

MARIANA MORAES DE CASTRO

**DURAÇÃO DO CICLO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO E PRODUÇÃO
ESPERMÁTICA DE *Leopardus pardalis* (Linnaeus, 1758)**

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

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2012**

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

T

C355d
2012

Castro, Mariana Moraes de, 1988-

Duração do ciclo do epitélio seminífero e produção
espermática de *Leopardus pardalis* (Linnaeus, 1758) /

Mariana Moraes de Castro. – Viçosa, MG, 2012.

xi, 51 f. : il. ; 29cm.

Orientador: Tarcízio Antônio Rego de Paula.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Jaguatirica - Testículos - Morfologia.
 2. Espermatogênese em animais. 3. *Leopardus pardalis*.
 4. Imunohistoquímica. I. Universidade Federal de Viçosa.
- II. Título.

CDD 22. ed. 636.89

MARIANA MORAES DE CASTRO

**DURAÇÃO DO CICLO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO E PRODUÇÃO
ESPERMÁTICA DE *Leopardus pardalis* (Linnaeus, 1758)**

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

APROVADA: 09 de fevereiro de 2012.



Sérgio Luis Pinto da Matta
(Coorientador)



Juliano Vogas Peixoto



Cláudio César Fonseca



Tarcízio Antônio Rego de Paula
(Orientador)

À minha mãe, pelo amor, suporte,
confiança e presença.

Ao meu pai, por sonhar e me fazer acreditar
que é possível.

Ao André, por entender e participar.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, pela oportunidade.

Aos Projetos Suçuarana e Predadores de Cadeia, pela concessão da bolsa da Capes.

Ao professor Tarcízio, pelo exemplo, por ter me acolhido e proporcionado um ambiente de descobertas e amadurecimento intelectual e pessoal.

Aos professores Sérgio da Matta, Mariana Machado, Juliano Vogas, Cláudio Fonseca pela constante disponibilidade, conselhos, críticas e sugestões.

Às pessoas do Laboratório de Biologia Estrutural, em especial a minha querida amiga Marli Cupertino pelos ótimos momentos, ajuda e conselhos.

À professora Andréia Pacheco, por autorizar o uso do fotomicroscópio que pertence ao Hospital Veterinário.

À Rosi, Beth e Carmem, funcionárias do Departamento, por serem tão solícitas e competentes.

À equipe de profissionais com quem trabalhei no Cetas durante esses dois anos. Carlão, Thyara, Gê, Tavela, Letícia, Leanes, Rafael, Ayisa, Vinícius, Baiano, Carol Ortegá, Hazel, Fernandinha, Zé Antônio, Sr. Romão, entre tantos, pelos momentos de aprendizado, ajuda e por me fazerem lembrar todos os dias como aquilo que buscamos para os animais é belo e necessário. Em especial, ao Marcos Rodrigues, por me encorajar. Graziella Vasconcelos e Natasha Maia, pelas risadas compartilhadas. Ao Moacir Carretta Jr, por estar sempre me dando força.

Aos animais que passaram e ainda estão no Cetas. Principalmente Diego, Mandíbula e Tripé.

Aos amigos de Viçosa que se somaram com os de antes para alegrarem a minha vida. Madu, Elba, Aline Direito, Aline Bio, Angélica, D. Luíza, pela ótima convivência, apoio e por fazerem meus dias mais felizes.

Aos professores que foram exemplo ao longo da jornada estudantil: Tia Nilce, Cidinha, Anna Regina, Bianca, Anderson Latini, Clayton Perônico, Alan Loures, Ita e Vanner entre tantos outros.

Aos meus pais, por todas as oportunidades oferecidas, pelo exemplo, esforço, carinho, companheirismo e amor. Por não desistirem em nenhum momento dos “nossos sonhos”.

André, meu querido irmão, por entender a minha ausência durante seu crescimento.

Meus tios, tias, primos, primas por estarem sempre presente em nossas vidas.

À Deus, pelos dias de estudo e pelas noites de descanso. Por estar ao meu lado,
iluminando meu caminho.

BIOGRAFIA

Mariana Moraes de Castro, filha de José Ronaldo de Castro e Teresina Crispim Simões Moraes de Castro nasceu em São Domingos do Prata, Minas Gerais, em 07 de maio de 1988.

Concluiu o ensino médio no “Centro Tecnológico Dr. Joseph Hein”, na cidade de João Monlevade (MG). Em fevereiro de 2006 ingressou no curso de Ciências Biológicas no Centro Universitário do Leste de Minas Gerais na cidade de Ipatinga e graduou-se em julho do ano de 2009 em Licenciatura e Bacharelado.

Em março de 2010 iniciou o curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, na área de concentração em Morfofisiologia de Animais Domésticos e Silvestres pela Universidade Federal de Viçosa.

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. Introdução Geral.....	1
2. Revisão de Literatura	2
2.1- Jaguatirica - <i>Leopardus pardalis</i> , Linnaeus, 1758.....	2
2.2- Testículos	4
2.2.1- Espermatogênese	6
2.2.2 - Ciclo do epitélio seminífero	7
2.2.3 - Estádios do ciclo do epitélio seminífero.....	7
2.3- Imunohistoquímica.....	8
3. Objetivos	9
Referências bibliográficas.....	10
Artigo 01 – Descrição e duração do ciclo do epitélio seminífero de <i>Leopardus pardalis</i> , Linnaeus, 1758	15
Resumo.....	15
Abstract	16
1. Introdução	17
2. Material e Métodos	18
2.1- Animais	18
2.2- Injeção do BrdU, histologia e duração do ciclo do epitélio seminífero	19
2.3- Estádios do ciclo do epitélio seminífero e suas frequências	20
3. Resultados e Discussão	20
3.1- Estádios do ciclo do epitélio seminífero e frequência relativa dos estádios	20
3.2- Duração do ciclo do epitélio seminífero	27
Referências Bibliográficas	30
Artigo 02 – Rendimento intrínseco do processo espermatogênico e a produção espermática diária de <i>Leopardus pardalis</i> , Linnaeus, 1758.....	32

Resumo.....	32
Abstract	33
1. Introdução	34
2. Material e Métodos	35
2.1- Animais	35
2.2- Estádios do ciclo do epitélio seminífero e Imunohistoquímica	36
2.3- Análise histométrica dos testículos	37
2.4- Contagem celular e Rendimentos intrínsecos do processo espermatogênico	37
2.5- Estatística	38
3. Resultados e Discussão	39
3.1- Análise histométrica dos testículos	39
3.2- Estádios do ciclo do epitélio seminífero e Imunohistoquímica	40
3.3- Contagem celular e Rendimentos intrínsecos do processo espermatogênico	42
Referências bibliográficas.....	47
Conclusões gerais.....	51

RESUMO

CASTRO, Mariana Moraes de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2012. **Duração do ciclo do epitélio seminífero e produção espermática de *Leopardus pardalis*, Linnaeus, 1758.** Orientador: Tarcízio Antônio Rego de Paula. Coorientadores: Sérgio Luís Pinto da Matta e Mariana Machado Neves.

O estudo da morfologia testicular e do processo espermatogênico em animais silvestres são fundamentais para o conhecimento dos padrões fisiológicos, auxiliando assim no estabelecimento de protocolos em reprodução assistida. Os objetivos deste estudo foram descrever a duração do ciclo do epitélio seminífero pela identificação das células germinativas mais avançadas marcadas pela 5-bromodeoxiuridina (BrdU); caracterizar os diversos estádios que constituem o ciclo do epitélio seminífero com base na associação das técnicas de morfologia tubular e desenvolvimento do sistema acrossômico; calcular a produção espermática diária por grama de testículo de jaguatirica (*Leopardus pardalis*). Para isso, foram utilizados cinco animais machos adultos provenientes do Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Viçosa e da Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte, ambas em Minas Gerais, Brasil. Os animais foram submetidos a biópsias testiculares a fim de se obter material biológico para avaliação histológica e imunohistoquímica. Foram descritos e determinada a frequência relativa de oito estádios do ciclo do epitélio seminífero em jaguatirica com base no método da morfologia tubular associado ao método do sistema acrossômico. Foi observado um estádio do ciclo por secção transversal de túbulo sendo a fase pré meiótica do processo espermatogênico maior que as outras (56,5%). Através do uso de um marcador de proliferação celular injetado intratesticularmente (BrdU) foi observado após 16 dias de aplicação, células marcadas em transição de paquíteno para diplóteno no início do estádio III. A partir daí, pode-se concluir que um ciclo do epitélio seminífero de jaguatirica dura 11,30 dias, assim o processo espermatogênico da jaguatirica dura no total 50,85 dias. A jaguatirica apresentou diâmetro médio de túbulos seminíferos de 211,37µm e 17,81 metros por grama de testículo em média. No epitélio seminífero, em cada secção transversal do túbulo seminífero no estádio I do ciclo, foi observado em média 1,06 espermatogônias do tipo A; 17,78 espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno; 19,22 espermatócitos primários em paquíteno; 59,5 espermátides arredondadas e 6,86 células de Sertoli. O rendimento geral da espermatogênese nesta espécie foi de aproximadamente 57 células, e cada célula de

Sertoli foi capaz de sustentar e manter 14,38 células da linhagem germinativa das quais, 8,76 espermatídes arredondadas. A produção espermática diária encontrada demonstra que a jaguatirica é um animal com alto nível de produção, uma vez que sua produção é cerca de 32 milhões de espermatozóides por grama de testículo.

ABSTRACT

CASTRO, Mariana Moraes de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2012. **Duration of the seminiferous epithelium cycle and sperm production of *Leopardus pardalis*, Linnaeus, 1758.** Adviser: Tarcízio Antônio Rego de Paula. Co-advisers: Sérgio Luís Pinto da Matta and Mariana Machado Neves.

The study of testicular morphology and spermatogenic process in wild animals are fundamental to the knowledge of physiological patterns, thus assisting in establishing protocols for assisted reproduction. The objectives of this paper were to describe the cycle of the seminiferous epithelium by identifying the most advanced germ cells marked by 5-bromodeoxyuridine (BrdU); to characterize the various stages that constitute the cycle of the seminiferous epithelium based on the combination of the techniques of tubular morphology and development of the acrosomal system, calculate the daily sperm production per gram of testis of ocelot (*Leopardus pardalis*). For this, we used five adult males from Centro de Triagem de Animais Silvestres at Universidade Federal de Viçosa and from Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte, both in Minas Gerais, Brazil. The animals underwent testicular biopsies in order to obtain biological material for histology and immunohistochemistry. We described and determined the relative frequency of eight stages of the seminiferous epithelium cycle on the ocelot based in the tubular morphology method associated with the acrosomal system method. We observed one stage of the cycle by tubule cross-section, being that the pre-meiotic spermatogenic process is longer than the others (56.5%). Through the use of a cell proliferation marker intratesticularly injected (BrdU) we observed after 16 days of application, labeled cells in transition from pachytene to diplotene at the beginning of stage III. From there, we can conclude that a cycle of the seminiferous epithelium of ocelot takes 11.30 days, so the ocelot spermatogenesis process lasts 50.85 days. The ocelot had an average diameter of seminiferous tubules of 211.37 μm and 17.81 meters per gram of testis on average. In the seminiferous epithelium, in each cross-section of seminiferous tubule in stage I of the cycle, we observed on average 1.06 type A spermatogonia, 17.78 primary spermatocytes in pre-leptotene/leptotene, 19.22 primary spermatocytes in pachytene, 59.5 round spermatids and 6.86 Sertoli cells. The overall yield of spermatogenesis in this species was approximately 57 cells, and each Sertoli cell was able to sustain and maintain 14,38 germline cells of which 8.76 were round

spermatids. The daily sperm production found shows that the ocelot is an animal with a high level of production, since production is about than 32 million sperm per gram of testis.

1. Introdução Geral

O estudo da biologia da conservação vem sendo desafiado pela perda contínua e acelerada da biodiversidade global, o que resulta em perdas catastróficas de variabilidade genética, causada pela redução subsequente de populações de animais podendo levá-las a extinção (Wildt et al., 1992).

O aparecimento de barreiras na paisagem pode alterar de modo significativo a dinâmica populacional das espécies. Os predadores da ordem *Carnivora*, por estarem no topo da pirâmide alimentar, possuem grande importância ecológica, uma vez que podem regular a população de presas naturais, influenciando diretamente toda a dinâmica do ecossistema em que vivem (Pitman et al., 2002).

Há duas possibilidades de se trabalhar com a conservação de espécies ameaçadas de extinção, como é o caso dos carnívoros silvestres, através de projetos *in situ* e *ex situ*. O primeiro envolve estratégias de conservação da população em seu ambiente natural, enquanto a preservação *ex situ* trata da conservação das espécies fora do ambiente natural, como a criação e manutenção em cativeiro, servindo como uma reserva de material biológico contra a extinção dessas espécies na natureza (Bensusan, 2008).

Devido ao seu tamanho corporal, a jaguatirica (*Leopardus pardalis*) é considerada um carnívoro de porte médio, porém muitas vezes está incluída no grupo dos grandes e por vezes dos pequenos felinos silvestres. Segundo Moreira et al. (1994), os pequenos felinos sul-americanos possuem baixo índice reprodutivo em cativeiro. Dentre as espécies de felinos, a jaguatirica foi a mais visada por caçadores nas décadas de 60 e 70 por conta de sua pelagem pintada. Atualmente a principal causa de declínio da sua população é a destruição do habitat, sendo essa a responsável por aumentar de forma significativa o risco de extinção de subespécies, visto o isolamento e perda genética (Oliveira, 1994; Nowell & Jackson, 1996).

De acordo com Wildt et al. (1995), pesquisas morfofuncionais sobre o testículo aliadas aos estudos em endocrinologia, embriologia e criopreservação de gametas, geram valiosas informações com aplicabilidade à reprodução assistida. Assim, informações sobre o processo espermatogênico da jaguatirica, além do conhecimento biológico sobre a morfofisiologia reprodutiva, fornecem importantes subsídios ao desenvolvimento de metodologias aplicáveis à conservação dessas espécies (Amann & Lambiase, 1969; Moreira, 2001; Guião Leite & Paula, 2003; Barros et al., 2004; Sarti,

2006; Azevedo et al., 2006; Guião Leite et al., 2006; Bittencourt et al., 2007; Balarini, 2008; Peixoto, 2010; Vasconcelos, 2011).

2. Revisão de Literatura

2.1- Jaguatirica - *Leopardus pardalis*, Linnaeus, 1758

A jaguatirica, também conhecida como ocelote e gato maracajá, é um dos felídeos neotropicais mais bem estudados. Alguns parâmetros ecológicos populacionais como dieta, área de vida, abundância e uso de habitat, vem sendo documentados desde a década de 1980, observados a partir de animais residentes em áreas protegidas ou pouco alteradas pelo homem (IUCN, 2006).

Dentre os pequenos felídeos neotropicais, a jaguatirica apresenta o maior porte (Fig. 1), pesando em média 11kg, sendo os machos mais pesados que as fêmeas. Seu comprimento pode chegar a 1 metro, com uma cauda proporcionalmente curta (em média 35 cm). Sua coloração pode variar do cinza-amarelado ao castanho com muitas tonalidades intermediárias, sendo que na região ventral a coloração é esbranquiçada. As manchas negras ao longo do dorso tendem a formar rosetas abertas que se unem formando bandas longitudinais nas laterais do corpo, sendo esse um padrão também encontrado em outras espécies do gênero *Leopardus* (Oliveira & Cassaro, 2005).



Figura 1: Jaguatirica (*Leopardus pardalis*) macho, adulto, mantido em cativeiro no Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Viçosa.

São animais de hábito solitário, predominantemente noturno, territorialista, em que os machos adultos toleram a sobreposição territorial com mais de uma fêmea, sugerindo assim, um modelo de acasalamento poligínico (Wieloch et al., 1997).

Sua dieta é constituída principalmente por pequenos vertebrados (<1kg), como: roedores, marsupiais, aves, lagartos e serpentes, mas há registros do consumo de outras presas maiores, geralmente animais jovens, como a cutia (*Dasyprocta sp*), preguiça (*Bradypus sp*), paca (*Cuniculus sp*), tatu (*Dasyurus sp*), veado (*Mazama sp*), quati (*Nasua sp*) (Moreno et al., 2006).

Com uma ampla distribuição geográfica (Fig. 2), a jaguatirica ocorre desde o oeste do México até o norte da Argentina. No Brasil, ocorre em todas as regiões com exceção do sul do estado do Rio Grande do Sul (Oliveira & Cassaro, 2005).



Figura 2: Países com relato de área de ocorrência de *Leopardus pardalis*, em vermelho (IUCN, 2006).

A maturidade sexual nas fêmeas ocorre dos 18 aos 22 meses de idade enquanto que nos machos, ocorre aos 30 meses (Sarti, 2006). Por meio de estudos nos padrões séricos de hormônios esteróides e da atividade ovariana em fêmeas de pequenos felinos em cativeiro, foi observado que essa espécie não apresenta padrão característico de

sazonalidade reprodutiva, portanto, experimentações reprodutivas podem ser conduzidas durante todo o ano (Moreira, 2001).

As jaguatiricas podem viver até os 20 anos em cativeiro, mas dificilmente ultrapassam os dez anos na natureza. O período de gestação das fêmeas varia entre 70 e 85 dias, podendo ter de 1 a 2 filhotes que recebem cuidados maternos até a fase adulta (Emmons, 1987).

São animais com uma grande capacidade de adaptação a habitats diferentes (ex: próximo a centros urbanos), o que aumenta ainda mais o seu risco de sobrevivência, uma vez estar mais sujeita aos atropelamentos, queimadas e desmatamentos. Essa espécie está entre as espécies de felinos brasileiros incluídos no apêndice I da Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção (CITES, 2010), e na lista oficial de espécies ameaçadas de extinção do Instituto Brasileiro de Recursos Naturais Renováveis e do Meio Ambiente (Ibama, 2006).

2.2- Testículos

O testículo dos mamíferos é um órgão de formato oval a arredondado, geralmente localizado fora da cavidade abdominal, em uma prega cutânea denominada escroto, sendo que nos felinos o escroto é perineal, sésil e comumente revestido por pêlos (Dyce, 2004) (Fig. 3).



Figura 3: Testículo esquerdo envolvido pelo escroto de *Leopardus pardalis*.

A localização escrotal é importante na maioria das espécies de mamíferos devido à necessidade de uma temperatura inferior à temperatura abdominal para a manutenção das funções testiculares (Junqueira & Carneiro, 2004). O testículo é envolvido pela albugínea que emite septos conjuntivos em direção ao mediastino.

Estes septos formam lobos testiculares, que apresentam inúmeros vasos sanguíneos e alojam os túbulos seminíferos (Paula, 1999; Carretta Junior, 2008). No testículo são observados dois compartimentos principais: o compartimento dos túbulos seminíferos e o compartimento intertubular ou intersticial. As funções endócrina e exócrina do testículo são controladas pelos hormônios gonadotróficos hipofisários (Ashdown & Hancock, 1988).

No interior dos túbulos seminíferos há o epitélio germinativo ou seminífero constituído por dois tipos celulares, as células somáticas ou de Sertoli e as células da linhagem germinativa, sendo que as primeiras envolvem e nutrem as células germinativas. No compartimento intertubular se localizam as células intersticiais de Leydig, produtoras de testosterona (Rondon et al., 2000; Junqueira & Carneiro, 2004).

De acordo com alguns autores, há uma correlação entre o peso testicular e a produção espermática (Amann, 1970; Olar et al., 1983; França & Russell, 1998). Porém, o tamanho testicular não acompanha proporcionalmente o tamanho corporal, ou seja, o investimento somático em massa gonadal é maior em animais de pequeno porte em relação àqueles de maior porte corporal (Kenagy & Trombulak, 1986). O fato do tamanho do testículo não necessariamente acompanhar o tamanho corporal é um contribuinte para a economia energética uma vez que animais de grande porte produziram quantidades excessivamente grandes de espermatozoides (Paula, 1999).

Animais que adotam comportamento sexual baseado em sistemas promíscuo ou poliândrico, no qual diferentes machos copulam com a mesma fêmea no mesmo ciclo estral, apresentam maior índice gonadossomático (IGS) do que aqueles que se reproduzem baseado em sistemas monogâmico ou poligínico, no qual um único macho é responsável pela cópula com determinada fêmea (Short, 1997).

Sarti et al. (2009) observaram que a jaguatirica apresenta 0,12% de IGS, valor bem superior aos demais felinos silvestres. Segundo estes mesmos autores, este dado é contraditório com a tendência ao comportamento poligínico sugerido por estudos territoriais (Wieloch et al., 1997), uma vez que no sistema de acasalamento poligínico não há a competição pela progênie no interior das vias genitais feminina, via quantidade de sêmen depositado (Sarti et al., 2009).

2.2.1- Espermatogênese

A espermatogênese é um evento dinâmico, sincrônico e bem organizado que ocorre ciclicamente no interior dos túbulos seminíferos, no qual uma célula tronco diploide, a espermatogônia, sofre diferenciação em várias etapas até ser liberada como célula haploide, o espermatozoide, no lume do túbulo seminífero. Nos mamíferos já estudados o processo total dura de 40 a 60 dias (França & Russell, 1998).

Este processo é organizado em três fases distintas, baseado em considerações morfológicas e funcionais. Na fase mitótica (espermatogonial ou proliferativa), as espermatogônias sofrem sucessivas divisões mitóticas gerando células que serão responsáveis pelo estoque de células tronco e uma geração de células que continuará o processo de diferenciação. A fase meiótica é caracterizada pela população de espermatócitos, nos quais o material genético é duplicado e recombinado. A terceira fase é a de diferenciação (espermio gênica), na qual as espermátides sofrem significativas modificações (alterações nucleares, formação do acrossoma, desenvolvimento flagelar e redistribuição citoplasmática) transformando-se em espermatozoides que são células muito especializadas e estruturalmente equipadas para alcançar e fertilizar os oócitos. Cada uma destas fases dura aproximadamente 1/3 de todo o processo espermatogênico (Russell et al., 1990).

O rendimento da espermatogênese não alcança os 100% de eficiência por ocorrer morte celular programada, apoptose, em células defeituosas limitando as células germinativas a um número que pode ser suportado pelas células de Sertoli disponíveis (Huckins, 1978; De Rooij & Janssen, 1987; De Rooij & Lok, 1987; Sharpe, 1994; De Rooij, 1998). De acordo com Roosen-Runge (1973), o grau e o modo de degeneração das células germinativas é espécie-específico, mas em geral ocorre durante as divisões mitóticas e meióticas. Degenerações de espermátides alongadas raramente foram observadas (Russell & Clermont, 1977).

Ainda são escassos os estudos que abordem a espermatogênese de animais silvestres. Mas algumas espécies de carnívoros, como onça parda (*Puma concolor*; Guião-Leite & Paula, 2003), onça pintada (*Panthera onca*; Azevedo, 2004), leão africano (*Panthera leo*; Barros, 2005), lobo guará (*Chrysocyon brachyurus*; Bittencourt et al., 2007), cachorro do mato (*Cerdocyon thous*; Caldeira, 2007), gato do mato pequeno (*Leopardus tigrinus*; Balarini, 2008), já foram foco de estudos espermatogênicos.

2.2.2 - Ciclo do epitélio seminífero

No epitélio seminífero pode-se observar gerações concomitantes de células que formam de quatro a cinco camadas concêntricas, da base ao lume tubular. À medida que a geração mais desenvolvida é liberada no lume, ao mesmo tempo uma nova geração é formada em sua base. O período de tempo observado entre cada uma destas etapas é denominado ciclo do epitélio seminífero (CES) (Leblond & Clermont, 1952). Em mamíferos, o CES é considerado uma constante biológica, com variações apenas interespecíficas, estando sob o controle do genótipo da célula germinativa e não sendo influenciada por qualquer fator conhecido (Clermont, 1972; Amann & Schanbacher, 1983).

Para o cálculo da duração do ciclo do epitélio seminífero são utilizados marcadores celulares, como a timidina triciada (Cardoso & Godinho, 1982; França, 1991; Paula, 1999; Guião-Leite et al., 2006; Bittencourt et al., 2007) ou a bromodeoxiuridina (BrdU) (Balarini et al., 2011; Vasconcelos, 2011) que permitem aplicações diretamente no parênquima testicular ou aplicações sistêmicas (Ellwart & Dormer, 1985; Peixoto, 2010). No momento da injeção o marcador incorpora-se ao DNA em duplicação no núcleo das células em interfase nos diferentes tipos espermatogoniais e nos espermátócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno. Como os pré-leptótenos/leptótenos são os últimos tipos celulares a incorporarem os marcadores celulares em seus núcleos, eles são utilizados como ponto de referência para a determinação do cálculo da duração do ciclo do epitélio seminífero, em associação com a frequência dos estádios percorridos após diferentes tempos de injeção do marcador (Clermont, 1972; França & Cardoso, 1998).

Aproximadamente 4,5 ciclos são requeridos para que o processo espermatogênico se complete em mamíferos, ou seja, a liberação dos espermatozoides no lume do túbulo seminífero, a partir de uma espermatogônia A₁ (Amann & Schanbacher, 1983; Lin et al., 1990; França & Russell, 1998).

2.2.3 - Estádios do ciclo do epitélio seminífero

Nos túbulos seminíferos de animais sexualmente maduros, as células espermatogênicas não estão arranjadas ao acaso, mas sim organizadas numa série bem definida de associações celulares ou estádios. Na grande maioria dos mamíferos estudados, o arranjo dos estádios do ciclo do epitélio seminífero é segmentar e usualmente existe somente um estágio por secção transversal de túbulo seminífero

(Leblond & Clermont, 1952; Russell et al., 1990). Dentre os sistemas utilizados para se estudar os estádios do ciclo do epitélio seminífero, o mais empregado é o método da morfologia tubular que permite a obtenção de oito estádios do ciclo. Esse método se baseia na forma e na localização dos núcleos das espermátides e na presença de figuras de divisões meióticas (Roosen-Runge & Giesel Jr., 1950; Courot et al., 1970; Berndtson, 1977; Ortavant et al., 1977; Guerra, 1983; França, 1991; Paula, 1999; Guião Leite et al., 2006; Bittencourt et al., 2007; Peixoto, 2010). Outra classificação, designada como método do sistema acrossômico, é baseada nas características das espermátides, em particular na forma do núcleo e no desenvolvimento do acrossoma. Com este método, os estádios são arbitrariamente definidos variando para cada espécie (Aire et al., 1980; Russell et al., 1990; França & Russell, 1998; Costa et al., 2008).

Com o conhecimento dos estádios do ciclo aliado aos estudos histomorfométricos do testículo é possível determinar a taxa de produção espermática em diferentes espécies com o objetivo de melhorar o manejo e a exploração dos reprodutores de destacado potencial genético (Amann, 1970; Amann & Schanbacher, 1983; França, 1991). Em espécies ameaçadas de extinção esta prática torna-se indispensável para a adequação de biotécnicas reprodutivas, como formação de bancos de germoplasma, além de possibilitar a translocação de material genético entre indivíduos de vida livre e de cativeiro contribuindo assim para a preservação e variabilidade genética destas espécies (Moreira, 2001).

2.3- Imunohistoquímica

Os métodos imunohistoquímicos estão cada vez mais difundidos nos laboratórios e já se encontram entre os mais úteis e comumente usados para avaliação da proliferação celular (Mello & Alves, 1999). A bromodeoxiuridina (5-bromo-2'-deoxiuridina), também designada por BrdU, é uma pirimidina análoga da timidina que é seletivamente incorporada ao DNA celular durante a fase S do ciclo celular. Por meio de técnica imunohistoquímica com o uso de anticorpos anti-BrdU é possível a identificação das células que incorporaram este precursor *in vivo* (Fagerholm et al., 1994). Por ser uma técnica não radioativa a incorporação do BrdU é uma alternativa ao método da timidina triciada para estudos morfofuncionais, já que é uma técnica com abordagem adequada, precisa e rápida para determinar o ciclo do epitélio seminífero (Rosiepen et al., 1997).

Pesquisas mais recentes, voltadas para o cálculo da duração do CES por meio do uso da bromodeoxiuridina ainda são escassas, limitando-se apenas ao estudo do ciclo espermato gênico da raposa azul (*Alopex lagopus*; Clausen et al., 1992), furão doméstico (*Mustela putorius furo*; Nakai et al., 2004), sagui do tufo branco (*Callithrix jacchus*; Ehmecke et al., 2005), do mussaranho (*Neomys fodiens*; Parapanov et al., 2008), macaco rhesus (*Macaca mulatta*; Rosiepen, 1997; Simorangkir et al., 2009), periquito australiano (*Melopsittacus undulatus*; Peixoto, 2010), quati (*Nasua nasua*; Vasconcelos, 2011) e do gato do mato pequeno (*Leopardus tigrinus*; Balarini et al., 2011).

3. Objetivos

Levando-se em consideração a escassez de informações a respeito da biologia reprodutiva de jaguatiricas, o presente estudo investigou a espécie *Leopardus pardalis* com os objetivos de:

- descrever a duração do ciclo do epitélio seminífero pela identificação das células germinativas mais avançadas marcadas pela 5-bromodeoxiuridina (BrdU);
- caracterizar os diversos estádios que constituem o ciclo do epitélio seminífero com base na associação das técnicas de morfologia tubular e desenvolvimento do sistema acrossômico;
- calcular a produção espermática diária por grama de testículo.

A partir dos resultados obtidos foram elaborados 2 artigos científicos:

- o primeiro trabalho descreve os estádios do ciclo através do uso da associação dos métodos da morfologia tubular e do desenvolvimento do sistema acrossômico e calcula a duração do ciclo do epitélio seminífero com o auxílio de um marcador de proliferação celular (5-bromodeoxiuridina);
- o segundo trabalho refere-se aos rendimentos intrínsecos da espermatogênese que aliados à duração do ciclo do epitélio seminífero possibilita o cálculo da produção espermática por grama de testículo de *Leopardus pardalis*.

Referências bibliográficas

- AIRE, T.A.; OLOWO-OKORUM, M.O.; AYENI, J.S. 1960. The seminiferous epithelium in the guinea fowl *Numida meleagris*. *Cell and Tissue Research*, 205:319-325.
- AMANN, R.P.; LAMBIASE, J.T. The male rabbit III. 1969. Determination of daily sperm production by means of testicular homogenates. *Journal of Animal Science*, 28:369-374.
- AMANN, R.P. Sperm production rates. In: JOHNSON, A.D.; GOMES, W.R.; VANDEMARK, N.L. (ed). 1970. *The testis*. New York: Academic Press, v. 1, Cap. 7: 433-482.
- AMANN, R.P.; SCHANBACHER, B.D. 1983. Physiology of male reproduction. *Journal Animal Science*, 57(2):380-403.
- ASHDOWN, R.R.; HANCOCK, J.L. 1988. Anatomia funcional da reprodução masculina, *Reprodução Animal*, 4ed. São Paulo, Manole, cap.2, 7-31.
- AZEVEDO, M.H.F. 2004. Análise morfofuncional do testículo da onça pintada (*Panthera onca*) adulta. Dissertação - Departamento de Veterinária, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 73p.
- AZEVEDO, M.H.F.; PAULA, T.A.R.; MATTA, S.L.P.; FONSECA, C.C.; NEVES, M.T.D. 2006. Morfometria testicular e o túbulo seminífero da onça pintada (*Panthera onca*). *Revista Ceres*, 53(307):374-381.
- BALARINI, M.K. 2008. Avaliação morfofuncional do testículo e do processo espermatogênico do gato-do-mato pequeno (*Leopardus tigrinus*, Schreber, 1775) adulto. Dissertação - Departamento de Veterinária, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 60p.
- BALARINI, M.K.; PAULA, T.A.R.; MATTA, S.L.P.; PEIXOTO, J.V.; GUIÃO-LEITE, F.L.; ROSSI JR, J.L.; CZERMAK JR, A.C.; WALKER, N.J. 2011. Stages and duration of the cycle of the seminiferous epithelium in oncilla (*Leopardus tigrinus*, SCHREBER, 1775). *Theriogenology* (In Press).
- BARROS, J.B.G.; PAULA, T.A.R.; AZEVEDO, M.H.F.; GUIÃO LEITE, F.L.; ROSSI Jr, J.L.; MATTA, S.L.P.; OLIVEIRA, P.C. 2004. Population of the seminiferous epithelium, intrinsic yield of spermatogenesis and Sertoli cells index in adult lions (*Panthera leo*) raised in captivity. 5th *International Symposium on Canine and Feline Reproduction*, Rio de Janeiro, RJ, p.166-168.
- BARROS, J.B.G. 2005. Análise morfofuncional do testículo e da espermatogênese de leões africanos (*Panthera leo*, Linnaeus, 1758) adultos. Dissertação (Livre Docência) - Departamento de Veterinária, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 77p.
- BENSUSAN, N. 2008. Seria melhor mandar ladrilhar? Biodiversidade - como, para que e por quê. 2^a edição - São Paulo: Peirópolis; Brasília, DF: Editora Universidade Brasileira, 428p.
- BERNDTSON, W.E. 1977. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *Journal of Animal Science*, 44(5):818-83.
- BITTENCOURT, V.L.; PAULA, T.A.R.; MATTA, S.L.P.; FONSECA, C.C.; COSTA, D.S.; BENJAMIN, L.A.; COSTA, E.P. 2007. The seminiferous epithelium cycle and daily spermatogenic production in the adult maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1811). *Micron* (In Press), 38(6):584-589.
- CALDEIRA, B.C. 2007. Avaliação morfofuncional do testículo e do processo espermatogênico do cachorro do mato (*Cerdocyon thous*) adulto. Dissertação -

- Departamento de Veterinária, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 61p.
- CARDOSO, F.M.; GODINHO, H.P. 1982. Cycle of the seminiferous epithelium and its duration in the zebu, *Bos indicus*. *Animal Reproduction Science*, 5:231-245.
- CARRETTA JUNIOR, M. 2008. Avaliação morfofuncional do processo espermatogênico de pacas (*Cuniculus paca*, Linnaeus, 1766) adultas. Dissertação - Departamento de Veterinária, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 61p.
- CITES, *Convention on International Trade in Endangered Species*. 2011. Disponível em< <http://www.cites.org/esp/app/Appendices-S.pdf>>. Acesso em 16 de dezembro de 2010.
- CLAUSEN, O.P.F.; ANDERSEN BERG, K.; KIRKHUS, B.; DE ANGELIS, P.; HUITFELDT, H. 1992. BrdUrd incorporation studies for evaluation of spermatogenesis in the blue fox. *Cytometry*, 13:371-380.
- CLERMONT, Y. 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammals, seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiological Reviews*, 52(1):198-236.
- COSTA, G.M.J.; CHIARINI-GARCIA, H.; MORATO, R.G.; ALVARENGA, R.L.L.S.; FRANÇA, L.R. 2008. Duration of spermatogenesis and daily sperm production in the jaguar. *Theriogenology*, 70:1136-1146.
- COUROT, M.; HOCHEREAU-DE-REVIERS, M.T.; ORTAVANT, R. Spermatogenesis. IN: JOHNSON, A.D.; GOMES, W.R.; VANDEMARK, N.L. (ed). 1970. *The testis*. New York: Academic Press, v.1, cap. 6:339-432.
- DE ROOIJ, D.G.; LOK, D. 1987. Regulation of the density of spermatogonia in the seminiferous epithelium of the chinese hamster: II. Differentiating spermatogonia. *The Anatomical Record*, 217(2):131-136.
- DE ROOIJ, D.G.; JANSSEN, J.M. 1987. Regulation of the density spermatogonia in the seminiferous epithelium of the chinese hamster: I. Undifferentiated spermatogonia. *The Anatomical Record*, 217(2):124-130.
- DE ROOIJ, D.G. 1998. Stem cells in the testis. *International Journal of Experimental Pathology*. 79: 67-80.
- DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. 2004. Tratado de Anatomia Veterinária. Rio de Janeiro: Elsevier. 663p.
- EHMCKE, J.; LUETJENS, C.M.; SCHLATT, S. 2005. Clonal organization of proliferating spermatogonial stem cells in adult males of two species of non-human primates, *Macaca mulata* and *Callithrix jacchus*. *Biology of Reproduction*, 72: 293-300.
- ELLWART, E.; DORMER, P. 1985. Effect of 5-Fluoro-2'-Deoxyuridine (FdUrd) on 5-Bromo-2'-Deoxyuridine (BrdUrd) incorporation into DNA measured with monoclonal BrdUrd antibody and by the BrdUrd/H. *Cytometry*, 6:513-520.
- EMMONS, L.H. 1987. Comparative feeding ecology of felids in a neotropical rainforest. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 20(4):271-283.
- FAGERHOLM, P.; HAMBERG-NYSTRÖM, H.; TENGROTH, B. 1994. Wound healing and myopic regression following photorefractive keratectomy. *Acta Ophthalmologica (Copen)*, 72(2):229-234.
- FRANÇA, L.R. 1991. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais. 185p.
- FRANÇA, L.R.; CARDOSO, F.M. 1998. Duration of spermatogenesis and sperm transit time through the epididymis in the piau boar. *Cell and Tissue Research*, 30(5):573-582.

- FRANÇA, L.R.; RUSSELL, L.D. 1998. The testis of domestic animals. In: REGADERA, J. & MARTINEZ-GARCIA (eds). *Male reproduction: A multidisciplinary overview*. Churchill Livingstone, Madrid, 197-219.
- GUERRA, M.O. 1983. Comparação entre dois métodos de determinação da frequência relativa dos estádios do ciclo do epitélio seminífero, em dados da literatura. *Revista Brasileira de Biologia*, 43(4):385-394.
- GUIÃO-LEITE, F.L.; PAULA T.A.R. 2003. Intrisec yield of spermatogenesis, Sertoli cell index and daily sperm production in cougar (*Puma concolor*). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 27:1-21.
- GUIÃO-LEITE, F.L.; PAULA, T.A.R.; MATTA, S.L.P.; FONSECA, C.S.; DAS NEVES, M.T.; BARROS, J.B.G. 2006. Cycle and duration of the seminiferous epithelium in puma (*Puma concolor*). *Animal Reproduction Science*, 91:307-316.
- HUCKINS, C. 1978. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. *The Anatomical Record*, 190(4):905-26.
- IBAMA, Instituto Brasileiro Do Meio Ambiente E Recursos Naturais Renováveis. 2006. Lista oficial de animais ameaçados de extinção. Disponível em <<http://www.ibama.gov.br/fauna-silvestre>>. Acesso em 16 de dezembro de 2010.
- IUCN, *Red List of Threatened Species*. 2006. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em 19 de agosto de 2010.
- JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. 2004. Aparelho Reprodutor Masculino. In: JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. *Histologia básica*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara. p. 89-105.
- KENAGY, G.J.; TROMBULAK, S.C. 1986. Size and function of mammalian testes in relation to body size. *Journal of Mammalogy*, 67(1):1-22.
- LEBLOND, C.P.; CLERMONT, Y. 1952. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 55:548-584.
- LIN, M.; JONES, R.C.; BLACKSHAW, A.W. 1990. The cycle of the seminiferous epithelium in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) and estimation of its duration. *Journal of Reproduction and Fertility*, 88:481-490.
- MELLO, E.S. & ALVES, V.A.F. 1999. Marcadores de proliferação celular. In: ALVES, V.A.F.; BACCHI, C.E.; VASSALO, J. *Manual de imunohistoquímica*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 182-194.
- MOREIRA, N.; MORAES, W.; SANTOS, L.C. 1994. Study of reproductive parameters in *Felis tigrina*, *Felis pardalis* e *Felis wiedii*. In: *Proceedings XVIII Brazilian Congresso of Zoological Society*. Rio de Janeiro, RJ, SZB, p. 59.
- MOREIRA, N. 2001. Reprodução e estresse em fêmeas de felídeos do gênero *Leopardus*. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba: CPGZOO/UFPR.
- MORENO, R.S.; KAYS, R.W.; SAMUDIO JUNIOR, R. 2006. Competitive release in diets of ocelot (*Leopardus pardalis*) and puma (*Puma concolor*) after jaguar (*Panthera onca*) decline. *Journal of Mammalogy*, 87(4):808-816.
- NAKAI, M.; VAN CLEEFF, J.K.; BAHR, J.M. 2004. Stages and duration of spermatogenesis in the domestic ferret (*Mustela putorius furo*). *Cell and Tissue Research*, 36:439-446.
- NOWELL, K.; JACKSON, P. 1996. *Wild cats: Status Survey and Conservation Action Plan*. Gland, Switzerland, IUCN / SSC Cat Specialist Group, 382p.

- OLAR, T.T.; AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. 1983. Relationships among testicular size, daily production and output of spermatozoa and extragonadal spermatozoa reserves of the dog. *Biology of Reproduction*, 29:1114–1120.
- OLIVEIRA, T.G. 1994. Neotropical cats: ecology and conservation, São Luís, EDUFMA. 221p.
- OLIVEIRA, T.G.; CASSARO, K. 2005. *Guia de campo dos felinos do Brasil*. São Paulo: Instituto Pró-Carnívoros, sociedade de Zoológicos do Brasil, Fundação Parque Zoológico de São Paulo e Pró-Vida Brasil. 80p.
- ORTAVANT, R.; COUROT, M.; HOCHEREAU-DE-REVIERS, M.T. Spermatogenesis in domestic mammals. In: COLE, H.H. & CUPPS, P.T. (eds). 1977. *Reproduction in domestic animals*. 3 ed. New York: Academic Press. Cap. 8:203-227.
- PARAPANOV, R.; NUSSLE, S.; HAUSSE, J.; VOGEL, P. 2008. Histological description of seminiferous epithelium and cycle length of spermatogenesis in the water shrew *Neomys fodiens* (Mammalia: Soricidae). *Animal Reproduction Science*, 107:148–160.
- PAULA, T.A.R. 1999. Avaliação histológica e funcional do testículo de capivaras adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Tese (Doutorado em Morfologia). Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 84p.
- PEIXOTO, J.V. 2010. Criopreservação de sêmen e avaliação histológica e funcional do testículo de periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus* SHAW, 1805). Tese de Doutorado. Departamento de Veterinária, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 78p.
- PITMAN, M.R.P.L.; OLIVEIRA, T.G.; PAULA, R.C.; INDRUSIAK, C. 2002. *Manual de identificação, prevenção e controle de predação por carnívoros*. Brasília: Edições IBAMA, 11p.
- RONDON, A.S.; RIBAS, J.A.S.; CAMARGO, L.M.; GERMINARO, A.; PERSONA, L.N.; SIMÕES, M.J.; FRANCO, P.C. 2000. Aspectos histológicos do testículo do lobinho do mato (*Cerdocyon thous*). *Arquivos do Instituto Biológico*, 67:55-58.
- ROOSEN-RUNGE, E.C.; GIESEL Jr, L.O. 1950. Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. *American Journal of Anatomy*, 87(1):1-30.
- ROOSEN-RUNGE, E.C. 1973. Germinal-cell loss in normal metazoan spermatogenesis. *Journal of Reproduction and Fertility*, 35:339-348.
- ROSIEPEN, G.; ARSLAN, M.; CLEMEN, G.; NIESCHLAG, E.; WEINBAUER, G.F. 1997. Estimation of the duration of the cycle of the seminiferous epithelium in the non-human primate *Macaca mulatta* using the 5-bromodeoxyuridine technique. *Cell and Tissue Research*, 288:365-369.
- RUSSEL, L.D.; CLERMONT, Y. 1977. Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats. *The Anatomical Record*, 187:347-366.
- RUSSELL, L. D.; ETTLIN, R. A.; SINHA-HIKIM, A. P.; CLEGG, E. D. 1990. Histological and histopathological evaluation of the testis. *Cache River Press*, Clearwater, Flórida.
- SARTI, P. 2006. Avaliação Morfométrica do Testículo e da Espermatogênese de Jaguatiricas (*Leopardus pardalis*, Linnaeus, 1758) Adultas. Dissertação - Departamento de Veterinária, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 66p.
- SARTI, P.; PAULA, T.A.R.; DA MATTA, S.L.P.; FONSECA, C.C.; POLLI, G.O.; BALARINI, M.K.; MASCARENHAS, R.M. 2009. Parâmetros biométricos corporais

- e testiculares de jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) adultas. *Revista Ceres*, 56(2):161-165.
- SHARPE, R.M. 1994. Regulation of spermatogenesis. In. KNOBIL, E. & NEIL, J.D. (eds) *The physiology of reproduction*, 2ed. Raven Press, New York, 1363-1434.
- SIMORANGKIR, D.R.; MARSHALL, G.R.; PLANT, T.M. 2009. A re-examination of proliferation and differentiation of type A spermatogonia in the adult rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Human Reproduction*, 24(7):1596-1604.
- SHORT, R.V. 1997. The testis: the witness of the mating system, the site of mutation and the engine of desire. *Acta Paediatrica*, New York (Supplement), 422:3-7.
- VASCONCELOS, G.S.C. 2011. Ciclo do epitélio seminífero de quati (*Nasua nasua* Linnaeus, 1766). Dissertação (Livre Docência) - Departamento de Veterinária, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 59p.
- WIELOCH, D.R.; VEADO, B.V.; FURTADO, D.B. 1997. Cadernos da Fundação Zoo-Botânica I – Animais de Zoológico, Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte, Serviço de Educação Ambiental, Belo Horizonte, 165-166.
- WILDT, D.E.; MONFORT, S.L.; DONOGHUE, A.M.; JOHNSTON, L.A.; HOWARD, J. 1992. Embryogenesis in conservation biology - or, how to make an endangered species embryo. *Theriogenology*, 37:161-184.
- WILDT, D.E.; PUKAZHENTHI, B.; BROWN, J.; MONFORT, S. HOWARD, J.G.; ROTH, T.L. 1995. Spermatology for understanding managing and conserving rare species. *Reproduction, Fertility and Development*, 7:812-824.

Artigo 01

Descrição e duração do ciclo do epitélio seminífero de

Leopardus pardalis, Linnaeus, 1758

Resumo: Apesar da jaguatirica ser um felino que apresenta uma ampla distribuição no continente americano, abrangendo os mais diversos habitats, são poucos os estudos a respeito de sua morfofisiologia testicular. Para estimar a duração do ciclo do epitélio seminífero em jaguatiricas foi injetado 0,1 ml de 5-bromodeoxiuridina via intratesticular. Após a realização de biópsia, processamento histológico e imunohistoquímico do fragmento foram descritos oito estádios do ciclo com base na associação dos métodos da morfologia tubular (forma e posição do núcleo das espermátides e na ocorrência de divisões meiótica) com o sistema acrossômico (descrição da morfologia e da área de ocupação do acrossoma sobre a superfície nuclear das espermátides). Foi encontrado um estádio por secção transversal de túbulo seminífero, o mais frequente foi o estádio I enquanto o estádio VII foi o menos frequente sendo a fase pré meiótica maior do que as outras (56,5%). Após 16 dias de aplicação foi realizada biópsia testicular e a marcação encontrada foi no início do estádio III na transição de paquíteno para diplóteno. Assim, a duração de um ciclo foi calculada em 11,30 dias, como, são necessários 4,5 ciclos para que o processo espermatogênico se complete, cerca de 50,85 dias são necessários para produção de espermatozoides a partir de uma espermatogônia do tipo A nessa espécie.

Palavras-chave: epitélio seminífero, processo espermatogênico, BrdU, morfologia tubular, sistema acrossômico.

Abstract: Although the oncelot is a cat that has a wide distribution in american's continent, encompassing the most diverse habitats, there are few studies about their testicular morphophysiology. To estimate the duration of the seminiferous epithelium's cycle in oncelots was injected 0,1 mL of 5-bromodeoxiuridina inside their testis. After the biopsy, histological and immunohistochemical processing of the fragment were described eight stages of the cycle, based on the combination of the tubular morphology methods (shape and position of the nucleus of spermatids and the occurrence of meiotic divisions) with the acrosomal system (description of the morphology and the footprint of the acrosome on the nuclear surface of spermatids). A stadium for seminiferous tubule cross-section was found, the most frequently was the stage I, while the stadium VII was the least frequent being the pre meiotic larger than the others (56.5%). After 16 days of 5-bromodeoxiuridina application a testicular biopsy was performed and it was found marking the beginning of stage III in the transition from pachytene to diplotene. So, the cycle length was calculated to be 11.30 days, as 4.5 cycles are necessary to complete the spermatogenic process and about 50.88 days are needed for the production of sperm from a spermatogonium type A in this species.

Keywords: seminiferous epithelium, spermatogenic process, BrdU, tubular morphology, acrosomal system.

1. Introdução

A jaguatirica (*Leopardus pardalis*) é um mamífero de médio porte, com ampla distribuição geográfica (Oliveira & Cassaro, 2005). No Brasil está presente em todas as regiões, com exceção do sul do estado do Rio Grande do Sul. É uma das espécies de felinos neotropicais incluídos no apêndice I da Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção (CITES, 2010) e na lista oficial de espécies ameaçadas de extinção do Instituto Brasileiro de Recursos Naturais Renováveis e do Meio Ambiente (Ibama, 2006).

A preservação da espécie depende de ambientes onde esses animais estarão protegidos na natureza, como parques estaduais e unidades de conservação, bem como em cativeiro. Este último proporciona ambiente favorável para realização de estudos sobre aspectos reprodutivos, que podem auxiliar no desenvolvimento apropriado de técnicas de reprodução assistida (Moreira, 2001; Guião-Leite & Paula, 2003; Barros et al., 2004; Guião-Leite et al., 2006). Neste contexto, o conhecimento do processo espermatogênico se torna essencial, ao considerar que ele é um evento dinâmico, sincrônico e bem organizado, que ocorre ciclicamente no interior dos túbulos seminíferos (Russell et al., 1990)

Este processo pode ser dividido em três fases distintas, baseado em considerações morfológicas e funcionais: (1) fase proliferativa onde as células sofrem sucessivas divisões mitóticas gerando células que renovarão o estoque de células tronco e uma geração de células que continuarão o processo de diferenciação; (2) fase meiótica, onde o material genético é duplicado e recombinado e (3) fase de diferenciação espermiogênica, quando as espermatídes sofrem significativas modificações, transformando-se em espermatozoides (Russell et al., 1990).

O processo espermatogênico compreende o tempo decorrido entre a formação de uma geração de células germinativas na base do túbulo até a sua liberação no lume tubular, como espermatozoides. Entre quatro e cinco ciclos são necessários para que todo o processo espermatogênico se complete (Leblond & Clermont, 1952). Em mamíferos, o ciclo do epitélio seminífero é considerado uma constante biológica, com variações apenas interespecíficas, estando sob controle do genótipo da célula germinativa e não sendo influenciada por qualquer fator conhecido (Clermont, 1972; Amann & Schanbacher, 1983).

Com base no presente exposto, o objetivo deste trabalho foi determinar a duração do ciclo do epitélio seminífero (CES) em *Leopardus pardalis*, utilizando o marcador celular a 5-bromodeoxiuridina, e caracterizar cada estágio do ciclo por meio da associação dos métodos da morfologia tubular e do desenvolvimento do sistema acrossômico.

2. Material e Métodos

2.1- Animais

Foram utilizadas três jaguatiricas machos adultas, provenientes do Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Viçosa-MG. Este estudo foi aprovado pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), sob o número 27.819 e pelo Comissão de Ética para o uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (processo número 37/201).

Para a contenção dos animais utilizou-se dardo contendo associação de cloridrato de quetamina (10 mg/kg) e cloridrato de xilazina (1 mg/kg), propelidos por pistola projetora de dardos mod.35 (Dist Injet[®] - Zootech). Para a determinação da duração do ciclo do epitélio seminífero foi aplicado 0,1ml de 5-bromodeoxiuridina (BrdU; Laboratórios Zymed, Carlsbad, CA, EUA), na borda livre do testículo sendo realizada biópsia testicular próximo ao local de injeção após 16 dias foi realizada.

A biópsia foi realizada com auxílio de um bisturi circular de 6mm de diâmetro após a contenção do animal e da tricotomia e antissepsia local. Após a coleta, os fragmentos testiculares foram imersos imediatamente em solução fixadora Karnovsky por 24 horas. Foi feita a sutura da região em planos distintos, onde albugínea testicular, túnica fibrosa e pele foram suturadas separadamente utilizando-se fio sintético absorvível. Todos os animais foram medicados com agentes anti-inflamatórios (Flunixin Meglumine, 1,1mg/kg IM) e antibioticoterapia profilática (Penicilina Benzatina, 20.000 UI/kg) em dose única. Os fragmentos testiculares foram mantidos em álcool 70% até o momento do processamento histológico. O material foi processado seguindo os métodos de rotina para inclusão em glicolmetacrilato (Historesin[®] - Leica) e parafina, visando o estudo histológico e o estudo imunohistoquímico, respectivamente.

2.2- Injeção do BrdU, histologia e duração do ciclo do epitélio seminífero

O fragmento testicular foi seccionado transversalmente e uma parte foi encaminhada ao processamento histológico para inclusão em parafina, para utilização em imunohistoquímica e outra parte encaminhada para processamento em resina glicolmetacrilato, para descrição histológica. Para inclusão em parafina o fragmento foi submetido à desidratação em série crescente de etanol (70, 80, 90% e absoluto) em banhos de 30 minutos cada e à diafanização em três passagens consecutivas de meia hora em xilol, até inclusão em parafina. O bloco contendo o fragmento testicular foi seccionado em micrótomo rotativo (Reichert-Jung), com navalha de aço, obtendo-se cortes semi-sequenciais de 4µm de espessura. Os cortes histológicos obtidos foram colocados em lâminas eletricamente carregadas, garantindo uma melhor adesividade dos mesmos (ImmunoSlide® - EasyPath). As lâminas foram submetidas à detecção por anticorpo monoclonal e reveladas pelo sistema de coloração *streptavidin-biotin*, através do kit de coloração BrdU (Zymed® - Invitrogen, Camarillo, CA, EUA). Para a inclusão em resina o fragmento foi submetido à desidratação em concentrações crescentes de etanol (80, 90 e 100%) permanecendo meia hora em cada meio, com posterior infiltração na resina em dois banhos distintos e incluídos, na mesma resina, com a adição de catalisador. Os fragmentos incluídos foram então seccionados com navalha de vidro em micrótomo rotativo (Leica RM2155, Leica Microsystems, Nussloch, Heidelberg, Germany), obtendo-se cortes semi-sequenciais de 3µm de espessura, posteriormente foi realizada a montagem em lâminas de vidro, corando-se os cortes histológicos com azul de toluidina/borato de sódio 1%. Para a coloração do acrossoma, os cortes foram corados com ácido periódico de Schiff (PAS).

A duração do ciclo do epitélio seminífero foi calculada através da observação da célula mais avançada no epitélio que apresentou marcação, de acordo com o método da morfologia tubular associado ao sistema acrossômico. Desta forma, foi calculada a frequência total dos estádios percorridos desde a incorporação do BrdU nos espermátocitos jovens na aplicação até a marcação da célula mais avançada, na coleta do material. A frequência dos estádios percorridos corresponde ao intervalo de tempo decorrido, sendo calculado o período relativo de um ciclo do epitélio seminífero e posteriormente do processo espermatogênico total.

2.3- Estádios do ciclo do epitélio seminífero e suas frequências

Os estádios do ciclo do epitélio seminífero foram caracterizados com base no método da morfologia tubular (Berndtson, 1977), associado ao método do desenvolvimento do sistema acrossômico (Aire et al., 1980; Russell et al., 1990; França & Russell, 1998). Para tal, foi descrita a morfologia e a área de ocupação do acrossoma sobre a superfície nuclear das espermátides arredondadas e alongadas presentes em cada estágio do ciclo.

A frequência relativa dos estádios do ciclo do epitélio seminífero foi feita com base na contagem dos oito estádios pelo método da morfologia tubular em 100 secções transversais de túbulos seminíferos em cada animal, em microscópio de luz, com aumento de 200 X. Para registro e ilustração foram obtidas imagens digitais capturadas em fotomicroscópio de luz (Olympus CX31), equipado com câmera digital Olympus SC20.

3. Resultados e Discussão

3.1- Estádios do ciclo do epitélio seminífero e frequência relativa dos estádios

A espermatogênese é um evento dinâmico, sincrônico e bem organizado que ocorre ciclicamente no interior dos túbulos seminíferos, no qual uma célula tronco diploide, a espermatogônia, sofre sucessivas divisões e diferenciação em várias etapas até ser liberada como célula haploide, o espermatozoide, no lume do túbulo seminífero (Russell et al., 1990). O período de tempo observado entre cada uma destas etapas é denominado ciclo do epitélio seminífero, sendo o processo espermatogênico o tempo total gasto desde a formação até a liberação do espermatozoide (Leblond & Clermont, 1952; Paula, 1999).

As avaliações do processo espermatogênico são, via de regra, realizadas em secções transversais do túbulo seminífero, onde é possível a visualização de quatro a cinco camadas concêntricas de células germinativas. Cada camada é composta por uma geração celular em uma fase específica de desenvolvimento, caracterizada por um acurado desenvolvimento sincrônico, uma vez que todas as células de determinada geração apresentam-se interligadas por pontes citoplasmáticas (De Rooij, 1998; Peixoto, 2010).

A partir da identificação da população celular é possível realizar a classificação dos estádios do ciclo do epitélio seminífero para poder estimar a sua duração. A

classificação foi feita com base no método da morfologia tubular (Berndtson, 1977) que utiliza a forma e posição do núcleo da espermátide bem como a ocorrência de figuras meióticas. Porém, no presente trabalho foi utilizada em associação o método denominado sistema acrossômico onde as características das espermátides, em particular a forma do núcleo e o grau de desenvolvimento do acrossoma, são observadas (Aire et al. 1980; Russell et al., 1990; França & Russell, 1998).

O ciclo do epitélio seminífero da jaguatirica foi então didaticamente dividido em oito estádios com base no método da morfologia tubular em associação aos passos acrossomais observados no método do sistema acrossômico. Esses estádios são descritos a seguir e identificados na figura 1, enquanto os passos acrossomais são identificados na figura 2.

Estádio I: foi caracterizado pela ausência de espermátides alongadas e pela presença de uma geração de espermátides com núcleos arredondados e escuros, os quais em geral formavam três a quatro camadas próximo ao lume do epitélio seminífero (Fig.1, Estádio I). O núcleo da célula de Sertoli apresenta um grande desenvolvimento do nucléolo e cromatina frouxa e as espermatogônias do tipo A e os espermatócitos primários se encontravam em transição de pré-leptóteno para leptóteno próximo a membrana basal. Os espermatócitos em paquíteno estavam entre as espermátides arredondadas e espermatócitos em pré-leptóteno/leptóteno. As espermátides arredondadas apresentam-se no passo acrossomal 5 (Fig.2-E), onde a formação do acrossoma está em etapa avançada de desenvolvimento apresentando capuz acrossômico com uma grande vesícula central com extensões laterais envolvendo uma área menor que 50% da superfície nuclear, orientando-se em direção à base do túbulo seminífero.

Estádio II: caracterizado pela presença de espermátides com o núcleo em alongamento, direcionadas no sentido dos núcleos das células de Sertoli. Próximo à lâmina basal foram encontrados espermatócitos primários em leptóteno, em paquíteno e em transição para espermatócitos em diplótenos. Espermatogônia do tipo A, núcleos e nucléolos das células de Sertoli apresentaram morfologia semelhante ao estágio I (Fig. 1, Estádio II). As espermátides presentes no estágio II apresentavam-se em formato mais alongado e o acrossoma com uma grande vesícula central com prolongamentos

laterais ocupando uma área de aproximadamente 50% da superfície nuclear (Fig.2-F), sendo denominado passo acrossomal 6.

Estádio III: foram observados feixes formados por espermátides, cujos núcleos apresentam um maior alongamento e maior condensação acrossômica. Duas gerações de espermatócitos primários em zigóteno e em diplóteno, com seus núcleos caracteristicamente grandes, também foram visualizados (Fig. 1, Estádio III). As células de Sertoli apresentam um nucléolo proeminente e as espermatogônias do tipo A foram observadas próximos à lâmina basal. Acompanhando o formato nuclear o acrossoma das espermátides apresentou-se mais alongado do que no passo anterior, ainda com uma vesícula acrossômica perceptível e prolongamentos com uma ocupação ligeiramente maior que no passo anterior, demonstrando o passo acrossomal 7 (Fig.2-G).

Estádio IV: o aspecto mais característico é a ocorrência de duas divisões meióticas, observadas pela ocorrência de placas metafásicas em espermatócitos primários. Assim, os espermatócitos em diplóteno formam espermatócitos secundários que se dividem produzindo espermátides arredondadas. Os espermatócitos primários apresentavam-se em transição de zigóteno para paquíteno e feixes de espermátides alongadas com grande condensação cromossômica foram observados (Fig.1, Estádio IV). As espermátides alongadas apresentavam acrossoma com uma cobertura maior do que 50% da superfície nuclear e uma vesícula acrossômica ainda é observada na extremidade da espermátide, que passa a apresentar um formato triangular, caracterizando o passo acrossomal 8 (Fig.2-H).

Estádio V: duas gerações de espermátides foram observadas neste estágio devido a presença das recém formadas espermátides arredondadas. Os espermatócitos primários em paquíteno foram observados na região intermediária do epitélio (Fig.1, Estádio V). As espermátides arredondadas, recém formadas, apresentam a característica do passo acrossomal 1, ou seja, uma pequena vesícula em um dos pólos do núcleo (Fig.2-A). Feixes de espermátides alongadas estavam localizados em criptas no citoplasma das células de Sertoli. Nas espermátides do feixe o acrossoma cobre quase toda a superfície nuclear, que apresenta uma forma bastante alongada, caracterizando o passo acrossomal 9 (Fig.2-I).

Estádio VI: todos os tipos celulares observados no estágio anterior estavam presentes nesse estágio. O aspecto característico desse estágio era que os feixes de espermátides alongadas estavam mais próximos do lume tubular. Os espermátócitos em paquíteno foram encontrados na região média do epitélio, e na região basal foram observadas espermatogônias (Fig.1, Estádio VI). As espermátides arredondadas apresentavam características do passo acrossomal 2 devido a presença de uma vesícula acrossômica bem desenvolvida e em contato com a superfície do núcleo (Fig.2-B). As espermátides alongadas caracterizam o passo acrossomal 10 onde seus núcleos apresentam alongamento e condensação em uma etapa quase completa ou completa da formação (Fig.2-J).

Estádio VII: os feixes formados pelas espermátides alongadas apresentavam-se dissociados e localizados próximos ao lume tubular. Os núcleos dos espermátócitos primários em paquíteno ocupavam a região intermediária do epitélio (Fig.1, Estádio VII). A geração de espermátide arredondada apresentava vesícula acrossomal expandida com uma projeção ligeiramente menor do que 25% da superfície nuclear, o que caracteriza o passo acrossomal 3 (Fig.2-C) e a geração de espermátides alongadas caracterizavam o passo acrossomal 10, descrito no estágio anterior (Fig.2-J). Também foram observadas a presença de corpos residuais e espermatogônias do tipo intermediária e B, na base do epitélio.

Estádio VIII: o aspecto mais característico deste estágio foi a localização das espermátides alongadas bem próximas do lume tubular com flagelos bem evidentes e prontas para a espermição. Corpos residuais eram evidenciados próximos à borda luminal do epitélio. Espermátócitos em paquíteno e espermátides arredondadas ocupavam a região intermediária do epitélio e células de Sertoli, espermatogônias do tipo B e alguns espermátócitos primários em pré-leptóteno foram observados próximos à lâmina basal (Fig.1, Estádio VIII). A vesícula acrossomal das espermátides arredondadas apresentavam expansão de aproximadamente 25% da superfície nuclear, o que caracteriza o passo acrossomal 4 (Fig.2-D), enquanto que as espermátides alongadas ainda caracterizavam o passo acrossomal 10 (Fig.2-J).

Foi encontrado um estágio por secção transversal no túbulo seminífero da jaguatirica, este dado corrobora os dados presentes na literatura para as espécies de felinos estudados (França & Godinho, 2003; Guião-Leite et al., 2006; Costa et al., 2008;

Balarini et al., 2011) e os de outros mamíferos. Assim, a jaguatirica apresenta o túbulo seminífero com arranjo do ciclo do epitélio seminífero de forma segmentar conforme os outros mamíferos (Leblond & Clermont, 1952; Russell et al., 1990; Paula, 1999; Neves et al., 2002; Bittencourt et al., 2007, Vasconcelos, 2011).

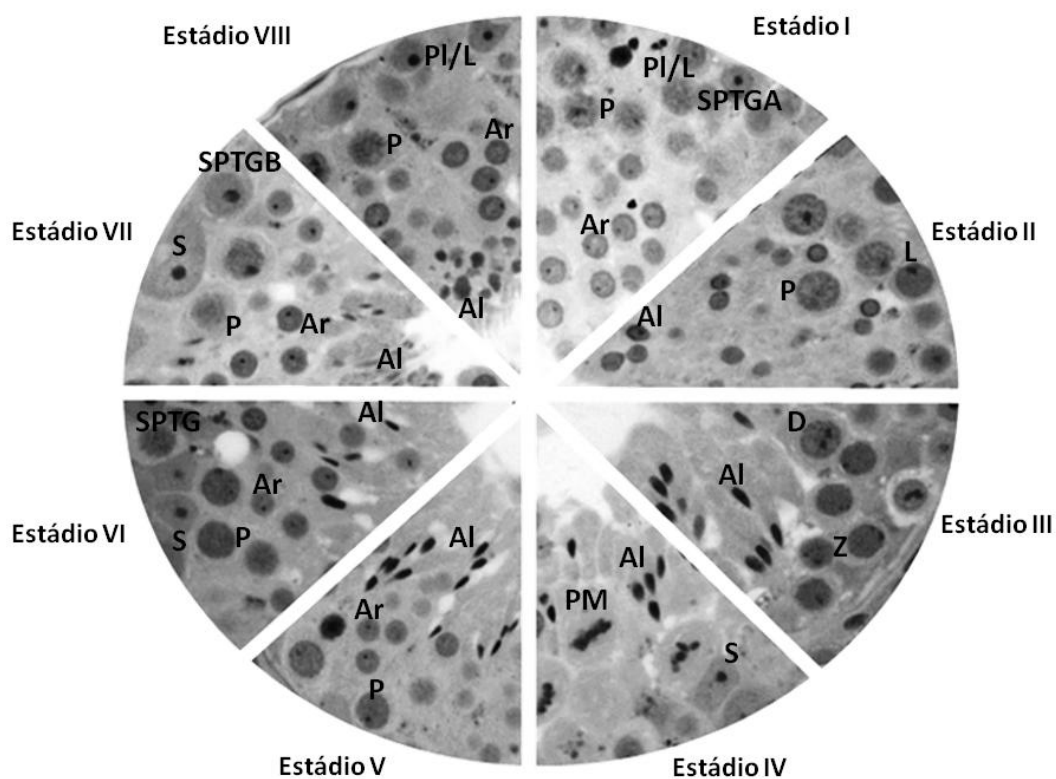


Fig.1- Montagem fotográfica contendo os oito estádios do ciclo do epitélio seminífero de jaguatirica (*Leopardus pardalis*). Espermatogônia (SPTG); espermatogônia do tipo A (SPTGA); espermatogônia do tipo B (SPTGB); célula de Sertoli (S); espermatócito em transição pré-leptóteno/leptóteno (PL/L); leptóteno (L); zigóteno (Z); paquíteno (P); diplóteno (D); placa metafásica (PM); espermátide arredondada (Ar); espermátide em alongamento/alongada (Al). Azul de toluidina. 200 X.

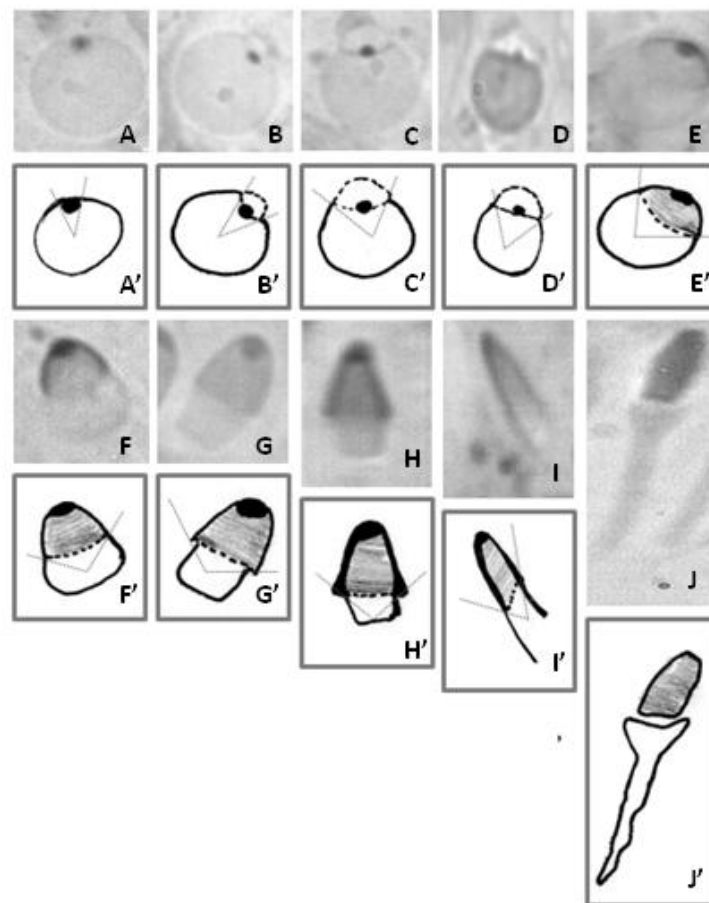


Fig.2- Montagem fotográfica contendo os dez passos acrossomais, de acordo com o método do sistema acrossômico, dos estádios do ciclo do epitélio seminífero em jaguatirica (*Leopardus pardalis*). A - passo acrossomal 1; B - passo acrossomal 2; C - passo acrossomal 3; D - passo acrossomal 4; E - passo acrossomal 5; F - passo acrossomal 6; G - passo acrossomal 7; H - passo acrossomal 8; I - passo acrossomal 9; J - passo acrossomal 10. PAS. 1000 X. Esquema demonstrando o avanço acrossomal sobre a superfície nuclear A' - pequena vesícula acrossomal; B' - vesícula acrossômica em contato com a superfície do núcleo; C' - vesícula acrossomal menor que 25% da superfície nuclear; D' - vesícula acrossomal ocupando aproximadamente 25% da superfície nuclear; E' - área ocupada pelo acrossoma menor que 50% da superfície nuclear; F' - prolongamentos do acrossoma ocupando aproximadamente 50% da superfície nuclear; G' - prolongamentos do acrossoma ligeiramente maior que 50%; H' - acrossoma cobrindo mais de 50% da superfície nuclear; I' - acrossoma cobre quase toda a superfície nuclear; J' - núcleo em alongamento e condensação.

A frequência relativa da ocorrência de cada estágio do ciclo do epitélio seminífero corresponde ao percentual de sua duração ao longo do desenvolvimento espermatogênico. Assim, o cálculo da frequência dos estádios é um procedimento fundamental para estimativa da duração do ciclo do epitélio seminífero, uma vez que a incorporação e o progresso do marcador celular utilizado pode ser rastreado e mensurado a partir do tempo de permanência no animal. A frequência relativa de cada

estádio do ciclo do epitélio seminífero da jaguatirica é mostrada na tabela 1. O estágio I foi o mais frequente (26,5%) enquanto o estágio VII apresentou menor frequência (6%). As frequências dos estádios podem ser agrupadas em três diferentes fases: período pré-meiótico (estádios I a III), meioótico (estádio IV), e pós meioótico (estádio V ao VIII). Muitos animais domésticos apresentam uma frequência maior da fase pré-meiótica em relação à fase pós-meiótica (França & Russell, 1998). No presente estudo as frequências do período pré-meiótico, meioótico, e pós meioótico ocuparam respectivamente 56,5%, 11% e 32,5% do ciclo (Fig. 3). Dos felinos estudados, a jaguatirica, o gato doméstico e a onça parda (Godinho, 1999; Guião-Leite et al., 2006) apresentaram a fase pré-meiótica maior do que a pós-meiótica, enquanto que o gato do mato pequeno (Balarini et al., 2011) não apresentou uma diferença significativa entre as fases, diferentemente da onça pintada, onde o período pós-meiótico é maior (Azevedo, 2004).

Tabela 1- Frequência relativa e duração de cada estágio e das fases do ciclo do epitélio seminífero de jaguatirica (*Leopardus pardalis*).

Estádios	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Frequência (%)	26,5	15	15	11	6,5	8	6	12
Duração (dias)	3,0	1,7	1,7	1,2	0,7	1,0	0,65	1,35
Fases	Pré-meiótica			Meiótica		Pós-meiótica		
Frequência (%)	56,5			11		32,5		

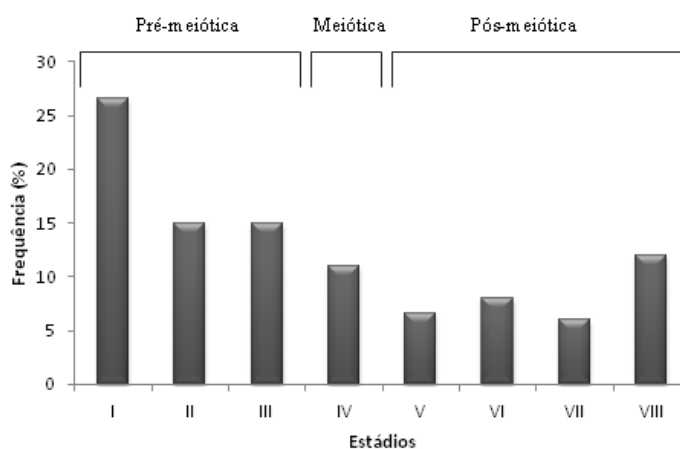


Fig.3- Média da porcentagem das fases pré-meiótica, meiótica e pós meiótica do epitélio seminífero de jaguatirica (*Leopardus pardalis*).

3.2- Duração do ciclo do epitélio seminífero

A 5-bromodeoxiuridina aplicada no testículo do animal é incorporada pelo núcleo das células que estão sintetizando DNA no momento da injeção, especificamente as espermatogônias e os espermátócitos primários em pré-leptóteno no estágio I do ciclo do epitélio seminífero. Assim, ao coletar os fragmentos testiculares em um período de tempo conhecido após a injeção de BrdU, e identificar as células imunomarcadas em estágio mais avançado no epitélio seminífero destes animais, é possível estimar o percentual do ciclo percorrido, bem como calcular a sua duração (Peixoto, 2010).

Após 16 dias de aplicação, foi observado a imunomarcação em células na transição paquíteno/diplóteno no início do estágio III, ou seja no segundo ciclo do epitélio seminífero, após a incorporação (Fig.4). Neste intervalo, cerca de 141,5% (Fig.5) de ciclos foram percorridos. Assim, um CES necessita de 11,30 dias para ocorrer. Como são necessários 4,5 ciclos do epitélio seminífero para que o processo espermatogênico se complete, são necessários então 50,85 dias para o desenvolvimento do espermatozoide a partir de uma espermatogônia, em jaguatirica.



Fig.4- Estádio III do ciclo do epitélio seminífero de jaguatirica (*Leopardus pardalis*), após 16 dias da aplicação de BrdU, demonstrando imunomarcação (seta) em espermátócitos primários em transição paquíteno/diplóteno. Streptavidin-biotin. 200X.

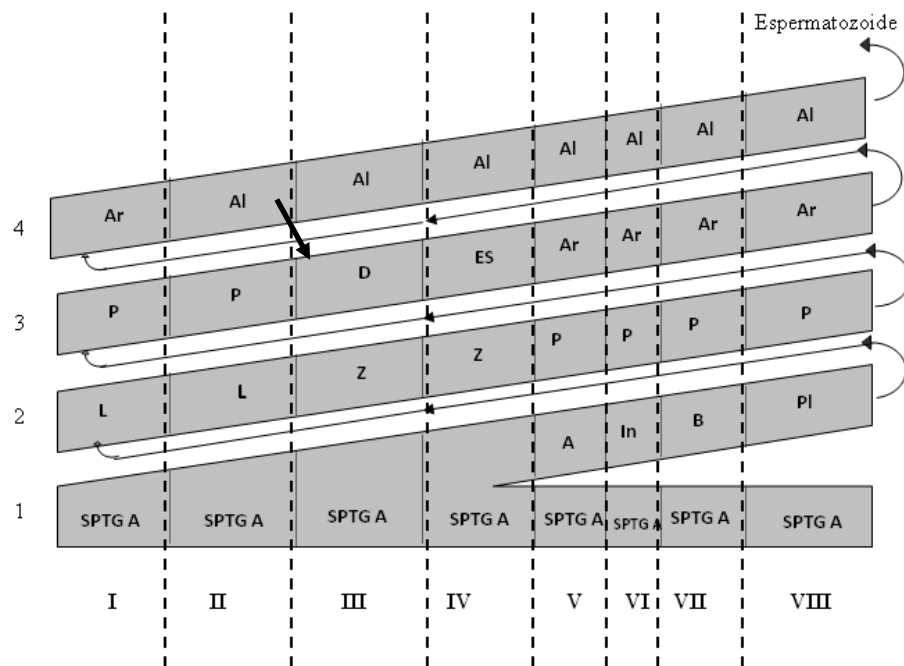


Fig.5- Diagrama do processo espermatogênico, onde os números arábicos (linhas) indicam o ciclo espermatogênico e os números romanos (colunas) indicam os 8 estádios do ciclo do epitélio seminífero. A célula germinativa marcada mais avançada (seta) nos oito estádios do ciclo, após dezesseis dias da injeção de BrdU, foi o espermatócito primário na transição paquíteno/diplóteno no início do estágio III. Espermatogônia do tipo A (SPTGA); espermatogônia intermediária (In); espermatogônia do tipo B (B); espermatócito primário: em pré-leptóteno (Pl); em leptóteno (L); em zigóteno (Z); em paquíteno (P); em diplóteno (D); espermatócito secundário (ES); espermátide arredondada (Ar) e espermátide alongada (Al).

A duração do CES é uma constante espécie-específica, sendo controlada pelo genótipo das células germinativas e não é afetada por nenhum fator conhecido (Clermont, 1972; Amann & Schambacher, 1983; França et al., 1998; Parreira et al., 1998).

Nas espécies mamíferas relatadas, a menor duração do ciclo do epitélio seminífero (6,7 dias) ocorre no roedor *Clethrionomys glareolus* (Grocock & Clarke, 1976), enquanto que os mais longos ciclos foram registrados em gambá (*Didelphis albiventris*; 17,3 dias; Queiroz & Nogueira, 1992) e no hamster chinês (*Cricetulus griseus*; 17,0 dias; Oud & De Rooij, 1977). A duração da espermatogênese na jaguatirica está dentro da faixa observada para a maioria dos felinos estudados nos quais a duração do ciclo espermatogênico varia de 7 a 14 dias (França & Godinho, 2003; Guião Leite et al., 2006; Costa et al., 2008; Balarini et al., 2011).

Em relação à duração das fases pré-meiótica, meioótica e pós-meiótica do ciclo do epitélio seminífero, a jaguatirica apresentou respectivamente 6,4; 1,2 e 3,7 dias em cada uma. Em relação à fase meioótica no processo espermatogênico, a jaguatirica apresentou o maior intervalo de dias (28,8 d) entre os felinos estudados.

Em conclusão foi encontrado um estágio por secção transversal de túbulo seminífero, sendo descritos oito estádios do CES em jaguatirica. A duração do ciclo do epitélio seminífero (11,30 d) é muito próxima do que foi encontrada nos demais felinos silvestres. Os métodos da morfologia tubular aliado ao método do desenvolvimento acrossômico e ao uso de marcadores celulares imunohistoquímicos para a descrição do ciclo do epitélio seminífero surgem como uma alternativa no auxílio para descrição e identificação dos estádios, auxiliando nos futuros estudos que visem técnicas de reprodução assistida.

Referências Bibliográficas

- AIRE, T.A.; OLOWO-OKORUM, M.O.; AYENI, J.S. 1980. The seminiferous epithelium in the guinea fowl *Numida meleagris*. *Cell and Tissue Research*, 205: 319-325.
- AMANN, R.P.; SCHANBACHER, B.D. 1983. Physiology of male reproduction. *Journal Animal Science*, 57(2):380-403.
- AZEVEDO, M.H.F. 2004. Análise morfofuncional do testículo da onça pintada (*Panthera onca*) adulta. Dissertação - Departamento de Veterinária, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 73p.
- BALARINI, M.K.; PAULA, T.A.R.; MATTA, S.L.P.; PEIXOTO, J.V.; GUIÃO-LEITE, F.L.; ROSSI JR, J.L.; CZERMAK JR, A.C.; WALKER, N.J. 2011. Stages and duration of the cycle of the seminiferous epithelium in oncilla (*Leopardus tigrinus*, SCHREBER, 1775). *Theriogenology* (In Press).
- BARROS, J.B.G.; PAULA, T.A.R.; AZEVEDO, M.H.F.; GUIÃO LEITE, F.L.; ROSSI Jr, J.L.; MATTA, S.L.P.; OLIVEIRA, P.C. 2004. Population of the seminiferous epithelium, intrinsic yield of spermatogenesis and Sertoli cells index in adult lions (*Panthera leo*) raised in captivity. *5th International Symposium on Canine and Feline Reproduction*, Rio de Janeiro, RJ, p.166-168.
- BERNDTSON, W.E. 1977. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *Journal of Animal Science*, 44(5):818-83.
- BITTENCOURT, V.L.; PAULA, T.A.R.; MATTA, S.L.P.; FONSECA, C.C.; COSTA, D.S.; BENJAMIN, L.A.; COSTA, E.P. 2007. The seminiferous epithelium cycle and daily spermatogenic production in the adult maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1811). *Micron* (In Press), 38(6):584-589.
- CITES, *Convention on International Trade in Endangered Species*. 2011. Disponível em <<http://www.cites.org/esp/app/Appendices-S.pdf>>. Acesso em 16 de dezembro de 2010.
- CLERMONT, Y. 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammals, seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiological Reviews*, 52(1):198-236.
- COSTA, G.M.J.; CHIARINI-GARCIA, H.; MORATO, R.G.; ALVARENGA, R.L.L.S.; FRANÇA, L.R. 2008. Duration of spermatogenesis and daily sperm production in the jaguar. *Theriogenology*, 70:1136-1146.
- FRANÇA, L.R.; RUSSELL, L.D. The testis of domestic animals. 1998. In: REGADERA, J. & MARTINEZ-GARCIA (eds.). *Male reproduction: A multidisciplinary overview*. Churchill Livingstone, Madrid, 197-219.
- FRANÇA, L.R.; OGAWA, T.; AVARBOCK, M.R. BRINSTER, R.L. RUSSELL, L.D. 1998. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biology of Reproduction*, 59:1371-1337.
- FRANÇA L.R.; GODINHO, C.L. 2003. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). *Biology of Reproduction*, 68:1554-1561.
- GROCOCK, C.A.; CLARKE, J.R. 1976. Duration of spermatogenesis in the vole (*Microtus agrestis*) and bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Journal of Reproduction and Fertility*, 47:133-135.
- GUIÃO-LEITE, F.L.; PAULA T.A.R. 2003. Intrinsic yield of spermatogenesis, Sertoli cell index and daily sperm production in cougar (*Puma concolor*). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 27:1-21.

- GUIÃO-LEITE, F.L.; PAULA, T.A.R.; MATTA, S.L.P.; FONSECA, C.S.; DAS NEVES, M.T.; BARROS, J.B.G. 2006. Cycle and duration of the seminiferous epithelium in puma (*Puma concolor*). *Animal Reproduction Science*, 91:307-316.
- IBAMA, Instituto Brasileiro Do Meio Ambiente E Recursos Naturais Renováveis. 2006. Lista oficial de animais ameaçados de extinção. Disponível em <<http://www.ibama.gov.br/fauna-silvestre>>. Acesso em 16 de dezembro de 2010.
- LEBLOND, C.P.; CLERMONT, Y. 1952. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 55:548-584.
- MOREIRA, N. 2001. Reprodução e estresse em fêmeas de felídeos do gênero *Leopardus*. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba: CPGZOO/UFPR, 232 p.
- NEVES, E.S.; CHIARINI-GARCIA, H.; FRANÇA, L.R. 2002. Comparative testis morphometry and seminiferous epithelium cycle length in donkeys and mules. *Biology of Reproduction*, 94:238-248.
- OLIVEIRA, T.G.; CASSARO, K. 2005. *Guia de campo dos felinos do Brasil*. São Paulo: Instituto Pró-Carnívoros, sociedade de Zoológicos do Brasil, Fundação Parque Zoológico de São Paulo e Pró-Vida Brasil. 80p.
- ODD, J.L.; DE ROOIJ, D. G. 1977. Spermatogenesis in Chinese hamster. *Anatomical Record*, 187:113-124.
- PARREIRA, G.G.; OGAWA, T.; AVARBOCK, M.R.; FRANÇA, L.R.; BRINSTER, R.L.; RUSSELL, L.D. 1998. Development of germ cell transplants in mice. *Biology of Reproduction*, 59:1360-1370.
- PAULA, T.A.R. Avaliação histológica e funcional do testículo de capivaras adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*). 1999. Tese (Doutorado em Morfologia). Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 84p.
- PEIXOTO, J.V. 2010. Criopreservação de sêmen e avaliação histológica e funcional do testículo de periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus* SHAW, 1805). Tese de Doutorado. Departamento de Veterinária, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 78p.
- QUEIROZ, G.F.; NOGUEIRA, J.C. 1992. Duration of the cycle of the epithelium and quantitative histology of the testis of the south american white belly opossum (*Didelphis albiventris*), Marsupialia. *Journal of Reproduction and Fertility*, 4:213-222.
- RUSSELL, L.D.; ETTLIN, R.A.; SINHA-HIKIM, A.P.; CLEGG, E.D. 1990. Histological and histopathological evaluation of the testis. *Cache River Press*, Clearwater, Flórida.
- VASCONCELOS, G.S.C. 2011. Ciclo do epitélio seminífero de quati (*Nasua nasua* Linnaeus, 1766). Dissertação - Departamento de Veterinária, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 59p.

Artigo 02

Rendimento intrínseco do processo espermatogênico e a produção espermática diária de *Leopardus pardalis*, Linnaeus, 1758

Resumo: Embora o tamanho testicular apresente um relacionamento direto com a produção espermática, o rendimento intrínseco da espermatogênese e os índices de capacidade suporte das células de Sertoli são, efetivamente, os melhores indicadores da capacidade de produção espermática. O diâmetro da secção transversal de túbulos seminíferos na jaguatirica foi de 211,37µm e a quantificação métrica dos túbulos seminíferos foi em torno de 301,02 metros de túbulos seminíferos em ambos os testículos perfazendo em média 17,81 metros por grama de testículo. Os rendimentos intrínsecos obtidos a partir da contagem em secções transversais mostraram que o coeficiente de mitoses espermatogoniais foi de 16,85 espermatócitos primários. Já o rendimento meiótico foi de 3,14 espermátides, sendo aproximadamente 57 destas liberadas a partir de uma espermatogônia, caracterizando o rendimento geral da espermatogênese. A capacidade suporte de células de Sertoli é de 14,38 células germinativas, sendo 8,76 destas espermátides arredondadas. A reserva espermática testicular total de cerca de seis bilhões de espermátides, assim, aproximadamente 356 milhões de espermátides são produzidas a cada ciclo do epitélio seminífero por grama de testículo. Através da quantificação da reserva espermática testicular aliada à duração do ciclo do epitélio seminífero é possível identificar a produção espermática diária, ou seja a quantificação de espermatozoides produzidos por dia no testículo. A jaguatirica apresenta alta eficiência reprodutiva produzindo cerca de 32 milhões de espermatozoides por grama de testículo.

Palavras-chave: rendimentos da espermatogênese, reserva espermática, perda celular, eficiência reprodutiva.

Abstract: Although testicular size presents a direct relationship with sperm production, the intrinsic efficiency of spermatogenesis and the indices of carrying capacity of Sertoli cells are indeed the best indicators of the ability of sperm production. The diameter of the cross section of seminiferous tubules in the ocelot was 211.37 μm and metric quantification of the seminiferous tubules was around 301.02 meters of seminiferous tubules in both testes making an average of 17.81 meters per gram of testis. The yield obtained from the intrinsic counts in cross sections showed that the ratio of spermatogonial mitoses was 16.85 primary spermatocytes. The meiotic yield was 3.14 spermatids, being that approximately 57 of these were released from a spermatogonium, characterizing the overall yield of spermatogenesis. The carrying capacity of Sertoli cells is 14.38 germ cells, these being 8.76 round spermatids. The testicular sperm reserves is about six billion spermatids, so approximately 356 million spermatids per gram of testis are produced every cycle of the seminiferous epithelium. Through the quantification of testicular sperm reserves combined with the cycle length of the seminiferous epithelium it is possible to identify the daily sperm production, ie the quantification of sperm produced per day in the testis. The ocelot presents a high reproductive efficiency producing about 32 million sperm per gram of testis.

Keywords: spermatogenesis yield, sperm reserves, cell loss, reproductive efficiency.

1. Introdução

A família Felidae é um dos grupos com maior diversidade de carnívoros e inclui espécies que variam muito em tamanho. Esta família compreende um grupo de espécies que vivem em uma ampla e natural distribuição geográfica por quase todos os biótopos do planeta, com exceção da Austrália e da Antártica (Nowell & Jackson, 1996). Apesar da sua larga distribuição, a abundância de muitas espécies vem diminuindo e praticamente todas estão ameaçadas de extinção (Oliveira, 1994).

A jaguatirica (*Leopardus pardalis*) é um animal de médio porte e está atualmente incluído no apêndice I da Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção (CITES, 2010), e na lista oficial de espécies ameaçadas de extinção do Instituto Brasileiro de Recursos Naturais Renováveis e do Meio Ambiente (Ibama, 2006).

Dentre as causas para a ameaça de extinção da jaguatirica encontra-se a endogamia entre indivíduos de populações de vida livre. Essa é causada pela forte fragmentação ambiental, que restringe a distribuição destes animais no seu ecossistema, levando-os a baixa eficiência reprodutiva (Wildt et al., 1987). Para isso a manutenção a longo prazo de populações geneticamente viáveis de pequenos felinos dependerá de programas que incluem técnicas de reprodução assistida como alternativa de troca de material genético entre populações cativas e de vida livre (Swanson & Wildt, 1997; Guimarães, 2001).

Uma importante contribuição para a conservação de espécies ameaçadas é o conhecimento de sua biologia reprodutiva, principalmente em seus aspectos básicos (Guião-Leite et al., 2006). Assim, a quantificação histológica do parênquima testicular torna-se um requisito básico para estudos que envolvam parâmetros reprodutivos masculinos (Roosen-Runge & Giesel Jr., 1950; Courot et al., 1970; Ortavant et al., 1977; Guerra, 1983; Paula et al., 2002; Bittencourt, 2003). O túbulo seminífero é geralmente o componente mais abundante do testículo na maioria dos mamíferos estudados, sendo que os parâmetros quantitativos relacionados ao túbulo seminífero, como diâmetro tubular e comprimento total e por grama de testículo, apresentam uma relação positiva com a atividade espermatogênica, se tornando um indicador da atividade espermática em investigações envolvendo a função testicular (França & Russel, 1998; Paula, 1999).

O objetivo desse estudo foi quantificar o rendimento intrínseco do processo espermatogênico, a reserva espermática testicular e juntamente com a duração do ciclo do epitélio seminífero calcular a produção espermática diária por grama de testículo, através da avaliação histológica de fragmentos obtidos por biópsia testicular de jaguatiricas adultas mantidas em cativeiro.

2. Material e Métodos

2.1- Animais

Foram utilizadas nesse experimento cinco jaguatiricas machos adultas, sendo três provenientes do Centro de Triagem de Animais Silvestres da Universidade Federal de Viçosa e duas da Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte, ambas em Minas Gerais. Este estudo foi aprovado pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), sob o número 02015003377/04-19, pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBio – 27.819) e pelo Comissão de Ética para o uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa (processos número, 35/2005 e 37/2011).

Para a contenção química e manutenção anestésica foram utilizados dardos anestésicos propelidos por arma pneumática contendo cloridrato de quetamina (10 mg/kg/IM) e cloridrato de xilazina (1 mg/kg/IM). Os animais foram pesados e ambos os testículos mensurados quanto à largura, espessura e comprimento, através de um paquímetro. Através da fórmula do volume do elipsoide: $\frac{4}{3}\pi ABC$, onde A= metade da largura, B= metade da espessura e C= metade do comprimento foi calculado o volume testicular em cada animal (Guião-Leite & Paula, 2003; Mascarenhas et al., 2005). A partir de técnica convencional para biópsia testicular (Mascarenhas et al., 2005) foram obtidos fragmentos com o auxílio de um bisturi circular de 6 mm. Esses fragmentos foram imersos imediatamente em solução fixadora de Karnovsky por 24 horas e em seguida, foram mantidos em álcool 70% até o momento do processamento histológico. Todos os animais foram medicados com agentes antiinflamatórios (Flunixin Meglumine, 1,1mg/kg IM) e antibioticoterapia profilática (Penicilina Benzatina, 20.000 UI/kg) em dose única.

O material coletado foi processado seguindo os métodos de rotina para inclusão em glicolmetacrilato (Historesin[®] - Leica) e parafina, visando respectivamente o estudo

histológico e imunohistoquímico. Para a inclusão em resina o fragmento foi submetido à desidratação em concentrações crescentes de etanol (80, 90 e 100%) permanecendo meia hora em cada meio, com posterior infiltração na resina em dois banhos distintos e incluídos, na mesma resina, com a adição de catalisador. Os cortes histológicos foram feitos de modo sequencial, utilizando-se um micrótomo rotativo (Leica RM2155, Leica Microsystems, Nussloch, Heidelberg, Germany), dotado de navalha de vidro, com 3 µm de espessura sendo corados com solução de azul de toluidina/borato de sódio 1% por um minuto. Para inclusão em parafina o fragmento foi submetido à desidratação em série crescente de etanol (70, 80, 90% e absoluto) e à diafanização em xilol, fazendo-se três passagens consecutivas de meia hora cada, até sua inclusão. O bloco contendo o fragmento testicular foi seccionado em micrótomo rotativo, com navalha de aço, obtendo-se cortes semi-sequenciais de 4µm de espessura.

2.2- Estádios do ciclo do epitélio seminífero e Imunohistoquímica

Os estádios do ciclo do epitélio seminífero foram caracterizados com base no método da morfologia tubular, que se baseia na forma e na localização dos núcleos das espermatídes e na presença de figuras de divisões meióticas (Berndtson, 1977). A frequência relativa dos estádios do ciclo do epitélio seminífero foi feita com base na contagem dos oito estádios pelo método da morfologia tubular em 100 secções transversais de túbulos seminíferos em cada animal, em microscópio de luz, com aumento de 200 X. Para registro e ilustração foram obtidas imagens digitais capturadas em fotomicroscópio de luz (Olympus CX31), equipado com câmera digital Olympus SC20.

Para a determinação da duração do ciclo do epitélio seminífero foi utilizado fragmento de testículo submetido 16 dias previamente a uma aplicação de 0,1ml de 5-bromodeoxiuridina (BrdU; Laboratórios Zymed, Carlsbad, CA, EUA). Os cortes histológicos realizados a pós a biópsia do fragemento foram submetidos à detecção do BrdU por anticorpo monoclonal e reveladas pelo sistema de imuncoloração *streptavidin-biotin*, através do kit de coloração BrdU (Zymed® - Invitrogen, Camarillo, CA, EUA). Para o cálculo da duração do ciclo do epitélio seminífero foi observado o estágio mais avançado do ciclo a apresentar células imunomarcadas. A partir da frequência relativa dos estádios percorridos nesses 16 dias foi calculado a duração de um ciclo do epitélio seminífero.

2.3- Análise histométrica dos testículos

O cálculo do volume do parênquima testicular foi precedido pelo cálculo da espessura da albugínea testicular. Para tal foi mensurado a espessura média da albugínea testicular em 10 secções transversais em cada animal, através de uma ocular micrométrica, em aumento de 40 X ao microscópio de luz. A espessura média da albugínea foi então descontada daqueles valores mensurados para o cálculo do volume testicular.

Com o auxílio de uma ocular integradora dotada de 100 pontos em aumento de 640 vezes, foi avaliada a proporção volumétrica do túbulo seminífero e do espaço intertubular do parênquima testicular, através da contagem destes elementos teciduais correspondentes aos pontos em dez campos, aleatoriamente distribuídos para cada animal. Inferindo-se estas proporções foram obtidos os volumes totais de cada componente testicular em todos os animais. O diâmetro médio dos túbulos seminíferos foi obtido pela média das mensurações de 20 secções transversais de túbulos seminíferos, o mais circular possível, em cada animal, utilizando-se ocular micrométrica.

Devido ao formato cilíndrico do túbulo seminífero, o cálculo do seu comprimento foi baseado na fórmula: comprimento = volume/área da base. O volume foi calculado previamente através da proporção volumétrica do túbulo seminífero no volume do parênquima testicular e a área da base corresponde à área da secção transversal do túbulo seminífero (πr^2).

2.4- Contagem celular e Rendimentos intrínsecos do processo espermatogênico

As populações de células germinativas foram estimadas em cada animal a partir da contagem em 10 secções transversais de túbulos seminíferos no estágio I do ciclo do epitélio seminífero, segundo o método da morfologia tubular. Os seguintes tipos celulares foram considerados: espermatogônias do tipo A (SPTGA), espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno (PL), espermatócitos primários em paquíteno (P), espermátides arredondadas (Ar) e células de Sertoli (S). A contagem obtida para cada tipo celular foi corrigida para o diâmetro nuclear médio e a espessura do corte, utilizando-se a fórmula de Abercrombie (1946) modificada por Amann (1962). Pelo fato das células de Sertoli apresentarem núcleo irregular, a correção do número das mesmas

foi feita a partir do diâmetro nucleolar médio. Neste caso, somente núcleos com nucléolos evidentes foram contados. A seguinte fórmula foi utilizada para obtenção do número corrigido:

$$\text{Número corrigido} = \text{contagem obtida} \times \frac{\text{Espessura do corte}}{\text{Espessura do corte} + \sqrt{\left(\frac{\text{DM}}{2}\right)^2 - \left(\frac{\text{DM}}{4}\right)^2}}$$

O diâmetro nuclear médio (DM) foi obtido pela média das mensurações de 10 núcleos dos tipos celulares estudados no estágio I do ciclo do epitélio seminífero para cada animal. Estas medidas nucleares foram feitas utilizando-se uma régua micrométrica acoplada à ocular 10x em microscópio de luz e com objetiva de 100 x.

A partir das populações corrigidas, foram calculados o coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais (PL/SPTGA), o rendimento meiótico (Ar/P), o rendimento geral da espermatogênese (Ar/SPTGA), o índice de células de Sertoli [(SPTGA+PL+P+Ar)/S] e o índice de célula de Sertoli por espermátide arredondada (Ar/S).

Através do número médio corrigido de espermátides arredondadas em secções transversais de túbulos seminíferos obteve-se a população total desta célula a partir da correção para o comprimento total do túbulo seminífero por testículo ou por grama de testículo. Desta forma, obteve-se a reserva espermática testicular produzida a cada ciclo do epitélio seminífero.

A produção espermática diária (PED) por grama de testículo foi calculada através da divisão da reserva espermática pela duração de um ciclo do epitélio seminífero.

2.5- Estatística

Todos os dados foram analisados quanto a média, desvio padrão e o coeficiente de variação segundo a função estatística do programa Excel/ Windows7.

3. Resultados e Discussão

3.1- *Análise histométrica dos testículos*

Para os cálculos quantitativos de produção espermática, torna-se necessário a compartimentalização do testículo em seus diferentes componentes funcionais e estruturais. Convencionalmente utiliza-se o termo parênquima testicular com referência ao peso do testículo desprovido de albugínea e mediastino testiculares, embora esta nomenclatura não seja totalmente adequada para a referência, é um termo amplamente utilizado na literatura (Berndtson, 1977; Jonhson et al., 1981; Russell et al., 1990; Jonhson et al., 2000; Bittencourt et al., 2007). No presente experimento, foi desconsiderado o volume ocupado pelo mediastino testicular, visto a impossibilidade de eliminar o estroma.

A espessura média da albugínea testicular de jaguatirica foi de 1066,25 μm , o que representa cerca de 23,42% da massa testicular. Consequentemente o parênquima testicular ocupa 76,58% do testículo, perfazendo em ambos os testículos um volume de 13,12 ml.

O parênquima testicular é dividido em dois compartimentos: o tubular e o intertubular.

No compartimento intertubular encontra-se a porção endócrina do testículo, representada pelas células de Leydig, associada às células e fibras conjuntivas, leucócitos, vasos sanguíneos e linfáticos (Fawcett et al., 1973). Sarti et al. (2011) descreveram que o compartimento intertubular de jaguatirica apresenta padrão do tipo II sendo o tecido conjuntivo o componente mais abundante do tecido intertubular. O compartimento corresponde a 19,4% do parênquima testicular, sendo 3,9% ocupado por células de Leydig.

Já o compartimento tubular é o principal componente do testículo na grande maioria dos mamíferos, exercendo grande influência sobre o peso testicular e sobre a produção espermática (Amann, 1970; França & Russell, 1998; Paula, 1999). Com exceção dos baixos valores descritos na marmota e na capivara (Russell et al., 1990; Paula, 1999), a maioria dos animais investigados apresenta entre 70 e 90% de túbulo seminífero no parênquima testicular (Fawcett et al., 1973; Russell et al., 1990; Guião Leite & Paula, 2003; Barros et al., 2004; Azevedo et al., 2006; Bittencourt et al., 2007; Balarini et al., 2011). O parênquima testicular de jaguatiricas apresenta 80,58% de sua

massa alocada em túbulos seminíferos e 19,39% em tecido intertubular, perfazendo um volume total de 10,53 e 2,58ml respectivamente.

O diâmetro da secção transversal de túbulos seminíferos na jaguatirica foi de 211,37 μ m (Tabela 1), valor menor do que o observado para os demais felinos estudados, cujos valores variam entre 228 à 257 μ m (Godinho, 1999; Guião-Leite & Paula, 2003; Azevedo, 2004; Barros, 2005; Balarini, 2008). Em relação à quantificação métrica dos túbulos seminíferos, a jaguatirica adulta apresentou em torno de 301,02 metros de túbulos seminíferos em ambos os testículos perfazendo em média 17,81 metros por grama de testículo (tabela 1).

Tabela 1- Diâmetro, comprimento total e por grama de testículo de túbulo seminífero em jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) adultas mantidas em cativeiro.

Parâmetros	Média $\pm$ desvio padrão	Coefficiente de variação
Diâmetro do túbulo seminífero (μ m)	211,37 $\pm$ 13,86	6,56
Comprimento total de túbulos seminíferos (m)	301,02 $\pm$ 26,9	8,94
Comprimento de túbulos seminíferos por grama de testículo (m/g)	17,81 $\pm$ 2,87	16,13

3.2- Estádios do ciclo do epitélio seminífero e Imunohistoquímica

Em jaguatiricas adultas, as células germinativas estão arranjadas de forma organizada numa série bem definida de associações celulares, ou estádios, ao longo do tempo. O sistema empregado para classificação desses estádios foi baseado no método da morfologia tubular. Os estádios refletem a combinação de distintas gerações de células germinativas, em diferentes etapas do processo espermatogênico, ao longo do epitélio seminífero (Berndtson, 1977). No total foram caracterizados e classificados oito estádios sendo encontrado um estágio por secção transversal no túbulo seminífero da jaguatirica (Castro, 2012), o que corrobora os dados presentes na literatura para as espécies de felinos estudados (França & Godinho, 2003; Guião-Leite et al., 2006; Costa et al., 2008; Balarini et al., 2011). A frequência de cada estágio do ciclo do epitélio seminífero da jaguatirica é mostrada na tabela 2. O estágio I foi o mais frequente (26,5%) enquanto o estágio VII apresentou menor frequência (6%).

A 5-bromodeoxiuridina aplicada no testículo do animal é incorporada pelo núcleo das células que estão sintetizando DNA no momento da injeção, especificamente as espermatogônias e os espermatócitos primários em pré-leptóteno no estágio I do CES.

Assim, ao coletar os fragmentos testiculares em um período de tempo conhecido após a injeção de BrdU, e identificar as células imunomarcadas mais avançadas no epitélio seminífero destes animais, é possível estimar o percentual do ciclo percorrido, bem como calcular a sua duração (Peixoto, 2010). Após 16 dias de aplicação, foi observada a imunomarcagem em células na transição paquíteno/diplóteno no início do estágio III, ou seja, no segundo ciclo do epitélio seminífero, após a aplicação (Fig.1). Neste intervalo cerca de 141,5% de ciclos foram percorridos, assim, um ciclo do epitélio seminífero (CES) necessita de 11,30 dias para ocorrer. Como são necessários 4,5 ciclos para que o processo espermatogênico se complete, são necessários então 50,85 dias para o desenvolvimento do espermatozoide a partir de uma espermatogônia em jaguatirica.

Tabela 2- Frequência relativa e duração de cada estágio e das fases do ciclo do epitélio seminífero de jaguatirica (*Leopardus pardalis*).

Estádios	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Frequência (%)	26,5	15	15	11	6,5	8	6	12
Duração (dias)	3,0	1,7	1,7	1,2	0,7	1,0	0,65	1,35
Fases	Pré-meiótica		Meiótica		Pós-meiótica			
Frequência (%)	56,5		11		32,5			

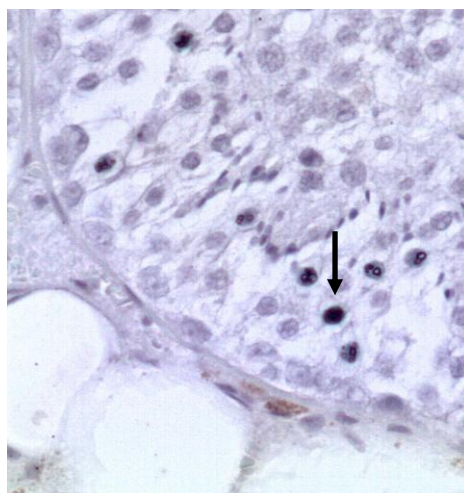


Fig.1- Estádio III do ciclo do epitélio seminífero de jaguatirica (*Leopardus pardalis*), após 16 dias da aplicação de BrdU, demonstrando imunomarcagem (seta) em espermatócitos primários em transição paquíteno/diplóteno. *Streptavidim biotin*. 200 X.

3.3- Contagem celular e Rendimentos intrínsecos do processo espermatogênico

Para o estudo da população celular, foram contabilizadas as populações epiteliais presentes em cortes transversais do túbulo seminífero no estágio I do CES. Esse estágio foi caracterizado pela ausência de espermátides alongadas e pela presença de uma geração de espermátides com núcleos arredondados e escuros, os quais em geral formavam três a quatro camadas próximo ao lume do epitélio seminífero. Próximo à membrana basal, é possível observar o núcleo da célula de Sertoli, espermatogônias do tipo A e espermatócitos primários em transição de pré-leptóteno para leptóteno. Já os espermatócitos em paquíteno estavam na região intermediária do epitélio, ou seja, entre as espermátides arredondadas e espermatócitos em pré-leptóteno/leptóteno. Na tabela 3 estão apresentados os valores populacionais destas células.

As relações populacionais indicativas do rendimento intrínseco da espermatogênese obtidas a partir da contagem em secções transversais mostraram que 16,85 espermatócitos primários são produzidos por espermatogônias no início do processo espermatogênico, denominado coeficiente de mitoses espermatogoniais. Cerca de 3,14 espermátides são produzidas durante a fase meiótica, rendimento meiótico, sendo aproximadamente 57 destas liberadas a partir de uma espermatogônia, caracterizando o rendimento geral da espermatogênese. A capacidade suporte de células de Sertoli é de 14,38 células germinativas, sendo 8,76 destas espermátides arredondadas. A reserva espermática testicular total de cerca de seis bilhões de espermátides, assim, aproximadamente 356 milhões de espermátides são produzidas a cada ciclo do epitélio seminífero por grama de testículo (tabela 3).

Em todos os mamíferos investigados somente 15 a 50% dos espermatozoides esperados são realmente produzidos (Huckins, 1978; Castro et al., 1997; França & Russell, 1998; Swerdloff et al., 1998). Isto, provavelmente, é decorrente de degeneração densidade-dependente, onde a apoptose é o mecanismo homeostático utilizado para limitar as células germinativas a um número que possa ser suportado pelas células de Sertoli disponíveis (Huckins, 1978; De Rooij & Jansen, 1987; De Rooij & Lok, 1987; Sharpe, 1994; De Rooij, 1998; Santos, 1999). Embora o valor encontrado de espermatócitos primários produzidos pela espermatogônia A esteja dentro da amplitude observada para a maioria dos animais domésticos (14,6 a 24,8; França & Russell, 1998), o coeficiente de eficiência das mitoses espermatogoniais é bem superior aos observados

nos felinos estudados como o gato doméstico (8,4; Godinho, 1999), onça parda (7,7; Guião-Leite & Paula, 2003), onça pintada (9,2; Azevedo, 2004) e o leão africano (10,3; Barros 2005).

Durante a fase meiótica do processo espermatogênico da jaguatirica, apenas 3,14 espermátides foram produzidas em média, o que significa perda de 21,5% nesta fase. Nos mamíferos, esta perda é aproximadamente de 25%, ou seja, de cada quatro espermátides arredondadas teoricamente esperadas, três são formadas (França & Russell, 1998). O gato do mato pequeno foi a espécie que menos apresentou perda (12%; Balarini, 2008) enquanto a jaguatirica aproximou-se do rendimento meiótico observado para a onça pintada (perda de 20%; Azevedo, 2004), sendo, porém, mais eficiente que leões africanos (perda de 33%; Barros, 2005), gato doméstico (perda de 30%; Godinho, 1999) e onça parda (perda de 25%; Guião-Leite & Paula, 2003).

O rendimento geral da espermatogênese é uma mensuração da eficiência do processo espermatogênico como um todo, e é calculado a partir da população de espermátides arredondadas por secção transversal do túbulo seminífero. Sua confiabilidade como índice de avaliação da produção de espermatozoides, é embasada no fato de que as perdas durante o processo espermiogênico são consideradas pequenas e não significativas (Amann, 1970; Berndtson, 1977). Na jaguatirica são observadas aproximadamente 57 espermátides por secção transversal do túbulo seminífero durante o processo espermatogênico, ou seja, 57 espermatozoides são produzidos a cada ciclo do epitélio seminífero a partir de uma espermatogônia do tipo A. Este valor está dentro do encontrado para a maioria dos animais domésticos (37,4 a 74,2; França & Russell, 1998), abaixo do encontrado para gato do mato pequeno, (88,86; Balarini, 2008) e acima do rendimento observado nos demais felinos como, o leão africano (22,1; Barros, 2005), onça parda (22,7; Guião-Leite & Paula, 2003), onça pintada (23,4; Azevedo, 2004) e o gato doméstico (16,3; Godinho, 1999).

A reserva espermática testicular quantifica o número potencial de espermatozoides em produção no testículo ou por grama de testículo, a cada ciclo do epitélio seminífero de uma dada espécie (Amann & Lambiase, 1969; Berndtson, 1977). Para o cálculo da reserva espermática testicular utiliza-se a população de espermátides arredondadas no estágio I do CES, considerando-se que as perdas durante o processo espermiogênico sejam pequenas e não significantes (Amann, 1970; Berndtson, 1977; Russell & Peterson, 1984; Johnson et al., 2000).

O valor médio observado para a reserva espermática por grama de testículo em jaguatiricas adultas foi de 356×10^6 , valor acima do observado para a maioria dos animais domésticos (120 a 260×10^6 ; França e Russell, 1998) e demais felinos estudados como o leão africano ($103,6 \times 10^6$; Barros, 2005), onça parda ($268,0 \times 10^6$; Guião-Leite & Paula, 2003), onça pintada ($165,9 \times 10^6$; Azevedo, 2004) e gato doméstico (157×10^6 ; Godinho 1999), colocando assim a jaguatirica como um dos animais que apresenta uma das maiores reservas espermáticas por grama de testículo dentre os felinos. Embora comparações quanto à reserva por grama de testículo sejam extremamente válidas em avaliações interespecíficas, é necessário ter em mente que este parâmetro é relativo à duração de um ciclo do epitélio seminífero, que por sua vez é uma constante biológica espécie-específica (Ortavant et al., 1977; Amann & Schambacher, 1983).

Tabela 3- População celular corrigida por secção transversal de túbulo seminífero, índices indicativos do rendimento intrínseco da espermatogênese, capacidade suporte das células de Sertoli e reserva espermática total e por grama de testículo de jaguatiricas adultas mantidas em cativeiro.

Parâmetros	Média $\pm$ desvio padrão	Coefficiente de variação (%)
Espermatogônias A	$1,06 \pm 0,2$	19,06
Células de Sertoli	$6,86 \pm 0,87$	12,70
Espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno	$17,78 \pm 2,91$	16,38
Espermatócitos primários em paquíteno	$19,22 \pm 3,39$	17,61
Espermátides arredondadas	$59,5 \pm 8,9$	15,02
Reserva espermática testicular total	$60,7 \times 10^8 \pm 5,8 \times 10^8$	9,60
Reserva espermática por grama de testículo	$356,6 \times 10^6 \pm 36,42 \times 10^6$	10,21
Coefficiente de mitoses espermatogoniais	$16,85 \pm 1,98$	11,73
Rendimento meiótico	$3,14 \pm 0,47$	14,86
Rendimento geral	$56,96 \pm 9,79$	17,18
Índice de células de Sertoli por espermátides arredondadas	$8,76 \pm 1,6$	18,35
Índice de células de Sertoli por total de células germinativas	$14,38 \pm 2,49$	18,33
Produção espermática diária total	$537,2 \times 10^6 \pm 51 \times 10^6$	9,60
Produção espermática diária por grama de testículo	$31,5 \times 10^6 \pm 3,2 \times 10^6$	10,21

Para se avaliar a produção espermática diária, vários métodos têm sido utilizados, dentre os quais podem ser citados aqueles que se baseiam na histologia quantitativa dos

testículos, na estimativa da reserva espermática testicular através da contagem hemocitométrica de células espermáticas em homogeneizados do parênquima testicular, na quantificação de espermatozoides ejaculados e na colheita de espermatozoides diretamente através de canulação do ducto deferente ou da rede testicular (Amann, 1970; Berndtson, 1977).

A eficiência espermatogênica em mamíferos é dependente principalmente da duração da espermatogênese, da densidade volumétrica (%) de túbulos seminíferos no testículo, do número de gerações de espermatogônias e da eficiência do processo espermatogênico (França e Russell, 1998). A produção espermática diária por grama de testículo é um dos parâmetros mais eficientes, que pode ser facilmente comparado entre as espécies porque elimina a disparidade no que envolve o peso testicular e a duração da espermatogênese (França & Russell, 1998). Estes parâmetros fornecem importantes dados biológicos que poderão auxiliar programas de reprodução assistida em espécies ameaçadas de extinção (Amann, 1970; Amann & Schambacher, 1983; França, 1991).

A população de espermátides arredondadas por secção transversal de 3 μm de espessura de túbulo seminífero em jaguatirica foi em média 59,5 células, e foram computados cerca de 17,81 metros de túbulo por grama de testículo. Assim um montante de $60,7 \times 10^8$ espermatozoides são produzidos em ambos os testículos perfazendo um total de $356,6 \times 10^6$ por grama de testículo de jaguatirica. Como este montante é produzido durante um ciclo do epitélio seminífero que dura cerca de 11,3 dias, cerca de $31,5 \times 10^6$ espermatozoides são produzidos por grama de testículo diariamente.

Os dados publicados na literatura permitem agrupar a produção espermática diária por grama de testículo em três patamares: espécies com alta eficiência espermatogênica e que produzem cerca de vinte a trinta milhões de espermatozoides, incluindo-se aí animais domésticos como o suíno, equino, ovino, coelho (França & Russell, 1998), o rato (Robb et al., 1978), o macaco rhesus (Amann et al., 1976) e o lobo guará (Bittencourt, et al., 2007); espécies com eficiência espermatogênica média, produzindo de dez a vinte milhões de espermatozoides, dentre as quais se encontram o bovino, búfalo e a capivara (França & Russell, 1998; Paula, 1999); e por último, espécies que produzem abaixo de dez milhões de espermatozoides como por exemplo o homem (Amann, 1981) e o gambá (*Didelphis albiventris*) (Queiroz & Nogueira, 1992). A jaguatirica, com aproximadamente trinta e dois milhões de espermatozoides, apresenta alta eficiência produtiva.

Conclui-se que em jaguatiricas o rendimento meiótico correspondeu em média a 3,14 células enquanto o rendimento geral da espermatogênese foi 57 células. Cada célula de Sertoli foi capaz de manter 14,38 células da linhagem germinativa, das quais 8,76 são espermatídes arredondadas. A reserva espermática por grama de testículo foi em média 356 milhões de espermatozoides e a produção espermática é de alta eficiência reprodutiva. Assim, a descrição da histologia testicular de jaguatirica ajuda a entender o processo espermatogênico e a estabelecer parâmetros que podem auxiliar a reprodução dessa espécie contribuindo de forma efetiva para a sua preservação.

Referências bibliográficas

- ABERCROMBIE, M. 1946. Estimation of nuclear populations from microtome sections. *Anatomical Records*, 94: 238-248.
- AMANN, R.P.; SCHANBACHER, B.D. 1983. Physiology of male reproduction. *Journal Animal Science*, 57(2):380-403.
- AMANN, R.P.; LAMBIASE, J.T. 1969. The male rabbit III. Determination of daily sperm production hy means of testicular homogenates. *Journal of Animal Science*, 28:369-374.
- AMANN, R.P. 1970. Sperm production rates. In: JOHNSON, A.D.; GOMES, W.R.; VANDEMARK, N.L. (ed). *The testis*. New York: Academic Press. v. 1, Cap. 7. 433-482.
- AMANN, R.P.; JOHNSON, L.; THOMPSON D.L. Jr; PICKETT, B.W. 1976. Daily spermatozoa production, epididymal spermatozoa reserves and transit time of spermatozoa through the epididymis of the rhesus monkey. *Biology of Reproduction*, 15(5): 586-592.
- AMANN, R.P. 1981. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. *Journal of Andrology*, 2: 37-58.
- AZEVEDO, M.H.F. 2004. Análise morfofuncional do testículo da onça pintada (*Panthera onca*) adulta. Dissertação - Departamento de Veterinária, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 73p.
- AZEVEDO, M.H.F.; PAULA, T.A.R.; MATTA, S.L.P.; FONSECA, C.C.; NEVES, M.T.D. 2006. Morfometria testicular e o túbulo seminífero da onça pintada (*Panthera onca*). *Revista Ceres*, 53(307): 374-381.
- BALARINI, M.K. 2008. Avaliação morfofuncional do testículo e do processo espermatogênico do gato-do-mato pequeno (*Leopardus tigrinus*, Schreber, 1775) adulto. Dissertação (Livre Docência) - Departamento de Veterinária, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 60p.
- BALARINI, M.K.; PAULA, T.A.R.; MATTA, S.L.P.; PEIXOTO, J.V.; GUIÃO-LEITE, F.L.; ROSSI JR, J.L.; CZERMAK JR, A.C.; WALKER, N.J. 2011. Stages and duration of the cycle of the seminiferous epithelium in oncilla (*Leopardus tigrinus*, SCHREBER, 1775). *Theriogenology* (In press).
- BARROS, J.B.G.; PAULA, T.A.R.; AZEVEDO. M.H.F.; GUIÃO LEITE, F.L.; ROSSI Jr, J.L.; MATTA, S.L.P.; OLIVEIRA, P.C. 2004. Population of the seminiferous epithelium, intrinsic yield of spermatogenesis and Sertoli cells index in adult lions (*Panthera leo*) raseid in captivity. *5th International Symposium on Canine and Feline Reproduction*, Rio de Janeiro, RJ, p.166-168.
- BARROS, J.B.G. 2005. Análise morfofuncional do testículo e da espermatogênese de leões africanos (*Panthera leo*, Linnaeus, 1758) adultos. Dissertação (Livre Docência) - Departamento de Veterinária, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 77p.
- BERNDTSON, W.E. 1977. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *Journal of Animal Science*, 44(5):818-83.
- BITTENCOURT, V.L. 2003. Avaliação morfofuncional do testículo e do processo espermatogênico do lobo guará (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1811) adulto. Dissertação (Livre Docência) - Departamento de Veterinária, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 65p.
- BITTENCOURT, V.L.; PAULA, T.A.R.; MATTA, S.L.P.; FONSECA, C.C.; COSTA, D.S.; BENJAMIN, L.A.; COSTA, E.P. 2007. The seminiferous epithelium cycle and

- daily spermatatic production in the adult maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1811). *Micron* (In Press), 38(6):584-589.
- CASTRO, A.C.S.; BERNDTSON, W.E.; CARDOSO, F.M. 1997. Cinética e quantificação da espermatogênese: bases morfológicas e suas aplicações em estudos da reprodução de mamíferos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 21(1): 25-34.
- CASTRO, M.M. 2012. Descrição e duração do ciclo do epitélio seminífero de jaguatirica (*Leopardus pardalis*). In: Duração do ciclo do epitélio seminífero e produção espermática de *Leopardus pardalis* (Linnaeus, 1758), Dissertação - Departamento de Veterinária, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.
- CITES, *Convention on International Trade in Endangered Species*. 2011. Disponível em< <http://www.cites.org/esp/app/Appendices-S.pdf>>. Acesso em 16 de dezembro de 2010.
- COSTA, G.M.J.; CHIARINI-GARCIA, H.; MORATO, R.G.; ALVARENGA, R.L.L.S.; FRANÇA, L.R. 2008. Duration of spermatogenesis and daily sperm production in the jaguar. *Theriogenology*, 70:1136-1146.
- COUROT, M.; HOCHEREAU-DE-REVIERS, M.T.; ORTAVANT, R. 1970. Spermatogenesis. IN: JOHNSON, A.D.; GOMES, W.R.; VANDEMARK, N.L. (ed). *The testis*. New York: Academic Press. v.1, cap. 6:339-432.
- DE ROOIJ, D.G.; JANSSEN, J.M. 1987. Regulation of the density spermatogonia in the seminiferous epithelium of the chinese hamster: I. Undifferentiated spermatogonia. *The Anatomical Record*, 217(2):124-130.
- DE ROOIJ, D.G.; LOK, D. 1987. Regulation of the density of spermatogonia in the seminiferous epithelium of the chinese hamster: II. Differentiating spermatogonia. *The Anatomical Record*, 217(2):131-136.
- DE ROOIJ, D.G. 1998. Stem cells in the testis. *International Journal of Experimental Pathology*, 79: 67-80.
- FAWCETT, D.W.; NEAVES, W.B. FLORES, M.N. 1973. Comparative observations on intertubular lymphatic and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biology of Reproduction*, 9:500-532.
- FRANÇA, L.R. 1991. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 185p.
- FRANÇA, L.R.; RUSSELL, L.D. 1998. The testis of domestic animals. In: Regadera, J. & Martinez-Garcia (eds.). *Male reproduction: A multidisciplinary overview*. Churchill Livingstone, Madrid, 197-219.
- FRANÇA L.R.; GODINHO, C.L. 2003. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle lenght, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). *Biology of Reproduction*, 68: 1554-1561.
- GODINHO, C.L. 1999. Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*) sexualmente maduros. Tese (Mestrado) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 123p.
- GUERRA, M.O. 1983. Comparação entre dois métodos de determinação da frequência relativa dos estádios do ciclo do epitélio seminífero, em dados da literatura. *Revista Brasileira de Biologia*, 43(4):385-394.
- GUIÃO-LEITE, F.L.; PAULA T.A.R. 2003. Intrisec yield of spermatogenesis, Sertoli cell index and daily sperm production in cougar (*Puma concolor*). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 27, 1-21.

- GUIÃO-LEITE, F.L.; PAULA, T.A.R.; MATTA, S.L.P.; FONSECA, C.S.; DAS NEVES, M.T.; BARROS, J.B.G. 2006. Cycle and duration of the seminiferous epithelium in puma (*Puma concolor*). *Animal Reproduction Science*, 91:307-316.
- GUIMARÃES, M.A.B.V. 2001. A aplicação de técnicas de reprodução assistida em animais silvestres mantidos em cativeiro. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 25(2): 116-117.
- HUCKINS, C. 1978. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. *The Anatomical Record*, 190(4):905-26.
- IBAMA, Instituto Brasileiro Do Meio Ambiente E Recursos Naturais Renováveis. 2006. Lista oficial de animais ameaçados de extinção. Disponível em <<http://www.ibama.gov.br/fauna-silvestre>>. Acesso em 16 de dezembro de 2010.
- JOHNSON, L.; PETTY, C.S.; NEVES, W.B. 1981. A new approach the qualification of spermatogenesis and its application to germinal cell attrition during human spermatogenesis. *Biology of Reproduction*, 25:217-226.
- JOHNSON, L.; VARNER, D.D.; ROBERTS, M.E.; SMITH, T.L. KEILLOR, G.E. SCRUTCHFIELD, W.L. 2000. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. *Animal Reproduction Science*, 60: 180-471.
- MASCARENHAS, R.M.; PAULA, T.A.R.; CARRETTA JÚNIOR, M.; RIBEIRO, E.C.S.; BORBOLETA, L.R.; MATTA, S.L.P. 2005. Efeitos da biópsia incisional testicular sobre o rendimento intrínseco da espermatogênese e índice de células de Sertoli em cães. *Revista Ceres*, (In Press).
- NOWELL, K.; JACKSON, P. 1996. *Wild cats: Status Survey and Conservation Action Plan*. Gland, Switzerland, IUCN / SSC Cat Specialist Group, 382p.
- OLIVEIRA, T.G. 1994. Neotropical cats: ecology and conservation, São Luís, EDUFMA. 221p.
- ORTAVANT, R.; COUROT, M.; HOCHEREAU-DE-REVIERS, M.T. 1977. Spermatogenesis in domestic mammals. In: Cole, H.H., Cupps, P.T. (eds). *Reproduction in domestic animals*. 3 ed. New York: Academic Press. Cap. 8, p.203-227.
- PAULA, T.A.R. 1999. Avaliação histológica e funcional do testículo de capivaras adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Tese (Doutorado em Morfologia). Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 84p.
- PAULA, T.A.R.; COSTA, D.S.; MATTA, S.L.P. 2002. Avaliação histológica quantitativa do testículo de capivaras adultas. *Bioscience Journal*, 18(1): 121-136.
- PEIXOTO, J.V. 2010. Criopreservação de sêmen e avaliação histológica e funcional do testículo de periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus* SHAW, 1805). Tese de Doutorado. Departamento de Veterinária, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 78p.
- QUEIROZ, G.F.; NOGUEIRA, J.C. 1992. Duration of the cycle of the epithelium and quantitative histology of the testis of the south american white belly opossum (*Didelphis albiventris*), Marsupialia. *Journal of Reproduction and Fertility*, 4: 213-222.
- ROOSEN-RUNGE, E.C.; GIESEL Jr, L.O. 1950. Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. *American Journal of Anatomy*, 87(1):1-30.
- RUSSEL, L.D.; PETERSON, R.N. 1984. Determination of the alongate spermatid-Sertoli cell ratio in various mammals. *Journal Reproduction and Fertlity*, 70:635-641.

- RUSSELL, L. D.; ETTLIN, R. A.; SINHA-HIKIM, A. P.; CLEGG, E. D. 1990. Histological and histopathological evaluation of the testis. *Cache River Press*, Clearwater, Flórida.
- SANTOS, R.L. 1999. Morte celular por apoptose no testículo. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 23(4):486-499.
- SARTI, P.; PAULA, T.A.R.; POLLI, G.O.; DECO SOUZA, T.; ARAUJO, G.R. 2011. Morfofisiologia do tecido intertubular e das células de Leydig de jaguatirica (*Leopardus pardalis*) adulta. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 63(5) 1060-1065.
- SHARPE, R.M. 1994. Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL, E. & NEIL, J.D. (eds) *The physiology of reproduction*, 2ed. Raven Press, New York, 1363-1434.
- SWANSON, W.F.; WILDT, D.E. 1997. Strategies and progress in reproductive research involving small cat species. *International Zoo Yearbook*, 35: 152-159.
- SWERDLOFF, R.S.; LUE, Y.; WANG, C. RAJAVASHISTH, T.; SINHA-HIKIN, A. 1998. Hormonal regulation of germ cell apoptosis. In: ZIRKIN, B.R. (ed). *Germ cell development, division, disruption and death*. New York, Inc. Springer- Verlag.
- WILDT, D.E.; BUSH, M.; GOODROWE, K.L.; PACKER, C.; PUSEY, A.E.; BROWN, J.L.; JOSLIN, P.; O'BRIEN, S.J. 1987. Reproductive and genetic consequences of founding isolated lion population. *Nature*, 329: 328-331.

Conclusões gerais

- 1 - Em jaguatiricas foi observado cerca de 17,81 metros de túbulo seminíferos por grama de testículo.
- 2 - O arranjo celular ao longo do ciclo do epitélio seminífero foi semelhante aos descritos para os mamíferos, sendo possível a definição de 8 estádios do ciclo do epitélio seminífero através da adaptação do método da morfologia tubular e da descrição de dez passos acrossomais de acordo com o método do sistema acrossômico.
- 3 - A frequência relativa dos oito estádios do ciclo do epitélio seminífero de jaguatirica foi: estágio I (26,5%); estágio II (15%); estágio III (15%); estágio IV (11%); estágio V (6,5%); estágio VI (8%); estágio VII (6%) e estágio VIII (12%). Os estádios pré meióticos somaram 56,5%, o meiótico 11% e os estádios pós meióticos somaram 32,5%.
- 4 - A duração do ciclo do epitélio seminífero em jaguatiricas foi de 11,30 dias e do processo espermatogênico total de 50,85 dias.
- 5- Após 16 dias de aplicação de bromodeoxiuridina no testículo de jaguatiricas foi encontrado imunomarcção em células na transição paquíteno/diplóteno no início do estágio III, ou seja no segundo ciclo do epitélio seminífero, após a incorporação.
- 6 - Nas áreas correspondentes ao estágio I do ciclo do epitélio seminífero de jaguatirica, foram observados valores corrigidos médios de 1,06 espermatogônias, 17,78 espermatócitos primários em pré-leptóteno-leptóteno, 19,22 espermatócitos primários em paquíteno, 59,5 espermátides arredondadas e 6,86 células de Sertoli.
- 7 – Os valores de reserva espermática total ($60,7 \times 10^8$), produção espermática diária ($537,2 \times 10^6$) e produção espermática diária por grama de testículo ($31,5 \times 10^6$) indicam uma alta produção espermática..
- 8 – Na jaguatirica foi observado um rendimento meiótico de 3,14 células, coeficiente de mitoses espermatogoniais de 16,85. O rendimento geral da espermatogênese foi de 56,96 espermatozoides.meiótica.