Research and Technique**, v. 73, n. 4, p. 243–278, 2010.
- ICMBIO. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume II - Mamíferos, p. 622, 2018.
- JANSEN, A. M. Marsupiais Didelfídeos: gambás e cuícas. In: **Animais de Laboratório: criação e experimentação**, p. 388, 2002.
- JOHNSON, L.; THOMPSON, D. L.; VARNER, D. D. Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. **Animal Reproduction Science**, v. 105, n. 1–2, p. 23–51, 2008.
- LEBLOND, C. P.; CLERMONT, Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 55, n. 4, p. 548–573,

1952.

MALLMANN, A. S. Dimensões Corporais E Reprodução De Pequenos Mamíferos Do Maciço Do Urucum , Ms , Oeste Do Brasil. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, p. 81, 2007.

MMA. Biodiversidade brasileira. **Ministério do Meio Ambiente**, p. 1–12, 2002.

MORAES, A. D.; CÁCERES, N. B. D.; COSTA, L. P. *Monodelphis americana*, Northern Three-striped Opossum. **The IUCN Red List of Threatened Species**, v. 8235, 2016.

ODUWOLE, O. O.; PELTOKETO, H.; HUHTANIEMI, I. T. . Role of Follicle-Stimulating Hormone in Spermatogenesis. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, p. 1–11, 2018.

PAES, R. D. Diversificação do complexo *Oecomys bicolor* (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae). Tese de doutorado, Universidade Federal do Espírito Santo, p.124, 2017.

PAGLIA, A. P.; FONSECA, G. A. B.; RYLANDS, A. B.; HERRMANN, G.; AGUIAR, L. M. S.; CHIARELLO, A. G.; LEITE, Y. L. R.; COSTA, L. P.; SICILIANO, S. Annotated checklist of Brazilian mammals. **Occasional Papers in Conservation Biology**, p. 76, 2012.

PARDIÑAS, U. F. J.; TETA, P.; SALAZAR-BRAVO, J.; MYERS, P.; GALLIARI, C. A. A new species of arboreal rat, genus *Oecomys* (Rodentia, Cricetidae) from Chaco. **Journal of Mammalogy**, v. 97, n. 4, p. 1177–1196, 2016.

PAVAN, S. E.; JANSA, S. A.; VOSS, R. S. Molecular phylogeny of short-tailed opossums (Didelphidae: Monodelphis): Taxonomic implications and tests of evolutionary hypotheses. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 79, n. 1, p. 199–214, 2014.

PERCEQUILLO, A.; ABREU, E.; BOVENDORP, R.; BRENNAND, P.; CHIQUITO, E.; CORREA, L.; GODOY, L.; LIBARDI, G.; PRADO, J.; ROTH, P.; SALLES, V. Roedores sigmodontíneos da Amazônia brasileira: composição, distribuição geográfica e diagnoses. **Pequenos mamíferos não-voadores da Amazônia brasileira**, 2015.

PHILLIPS, B. T; GASSEI, K.; ORWIG, K. E. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 365, n. 1546, p. 1663–1678, 2010.

REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO. W. A.; LIMA, I. P. Mamíferos do Brasil. **Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina**, p. 437, 2006.

ROOSEN-RUNGE, E. C. Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat III. Volume changes in the cells of the seminiferous tubules. **The Anatomical Record**, v. 123, n. 4, p. 385–398, 1955.

ROOSEN-RUNGE, E. C.; GIESEL, L.O. Quantitative studies on Spermatogenesis in the

- Albine Rat. **The American Journal of Anatomy**, v. 87, n. 1, p. 1–30, 1950.
- RUSSELL, L.D; ETTLIN, R.A.; SINHA-HIKIM, A.P.; CLEGG, E.D. Mammalian spermatogenesis. **Histological and histopathological evaluation of the testis**. Clearwater: Cache River Press, 1990.
- SHARMA R, A. A. Spermatogenesis: An Overview. In: **Sperm Chromatin**. p. 45–60, 2011.
- SHARPE, R. M.; MADDOCKS, S.; KERR, J. B. Cell-cell interactions in the control of spermatogenesis as studied using leydig cell destruction and testosterone replacement. **American Journal of Anatomy**, v. 188, n. 1, p. 3–20, 1990.
- STANTON, P. G. Regulation of the blood-testis barrier. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 59, p. 166–173, 2016.
- SUÁREZ-VILLOTA, E. Y.; CARMIGNOTTO, A. P.; BRANDÃO, M. V.; PERCEQUILLO A. R.; SILVA, M. J. Systematics of the genus *Oecomys* (Sigmodontinae: Oryzomyini): molecular phylogenetic, cytogenetic and morphological approaches reveal cryptic species. **Zoological Journal of the Linnean Society**, n. 10, p. 1–29, 2017.
- VOSS, R.S. E JANSA, S. A. Phylogenetic studies on didelphid marsupials II. Nonmolecular data and new IRBP sequences: separate and combined analyses of didelphine relationships with denser taxon sampling. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, 82 pp, 2013.
- WOLFF, J. O. Social biology of rodents. **Integrative Zoology**, v. 2, n. 4, p. 193–204, 2008.

## ARTIGO 1

**Padrões histomorfométricos testiculares e dinâmica da espermatogênese de *Oecomys bicolor* Tomes, 1860 (Rodentia:Cricetidae)**

## Resumo

Os testículos dos mamíferos são compostos pelo compartimento tubular, onde a células de Sertoli mantém as demais células germinativas para a produção de espermatozoides, e pelo compartimento intertubular onde as células de Leydig estão presentes e secretam a testosterona, hormônio essencial à espermatogênese. Para muitas espécies ainda não há interesse no desenvolvimento de políticas de conservação da vida silvestre e o conhecimento do processo reprodutivo é base para sua preservação. A ordem Rodentia é a maior entre os mamíferos, com 9 famílias, sendo a família Cricetidae a mais diversa dos roedores brasileiros. No Brasil são encontradas 12 das 16 espécies do gênero *Oecomys*. *Oecomys bicolor* é conhecido no Brasil como Rato-da-árvore, sendo encontrado em florestas secas, decíduas e tropicais. *Oecomys bicolor* apresentou peso corporal de 35,8g com IGS 0,53%, ITS 0,47% e IES 0,37%, sendo a proporção de túbulos seminíferos de 89,84%. Por apresentar essas características entende-se que a espécie investe muito em reprodução. Os índices mitótico e meiótico foram 8,59 e 2,45 células, respectivamente, e o rendimento da espermatogênese foi de 23,83 células. O compartimento intertubular representa 10,28% do parênquima testicular sendo 4,99% de células de Leydig, cujo número por grama de testículo é de  $11,10 \times 10^7$  células. Pelo grande aporte da espécie em epitélio seminífero e em intertúbulo, quando comparado a outras espécies da mesma família, é possível inferirmos que *Oecomys bicolor* é uma espécie promiscua.

Palavras chave: Espermatogênese, Sertoli, Leydig, Túbulo seminífero, *Oecomys bicolor*

## 1. Introdução

Os roedores são membros importantes nos grupos da fauna pois são cosmopolitas e nativos da maioria das comunidades terrestres (Emmons e Feer, 1997). A ampla variação em sua morfologia e diversidade de seus habitats, tolerância climática e fontes alimentares os tornam os mais numerosos e evolutivamente bem-sucedidos dentre as ordens de mamíferos (Emmons e Feer, 1997).

A ordem Rodentia é a maior entre os mamíferos com 9 famílias, 74 gêneros e 234 espécies descritas, sendo 12 destas ameaçadas, e representam 33% das espécies de mamíferos, seguida pela ordem Chiroptera (MMA, 2002; Paglia et al., 2012). A família Cricetidae é a mais diversa dos roedores brasileiros, com 117 espécies divididas em 36 gêneros, representando 55% das espécies de roedores sul-americanos e 22% das espécies de mamíferos neotropicais (Reis et al., 2006). Esta família é dividida em cinco subfamílias: Cricetinae, exclusivamente encontrada no leste Europeu e Ásia; Neotominae, Thylomyinae e Sigmodontinae, animais neotropicais encontrados no continente americano; e Arvicolinae, animais dispersos em todo hemisfério norte (Jansa e Weksler, 2004; Stepan et al., 2004; Stenger et al., 2018).

O gênero *Oecomys* tem ao todo 16 espécies, sendo 12 delas encontradas no Brasil (Suárez-Villota et al., 2017). As espécies desse gênero têm porte de pequeno a médio, sendo a cauda maior que o comprimento do corpo, possuindo hábito arborícola e frugívoro (Reis et al., 2006). A espécie *Oecomys bicolor*, comumente conhecida no Brasil como Rato-da-árvore, é uma espécie silvestre encontrada em florestas secas, decíduas e tropicais. Apresenta hábitos noturnos e tem comprimento corporal de 90-150 mm (Pardiñas et al., 2016). No Brasil é encontrada nos estados do Amapá, Roraima, Amazonas, Pará, Acre, Rondônia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Goiás e Distrito Federal (Bonvicino et al., 2008; Pardiñas et al., 2016).

Infelizmente, para muitas espécies não há interesse e recursos para criação de políticas de conservação da vida silvestre a fim de ter melhores impactos sobre as populações (Manlik et al., 2016). A falta de estudos reprodutivos levam os cientistas a generalizarem medidas com base em traços compartilhados de espécies filogeneticamente próximas (Manlik et al., 2016).

O conhecimento sobre o processo espermatogênico é importante para a criação de políticas de conservação de qualquer espécie, e também contribui para o aumento do conhecimento científico da biologia reprodutiva das espécies (Leite et al., 2006). A aplicação da morfometria testicular, considerando os compartimentos tubular e intertubular, permite avaliar a atividade das células e a relação com os períodos de reprodução e padrões de acasalamento do animal (Morais et al., 2014). Desse modo, este estudo teve objetivo de descrever a dinâmica da espermatogênese assim como realizar a histomorfometria dos compartimentos tubular e intertubular do roedor *Oecomys bicolor*.

## 2. Material e métodos

### *Animais*

Os animais (n=6) foram capturados em áreas de Cerrado, no município de Jataí, Goiás (17° 52' 53" S, 51° 42' 52" W) utilizando-se armadilhas do tipo Shermann, sendo as capturas realizadas em maio e junho de 2012. As coletas foram autorizadas pelo IBAMA (licença nº 11621-1) e os procedimentos para estudos e eutanásia foram autorizados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Goiás – CEP/UFG (protocolo nº 233/10). Os animais foram pesados e anestesiados utilizando-se tiopental 30mg/kg intraperitoneal.

### *Processamento histológico*

Os testículos destinados às análises morfológicas foram removidos e fixados em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965). Após fixação, fragmentos testiculares foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, incluídos em 2-hidroxietil metacrilato (Historesin®, Leica), seccionados na espessura de 3µm e corados com azul de toluidina - borato de sódio 1%.

Imagens do parênquima testicular foram obtidas em microscópio Olympus AX-70 e analisadas utilizando-se o software de análise de imagens ImageJ. A albugínea testicular foi retirada e pesada e seu peso foi subtraído do peso testicular obtendo assim o peso do parênquima testicular.

#### *Dados biométricos*

Baseado nos pesos corporal, testicular e no volume dos túbulos seminíferos foram calculados os índices gonadossomático (IGS) e tubulossomático (ITS). Considerando que o parênquima é a parte funcional do testículo e o epitélio germinativo é responsável pela espermatogênese foram calculados os índices parenquimossomático (IPS) e epiteliossomático (IES). Esses índices foram obtidos a partir da seguinte equação: Índice (%) = peso do testículo ou peso do parênquima ou volume de túbulo ou volume de epitélio/PC x 100, respectivamente, onde PC= Peso corporal.

#### *Morfometria e estereologia dos túbulos seminíferos*

A proporção volumétrica dos componentes do parênquima testicular foi estimada a partir da contagem de 5.320 pontos por animal, utilizando-se retículo com 266 intersecções (pontos), em aumento de 200X, realizando-se a contagem de 20 campos aleatórios por animal. Desse modo, foram calculadas as proporções volumétricas de todos os componentes do parênquima testicular tais como túnica própria, epitélio seminífero, lume e intertúbulo, por meio da equação: Proporção volumétrica (%) = (NT/NTT) x 100, onde NT= Número de pontos contados sobre o componente do parênquima e NTT= Número de pontos totais contados. Para cálculo dos volumes dos componentes do parênquima testicular utilizou-se a equação: Volume = % do elemento x PPT / 100, onde PPT= Peso do parênquima testicular. O volume do testículo foi considerado igual ao peso (Johnson et al., 1981; Costa et al., 2011).

O diâmetro tubular médio ( $\mu\text{m}$ ) por animal foi obtido a partir da mensuração, ao acaso, de 20 secções transversais de túbulos sem considerar o estágio do ciclo do epitélio seminífero.

Nas mesmas secções foram mensuradas a altura do epitélio seminífero ( $\mu\text{m}$ ) a partir da túnica própria até o lume tubular, tomadas de forma diametralmente opostas.

O comprimento total dos túbulos seminíferos (CTT) por testículo e por grama de testículo, em metros, foi estimado empregando-se a seguinte equação:  $\text{CTT} = \text{VTS} / \pi R^2$ , onde VTS= Volume total de túbulos seminíferos dos testículos,  $\pi R^2$ = Área da secção transversal dos túbulos seminíferos e R= diâmetro tubular. O CTT foi dividido pelo peso dos testículos para estimar o comprimento dos túbulos seminíferos por grama de testículo.

Com base nas medidas do diâmetro tubular foram calculadas as áreas tubular (AT), luminal (AL) e epitelial (AE), de acordo com as fórmulas:  $\text{AT} = \pi \cdot \text{RT}^2$ , sendo RT = raio tubular;  $\text{AL} = \pi \cdot \text{RL}^2$ , sendo RL = raio luminal;  $\text{AE} = \text{AT} - \text{AL}$ . Por serem grandezas não lineares, a mensuração das áreas dos componentes tubulares torna a comparação mais confiável. A relação túbulo/epitélio (RT/E) foi calculada dividindo AT / AE (Dias et al., 2019). Quanto mais próxima de 1 for esta relação, mais epitélio a espécie possui.

#### *Contagem de células do estágio 1 pelo método da Morfologia Tubular*

O número de células que constituem o epitélio seminífero no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero foi obtido a partir da contagem das células germinativas e das células de Sertoli, em 20 secções transversais de túbulos seminíferos para cada animal. Foram quantificadas espermatogônias do tipo A (SGA), espermatócitos primários na transição de preleptóteno para leptóteno (PL), espermatócitos primários em paquíteno (PAQ) e espermátides arredondadas (EAR), além dos nucléolos de células de Sertoli (SER). Foram medidos os diâmetros nucleares de cada célula germinativa e nucleolares das células de Sertoli, sendo 30 medidas para cada tipo celular. As contagens obtidas foram corrigidas para o diâmetro nuclear/nucleolar médio de 30 células e espessura do corte histológico segundo Amann (1961). As seguintes razões foram utilizadas: índice mitótico (PL:SGA); índice meiótico (EAR:PAQ) e rendimento geral da espermatogênese (EAR:SGA).

### *Estádios do ciclo seminífero (CES)*

Os estádios do CES foram caracterizados pelo método da Morfologia Tubular (Berndston, 1977). Baseado nas alterações da forma e localização do núcleo das diferentes gerações das células germinativas e na ocorrência de figuras de divisão meiótica foram caracterizados 8 estádios. A frequência relativa dos estádios do CES foi determinada a partir da caracterização e contagem de 200 secções transversais de túbulos seminíferos para cada animal, escolhidos aleatoriamente (Siman et al., 2017).

### *Reserva espermática*

Considerando-se que a perda na espermiogênese é insignificante, determinou-se a reserva espermática testicular (RET) total e por grama de testículo a partir da população celular de espermátides arredondadas no estágio I do CES, baseando-se na fórmula:  $RET = (\text{comprimento dos túbulos seminíferos/espessura do corte}) \times \text{número corrigido de espermátides arredondadas por secção transversal}$  (Berndston, 1977).

### *Células de Sertoli*

O número de células de Sertoli por testículo foi estimado a partir da fórmula:  $NCS = \text{Comprimento total de túbulos seminíferos } (\mu\text{m}) \times \text{Número corrigido de nucléolos de células de Sertoli por secção transversal / espessura do corte } (\mu\text{m})$ . O número de células de Sertoli foi dividido pelo peso testicular para estimar a quantidade de células por grama de testículo. O índice de célula de Sertoli (EAR:SER) e a capacidade total de suporte da célula de Sertoli (SGA + PL + PAQ + EAR:SER) também foram calculados (Costa et al., 2011).

### *Morfometria intertubular*

A proporção volumétrica entre os elementos que compõem o intertúbulo foi estimada a partir da contagem de 1.000 pontos por animal, utilizando-se retículo com 540 intersecções (pontos), em aumento de 400X, realizando-se a contagem de campos aleatórios em cada animal. Foram contabilizadas as proporções volumétricas de núcleo e citoplasma da célula de Leydig,

vaso sanguíneo, espaço linfático, tecido conjuntivo e macrófagos pela fórmula: Proporção volumétrica (%) =  $(NI/NTI) \times 100$ , onde NI= Número de pontos contados sobre o componente do intertúbulo e NTI= Número de pontos totais contados no intertúbulo.

Para cálculo do volume do intertúbulo, bem como dos elementos que o compõem, utilizou-se a fórmula: Volume = % do componente do intertúbulo x PPT / 100, onde: PPT= peso do parênquima testicular.

Com base no peso corporal e na proporção de intertúbulo e células de Leydig foi calculado o índice intertubulossomático (IIS) e índice Leydigossomático (ILS) pela fórmula: Índice (%) =  $(VCL \text{ ou } \%I / PC) \times 100$ , onde VCL= Volume de células de Leydig nos testículos, %I = proporção de intertúbulo e PC= Peso corporal (Oliveira et al., 2015).

#### *Morfometria das células de Leydig*

Foi medido o diâmetro nuclear médio, em  $\mu\text{m}$ , das células de Leydig em aumento de 400X, totalizando 30 núcleos para cada animal. A partir das fórmulas abaixo, foram calculados o volume nuclear (VNL), citoplasmático (VCL) e o volume de cada célula de Leydig (VL), em  $\mu\text{m}^3$ :  $VNL = 4/3 \pi R^3$ , onde R= Raio nuclear;  $VCL = \%CL \times VNL / \%NL$ , onde %CL= Proporção volumétrica de citoplasma de Leydig e %NL = Proporção volumétrica de núcleo de Leydig; e  $VL = VNL + VCL$ .

O volume que a célula de Leydig ocupa nos testículos (VLT), em  $\mu\text{L}$ , foi calculado a partir da fórmula:  $VLT = (\% \text{ Ley} \times PPT) / 100$ , onde % Ley = Proporção volumétrica da célula de Leydig no parênquima testicular e PPT= Peso do parênquima testicular. O volume de célula de Leydig por grama de testículo (VL/gT) foi obtido por  $VLT/PT$ , onde PT é peso testicular.

Foram calculados o número de células de Leydig por testículo (NL/t) e por grama de testículo (NL/gT) por meio da seguinte equação:  $N/t = VLT / VL$ , onde: VLT= Volume de Leydig por testículo e VL= Volume de uma célula de Leydig, e  $NL/gT = NL/PT$ , onde PT= Peso testicular (Oliveira et al., 2015).

### *Estatística*

Todos os resultados foram analisados no software Excel do Windows e expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média.

## 3. Resultados

### *3.1 Dados Biométricos, morfometria e estereologia dos túbulos seminíferos*

A média do peso corporal de *O. bicolor* foi 35,8 g e o peso testicular 0,19 g. Com base na contagem de pontos foi contabilizada a proporção e a volumetria dos componentes testiculares. Todos os dados dos parâmetros acerca dos túbulos seminíferos e de seus componentes de *O. bicolor* estão na tabela 1.

### *3.2 Contagem de células do estágio 1 pelo método da Morfologia Tubular*

Utilizando-se a contagem da população de células no estágio 1 foram calculados os valores corrigidos dos tipos celulares do epitélio seminífero e os índices espermatogênicos, sendo o rendimento da espermatogênese igual a 23,83 células (Tabela 2).

### *3.3 Estádios do ciclo seminífero (CES)*

Com base nos critérios de divisão pelo método da morfologia tubular proposto por Berndtson (1977), foram caracterizados oito estádios do epitélio seminífero de *O. bicolor*. Espermatogônias do tipo A encontradas no ambiente basal apresentaram núcleo ovoide em relação à membrana basal, espermatócitos primários em preleptóteno e paquíteno foram encontrados em todos os estádios descritos. As demais associações celulares estão caracterizadas a seguir (Figura 1).

Estádio I: Espermatócitos primários em preleptóteno (PI) no ambiente basal dispostos em uma camada apresentaram núcleos pequenos com cromatina condensada. Espermatócitos primários em paquíteno (P) distribuídos em uma a duas camadas já no ambiente adluminal. Mais de cinco camadas de espermátides arredondadas (R) com núcleos pequenos e cromatina não condensada.

Estádio II: Espermátides arredondadas começam a adquirir morfologia alongada (E) e nota-se espermátocitos em leptóteno (L) no ambiente adluminal.

Estádio III: Espermátides alongadas se organizam e formam feixes no ápice do epitélio. Espermátocitos em zigóteno (Z) e diplóteno (D) presentes no epitélio.

Estádio IV: Observa-se a segunda divisão meiótica pela presença de placas metafásicas (M), além de espermátocitos secundários (II). Foram encontrados espermátocitos primários em zigóteno, em diplóteno e feixes de espermátides alongadas.

Estádio V: Foram encontradas espermatogônias intermediárias com os núcleos maiores e arredondados e a cromatina perinuclear condensada com a presença de nucléolos. Há duas gerações de espermátides: as arredondadas fruto da segunda divisão meiótica e as alongadas organizadas em feixes. Presença de espermátocitos primários em paquíteno.

Estádio VI: Foram encontradas espermatogônias do tipo B, espermátocitos em paquíteno além das espermátides arredondadas. Feixes de espermátides alongadas situadas na região central do epitélio.

Estádio VII: Há espermatogônias do tipo A e B, espermátocitos primários em paquíteno e espermátides arredondadas, estando os feixes de espermátides alongadas já próximos ao lume tubular. Presença de corpos residuais no ápice do epitélio.

Estádio VIII: Espermatozoides presentes no lume tubular e corpos residuais no ápice do epitélio próximo às espermátides arredondadas. Espermátocitos primários em preleptóteno e em paquíteno presentes.

Foi realizada a frequência desses estádios. A fase pré-meiótica correspondeu a 50% dos estádios, a meiose representou 5 % e a fase pró-meiótica a 45% dos estádios (Figura 2).

#### *3.4 Reserva espermática e células de Sertoli*

Com base na contagem de células de Sertoli foram calculados todos os parâmetros referentes à célula bem como os valores da reserva espermática, sendo o valor por grama de testículo igual a  $79,08 \times 10^6$  (Tabela 3).

### 3.5 Morfometria intertubular

Feita a contagem de pontos sobre o compartimento intertubular obteve-se a proporção dos seus componentes e suas volumetrias (Tabela 4). *O. bicolor* tem 10,28% de intertúbulo, sendo 4,99% alocados em células de Leydig.

O testículo de *O. bicolor* tem  $11,10 \times 10^7$  células de Leydig por grama de testículo. Os demais dados referentes às células de Leydig estão dispostos na tabela 5.

## 4. Discussão

Este estudo apresenta informações sobre a biologia reprodutiva do roedor *Oecomys bicolor* com ênfase na morfometria e estereologia do testículo relacionadas à espermatogênese, visando contribuir para melhor compreensão das estratégias reprodutivas da espécie e fornecer dados mais específicos para atividades de conservação e manejo da espécie.

O valor do IGS encontrado em *Oecomys bicolor* (0,53) segue o padrão de outros roedores de pequeno porte, visto que os índices são calculados com base no peso corporal dos animais, como *Oligoryzomys nigripes* (0,5) (Cordeiro Júnior, 2009) e *Oxymycterus rufus* (0,47) (Morais et al., 2016). Os índices ITS e IES de *O. bicolor* (0,47 e 0,37, respectivamente) também foram semelhantes aos encontrados em *O. rufus* (0,4 e 0,35, respectivamente). Kenagy e Trombulak (1986) comprovaram que há relação entre o peso corporal e o peso testicular, sendo possível inferirmos o comportamento sexual das espécies, pois espécies monogâmicas geralmente apresentam IGS e ITS menores que espécies promíscuas porque há necessidade de grande produção espermática por parte dos machos (Siman et al., 2017). Um exemplo é a capivara com IGS igual a 0,12 e descrita como uma espécie monogâmica, enquanto *O. nigripes* e *O. rufus* como espécies promíscuas (Paula et al 2007).

Os túbulos seminíferos são o principal componente testicular analisado para avaliar os parâmetros reprodutivos, assim como o diâmetro tubular, a altura do epitélio e comprimento total tubular (França e Russell, 1998). No parênquima testicular os túbulos seminíferos são o componente mais farto, seguido pelo epitélio seminífero. Em *O. bicolor*, observa-se menor proporção desses componentes comparados a outros roedores de hábito reprodutivo promíscuo da mesma família, como *O. nigripes* que apresenta 96,3% de túbulos seminíferos e 87,1% de epitélio seminífero e *O. rufus* com 90,9% e 81,2% respectivamente (Cordeiro Júnior, 2009; Morais et al., 2016). A grande proporção de túbulos seminíferos e epitélio seminífero são características típicas de pequenos roedores porque eles têm ciclo de vida pequeno, são espécies promíscuas e têm muitas ninhadas por ano (Cordeiro Júnior, 2009).

Os valores de diâmetro tubular (189,45  $\mu\text{m}$ ) e altura de epitélio (62,24  $\mu\text{m}$ ) de *O. bicolor* encontram-se dentro do padrão descrito para os mamíferos amniotas de 160 a 350 $\mu\text{m}$  (França e Russell, 1998). Esses valores foram semelhantes aos de *Trinomys moojeni* (172 e 67  $\mu\text{m}$ , respectivamente) e de *O. rufus* (175,45 e 67  $\mu\text{m}$  respectivamente), sugerindo capacidade espermatogênica semelhantes à desses animais (Cordeiro Júnior, 2009; Morais et al., 2016).

O comprimento total tubular por grama de testículo de *O. bicolor* foi 31,91m, maior em relação aos valores descritos para *Akodon cursor* (20 m) e a *Necromys lasiurus* (21 m) (Cordeiro Júnior, 2009), enquanto *O. rufus* (34,92m) apresentou comprimento maior por apresentar maiores proporções dos componentes tubulares que *O. bicolor* (Morais et al., 2016).

Os dados das áreas de túbulo seminífero, epitélio seminífero e lume também podem ser usados para descrever e comparar a espermatogênese das espécies, sendo esse o primeiro estudo que traz esses dados para uma espécie de roedor. A área tubular, epitelial e luminal de *O. bicolor* foram de 28,30  $\times 10^3 \mu\text{m}^2$ , 25,02  $\times 10^3 \mu\text{m}^2$  e 3,28  $\times 10^3 \mu\text{m}^2$ , respectivamente.

O número corrigido das células germinativas e das células de Sertoli são parâmetros importantes para a compreensão do processo espermatogênico das espécies. (Russell et al.,

1990). O índice mitótico nos permite analisar a fase proliferativa da espermatogênese por ser a razão entre espermátocitos primários em preleptóteno e espermatogônias. Em *O. bicolor* 8,95 espermátocitos primários em preleptóteno foram produzidos pelas mitoses das espermatogônias, enquanto *O. nasutus* e *O. rufus* apresentaram aproveitamento menor de 7,02 e 5,64, respectivamente (Morais et al., 2014; Morais et al., 2016).

O índice meiótico, por sua vez, representa quantas espermátides arredondadas são produzidas a partir da população espermátocitos primários. Em mamíferos esse índice varia entre 1,9 e 3,4 (França e Russell, 1998). *O. bicolor* apresentou aproveitamento de 2,45 células, semelhante a *O. nasutus* e *O. rufus* com 2,83 e 2,79, respectivamente, estando dentro dos valores observados (Morais et al., 2014; Morais et al., 2016). Considerando que não houvesse morte de células germinativas por apoptose, cada espermátocito em paquíteno originaria quatro espermátides arredondadas. Com base nisso, de acordo com França e Russell (1998), a taxa de perda celular durante a meiose varia entre 5% e 30% em mamíferos. *O. bicolor* apresentou taxa de 58,98% de perda celular, enquanto *O. rufus* e *O. nasutus* apresentaram taxa de perda celular maior, de 69,88% e 70,84% respectivamente (Morais et al., 2014; Morais et al., 2016). A perda celular durante a espermatogênese é importante para evitar que células com anormalidades cromossômicas tornem-se espermatozoides e, além disso, ajuda a manter a quantidade de células no epitélio de acordo com a capacidade das células de Sertoli (Collins et al., 1997).

O rendimento geral da espermatogênese é a razão entre o número de espermátides arredondadas pelas espermatogônias do tipo A. Em *O. bicolor* o rendimento foi de 23,83, valor abaixo do referido por França e Russell (1998) para mamíferos, de 26,2 a 74,2. Contudo, em *O. rufus* e *O. nasutus*, o rendimento foi menor ainda sendo 11,98 e 19,79 células, respectivamente (Morais et al., 2014; Morais et al., 2016).

Observando os valores dos índices relacionados à espermatogênese em *O. bicolor* é notório que, apesar de apresentar proporção de túbulos seminíferos e epitélio seminífero

menores que as de *O. rufus* e *O. nasutus*, seu aproveitamento da espermatogênese é melhor. Por outro lado, *O. nigripes* (36,54) e *A. cursor* (31,38) tiveram maior rendimento espermatogênico que *O. bicolor* e dentro do observado para mamíferos (Balarini, 2013).

A célula de Sertoli é responsável pela manutenção da espermatogênese e parâmetros desta célula são importantes para avaliar este processo (França e Russell, 1998; França et al., 2016). Cada célula de Sertoli de *O. bicolor* é capaz de suportar 16,23 células germinativas, sendo menor que em *O. nigripes* (27,78 células) e *A. cursor* (26,67 células). O índice das células de Sertoli é a razão entre estas células e as espermatídes arredondadas. Em *O. bicolor* o índice foi 8,84, menor que em *O. nigripes* (14,92) e *A. cursor* (14,05). Apesar de serem espécies da mesma família, *O. bicolor* possui menos células em seu epitélio seminífero, o que justifica a diferença entre os parâmetros da célula de Sertoli entre as espécies. Além disso, *O. bicolor* também apresenta menos células de Sertoli por grama de testículo comparado com *O. nigripes* ( $35 \times 10^6$ ) e *A. cursor* ( $48 \times 10^6$ ) (Balarini, 2013).

Pelo valor da reserva espermática testicular é possível determinar o número de espermatozoides produzidos por cada ciclo do epitélio seminífero. A reserva espermática por grama de testículo de *O. bicolor* ( $79,08 \times 10^6$ ) foi menor que a observada em *O. nasutus* ( $849,63 \times 10^6$ ) e maior que a de *O. rufus* ( $73,13 \times 10^6$ ) (Morais et al, 2014; Moraes et al, 2016), sendo considerada espécie promíscua.

Os estádios I a III representam a fase pré-meiótica na qual apenas uma geração de espermatídes está presente, sendo o estágio I o mais frequente dentre todos eles. O estágio IV representa a meiose, sendo o menos frequente, enquanto os estádios de V a VIII são os pós-meióticos, com a presença de duas gerações de espermatídes, sendo o estágio VIII o mais frequente dessa fase. Vários autores sugerem que espécies filogeneticamente próximas têm frequências de estádios semelhantes e conseqüentemente a duração das fase pré e pós-meióticas (França et al., 2005; Silva et al., 2010; Figueiredo et al., 2017). O mesmo padrão de frequência

de estádios foi descrito para *O. rufus* e *Kannabateomys amblyonyx* (Morais et al., 2016; Siman et al., 2017).

O compartimento intertubular corresponde à porção endócrina do testículo, função desempenhada pelas células de Leydig por estimulação do hormônio luteinizante (LH) (Ge et al., 2008). *O. bicolor* possui maior proporção de compartimento intertubular e de células de Leydig do que *Hylaeamys megacephalus* (5,54% e 3,21%, respectivamente) e *Necromys lasiurus* (6,87% e 3,32%, respectivamente), roedores pertencentes à mesma família (Melo et al., 2015; Oliveira et al., 2015). De acordo com Fawcett et al (1973), *O. bicolor* pertence à classificação tipo três de organização do compartimento intertubular, por ser composto majoritariamente por células de Leydig, pouco espaço linfático e principalmente pouco tecido conjuntivo.

Em *O. bicolor* o diâmetro e o volume nuclear das células de Leydig foram 7,1  $\mu\text{m}$  e 190,66  $\mu\text{m}^3$ , respectivamente, sendo maiores que os encontrados em *N. lasiurus* (6,21 $\mu\text{m}$  e 126,21 $\mu\text{m}^3$ , respectivamente), *Rhipidomys macrurus* (6,88 $\mu\text{m}$  e 172,74 $\mu\text{m}^3$ , respectivamente) e *H. megacephalus* (5,95  $\mu\text{m}$  e 111,18  $\mu\text{m}^3$ , respectivamente). Esses dados sugerem que a capacidade de síntese de testosterona das células de Leydig de *O. bicolor* é maior do que as demais espécies analisadas (Melo et al., 2015; Oliveira et al., 2015).

*O. bicolor* possui mais células de Leydig por grama de testículo ( $11,10 \times 10^7$ ) que *H. magacephalus* ( $89,58 \times 10^6$ ), *N. lasiurus* ( $61 \times 10^6$ ) o que reforça a hipótese de *O. bicolor* produzir mais testosterona em relação a essas três espécies (Melo et al., 2015; Oliveira et al., 2015).

Existe uma relação entre o volume do núcleo da célula de Leydig, o número de células de Leydig por grama de testículo e a concentração de testosterona sérica (Castro et al., 2002). Como esses parâmetros de células de Leydig em *O. bicolor* são significativamente maiores entre as espécies comparadas, é esperado que a síntese de testosterona influencie positivamente na libido e na espermatogênese dessa espécie. A alta capacidade androgênica também

influência no comportamento reprodutivo da espécie, para um macho com sistema de acasalamento promíscuo, a testosterona atua positivamente na competição intraespecífica por fêmeas (Ridley, 2004; Paula et al 2007).

## 5. Conclusões

*Oecomys bicolor* apresenta alto investimento reprodutivo devido aos valores de proporção do epitélio seminífero, do IGS e ITS e dos índices relacionados à espermatogênese. Apresenta também grande investimento no compartimento intertubular, visto seus dados relativos às células de Leydig. Esses fatores estão relacionados diretamente a um perfil de comportamento reprodutivo dos machos, indicando que são animais promíscuos.

## Referências bibliográficas

- Amann, R.P., 1962. Reproductive capacity of dairy bulls. VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. *J. Dairy Sci.* 774-781.
- Balarini, M.K., 2013. Avaliação morfofuncional do testículo e do processo espermatogênico dos roedores silvestres *Akodon cursor* e *Oligoryzomys nigripes* (Rodentia: Cricetidae). PhD Thesis. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil (81p.).
- Berndston, W.E., 1977. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *J. Anim. Sci.* 44, 818–833.
- Bonvicino, C.R., Oliveira, J.A., D’Andrea, P.S.D., 2008. Guia dos Roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseados em caracteres externos, Centro pan-Americano de Febre Aftosa – OPAS/OMS, Rio de Janeiro.
- Collins, J. A, Schandl, C. A, Young, K. K, Vesely, J, Willingham, M. C. 1997. Major DNA fragmentation is a late event in apoptosis. *J. Histochem. Cytochem.*, 45(7), 923–934.
- Cordeiro Júnior, D.A., 2009. Estrutura e função testiculares em roedores silvestres das famílias Echimyidae (*Trinomys moojeni*) e Cricetidae (*Akodon cursor*, *Akodon montensis*, *Necromys*

- lasiurus e Oligoryzomys nigripes*), da Reserva Particular do Patrimônio Natural do Caraça. PhD Thesis. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerias, Brasil (119 p.).
- Castro, A. C. S, Berndtson, W. E, & Cardoso, F. M. 2002. Plasma and testicular testosterone levels, volume density and number of Leydig cells and spermatogenic efficiency of rabbits. *Braz. J. Med. Biol.*, 35(4), 493–498.
- Costa, K.L.C., Matta, S.L.P., Gomes, M.L.M., Paula, T.A.R., Freitas, K.M., Carvalho, F.A.R., Silveira, J.A., Dolder, H., Mendis-Handagama S.M.L.C., 2011. Histomorphometric evaluation of the neotropical brown brocket deer *Mazama gouazoubira* testis, with an emphasis on cell population indexes of spermatogenic yield. *Anim. Reprod. Sci.* 127, 202–212.
- Dias, F.C.R., Martins, A.L.P., Melo, F.C.S.A., Cupertino, M. C., Gomes, M.L.M., Oliveira, J.M., Damasceno, E.M., Silva, J., Otoni, W.C., Matta, S.L.P., 2019. Hydroalcoholic extract of *Pfaffia glomerata* alters the organization of the seminiferous tubules by modulating the oxidative state and the microstructural reorganization of the mice testes. *J. Ethnopharmacol.* 233, 179–189.
- Emmons, L., Feer, F. (1997). Neotropical rainforest mammals: A field guide. 2<sup>nd</sup> ed. *J. Trop. Ecol.*
- Figueiredo, A.F.A., Cordeiro Jr, D.A., Nogueira, J.C., Talamoni, S.A., França, L.R., 2017. Spermatogenesis in a neotropical marsupial species, *Philander frenatus* (Olfers, 1818). *Anim. Reprod. Sci.* 102–109.
- França, L.R., Avelar, G.F., Almeida, F.F.L., 2005. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology* 63, 300–318.
- França, L.R., Hess, R.A., Dufour, J.M., Hofmann, M.C., Griswold, M.D., 2016. The Sertoli cell: One hundred fifty years of beauty and plasticity. *Andrology* 4, 189–212.
- França, L. R. & Russell, L. D. (1998). Male reproduction: A multidisciplinary overview. Churchill Communications.

- Fawcett, D. W., Neaves, W. B., Flores, M. N., 1973. Comparative Observations on Intertubular Lymphatics and the Organization of the Interstitial Tissue of the Mammalian Testis. *Biol. Reprod.* 9, 500-532.
- Ge, R., Chen, G., Hardy, M.P., 2008. The role of the Leydig cell in spermatogenic function. *Adv. Exp. Med. Biol.* 636, 255–269.
- Jansa S. A., Weksler, M., 2004. Phylogeny of muroid rodents: relationships within and among major lineages as determined by IRBP gene sequences. *Mol. Phylogenetics Evol.* 31, 256–276.
- Johnson, L., Petty, C.S., Neaves, W.B., 1981. A new approach to quantification of spermatogenesis and its application to germinal cell attrition during human spermiogenesis. *Biol. Reprod.* 25, 217–226.
- Karnovsky, M.J., 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 27, 137–138.
- Kenagy, G.J., Trombulak, S.C., 1986. Size and function of mammalian testes in relation to body size. *J. Mammal.* 67, 1–22.
- Leite, F.L.G., Paula, T.A.R., Matta, S.L.P., Fonseca, C.C., Neves, M.T.D., Barros, J.B.G., 2006. Cycle and duration of the seminiferous epithelium in puma (*Puma concolor*). *Anim. Reprod. Sci.* 91, 307–316.
- Manlik, O., Mcdonald, J.A., Mann, J., Raudino, H.C., Bejder, L., Connor, R.C., Heithaus, M.R., Lacy, R.C., Sherwin, W.B., 2016. The relative importance of reproduction and survival for the conservation of two dolphin populations. *Ecol. Evol.* 6, 3496–3512.
- Melo, F.C.S.A., Souza, T.P., Costa K.L.C., Matta, S.L.P., Melo, F.R., 2015. Morphometry and stereology of the interstitial compartment in the wild rodent *Hylaeamys megacephalus* (Rodentia: Cricetidae). *Enciclopédia Biosf.* 11, 2331–2339.
- MMA, 2002. Biodiversidade brasileira, Ministério do Meio Ambiente.

- Morais, A.C.T., Balarini, M.K., P. Menezes, T., S. Ferraz, F., Gomes, M.L.M., B. Morais, D., Paula, T.A.R., Matta, S.L.P., 2016. Germ cells and the seminiferous epithelium cycle in the wild rodent *Oxymycterus rufus* (Rodentia: Cricetidae). *J. Pharm. Biol. Sci.* 11, 61–71.
- Morais, A.C.T., Lopes, E.O., Menezes, T.P., Morais, D.B., Gomes, M.L.M., Matta, S.L.P., Balarini, M.K., Quintela, F.M., 2014. The tubular compartment and the spermatogenic dynamics of the wild rodent *Oxymycterus nasutus* (Rodentia: Cricetidae). *Anim. Reprod. Sci.* 149, 249–258.
- Oliveira, L.M., Mello, J.P.L., Matta, S.L.P., Melo, F.R., Melo, F.C.S.A., 2015. Morfometria do compartimento intertubular dos testículos de roedores silvestres *Necomys lasiurus* e *Rhipidomys macrurus* (Cricetidae: Sigmodontinae) capturados em área de cerrado do sudoeste de Goiás. *Enciclopédia Biosf.* 11, 2319-2330.
- Paglia, A.P., Fonseca, G.A.B., Rylands, A.B., Herrmann, G., Aguiar, L.M.S., Chiarello, A.G., Leite, Y.L.R., Costa, L.P., Siciliano, S., Kierulff, M.C.M., Mendes, S.L., Mittermeier, R.A., Patton, J.L., 2012. *Conservation Biology*. 2a edition. Occasional Papers in Conservation Biology, No. 6. Conservation International, Arlington, VA. p.76.
- Pardiñas, U.F.J., Teta, P., Salazar-Bravo, J., Myers, P., Galliari, C.A., 2016. A new species of arboreal rat, genus *Oecomys* (Rodentia, Cricetidae) from Chaco. *J. Mammal.* 97, 1177–1196.
- Paula, T.A.R., Matta, S.L.P., Silva, V.A., Costa, D.S., Fonseca, C.C., Neves, M.T.D., 2007. Intertubular space characterization in adult capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) testis. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 50, 289–297.
- Russell, D., Ettlín, R. A, Sinha Hikim, A. P., Clegg, E. D. (1990). *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Cache River Press, Clearwater.
- Reis, N.R. Peracchi, A.L., Pedro, W.A., Lima, I.P., 2006. *Mamíferos do Brasil, Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina*.
- Ridley, M. 2004. *Evolution*. 3rd Edition, Blackwell Publisher, Oxford.

- Silva, R.C., Costa, G.M.J., Andrade, L.M., França, L.R., 2010. Testis stereology, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in the ocelot (*Leopardus pardalis*). *Theriogenology* 73, 157–167.
- Siman, V.A., Godoy, R.S.M., Dias, F.C.R., Silva, F.A., Giudice, G.M.L., Gomes, M.L.M., Matta, S.L.P., 2017. Spermatogenic dynamics of the spiny rat *Kannabateomys amblyonyx* (Wagner, 1845) (Rodentia, Echimyidae). *Anim. Reprod. Sci.* 184, 36–43.
- Stenger, B. L. S., Horčíčková, M., Clark, M. E., Kváč, M., Čondlová, S., Khan, E., Widmer, G., Xiao, L., Giddings, C. W., Pennil, C., Stanko, M. Sak, B., Mcevoy, J. M., 2018. *Cryptosporidium* infecting wild cricetid rodents from the subfamilies Arvicolinae and Neotominae. *Parasitology*. 145(3), 326–334.
- Steppan, S. J., Adkins, R. M., Anderson, J., 2004. Phylogeny and divergence-date estimates of rapid radiations in muroid rodents based on multiple nuclear genes. *Syst. Biol.* 53(4), 533–553.
- Suárez-Villota, E.Y., Carmignotto, A.P., Brandão, M.V., Percequillo, A.R., Silva, M.J.J., 2017. Systematics of the genus *Oecomys* (Sigmodontinae: Oryzomyini): molecular phylogenetic, cytogenetic and morphological approaches reveal cryptic species. *Zool. J. Linn. Soc.* 1–29.

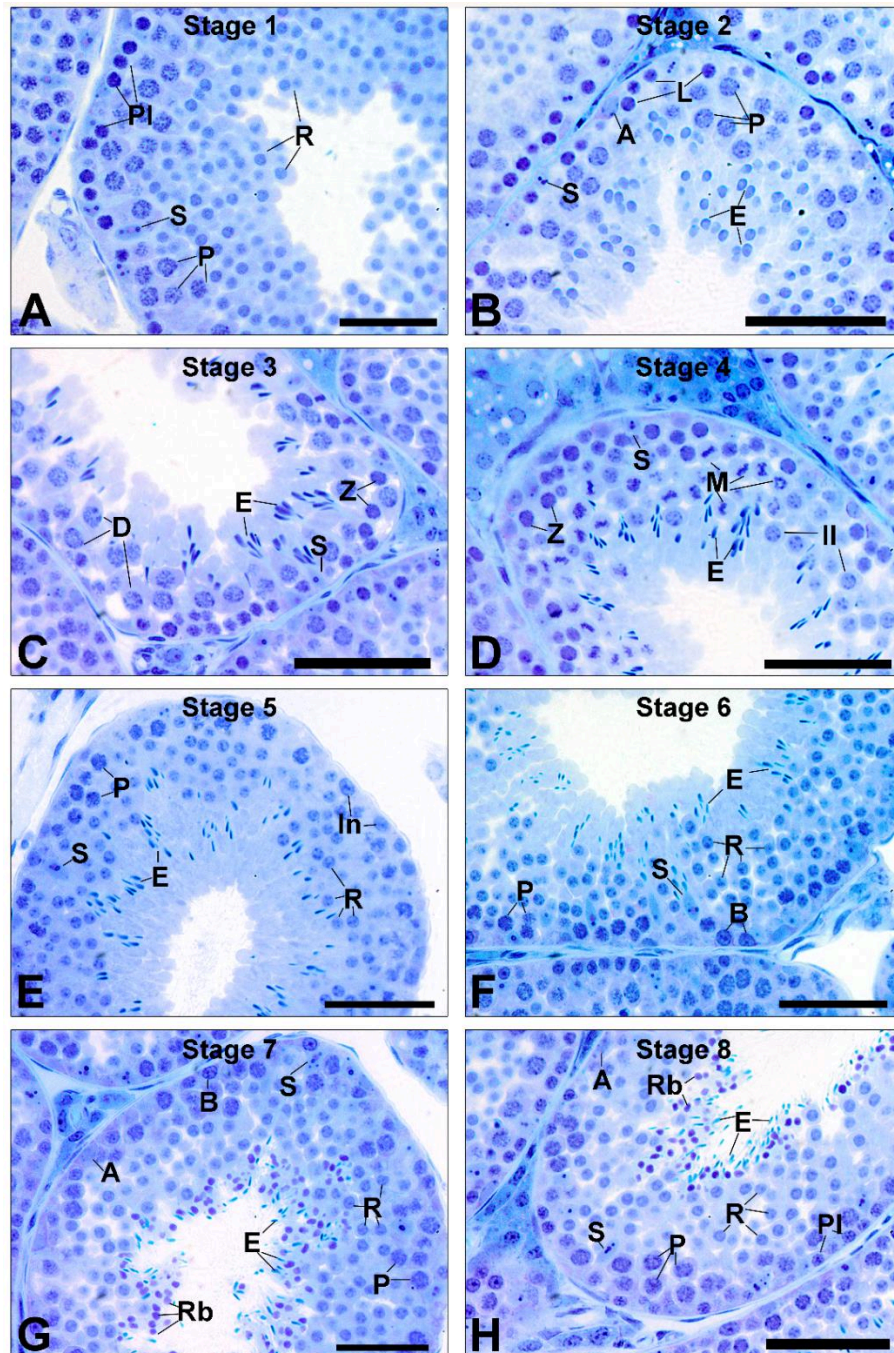


Figura 1. Estádios do epitélio seminífero de *Oecomys bicolor*. (A) Estádio 1. (B) Estádio 2. (C) Estádio 3. (D) Estádio 4. (E) Estádio 5. (F) Estádio 6. (G) Estádio 7. (H) Estádio 8. S: célula de Sertoli, PI: Preleptóteno, P: Paquíteno, R: Espermátides arredondadas, A: Espermatogônia tipo A, B: Espermatogônia tipo B, L: Leptóteno, M: Mitose, E: Espermátides alongadas, Z: Zigóteno, RB: Corpo residual. Barra 50 $\mu$ m.

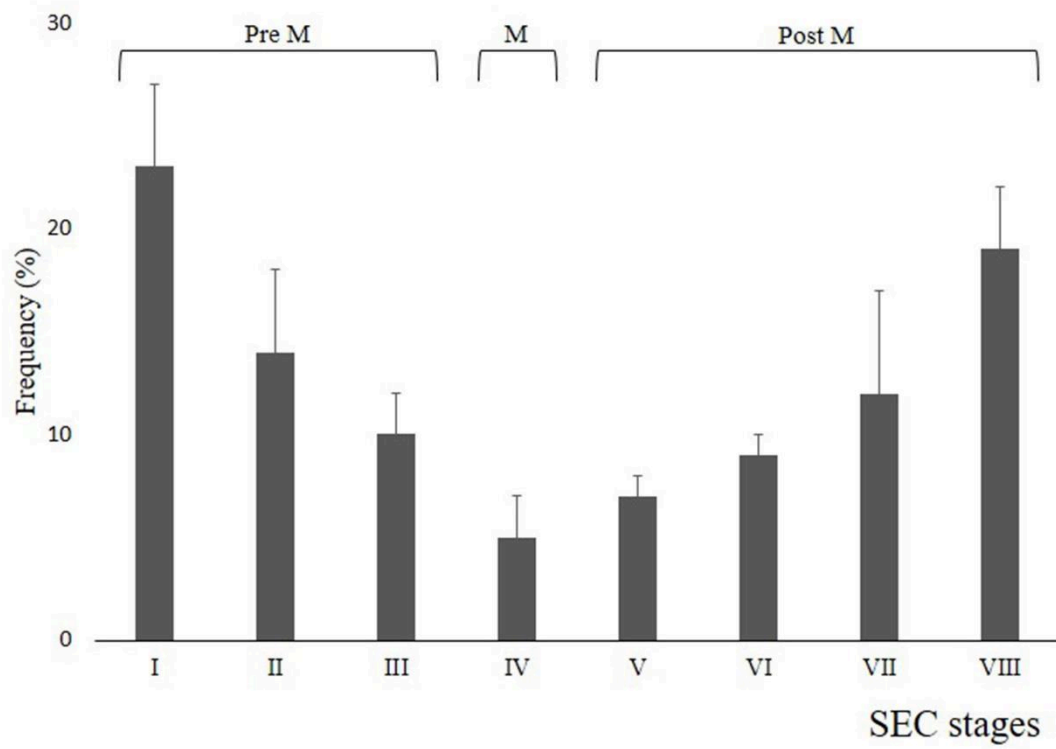


Figura 2. Frequência dos estádios do epitélio seminífero (SEC) de *Oecomys bicolor*. Pré M: fase pré-meiótica; M: fase meiótica; Post M: fase pós-meiótica.

Tabela 1.

<b>Parâmetros</b>	<b>Média ± DP</b>
Peso corporal (g)	35.8 ± 8.2
Peso testicular (g)	0.191 ± 0.7
IGS (%)	0.53 ± 0.19
Albugínea (g)	0.002 ± 0.0003
Parênquima testicular(g)	0.189 ± 0.8
IPS (%)	0.50 ± 0.19
Túbulo seminífero (%)	89.72 ± 0.68
Epitélio seminífero (%)	69.86 ± 2.12
Túnica própria (%)	5.98 ± 0.74
Lume (%)	13.86 ± 2.88
ITS (%)	0.47 ± 0.17
IES (%)	0.37 ± 0.13
Túbulo seminífero (ml)	0.17 ± 0.07
Epitélio seminífero (ml)	0.13 ± 0.05
Túnica própria (ml)	0.01 ± 0.005
Lume (ml)	0.03 ± 0.01
Diâmetro tubular (µm)	189.45 ± 14.56
Altura de epitélio (µm)	62.64 ± 4.81
Comprimento do túbulo seminífero (m)	6.03 ± 2.34
Comprimento do túbulo seminífero/g de testículo (m/g)	31.91 ± 4.46
Área de túbulo seminífero (µm <sup>2</sup> )	28306.35 ± 4470.36
Área de epitélio seminífero (µm <sup>2</sup> )	25023.12 ± 3733.86
Área de lume (µm <sup>2</sup> )	3283.23 ± 966.25
Relação túbulo/epitélio	1.13 ± 0.03

Biometria, morfometria e estereologia dos componentes testiculares de *Oecomys bicolor*.

IGS: Índice gonadossomático; IPS: Índice parenquimossomático; ITS: Índice tubulossomático;

IES: Índice epiteliossomático.

Tabela 2.

Número corrigido das células do epitélio seminífero no estágio 1 e índices da espermatogênese de *Oecomys bicolor*.

<b>Parâmetro</b>	<b>Média ± DP</b>
Tipo celular	
Espermatogônia tipo A	32.12 ± 10.55
Espermatócito em preleptóteno	271 ± 98.91
Espermatócito em paquíteno	310.6 ± 195.53
Espermátide arredondada	732.82 ± 242.64
Célula de Sertoli	81.3 ± 13.98
Índice mitótico	8.59 ± 2.03
Índice meiótico	2.45 ± 0.37
Rendimento da espermatogênese	23.83 ± 8.10

Tabela 3.

Índice de células de Sertoli e reserva espermática de *Oecomys bicolor*.

<b>Parâmetros</b>	<b>Média ± DP</b>
Número de célula de Sertoli/testículo (10 <sup>5</sup> )	16.56 ± 7.3
Número de célula de Sertoli/ g de testículo (10 <sup>5</sup> )	87.2 ± 23.89
Índice de Sertoli	8.84 ± 1.51
Capacidade suporte de Sertoli	16.23 ± 3.27
Reserva espermática/testículo (10 <sup>6</sup> )	14.86 ± 6.56
Reserva espermática/g de testículo (10 <sup>6</sup> )	79.08 ± 33.93

Tabela 4.

Biometria, morfometria e estereologia do compartimento intertubular de *Oecomys bicolor*.

<b>Parâmetros</b>	<b>Média ± DP</b>
Intertúbulo (%)	10.28 ± 0.75
Célula de Leydig (%)	4.99 ± 0.39
Citoplasma da célula de Leydig (%)	2.96 ± 0.31
Núcleo da célula de Leydig (%)	2.03 ± 0.15
Espaço linfático (%)	3.17 ± 0.71
Vasos sanguíneos (%)	1.01 ± 0.37
Tecido conjuntivo (%)	1.01 ± 0.32
Macrófago (%)	0.1 ± 0.03
IIS (%)	0.054 ± 0.021
ILS (%)	0.026 ± 0.011
Intertúbulo (ml)	0.0193 ± 0.0077
Célula de Leydig (ml)	0.0097 ± 0.0043
Citoplasma da célula de Leydig (ml)	0.0059 ± 0.0027
Núcleo da célula de Leydig (ml)	0.0038 ± 0.0016
Espaço linfático (ml)	0.0056 ± 0.0016
Vasos sanguíneos (ml)	0.0021 ± 0.0014
Tecido conjuntivo (ml)	0.0018 ± 0.0006
Macrófago (ml)	0.0001 ± 0.00005

IIS: Índice intertubulossomático; ILS: Índice Leydigossomático

Tabela 5.

Estereologia das células de Leydig de *Oecomys bicolor*.

<b>Parâmetro</b>	<b>Média ± DP</b>
Diâmetro do núcleo de Leydig ( $\mu\text{m}$ )	$7.1 \pm 0.59$
Volume da célula de Leydig ( $\mu\text{m}^3$ )	$471.24 \pm 121.32$
Volume do citoplasma da célula de Leydig ( $\mu\text{m}^3$ )	$280.58 \pm 78.81$
Volume do núcleo da célula de Leydig ( $\mu\text{m}^3$ )	$190.66 \pm 45.70$
Volume da célula de Leydig/testículo ( $\mu\text{m}^3 10^8$ )	$95.46 \pm 43.02$
Volume da célula de Leydig/g de testículo ( $\mu\text{m}^3 10^9$ )	$49.26 \pm 37.60$
Número de células de Leydig/testículo ( $10^6$ )	$20.41 \pm 8.67$
Número de células de Leydig/g de testículo ( $10^7$ )	$11.10 \pm 3.34$

## ARTIGO 2

**Parâmetros histomorfométricos testiculares e dinâmica da espermatogênica de *Monodelphis americana* (Müller, 1776) (Didelphimorphia: Didelphidae)**

## Resumo

Os testículos dos mamíferos são responsáveis pela produção dos gametas e pela secreção do hormônio sexual testosterona. No compartimento tubular acontece a espermatogênese onde células da linhagem germinativa se dividem e se diferenciam até a formação do espermatozoide, enquanto no compartimento intertubular as células de Leydig produzem e secretam a testosterona, hormônio essencial para a espermatogênese. *Monodelphis americana* é um marsupial endêmico do Brasil conhecido popularmente como cuíca de três listras. A biologia reprodutiva, principalmente dos marsupiais, é pouco explorada e é uma ferramenta importante para compreender as estratégias reprodutiva das espécies o que contribuí para a ações de manejo e conservação das espécies. *Monodelphis americana* apresentou peso corporal de 36,7g com IGS 0,47%, ITS 0,36% e IES 0,27%, sendo a proporção de túbulos seminíferos de 83,16%, o que aponta grande investimento da espécie na produção de espermatozoides. Os índices mitótico e meiótico foram 1,87 e 2,64 células, respectivamente, e o rendimento da espermatogênese foi de 12,68 células. O compartimento intertubular representa 16,84% do parênquima testicular sendo 13,13% de células de Leydig, cujo número por testículo é de  $22,75 \times 10^6$  células. *Monodelphis americana* tem maior investimento nos parâmetros espermatogênicos do que no compartimento intertubular inferindo que os machos apresentam comportamento reprodutivo promíscuo.

Palavras chave: *Monodelphis americana*, Espermatogênese, Túbulo seminífero, Sertoli, Leydig.

## 1. Introdução

Os marsupiais se distinguem dos demais mamíferos principalmente pelo seu modo reprodutivo e pela anatomia do trato urogenital. Os dutos urinários passam no meio dos dutos genitais, enquanto nos eutérios passam lateralmente. Nos machos, o pênis é bifurcado e o escroto, ao contrário dos eutérios, localiza-se à frente do pênis. Nas fêmeas, o trato reprodutivo consiste de duas vaginas laterais. As fêmeas têm curto período de gestação intrauterina e longo período de lactação. Os filhotes nascem em um estágio imaturo e, dependendo da espécie, são mantidos do lado de fora do corpo ou no marsúpio, onde os mamilos estão implantados (ANDRADE; PINTO; OLIVEIRA, 2002).

Existem três ordens de marsupiais americanos: Didelphimorphia, Paucituberculata e Microbiotheria (BRITO et al., 2009). A Ordem Didelphimorphia pertence à subclasse Theria e é a ordem mais diversa, sendo espécies popularmente conhecidas por cuícas e gambás. Apresentam distribuição desde o extremo sul da América do Sul até o leste do Canadá (GARDNER, 2008). No Brasil são registrados cerca de 16 gêneros e 55 espécies. O gênero *Monodelphis* possui 15 espécies e todos habitam a América do Sul, sendo animais de pequeno porte (REIS et al., 2006)

*Monodelphis americana*, popularmente conhecida como cuíca-de-três-listras, possui porte pequeno, entre 100 e 105mm, tem a pelagem dorsal marrom a acinzentada com três listras pretas horizontais. A listra do meio parte do focinho e vai até a base da cauda, enquanto as laterais partem dos ombros. É uma espécie essencialmente terrestre e mais ativa durante o dia. São encontrados na Mata Atlântica e no Cerrado e alimentam-se de pequenos invertebrados, frutas e sementes (MORAES et al., 2016).

Apesar dos 55 gêneros distribuídos nos diferentes biomas brasileiros e do interesse nos aspectos da história natural desses animais, há poucas informações sobre a ecologia e a

adaptação desse grupo, principalmente da ecologia-evolutiva e das estratégias de reprodução desses animais (CÁCERES, 2012).

Estudos sobre o processo espermatogênico das espécies são importantes para o desenvolvimento de políticas de conservação específicas. Além disso, ajudam a complementar o conhecimento acerca da biologia reprodutiva das espécies (LEITE et al., 2006). A morfometria testicular dos compartimentos tubular e intertubular é capaz de gerar dados que permitem estimar a atividade das células e a relação dos padrões de acasalamento das espécies (MORAIS et al., 2014). Desse modo, esse estudo teve objetivo de descrever a dinâmica da espermatogênese assim como o compartimento tubular e intertubular do marsupial *Monodelphis americana*.

## 2. Material e métodos

### 2.1. Animais

A área utilizada para coleta dos animais possui aproximadamente 450 hectares de reserva de Mata Atlântica, chamada de Mata do Paraíso que pertence ao município de Viçosa, Minas Gerais. Foram capturados 10 animais utilizando armadilhas do tipo Pitfall assim como Sherman e Tomahawk com iscas compostas por fubá, sardinha e banana. As coletas foram autorizadas pelo IBAMA licença nº13045-1 e o protocolo experimental aprovado pelo CEUA da UFV sob protocolo número 552/2016. Os animais foram pesados e anestesiados utilizando-se tiopental 30mg/kg intraperitoneal.

### 2.2. Processamento histológico

Os testículos destinados às análises morfológicas foram removidos e fixados em solução de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965). Depois de fixados, fragmentos testiculares foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, incluídos em 2-hidroxietil metacrilato (Historesin®, Leica), seccionados na espessura de 3µm e corados com azul de toluidina – borato

de sódio 1%. Imagens do parênquima testicular foram obtidas em microscópio Olympus AX-70 e analisadas utilizando-se o software de análise de imagens ImageJ. A albugínea testicular foi retirada e pesada, sendo seu peso subtraído do peso gonadal para se obter o peso do parênquima testicular.

### 2.3. Dados biométricos

Baseado nos pesos corporal, testicular, do parênquima e nos volumes de túbulos seminíferos e epitélio seminífero, foram calculados os índices gonadossomático (IGS), parenquimossomático (IPS), tubulossomático (ITS) e epiteliossomático (IES) a partir da equação: Índice (%) = peso do testículo ou parênquima ou volume do túbulo ou epitélio/PC x 100, onde PC= Peso corporal.

### 2.4. Morfometria e estereologia dos túbulos seminíferos

A proporção volumétrica dos componentes do parênquima testicular foi estimada a partir da contagem de 5.320 pontos por animal, utilizando-se retículo com 266 intersecções (pontos), em aumento de 100X, realizando-se a contagem de 20 campos aleatórios para cada animal. Desse modo, foram calculadas as proporções volumétricas de todos os componentes do parênquima testicular: túnica própria, epitélio seminífero, lume e intertúbulo. A equação usada foi: Proporção volumétrica (%) = (NT/NTT) x 100, onde NT= Número de pontos contados sobre o componente do parênquima e NTT= Número de pontos totais contados. Para cálculo dos volumes dos componentes do parênquima testicular utilizou-se a equação: Volume = % do elemento x PPT / 100, onde PPT= Peso do parênquima testicular. O volume do testículo foi considerado igual ao peso (JOHNSON; PETTY; NEAVES, 1981; COSTA et al., 2011).

O diâmetro tubular médio ( $\mu\text{m}$ ) por animal foi obtido a partir da mensuração, ao acaso, de 20 secções transversais de túbulos sem considerar o estágio do ciclo do epitélio seminífero.

Nas mesmas secções foram mensuradas a altura do epitélio seminífero ( $\mu\text{m}$ ), a partir da túnica própria até o lúmen tubular, tomadas de forma diametralmente opostas.

O comprimento total dos túbulos seminíferos (CTT) por testículo e por grama de testículo, em metros, foi estimado empregando-se a seguinte equação:  $\text{CTT} = \text{VTS} / \pi R^2$ , onde VTS= Volume total de túbulos seminíferos dos testículos,  $\pi R^2$ = Área da secção transversal dos túbulos seminíferos e R= diâmetro tubular. O CTT foi dividido pelo peso dos testículos para estimar o comprimento dos túbulos seminíferos por grama de testículo.

A área tubular foi calculada pela fórmula  $\text{AT} = \pi \cdot \text{RT}^2$ , onde RT= raio tubular, enquanto a área luminal pela fórmula  $\text{AL} = \pi \cdot \text{RL}^2$ , onde RL= raio luminal. A área de epitélio foi calculada subtraindo a AT pela AL, enquanto a relação túbulo/epitélio (RT/E) foi obtida por AT/AE (DIAS et al., 2019).

## 2.5. Contagem de células do estágio 1

O número de células que constituem o epitélio seminífero no estágio 1 do ciclo foi obtido a partir da contagem das células germinativas e das células de Sertoli, em 20 secções transversais de túbulos seminíferos para cada animal. Foram quantificadas espermatogônias do tipo A (SGA), espermatócitos primários na transição de preleptóteno para leptóteno (PL), espermatócitos primários em paquíteno (PAQ) e espermatídes arredondadas (EAR), além dos nucléolos de células de Sertoli (SER). Foi feita a média dos diâmetros de cada célula germinativa e a média dos nucléolos das células de Sertoli pela mensuração de 30 células de cada tipo citado. As contagens obtidas foram corrigidas para o diâmetro nuclear médio de 30 células e espessura do corte histológico segundo AMANN (1961). As seguintes razões foram utilizadas: índice mitótico (PL:SGA); índice meiótico (EAR:PAQ) e rendimento geral da espermatogênese (EAR:SGA).

## 2.6. Caracterização e frequência dos estágios do ciclo seminífero (CES)

Os estádios do CES foram caracterizados pelo método da Morfologia Tubular (BERNDTSON, 1977). Baseados nas alterações da forma e localização do núcleo das diferentes gerações das células germinativas e na ocorrência de figuras de divisão meiótica foram caracterizados 8 estádios. A frequência relativa dos estádios do CES foi determinada a partir da caracterização e contagem de 200 secções transversais de túbulos seminíferos para cada animal, escolhidos aleatoriamente (SIMAN et al., 2017).

### 2.7. Reserva espermática

Considerando-se que a perda na espermiogênese é insignificante, determinou-se a reserva espermática testicular (RET) total e por grama de testículo a partir da população celular de espermátides arredondadas no estágio I do CES, baseando-se na fórmula:  $RET = (\text{comprimento dos túbulos seminíferos/espessura do corte}) \times \text{número corrigido de espermátides arredondadas por secção transversal}$  (BERNDTSON, 1977).

### 2.8. Célula de Sertoli

O número de células de Sertoli por testículo foi estimado a partir da fórmula:  $NCS = \text{Comprimento total de túbulos seminíferos } (\mu\text{m}) \times \text{Número corrigido de nucléolos de células de Sertoli por secção transversal} / \text{Espessura do corte } (\mu\text{m})$ . O número de células de Sertoli foi dividido pelo peso testicular para estimar a quantidade de células por grama de testículo. O índice de célula de Sertoli (EAR:SER) e a capacidade total de suporte da célula de Sertoli (SGA + PL + PAQ + EAR:SER) também foram calculados.

### 2.9. Morfometria intertubular

A proporção volumétrica entre os elementos que compõem o intertúbulo foi estimada a partir da contagem de 1.000 pontos por animal, utilizando-se retículo com 540 intersecções (pontos), em aumento de 400X, realizando-se a contagem de campos aleatórios em cada animal. Foram contabilizados a proporção volumétrica de núcleo e citoplasma da célula de Leydig, vaso

sanguíneo, espaço linfático, tecido conjuntivo e macrófagos, pela fórmula: Proporção volumétrica (%) =  $(NI/NTI) \times 100$ , onde NI= Número de pontos contados sobre o componente do intertúbulo e NTI= Número de pontos totais contados no intertúbulo.

Para cálculo do volume do intertúbulo, bem como dos elementos que o compõe, utilizou-se a fórmula: Volume = % do componente do intertúbulo x PPT / 100, onde PPT= peso do parênquima testicular.

Com base no peso corporal e na proporção de intertúbulo e células de Leydig foram calculados os índices intertubulossomático (IIS) e Leydigossomático (ILS) pela fórmula: Índice (%) =  $(VCL \text{ ou } \%I / PC) \times 100$ , onde VCL= Volume de células de Leydig nos testículos %I = proporção de intertúbulo e PC= Peso corporal.

## 2.10. Morfometria da Célula de Leydig

Foi medido o diâmetro nuclear médio, em  $\mu\text{m}$ , das células de Leydig em aumento de 400X, totalizando 30 núcleos para cada animal. A partir das fórmulas abaixo, foram então calculados o volume nuclear (VNL), citoplasmático (VCL) e o volume de cada célula de Leydig (VL), em  $\mu\text{m}^3$  aplicando-se as fórmulas:  $VNL = 4/3 \pi R^3$ , onde R= Raio nuclear;  $VCL = \%CL \times VNL / \%NL$ , onde %CL= Proporção volumétrica de citoplasma de Leydig; %NL = Proporção volumétrica de núcleo de Leydig; e  $VL = VNL + VCL$ .

O volume que a célula de Leydig ocupa nos testículos (VLT), em  $\mu\text{L}$ , foi calculado a partir da fórmula:  $VLT = (\% \text{ Ley} \times PPT) / 100$ , onde % Ley = Proporção volumétrica da célula de Leydig no parênquima testicular e PPT= Peso do parênquima testicular. O volume de célula de Leydig por grama de testículo (VL/gT) foi obtido por  $VLT/PT$ , onde PT é peso testicular.

Foram calculados o número de células de Leydig por testículo (NL/t) e por grama de testículo (NL/gT), por meio da seguinte equação:  $N/t = VLT / VL$ , onde: VLT= Volume de

Leydig por testículo e  $VL =$  Volume de uma célula de Leydig, e  $NL/gT = NL/PT$ , onde  $PT =$  Peso testicular.

### 2.11. Estatística

Todos os resultados foram analisados no software Excel do Windows e expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média.

## 3. Resultados

### 3.1. Dados Biométricos, Morfometria e estereologia dos túbulos seminíferos

Os dados biométricos, morfométricos e estereológicos dos túbulos seminíferos de *M. americana* encontram-se na Tabela 1. O peso corporal e testicular foram de 36,7g e 0,16g, respectivamente. O índice gonadossomático (IGS) foi 0,47% e o parenquimossomático (IPS) 0,43% (Tabela 1).

*M. americana* possui 83,16% do parênquima testicular composto por túbulos seminíferos e 16,84% de intertúbulo. A maior parte dos túbulos seminíferos é composta pelo epitélio seminífero (63,48%), seguido pelo lume e túnica própria (14,67% e 5,01%, respectivamente) (Tabela 1).

Com base na volumetria dos túbulos seminíferos e epitélio seminífero, foram calculados os índices tubulossomático (ITS) e epiteliossomático obtendo-se 0,36% e 0,27%, respectivamente (Tabela 1). O diâmetro tubular e a altura do epitélio de *M. americana* foram de 216,58  $\mu\text{m}$  e 66,26  $\mu\text{m}$ , respectivamente (Tabela 1). *M. americana* possui cerca de 3,43 m de túbulos seminíferos, na proporção de 20,96 m/g de testículo (Tabela 1).

As medições da área do túbulo, lúmen e epitélio e a razão túbulo epitelial (RTE) de *M. americana* são mostradas na Tabela 1. A área tubular é de  $36,97 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ , distribuída em  $31,35 \times 10^3 \mu\text{m}^2$  de área epitelial e  $5,62 \times 10^3 \mu\text{m}^2$  de área luminal. A relação túbulo/epitélio (RTE) foi de 1,18.

### 3.2 Contagem de células do estágio 1

Os números corrigidos de células germinativas e de Sertoli, assim como os índices espermatogênicos de *M. americana* estão descritos na Tabela 2. A eficiência da mitose espermatogonial é de 1,87 células, enquanto o índice meiótico é de 2,64 células e o rendimento espermatogênico é de 12,68 células.

### 3.3 Estádios do ciclo seminífero (CES)

Com base nos critérios de divisão pelo método da morfologia tubular proposto por BERNDTSON (1977) e de acordo com OISHI (2013) foram caracterizados oito estádios do epitélio seminífero de *M. americana*.

Espermatogônias do tipo A são encontradas no compartimento basal, apresentam núcleo oval e pouca heterocromatina. Já os espermatócitos em paquíteno são as células com núcleos maiores com feixes de cromatina condensados, ausentes somente nos estádios 3 e 4. As demais organizações estão descritas a seguir (Figura 1).

Estádio 1: As espermátides possuem morfologia nuclear levemente alongada onde em uma das extremidades nota-se o acrossoma, uma faixa mais corada do que o restante do núcleo. Espermatócitos em preleptóteno e paquíteno estão presentes.

Estádio 2: Espermátides com núcleo mais condensados e em formato cônico, em ambos lados do núcleo há formação das manchetas. Presença de espermatogônias do tipo A, além de espermatócitos em leptóteno e paquíteno na base do epitélio.

Estádio 3: Espermátides com o núcleo condensado achatado paralelas à membrana basal. Acrossoma menos corado acima do núcleo e a persistência das manchetas nas laterais das espermátides. Presença de espermatócitos em zigóteno e em diplóteno.

Estádio 4: As espermátides adquirem morfologia em V e mudam de eixo no epitélio seminífero a partir do estágio 4, distinção entre o acrossoma e núcleo pelo tom da coloração e as manchetes já não são mais observadas. Acontece a segunda divisão meiótica e há espermátocitos em diplóteno e zigóteno.

Estádio 5: Espermátides em V no topo do epitélio e abaixo espermátides fruto da segunda divisão da meiose com núcleos esféricos.

Estádios 6 e 7: Desenvolvimento da vesícula acrossômica. A extremidade da vesícula em contato com o núcleo forma uma depressão convexa no núcleo. Nota-se o crescimento dessa vesícula até seu desaparecimento ao fim do estágio 7. As espermátides em V dirigem-se ao topo do epitélio. Presença de espermatogônias do tipo B.

Estádio 8: Observa-se espermatozoides livres no lume do túbulo seminífero e corpos residuais. Os núcleos das espermátides voltam a morfologia alongada semelhante à do estágio I. Presença de espermátocitos em paquíteno.

A frequência dos estádios está apresentada na figura 2. A fase pré-meiotica corresponde a 48% da frequência dos estádios observados, a meiose condiz a 3%, e a fase pós-meiotica a 49% dos estádios.

#### 3.4. Reserva espermática e células de Sertoli

Os índices de células de Sertoli e a reserva espermática testicular estão na Tabela 3. O número de células de Sertoli por grama de testículo em *M. americana* é de  $42,7 \times 10^5$  células. O índice de células de Sertoli é de 3,92 espermátides e cada célula de Sertoli pode suportar 6,42 células (capacidade de suporte de células de Sertoli), enquanto a reserva espermática por grama de testículo foi  $1,66 \times 10^9$ .

#### 3.5. Morfometria intertubular

Os dados morfométricos e estereológicos referentes ao compartimento intertubular de *M. americana* podem ser encontrados na Tabela 4. As células de Leydig são responsáveis por 13,13% do compartimento intertubular. O tecido conjuntivo foi o segundo elemento mais abundante (1,66%), seguido pelos vasos sanguíneos e espaço linfático e macrófagos, que juntos são responsáveis por 2,05% do compartimento intertubular nos testículos. O índice intertubulossomático (IIS) de *M. americana* é de 0,072%.

A morfometria da célula Leydig de *M. americana* é mostrada na Tabela 5. Estas células apresentam volume médio  $1003,11 \mu\text{m}^3$ , sendo o seu número por grama de testículo de  $137,77 \times 10^6$  células. O índice Leydigossomático (ILS), que representa a porcentagem do peso corporal alocado para as células Leydig, é de 0,061%.

#### 4 Discussão

Este estudo apresenta informações sobre a biologia reprodutiva do marsupial *Monodelphis americana* com ênfase na morfometria e estereologia da espermatogênese, visando contribuir para melhor compreensão das estratégias reprodutivas da espécie e fornecer dados mais específicos para atividades de conservação e manejo da espécie.

O peso testicular de *M. americana* (0,16g) foi menor do que o de *Didelphis albiventris* (0,88g) e *Phinlander frenatus* (0,4g), o que reflete no maior valor do IGS em *M. americana* (0,47%) do que em *D. albiventris* (0,06%) e *P. frenatus* (0,3%), pois dentre essas espécies *M. americana* possui menor peso corporal. (FERREIRA et al., 2020; FIGUEIREDO et al., 2017; QUEIROZ; NOGUEIRA, 1992).

A proporção volumétrica de túbulos seminíferos de *M. americana* (83,16%) está de acordo com o descrito para mamíferos (60-90%) sendo maior do que em *D. albiventris* (72% - DT  $284 \mu\text{m}$ ), *Macrotis lagotis* (52,6% - DT  $372,3 \mu\text{m}$ ) e *P. frenatus* (64,95% - DT  $279,79 \mu\text{m}$ ). Porém, entre essas espécies *M. americana* foi a que apresentou menor diâmetro tubular

(216 $\mu\text{m}$ ). Esses parâmetros inversamente proporcionais para as três espécies sugere que há manutenção/compensação da função espermatogênica, pois onde a proporção de túbulo é maior o diâmetro tubular é menor (COSTA et al., 2010; JOHNSTON et al., 2010; QUEIROZ; NOGUEIRA, 1992).

O componente testicular responsável pela espermatogênese é o epitélio seminífero composto pelas células da linhagem gamética e as células de Sertoli. Em *M. americana* a proporção desse componente foi 63,48%, enquanto em *P. frenatus* a proporção foi 45,19%, seguindo o padrão da proporção de túbulos seminíferos das duas espécies. O ITS e o IES de *M. americana* foram de 0,36% e 0,27%, respectivamente, e em *P. frenatus* foram 0,10% e 0,07%, respectivamente. As proporções menores em *P. frenatus* do que em *M. americana* refletem a maior proporção desses componentes testiculares e menor peso corporal (FERREIRA et al., 2020).

O comprimento dos túbulos seminíferos de *M. americana* foi 3,43m, menor que em *D. albiventris* (7,5m) e *P. frenatus* (6,82m) (FERREIRA et al., 2020; QUEIROZ; NOGUEIRA, 1992). Analisando os dados de comprimento tubular e os demais parâmetros de proporção dos túbulos seminíferos podemos inferir até aqui que há compensação entre os componentes do compartimento tubular das espécies de marsupiais. O *M. americana* que apresentou menor comprimento de túbulos seminíferos e diâmetro tubular mas entres as espécies comparadas foi a que teve maior proporção de túbulo seminífero e epitélio seminífero.

Os parâmetros sobre as áreas dos componentes tubulares também permitem analisar a atividade espermatogênica das espécies. *M. americana* possui área de túbulo seminífero, de epitélio seminífero e luminal inferior a *P. frenatus* (61,63  $\mu\text{m}^2$ , 48,16  $\mu\text{m}^2$  e 13,47  $\mu\text{m}^2$  respectivamente), refletindo o menor comprimento tubular de *M. americana* (FERREIRA et al., 2020).

A eficiência da espermatogênese pode ser avaliada pela razão entre os tipos celulares presentes do epitélio seminífero (FRANÇA; AVELAR; ALMEIDA, 2005). O índice mitótico é a razão entre os espermátócitos primários em preleptóteno/leptóteno e as espermatogônias. Em *M. americana* esse índice foi de 1,87, um pouco maior que o descrito para *D. albiventris* (1,57) e *P. frenatus* (1,26). O índice meiótico permite mensurar quantas espermátides arredondadas foram produzidas a partir da população de espermátócitos primários. Em *M. americana* o índice meiótico foi 2,64, inferior ao encontrado em *D. albiventris* (4,01) e em (*P. frenatus*) 3.88 (FERREIRA et al., 2020; QUEIROZ; NOGUEIRA, 1992).

Outro dado que reforça a ideia de manutenção da atividade espermatogênica entre as espécies de marsupiais é o rendimento da espermatogênese. Em *M. americana* o rendimento foi 12,68 espermátides arredondadas para cada espermatogônia, valor semelhante ao descrito para *P. frenatus* de 10,3 espermátides arredondadas para cada espermatogônia. Além disso, a reserva espermática por testículo em *M. americana* foi  $2,72 \times 10^{10}$  muito maior que a encontrada em *P. frenatus* com  $7,14 \times 10^6$  (FERREIRA et al., 2020). O reflexo da reserva espermática de *M. americana* ser muito superior ao de *P. frenatus* se deve ao melhor aproveitamento da espermatogênese em *M. americana* onde mais espermátides arredondas foram produzidas durante a espermatogênese, mesmo tendo comprimento tubular menor do que *P. frenatus*.

Parâmetros que avaliam as células de Sertoli são valiosos para a descrição da espermatogênese das espécies pois ela é a responsável pela sustentação desse processo (FRANÇA et al., 2016). Cada célula de Sertoli do *M. americana* é capaz de suportar 6,42 células germinativas, valor semelhante ao encontrado em *D. albiventris* (5,99 células) e ao de *P. frenatus* (5,79). O índice de Sertoli de *M. americana* foi 3,92, em *D. albiventris* 3,51 e em *P. frenatus* 3,91, observando-se a semelhança dos valores dos parâmetros de células de Sertoli entre os marsupiais (FERREIRA et al., 2020; QUEIROZ; NOGUEIRA, 1992).

Os estádios I a III representam a fase pré-meiótica na qual apenas uma geração de espermatídes está presente, sendo o estágio III o mais frequente dentre todos eles, notando-se grande mudança na morfologia das espermatídes. O estágio IV representa a meiose, sendo o menos frequente, enquanto os estádios de V a VIII são os pós-meióticos, com a presença de duas gerações de espermatídes, sendo o estágio V o mais frequente dessa fase. Vários autores sugerem que espécies filogeneticamente próximas têm frequências de estádios semelhantes e, conseqüentemente, a duração das fases pré e pós-meióticas (FIGUEIREDO et al., 2017; FRANÇA; AVELAR; ALMEIDA, 2005). Em *M. lagotis* o estágio com maior frequência também foi o III (JOHNSTON et al., 2010).

No compartimento intertubular estão as células de Leydig, responsáveis pela função endócrina do testículo. Estas células produzem e secretam a testosterona estimuladas pelo hormônio luteinizante (LH). O intertúbulo também apresenta espaço linfático, vasos sanguíneos e células do tecido conjuntivo (GE; CHEN; HARDY, 2008). O compartimento intertubular de *M. americana* ocupa 16,84% do parênquima testicular, valor semelhante ao de *D. albiventris* (15,5%) e inferior ao de *M. lagotis* (37,5%) e *P. frenatus* (35,05%). O componente mais abundante desse compartimento são as células de Leydig que, em *M. americana* ocupam 13,13% do parênquima testicular, em *D. albiventris* 12,5%, em *M. lagotis* 28,9%, e em *P. frenatus* 24,40%, seguindo a tendência da proporção de intertúbulo em cada espécie (FERREIRA et al., 2020; JOHNSTON et al., 2010; QUEIROZ; NOGUEIRA, 1992).

O segundo componente mais abundante em *M. americana* foi o tecido conjuntivo seguido pelos vasos sanguíneos, sendo o mesmo padrão de composição encontrado em *M. lagotis*. Segundo FAWCETT (1973), *M. americana* segue o padrão de organização três, no qual o intertúbulo é composto majoritariamente por células de Leydig.

A avaliação quantitativa das células de Leydig permite o entendimento da dinâmica reprodutiva e da libido das espécies visto que a testosterona produzida por elas é um regulador

do comportamento reprodutivo dos animais (KENAGY; TROMBULAK, 1986). A célula de Leydig de *M. americana* tem  $1003,11 \mu\text{m}^3$  de volume divididos em  $748,45 \mu\text{m}^3$  de citoplasma e  $254,66 \mu\text{m}^3$  de volume nuclear, valores estes muito inferiores aos encontrados para a célula de Leydig em *P. frenatus* com  $2.627 \mu\text{m}^3$  de volume total sendo  $2.308,9 \mu\text{m}^3$  de citoplasma e  $318,22 \mu\text{m}^3$  de volume nuclear. O número de células de Leydig por testículo em *M. americana* ( $22,75 \times 10^6$ ) também foi inferior em relação a *P. frenatus* ( $91,28 \times 10^6$ ). Comparando essas duas espécies de marsupiais pressupõem que a produção de testosterona em *P. frenatus* seja maior do que em *M. americana* (FERREIRA et al., 2020). *P. frenatus* foi descrita como uma espécie poligínica com hábito territorialista devido ao grande investimento no compartimento intertubular em detrimento do processo espermatogênico em si, o contrário do que foi observado em *M. americana*.

## 5 Conclusões

*Monodelphis americana* possui maior engajamento no compartimento tubular e no processo espermatogênico em relação ao compartimento intertubular e as células de Leydig. Essas características estão relacionadas ao tipo de comportamento reprodutivo promíscuo, pois nessas espécies é importante para o macho garantir maior produção de gametas a fim de garantir o repasse dos genes.

## Referências bibliográficas

- AMANN, R. P. Reproductive Capacity of Dairy Bulls. Spermatogenesis and testicular germ cell degeneration. **American Journal of Anatomy**, v. 101, p. 69–78, 1961.
- ANDRADE, A.; PINTO, S.; OLIVEIRA, R. Marsupiais didelfídeos: gambás e cuícas. In: **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Editora Fiocruz, 2002. V. 22p. 167–173.
- BERNDTSON, W. E. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. **Journal of Animal Science**, v. 44, n. 5, p. 818–833, 1977.
- BRITO, D.; OLIVEIRA, L. C.; OPREA, M.; MELLO, M. A. R. An overview of Brazilian mammalogy: trends, biases and future directions. **Zoologia**, v. 26, n. 1, p. 67–73, 2009.
- CÁCERES, N. **Os Marsupiais do Brasil**. Editora UFMS. 2012.

- COSTA, G. M. J.; LEAL, M. C.; FERREIRA, A. C. S.; GUIMARÃES, D. A.; FRANÇA, L. R. Duration of spermatogenesis and spermatogenic efficiency in 2 large neotropical rodent species: The agouti (*Dasyprocta leporina*) and paca (*Agouti paca*). **Journal of Andrology**, v. 31, n. 5, p. 489–499, set. 2010.
- COSTA, K.; MATTA, S. L. P.; GOMES, M. L. M.; PAULA, T. A. R.; FREITAS, K. M.; CARVALHO, F. A. R.; SILVEIRA, J. A.; DOLDER, H.; Chamindrani Mendis-Handagama, S. M. L. Histomorphometric evaluation of the neotropical brown brocket deer *Mazama gouazoubira* testis, with an emphasis on cell population indexes of spermatogenic yield. **Animal Reproduction Science**, v. 127, p. 202–212. 2011.
- DIAS, F. C. R.; MARTINS, A. L. P.; MELO, F. C. S. A.; CUPERTINO, M. C.; GOMES, M. L. M.; OLIVEIRA, J. M.; DAMASCENO, E. M.; SILVA, J.; OTONI, W. C.; MATTA, S. L. P. Hydroalcoholic extract of *Pfaffia glomerata* alters the organization of the seminiferous tubules by modulating the oxidative state and the microstructural reorganization of the mice testes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 233, p. 179–189. 2019.
- FAWCETT, D. W.; NEAVES, W. B.; FLORES, M. N. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. **Biology of Reproduction**, v. 9, p. 500–532, 1973.
- FERREIRA, V. F.; DIAS, F. C. D.; COSTA, K. L. C.; MATTA, S. L. P.; MELO, F. R.; MELO, F. C. S. A. Descriptive morphometry and stereology in accessing the testis structure and function of the marsupial *Philander frenatus* (Olfers, 1818) (Didelphimorphia: Didelphidae). **Anatomia Histologia Embryologia**, v. 50, n. 2, p. 379–386, 2020.
- FIGUEIREDO, A. F. A.; CORDEIRO, D. A.; NOGUEIRA, J. C.; TALAMONI, S. A.; FRANÇA, L. R.; COSTA, G. M. J. Spermatogenesis in a neotropical marsupial species, *Philander frenatus* (Olfers, 1818). **Animal Reproduction Science**, v. 184, p. 102–109. 2017.
- FRANÇA, L. R.; HESS, R. A.; DUFOUR, J. M.; HOFMANN, M. C.; GRISWOLD, M. D. The Sertoli cell: One hundred fifty years of beauty and plasticity. **Andrology**, v. 4, n. 2, p. 189–212. 2016.
- FRANÇA, L. R.; AVELAR, G. F.; ALMEIDA, F. F. L. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 300–318. 2005.
- GARDNER, A. L. Marsupials, Xenarthrans, Shrews and Bats. **Mammals of South America**. 2008.
- GE, R.; CHEN, G.; HARDY, M. The role of the Leydig Cell in spermatogenic function. **Molecular Mechanisms in Spermatogenesis**. P. 255–269. 2008.
- JOHNSON, L.; PETTY, C. S.; NEAVES, W. B. A new approach to quantification of spermatogenesis and its application to germinal cell attrition during human spermiogenesis. **Biology of Reproduction**, v. 25, p. 217–226, 1981.
- JOHNSTON, S.; RUMPH, C.; LUCHT, M.; STENZEL, D.; NICOLSON, V.; BLYDE, D.; KEELEY, T. Studies of male reproduction in the Greater Bilby *Macrotis lagotis*. **Australian Zoologist**, v. 35, n. 2, p. 315–330, 2010.

- KARNOVSKY, M. J. A Formaldehyde-Glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **The Journal of Cell Biology**, v. 6, p. 181, 1965.
- KENAGY, G. J.; TROMBULAK, S. C. Size and function of mammalian testes in relation to body size. **Journal of Mammalogy**, v. 67, n. 1, p. 1–22, 1986.
- LEITE, F. L. G.; PAULA, T. A. R.; MATTA, S. L. P.; FONSECA, C. C.; NEVES, M. T. D.; BARROS, J. B. G. Cycle and duration of the seminiferous epithelium in puma (*Puma concolor*). **Animal Reproduction Science**, v. 91, n. 3–4, p. 307–316, 2006.
- MORAES, D.; CÁCERES, N.; BRITO, D.; COSTA, L.P. *Monodelphis americana*. **The IUCN Red List of threatened species**, 2016.
- MORAIS, A. C. T. BALARINI, M. K.; LOPES, E. O.; QUINTELA, F. M.; MORAIS, D. B.; GOMES, M. L. M.; MATTA, S. L. P. The tubular compartment and the spermatogenic dynamics of the wild rodent *Oxymycterus nasutus* (Rodentia: Cricetidae). **Animal Reproduction Science**, v. 149, n. 3–4, p. 249–258, 2014.
- OISHI, M.; TAKAHASHI, M.; AMASAKI, H.; JANSSEN, T.; JOHNSTON S. D. The seminiferous epithelial cycle and microanatomy of the koala (*Phascolarctos cinereus*) and southern hairy-nosed wombat (*Lasiorhinus latifrons*) testis. **Journal of Anatomy**, v. 222, p. 380–389, 2013.
- QUEIROZ, G. F.; NOGUEIRA, J. C. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium and quantitative histology of the testis of the South American White-belly opossum (*Didelphis albiventris*), Marsupialia. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 4, p. 213–222, 1992.
- REIS, N. PERACCHI, A.L.; PEDRO, W.A.; LIMA, I.A. **Mamíferos do Brasil**. 2006.
- SIMAN, V. A. GODOY, R. S. M.; DIAS, F. C. R.; SILVA, F. A.; GIUDICE, G. M. L.; GOMES, M. L. M.; MATTA, S. L. P. Spermatogenic dynamics of the spiny rat *Kannabateomys amblyonyx* (Wagner, 1845) (Rodentia, Echimyidae). **Animal Reproduction Science**, v. 184, p. 36–43, 1 set. 2017.
- SMITH, K. K. Integration of craniofacial structures during development in mammals. **American Zoologist**, v. 36, p. 70–79, 1996.

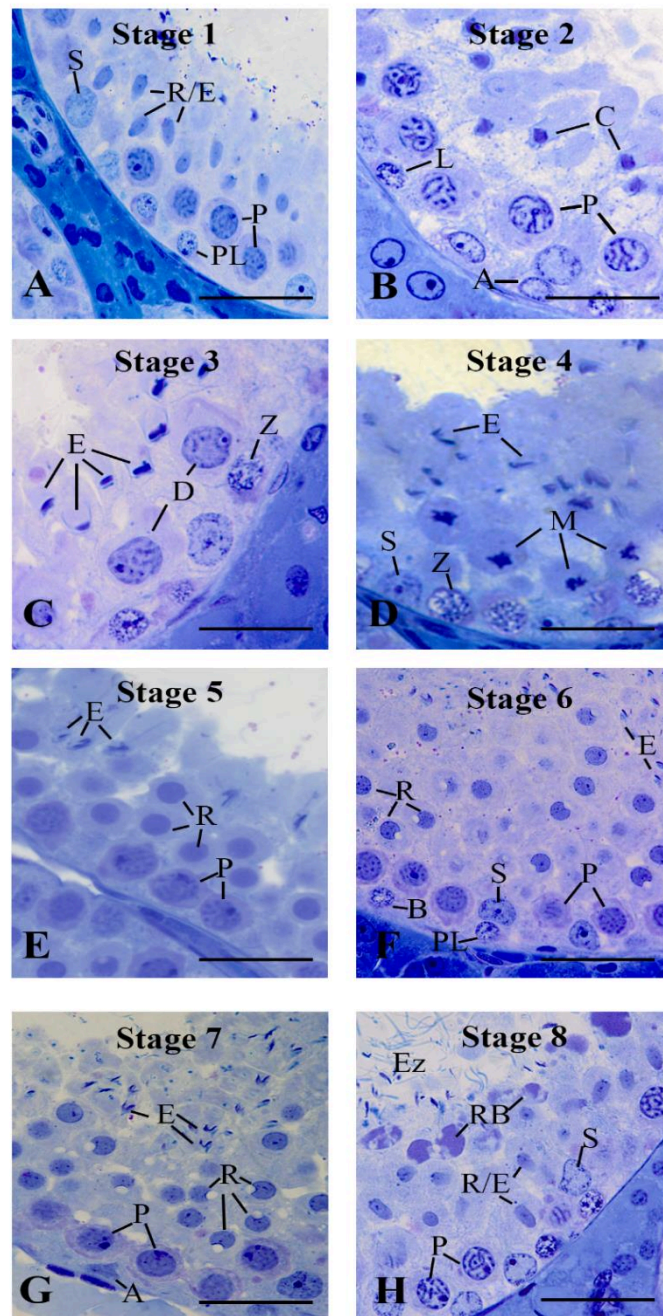


Figura 1. Estádios de *Monodelphis americana*. A: Espermatogônia A. B: Espermatogônia B. PL: Espermatócito em primário em preleptóteno. L: Espermatócito em primário em leptóteno. P: Espermatócito em primário em paquíteno. Z: Espermatócito em primário em zigóteno. D: Espermatócito em primário em diplóteno. M: Meiose. RB: Corpos residuais. R/E: Espermátide em alongamento. C: Espermátide condensada. E: Espermátide alongada. R: Espermátide arredondada. EZ: Espermatozoide. Barra: 50 $\mu$ m.

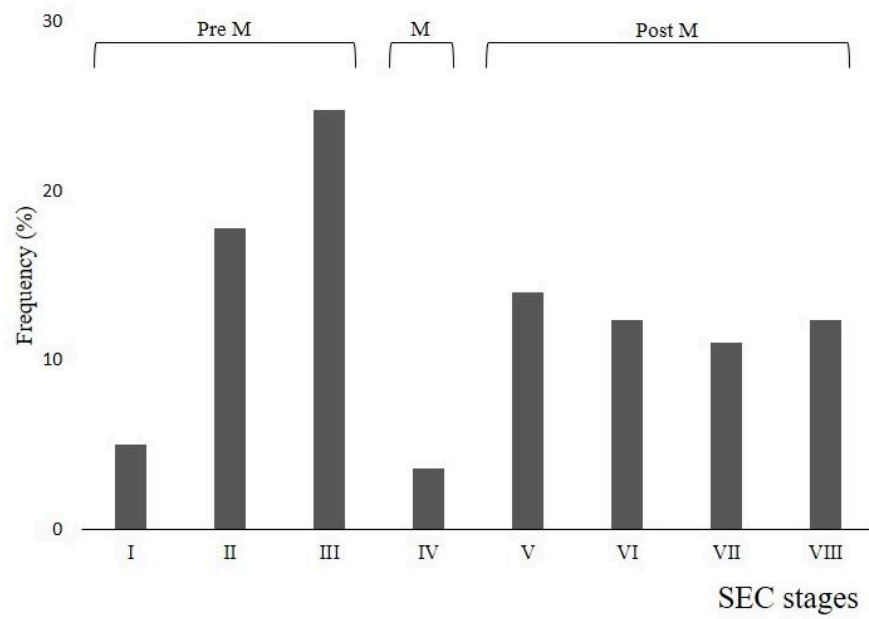


Figura 2. Frequência dos estádios de *Monodelphis americana*. Pre M: Fase pré meiótica. M: Meiose. Post M: Fase pós meiótica.

<b>Parâmetros</b>	<b>Média ± DP</b>
Peso corporal (g)	36,7 ± 9,8
Peso testicular (g)	0,16 ± 0,03
IGS (%)	0,47 ± 0,11
Túnica albugínea(g)	0,01 ± 0,003
Parênquima testicular(g)	0,15 ± 0,03
IPS (%)	0,43 ± 0,10
Túbulo seminífero (%)	83,16 ± 3,48
Epitélio seminífero (%)	63,48 ± 3,28
Túnica própria (%)	5,01 ± 0,51
Lume (%)	14,67 ± 1,75
ITS (%)	0,36 ± 0,08
IES (%)	0,27 ± 0,06
Túbulo seminífero (ml)	0,13 ± 0,02
Epitélio seminífero (ml)	0,10 ± 0,02
Túnica própria (ml)	0,01 ± 0,002
Lume (ml)	0,02 ± 0,004
Diâmetro tubular (µm)	216,58 ± 15,05
Altura de epitélio (µm)	66,26 ± 4,67
Comprimento do túbulo seminífero (m)	3,43 ± 0,69
Comprimento do túbulo seminífero/g de testículo (m/g)	20,96 ± 2,58
Área de túbulo seminífero (µm <sup>2</sup> )	36979,60 ± 5116,06
Área de epitélio seminífero (µm <sup>2</sup> )	31350,88 ± 4126,76
Área de lume (µm <sup>2</sup> )	5628,72 ± 1426,29
Relação túbulo/epitélio	1,18 ± 0,04

Tabela 1.

Biometria, morfometria e estereologia dos componentes testiculares de *Monodelphis americana*.

IGS: Índice gonadossomático; IPS: Índice parenquimossomático; ITS: Índice tubulossomático; IES: Índice epiteliossomático.

Tabela 2.

Número corrigido das células do epitélio seminífero no estágio 1 e índices da espermatogênese de *Monodelphis americana*.

Parâmetro	Média ± DP
Tipo celular	
Espermatogônia tipo A	19,24 ± 3,44
Espermatócito em preleptóteno	35,42 ± 5,15
Espermatócito em paquíteno	98,77 ± 42,55
Espermátide arredondada	239,25 ± 23,49
Célula de Sertoli	61,29 ± 6,05
Índice mitótico	1,87 ± 0,29
Índice meiótico	2,64 ± 0,63
Rendimento da espermatogênese	12,68 ± 1,85

Tabela 3.

Índice de células de Sertoli e reserva espermática de *Monodelphis americana*.

Parâmetros	Média ± DP
Número de célula de Sertoli/testículo ( $10^5$ )	6,69 ± 1,34
Número de célula de Sertoli/ g de testículo ( $10^5$ )	42,7 ± 5,28
Índice de Sertoli	3,92 ± 0,34
Capacidade suporte de Sertoli	6,42 ± 0,91
Reserva espermática/testículo ( $10^{10}$ )	2,72 ± 0,53
Reserva espermática/g de testículo ( $10^9$ )	1,66 ± 0,19

Tabela 4.  
Biometria, morfometria e estereologia do compartimento intertubular de *Monodelphis americana*.

<b>Parâmetros</b>	<b>Média ± DP</b>
Intertúbulo (%)	16,84 ± 3,48
Célula de Leydig (%)	13,13 ± 3,34
Citoplasma da célula de Leydig (%)	9,63 ± 2,82
Núcleo da célula de Leydig (%)	3,50 ± 1,08
Espaço linfático (%)	0,60 ± 0,24
Vasos sanguíneos (%)	0,46 ± 0,19
Tecido conjuntivo (%)	1,66 ± 0,33
Macrófago (%)	0,99 ± 0,31
IIS (%)	0,072 ± 0,027
ILS (%)	0,061 ± 0,025
Intertúbulo (ml)	0,0257 ± 0,0092
Célula de Leydig (ml)	0,0217 ± 0,0081
Citoplasma da célula de Leydig (ml)	0,016 ± 0,0063
Núcleo da célula de Leydig (ml)	0,0057 ± 0,002
Espaço linfático (ml)	0,0009 ± 0,0002
Vasos sanguíneos (ml)	0,0006 ± 0,0002
Tecido conjuntivo (ml)	0,0025 ± 0,0008
Macrófago (ml)	0,001 ± 0,0007

IIS: Índice intertubulossomático; ILS: Índice Leydigossomático

Tabela 5.

Estereologia das células de Leydig de *Monodelphis americana*.

<b>Parâmetro</b>	<b>Média ± DP</b>
Diâmetro do núcleo de Leydig ( $\mu\text{m}$ )	7,84 ± 0,49
Volume da célula de Leydig ( $\mu\text{m}^3$ )	1003,11 ± 314,84
Volume do citoplasma da célula de Leydig ( $\mu\text{m}^3$ )	748,45 ± 291,43
Volume do núcleo da célula de Leydig ( $\mu\text{m}^3$ )	254,66 ± 43,89
Volume da célula de Leydig/testículo ( $\mu\text{m}^3 10^8$ )	217,71 ± 81,75
Volume da célula de Leydig/g de testículo ( $\mu\text{m}^3 10^8$ )	1296,72 ± 30,93
Número de células de Leydig/testículo ( $10^6$ )	22,75 ± 8,36
Número de células de Leydig/g de testículo ( $10^6$ )	137,77 ± 42,1

## ARTIGO 3

**Caracterização do ciclo do epitélio seminífero de *Oecomys bicolor* (Tomes, 1860) e *Monodelphis americana* (Müller, 1776) pelo método do desenvolvimento acrossômico**

## Resumo

A espermatogênese é o processo de formação dos gametas masculinos, ocorre no testículo, precisamente no epitélio seminífero. As células que dão origem aos espermatozoides têm um arranjo específico no epitélio e vão se reorganizando de acordo com a maturação das células. Cada arranjo de células no epitélio recebe o nome de estágio, os estádios do epitélio seminífero de cada espécie podem ser descritos pelo método morfológico e/ou pelo método acrossômico. *Oecomys bicolor* é um roedor da fauna do cerrado brasileiro e *Monodelphis americana* um marsupial da mata atlântica. A descrição dos estádios do ciclo seminífero é também uma ferramenta de qualificar a espermatogênese das espécies. *Oecomys bicolor* foi descrito com 12 estádios e *Monodelphis americana* com 10 estádios de acordo com o método acrossômico, ambos seguiram os padrões de estádios de espécies filogeneticamente próximas. O método acrossômico é uma ferramenta útil para comparar o ciclo do epitélio seminífero de animais próximos filogeneticamente.

Palavras chave: Espermátide, Roedor, Marsupial, Epitélio seminífero.

## 1. Introdução

A espermatogênese acontece nos testículos de machos sexualmente maduros dentro dos túbulos seminíferos, onde as células espermatogênicas seguem uma sequência bem definida de associações celulares no epitélio seminífero (França e Russell, 1998).

Essa sequência de associações celulares ocorre de modo preciso e ordenado, assim como o tempo que cada arranjo celular é observado no epitélio seminífero. Cada arranjo celular ou associação pode consistir em uma ou duas gerações de espermatogônias e espermátides além dos espermatócitos (Leblond & Clermont, 1952).

O ciclo do epitélio seminífero é dividido de acordo com as associações e desassociações das células espermatogênicas no epitélio seminífero, onde cada arranjo celular recebe o nome de estágio (Leblond & Clermont, 1952).

Existem duas metodologias para identificar os estádios do ciclo seminífero. Uma denominada Morfologia Tubular que considera principalmente a mudança na morfologia do núcleo das espermátides, assim como a distribuição do restante das células espermatogênicas no resto do epitélio. A outra, denominada Método Acrossômico que observa a formação e o desenvolvimento do acrossoma para diferenciar os estádios. O método da morfologia tubular facilita a comparação entre as espécies pois o ciclo do epitélio seminífero é dividido em oito estádios independentemente da espécie, enquanto pelo método acrossômico a comparação é mais complexa, pois a quantidade de estádios é espécie específica (Berndtson, 1997; Moraes et al., 2012).

A espécie *Monodelphis americana* é um marsupial de pequeno porte popularmente conhecida como cúca-de-três-listras. É uma espécie essencialmente terrestre e mais ativa durante o dia. São encontrados na Mata Atlântica e no Cerrado (Moraes et al., 2016). A espécie *Oecomys bicolor* é um roedor de pequeno porte. No Brasil, a espécie é encontrada nos biomas

da Amazônia e Cerrado e possui hábitos noturnos. Ambas as espécies são consideradas, no momento, como pouco preocupantes em relação ao seu nível de conservação (Bonvicino et al., 2008; Pardiñas et al., 2016).

A estratégia de dividir o ciclo do epitélio seminífero em estádios é uma importante ferramenta para avaliar parâmetros quantitativos da espermatogênese, além de também permitir a comparação entre espécies diferentes (Morais et al., 2012). Desse modo, o objetivo deste estudo foi descrever os estádios do ciclo do epitélio seminífero de *Oecomys bicolor* e *Monodelphis americana* pelo método acrossômico, buscando apontar as diferenças e semelhanças entre as duas espécies de mamíferos de pequeno porte.

## 2. Material e métodos

Os animais da espécie *Oecomys bicolor* (n=6) foram capturados em área de Cerrado no município de Jataí, Goiás (17° 52' 53" S, 51° 42' 52" W) por armadilhas do tipo Sherman, no período de maio a junho de 2012. As capturas foram autorizadas pelo IBAMA (licença n. 11621-1) e o protocolo experimental autorizado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Goiás – CEP/UFG (protocolo n. 233/10).

Os animais da espécie *Monodelphis americana* (n=10) foram capturados utilizando armadilhas do tipo Pitfall assim como Sherman e Tomahawk com iscas compostas por fubá, sardinha e banana numa reserva de Mata Atlântica no município de Viçosa, Minas Gérias. As coletas foram autorizadas pelo IBAMA (licença nº13045-1) e a eutanásia aprovada pelo CEUA da UFV (protocolo n. 552/2016). Os animais de ambas as espécies foram pesados e anestesiados utilizando-se tiopental 30mg/kg intraperitoneal.

O testículo destinado a análises morfológicas foi retirado e fixado em solução de Karnovsky (Karnovsky, 1965). Após a fixação, um fragmento foi desidratado em concentrações crescentes de etanol e incluídos em 2-hidroxietil metacrilato (Historesin®, Leica). Após

incluído, foram feitas secções de 3µm de espessura em micrótomo rotatório, os cortes obtidos foram corados com azul de toluidina borato de sódio 1% e PAS. As imagens do parênquima testicular foram obtidas no microscópio Olympus AX-70.

Os estádios do ciclo do epitélio seminífero foram caracterizados com base no desenvolvimento do acrossoma e também pela morfologia dos núcleos das espermatídes (Russell et al., 1990). A frequência relativa dos estádios foi determinada pela contagem de 200 secções transversais do túbulo seminífero por animal, num aumento de  $\times 400$  vezes como descrito por Figueiredo (2017).

### 3. Resultados

Baseado no desenvolvimento do sistema acrossômico 12 estádios foram descritos para *Oecomys bicolor* (**Figura 1**) e 10 estádios para *Monodelphis americana* (**Figura 2**). Em ambas as espécies foi encontrado apenas um estádio por secção transversal de túbulo seminífero.

#### *Oecomys bicolor*

Estádio 1: Possui duas gerações de espermatídes: as alongadas e as arredondadas. Nas espermatídes arredondadas ainda não é possível visualizar os grânulos pró-acrossômicos. Presença de espermatócitos primário em paquíteno.

Estádio 2: Nesse estádio os grânulos pró-acrossômicos já são visíveis ao lado do núcleo das espermatídes arredondadas. Presença de espermatócitos em paquíteno e de mitose de espermatogônias.

Estádio 3: A vesícula acrossômica está bem visível em torno do núcleo das espermatídes arredondadas e o ângulo varia de  $34^\circ$  a  $48^\circ$ . Presença de espermatócitos em paquíteno.

Estádio 4: Nesse estádio há o trânsito das espermatídes alongadas pelo epitélio seminífero. As vesículas acrossômicas estão maiores do que no estádio anterior o ângulo formado por elas varia de  $48^\circ$  até  $62^\circ$ . Presença de espermatogônias B.

Estádio 5: As espermatídes alongadas já retornaram ao ápice do epitélio. Nota-se o maior ângulo da vesícula acrossômica em torno do núcleo das espermatídes arredondadas, de 62° até 78°. Corpos residuais já estão presentes no epitélio. Espermatogônias B ainda são visualizadas.

Estádio 6: Ocorre a espermiação, presença de espermatozoides livres no lume do túbulo e corpos residuais. A vesícula acrossômica continua se achatando em torno do núcleo das espermatídes arredondadas, formando ângulo de 78° até 110°. Presença de espermatócitos primários em preleptóteno.

Estádio 7: Uma geração de espermatídes de núcleo arredondado dispostas em várias camadas no epitélio. Presença de preleptóteno na base do epitélio.

Estádio 8: Início do processo de alongamento do núcleo das espermatídes arredondadas. Espermatócitos em leptótenos são encontrados no epitélio.

Estádio 9: Os núcleos das espermatídes seguem se alongando. Transição dos espermatócitos em leptóteno para zigótenos na base epitélio.

Estádio 10: Alongamento e condensação do núcleo das espermatídes continuam e nota-se que essas começam a se organizar em feixes. Presença de espermatócitos em zigóteno e paquíteno.

Estádio 11: Espermatídes finalizando o alongamento do núcleo e organizadas em feixes no ápice do epitélio. Presença de zigótenos e diplótenos.

Estádio 12: As figuras da meiose são a característica principal desse estágio. No epitélio estão presentes zigótenos, diplótenos e espermatócitos secundários.

Espermatogônias do tipo A presentes em todos os estádios.

O estágio mais frequente foi o VII (20%). As frequências dos estádios pré-meiose (VII-XI), meiose (XII) e pós-meiose (I-VI) foram, respectivamente, 46%, 4% e 47% (**Figura 3**).

*Monodelphis americana*

Estádio 1: Presença de duas gerações de espermátides: alongadas e arredondadas. Nas espermátides arredondadas ainda não é possível visualizar os grânulos pró-acrossômicos. Há espermatócitos em paquíteno.

Estádio 2: Nesse estágio os grânulos pró-acrossômicos já são visíveis nas espermátides arredondadas. Presença de paquítenos.

Estádio 3: Início da formação da vesícula pré-acrossômica numa extremidade do núcleo das espermátides onde também há uma deformação no núcleo. A vesícula acrossômica nesse estágio ocupa de 40° a 61° da circunferência superficial do núcleo. Presença de espermatócitos em preleptóteno, leptóteno e em paquíteno.

Estádio 4: Estádio com a maior vesícula pré-acrossômica variando entre 95° até 115°. Nota-se que as espermátides alongadas já retornaram ao ápice do epitélio. Presença de espermatócitos primários em preleptóteno e paquíteno.

Estádio 5: As espermátides alongadas são liberadas no lume tubular, com presença de corpos residuais no ápice do epitélio. As espermátides arredondadas do estágio anterior já começam a se alongar. Presença de espermatócitos primários em preleptóteno, leptóteno e paquíteno na base do epitélio.

Estádio 6: Única geração de espermátides com o núcleo alongado, o acrossoma apresenta se voltado para a base do epitélio. Espermatócitos em preleptóteno e leptóteno.

Estádio 7: Espermátides com o núcleo completamente condensado, notando-se a formação das manchetes ao lado do núcleo. Espermatócitos em paquíteno com o núcleo grande.

Estádio 8: O núcleo das espermátides condensado de achata e fica paralelo a lâmina basal, organizados em uma camada, disposto somente em uma camada. Ainda é possível visualizar as manchetes. Presença de espermatócitos em zigóteno e diplóteno.

Estádio 9: Espermátides adquirem morfologia em V, onde a aresta menor é o acrossoma e a maior é o núcleo da espermátide. Presença de espermatócitos em diplóteno e zigóteno.

Estádio 10: Característica marcante do estágio são as figuras da meiose além da presença de espermatócitos secundários.

Presença de espermatogônias A em todos os estádios.

O estágio mais frequente foi o VII (16%). As frequências dos estádios pré-meiose (VI-IX), meiose (X) e pós-meiose (I-V) foram respectivamente 46%, 5% e 51% (**Figura 4**).

#### 4. Discussão

Este é o primeiro estudo que procurou descrever os estádios do ciclo seminífero de *Oecomys bicolor* e *Monodelphis americana* pelo desenvolvimento do sistema acrossômico. Este tipo de informação se faz necessário principalmente porque apenas cerca de 2% das espécies de mamíferos viventes tiveram sua estrutura e função testicular estudadas e descritas (Lara et al., 2016).

*Oecomys bicolor* possui a distribuição do ciclo seminífero com 12 estádios caracterizados iguais aos de outras espécies de roedores como *Trinomys moojeni* e *Proechimys guyannensis* (Lara et al, 2016; Cordeiro Jr et al., 2010). A espécie *Monodelphis americana* apresentou 10 estádios caracterizados pelo desenvolvimento do acrossoma assim como outras espécies de marsupiais como *Phinlander frenatus* e *Didelphis albiventris* (Figueiredo et al., 2017; Queiroz e Nogueira, 1992). O fato de espécies filogeneticamente próximas terem a mesma quantidade de estádios descritos nos permite inferir que as características espermatogênicas dessas espécies sejam conservadas entre si.

A literatura descreve três tipos de distribuição de frequência pré-meiótica e pós-meiótica da espermatogênese para as espécies: (1) espécies em que a fase pré-meiótica corresponde a um quarto do ciclo do epitélio seminífero assim como o rato e camundongo; (2) espécies em que a fase pré-meiótica ocupa dois terços do ciclo espermatogênico como espécies da subordem Ruminantia; (3) e espécies que a fase pré-meiótica e pós-meiótica têm frequências equilibradas

(Figueiredo et al., 2017). *O. bicolor* e *M. americana* se enquadram no terceiro tipo, pois têm suas frequências pré-meiótica e pós-meiótica equivalentes dentro do ciclo espermatogênico das espécies, assim como *P. frenatus* e *P. guyannensis* (Figueiredo et al., 2017; Cordeiro Jr et al., 2010).

Observando o desenvolvimento do acrossoma e o ângulo formado pelo seu crescimento em torno do núcleo das espermatídes observa-se que são semelhantes entre as duas espécies, começando em torno de 40° indo até 115°. Essa descrição é semelhante também ao descrito para rato e camundongo cujo menor ângulo foi 40° e o maior 120° (Russell et al., 1990).

## 5. Conclusões

Este trabalho apresenta características do ciclo do epitélio seminífero do roedor *Oecomys bicolor* e o marsupial *Monodelphis americana*, mostrando nitidamente que essas características são conservadas entre das espécies filogeneticamente próximas, sendo o método acrossômico pouco apropriado para comparações interespecíficas, apesar de oferecer mais detalhes sobre a formação dos gametas.

## Referências bibliográficas

- Berndtson, W. E. (1977). Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *Journal of Animal Science*, 44(5), 818–833. <https://academic.oup.com/jas/article-abstract/44/5/818/4697501>
- Bonvicino, C. R., Oliveira, J. A., D’Andrea, P. S. D. (2008). Guia dos Roedores do Brasil.
- Cordeiro-Júnior, D. A., Costa, G. M. J., Talamoni, S. A., & França, L. R. (2010). Spermatogenic efficiency in the spiny rat, *Trinomys moojeni* (Rodentia: Echimyidae). *Animal Reproduction Science*, 119(1–2), 97–105. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.11.006>
- Figueiredo, A. F. A., Cordeiro, D. A., Nogueira, J. C., Talamoni, S. A., França, L. R., & Costa, G. M. J. (2017). Spermatogenesis in a neotropical marsupial species, *Philander frenatus*

- (Olfers, 1818). *Animal Reproduction Science*, 184, 102–109.  
<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.07.004>
- França, L. R. & Russell, L. D. (1998). Male reproduction: A multidisciplinary overview. Churchill Communications.
- Karnovsky, M. J. (1965) A Formaldehyde-Glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, v. 6, p. 181.
- Lara, N. L. M., Santos, I. C., Costa, G. M. J., Cordeiro-Junior, D. A., Almeida, A. C. G., Madureira, A. P., Zanini, M. S., & França, L. R. (2016). Duration of spermatogenesis and daily sperm production in the rodent *Proechimys guyannensis*. *Zygote*, 24(5), 783–793.  
<https://doi.org/10.1017/S0967199416000137>
- Leblond, C. P., & Clermont, Y. (1952). Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Annals New York Academy of Sciences*, 54(4), 548–573.
- Moraes, D., Cáceres, N., Brito, D., & Costa, L. (2016). *Monodelphis americana*. *The IUCN Red List of Threatened Species*. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-2.RLTS.T96866849A97249006.en>
- Morais, D. B., de Paula, T. A. R., de Freitas, K. M., & da Matta, S. L. P. (2012). Cycle of the seminiferous epithelium of the bat *Molossus molossus*, characterized by tubular morphology and acrosomal development. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 1(4), 303–307.  
[https://doi.org/10.1016/S2305-0500\(13\)60097-4](https://doi.org/10.1016/S2305-0500(13)60097-4)
- Pardiñas, U. F. J., Teta, P., Salazar-Bravo, J., Myers, P., Galliari, C. A. (2016). A new species of arboreal rat, genus *Oecomys* (Rodentia, Cricetidae) from Chaco. *Journal of Mammalogy*, 97, 1177–1196. <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyw070>
- Queiroz, G. F., & Nogueira, J. C. (1992). Duration of the Cycle of the Seminiferous Epithelium and Quantitative Histology of the Testis of the South American White-belly Opossum

(*Didelphis albiventris*), Marsupialia. *Reproduction, Fertility and Development*, 4, 213–235.

<https://doi.org/10.1071/rd9920213>

Russell LD, Ettlín RA, Sinha-Hikim AP, Clegg ED. Mammalian spermatogenesis. *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Clearwater: Cache River Press; 1990, p. 121-159.

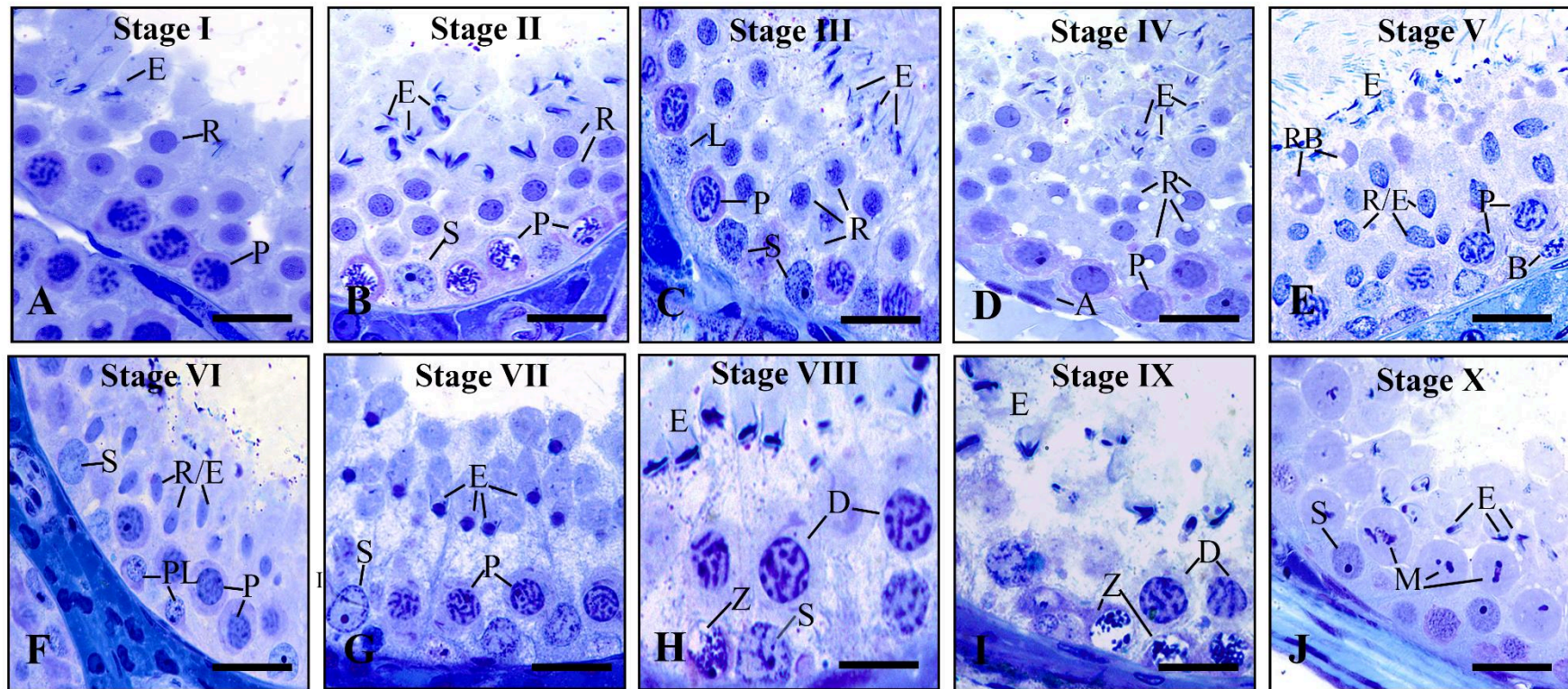


Figura 1. Estádios de *Monodelphis americana*. A: Espermatogônia A. B: Espermatogônias B. PL: Preleptóteno. L: Leptóteno. P: Paquíteno. Z: Zigóteno. D: Diplóteno. R: Espermatíde arredondada. E: Espermatíde alongada. R/E: Espermatíde em alongamento. C: Espermatíde condensada. RB: Corpo residual. M: Meiose. Barra: 10μm.

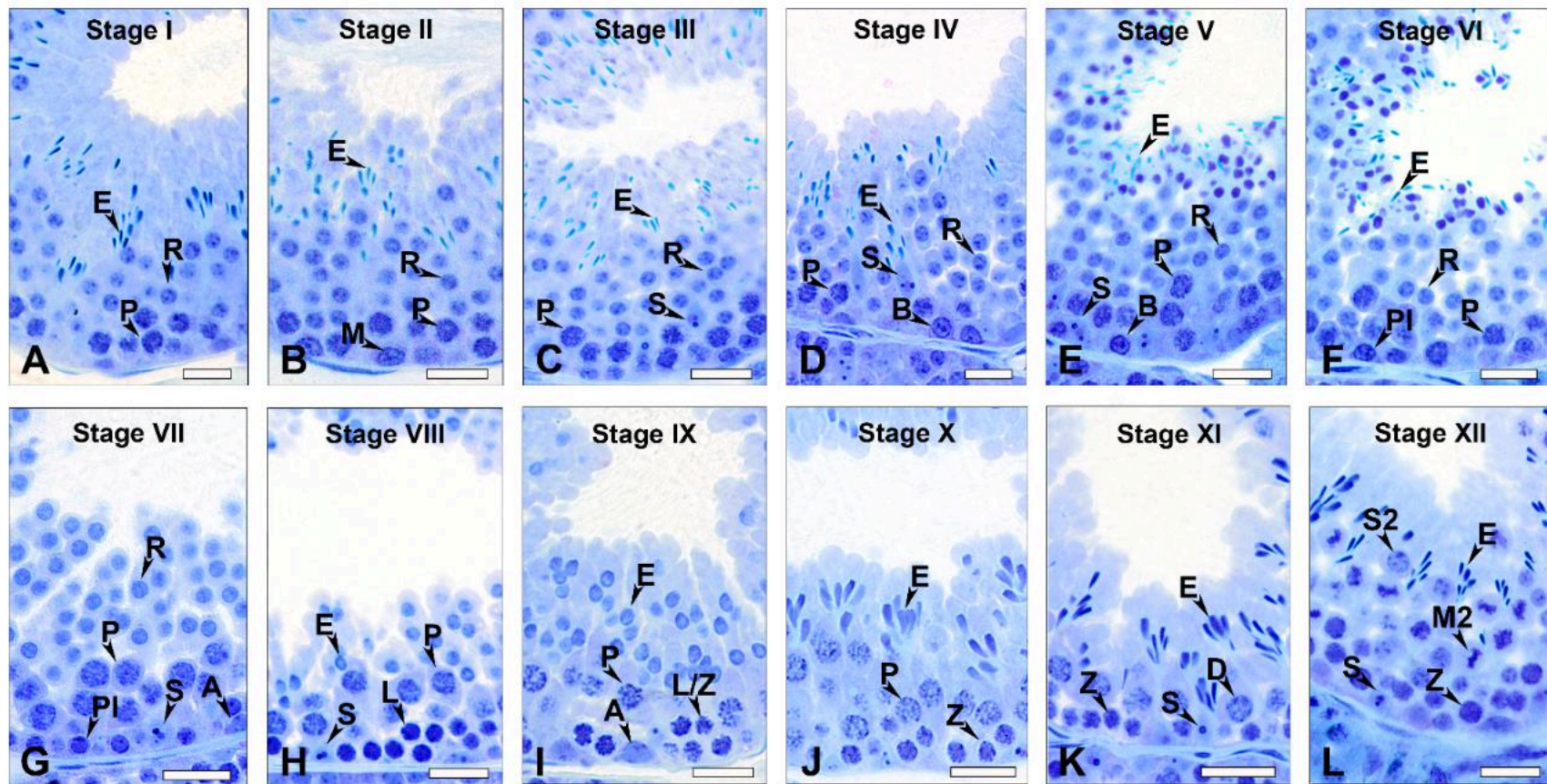


Figura 2. Estádios de *Oecomys bicolor*. A: Espermatogônia A. B: Espermatogônia B. Pl: Preleptóteno. L: Leptóteno P: Paquíteno. Z: Zigóteno. D: Diplóteno. R: Espermátide arredonda. E: Espermátide alongada. M: Mitose. M2: Meiose. S2: Espermátócito secundário. Barra: 10µm.

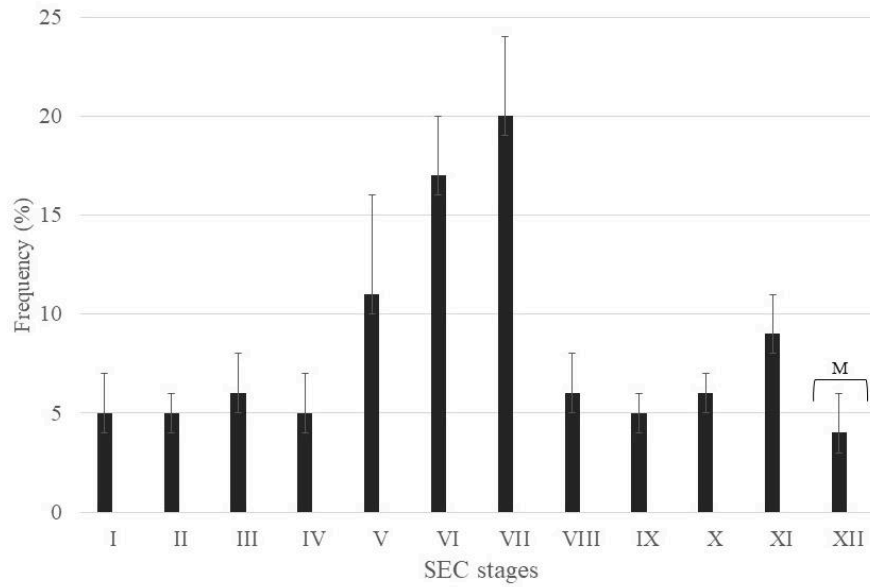


Figura 3. Frequência dos estádios de *Oecomys bicolor*. M: Meiose.

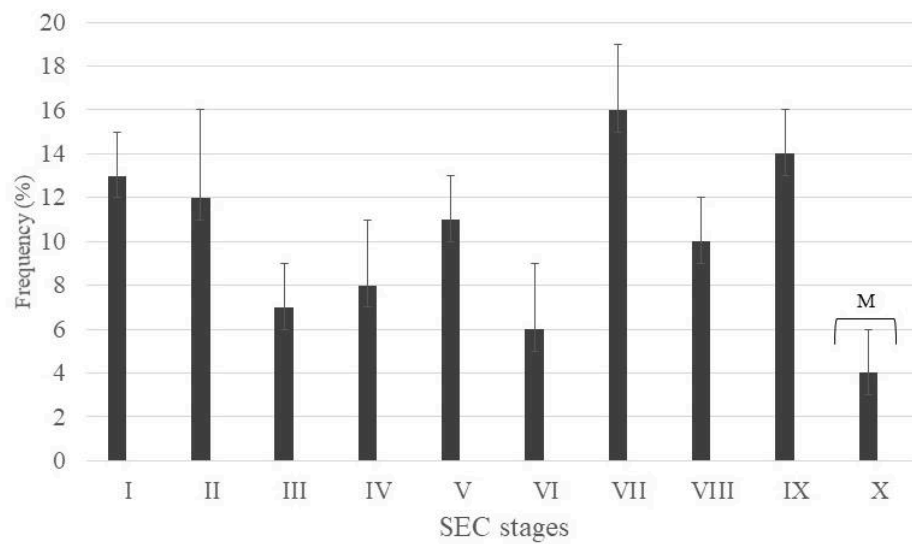


Figura 4. Frequência dos estádios de *Monodelphis americana*. M: Meiose.