

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA**

**Estrutura e Função Testiculares em Roedores Silvestres das
Famílias Echimyidae (*Trinomys moojeni*) e Cricetidae (*Akodon cursor*,
Akodon montensis, *Necomys lasiurus* e *Oligoryzomys migripes*), da
Reserva Particular do Patrimônio Natural do Caraça - MG**

DIRCEU A. CORDEIRO JÚNIOR

BELO HORIZONTE

2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA

**Estrutura e Função Testiculares em Roedores Silvestres das
Famílias Echimyidae (*Trinomys moojeni*) e Cricetidae (*Akodon cursor*,
Akodon montensis, *Necromys lasiurus* e *Oligoryzomys migripes*), da
Reserva Particular do Patrimônio Natural do Caraça - MG**

DIRCEU A. CORDEIRO JÚNIOR

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Biologia Celular.

ORIENTADOR: LUIZ RENATO DE FRANÇA

BELO HORIZONTE

2009

Este trabalho é dedicado à minha esposa, à minha mãe,
ao meu pai, que não está mais conosco
e ao meu filho, que em breve estará.

“Quando o homem aprender a respeitar até a menor das criaturas,
ninguém precisará ensiná-lo a amar seu semelhante.”

Albert Schweitzer

AGRADECIMENTOS

Ao professor Luiz Renato de França, pela amizade, disponibilidade e pelos valiosos ensinamentos durante todo período de convivência.

À professora Sônia A. Talamoni, pela amizade e pela importante participação no desenvolvimento do estudo.

À minha esposa e melhor amiga Fernanda, pelo companheirismo, paciência e carinho.

Aos meus pais pelo exemplo e por todo incentivo.

Ao Guilherme, pela amizade e pela grande ajuda em todas as fases do trabalho.

À Gleide, pela ajuda, paciência e principalmente pela grande amizade.

Aos grandes amigos do Laboratório de Biologia Celular que tanto me ajudaram, Adriano, Amanda, Ana, Andréia, Bruno, Carolina, Caroline, Daniel, Érika, Fernando, Leonardo, Luiz Henrique, Mara, Marcelo, Nathália, Rafael, Rafael Nóbrega, Rachel, Robson, Samuel, Samyra, Sarah, Sérgio, Stela, Tânia.

Aos meus familiares: Ana Carolina, Anderson, Antônio, Augusto, Emmanuel, Fábio, Marli, Renata e Roberta por todo o apoio.

A todos os amigos do Curso de Pós-graduação.

Às secretárias do curso: Iraides Silva e Sibeles das Graças.

Aos professores do Departamento de Morfologia, pelos ensinamentos, amizade, carinho e atenção que sempre nos dedicam.

Aos Funcionários da RPPN do Caraça, por todo auxílio logístico nos trabalhos de campo.

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	1
1 -INTRODUÇÃO GERAL.....	3
1.1 A Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) do Caraça e os roedores silvestre..	3
1.2 – Testículo e espermatogênese.....	3
1.3- Células de Sertoli e de Leydig.....	6
1.4- Quantificação da espermatogênese.....	8
2 - JUSTIFICATIVA.....	10
3 - OBJETIVO GERAL.....	11
3.1 - Objetivos específicos.....	11
3.2 - Referências Bibliográficas.....	12
CAPÍTULO I: EFICIÊNCIA ESPERMATOGÊNICA DO RATO-DE-ESPINHO, <i>Trinomys moojeni</i> (RODENTIA: ECHIMYIDAE).	
ABSTRACT.....	18
RESUMO.....	19
1. INTRODUÇÃO.....	20
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
2.1. Animais.....	21
2.2. Injeção de timidina triciada.....	21
2.3. Morfometria testicular.....	22
2.4. Estádios e duração do ciclo do epitélio seminífero.....	23
2.5. Contagens celulares e número de células.....	23
3. RESULTADOS.....	24
3.1. Dados biométricos e estereologia testicular.....	24
3.2. Estádios do ciclo do epitélio seminíferos e cálculo das frequências relativas.....	25
3.3. Duração do ciclo do epitélio seminífero.....	27
3.4. Contagens celulares e morfometria das células de Leydig.....	28
4. DISCUSSÃO.....	28

5. CONCLUSÃO.....	31
6. FIGURAS.....	32
7. TABELAS	39
8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

CAPÍTULO II: ESTUDO COMPARADO DA ESTRUTURA E FUNÇÃO TESTICULARES EM ROEDORES SILVESTRES (*Akodon cursor*, *Akodon montensis*, *Necromys lasiurus* e *Oligoryzomys nigripes*) DA FAMÍLIA CRICETIDAE

RESUMO.....	45
1. INTRODUÇÃO.....	47
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
2.1. Animais.....	49
2.2. Injeções de timidina triciada.....	50
2.3. Colheita dos testículos e processamento do material.....	50
2.4. Estádios do ciclo do epitélio seminífero e duração do ciclo do epitélio seminífero.....	51
2.5. Análise morfométrica do testículo.....	52
2.5.1- Diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero.....	52
2.5.2- Proporções volumétricas (%) e volumes dos componentes do testículo.....	52
2.5.3- Comprimento total dos túbulos seminíferos.....	53
2.5.4- População de células espermatozóides e de células de Sertoli.....	53
2.5.5- Razões entre números celulares.....	54
2.5.6- Número de células de Sertoli por testículo.....	54
2.5.7- Volume individual das células de Leydig e número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo.....	55
2.5.8- Cálculo da produção espermática diária por testículo e por grama de testículo.....	55
3- RESULTADOS.....	56
3.1- Biometria.....	56
3.2- Análise morfométrica dos testículos	56
3.3- Estádios do ciclo do epitélio seminífero e suas frequências.....	57
3.4- Duração do ciclo do epitélio seminífero.....	61

3.5-	Contagens celulares e quantificação da espermatogênese.....	62
3.6-	Morfometria e população das células de Leydig	63
4.	DISCUSSÃO.....	63
5.	FIGURAS.....	70
6.	TABELAS.....	87
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

CAPÍTULO I

Figura 1 - Estádios I a XII do ciclo do epitélio seminífero em <i>T. moojeni</i> , baseado no sistema acrossômico.	34
Figura 2 - Percentual médio (\pm EPM) de cada estágio do ciclo do epitélio seminífero caracterizado de acordo com o sistema acrossômico.....	37
Figura 3 - Células germinativas marcadas mais avançadas encontradas nos dois intervalos de tempo utilizados após a injeção intraperitoneal de timidina triciada em <i>T. moojeni</i>	38
Figura 4 - Diagrama mostrando a composição de células germinativas, frequência (%) e duração (em dias) de cada estágio do ciclo do epitélio seminífero em <i>T. moojeni</i>	39
Tabela 1 – Dados biométricos e morfométricos (média \pm EPM).....	41
Tabela 2 – Média (\pm EPM) da duração (dias) do ciclo do epitélio seminífero.....	41
Tabela 3 – Contagem celular, razões celulares e produção espermática.....	42
Tabela 4 – Morfometria das células de Leydig (média \pm EPM).....	42

CAPÍTULO II

Figuras 1-4 - Estádios I a XII do ciclo do epitélio seminífero, caracterizados de acordo com o sistema acrossômico, nas quatro diferentes espécies de roedores investigadas.....	72
Figura 5 - Células germinativas mais avançadas marcadas com timidina triciada em <i>A. cursor</i>	81
Figura 6 - Células germinativas mais avançadas marcadas com timidina triciada em <i>A. montensis</i>	81
Figura 7 - Células germinativas mais avançadas marcadas com timidina triciada em <i>N. lasiurus</i>	82
Figura 8 - Células germinativas mais avançadas marcadas com timidina triciada em <i>O. nigripes</i>	82

Figuras 9-12 - Diagrama mostrando a composição de células germinativas, frequência (%) e duração (em dias) de cada estágio do ciclo do epitélio seminífero nas quatro diferentes espécies de roedores investigadas.....	83
Tabela 1 – Tabela comparada mostrando as frequências das fases pré-meiótica, meiótica e pós-meiótica dos estágios do ciclo do epitélio seminífero e as durações de cada ciclo e total da espermatogênese, em mamíferos.....	89
Tabela 2 – Dados comparativos da composição testicular, eficiência de célula de Sertoli, número de células de Sertoli por grama de testículo, duração do ciclo do epitélio seminífero (CES) e produção espermática diária (PED) por grama de testículo em mamíferos	91
Tabela 3 – Biometria e morfometria testicular nas quatro diferentes espécies de roedores investigadas.....	92
Tabela 4 – Frequências relativas dos doze estágios do ciclo do epitélio seminífero nas quatro diferentes espécies de roedores investigadas.....	93
Tabela 5 - Percentual das fases pré-meiótica, meiótica e pós-meiótica nas quatro diferentes espécies de roedores investigadas.....	93
Tabela 6 - Duração (dias) do ciclo do epitélio seminífero nas quatro diferentes espécies de roedores investigadas.....	94
Tabela 7 – Razões entre números celulares corrigidos, obtidos no estágio VIII do CES, número de células de Sertoli e produção espermática diária por testículo e por grama de testículo nas quatro diferentes espécies de roedores investigadas.....	95
Tabela 8 - Morfometria e número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo nas quatro diferentes espécies de roedores investigadas.....	95
Tabela 9 - Parâmetros comparativos relacionados à estereologia testicular e eventos espermatogênicos em roedores sexualmente maduros.	96

RESUMO GERAL

Por sua diversidade e pela facilidade de serem amostrados sistematicamente, os roedores silvestres tornaram-se modelos muito úteis para o estudo de fatores que afetam a diversidade de espécies e as interações ecológicas fundamentais para a manutenção da biodiversidade de uma determinada área. A Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) do Caraça, localizada no estado de Minas Gerais, é uma região caracterizada por zona de contato entre os biomas do Cerrado e da Mata Atlântica que estão incluídos entre os mais diversificados e ameaçados biomas do mundo. Esta região apresenta como característica marcante uma alta diversidade de mamíferos, particularmente pequenos mamíferos da ordem Rodentia, tais como *Akodon cursor*, *Akodon montensis*, *Necromys lasiurus*, *Oligoryzomys nigripes* e *Trinomys moojeni*. Apesar de serem frequentemente capturadas em trabalhos de campo realizados no Cerrado e Mata Atlântica, existem poucos estudos envolvendo a biologia reprodutiva dessas cinco espécies de roedores silvestres pertencentes à subordem Myomorpha e família Cricetidae (*A. cursor*, *A. montensis*, *N. lasiurus*, *O. nigripes*) e subordem Hystricomorpha e família Echimyidae (*T. moojeni*). Dessa forma, o presente estudo teve como principais objetivos investigar, comparativamente, importantes parâmetros biométricos e morfométricos testiculares, bem como estimar a duração do ciclo do epitélio seminífero e quantificar a espermatogênese desses roedores. Quarenta e nove animais das cinco espécies mencionadas foram utilizados conforme segue: *A. cursor* (n = 6); *A. montensis* (n = 9); *N. lasiurus* (n = 13); *O. nigripes* (n = 11); e *T. moojeni* (n = 10). Os testículos foram fixados por perfusão em glutaraldeído e rotineiramente processados para análises histológicas e morfométricas, bem como para a caracterização dos estádios do ciclo do epitélio seminífero (CES), de acordo com o desenvolvimento do sistema acrossômico. Adicionalmente, injeções intraperitoneais de timidina triciada foram administradas em dois animais destas espécies para se estimar a duração da espermatogênese. Com exceção do *O. nigripes*, em comparação com a maioria das espécies de mamíferos investigadas até o presente momento, o índice gonadossomático observado (0,8-1,1%) nas quatro outras espécies foi bastante elevado. Doze estádios do CES foram caracterizados para todas as espécies e a morfologia das células germinativas foram bastante semelhantes entre si e também em relação a grande maioria das outras espécies de roedores. Exceção feita a forma do núcleo das espermátides que foi espatulada

no *T. moojeni* e falciforme nas demais espécies. Da mesma forma, demonstrando o aspecto filogenético destes parâmetros, as frequências das fases pré- e pós-meióticas no *T. moojeni* foram próximas às da subordem Hystricomorpha, enquanto as dos demais roedores foram semelhantes às das espécies pertencentes à subordem Myomorpha. As durações, em dias, de um ciclo espermatogênico e total da espermatogênese (que não são determinadas filogeneticamente) em *A. cursor*, *A. montensis*, *N. lasiurus*, *O. nigripes* e *T. moojeni* foram, respectivamente, $8,4 \pm 0,1$ e $38 \pm 0,4$; $8,9 \pm 0,04$ e $40 \pm 0,2$; $7,8 \pm 0,02$ e $35 \pm 0,1$; $7,9 \pm 0,1$; $36 \pm 0,4$; e $8,6 \pm 0,1$ e $38,5 \pm 0,5$. Valores estes que se situam dentre os mais baixos para mamíferos. Em todas as cinco espécies aqui investigadas o percentual de túbulos seminíferos (96-98%) foi bastante alto, situando-se no patamar mais elevado dentre as espécies de mamíferos já estudadas. O oposto ocorreu para o percentual (0,3-2%) e número de células de Leydig (4-17 milhões) por grama de testículo. Este último, exceto para *O. nigripes* (~35 milhões). Baseado no número de espermátides encontrado por célula de Sertoli (~8-15) pode se considerar que a eficiência das células de Sertoli nestes roedores variou de bem alta a moderada. No entanto, a eficiência espermatogênica (~60-80 milhões) nestas cinco espécies foi bastante elevada, sendo as mais altas dentre as diversas espécies de mamíferos eutérios já investigadas. Esta produção espermática por grama de testículo bastante acentuada deveu-se principalmente ao alto percentual de túbulos seminíferos e a relativamente curta duração da espermatogênese, conforme já mencionado, e a numerosa população de células de Sertoli (~50-70 milhões) por grama de testículo observada para estas espécies. Os resultados encontrados no presente estudo poderão contribuir para o melhor entendimento da biologia reprodutiva destas espécies de roedores neotropicais, bem como para a elaboração de programas de manejo e conservação da fauna silvestre da Mata Atlântica e do Cerrado.

Palavras-chave: testículo, espermatogênese, eficiência espermatogênica, célula de Sertoli; célula de Leydig; duração da espermatogênese; pequenos mamíferos, *Akodon cursor*, *Akodon montensis*, *Necromys lasiurus*, *Oligoryzomys nigripes*, *Trinomys moojeni*, Myomorpha, Hystricomorpha.

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1- A Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) do Caraça e os roedores silvestres

A RPPN do Caraça (20° 05' S, 43° 29' W) está localizada no município de Catas Altas, estado de Minas Gerais, no contraforte da Serra do Espinhaço, em região caracterizada por zona de contato entre os biomas do Cerrado e da Mata Atlântica (Giulietti et al., 1997). Esta unidade de conservação possui área de 10.187 ha e a vegetação é formada por campos de altitude, floresta estacional semidecídua e cerrado (Strang, 1981). A ocupação da área onde se encontra a RPPN teve início no século XVIII, época em que foi construído o Santuário do Caraça. Até meados de 1950, a vegetação desta reserva foi consideravelmente descaracterizada pela constante extração de madeira, para a produção de carvão vegetal (Strang, 1981). Atualmente esta reserva está incluída no Atlas de Áreas Prioritárias de Conservação no Estado de Minas Gerais (Costa et al., 1998). Estudos recentes verificaram alta diversidade de mamíferos na RPPN do Caraça e, dentre as diversas ordens registradas, a ordem Rodentia possui maioria das espécies (Talamoni et al., 2001). Os roedores estão presentes em todos os biomas encontrados nessa reserva. Além dos animais capturados em armadilhas, muitas espécies foram identificadas através da análise de fezes de predadores, demonstrando também, a importância desse grupo de pequenos mamíferos, em relação às interações ecológicas com outras espécies, interações essas fundamentais para a biodiversidade da RPPN do Caraça (Silva e Talamoni, 2003; Cordeiro-Jr e Talamoni, 2006).

1.2 – Testículo e espermatogênese

O testículo é um órgão com funções exócrina e endócrina que pode ser dividido em dois compartimentos principais: o compartimento intertubular ou intersticial, e o compartimento de túbulos seminíferos (Russell et al., 1990). Os elementos componentes do compartimento intertubular são as células de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos

e uma população celular variável constituída principalmente de fibroblastos, macrófagos e mastócitos (Setchell, 1991). Apesar de existir grande variação entre as diversas espécies quanto ao percentual dos diferentes componentes deste compartimento (Fawcett et al., 1973; França e Russell, 1998), a célula de Leydig é usualmente o tipo celular mais freqüente, podendo seu percentual nos testículos de animais sexualmente maduros, no período reprodutivo, variar de aproximadamente 1% em carneiros até cerca de 35% em capivaras (França e Russell, 1998; Paula et al., 1999; Hess e França, 2007).

O compartimento dos túbulos seminíferos constitui a maior parte do testículo, ocupando, na grande maioria dos mamíferos, de 70% a 90% do parênquima testicular (França e Russell, 1998; Hess e França, 2007). Os túbulos seminíferos são constituídos por túnica própria, epitélio seminífero e lume tubular. A túnica própria envolve o túbulo externamente, sendo composta de células mióides e matriz extracelular. No epitélio seminífero são encontrados dois tipos celulares de origem embriológica distintas: as células germinativas originárias do epiblasto e as células de Sertoli provenientes do epitélio do celoma (Karl e Capel, 1998).

Existe grande variação no número e nas dimensões (diâmetro e comprimento) dos túbulos seminíferos nas diferentes espécies de mamíferos (França e Russell, 1998). O camundongo, por exemplo, possui aproximadamente 20 túbulos seminíferos por testículo, perfazendo no total cerca de 2 metros de comprimento tubular por testículo (Bascom e Ostrud, 1925). Já no suíno doméstico existem de várias centenas a alguns poucos milhares de túbulos seminíferos por testículo e aproximadamente 3000 metros de túbulos no total (França e Russell, 1998). De maneira geral, o valor observado para o diâmetro tubular na grande maioria das espécies de mamíferos está em torno de 180 μ m a 300 μ m (Roosen-Runge, 1977).

A espermatogênese, que consiste na transformação de células espermatogoniais em espermatozóides, é um processo altamente complexo e bem organizado que ocorre nos túbulos seminíferos e dura cerca de 30 a 78 dias nos mamíferos já investigados (França e Russell, 1998; França et al., 1998; Quiroz e Nogueira, 1992; Hess e França, 2007). Baseado em características morfológicas e funcionais, o processo espermatogênico pode ser dividido em três fases: (a) fase proliferativa ou espermatogonial, na qual as espermatogônias passam

por sucessivas e rápidas divisões mitóticas; (b) fase meiótica ou espermatocitária, onde o material genético é duplicado, recombinado e segregado, sendo esta fase muito importante para a variabilidade genética entre membros da mesma espécie; e (c) fase de diferenciação ou espermiogênica, na qual células haplóides formadas se transformam em células altamente especializadas e estruturalmente equipadas para alcançar e fertilizar os oócitos (Russell et al., 1990; Sharpe, 1994).

Em animais de laboratório bem investigados as espermatogônias podem ser classificadas, de acordo com a presença e distribuição da heterocromatina, em duas categorias básicas: espermatogônias indiferenciadas ou imaturas e diferenciadas ou maduras (De Rooij e Russell, 2000; Chiarini-Garcia e Russell, 2001). À primeira categoria pertencem as espermatogônias isoladas (A_s), pareadas (A_{pr}) e alinhadas (A_{al}), sendo as isoladas consideradas funcionalmente como espermatogônias tronco. Trabalhos recentes (Chiarini-Garcia e Russell, 2001; Chiarini-Garcia et al., 2001; Ryu et al., 2006) sugerem que as espermatogônias indiferenciadas estão localizadas em regiões específicas do epitélio seminífero denominadas de nichos. Já as espermatogônias do tipo A (A_1 - A_4 em várias espécies de mamíferos), intermediárias (In) e do tipo B pertencem à categoria das espermatogônias diferenciadas, estando comprometidas com a formação dos espermatozoides. O esquema a seguir ilustra a provável seqüência das células espermatogênicas no rato e no camundongo, desde a espermatogônia isolada (A_{is}) até a formação de espermátides: $A_{is} \rightarrow A_{pr} \rightarrow A_{al}(1-4) \rightarrow A_1 \rightarrow A_2 \rightarrow A_3 \rightarrow A_4 \rightarrow In \rightarrow B \rightarrow$ espermátides primários \rightarrow espermátides secundários \rightarrow espermátides. Usualmente, a disposição da cromatina nuclear é utilizada como principal referência para se distinguir os diferentes tipos espermatogoniais, uma vez que a quantidade de cromatina associada ao envoltório nuclear aumenta gradativamente da espermatogônia do tipo A isolada até a do tipo B (Chiarini-Garcia e Russell, 2001). Existem consideráveis diferenças em relação ao número de gerações de espermatogônias diferenciadas em mamíferos. No entanto, nas diversas espécies de mamíferos investigadas até o momento, este número não ultrapassa seis gerações (De Rooij e Grootegoed, 1998; De Rooij e Russell, 2000).

Nos túbulos seminíferos, as células germinativas não estão organizadas ao acaso e sim em associações celulares características denominadas de estádios, os quais se sucedem com o tempo de maneira bastante ordenada, formando o ciclo do epitélio seminífero (CES).

Os estádios do CES podem ser classificados pelo método da morfologia tubular (Berndtson, 1977; França e Russell, 1998) e pelo método do sistema acrossômico (Leblond e Clermont, 1952; Russell et al., 1990). No primeiro caso, 8 estádios do ciclo são sempre obtidos para todas as espécies, enquanto pelo sistema acrossômico, o número de estádios varia de 6 a 14 nas espécies já investigadas. A duração do CES é considerada uma constante biológica espécie-específica que está sob o controle do genótipo da célula germinativa (França et al., 1998). Cerca de 4,5 ciclos são necessários para que o processo espermatogênico se complete em mamíferos, ou seja, desde uma espermatogônia do tipo A_{is} até a liberação dos espermatozóides no lume tubular (Amann e Schanbacher, 1983). Diversas metodologias tais como irradiações por raio-X, raio gama e injeções de radioisótopos têm sido empregadas para se estimar a duração do CES (Clermont et al., 1959). Dentre estas metodologias, as mais utilizadas atualmente são aquelas que empregam a timidina triciada e a bromodeoxiuridina como marcadores (França, 1991; Rosiepen et al., 1997; França e Godinho, 1999). No caso específico da timidina triciada, os estudos são desenvolvidos através de técnica denominada de radioautografia, a qual permite detectar, com alto poder de resolução em microscopia de luz (Swierstra e Foote, 1965), a energia beta emitida pelo radioisótopo que se incorporou às células investigadas, e que possui a propriedade de sensibilizar emulsões fotográficas (Blumen e Merzel, 1976; Bundy, 1995). Conforme Clermont et al. (1959), a timidina triciada é um marcador específico para células que estejam sintetizando DNA no momento de injeção do radioisótopo. Tais células no epitélio seminífero compreendem os diferentes tipos de espermatogônias encontradas em todos os estádios do ciclo do epitélio seminífero e os espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno, ocorrendo nestes espermatócitos a última síntese de DNA nas células espermatogênicas. Assim, pré-leptótenos/leptótenos marcados são pontos de referência para se calcular a duração da espermatogênese a partir da injeção de timidina triciada nos diferentes intervalos de tempo utilizados (França, 1991).

1.3- Células de Sertoli e de Leydig

A células de Sertoli, também denominada célula de suporte, célula de sustentação célula ramificada e *nurse cell*, nos testículos de mamíferos sexualmente maduros, estão completamente diferenciadas. A variação considerável na forma e estrutura da célula de

Sertoli durante o CES demonstra o alto grau de plasticidade desta célula, o qual reflete as alterações morfológicas e funcionais que ocorrem nas células germinativas (França et al., 1993; Ye et al., 1993; França e Hess, 2005). Além da formação da barreira de célula de Sertoli, que propicia ambiente considerado imunoprivilegiado no epitélio seminífero, as células de Sertoli desempenham outras funções essenciais para o desenvolvimento das células germinativas. Assim, podem ser citadas a síntese de várias proteínas, o fornecimento de nutrientes e inúmeros outros fatores importantes para as células germinativas, mediação da ação do FSH (hormônio folículo estimulante) e da testosterona na espermatogênese, fornecimento de suporte físico (sustentação) para as células espermatogênicas, participação ativa no processo de liberação (espermição) das espermátides para o lume tubular, fagocitose do excesso de citoplasma (corpos residuais) resultante da liberação das células espermiadas e fagocitose de células germinativas que sofrem apoptose. As células de Sertoli secretam ainda fluido em direção ao lume tubular, o qual possui substâncias importantes para a função epididimária e maturação espermática, servindo também de veículo para o transporte dos espermatozoides. A secreção também ocorre em direção ao interstício, estando envolvida com os mecanismos de regulação parácrina de outros tipos celulares do testículo tais como células mióides, células de Leydig e células musculares lisas dos vasos (Sharpe, 1994; Hess e França, 2007).

As células de Leydig são bastante conhecidas por sua produção de esteróides, os quais são sintetizados a partir de uma molécula base, o colesterol (Bardin, 1996). Esta produção ocorre através de estímulos do LH (hormônio luteinizante) em receptores localizados na membrana citoplasmática destas células. Nos testículos, existem receptores para andrógenos nas células de Sertoli, células mióides, células musculares lisas dos vasos e na própria célula de Leydig (Schlatt et al., 1997). Dentre os andrógenos sintetizados pelas células de Leydig incluem-se a testosterona e a diidrotestosterona, os quais são responsáveis pela diferenciação do sistema genital masculino e da genitália externa na fase fetal (Pelliniemi et al., 1996) e pelo aparecimento dos caracteres sexuais secundários e a manutenção quantitativa das células germinativas a partir da puberdade (Sharpe, 1994), embora tenha sido demonstrado que o FSH também participa na iniciação e manutenção da espermatogênese (Russell et al., 1993; Plant e Marshall, 2001). Particularmente, a

diidrotestosterona é responsável pela manutenção funcional das glândulas sexuais anexas e do epidídimo (Luke e Coffey, 1994).

É importante salientar a necessidade da interação das células germinativas com os componentes somáticos do testículo, principalmente células de Sertoli, células de Leydig e células mióides, para que o processo espermatogênico transcorra de maneira normal e eficiente (Skinner, 1991; Russell et al., 1994; Griswold, 1995; Schalatt et al., 1997; França e Russell, 1998; Hess e França, 2007). A integridade funcional da membrana basal sintetizada pelas células de Sertoli e células mióides é também essencial para o processo espermatogênico (Dym, 1994).

1.4- Quantificação da espermatogênese

Normalmente existe uma perda de células germinativas por apoptose durante a espermatogênese dos mamíferos estudados, o que influencia consideravelmente na quantidade de espermatozóides produzidos (França e Hess, 2005). Essa perda celular é muito importante na homeostase da espermatogênese, refletindo diretamente na produção espermática diária característica de cada espécie (Clermont, 1972; Sharpe, 1994). Embora as apoptoses sejam comumente observadas durante a fase de divisões meióticas (Roosen-Runge, 1977; Russell et al. 2002), a regulação do número de células germinativas ocorre usualmente durante a fase espermatogonial (De Rooij e Lok, 1987), fazendo com que um número apropriado de células espermatogênicas por célula de Sertoli seja proporcionado (França e Russell, 1998).

O estudo quantitativo das células que compõem o epitélio seminífero, em secções transversais de túbulos seminíferos, é importante para o entendimento do processo espermatogênico (Roosen-Runge e Giesel Jr., 1950; Wing e Christensen, 1982; França e Russell, 1998). Este estudo permite, ainda, o entendimento mais completo da espermatogênese e também de como a estrutura testicular se comporta em condições experimentais e patológicas (França e Russell, 1998). Também neste aspecto, a obtenção da proporção volumétrica (%) entre os diversos componentes do testículo e do epitélio seminífero, bem como a estimativa do tamanho e número de células de Leydig por testículo, fornecem importantes dados para se avaliar a função testicular (Hess e França, 2007).

Estudos nas últimas décadas mostram que o número de células de Sertoli por testículo é o principal fator na determinação da produção espermática e do tamanho do testículo (Orth et al., 1988; França et al., 1995; Rocha et al., 1999; Miranda, 2002; França e Hess, 2005). Tal pressuposto baseia-se no fato de que as células de Sertoli têm uma capacidade de suporte de células germinativas relativamente fixa para cada espécie, e que a população deste tipo celular mantém-se estável após a puberdade (Orth, 1982; Orth et al., 1988; França e Russell, 1998), não havendo alteração no seu número ao longo dos estádios do CES (Roosen-Runge e Giesel Jr., 1950; Wing e Christensen, 1982; França, 1991; Neves et al., 2001). Desta forma, o número de células germinativas suportadas por uma única célula de Sertoli é a melhor indicação da eficiência funcional da célula de Sertoli e da produção espermática (Russell e Peterson, 1984; Sinha-Hikim et al., 1989; França e Russell, 1998; França e Hess, 2005). Em termos de eficiência da produção espermática por unidade de área de túbulo seminífero, o índice mais importante é o número de espermátides por célula de Sertoli (Russell e Peterson, 1984; França e Russell, 1998).

A produção espermática diária por grama de testículo, que depende da estimativa prévia da duração da espermatogênese, é uma abordagem bastante eficaz para se medir a eficiência espermatogênica, sendo bastante útil nas comparações entre diferentes espécies. A alta eficiência da espermatogênese observada em determinadas espécies de mamíferos é decorrente principalmente do alto número de células de Sertoli por grama de testículo e alta capacidade de suporte das células de Sertoli, alto percentual de túbulos seminíferos no testículo, maior número de gerações de espermatogônias, baixa perda de células durante a espermatogênese e curta duração do ciclo do epitélio seminífero (França e Russell, 1998; Johnson et al., 2000; França e Hess, 2005).

Para avaliação da produção espermática diária vários métodos têm sido utilizados (Berndtson, 1977). No Laboratório de Biologia Celular-ICB/UFMG, o método histológico é empregado mais rotineiramente para o cálculo da produção espermática, sendo levado em consideração o comprimento total de túbulos seminíferos por testículo, número de células de Sertoli por testículo, razão entre o número de espermátides por célula de Sertoli e frequência e duração da espermatogênese, que é espécie-específica (França, 1992; Almeida, 2002; Hess e França, 2007). Este método histométrico é relativamente simples e tem propiciado resultados tão acurados quanto aqueles obtidos com metodologias mais

tradicionais, tais como o método hemocitométrico e a quantificação através de canulação dos ductos eferentes (Amann e Almquist, 1962).

2 - JUSTIFICATIVA

As 235 espécies de roedores, distribuídas em 71 gêneros, correspondem a 36 % da mastofauna brasileira (Oliveira e Bonvicino, 2006). Especificamente na Mata Atlântica, que é um dos cinco “hotspots” de biodiversidade mais importantes do mundo (Myers et al., 2000), esses mamíferos representam a maioria das espécies endêmicas, ou seja, restritas ao seu território (Fonseca et al., 1999). Por outro lado, no cerrado, que possui cerca de 33% da diversidade biológica do Brasil (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2007), essa ordem representa cerca de 1/4 das espécies de mamíferos (Fonseca et al., 1996; Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2007).

Apesar do grande número de espécies da ordem Rodentia em nossa fauna, existem poucos dados na literatura sobre a biologia reprodutiva das mesmas (Duarte, 2003). A insuficiência de estudos que forneçam conhecimento básico sobre grande parte das espécies de mamíferos brasileiros, dificulta a aplicação de medidas de conservação (Fonseca et al., 1996). Mesmo quando se considera os mamíferos de maneira geral, trabalhos envolvendo a estrutura e função testiculares, foram realizados em pouco mais de 2% das espécies ainda existentes (Nowak, 1999; Almeida et al., 2006; Hess e França, 2007; Leal e França, 2009).

Conforme pode ser facilmente inferido da literatura existente, nosso conhecimento sobre a biologia e a fisiologia da reprodução em mamíferos é ainda muito limitado, em relação aos parâmetros reprodutivos mais elementares dos animais silvestres (Wildt, 2005). Sem considerar a importância em si do conhecimento comparativo e evolutivo da função reprodutiva, este aspecto torna-se ainda mais crítico pelo fato do conhecimento de parâmetros reprodutivos básicos serem muito importantes para a elaboração de políticas de conservação que previnam a extinção de espécies ou melhore o manejo das mesmas (Wildt, 2005).

Nesse contexto o estudo da função testicular, especialmente dos aspectos relacionados à atividade espermatogênica, é essencial para o conhecimento da biologia reprodutiva de qualquer espécie de vertebrado, seja ela de interesse econômico ou não (Amann e Schanbacher, 1983). Particularmente no caso de mamíferos silvestres, a enorme

diversidade de espécies, as quais ocorrem nos mais variados habitats, faz com que as mesmas utilizem estratégias reprodutivas bastante variadas (Weir e Rowlands, 1973). Assim, esses mamíferos pouco investigados são modelos experimentais muito atraentes em investigações que visam a melhor compreensão da biologia da reprodução.

3 – OBJETIVO GERAL

Investigar a estrutura do testículo e do processo espermatogênico, através de análises de microscopia de luz, morfométricas e autorradiográficas, em cinco espécies de roedores silvestres das famílias Echimyidae: *Trinomys moojeni* e Cricetidae: *Akodon cursor*, *Akodon montensis*, *Necomys lasiurus* e *Oligoryzomys nigripes*.

3.1 - Objetivos específicos

- a) Realizar análises biométricas e morfométrica dos testículos, incluindo proporções volumétricas (%) entre os diferentes componentes do parênquima testicular, diâmetro e comprimento total dos túbulos seminíferos, e altura do epitélio seminífero.
- b) Realizar análises morfológicas das células da linhagem espermatogênica e das células de Sertoli.
- c) Caracterizar o CES através do sistema acrossômico.
- d) Calcular as frequências relativas dos diferentes estádios do CES e da duração dos eventos espermatogênicos, através da injeção de timidina triciada.
- e) Determinar as relações entre os diferentes tipos celulares quantificados.
- f) Calcular o número de células de Sertoli por testículo e por grama de testículo.
- g) Determinar o volume individual das células de Leydig, bem como do número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo.
- h) Calcular a produção espermática diária (eficiência espermatogênica), através da histologia quantitativa do testículo.

4 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, F.F., LEAL, M.C., FRANÇA, L.R. Testis morphometry, duration of spermatogenesis, and spermatogenic efficiency in the wild boar (*Sus scrofa scrofa*). *Biol Reprod* 75, 792-799, 2006.
- ALMEIDA, F.F. Estrutura e função testiculares em javalis (*Sus scrofa scrofa*) sexualmente maduros. 65p. Dissertação (mestrado em Medicina Veterinária): UFMG, 2002.
- AMANN, R.P.; ALMQUIST, J.O. Reproductive capacity of dairy bulls. VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. *J. Dairy Sci.*, 45(1): 774-781, 1962.
- AMANN, R.P.; SCHANBACHER, B.D. Physiology of male reproduction. *J. Anim. Sci. Suppl.*, 57: 380-403, 1983.
- BASCOM, KF; OSTRUD, HL. Quantitative studies of testicle. II Pattern and total tubule length in the testicles of certain common mammals. *Anat. Rec.* 31:159-169. 1925.
- BARDIN, C.W. Androgens: early attempts to evaluate Leydig cell function in man. In: PAYNE, A.H., HARDY, M.P., RUSSELL, L.D. (Eds). *The Leydig cell*. Viena: Cache River Press. 31-42. 1996.
- BERNDTSON, W.E. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *J. Anim. Sci.*, 44: 818-883, 1977.
- BLUMEN, G.; MERZEL, J. Radioautografia: princípios, aplicações e técnicas. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba, 1976.
- BUNDY, D.C. Photographic emulsions and processing. In: STUMPF, W.E.; SOLOMON, H.F. (Eds.) *Autoradiography and correlative imaging*. San Diego: Academic Press, p.49-57, 1995.
- CHIARINI-GARCIA, H.; RUSSELL, L.D. High-resolution light microscopic characterization of mouse spermatogonia. *Biol. Reprod.*, 65: 1170-78, 2001.
- CLERMONT, Y.; LEBLOND, C.P.; MESSIER, B. Durée du cycle de l'épithelium séminal du rat. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Suppl.*, v.48, p.37-55, 1959.
- CLERMONT, Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals, seminiferous epithelium cycle and spermatogonial review. *Physiol. Rev.* 52:198- 236. 1972.
- CORDEIRO-JR, D.A.; TALAMONI, S. A. New data on the life history and occurrence of spiny rats *T. moojeni* (Rodentia: Echimyidae), in southeastern Brazil. *Acta Theriol.*, 51 (2): 163-168, 2006.

COSTA, C. M. R. et al. Biodiversidade em Minas Gerais: um atlas para sua conservação. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, Governo de Minas Gerais, IEF, Conservation International, 1998. 94p.

DE ROOIJ, D.G.; GROOTEGOED, J.A. Spermatogonial stem cells. Current opinion in cell biology, v.10, p.694-701, 1998.

DE ROOIJ, DG; LOK, D. Regulation of the density of spermatogonia in the seminiferous epithelium of the Chinese hamster: II. Differentiating spermatogonia. Anat. Rec. 217: 131-36. 1987.

DE ROOIJ, D.G.; RUSSELL, L. D. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. J. Androl., v.21, n.6, p.776-798, 2000.

DUARTE, A.P.G. Aspectos reprodutvos de *Akodon montensis* (Rodentia, Muridae) e *Artibeus lituratus* (Chiroptera, Phyllostomidae) em áreas de mata no sudeste do Brasil. 52p. Dissertação (Mestrado em Zoologia), PUC-Minas, 2003.

DYM, M. Spermatogonial stem cells of the testis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v.91, p.11298-11302, 1994.

FAWCETT, D.W., NEAVES, W.B., FLORES, M.N. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. Biol. Reprod., 9: 500-532, 1973.

FONSECA, G. A. B. et al. Macrogeography on Brazilian Mammals, In: EISENBERG, J. F.; REDFORD, K. H. Mammals of the neotropics. The central neotropics, 3. ed. Chicago: Chicago Press, 1999. p. 549-563.

FRANÇA, L.R. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. 1991. 185p. Tese (doutorado em ciências)- UFMG, 1991.

FRANÇA, L.R. Daily sperm production in Piau boars estimated from Sertoli cell population and Sertoli cell index. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 12, 1992, Netherlands. Proceedings of the... Hague: 1992. p.1716-1718.

FRANÇA L.R.; GODINHO C.L. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). Biol. Reprod. 68:1554-1561. 2003.

FRANÇA, L.R., GOSH, S., YE, S.J. et al. Surface and surface-to-volume relationships of the Sertoli cell during the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. Biol. Reprod., 49: 1215-1228, 1993.

FRANCA, L.R.; HESS, R.A. Structure of the Sertoli cell. In: SKINNER, M; GRISWOLD, M. (Eds). Sertoli cell Biology. San Diego - California: Elsevier Academic Press. 19-40. 2005.

FRANÇA, L.R.; OGAWA, T.; AVARBOCK, M.R. et al. Germ cell genotype control cells cycle during spermatogenesis in the rat. *Biol. Reprod.*, v.59, p.1371-1377, 1998.

FRANÇA, L.R.; RUSSELL, L.D. The testis of domestic animals. In: REGADERA, J.; MARTINEZ GARCIA (Eds.). Male reproduction: a multidisciplinary overview. Madrid: Churchill Livingstone, 1998. p.197-219.

GIULIETTI, A. M.; PIRANI, J. R.; HARLEY, R. M. Espinhaço Range Region, Eastern Brazil. In: DAVIS, S. D.; HEYWOOD, V. H.; HERRERA-MACBRYDE, O.; VILLALOBOS, J.; HAMILTON, A. C. (Ed.) Centres of Plant Diversity. The Americas. Vol.3. World Wide Fund For Nature, Oxford. pp. 397-404, 1997.

GRISWOLD, M.D. Interaction between germ cells and Sertoli cells in the testis. *Biol. Reprod.*, v.52, p.211-216, 1995.

HESS, R.A.; FRANÇA, L.R. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: Molecular mechanisms in spermatogenesis (ed.Cheng CY), pp. 1-15. Landes Bioscience, 2007.

JOHNSON, L., VARNER, D.D., ROBERTS, M.E. et al. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61: 471-480, 2000.

KARL, J.; CAPEL, B. Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. In: *Developmental biology*, v.203, p.323-333. Academic Press, 1998.

LEAL, M ; FRANCA, L . Slow increase of Sertoli cell efficiency and daily sperm production causes delayed establishment of full sexual maturity in the rodent *Chinchilla lanigera*. *Theriogenology*, v. 71, p. 509-518, 2009

LEBLOND, C.P.; CLERMONT, Y. Definition of the stages of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.55, p.548-573, 1952.

LUKE, M.C.; COFFEY, D.S. The male sex accessory tissue: structure, androgen action and physiology. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. (Eds.). *The physiology of reproduction*, 2 ed. New York: Raven Press, 1994. V. 1, cap.23, p.1435-1488.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Diversidade do bioma Cerrado: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, Brasil, 2007.

MIRANDA, J.R. Efeitos do tratamento neonatal com 6-N-Propil-2-Tiouracil (PTU) e FSH na proliferação das células de Sertoli e função testicular em ratos Wistar adultos. 75p. Dissertação (mestrado em Medicina Veterinária) - UFMG, 2002

MYERS, N., MITTERMEIER, R.A., MITTERMEIER, C.G., FONSECA, G. A.; KENT, J.. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403: 853-858, 2000.

NEVES, E.S.; CHIARINI-GARCIA, H.; FRANÇA, L.R. Seminiferous epithelium cycle lenght in donkeys. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANDROLOGY, 7., 2001, Montreal. *Abstracts...* Montreal: American Society of Andrology. June, 2001. p.158.

NOWAK, R.M. Walker's mammals of the world. 6 ed., Vol. 2. London: Johns Hopkins University Press, 1999. p.1053-1062.

QUEIROZ, G.; NOGUEIRA, J.C. . Duration Of The Cycle Of The Seminiferous Epithelium And Quantitative Histology Of The Testis Of The Opossum D. Albiventris, Marsupialia.. REPRODUCTION , FERTILITY & DEVELOPMENT, MELBOURNE - AUSTRALIA, v. 04, p. 213-222, 1992.

OLIVEIRA, J.A.; BONVICINO, C.R. 2006. Ordem Rodentia. In N.R. REIS, A.L. Peracchi, W.A. Pedro,; I.P. Lima (eds.). Mamíferos do Brasil. Imprensa da UEL, Londrina, p. 347-406.

ORTH, J.M. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. *Anat. Rec.*, v.203, p.485-492, 1982.

ORTH, J.M.; GUNSALUS, G.L.; LAMPERTI, A.A. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology*, v.122, p.787-794, 1988.

PAULA, T.A.R.; CHIARINI-GARCIA, H.; FRANÇA, L.R. Seminiferous epithelium cycle and its duration in capybaras (*Hydrocoerus hydrochaeris*). *Tiss. Cell*, v.31, p.327-334, 1999.

PELLINIEMI, LJ; KUOPIO, T; FROJDMAN, K. The cell biology and function of the fetal Leydig cell. In: PAYNE, A.H.; HARDY, M.P.; RUSSELL, L.D. (Eds). *The Leydig Cell*. Ed. Cache River Press. Vienna. 143-157. 1996.

PLANT, T.M.; MARSHALL, G.R. The Functional Significance of FSH in Spermatogenesis *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, November 1,; 86(11): 5541 – 5546, 2001.

ROCHA, D.C.M.; DEBELJUK, L.; FRANÇA, L.R. Exposure to constant light during testis development increases daily sperm production in adult Wistar rats. *Tiss. Cell*, v.31, p.372-379, 1999.

ROOSEN-RUNGE, E.C. *The process of spermatogenesis in mammals*. Cambridge: University Press, 1977.

ROOSEN-RUNGE, E.C; GIESEL Jr, L.O. Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. *Am. J. Anat.* 87:1-30. 1950.

ROSIEPEN, G., ARSLAN, M., CLEMEN, G. et al. Estimation of the duration of the cycle of the seminiferous epithelium in the non-human primate *Macaca mulatta* using the 5-bromodeoxyuridine technique. *Cell e Tissue Research*, 288(2): 365-9, 1997.

RUSSELL, L.D.; PETERSON, R.N. Determination of the elongate spermatid-Sertoli cell ratio in various mammals. *J. Reprod. Fert.*, v.70, p.635-664, 1984

RUSSELL, L.D., ETTLIN, R.A., SINHA-HIKIM, A.P., CLEGG, E.D. Histological and histopathological evaluation of the testis. Clearwater: Cache River Press, 1990.

RUSSELL, L.D; CORBIN, T.J; BORG, K.E; et al. Recombinant human follicle-stimulating hormone is capable of exerting a biological effect in the adult hypophysectomized rat by reducing the numbers of degenerating germ cells. *Endocrinology*. 133:2062-2070. 1993.

RUSSELL, L.D; SINHA-HIKIM, AP; GHOSH, S. et al. Structure-function relationships in somatic cells of the testis and accessory reproductive glands. In: BARTKE, A (Ed). *Function of somatic cells in the testis*. New York: Springer-Verlag. 1994.

RYU, B.Y. ORWIG, K.E. OATLEY, J.M. AVARBOCK, M.R. BRINSTER, R.L. Effects of aging and niche microenvironment on spermatogonial stem cell self-renewal. *Stem Cells* 24, 1505–1511, 2006.

SCHLATT, S., MEINHARDT, A. AND NIESCHLAG, E. Paracrine regulation of cellular interactions in the testis: factors in search of a function. *European Journal of Endocrinology* 137:107-117, 1997.

SETCHELL, B.P. Male reproductive organs and semen. In: CUPPS, P.T. (Ed.). *Reproduction in Domestic Animals*. San Diego: Academic Press, 1991, p.221-249.

SHARPE, RM. Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL, E; NEIL, JD. (Eds). *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press. 1363-1434. 1994.

SILVA, J. A.; TALAMONI, S. A. Diet adjustments of maned wolves, *Chrysocyon brachyurus* (Mammalia, Canidae), subjected to supplemental feeding in a private reserve, Southeastern Brazil. *Rev. Bras. Zool*, 20 (2): 339-345, 2003.

SINHA-HIKIM, A.P.; AMADOR, A.G.; KLEMCKE, H.G. et al. Correlative morphology and endocrinology of Sertoli cells in hamster testis in active and inactive states of spermatogenesis. *Endocrinology*, v.125, p.1829-1843, 1989.

SKINNER, M. Cell-cell interactions in the testis. *Endocr. Rev.*, v.12, p.45-77, 1991.

STRANG, H. E. (coord.). Projeto Caraça. Fundação Brasileira para a Conservação da Natureza. 1981.

SWIERSTRA, E.E.; FOOTE, R.H. Duration of spermatogenesis and spermatozoan transport in the rabbit based on cytological changes, DNA synthesis and labeling with tritiated thymidine. *Am. J. Anat.*, v.116, p. 401-412, 1965.

TALAMONI, S. A.; SILVA, J. A. ; FALCÃO, F. ; CORDEIRO JR, D. A. ; FREITAS, V. R. Caracterização da fauna de mamíferos da Reserva Particular do Patrimônio Natural Santuário do Caraça, Catas Altas, MG. 2001 (Relatório Técnico).

WEIR, B. J.; ROWLANDS, I. W. Reproductive strategies of mammals. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v. 4, p. 139-163, 1973.

WILDT, D. E. Lions, Tigers, and Pandas, Oh My. *J. Androl.*, 26(4): 452-454, July/August 2005.

WING, T.Y.; CHRISTENSEN, A.K. Morphometric studies on rat seminiferous tubules. *Am. J. Anat.* ,v.165, p.13-25, 1982.

YE, S.J., YING, L., GHOSH, S. et al. Sertoli cell cycle: a re-examination of the structural changes during the cycle of the seminiferous epithelium of the rat. *Anat. Rec.*, 237(2): 187-98, 1993.

CAPÍTULO I

EFICIÊNCIA ESPERMATOGÊNICA DO RATO-DE-ESPINHO, *Trinomys moojeni* (RODENTIA: ECHIMYIDAE)

ABSTRACT

The spiny rat (*Trinomys moojeni*) is a rodent found in the Atlantic forest, which is considered one of the most diverse and threatened biomes in the world. Knowledge on reproductive biology and physiology is critical to conservation and species management, allowing the prevention of extinction and the use of males in natural and artificial reproduction programs. The main objectives of the present study were to investigate the testis structure as well as spermatogenic and Sertoli cell efficiency in the spiny rat captured in the Caraça Natural Reserve, a fragment of the Atlantic Rainforest located in the State of Minas Gerais, Brazil. Ten sexually mature spiny rats were analyzed. Intraperitoneal injections of tritiated thymidine were administered in order to estimate the duration of spermatogenesis. The testes were perfused-fixed in buffered glutaraldehyde and routinely processed for histological and morphometric analyses as well as the characterization of the stage of seminiferous epithelium cycle. Volume density (%) of seminiferous tubules and Leydig cells were 97 ± 0.3 and 0.3 ± 0.02 , respectively. The duration of one spermatogenic cycle and total duration of spermatogenesis were 8.6 ± 0.1 and 38.5 ± 0.5 days, respectively. Due to the very high volume density of the seminiferous tubules, short duration of spermatogenesis, tubule length per gram of testis (~40 meters), high Sertoli cell efficiency (~15 spermatids per Sertoli cell) and high number of Sertoli cells per testis gram (53 million), spermatogenic efficiency in the spiny rat (82 million) is by far the highest of the mammalian species investigated thus far.

Key-words: Spiny rat (*T. moojeni*); testis; spermatogenic cycle length; Sertoli cells; Leydig cells; spermatogenic efficiency.

RESUMO

O rato-de-espinho (*Trinomys moojeni*) é um roedor encontrado na Mata Atlântica, a qual é considerada um dos mais diversificados e ameaçados biomas do mundo. O conhecimento sobre a biologia e a fisiologia da reprodução é fundamental para a conservação e manejo das espécies, permitindo a prevenção da extinção e o uso de machos em programas de reprodução naturais e artificiais. O principal objetivo do presente estudo foi o de investigar a estrutura testicular bem como as eficiências espermatogênica e da célula de Sertoli nos ratos-de-espinho coletados na RPPN do Caraça em um fragmento de Mata Atlântica, localizado no Estado de Minas Gerais, Brasil. Dez ratos-de-espinho sexualmente maduros foram analisados. Injeções intraperitoneais de timidina triciada foram administradas com a finalidade de estimar a duração da espermatogênese. Os testículos foram fixados por perfusão em glutaraldeído tamponado e processados rotineiramente para análise histológica e morfométrica, bem como para a caracterização dos estádios do ciclo do epitélio seminífero. A Proporção volumétrica (%) dos túbulos seminíferos e células de Leydig foram $97 \pm 0,3$ e $0,3 \pm 0,02$, respectivamente. A duração de um ciclo espermatogênico e a duração total da espermatogênese foram de $8,6 \pm 0,1$ e $38,5 \pm 0,5$ dias, respectivamente. Devido à proporção volumétrica muito elevada de túbulos seminíferos, a curta duração da espermatogênese, o comprimento tubular por grama de testículo (~ 40 metros), a alta eficiência de células de Sertoli (~ 15 espermátides por célula de Sertoli) e alto número de células de Sertoli por grama de testículo (53 milhões), a eficiência espermatogênica em ratos-de-espinho (82 milhões) é a mais elevada nas espécies de mamíferos já investigado até o presente momento.

Palavras-chave: rato-de-espinho (*Trinomys moojeni*); testículo; duração do ciclo espermatogênico; célula de Sertoli; célula de Leydig; eficiência espermatogênica.

1- INTRODUÇÃO

A ordem Rodentia representa 40% das espécies de mamíferos ainda existentes, sendo a maior ordem em número de espécies, com aproximadamente 29 famílias, 443 gêneros e 2021 espécies (Nowak, 1999; Lage e Schmidt, 2007). Particularmente no Brasil, foram registrados 71 gêneros e 235 espécies de roedores (Oliveira e Bonvicino, 2006).

Os ratos-de-espinho do gênero *Trinomys* (subordem Hystricomorpha; família Echimyidae) são roedores terrestres que utilizam buracos em troncos de árvores para estocar alimento e para abrigar os filhotes. As espécies deste gênero se reproduzem durante todo o ano e as fêmeas, normalmente, geram dois filhotes (Moojen, 1952). Sua dieta consiste basicamente de sementes, frutos e fungos (Emmons e Feer, 1990). A espécie *Trinomys moojeni* ($2n = 56$) foi descrita por Pessoa et al. (1992) que se utilizou de espécies depositadas no Museu Nacional no Rio de Janeiro, onde o holótipo é preservado. A localidade onde o holótipo foi coletado em 1954 foi o município de Conceição do Mato Dentro - MG ($19^{\circ} 01'S$, $43^{\circ}25'W$). Entretanto, Cordeiro-Júnior e Talamoni (2006) reportaram uma nova localidade de ocorrência para o *T. moojeni* no estado de Minas Gerais – A Reserva Particular da Serra do Caraça ($20^{\circ}05'S$, $43^{\circ}29'W$) localizada no município de Catas Altas. Apesar disso pode-se inferir que a distribuição geográfica dessa espécie é relativamente bem limitada.

O conhecimento da biologia e fisiologia da reprodução em mamíferos, em relação aos parâmetros reprodutivos mais elementares dos animais silvestres, é ainda extremamente e surpreendentemente limitado (Wildt, 2005). Esse aspecto dificulta a implementação de programas de conservação (Wildt, 2005; Fonseca et al., 1996). Mesmo quando se considera os mamíferos de maneira geral, trabalhos envolvendo a estrutura e a função testiculares, foram realizados em pouco mais de 2% das espécies ainda existentes (Nowak, 1999; Almeida et al., 2006; Leal e França, 2009). Informações sobre a função reprodutiva são também muito importantes, para estudos comparativos e evolutivos (Wildt, 2005). A Mata Atlântica é considerada um dos mais diversificados e ameaçados biomas do mundo (Myers et al., 2000). De acordo com recentes publicações (Catzeflis et al., 2008), o *T. moojeni* foi incluído na lista vermelha de animais ameaçados de extinção com o status de risco extremamente alto de extinção na natureza. Embora se acredite que essa espécie reproduza

durante todo o ano (Cordeiro-Júnior e Talamoni, 2006), não há dados na literatura que relatem a biologia reprodutiva do *T. moojeni*. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi o de desenvolver uma cuidadosa e precisa análise histológica e morfométrica da estrutura do testículo e do processo espermatogênico, através de análises por microscopias de luz, morfométricas e autorradiográficas, com a finalidade de determinar a duração da espermatogênese, a eficiência espermatogênica e a eficiência da célula de Sertoli nessa espécie.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Animals

Dez indivíduos da espécie *T. moojeni*, sexualmente maduros (Cordeiro-Júnior e Talamoni, 2006), foram utilizados no presente estudo. Esses roedores foram capturados durante todo o ano, em um fragmento de Mata Atlântica na Reserva Particular da Serra do Caraça - MG (20°05`S, 43°29`W), onde o clima é definido por uma estação chuvosa (outubro-março) e uma estação seca (abril-setembro). Os animais foram capturados utilizando-se 100 armadilhas de captura viva de arame galvanizado (31 x 15 x 15 cm). As armadilhas foram instaladas em intervalos de 15 metros, em três transectos separados por 20 metros de distância. Durante quatro noites por mês, as armadilhas foram iscadas com uma mistura de banana e manteiga de amendoim e fiscalizadas na manhã seguinte. As peles e crânios dos animais foram depositados na coleção de referência do Museu de Ciências Naturais da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais em Belo Horizonte. Todos os procedimentos estavam em conformidade com as diretrizes aprovadas para o tratamento ético dos animais estabelecidas pela Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA-UFMG, protocolo n° 94/2004), que estão de acordo com o padrão de normas internacionais.

2.2- Injeções de timidina e preparação do tecido

Com a finalidade de estimar a duração do ciclo do epitélio seminífero (CES), cada um dos dois ratos-de-espinho utilizados nessa abordagem recebeu duas injeções intraperitoniais de timidina triciada (Thymidine [methyl-3 H], atividade específica de 82.0 Ci/mmol; Amersham Life Science). Essas injeções de 50 µCi de timidina triciada em 0,1 mL de solução aquosa foram administradas usando seringa hipodérmica. Dois intervalos de tempo (1 hora e 20 dias) após as injeções de timidina, foram considerados por animal, Os

testículos foram fixados por perfusão transcardíaca via ventrículo esquerdo com salina 0,9% e glutaraldeído tamponado a 4%, por 25 a 30 minutos (Sprando, 1990). Antes da cirurgia, todos os animais receberam injeção intraperitoneal de heparina [125 IU/kg peso corporal (PC)] e pentobarbital (50 mg/kg PC). Após a fixação os testículos foram separados do epidídimo, pesados e cortados longitudinalmente com uma lâmina de aço. Amostras de tecido, medindo 1 a 3 mm de espessura foram retiradas, rotineiramente processadas e incluídas em resina plástica (glicolmetacrilato).

Para as análises autorradiográficas, lâminas com cortes de testículo (4 μm) foram imersas em emulsão autorradiográfica (Kodak NTB-2, a Eastman Kodak Company, Rochester, NY, E.U.A.) a 43-45 °C. Após a secagem por cerca de uma hora a 25 °C, as lâminas foram colocadas em caixas escuras, seladas e armazenadas em geladeira a 4 °C, por aproximadamente quatro semanas. Os cortes foram então revelados em solução reveladora Kodak D-19 a 15 °C (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, E.U.A.) (Bundy 1995), e contrastados com azul de toluidina borato de sódio. As análises das lâminas foram realizadas em microscopia de luz, a fim de se detectar o tipo mais avançado de células germinativas marcadas nos diferentes períodos de tempo após a injeção de timidina. As células foram consideradas marcadas quando quatro ou mais grãos estavam presentes no núcleo, na presença de “background” fraco a moderado, até quatro grãos de prata revelados.

2.3- Morfometria testicular

As proporções volumétricas dos componentes testiculares foram determinadas por microscopia de luz, usando um ratículo com 441 pontos que foi acoplado na ocular do microscópio de luz. Quinze campos escolhidos aleatoriamente (6615 pontos) foram contados para cada animal em aumento de 400x. O diâmetro tubular e a altura do epitélio dos túbulos seminíferos foram medidos no aumento de 100x, usando micrômetro ocular. Trinta túbulos, o mais arredondados possíveis, foram escolhidos aleatoriamente e medidos para cada animal. A altura do epitélio seminífero foi obtida a partir dos mesmos túbulos utilizados para se determinar o diâmetro tubular. Comprimento total dos túbulos seminíferos (metros) foi determinado dividindo-se o volume ocupado pelos túbulos seminíferos no parênquima testicular, pelo raio ao quadrado do túbulo multiplicado por π (Johnson e Neaves, 1981).

2.4- Estádios e duração do ciclo do epitélio seminífero (CES)

Os estádios do CES foram caracterizados com base no desenvolvimento do sistema acrossômico e morfologia dos núcleos das espermátides. As frequências relativas dos estádios foram determinadas através da avaliação de pelo menos 150 secções transversais de túbulos seminíferos por animal em aumento de 400x. Ambos os testículos foram analisados para cada animal. Os cortes histológicos utilizados foram aqueles que apresentaram melhor qualidade e tiveram maior número de secções transversais de túbulos. A duração do ciclo espermatogênico foi estimada com base nas frequências dos estádios, caracterizados de acordo com o sistema acrossômico, e com o tipo de célula germinativa marcada mais avançada em diferentes períodos avaliados após a injeção de timidina. Para a duração total da espermatogênese considerou-se que aproximadamente 4,5 ciclos são necessários para que o processo espermatogênico seja concluído, desde espermatogônias tipo A até a espermiacção (Amann e Schanbacher 1983). Como o volume do núcleo de espermatócitos primários em paquíteno cresce acentuadamente durante a prófase meiótica e essas células estão presentes em praticamente todos os estádios do ciclo (França e Russell, 1998; Neves et al., 2002), o tamanho de seus núcleos foi utilizado como ponto de referência para se determinar a localização das células germinativas marcadas mais avançadas com mais precisão.

2.5- Contagens celulares e número de células

Todos os núcleos de células germinativas e nucléolos de células de Sertoli, presentes no estágio VII do ciclo foram contados em dez secções transversais de túbulos seminíferos, as mais arredondadas possíveis, escolhidas aleatoriamente para cada animal. Essas contagens foram corrigidas para a espessura do corte (4 μ m) e diâmetros do núcleo ou nucléolo (Abercrombie, 1946, como modificado por Amann e Almquist, 1962). Para esse propósito, os diâmetros de 10 núcleos ou nucléolos foram medidos (por animal) para cada tipo de célula analisada. Razões celulares foram obtidas a partir das contagens corrigidas obtidas no estágio VII. Partindo-se do pressuposto de que não há perdas significativas durante o processo espermiogênico (Russell e Clermont, 1977), o número de espermátides arredondadas computado no estágio VII do ciclo do epitélio seminífero em ratos-de-

espinho foi considerado como a população real de espermatozoides a serem formados. O número total de células de Sertoli foi determinado a partir da contagem corrigida de nucléolos de células de Sertoli dos túbulos seminíferos por secção transversal e do comprimento total dos túbulos seminíferos (Hochereau-De-Reviere e Lincoln, 1978). A produção espermática diária (PED) por testículo e por grama de testículo (eficiência espermática) foi obtida com base na seguinte fórmula (França, 1992): $PED = \text{número total de células de Sertoli por testículo} \times \text{razão de espermátides arredondadas por célula de Sertoli no estágio VII} \times \text{frequência relativa do estágio VII (\%)} / \text{duração do estágio VII (dias)}$. O volume individual das células de Leydig foi obtido a partir do conhecimento do volume nuclear dessas células e proporção entre núcleo e citoplasma. Como o núcleo das células de Leydig em ratos-de-espinho é esférico, o volume do núcleo foi calculado a partir do diâmetro nuclear médio. Para este propósito, 30 núcleos com um nucléolo evidente foram medidos para cada animal. O volume do núcleo da célula de Leydig foi expresso em μm^3 e obtido pela fórmula $4/3\pi R^3$, onde $R = \text{diâmetro nuclear}/2$. A fim de calcular a proporção entre núcleo e citoplasma, um retículo com 441 pontos foi colocado sobre o material seccionado no aumento de 400x e 1000 pontos sobre as células de Leydig foram contados para cada animal. O número total de células de Leydig por testículo foi estimado a partir do volume individual das células de Leydig e do volume ocupado pelas células de Leydig no parênquima testicular.

3- RESULTADOS

3.1 – Dados biométricos e estereologia testicular

Os dados biométricos e a proporção volumétrica testicular estão apresentados na tabela 1. A média do peso corporal para *Trinomys moojeni* foi 207 ± 9 g, fornecendo índice gonadossomático (IGS) (Massa testicular dividida pelo peso corporal) de $0,93 \pm 0,03\%$. O percentual de túnica albugínea foi $3,1 \pm 0,1 \%$. Os túbulos seminíferos ocuparam aproximadamente 98% do parênquima testicular. Enquanto as células de Leydig compreenderam apenas $0,3 \pm 0,02\%$ desse parênquima. A média do diâmetro tubular e a altura do epitélio seminífero foi 172 ± 3 e 67 ± 2 μm , respectivamente. Baseado no volume do parênquima testicular (peso do testículo menos o peso da túnica albugínea), bem como

no volume ocupado pelos túbulos seminíferos no parênquima testicular e diâmetro tubular, foram encontrados aproximadamente 40 metros de túbulos seminíferos por grama de testículo e por testículo (Tabela 1).

3.2 – Estádios do ciclo do epitélio seminíferos e cálculo das frequências relativas.

Baseado no desenvolvimento do sistema acrossômico e morfologia do desenvolvimento dos núcleos das espermatídes, doze estádios do CES seminíferos foram determinados no rato-de-espinho. Esses estádios (Figura 1) estão descritos resumidamente a seguir:

3.2.1. Estádio I

Duas gerações de espermatídes estavam presentes nesse estágio, espermatídes arredondadas iniciais e espermatídes alongadas. Como os grânulos acrossômicos não puderam ser visualizados sob microscopia de luz, as espermatídes recém formadas nesse estágio foram caracterizadas pela sua falta de características peculiares e por serem menores do que espermatócitos secundários. No entanto, o aparelho de Golgi perinuclear estava bastante evidente. Feixes de espermatídes alongadas estavam mais compactados e alguns deles estavam localizados mais profundamente no epitélio. Espermatogônias tipo A foram observadas em contato com a lâmina basal.

3.2.2. Estádio II

As espermatídes arredondadas iniciais presentes nesse estágio usualmente apresentaram duas pequenas vesículas acrossômicas nas quais apenas grânulos acrossômicos ocasionais estavam presentes. No final desse estágio as pequenas vesículas proacrossômicas coalesceram para formar uma única vesícula contendo um único grânulo acrossômico e a vesícula acrossômica estava em contato com o núcleo.

3.2.3. Estádio III

Esse estágio se iniciou com o leve achatamento da vesícula acrossômica sobre a superfície do núcleo. As vesículas acrossômicas formaram ângulo de $64 \pm 11^\circ$ sobre a superfície nuclear (variando de ~ 42 a $\sim 70^\circ$). Espermatogônias intermediárias presentes nesse estágio estavam em contato com a membrana basal.

3.2.4. Estádio IV

O acrossomo formou ângulo de $83 \pm 16^\circ$ sobre a superfície dos núcleos (variando de ~ 60 a $\sim 110^\circ$). As espermátides alongadas estavam se deslocando para o lume do túbulo seminífero. Espermatogônias do tipo B estavam presentes e em contato com a membrana basal.

3.2.5. Estádio V

Os feixes de espermátides alongadas tinham se dissociado e estavam localizados muito perto do lume tubular. Os acrossomos formaram ângulo de $94 \pm 12^\circ$ sobre a superfície do núcleo (variando de ~ 80 a $\sim 120^\circ$). Espermatogônias do tipo B, em transição para pré-leptóteno, estavam presentes na base dos túbulos seminíferos.

3.2.6. Estádio VI

Nesse estágio, os acrossomos formaram ângulo de $108 \pm 19^\circ$ sobre a superfície do núcleo (variando de ~ 82 a $\sim 138^\circ$). Espermátides alongadas com a cabeça espatuladas, bem próximas à borda luminal, estavam sendo liberadas no lume dos túbulos seminíferos e os corpos residuais foram observados logo abaixo dessas células. Duas gerações de espermátócitos primários estavam presentes: espermátócitos em pré-leptóteno/leptóteno em contato com a lâmina basal; e espermátócitos em paquítenos posicionados entre as espermátides arredondadas e os espermátócitos em pré-leptótenos.

3.2.7. Estádio VII

Apenas uma geração de espermátides estava presente nesse estágio, Os núcleos dessas espermátides apresentavam-se arredondados e formavam que formaram várias camadas na parte superior do epitélio seminífero. Os acrossomos formaram ângulo de $136 \pm 12^\circ$ sobre a superfície do núcleo (variando de ~ 109 a $\sim 151^\circ$).

3.2.8. Estádio VIII

Os núcleos das espermátides iniciaram o alongamento adquirindo uma forma ovóide. Os acrossomos formaram ângulo de $145 \pm 10^\circ$ sobre a superfície dos núcleos (variando de ~ 129 a $\sim 162^\circ$).

3.2.9. Estádio IX

O acrossomo acompanhou o processo de alongamento dos núcleos das espermátides. A relação entre o eixo mais curto (linha transversal que passa através do núcleo na zona equatorial) e o eixo longitudinal ou o mais longo foi de aproximadamente $1,76 \pm 0,1$. As

espermátides alongadas iniciam a formação de feixes e suas cabeças estavam voltadas para o núcleo o núcleo das células de Sertoli (geralmente localizadas na base do túbulo). Espermatócitos em leptótenos também foram observados.

3.2.10. Estádio X

Um ângulo ventral foi formado na cabeça das espermátides alongadas. A relação entre o eixo menor e eixo longitudinal ou o mais longo foi de aproximadamente $2,2 \pm 0,1$. Ao final dessa fase, espermátides em paquítenos, em transição para a fase de diplóteno da prófase meiótica, estavam presentes.

3.2.11. Estádio XI

O alongamento das espermátides estava concluído durante esta fase. A relação entre o eixo menor e eixo longitudinal ou o mais longo foi de aproximadamente $2,3 \pm 0,1$. Duas gerações de espermátides primárias estavam presentes: zigóteno e diplóteno.

3.2.12. Estádio XII

A presença de figuras de meiose relacionadas com a primeira e segunda divisões meióticas foi a principal característica deste estágio. Portanto, espermátides secundárias e espermátides arredondadas recém-formadas também foram observadas. Em comparação com a fase anterior, os núcleos das espermátides alongadas tinham uma morfologia semelhante. A se julgar pela afinidade de coloração, a condensação dessas células ainda estava ocorrendo.

Os percentuais médios dos doze estádios do ciclo do epitélio seminífero (caracterizados baseando-se no desenvolvimento do acrossomo) estão mostrados na figura 2. Os estádios IV a VIII tiveram as mais altas frequências (~9 a ~11%), e os estádios IX a XII apresentaram as mais baixas frequências (~6 a ~7%). As frequências dos estádios pré-meióticos (estádios VII a XI), meiótico (estádio XII) e pós-meióticos (estádios I a VI) do ciclo foram ~ 41, ~ 7 e 53%, respectivamente.

3.3. Duração do ciclo do epitélio seminífero (CES)

O tipo de célula germinativa marcado mais avançado observado em diferentes períodos de tempo após a injeção de timidina são apresentados na Tabela 2 e Figuras 3 e 4. Aproximadamente 1 hora após a injeção, as células germinativas marcadas mais avançadas

foram identificadas como espermatócitos em pré-leptótenos ou células na transição de espermatócitos em pré-leptótenos para leptótenos. Com base no diâmetro médio do núcleo dos paquítenos em ambos os animais investigados neste aspecto, essas células, localizadas no compartimento basal, estavam presentes no início do Estádio VIII e tinham percorrido apenas 1% desse estágio. Aos 20 dias após a injeção de timidina, o tipo de célula germinativa marcado mais avançado em ambos os ratos-de-espinho foram espermátides alongadas presentes no estágio XII, que haviam percorrido apenas 2% do estágio. Com base no tipo de célula germinativa marcado mais avançado observado em cada período de tempo avaliado após a injeção de timidina e nas frequências dos estádios, a duração média do CES e a duração total de espermatogênese para os dois animais investigados neste aspecto foi estimada em $8,6 \pm 0,1$ e $38,5 \pm 0,5$ dias, respectivamente.

3.4. Contagens celulares e morfometria das células de Leydig

O índice meiótico (mensurado pelo número de espermátides arredondadas produzidas por espermatócito primário em paquíteno) foi $3 \pm 0,2$. Portanto, 25% de perda celular ocorreu durante a prófase meiótica. A eficiência das células de Sertoli em *T. moojeni* (estimativa do número de espermátides arredondadas por célula de Sertoli) foi de $14,7 \pm 0,9$ (Tabela 3). O número de células de Sertoli por grama de testículo e por testículo foi de cerca de cinquenta milhões. Com relação à eficiência espermatogênica, a produção diária de espermatozóides por grama de testículo e por testículo em *T. moojeni* foi de aproximadamente $82 \pm 6 \times 10^6$ e $80 \pm 6 \times 10^6$, respectivamente. Isso significa que no total 160 milhões de espermatozóides são produzidos diariamente. Em relação às células de Leydig, o volume nuclear e tamanho dessa célula foram de 155 ± 6 e $799 \pm 26 \mu\text{m}^3$, respectivamente. Enquanto o seu número por grama de testículo e por testículo foi de aproximadamente quatro milhões (Tabela 4).

4- DISCUSSÃO

No nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo sobre a biologia reprodutiva do rato-de-espinho, *T. moojeni*. Os resultados encontrados mostraram que essa espécie tem a mais alta eficiência espermatogênica dentre as espécies de mamíferos investigadas até o presente momento. Essa eficiência resulta da combinação de alguns atributos positivos tais

como, alto valor para a proporção volumétrica de túbulos seminíferos, comprimento dos túbulos seminíferos por grama de testículo, número de células de Sertoli por grama de testículo, eficiência da célula de Sertoli (mensurado pelo número de espermátides por célula de Sertoli) e curta duração da espermatogênese. Para a maioria das espécies de mamíferos investigadas, a produção espermática diária por grama de testículo (PED/g de testículo ou eficiência espermatogênica) varia de ~ 20 a ~ 30 milhões e, para o homem, esse valor é de 4 a 4,5 milhões (Sharpe, 1994; Hess e França, 2007). Deste modo, a eficiência espermatogênica no rato-de-espinho é aproximadamente vinte vezes maior do que a observada no homem. Particularmente em comparação com roedores de laboratório, a eficiência espermatogênica no rato-de-espinho é de duas (camundongos; Hess e França, 2007) a quatro vezes (hamsters e ratos; Sharpe, 1994; Hess e França, 2007) maior.

A duração da espermatogênese está sob o controle do genótipo da célula germinativa (França et al., 1998) e é considerada geralmente constante para uma dada espécie (Clermont, 1972). Por outro lado, estudos conduzidos em nosso laboratório sugerem que as frequências dos estádios pré-meiótico e pós-meiótico podem ser filogeneticamente determinadas entre membros da uma mesma família de mamíferos ou mesmo a partir da mesma subordem (França e Russell, 1998; Neves et al., 2002; Almeida et al., 2006). Portanto, as frequências desses estádios observadas para os roedores que pertencem à subordem Hystricomorpha, são semelhantes às encontradas para outras espécies pertencentes a várias famílias dessa subordem (Paula et al., 1999; Leal e França, 2009) e muito diferente de outros roedores da família Muridae, tais como ratos, camundongos e hamsters (França et al., 2005). Em relação a outra característica filogenética, a cabeça do espermatozóide nas espécies da subordem Hystricomorpha é espatulada, enquanto nas espécies da família Muridae, é falciforme. (Eddy e O'Brien, 1994). Quanto à duração de um ciclo espermatogênico e a duração da espermatogênese (que apesar de estar sob o controle do genótipo das células germinativas, não é determinada filogeneticamente), os valores observados são similares aos obtidos em camundongos (8,6 e 38,7 dias), porcos (9 e 40,5 dias) e búfalos (8,7 e 39,2 dias) e estão situados na faixa bem inferior para as espécies de mamíferos investigadas até o presente momento (França e Russell, 1998; Hess e França, 2007).

Além de ser crucial para se determinar a eficiência espermatogênica, o conhecimento da duração da espermatogênese é um parâmetro muito útil para comparações entre espécies. Em geral, a alta eficiência espermatogênica está correlacionada com a duração mais curta da espermatogênese (Amann 1962; França et al., 2005; Hess e França, 2007). A eficiência espermatogênica também apresenta correlação positiva significativa com os valores observados para a proporção volumétrica de túbulos seminíferos no parênquima testicular, comprimento tubular total, eficiência da célula de Sertoli e número de células de Sertoli por grama de testículo. Embora a duração do ciclo espermatogênico seja muito curta no rato-de-espinho, os valores encontrados para todos os outros parâmetros mencionados para essa espécie estão sistematicamente entre os mais altos observados para as espécies de mamíferos investigadas até o presente momento (França e Russell, 1998; França et al., 2005; Hess e França, 2007). No entanto, conforme esperado, os resultados encontrados para a proporção volumétrica das células de Leydig e o número dessa célula somática esteroidogênica por grama de testículos são os mais baixos observados para os mamíferos (Russell, 1996; França e Russell, 1998; França et al., 2005; Hess e França, 2007). Por exemplo, esses valores foram aproximadamente sete a dez vezes menores que os valores observados para ratos e camundongos (Russell, 1996). Em relação ao tamanho das células de Leydig, apenas os valores obtidos para carneiros ($416 \mu\text{m}^3$) (Lunstra e Schanbacher, 1988) e javalis ($399 \mu\text{m}^3$) (Almeida et al., 2006) são menores do que os obtidos para o rato-de-espinho, o que representa um volume de aproximadamente metade do tamanho desta célula esteroidogênica para esta espécie de roedor.

O IGS observado em ratos-de-espinho adultos é relativamente elevado em comparação com a maioria das espécies de mamíferos já investigadas até agora (Kenagy e Trombulak, 1986) e semelhante a outros roedores tais como ratos (0,76), camundongos (0,74) e chinchilas (0,8) (Rocha et al. 1999; Leal e França, 2008). Pelo menos em parte, este resultado está associado com a proporção volumétrica muito alta dos túbulos seminíferos observada nos ratos-de-espinho, que é a maior encontrada entre os mamíferos investigados (França e Russell 1998; França et al. 2005; Leal e França, 2008), em contraste com o valor extremamente baixo observado para a proporção volumétrica das células de Leydig (Russell 1996; França e Russell 1998; França et al. 2005; Leal e França, 2008). Por exemplo, a proporção volumétrica dos túbulos seminíferos nos ratos-de-espinhos foi cinco

a dez por cento maiores que os valores observados para outros roedores tais como os ratos, camundongos e gerbil (Hess e França, 2007). Em comparação com a maioria das espécies de mamíferos (França e Russell, 1998; Leal e França, 2008), os valores encontrados para o diâmetro dos túbulos seminíferos e altura do epitélio seminífero são relativamente muito baixos em ratos-de-espinho sexualmente maduros.

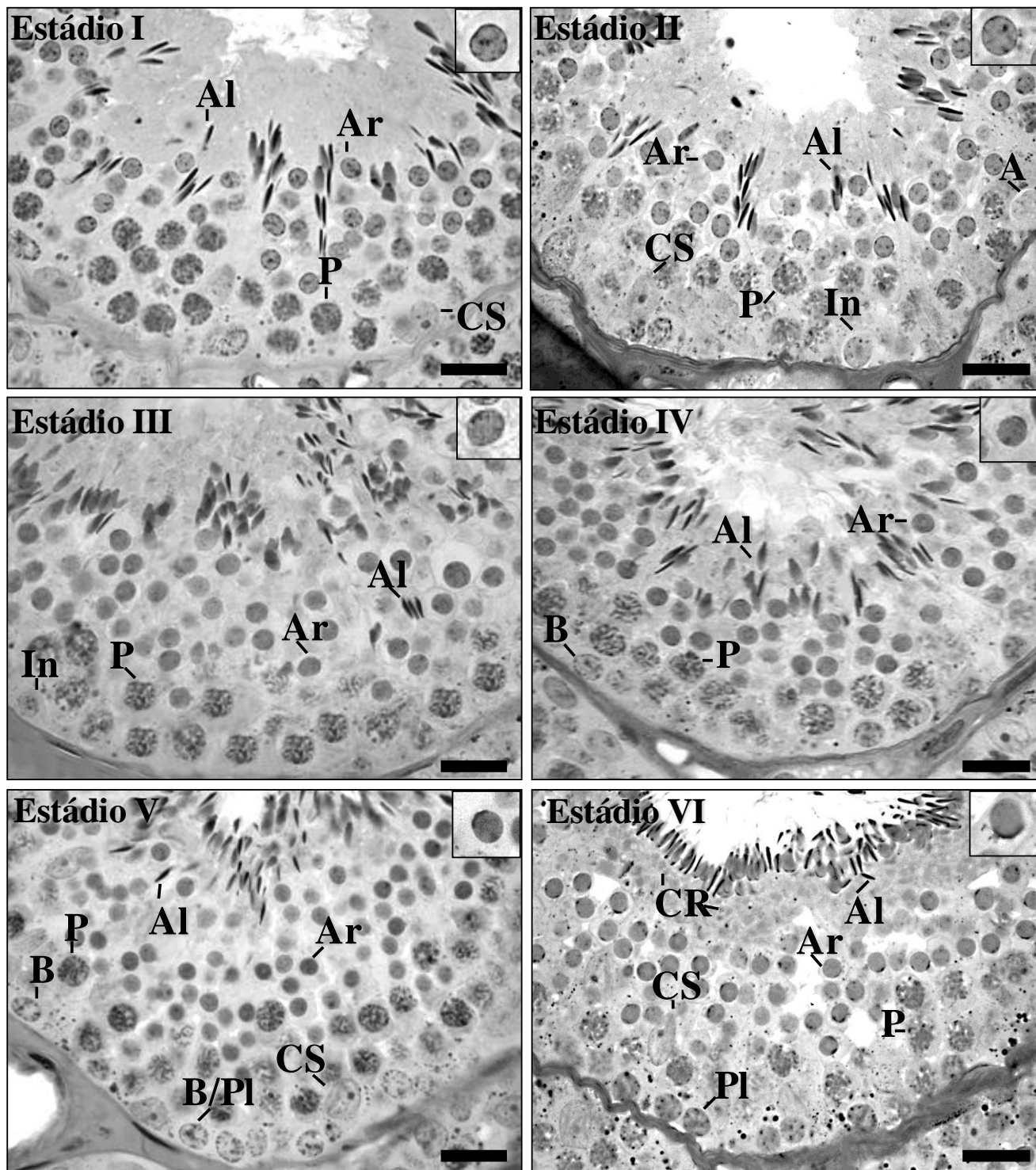
A apoptose de células germinativas é parte integrante da espermatogênese em vertebrados (Roosen-Runge, 1973; Shaha, 2007) e ocorre, principalmente, para regular a densidade celular ou eliminar células germinativas anormais (França e Russell, 1998; Nóbrega et al., 2009). Portanto, a apoptose desempenha importante papel fisiológico durante a espermatogênese, influenciando diretamente o número de espermatozoides que devem ser produzidos para cada espécie (Nóbrega et al., 2009). Com base no número de espermátides arredondadas produzidas por espermatócitos primários (índice meiótico), a perda de células germinativas durante a meiose nos ratos-de-espinho é semelhante aos valores observados para a maioria das espécies de mamíferos investigados (Roosen-Runge, 1973; França e Russell, 1998; França et al., 2005).

5- CONCLUSÃO

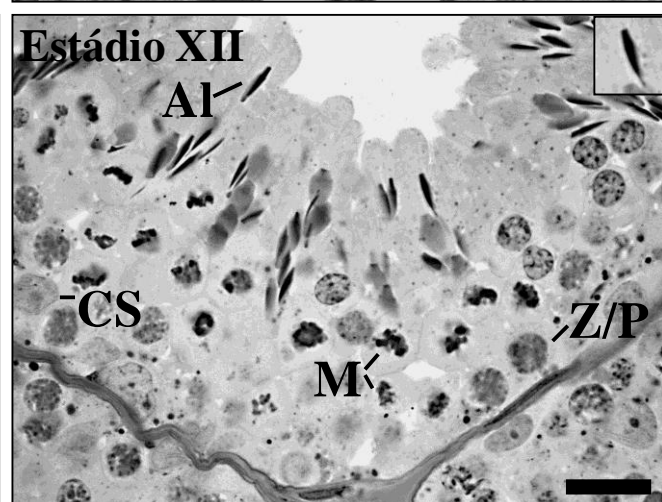
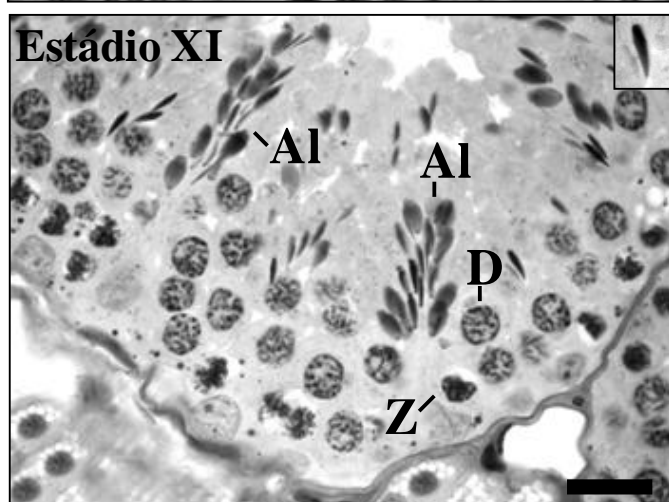
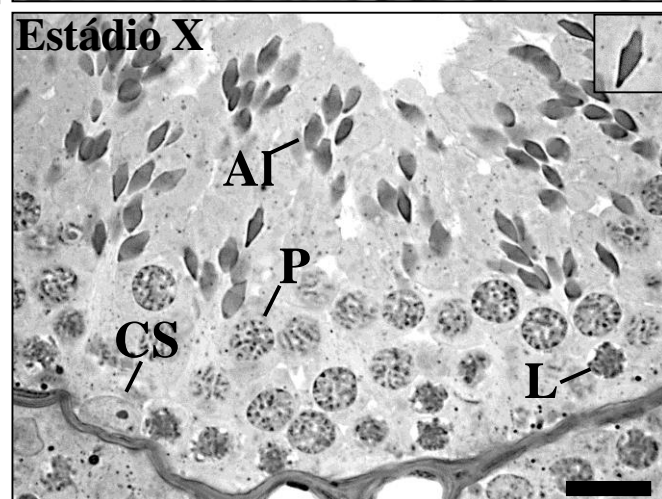
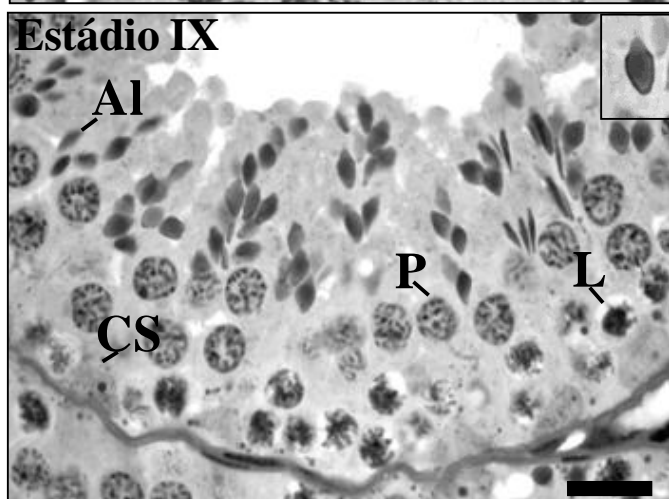
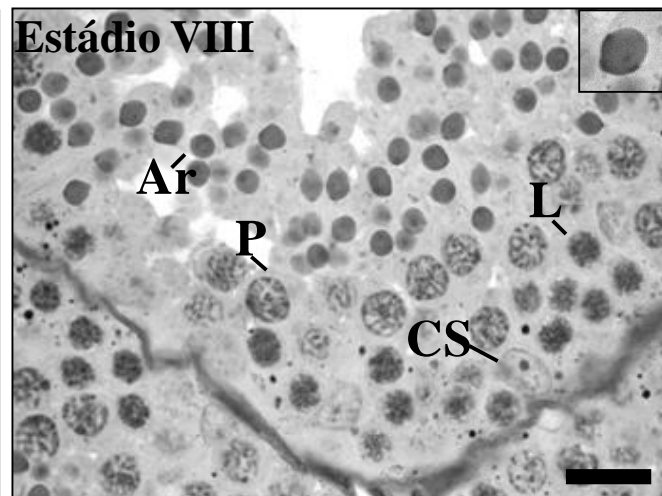
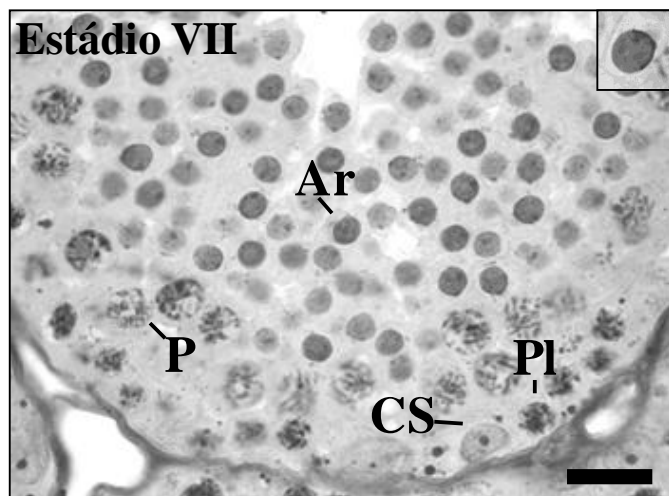
Como consequência de vários atributos positivos relacionados à função testicular, a eficiência espermatogênica em ratos-de-espinho é a maior entre as espécies de mamíferos já investigadas. Paradoxalmente, no entanto, esta espécie não é tão prolífica como as espécies de roedores da família Muridae, que investem grande quantidade de energia na reprodução e têm índice gonadossomático semelhante à encontrada para os ratos-de-espinho. Com a finalidade de melhor compreender a razão pela qual esta espécie tem eficiência espermatogênica tão notável, futuros estudos sobre a biologia reprodutiva dos ratos-de-espinho devem se concentrar no seu comportamento e/ou estratégia reprodutiva.

6- FIGURAS

Figura 1 - Estádios I a XII do ciclo do epitélio seminífero em *T. moojeni*, baseado no sistema acrossômico: espermatogonia Tipo B (B); espermatócitos em pré-leptóteno (Pl); espermatócitos em leptóteno (L); espermatócitos em zigóteno (Z); espermatócito em paquíteno (P); espermatócito em diplóteno (D); figuras meióticas (M); espermátides arredondadas (Ar); espermátides em alongamento/alongada (Al); célula de Sertoli (CS); e corpos residuais (CR). O detalhe em maior aumento, presente na parte superior direita, nas figuras dos estádios representa o desenvolvimento do acrossoma das espermátides. Barras = 10 μ m.



Aumento 1000X



Aumento 1000X

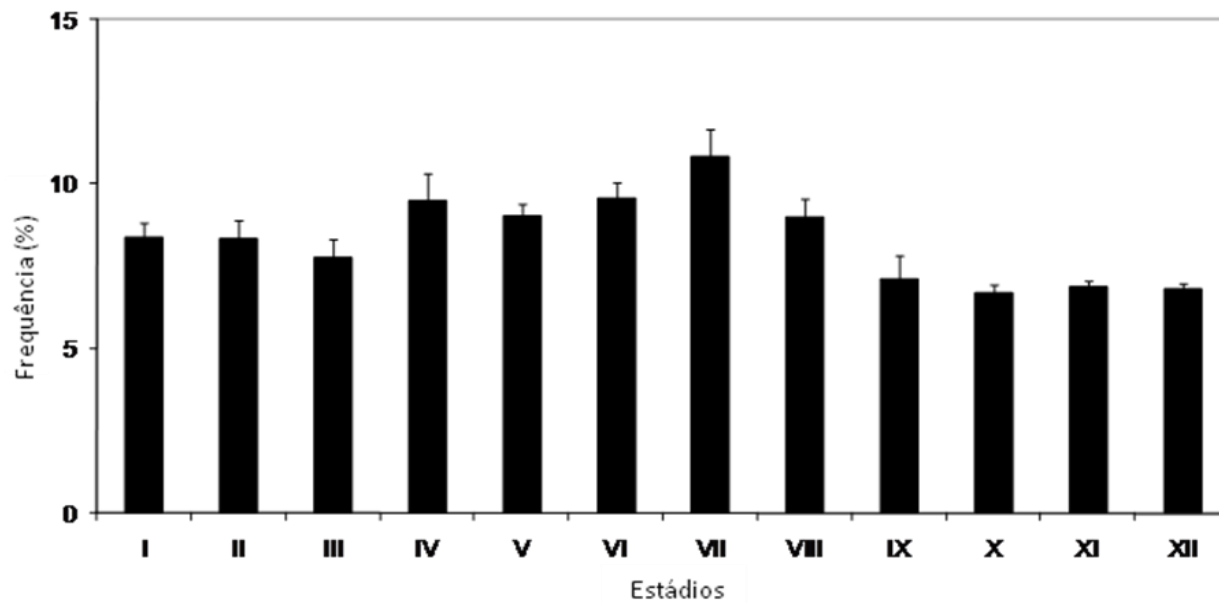


Figura 2 – Percentual médio (\pm EPM) de cada estágio do ciclo do epitélio seminífero caracterizado de acordo com o sistema acrossômico

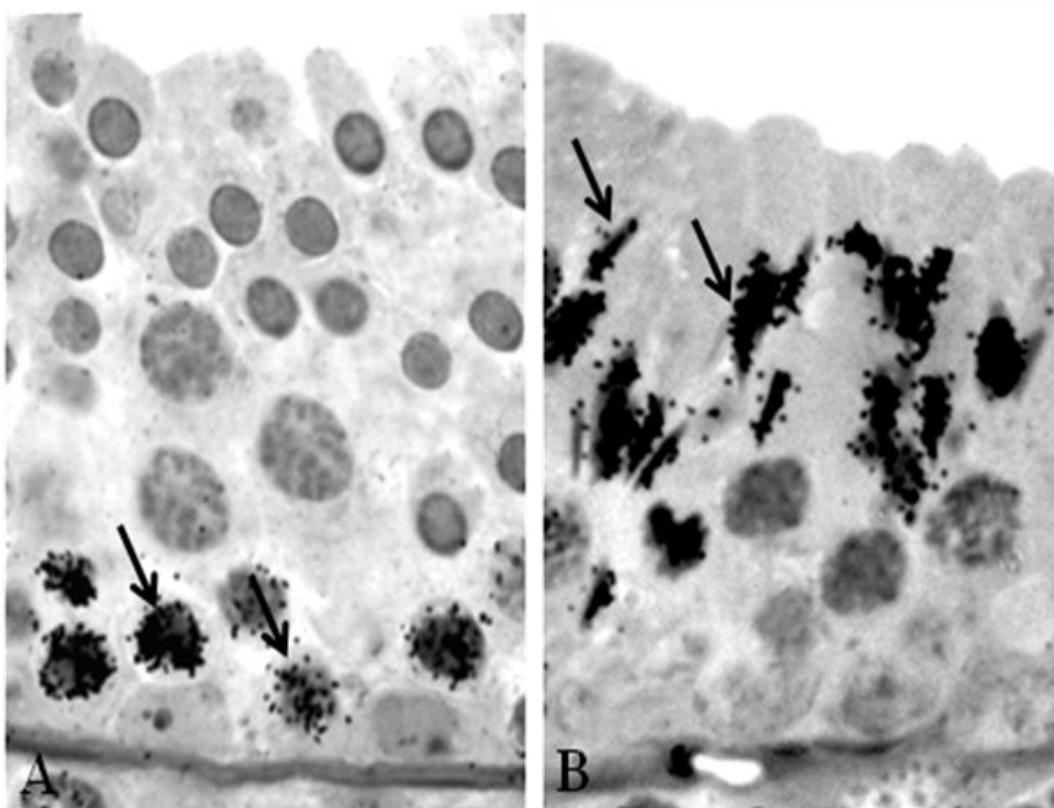


Figura 3 - Células germinativas marcadas mais avançadas encontradas nos dois intervalos de tempo utilizados após a injeção intraperitoneal de timidina triciada em *T. moojeni*: (A) uma hora após a injeção, espermatócitos em pré-leptóteno/leptóteno (setas) no início do estágio VIII; (B) vinte dias após a injeção, espermátides alongadas (setas) no início do estágio XII.

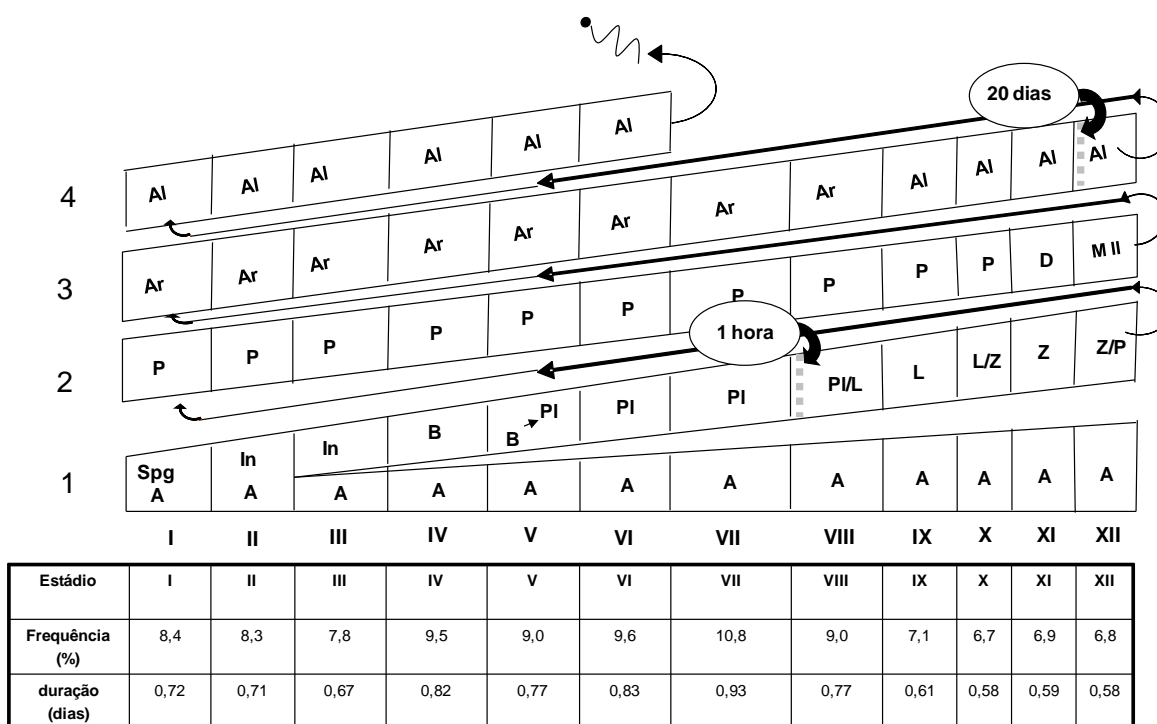


Figura 4 - Diagrama mostrando a composição de células germinativas, frequência (%) e duração (em dias) de cada estágio do ciclo do epitélio seminífero em *T. moojeni*. Também representada está a célula germinativa marcada mais avançada nos doze estádios do ciclo nos dois intervalos (1 hora e 20 dias) utilizados após a injeção de timidina triciada. O espaço para cada estágio é proporcional a sua frequência e duração. As letras inseridas em cada coluna indicam o tipo de célula germinativa presente em cada estágio do ciclo. Letras presentes em cada coluna indicam os tipos de células germinativas que compõem cada estágio do ciclo. A, espermatogônia do tipo A; In, espermatogônia intermediária; B, espermatogônia do tipo B; Pl, pré-leptóteno; L, leptóteno; Z, zigóteno; P, paquíteno; D, diplóteno; II, espermátocito secundário; Ar, espermátides arredondadas; e Al, espermátides em alongamento/alongadas.

7- TABELAS

Tabela 1 - Dados biométricos e morfométricos (média \pm EPM).

Parâmetros (n=10)	
Peso corporal (g)	207 \pm 9
Peso testicular médio (g)	0,97 \pm 0,06
Testículo direito	0,94 \pm 0,06
Testículo esquerdo	0,99 \pm 0,07
Índice gonadossomático (%)	0,93 \pm 0,03
Proporção volumétrica do parênquima testicular (%)	
Compartimento tubular	97,6 \pm 0,3
Túnica própria	3,1 \pm 0,2
Epitélio seminífero	89,9 \pm 0,4
Lume	4,6 \pm 0,3
Compartimento intertubular	2,4 \pm 0,05
Células de Leydig	0,3 \pm 0,02
Vasos sanguíneos	1,5 \pm 0,2
Espaço linfático	0,4 \pm 0,08
Outros	0,2 \pm 0,05
Túnica albugínea (%)	3,1 \pm 0,1
Diâmetro tubular (μ m)	172 \pm 3
Altura do epitélio seminífero (μ m)	67 \pm 2
Comprimento tubular por grama de testículo (metros)	39 \pm 1,5
Comprimento tubular total por testículo (metros)	38 \pm 2

Tabela 2 - Duração (dias) média (\pm EPM) do ciclo do epitélio seminífero.

Animal	Intervalo após a injeção	Estádio e célula germinativa marcada mais avançada	Número de ciclos percorridos	Duração do ciclo baseada na marcação em pré-leptóteno/leptóteno
1	1 hora	VIII – Pl ^a	2,28	8,7 dias
	19,82 dias ^c	XII – Al ^b		
2	1 hora	VIII – Pl ^a	2,35	8,45 dias
	19,85 dias ^c	XII – Al ^b		
Duração média do ciclo baseada em Pl/L = 8,6 \pm 0,1 dias				

^a Pl: espermatócitos primários em pré-leptóteno.

^b Al: espermátides alongadas

^c Tempo total após a injeção de timidina menos 1 hora

Tabela 3 - Contagem celular, razões celulares e produção espermática (média \pm EPM).

Parâmetros (n=10)	
Espermátides arredondadas : Espermatócitos em paquíteno	3 \pm 0,2
Espermátides arredondadas : Nucléolo de célula de Sertoli	14,7 \pm 0,9
Número de células de Sertoli por grama de testículo (milhões)	53 \pm 3
Número de células de Sertoli por testículo (milhões)	51 \pm 4
Produção espermática diária por grama de testículo (milhões)	82 \pm 6
Produção espermática diária por testículo (milhões)	80 \pm 6

Tabela 4 - Morfometria das células de Leydig (média \pm EPM).

Parâmetros (n=10)	
Diâmetro nuclear (μm)	6,7 \pm 0,1
Volume das células de Leydig (μm^3)	799 \pm 26
Volume nuclear (μm^3)	155 \pm 6
Volume citoplasmático (μm^3)	644 \pm 26
Número de células de Leydig por testículo (milhões)	3,7 \pm 0,05
Número de células de Leydig por grama de testículo (milhões)	3,8 \pm 0,05

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERCROMBIE, M. Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat. Rec.* 94, 239-247, 1946.

ALMEIDA, F.F.; LEAL, M.C.; FRANÇA, L.R. Testis morphometry, duration of spermatogenesis, and spermatogenic efficiency in the wild boar (*Sus scrofa scrofa*). *Biol. Reprod.*, 75, 792-799, 2006.

AMANN, R.P. Reproductive capacity of dairy bulls. III. The effect of ejaculation frequency, unilateral vasectomy, and age on spermatogenesis. *Am J Anat.* 110, 49-67, 1962.

AMANN, R.P.; SCHANBACHER, B.D. Physiology of male reproduction. *J Anim Sci.* 57, 380-403, 1983.

AMANN, R.P., ALMQUIST, J.O. Reproductive capacity of dairy bulls. VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. *J. Dairy Sci.* 45, 774-781, 1962.

BUNDY, D.C. Photographic emulsions and processing. In: STUMPF, W.E., SOLOMON, H.F. (Eds.), *Autoradiography and correlative imaging*. Academic Press, San Diego, pp. 49-57, 1995.

CATZEFLIS, F., PATTON, J., PERCEQUILLO, A., BONVICINO, C., WEKSLER, M. *Trinomys moojeni*. In: *IUCN Red List of Threatened Species*, 2008.

CLERMONT, Y., 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renew. *Physiol Rev.* 52, 198-236.

CORDEIRO JR, D. A., TALAMONI, S. A. New data on the life history and occurrence of spiny rats *Trinomys moojeni* (Rodentia: Echimyidae), in southeastern Brazil. *Acta Theriol* 51, 163-168, 2006.

EDDY, E.M., O'BRIEN, D.A. The spermatozoon. In: Knobil, E., Neil, J.D. (Eds.), *The physiology of reproduction*. Raven, New York, pp. 29-77, 1994.

EMMONS, L.H., FEER, F. *Neotropical rain forest mammals*. University of Chicago Press, Chicago, 1990.

FONSECA, G.A.B., HERRMANN, G., LEITE, Y.L.R., MITTERMEIER, R.A., RYLANDS, A.B., PATTON, J.L. Lista anotada dos mamíferos do Brasil. *Occasional Papers in Conservation Biology*. 4, 1-38, 1996.

FRANÇA, L.R. Daily sperm production in Piau boars estimated from Sertoli cell population and Sertoli cell index, In: Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, pp. 1716-1718, 1992.

FRANÇA, L.R., AVELAR, G.F., ALMEIDA, F.F. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*. 63, 300-318, 2005.

FRANÇA, L.R., OGAWA, T., AVARBOCK, M.R., BRINSTER, R. L., RUSSELL, L. D. Germ cell genotype control cells cycle during spermatogenesis in the rat. *Biol. Reprod.* 59, 1371-1377, 1998.

FRANÇA, L.R., RUSSEL, L.D. The testis of domestic animals, In: REGADERA, J., MARTINEZ-GARCIA, F. (Eds.), *Male reproduction: a multidisciplinary overview*. Churchill Livingstone. Madrid., pp. 197-219, 1998.

HESS, R.A., FRANCA, L.R. Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium, In: CHENG, C.Y. (Eds), *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*. Landes Bioscience., NewYork, pp. 1-15, 2007.

HOCHEREAU-DE-REVIERS, M.T., LINCOLN, G.A. Seasonal-variation in histology of testis of red deer, *cervus-elaphus*. *J. Reprod. Fertil.* 54, 209-213, 1978.

JOHNSON, L., NEAVES, W.B. Age-related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules and sperm production in stallions. *Biol Reprod.* 24, 703-712, 1981.

KENAGY, G.J., TROMBULAK, S.C. Size of mammalian testes in relation to body size. *J. Mammal.* 67, 1-22, 1986.

LAGE, R.R., SCHMIDT, E.M.S. Rodentia – Roedores Silvestres (Capivara, Cutia, Paca, Ouriço), In: CUBAS, Z.S., SILVA, J.C.R., CATÃO-DIAS, J.L. (Eds.), *Tratado de Animais Selvagens Medicina Veterinária*. Roca, São Paulo, pp. 475-491, 2007.

LEAL, M.C., FRANÇA, L.R. Postnatal Sertoli and Leydig cell proliferation and the establishment of puberty and sexual maturity in *Chinchilla lanigera* (Rodentia, Chinchillidae). *Reprod Fertil Dev.* 20, 665-673, 2008.

LEAL, M.C., FRANCA, L.R. Slow increase of Sertoli cell efficiency and daily sperm production causes delayed establishment of full sexual maturity in the rodent *Chinchilla lanigera*. *Theriogenology*. 71, 509-518, 2009.

LUNSTRA, D.D., SCHANBACHER, B.D. Testicular function and Leydig cell ultrastructure in long-term bilaterally cryptorchid rams. *Biol Reprod.* 38, 211-20, 1988.

MOOJEN, J. Os Roedores do Brasil. Ministério da Educação e Saúde, Instituto Nacional do Livro, Rio de Janeiro, 1952.

MYERS, N., R. A. MITTERMEIER, C. G. MITTERMEIER, G. A. B. DA FONSECA, AND J. KENT. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*. 403, 853-858, 2000.

NEVES, E.S., CHIARINI-GARCIA, H., FRANÇA, L.R. Comparative testis morphometry and seminiferous epithelium cycle length in donkeys and mules. *Biol Reprod*. 67, 247-255, 2002.

NÓBREGA, R.H., BATLOUNI, S.R., FRANÇA, L.R. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. *Fish Physiol Biochem*. 35, 197-206, 2009.

NOWAK, R.M. *Walker's Mammals of the World*, sixth ed. Baltimore, John Hopkins University Press, 1999.

OLIVEIRA, J.A., BONVICINO, C.R. Ordem Rodentia, In: REIS, N.R., PERACCHI, A.L. PEDRO, W.A., LIMA, I.P. (Eds.). *Mamíferos do Brasil*. Imprensa da UEL, Londrina, pp. 347-406, 2006.

PAULA, T.A., CHIARINI-GARCIA, H., FRANÇA, L.R. Seminiferous epithelium cycle and its duration in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). *Tissue Cell*. 31, 327-334, 1999.

PESSOA, L. M., OLIVEIRA, J. A., REIS, S. F. A New Species of Spiny Rat Genus *Proechimys*, Subgenus *Trinomys* (Rodentia:Echimyidae). *Mamm. Biol*. 57, 39-46, 1992.

ROCHA, D.C., DEBELJUK, L., FRANÇA, L.R. Exposure to constant light during testis development increases daily sperm production in adult Wistar rats. *Tissue Cell*. 31, 372-379, 1999.

ROOSEN-RUNGE, E.C. Germinal-cell loss in normal metazoan spermatogenesis. *J. Reprod. Fertil*. 35, 339-348, 1973.

RUSSELL, L. D. Mammalian Leydig cell structure. In: Payne, A. H., Hardy, M. P., Russell, L. D. (Eds.), *The Leydig cell*. Cache River Press. Vienna, IL, 1996.

SHAHA, C. Modulators of spermatogenic cell survival. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl*. 63, 173-186, 2007.

SHARPE, R.M. Regulation of spermatogenesis, In: KNOBIL, E., NEIL, J.D. (Eds.), *The physiology of reproduction*. Raven Press, New York, pp. 1363-1434, 1994.

SPRANDO, R.L. Perfusion of rat testis through the heart using heparin, in: Russel, L.D., Ettlin, A.P.S., Cleeg, E.D. (Eds.), *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*, Cache River Press, Clearwater, pp. 277-280, 1990.

WILDT, D. E. Lions, Tigers, and Pandas, *Oh My*. *J. androl*. 26, 452-454, 2005

CAPÍTULO II

ESTUDO COMPARADO DA ESTRUTURA E FUNÇÃO TESTICULARES EM ROEDORES SILVESTRES (*Akodon cursor*, *Akodon montensis*, *Necromys lasiurus* e *Oligoryzomys nigripes*) DA FAMÍLIA CRICETIDAE

RESUMO

Por sua diversidade e pela facilidade de serem amostrados sistematicamente, os roedores silvestres tornaram-se modelos muito úteis para o estudo de fatores que afetam a diversidade de espécies e as interações ecológicas fundamentais para a manutenção da biodiversidade de uma determinada área. A Reserva Particular do Patrimônio Natural do Caraça, localizada no estado de Minas Gerais, é uma região caracterizada por zona de contato entre os biomas do Cerrado e da Mata Atlântica. Esta região apresenta como característica marcante uma grande diversidade de mamíferos, particularmente pequenos mamíferos da ordem Rodentia, tais como *Akodon cursor*, *Akodon montensis*, *Necromys lasiurus* e *Oligoryzomys nigripes*. Apesar de serem frequentemente capturadas em trabalhos de campo realizados no Cerrado e Mata Atlântica, existem poucos estudos envolvendo a biologia reprodutiva dessas quatro espécies de roedores silvestres pertencentes à família Cricetidae. Dessa forma, o presente estudo teve como principais objetivos investigar, comparativamente, parâmetros biométricos e morfométricos testiculares, bem como estimar a duração do ciclo do epitélio seminífero (CES) e quantificar a espermatogênese desses roedores. Trinta e nove animais das quatro espécies mencionadas foram utilizados conforme segue: *A. cursor* (n = 6); *A. montensis* (n = 9); *N. lasiurus* (n = 13) e *O. nigripes* (n = 11). Os testículos foram fixados por perfusão em glutaraldeído e rotineiramente processados para análises histológicas e morfométricas, bem como para a caracterização dos estádios do CES, de acordo com o desenvolvimento do sistema acrossômico. Adicionalmente, injeções intraperitoneais de timidina triciada foram administradas em dois animais de cada espécie para se estimar a duração da espermatogênese. Com exceção do *O. nigripes*, em comparação com a maioria das espécies de mamíferos investigadas até o presente momento, o índice gonadosomático observado (0,8-1,1%) nas três outras espécies

foi bastante elevado. Doze estádios do ciclo foram caracterizados para todas as espécies e a morfologia das células germinativas, bem como as frequências das fases pré- e pós-meióticas, foram semelhantes entre si e também em relação a grande maioria das outras espécies da subordem Myomorpha. As durações, em dias, de um ciclo espermatogênico e total da espermatogênese em *A. cursor*, *A. montensis*, *N. lasiurus* e *O. nigripes* foram, respectivamente, $8,4 \pm 0,1$ e $38 \pm 0,4$; $8,9 \pm 0,04$ e $40 \pm 0,2$; $7,8 \pm 0,02$ e $35 \pm 0,1$; $7,9 \pm 0,1$ e $36 \pm 0,4$. Valores estes dentre os mais baixos para mamíferos. Em todas as quatro espécies aqui investigadas o percentual de túbulos seminíferos (96-97%) foi bastante alto, situando-se no patamar mais elevado dentre as espécies de mamíferos já estudadas. O oposto ocorreu para o percentual (1-2%) e número de células de Leydig (14-17 milhões) por grama de testículo. Este último, exceto para *O. nigripes* (~35 milhões). Baseado no número de espermátides encontrado por célula de Sertoli (~8-13) pode se considerar que a eficiência das células de Sertoli nestes roedores foi de moderada a alta. No entanto, a eficiência espermatogênica (~60-80 milhões) nestas quatro espécies foi bastante elevada e, dentre as diversas espécies de mamíferos já investigadas, ficou somente abaixo da outra espécie de roedor (*T. moojeni*; ~80 milhões) também previamente investigada. Esta acentuada produção espermática por grama de testículo deveu-se principalmente ao alto percentual de túbulos seminíferos e curta duração da espermatogênese, conforme já aventado, e a numerosa população de células de Sertoli (~50-70 milhões) por grama de testículo observada para estas espécies. Os resultados encontrados no presente estudo, principalmente para a eficiência espermatogênica, sugerem que, provavelmente pelo fato de apresentarem um curto ciclo de vida, para garantir a sua sobrevivência, estas espécies devem se reproduzir de forma eficaz. Esses resultados poderão contribuir para o melhor entendimento da biologia reprodutiva destas espécies de roedores neotropicais, bem como para a elaboração de programas de manejo e conservação da fauna silvestre da Mata Atlântica e do Cerrado.

Palavras-chave: testículo, espermatogênese, célula de Sertoli; célula de Leydig;; pequenos mamíferos, *Akodon cursor*, *Akodon montensis*, *Necromys lasiurus*, *Oligoryzomys nigripes*.

1- INTRODUÇÃO

Por sua diversidade e pela facilidade de serem amostrados sistematicamente, os roedores silvestres tornaram-se modelos muito úteis para o estudo de fatores que afetam a diversidade de espécies em uma determinada área. De maneira geral, esses roedores são animais que pouco se dispersam, e não possuem a capacidade de ultrapassar barreiras ambientais. Além disso, requerem áreas relativamente pequenas para manterem populações viáveis, facilitando o trabalho de amostragem (Lizzaralde et al., 1986, Herrmann, 1991).

As espécies investigadas nesse capítulo pertencem à família Cricetidae, que é a família mais diversificada de roedores do Brasil, com 117 espécies e 36 gêneros, todos agrupados em uma única subfamília neotropical, Sigmodontinae (Oliveira e Bonvicino, 2006). Quatro espécies de roedores, frequentemente capturadas em estudos na Mata Atlântica e/ou no Cerrado foram analisadas (*Akodon cursor*, *Akodon montensis*, *Necromys lasiurus* e *Oligoryzomys nigripes*).

A espécie *Akodon cursor* ($2n=14$) é encontrada em vários tipos de habitats, porém essa espécie é mais comumente observada em florestas semi-decíduas. *A. cursor* também apresenta o particionamento espacial, nesse tipo de vegetação, com *Akodon montensis* ($2n=24$). A primeira espécie citada é, geralmente, encontrada em altitudes de até 800 metros, enquanto a segunda é capturada, na maioria das vezes, em elevações que excedem 800 metros. (Redford e Eisenberg, 1992; Gentile, 2000; Patton e Smith, 2001). As espécies de *Akodon* têm hábito terrestre e são insetívoras-onívoras, e os artrópodes e sementes também estão incluídos em sua dieta (Graipel et al., 2003). O *Necromys lasiurus* ($2n=33$) ou *Pixuna* é mais frequentemente encontrado em áreas de domínio de cerrado e suas derivações e em ecotónos Mata Atlântica (Vieira e Baumgarten, 1995). As espécies de *Necromys* têm tamanho pequeno e cauda menor que o corpo (Bonvincino et al., 2005) e possuem hábito alimentar onívoro-granívoro (Vieira e Baumgarten, 1995). Um anel periocular com pelos mais claros está presente em cada olho e é característica marcante da espécie (Oliveira e Bonvicino, 2006). O *Oligoryzomys nigripes* ou ratinho-do-arroz ($2n=62$) é uma espécie de roedor pequena e de hábito terrestre, com capacidade de escalar e que apresenta a cauda bem maior que o corpo. O gênero é comum em formações vegetais

abertas do Cerrado, Mata Atlântica, Floresta Amazônica, Pantanal e Caatinga (Bueno, 2003).

Em todos os vertebrados, com exceção dos peixes cartilagosos (Sourdaine, 1992), o parênquima testicular é composto pelos compartimentos tubular e intertubular (Amann, 1986; Russell et al. 1990; Russell e França 1995). O compartimento dos túbulos seminíferos é constituído pela túnica própria, onde se encontram as células peritubulares mióides, lâmina basal, epitélio seminífero e lume. Por outro lado, no compartimento intertubular encontram-se os vasos sanguíneos e linfáticos, macrófagos, células e fibras do tecido conjuntivo e células de Leydig, cuja principal função é a secreção de andrógenos. Particularmente, o epitélio seminífero é formado pela associação do componente somático, a célula de Sertoli, com o componente germinativo, as células espermatogênicas, que se encontram em diferentes fases de desenvolvimento. Portanto, a principal função deste epitélio é a formação do gameta masculino, o espermatozóide (Setchell e Breed 2006; Hess e França 2007). No entanto, para que ocorra a formação deste gameta há a necessidade de uma orquestrada interação entre os diferentes componentes do testículo, principalmente entre as células germinativas e os componentes somáticos tais como as células de Sertoli, células mióides e células de Leydig (Russell et al. 1994, França e Russell 1998).

Devido às freqüentes variações na citoarquitetura dos diversos componentes do testículo, o estudo das proporções volumétricas das diferentes estruturas que o compõem, bem como, por exemplo, de outros parâmetros tais como números e índices celulares, fornecem dados importantes para a avaliação da função testicular de diferentes espécies, possibilitando ainda o melhor entendimento de eventuais estratégias reprodutivas e especificidades na fisiologia da reprodução de cada uma delas (França 1991, França e Godinho 2003, Leal e França 2006, Costa et al. 2008, Leal e França 2008). Por exemplo, vários trabalhos na literatura demonstram que a eficiência das células de Sertoli é um dos principais fatores na determinação da produção espermática diária por grama de testículo (eficiência espermatogênica). Portanto, o número total destas células, em última análise, determina o tamanho do testículo e a magnitude da produção espermática (França et al. 1995, França e Russell 1998, Kerr et al. 2006, Leal e França 2006, Hess e França 2007, Costa et al. 2008, Leal e França 2008). Por outro lado, o percentual ocupado pelas células

de Leydig no compartimento intertubular é um forte indicativo acerca de quanto uma determinada espécie investe, por exemplo, em dominância ou demarcação territorial (Hart e Eckstein, 1997; Paula, 1999).

O conhecimento comparativo e evolutivo da função reprodutiva é fundamental para a elaboração de políticas de manejo e conservação, porém embora diversos estudos demonstrem as marcantes diferenças existentes na biologia reprodutiva das espécies de mamíferos já investigadas (França et al, 2005; Setchell e Breed, 2006), temos uma tendência de focar virtualmente toda a nossa atenção e nossos recursos num total de 15 espécies, acreditando e supondo erroneamente que os mecanismos reprodutivos são razoavelmente uniformes para todas elas (Wildt, 2005). Com a finalidade de se contextualizar os diversos parâmetros usualmente investigados do ponto de vista morfofuncional e quantitativo do testículo, particularmente do processo espermatogênico, as tabelas 1 e 2 apresentam dados referentes à biologia reprodutiva de várias espécies de mamíferos estudadas até o momento.

Apesar de frequentemente capturadas em trabalhos de campo realizados no Cerrado e Mata Atlântica, são poucos os estudos envolvendo a biologia reprodutiva dessas quatro espécies de roedores silvestres (Parreira e Cardoso, 1991; Couto e Talamoni, 2000; Duarte, 2003; D'elia, 2008). Dessa forma, o presente estudo teve como principais objetivos investigar comparativamente parâmetros biométricos e morfométricos testiculares, bem como estimar a duração do ciclo do epitélio seminífero e quantificar a espermatogênese desses animais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1- Animais

Para a realização do presente estudo foram utilizados testículos das espécies *A. cursor* (n = 6), *A. montensis* (n = 9), *N. lasiurus* (n = 13) e *O. nigripes* (n = 11), sexualmente maduros. Para a captura desses roedores foram utilizadas 130 armadilhas de arame galvanizado de captura-viva (31x15x15cm). Os postos de coleta foram instalados em três transectos paralelos com trinta armadilhas em cada um. Inicialmente as armadilhas foram instaladas em uma área de mata estacional semidecídua, e as mesmas foram posteriormente

transferidas para área de cerrado. Como iscas foram utilizados banana e creme de amendoim. As coletas ocorreram em quatro noites mensais durante 12 meses.

2.2- Injeções de timidina triciada

No procedimento de injeção do radioisótopo, os animais foram contidos e receberam injeções intraperitoneais de timidina triciada em solução aquosa estéril (Thymidine [6-3H], atividade específica de 3,03 TBq/m mol 82,0 Ci/m mol, Amersham Life Science, England), na concentração de 1,0 mCi/mL. Esta solução foi injetada diretamente na cavidade peritoneal utilizando-se agulha hipodérmica descartável do tipo insulina (13 x 3,8). Aproximadamente 1µci foi injetado para cada grama de peso corporal. A colheita do material para o processamento autorradiográfico foi feita em dois diferentes tempos, após a injeção do radioisótopo (Tab. 6). Dois animais de cada espécie foram utilizados para cada tempo investigado.

2.3- Colheita dos testículos e processamento do material

Na época programada para o sacrifício, os animais foram pesados e, em seguida, receberam injeções via intraperitoneal contendo heparina (125 UI/Kg/ de peso corporal). Após quinze minutos, estes animais foram anestesiados com pentobarbital (50mg por kg de peso corporal) e perfundidos através do ventrículo esquerdo com solução salina a 0,9% durante 3-5 minutos, e posteriormente fixados com glutaraldeído a 4% em tampão fosfato (0,05M – pH 7,2-7,4), por aproximadamente 25 minutos. Após este procedimento, os testículos foram retirados e separados do respectivo epidídimo e pesados. A partir dos pesos testicular e corporal, foi estimado o índice gonadossomático (relação percentual entre a massa testicular e o peso corporal) para cada animal. No momento da pesagem dos testículos, a túnica albugínea foi retirada e pesada tendo o seu percentual estimado em relação ao testículo. O valor percentual médio obtido nesta abordagem foi utilizado para a medida do peso líquido do testículo, parâmetro este importante na determinação da produção espermática diária por grama de testículo (eficiência espermatogênica).

Para as análises microscópicas foram colhidos fragmentos do testículo com até 3 mm de espessura. Após este procedimento, os fragmentos foram armazenados em tampão fosfato a 4 °C. Estes fragmentos foram posteriormente desidratados em concentrações

crescentes de etanol (70°, 80°, 90° e 100°) com trocas a cada trinta minutos. Após a desidratação, os fragmentos foram incluídos em resina plástica à base de glicol metacrilato (Leica Historesin Embedding Kit, Leica Instruments), sendo posteriormente seccionados na espessura de 4µm, em micrótomo com navalhas de vidro. As secções obtidas foram coradas com azul de toluidina-borato de sódio a 1% e PAS-hematoxilina e montadas com Entellan (Merck), e analisadas em microscópio Olympus.

Para as análises autorradiográficas, os fragmentos de testículo coletados foram processados conforme descrito previamente. As secções histológicas obtidas não coradas foram submetidas ao processo de emulsão em câmara escura. Assim, as lâminas contendo os cortes foram imersas em cubetas contendo emulsão autorradiográfica Kodak NTB-2 (Eastman Kodak Co, Rochester, NY, EUA), mantida líquida em banho-maria a 45 °C. Após cerca de 1 hora, ainda em câmara escura e à temperatura ambiente, os cortes já secos foram acondicionados em caixas de lâminas à prova de luz e armazenados a 4 °C, durante cerca de quatro semanas, tempo suficiente para que o radioisótopo sensibilize os grãos de prata da emulsão. Após o tempo citado procedeu-se a revelação das secções histológicas em câmara escura utilizando-se solução aquosa (1:1) do revelador Kodak D-19 (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, E.U.A.) (Bundy 1995) por 4 minutos. Os cortes foram lavados por alguns segundos em água destilada e fixados em fixador Kodak F5, por 5 minutos. Após serem imersas por cinco minutos em água destilada, para retirada do fixador, as lâminas contendo os cortes foram secas à temperatura ambiente, sendo então coradas com azul de toluidina. Todas as etapas, desenvolvidas em câmara escura (revelação, banhos com água destilada e fixação), foram realizadas à temperatura de 15 °C. A análise das células marcadas mais adiantadas em cada tempo após a injeção foi feita em microscópio, no aumento de 400x. As células foram consideradas marcadas quando quatro ou mais grãos estavam presentes no núcleo, na presença de “background” fraco a moderado.

2.4- Estádios e duração do ciclo do epitélio seminífero (CES).

Os estádios do CES foram caracterizados de acordo com o desenvolvimento do sistema acrossômico e a morfologia do núcleo das espermátides em desenvolvimento (Leblond e Clermont, 1952; Russell et al., 1990). As frequências relativas de cada um dos doze estádios caracterizados foram determinadas avaliando-se 150 secções transversais de

túbulos seminíferos, por animal, em aumento de 400x. As medidas dos ângulos dos acrossomas sobre a superfície nuclear foram obtidas em 15 células germinativas (por animal e por estágio do ciclo) em aumento de 1000x. As secções histológicas avaliadas neste estudo foram aquelas que apresentaram melhor qualidade e o maior número de túbulos em secções transversais. A duração do ciclo espermatogênico foi estimada com base nas frequências relativas dos diferentes estádios e das células germinativas marcadas mais avançadas encontrada após a injeção de timidina triciada (nos diferentes tempos) em dois animais de cada espécie. A duração total do processo espermatogênico levou em conta que são necessários 4,5 ciclos espermatogênicos para que este processo seja concluído, desde espermatogônias do tipo A até a espermição (Amann e Schanbacher 1983). Como o volume do núcleo do espermatócito primário em paquíteno cresce de forma contínua durante a prófase meiótica e estas células estão presentes em quase todos os estádios do ciclo (França e Russell, 1998; Neves et al., 2002), o tamanho dos seus núcleos foi utilizado como ponto de referência, com o objetivo de se determinar de forma mais precisa a localização da célula germinativa marcada mais avançada.

2.5- Análise morfométrica do testículo

2.5.1- Diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero

O diâmetro tubular médio por animal foi obtido a partir da mensuração ao acaso de 30 secções transversais de túbulos seminíferos apresentando contorno o mais circular possível, utilizando-se ocular micrométrica de 10x, com aumento final de 100x. Nas mesmas secções utilizadas para se medir o diâmetro tubular foi mensurada a altura do epitélio seminífero, a qual foi tomada da membrana basal até a borda luminal. O valor encontrado para a altura do epitélio em cada túbulo foi representado pela média de duas medidas tomadas de forma diametralmente opostas.

2.5.2- Proporções volumétricas (%) e volumes dos componentes do testículo

As proporções volumétricas foram estimadas utilizando-se retículo com 441 intersecções (pontos) por campo, em aumento de 400x. Para cada animal foram analisados 15 campos, escolhidos ao acaso, perfazendo um total de 6615 pontos. Do compartimento tubular foram avaliados túnica própria, epitélio seminífero e Lume; enquanto do

compartimento intertubular foram analisados células de Leydig, células e fibras do tecido conjuntivo, e vasos sanguíneos e linfáticos. O volume de cada componente testicular, expresso em mL, foi estimado a partir do conhecimento do volume líquido do testículo. O valor deste último foi obtido subtraindo-se do peso bruto do testículo o peso da túnica albugínea. Como a densidade do testículo é muito próxima de 1 (1,03 a 1,04; França, 1991), o peso do testículo (g) foi considerado igual ao seu volume (mL).

2.5.3- Comprimento total dos túbulos seminíferos

O comprimento total dos túbulos seminíferos (CT) por testículo, expresso em metros, foi estimado a partir do conhecimento do volume ocupado pelos túbulos seminíferos no testículo, e do diâmetro tubular médio obtido para cada animal. A seguinte fórmula foi empregada (Attal e Courot, 1963; Dorst e Sajonski, 1974):

$$CT=VTS/\pi R^2$$

Onde, VTS é o volume total dos túbulos seminíferos no testículo, e πR^2 é a área da secção transversal de túbulos seminíferos ($R = \text{diâmetro tubular}/2$). O comprimento de túbulo seminífero por grama de testículo corresponde à razão entre o comprimento tubular total e o peso líquido do testículo.

2.5.4- População de células espermato gênicas e de células de Sertoli

As contagens dos diferentes tipos celulares investigados foram obtidas em 10 secções transversais de túbulos seminíferos por animal, com perfis o mais arredondado possíveis, no estágio imediatamente após a espermiacão (estádio VIII), em aumento de 400x. Os seguintes tipos celulares foram quantificados:

- Espermatócitos primários em paquíteno.
- Espermátides arredondadas.
- Células de Sertoli (com a presença do nucléolo).

Todos os números celulares da linhagem espermatogênica obtidos foram corrigidos para o diâmetro nuclear e espessura do corte histológico, utilizando-se a fórmula de Abercrombie (1946), modificada por Amann e Almquist (1962), conforme segue:

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

O diâmetro nuclear médio (DM) representa a média dos diâmetros de 10 núcleos de células germinativas por estágio e por animal. Estes diâmetros foram medidos com o auxílio de ocular micrométrica de 10x, acoplada à objetiva de 100x, propiciando aumento final de 1000x.

As contagens de células de Sertoli foram corrigidas para o diâmetro nucleolar e espessura dos cortes histológicos, utilizando-se para isto a mesma metodologia empregada para a correção do número de células germinativas. Para isso, foram quantificadas somente células de Sertoli com nucléolo visível, os quais tiveram seus diâmetros medidos da mesma forma citada para as células germinativas.

2.5.5- Razões entre números celulares

Com o objetivo de se estimar a eficiência do processo espermatogênico e da célula de Sertoli as razões entre os números corrigidos de células espermatogênicas e entre estas últimas e as células de Sertoli foram estimadas, no estágio VIII do CES.

2.5.6- Número de células de Sertoli por testículo

O número de células de Sertoli por testículo foi estimado a partir do número corrigido de nucléolos de células de Sertoli por secção transversal de túbulo seminífero e do comprimento total de túbulos seminíferos por testículo, segundo a fórmula empregada por

Hochereau-de Reviers e Lincoln (1978). A partir deste cálculo, foi também estimado o número de células de Sertoli por grama de testículo.

2.5.7- Volume individual das células de Leydig e número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo

O cálculo do volume individual das células de Leydig foi investigado empregando-se retículo com 441 intersecções (pontos), em aumento de 400x. Mil pontos sobre o citoplasma e o núcleo das células de Leydig foram contados por animal, com a finalidade de se determinar a proporção (%) entre núcleo e citoplasma. Em outra etapa, o diâmetro nuclear médio destas células foi obtido com o auxílio de ocular micrométrica 10x acoplada à objetiva de 100x, resultando em aumento final de 1000x. Trinta núcleos de células de Leydig foram medidos em cada animal. Os núcleos medidos foram aqueles que se apresentaram arredondados e com cromatina perinuclear e nucléolos bastante evidentes. A partir dos dados acima obtidos e aplicando-se as fórmulas abaixo, foram calculados o volume nuclear, o volume do citoplasma e, conseqüentemente, o volume de cada célula de Leydig por animal. Estes valores foram expressos em micrômetros cúbicos.

$$\text{Volume nuclear} = 4/3\pi R^3, \text{ onde } R = \text{raio nuclear}$$

$$\text{Volume citoplasmático} = \% \text{ citoplasma} \times \text{volume nuclear} / \% \text{ núcleo}$$

$$\text{Volume celular} = \text{volume nuclear} + \text{volume citoplasmático}$$

De posse do volume (μm^3) das células de Leydig, da proporção volumétrica (%) das mesmas no testículo, e do volume total (mL) ocupado por estas células no testículo, foi calculado o número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo, em cada animal.

2.5.8- Cálculo da produção espermática diária por testículo e por grama de testículo

Esta estimativa foi feita de acordo com França (1992), utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{PED} = \frac{\text{Número total de células de Sertoli por testículo} \times \text{ICS} \times \text{freq. do estágio VIII}(\%)}{\text{Duração do estágio VIII (dias)}}$$

3- RESULTADOS

3.1- Biometria

Os dados biométricos e o índice gonadosomático (IGS) das quatro espécies de roedores avaliadas estão apresentados na tabela 3. Conforme pode ser observado nessa tabela, os maiores e menores pesos testiculares e IGS foram encontrados em *A. cursor* e *O. nigripes*, respectivamente. Apesar do *N. lasiurus* apresentar peso testicular médio maior que o *A. montensis*, o menor IGS observado para essa espécie ocorreu devido ao maior peso corporal encontrado para a mesma.

3.2- Análise morfométrica dos testículos

As análises morfométricas dos testículos das espécies de roedores estudadas estão mostradas na tabela 3, onde se observa o percentual ocupado pelos diversos componentes do parênquima testicular. Em todas as quatro espécies investigadas o percentual de túbulos seminíferos e do epitélio seminífero foi bastante elevado, ficando nos patamares de 95-97% e 85-87 %, respectivamente. Já os percentuais encontrados para as células de Leydig foram obviamente muito pequenos, particularmente para *A. montensis*, cujo percentual de células esteroideogênicas foi em torno de 1%. De maneira geral, os valores percentuais observados para túnica própria, lume tubular, vasos sanguíneos/linfáticos e demais componentes (outros) do testículo foram semelhantes para as quatro espécies de roedores investigadas (Tab. 3).

Ainda na tabela 3 podem ser observados os valores médios obtidos para o diâmetro dos túbulos seminíferos, altura do epitélio seminífero e comprimento tubular. Conforme está mostrado, valores muito próximos para estes parâmetros foram encontrados para *A. cursor*, *A. montensis* e *N. lasiurus*. Pelo fato de apresentar valor nitidamente inferior para o diâmetro tubular e peso testicular, *O. nigripes* apresentou maior e menor comprimento tubular por grama de testículo e por testículo, respectivamente.

3.3- Estádios do ciclo do epitélio seminífero e suas frequências

Todas as espécies de roedores estudadas apresentaram XII estádios, caracterizados de acordo com o sistema acrossômico. As associações celulares para esses estádios do ciclo do epitélio seminífero (CES) estão apresentadas nas figuras 1 a 4, enquanto a descrição detalhada dos mesmos está citada nas legendas dessas figuras. Merece ser ressaltado que a morfologia das células germinativas foi muito semelhante nas quatro espécies de roedores e em todas as espécies investigadas a espermição ocorreu no estágio VII. Desta forma, ao invés de descrevermos os doze estádios para cada uma das quatro espécies investigadas, o que certamente seria repetitivo e entediante, decidimos descrever cada um deles de forma unificada.

Estádio I - Duas gerações de espermátides estavam presentes nesse estágio: espermátides arredondadas recém formadas e espermátides alongadas. Nas espermátides arredondadas, os grânulos acrossômicos não puderam ser visualizados sob microscopia de luz. No entanto, o aparelho de Golgi perinuclear estava evidente. Espermatogônias do tipo A e espermatócitos primários em paquíteno inicial também foram observados no estágio I.

Estádio II – Nesse estágio, as espermátides arredondadas usualmente apresentavam uma pequena vesícula acrossômica, a qual, ao final do mesmo, mostrava a presença de grânulos acrossômicos em contato com o núcleo. Os outros tipos de células germinativas presentes neste estágio foram os espermatócitos primários em paquíteno, espermátides alongadas, que de maneira geral estavam um pouco mais próximas do lume tubular, e espermatogônias intermediárias em contato com a membrana basal.

Estádio III - Nesse estágio, as vesículas acrossômicas começavam a se espalhar levemente sobre a superfície dos núcleos das espermátides arredondadas. Estas vesículas acrossômicas em *A. cursor*, *A. montensis*, *N. lasiurus* e *O. nigripes* formavam, respectivamente, ângulos de aproximadamente $28 \pm 2^\circ$, $29 \pm 2^\circ$, $41 \pm 3^\circ$, e $44 \pm 2^\circ$, sobre a superfície nuclear. Espermatogônias intermediárias, espermatócitos primários em paquíteno, espermátides arredondadas e espermátides alongadas, foram observados. Estas últimas apresentavam os feixes celulares mais dissociados.

Estádio IV – Nesse estágio, os ângulos dos acrossomos sobre a superfície dos núcleos das espermátides foram de $33 \pm 1^\circ$, $34 \pm 1^\circ$, $44 \pm 2^\circ$ e $54 \pm 2^\circ$, em *A. cursor*, *A. montensis*, *N. lasiurus* e *O. nigripes*, respectivamente. Já os feixes de espermátides alongadas estavam mais próximos ainda do lume tubular. Junto à membrana basal, espermatogônias do tipo B eram observadas, enquanto espermatócitos primários em paquíteno e espermátides arredondadas, que apresentavam mais de uma camada celular, localizavam-se, respectivamente, na porção mais baixa e média superior do epitélio seminífero.

Estádio V – Os feixes de espermátides alongadas presentes neste estágio haviam se dissociado e estavam localizados muito próximos do lume tubular. Por outro lado, em *A. cursor*, *A. montensis*, *N. lasiurus* e *O. nigripes* os acrossomos formavam, sobre a superfície dos núcleos das espermátides arredondadas, ângulos de $41 \pm 3^\circ$, $44 \pm 3^\circ$, $54 \pm 2^\circ$ e $57 \pm 2^\circ$, respectivamente. Em contato com a membrana basal, as espermatogônias do tipo B encontravam-se em transição para pré-leptóteno. Espermatócitos primários em paquíteno e espermátides arredondadas apresentavam disposição semelhante ao estágio anterior.

Estádio VI - Duas gerações de espermatócitos primários estavam presentes neste estágio: espermatócitos em pré-leptóteno em contato com a lâmina basal (com exceção de *N. lasiurus* que apresentou espermatogônias do tipo B) e espermatócitos em paquíteno, posicionados entre as espermátides arredondadas e as células germinativas mais iniciais em contato com a membrana basal. Espermátides alongadas, cujos feixes estavam visivelmente dissociados e na proximidade da borda luminal, foram também observadas. Os ângulos dos acrossomos sobre a superfície dos núcleos das espermátides foram de $61 \pm 4^\circ$, $61 \pm 2^\circ$, $61 \pm 3^\circ$ e $73 \pm 2^\circ$ em *A. cursor*, *A. montensis*, *N. lasiurus* e *O. nigripes*, respectivamente.

Estádio VII - Espermátides alongadas, que nas quatro espécies investigadas apresentam suas cabeças (núcleos) em forma de foice, estavam na borda luminal ou sendo liberadas (espermíadas) no lume tubular. Corpos residuais resultantes do citoplasma das espermátides alongadas eram observados logo abaixo dos núcleos dessas células. Já as espermátides arredondadas formavam várias camadas na porção superior do epitélio seminífero e, sobre a superfície dos núcleos dessas células, em *A. cursor*, *A. montensis*, *N. lasiurus* e *O. nigripes*,

os acrossomos formavam, respectivamente, ângulos de $97 \pm 2^\circ$, $92 \pm 4^\circ$, $78 \pm 4^\circ$ e $83 \pm 2^\circ$. Também estavam presentes no estágio VII espermátocitos primários, na transição de pré-leptóteno/leptóteno, e espermátocitos primários em paquíteno. Particularmente em *O. nigripes*, os espermátocitos primários jovens encontravam-se ainda na fase de pré-leptóteno.

Estádio VIII - Apenas uma geração de espermátides estava presente nesse estágio. Os acrossomos localizados sobre a superfície dos núcleos das espermátides arredondadas formavam ângulos de $103 \pm 3^\circ$, $102 \pm 2^\circ$, $86 \pm 4^\circ$ e $93 \pm 4^\circ$, em *A. cursor*, *A. montensis*, *N. lasiurus* e *O. nigripes*, respectivamente. Em *N. lasiurus* e *O. nigripes* os espermátocitos primários jovens encontravam-se na transição de pré-leptóteno para leptóteno, enquanto nas duas espécies de *Akodon* estas células apresentavam-se na fase de espermátocitos primários em leptóteno. Estavam ainda presentes nesse estágio espermátocitos primários em paquíteno, os quais se localizavam entre as camadas de espermátides arredondadas e os espermátocitos primários mais jovens.

Estádio IX - Os núcleos das espermátides iniciavam seu processo de alongamento, tornando-se ovóides. O acrossomo acompanhou o processo de alongamento desses núcleos e os ângulos formados sobre a superfície dos mesmos foi de $105 \pm 4^\circ$, $111 \pm 2^\circ$, $95 \pm 5^\circ$ e $106 \pm 2^\circ$ em *A. cursor*, *A. montensis*, *N. lasiurus* e *O. nigripes*, respectivamente. Foram ainda observados nesse estágio espermátocitos primários em leptóteno, exceto em *O. nigripes* no qual estas células encontravam-se ainda em pré-leptóteno/leptóteno, e espermátocitos primários em paquíteno.

Estádio X - Nesse estágio, os núcleos das espermátides alongadas começavam a se agrupar em feixes e, acompanhando a modificação na forma do núcleo, o acrossomo formava um ângulo ventral sobre a cabeça dessas espermátides. A relação entre o eixo longitudinal ou o mais longo e o eixo menor em *A. cursor*, *A. montensis*, *N. lasiurus* e *O. nigripes* foi, respectivamente, $1,3 \pm 0,1$; $1,8 \pm 0,4$; $2,5 \pm 0,1$ e $1,5 \pm 0,1$. Outro aspecto que merece ser mencionado foi o início da polarização dos núcleos das espermátides alongadas, cujas cabeças (face acrossômica) estavam voltadas para a base do túbulo seminífero.

Espermatócitos primários em leptóteno estavam também presentes neste estágio e, na fase final do mesmo, os espermatócitos em paquíteno encontravam-se em transição para a fase de diplóteno.

Estádio XI - O alongamento dos núcleos das espermatídes estava concluído nesse estágio e os núcleos dessas células se apresentavam nitidamente agrupados em feixes, orientados para o núcleo das células de Sertoli (geralmente localizadas na base do túbulo). A relação entre o eixo longitudinal e o eixo menor em *A. cursor*, *A. montensis*, *N. lasiurus* e *O. nigripes* foi, respectivamente, $1,9 \pm 0,2$; $2,5 \pm 0,1$; $2,3 \pm 0,1$ e $1,8 \pm 0,1$. Os espermatócitos primários encontravam-se em zigóteno (*O. nigripes*) ou na transição de leptóteno para zigóteno. Espermatócitos primários mais avançados e na fase de diplóteno também eram observados nesse estágio.

Estádio XII – O aspecto marcante desse estágio foi a presença de figuras de divisão meiótica, relacionadas com a primeira e segunda divisões meióticas. Portanto, espermatócitos secundários estavam também presentes neste estágio. Em comparação com o estágio anterior, os núcleos de espermatídes alongadas estavam mais condensados. Em *A. cursor*, *A. montensis*, *N. lasiurus* e *O. nigripes* a relação entre o eixo longitudinal e o eixo menor foi, respectivamente, $2,9 \pm 0,2$; $2,8 \pm 0,2$; $2,8 \pm 0,1$ e $2,5 \pm 0,2$. Espermatócitos primários em zigóteno também foram observados neste estágio.

Finalizando, em relação aos doze diferentes estádios do CES caracterizados de acordo com o sistema acrossômico, em todos eles espermatogônias do tipo A indiferenciadas estavam presentes, enquanto as do tipo A diferenciadas eram estádios dependentes (estádios VIII-I). No entanto, a cinética espermatogonial não foi objetivo do presente estudo. De maneira óbvia, as células de Sertoli também estavam presentes em todos os estádios do CES.

As frequências médias dos diferentes estádios caracterizados estão representadas na tabela 4. Já o percentual das fases pré-meioótica, meioótica e pós-meioótica, encontra-se na tabela 5. Os estádios VII e III foram aqueles em que *A. cursor*, *A. montensis* e *N. lasiurus*

apresentaram as maiores frequências. Em *O. nigripes* vários estádios (I, VI, VII, IX e XII) apresentaram frequências entre 10 e 13%. Considerando-se as quatro espécies investigadas, as menores frequências foram observadas para os estádios II, IV, V e XI. As frequências combinadas dos estádios pré e pós-meióticos foram semelhantes e ficaram, para as quatro espécies de roedores investigadas, no patamar de 30 e 60%, respectivamente.

3.4- Duração do CES

Os diferentes tipos de células germinativas marcadas após a injeção de timidina triciada, nos diferentes períodos de tempo avaliados, estão mostrados na tabela 6 e figuras 5 a 8. Após aproximadamente 1 hora, em todas as quatro espécies investigadas, as células germinativas marcadas mais avançadas foram espermátocitos em fase de pré-leptóteno ou células em transição de pré-leptóteno para leptóteno (Figs. 5 a 8). Estas células foram encontradas no estágio VII (*A. cursor*) e no estágio IX nas demais espécies. Com base na média do diâmetro dos núcleos dos paquítenos, estas células percorreram aproximadamente 99% do estágio VII no *A. cursor*, 99 % do estágio IX no *A. montensis*, 60% do estágio IX no *N. lasiurus* e 20% do estágio IX no *O. nigripes*.

Após aproximadamente 20 dias, em *A. cursor*, *A. montensis* e *N. lasiurus*, as células marcadas foram espermátides alongadas que percorreram ~99% do estágio XII em *A. cursor*, ~90% do estágio I em *A. montensis* e ~45% do estágio III em *N. lasiurus*. Em *O. nigripes*, após aproximadamente 15 dias, as células marcadas foram espermátides arredondadas presentes no estágio VIII, que percorreram ~44% desse estágio.

Os tipos celulares marcados com o radioisótopo, bem como os períodos das injeções e os estádios onde ocorreram as marcações, para cada uma das espécies avaliadas, estão representados na tabela 6 e figuras 5 a 12. Calculando-se o intervalo decorrido entre os diferentes tempos de injeção e os tipos celulares marcados mais avançados em cada tempo, e associando-se estes resultados à frequência de cada estágio nos animais investigados, foi possível calcular a duração de um ciclo do epitélio seminífero e a duração total da espermatogênese. Desta forma, estes valores em dias para *A. cursor*, *A. montensis*, *N. lasiurus* e *O. nigripes* foram respectivamente os seguintes: $8,4 \pm 0,2$ e $37,9 \pm 1,1$; $8,9 \pm 0,2$ e $40 \pm 0,9$; $7,8 \pm 0,1$ e $35,1 \pm 0,3$; $7,9 \pm 0,03$ e $35,6 \pm 0,1$. A duração total do processo

espermatogênico considera que o mesmo requer 4,5 ciclos do epitélio seminífero para ser completado, desde a espermatogônia inicial indiferenciada do tipo A até a espermiacção. Estas abordagens permitiram ainda estimar a duração de cada estágio separadamente (Figs. 9 a 12).

3.5- Contagens celulares e quantificação da espermatogênese

Na tabela 7 podem ser observadas as razões encontradas entre os valores médios obtidos para os números corrigidos de células espermatogênicas e de nucléolo de células de Sertoli avaliados no estágio VIII. O índice meiótico (razão entre o número de espermátides arredondadas por espermatócitos primários) retrata as perdas celulares que ocorrem durante as divisões meióticas, baseando-se no fato que quatro espermátides podem ser formadas para um espermatócito primário. Essas perdas celulares foram de aproximadamente 35% para *O. nigripes*, 28% para *A. cursor*; 25% para *N. lasiurus* e de 22% para *A. montensis*. Conforme pode ser ainda observado nessa tabela, a espécie *N. lasiurus* apresentou a maior eficiência da célula de Sertoli, cuja capacidade individual de suporte foi de aproximadamente 13 espermátides arredondadas. Essa eficiência decresce gradativamente nas demais espécies atingindo cerca de oito espermátides no *O. nigripes*.

O número médio de células de Sertoli por testículo e por grama de parênquima testicular foi estimado a partir do conhecimento do número corrigido de nucléolo de células de Sertoli por secção transversal de túbulo e do comprimento total de túbulos seminíferos. Este cálculo parte do pressuposto que a população deste tipo celular é estável ao longo dos diferentes estádios do ciclo (França, 1991; Almeida, 2002). Assim, na tabela 7 pode ser observado que, exceto para o *O. nigripes* (~70 milhões), nas demais espécies o número de células de Sertoli por grama de parênquima testicular ficou no patamar próximo de 50 milhões. Já o número de células de Sertoli por testículo, em linhas gerais, seguiu o peso testicular e foi nitidamente inferior (~4 milhões) no *O. nigripes*. Quanto a eficiência espermatogênica (produção espermática diária por grama de testículo), os valores encontrados para esse importante índice, ficaram entre 62 e 66 milhões para *A. cursor* e *A. montensis*, e na faixa de ~75 e ~80 milhões para *N. lasiurus* e *O. nigripes*, respectivamente (Tab. 7). Por outro lado, a produção espermática por testículo seguiu tendência semelhante

a observada para o número de células de Sertoli e ficou no patamar de 18 milhões para o *A. cursor* e *N. lasiurus* e pouco menos de 5 milhões no *O. nigripes* (Tab. 7).

3.6- Morfometria e população das células de Leydig

Os dados relativos às células de Leydig (Tab. 8) foram obtidos a partir da análise morfométrica dos testículos, tomando-se como principais pontos de referência o volume ocupado por estas células no compartimento intertubular e o volume individual das mesmas. O volume individual das células de Leydig em *O. nigripes* foi o menor dentre as quatro espécies estudadas ($\sim 400 \mu\text{m}^3$), representando, cerca da metade do valor observado para *A. montensis* e cerca de um terço do obtido para o *A. cursor*. Provavelmente devido ao reduzido volume individual da célula de Leydig, *O. nigripes* apresentou maior número destas células por grama de testículo, sendo este valor aproximadamente duas vezes maior do que o encontrado nas outras espécies.

4 - DISCUSSÃO

A Reserva Particular do Patrimônio Natural do Caraça é uma região caracterizada por zona de contato entre os biomas do Cerrado e da Mata Atlântica. Esta região apresenta como característica marcante uma grande diversidade de mamíferos, particularmente pequenos mamíferos da ordem Rodentia (Talamoni et al., 2001), os quais são importantes no que se refere às interações ecológicas com outras espécies, interações essas fundamentais para a biodiversidade local (Cordeiro-Jr e Talamoni, 2006; Silva e Talamoni, 2004). No entanto, pouco se conhece a respeito dos parâmetros reprodutivos básicos destes pequenos roedores (Duarte, 2003), conhecimento que é essencial para estudos comparativos e evolutivos da biologia reprodutiva de qualquer espécie e para a aplicação de medidas de conservação (Fonseca et al., 1996). Desta forma, no presente estudo investigamos a estrutura e a função testiculares de quatro espécies de pequenos roedores, três delas predominantes na RPPN (*A. montensis*, *N. lasiurus* e *O. nigripes*) e a outra (*A. cursor*) abundante em fragmento de Mata Atlântica, próximo a RPPN.

Apesar de representar cerca de 40% das espécies de mamíferos ainda existentes (Nowak, 1999; Lage e Schmidt, 2007), existem poucas espécies de roedores para as quais a estrutura e função testiculares foram investigadas de forma mais ampla e detalhada. A

tabela 9 representa uma compilação de vários importantes parâmetros testiculares, obtidos em sua quase totalidade em nosso laboratório, para roedores das subordens Myomorpha e Hystricomorpha. Enquanto a tabela 2 engloba muitos destes parâmetros em espécies de outras ordens. Num contexto ainda mais amplo para mamíferos, em particular para as frequências dos diferentes estádios do CES, duração da espermatogênese, a tabela 1 também contém uma compilação de dados da literatura disponível até o presente momento. Desta forma, com a finalidade de fazermos uma comparação mais contextual dos dados obtidos no presente capítulo, para as quatro diferentes espécies de roedores investigadas, grande parte da discussão a seguir terá como ponto de referência estas duas tabelas.

Em comparação com a grande maioria de mamíferos investigados, conforme observado nas tabelas 2 e 9, todas as quatro espécies de roedores por nós estudadas no presente trabalho apresentaram eficiência espermatogênica bastante elevada (Russell e França, 1998; Johnson et al., 2000; França et al., 2005; Hess e França, 2007; Costa, 2009). Esta elevada eficiência ocorreu devido a combinação de vários atributos favoráveis tais como altos valores para o percentual de túbulos seminíferos, número de células de Sertoli por grama de testículo, eficiência da célula de Sertoli e duração muito curta da espermatogênese (Hess e França, 2007). Na tabela 9 fica patente que, embora a eficiência espermatogênica nas quatro espécies de pequenos roedores aqui investigados seja bastante destacada, dois patamares podem ser evidenciados. Um mais baixo (~60-65 milhões), onde se encontra as duas espécies de *Akodon*, e outro mais elevado (~75-80 milhões) ocupado pelo *N. lasiurus* e *O. nigripes*. Em relação a todas as espécies de mamíferos já investigadas, estas duas últimas espécies de roedores apresentam eficiência espermatogênica somente abaixo do *T. moojeni* (Tab. 9). Conforme será ainda discutido em maiores detalhes, a elevada produção espermática diária por grama de testículo observada nestes roedores deveu-se, em grande parte, a combinação de alto número de células de Sertoli por grama de parênquima testicular, a relativamente alta eficiência destas células, e a curta duração da espermatogênese, esta última particularmente no *N. lasiurus* e *O. nigripes*.

Resultados obtidos em nosso laboratório, a partir de estudos envolvendo cerca de duas dezenas de espécies de mamíferos (França et al., 2005; Costa et al., 2008; Costa, 2009; Costa et al., 2009; Silva et al., 2009), sugerem fortemente que a frequência dos estádios do ciclo, agrupadas em fases pré-meiótica e pós-meiótica, são determinadas filogeneticamente

entre membros de uma mesma família ou mesmo subordem. As tabelas 1 e 9 mostram que três padrões são prontamente notados para as frequências dos estádios do ciclo agrupados tendo como ponto de referência a meiose: I) espécies com predominância da fase pré-meiótica (ex: algumas espécies de ruminantes e diversas de primatas); II) espécies nas quais a fase pós-meiótica apresenta frequência notadamente superior (ex: roedores da subordem Myomorpha e suídeos); e III) espécies onde as duas fases apresentam relativo equilíbrio (ex: roedores da subordem Hystricomorpha e a maioria das espécies os primatas). Corroborando estudos anteriores e a nossa hipótese acima levantada, no presente capítulo, no qual todas as espécies investigadas são da subordem Myomorpha, embora ocorram algumas flutuações para as frequências individuais nos doze estádios do ciclo, as mesmas apresentam frequências bastante semelhantes para fases pré e pós-meióticas e o padrão de frequência do tipo II. Para ilustrar esta inferência, o *T. moojeni*, que é da subordem Hystricomorpha, se enquadra no padrão do tipo III (Cordeiro-Júnior et al, 2009; Tabela 9). Por outro lado, embora a duração da espermatogênese seja considerada espécie-específica, (Clermont, 1972; Amann e Schanbacher, 1983) e controlada pelo genótipo da célula germinativa (França et al., 1998), este importante parâmetro reprodutivo não é filogeneticamente determinado (Clermont, 1972; Amann e Schanbacher, 1983). Na maioria das espécies de mamíferos eutérios já investigadas, a duração de um ciclo espermatogênico está situada no intervalo entre ~9-12 dias e, particularmente para roedores, o ciclo espermatogênico ocorre de forma um pouco mais rápida (Tabelas 1 e 9) (Russell et al., 1990b; França e Russell, 1998; Hess e França, 2007). Desta forma, os valores observados para o ciclo espermatogênico em *A. montensis*, *N. lasiurus*, *O. nigripes* e *A. cursor* ficou entre ~8 e 9 dias. Em relação ao *N. lasiurus* e *O. nigripes*, as durações totais da espermatogênese para estas duas espécies (~35-36 dias) estão dentre as mais curtas para mamíferos, sendo semelhante a do roedor *Microtus agrestis* e apenas mais longas do que as de outros dois roedores, o *Microtus ochrogaster* e *Clethrionomys glareolus* (Tab. 1). Por outro lado, os valores observados em *A. cursor* e *A. montensis* são similares aos obtidos para camundongos (Tab. 9).

Em comparação com as espécies da subordem Hystrichomorpha, as espécies de roedores pertencentes a subordem Myomorpha usualmente apresentam menor peso corporal (Tab. 9). Segundo Kenagy e Trombulak (1986), de maneira geral as espécies com

menor peso corporal apresentam proporcionalmente maior investimento energético na reprodução. O comportamento sexual e as estratégias reprodutivas relacionadas à competição espermática também podem estar correlacionados com o tamanho do testículo (Kenagy e Trombaluk, 1986; Short, 1997). A literatura mostra que os roedores da subordem Myomorpha, tais como o gerbil, hamster, camundongo e o rato, apresentam baixa expectativa de vida, sistema de acasalamento promíscuo, produzem múltiplas ninhadas por ano e possuem espermatozóide com a cabeça falciforme. Em contraste, os roedores da subordem Hystrichomorpha são monogâmicos, vivem mais tempo, produzem poucas ninhadas por ano (geralmente uma ou duas) e, nesta subordem, a cabeça do espermatozóide apresenta a forma de espátula (Eisenberg, 1981; Eddy e O'Brien, 1994). Ainda, existem evidências para um grande número de espécies de mamíferos e de outras classes de vertebrados mostrando que o tamanho relativo do testículo e a morfologia do espermatozóide são indicadores do sistema de acasalamento (Short, 1997). Conforme observado na tabela 9, com exceção do *O. nigripes*, em comparação com a maioria das espécies de mamíferos investigadas até o presente momento, o IGS observado nas três outras espécies de roedores cricetídeos da subordem Myomorpha por nós estudadas é bastante elevado (Kenagy e Trombulak, 1986). Este IGS é semelhante aos roedores da família Muridae, que pertencem a mesma subordem. Embora não existam muitos dados referentes às espécies por nós aqui estudadas, merece ser ressaltado que as mesmas são prolíficas e apresentam mais de um período reprodutivo anual e ninhadas de 3 a 7 filhotes (Oliveira e Bonvicino, 2006). Por exemplo, o *N. lasiurus* pode gerar até 13 filhotes (Oliveira e Bonvicino, 2006). Pelo fato de também apresentarem a cabeça do espermatozóide com a forma de foice, podemos especular que as características dos roedores por nós investigados seriam semelhantes àquelas já comentadas para outros roedores da subordem Myomorpha.

Em relação ao diâmetro tubular, com exceção de algumas espécies de marsupiais, nas quais este parâmetro pode chegar a 550 μm , o valor encontrado para a maioria dos amniotas situa-se entre 160 a 350 μm (Roosen-Runge, 1977; Setchell et al., 1994). Assim, os valores encontrados (~230-250 μm) para o diâmetro dos túbulos seminíferos em *A. cursor*, *A. montensis* e *N. lasiurus* estão na faixa intermediária dessa amplitude. Em *O. nigripes* o valor encontrado (~180 μm) para o diâmetro tubular foi baixo, o que refletiu

diretamente no grande comprimento tubular por grama de testículo (35 metros) observado para esta espécie. De maneira geral, de 10 a 20 metros de túbulos seminíferos por grama de testículo são encontrados na maioria dos mamíferos já estudados (Amann, 1970a; Yadav e Sharma, 1994; França e Russell, 1998; Leal e França, 2008), incluindo-se os outros três roedores aqui investigados.

Pelo fato do número de células de Sertoli ser estável no animal adulto, bem como nos diferentes estádios do ciclo, estas células são usadas como ponto de referência para se quantificar e avaliar funcionalmente o processo espermatogênico (França e Russell, 1998; Johnson et al., 2000; França e Hess, 2005). O número total de células de Sertoli, estabelecido antes da puberdade (Orth et al., 1988; Cooke et al., 1994; Sharpe et al., 2003; França et al., 2005), determina em última análise a magnitude da produção espermática diária por testículo e por grama de testículo (eficiência espermatogênica) (Johnson et al., 2000; Hess e França, 2007), principalmente pelo fato do número de células germinativas que são suportadas para cada célula de Sertoli (eficiência da célula de Sertoli) ser relativamente constante para cada espécie (França e Russell, 1998; Johnson et al., 2000; França et al., 2005; França e Hess, 2005). Enquanto o número de células de Sertoli por grama de testículo encontrado nas quatro espécies de roedores aqui investigados está situado no patamar superior para mamíferos ($\sim 50-70 \times 10^6$), em comparação com outras espécies de roedores (Tab. 9), e mesmo outros mamíferos (Tab. 2), os valores observados para a eficiência das células de Sertoli nestas quatro espécies ($\sim 8-13$) são de moderado a alto (França e Russell, 1998; Johnson et al., 2000; França et al., 2005; França e Hess, 2005). Assim, conforme foi comentado no início da discussão, a combinação destes dois parâmetros resultou em eficiência espermatogênica muito alta, a qual foi somente inferior a do *T. moojeni* que apresentou pronunciada eficiência da célula de Sertoli (Tab. 9). Num outro aspecto importante, o percentual de túbulos seminíferos, que foi bastante alto ($\sim 96-97\%$) em todas as quatro espécies por nós estudadas, usualmente apresenta correlação alta e positiva com a eficiência espermatogênica (Russell et al., 1990b; França e Russell, 1998; França et al., 2005). Portanto, em comparação com a maioria das espécies de mamíferos já investigadas, este elevado percentual de túbulos foi provavelmente um dos principais fatores responsáveis pela acentuada produção espermática diária por grama de parênquima testicular nestes roedores.

Em contraste com o elevado percentual de túbulos seminíferos, conforme esperado, o volume relativo (1-2%) ocupado pelas células de Leydig no parênquima testicular, bem como o número destas células por grama de testículo (~15-20 milhões), foram muito baixos no *A. cursor*, *A. montensis*, *N. lasiurus* quando comparado com outros roedores e mesmo outros mamíferos já investigados (Russell, 1996; França e Russell, 1998; França et al., 2005; Hess e França, 2007). Com exceção do *O. nigripes* (~35 milhões), os valores encontrados para o número de células de Leydig por grama de testículo nas outras três espécies são somente inferiores aos de chinchilla e *T. moojeni* (Tab. 9). Tendência semelhante foi observada para o tamanho da célula de Leydig, exceto para *O. nigripes*, cujo valor foi de pouco menos da metade do encontrado para as outras três espécies de roedores e semelhante aos de ovinos (Lunstra e Schanbacher, 1988) e javalis (Almeida et al., 2006).

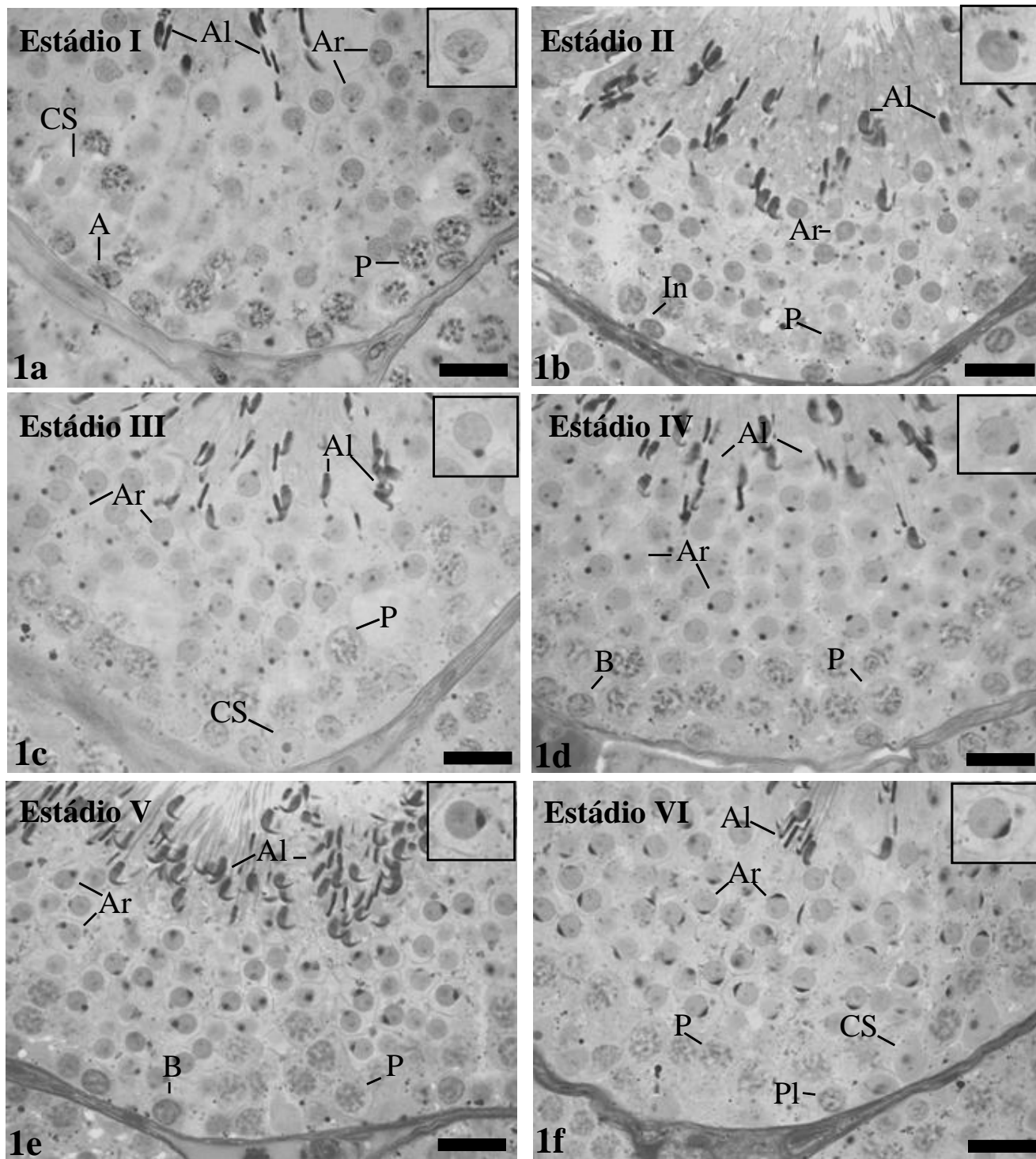
Com exceção do *O. nigripes*, as perdas celulares que ocorreram durante a meiose (~20-25%) foram semelhantes aos valores encontrados para a maioria das espécies de mamíferos (Roosen-Runge, 1973; França e Russell, 1998; Johnson et al., 2000; França et al., 2005; Hess e França, 2007) e menores do que aqueles observados para algumas linhagens de camundongos, capivaras e o homem (França et al., 2005; Tabela 9). Conforme já é amplamente estabelecido na literatura, as perdas celulares desempenham papel muito importante na homeostase da espermatogênese, e ocorrem principalmente durante a fase espermatogonial e durante a meiose, regulando, respectivamente, a densidade das células germinativas (De Rooij e Lok, 1987; De Rooij e Russell, 2000) e eliminando as células que apresentam defeitos cromossômicos ou mutações mais severas do DNA (Sinha-Hikim et al, 1985; Weinbauer et al, 2001; Baum et al., 2005).

Em conclusão, quando comparadas com outras espécies de mamíferos e roedores bem investigados da subordem Myomorpha, as quatro espécies estudadas no presente trabalho apresentaram elevada eficiência espermatogênica, devido principalmente aos altos valores observados para o número de células de Sertoli por grama de parênquima testicular e percentual de túbulos seminíferos. Também contribuíram, em menor escala, para esta elevada eficiência a curta duração da espermatogênese e a elevada/moderada capacidade de suporte das células de Sertoli. Estes dados sugerem que, provavelmente pelo fato de apresentarem um curto ciclo de vida, para garantir a sua sobrevivência estas espécies devem se reproduzir de forma eficiente. Esperamos que os resultados obtidos na presente

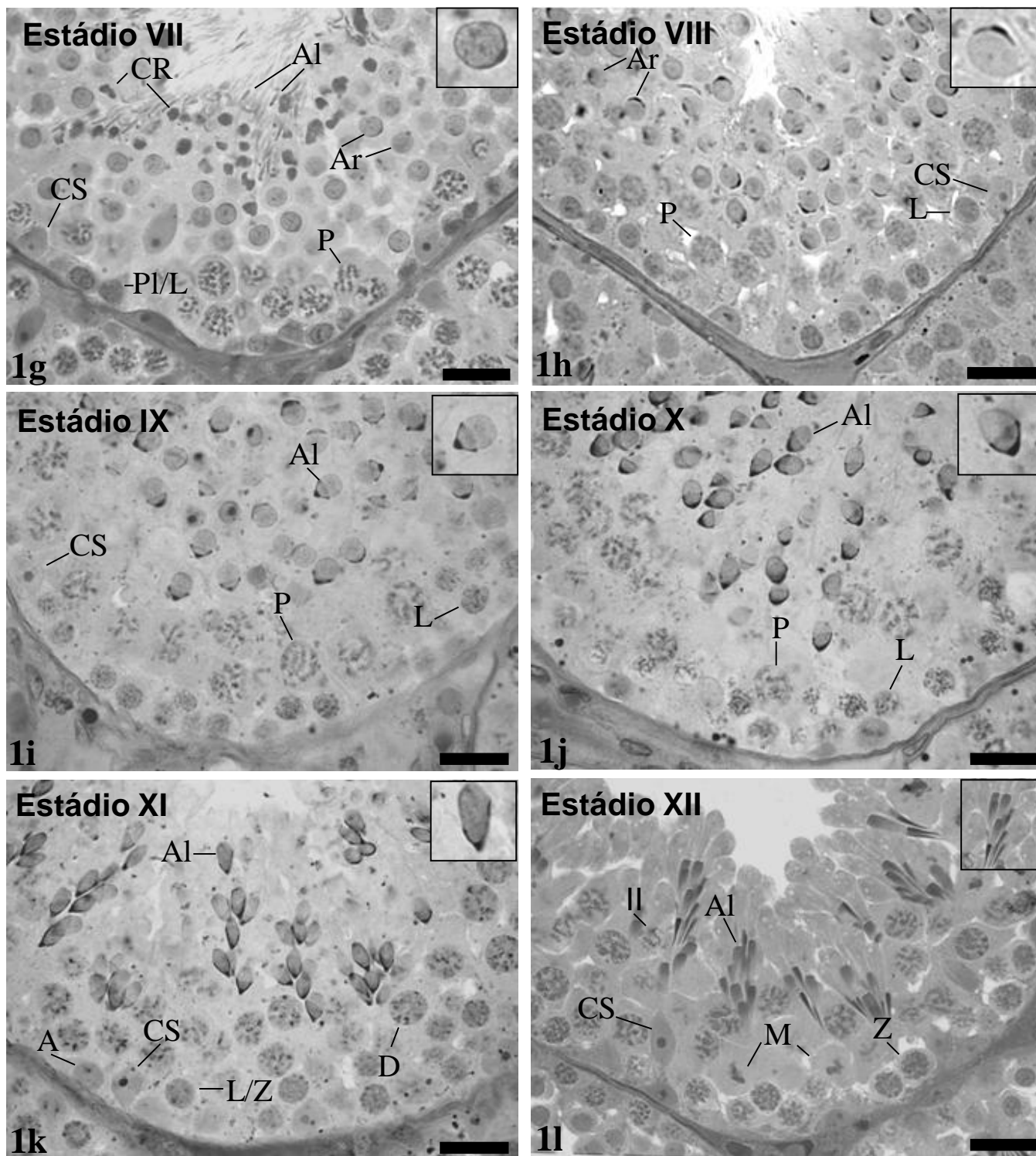
investigação possam contribuir para o melhor entendimento da biologia reprodutiva destas espécies, bem como para a elaboração de programas de manejo e conservação da fauna silvestre da Mata Atlântica e do Cerrado.

5- FIGURAS

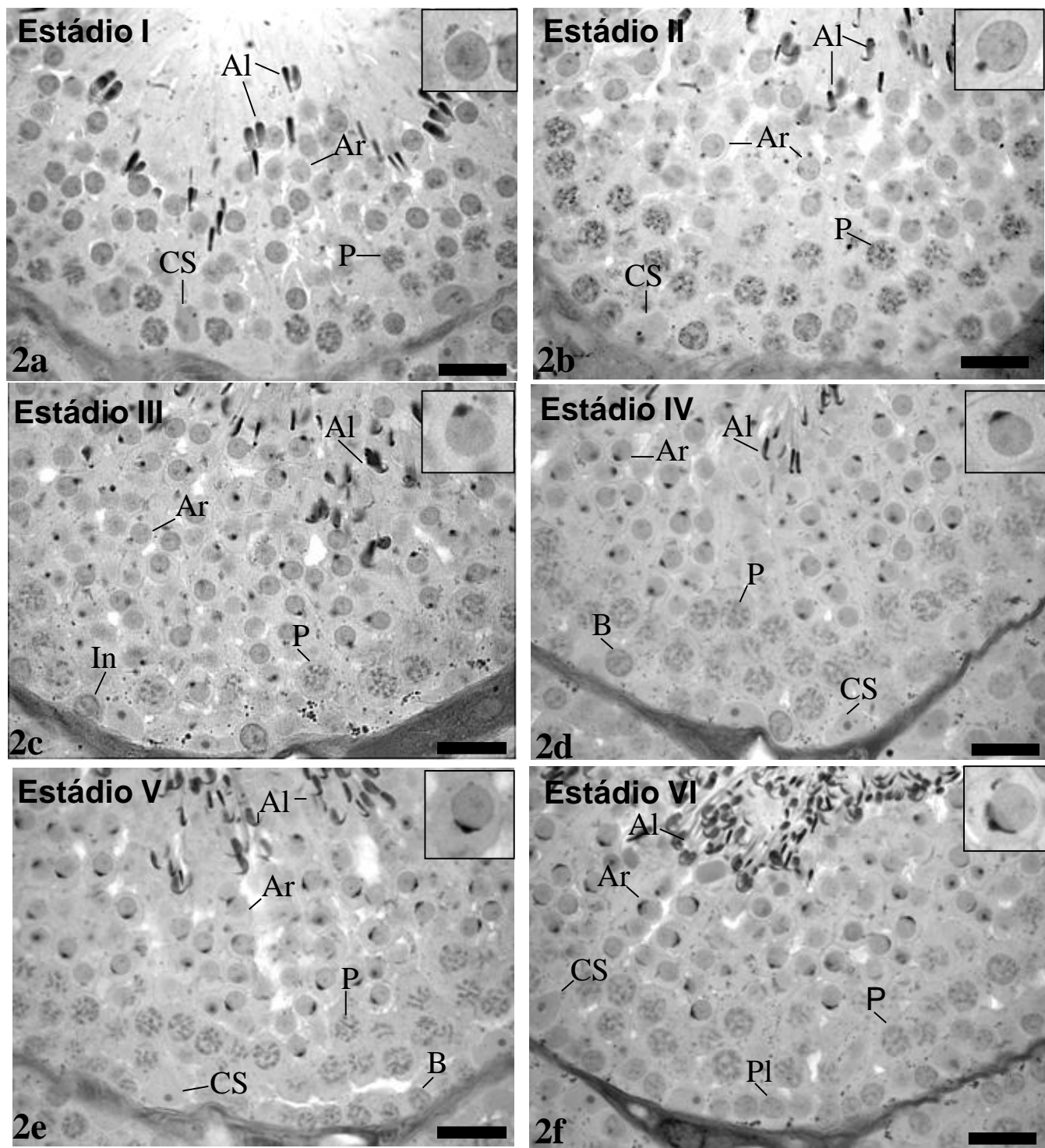
FIGURAS 1-4 - Estádios I a XII do ciclo do epitélio seminífero, caracterizados de acordo com o sistema acrossômico, nas quatro diferentes espécies de roedores investigadas, conforme segue: *A. cursor* (Fig. 1); *A. montensis* (Fig. 2); *N. lasiurus* (Fig. 3); *O. nigripes* (Fig. 4). Espermatogônias do tipo A (A), espermatônias intermediárias (In) e espermatogônias do tipo B (B). Espermatócitos primários em: pré-leptóteno (Pl); pré-leptóteno na transição para leptóteno (Pl/L); leptóteno (L); leptóteno na transição para zigóteno (L/Z); zigóteno (Z); paquíteno (P); diplóteno (D). Espermatócitos secundários (II), figuras de divisão meiótica (M) pós-prófase I, espermátides arredondadas (Ar), espermátides em alongamento/alongada (Al), célula de Sertoli (CS) e corpos residuais (CR). O detalhe em maior aumento, presente na parte superior direita nas figuras dos estádios representa o desenvolvimento do acrossoma das espermátides. Barras = 10 µm.

FIGURA 1 – *A. cursor**A. cursor*

Aumento: 1000X

FIGURA 1 - *A. cursor* -(continuação)*A. cursor*

Aumento: 1000X

FIGURA 2 – *A. montensis**A. montensis*

Aumento 1000X

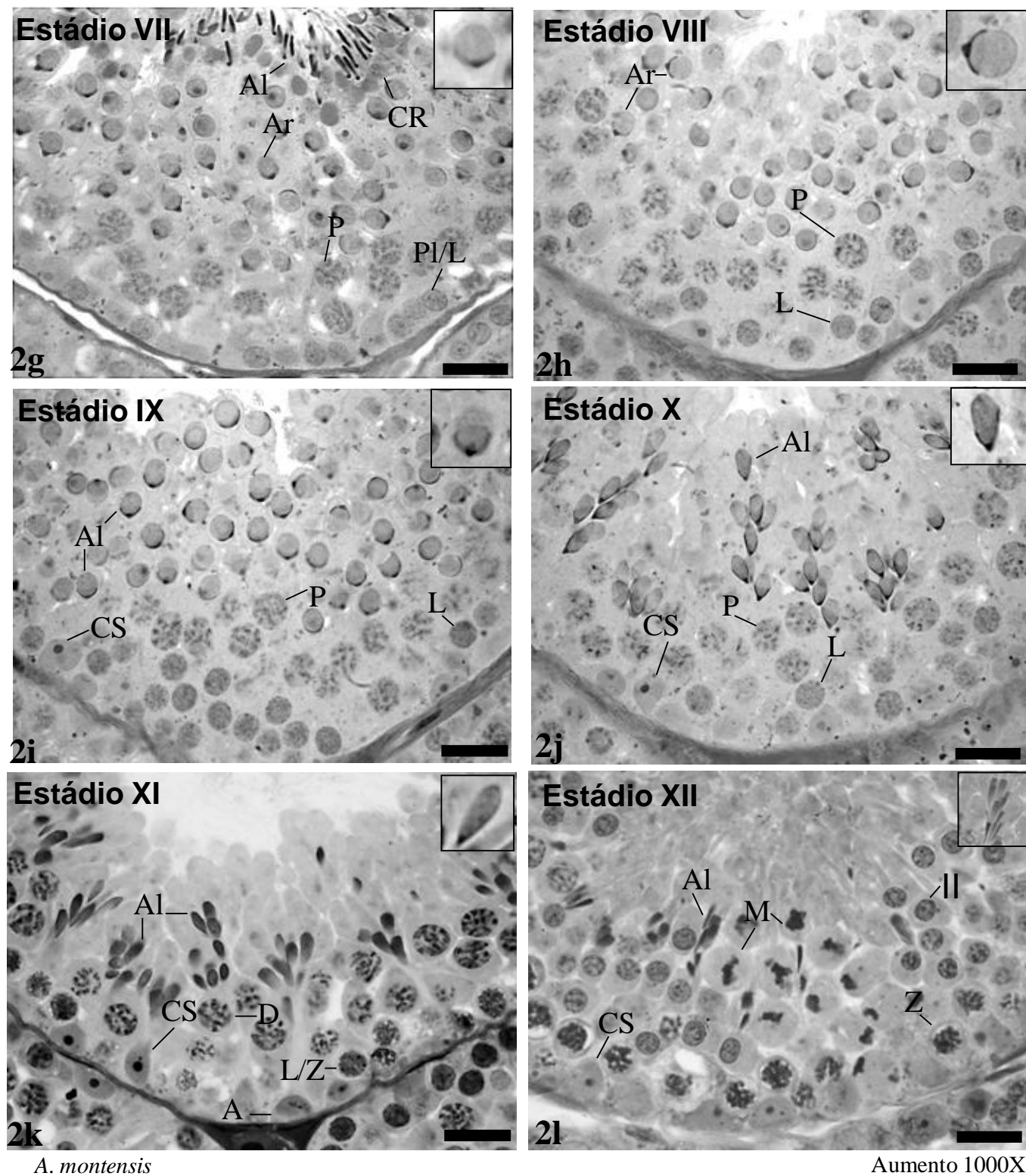
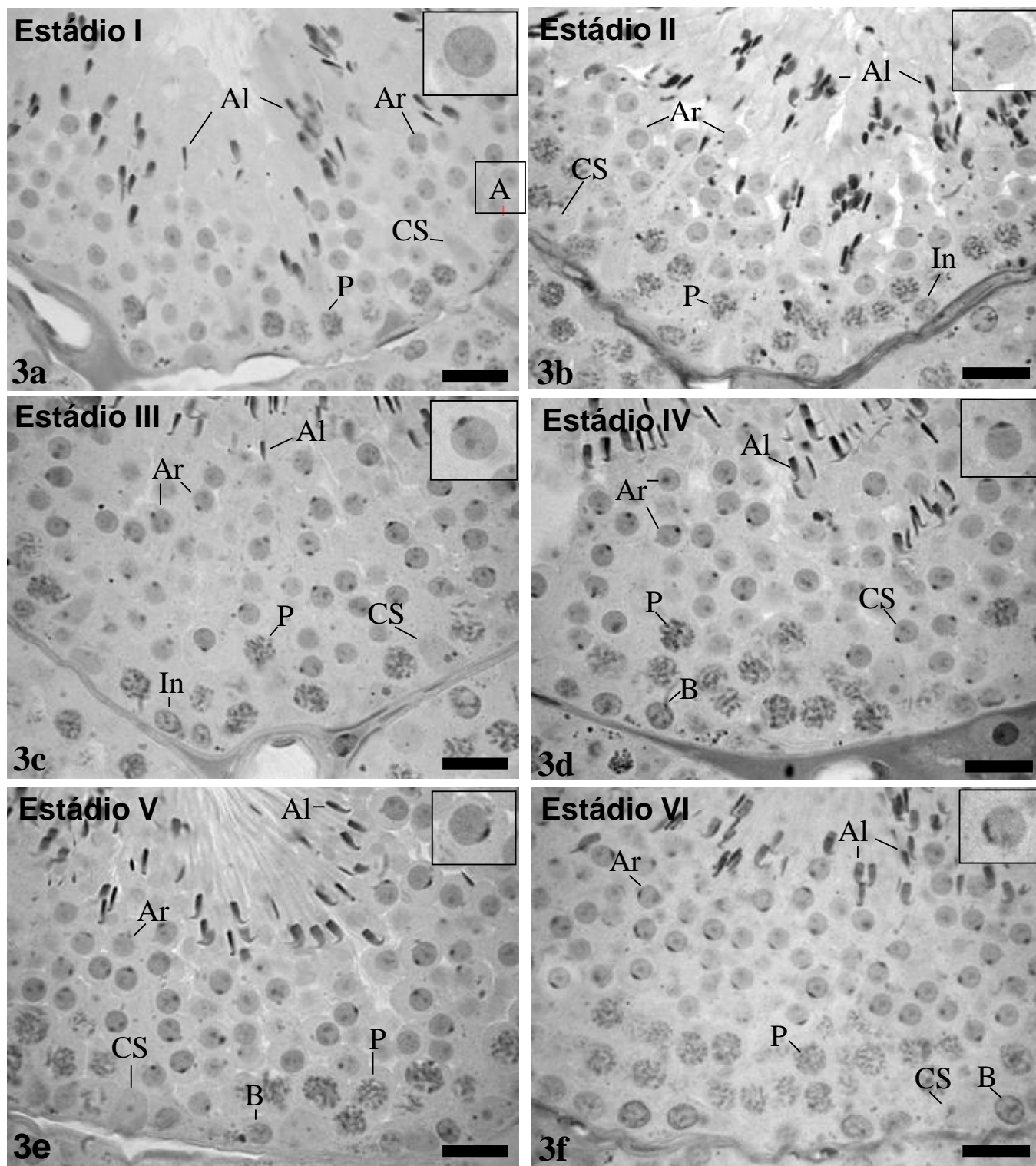
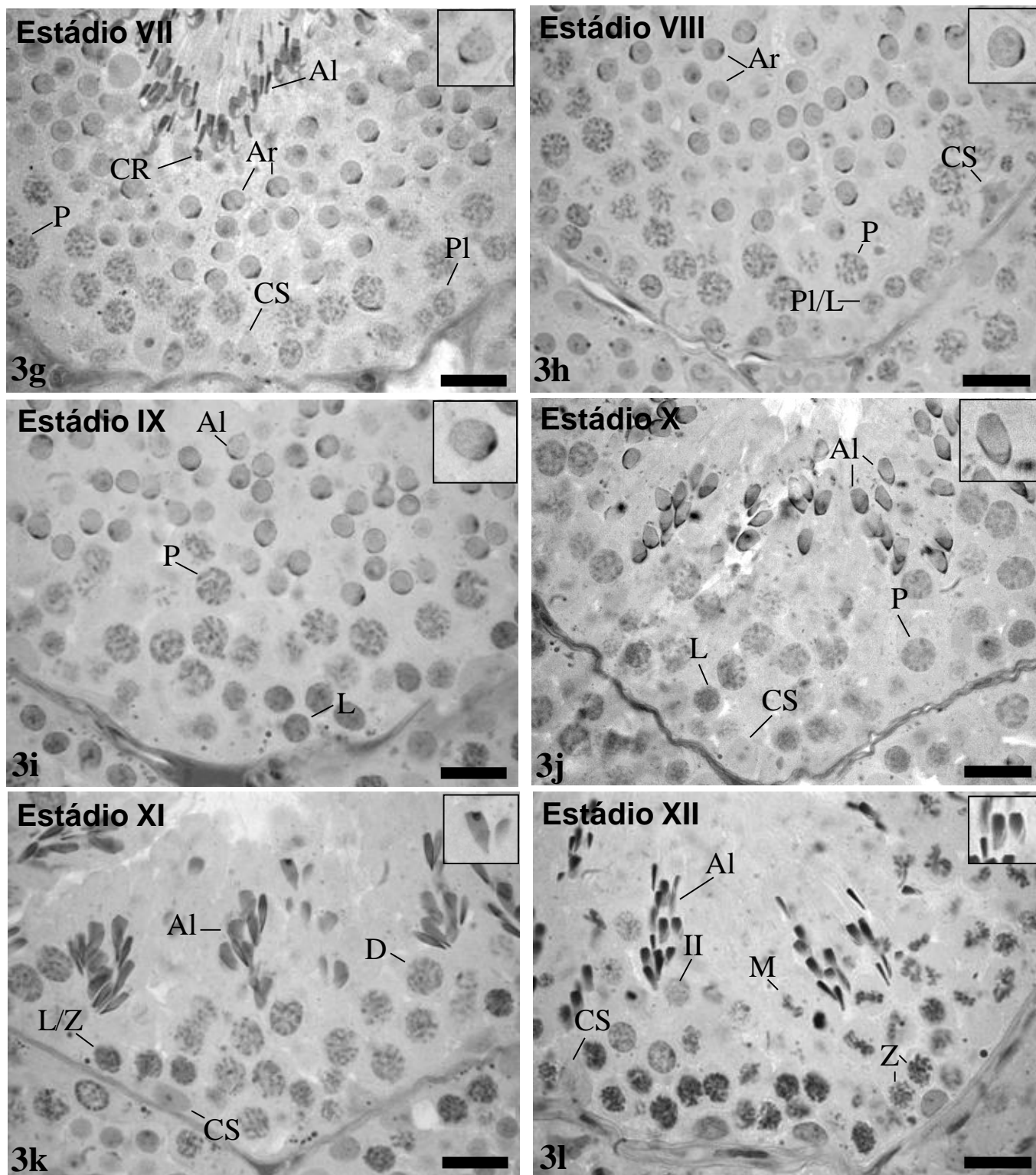
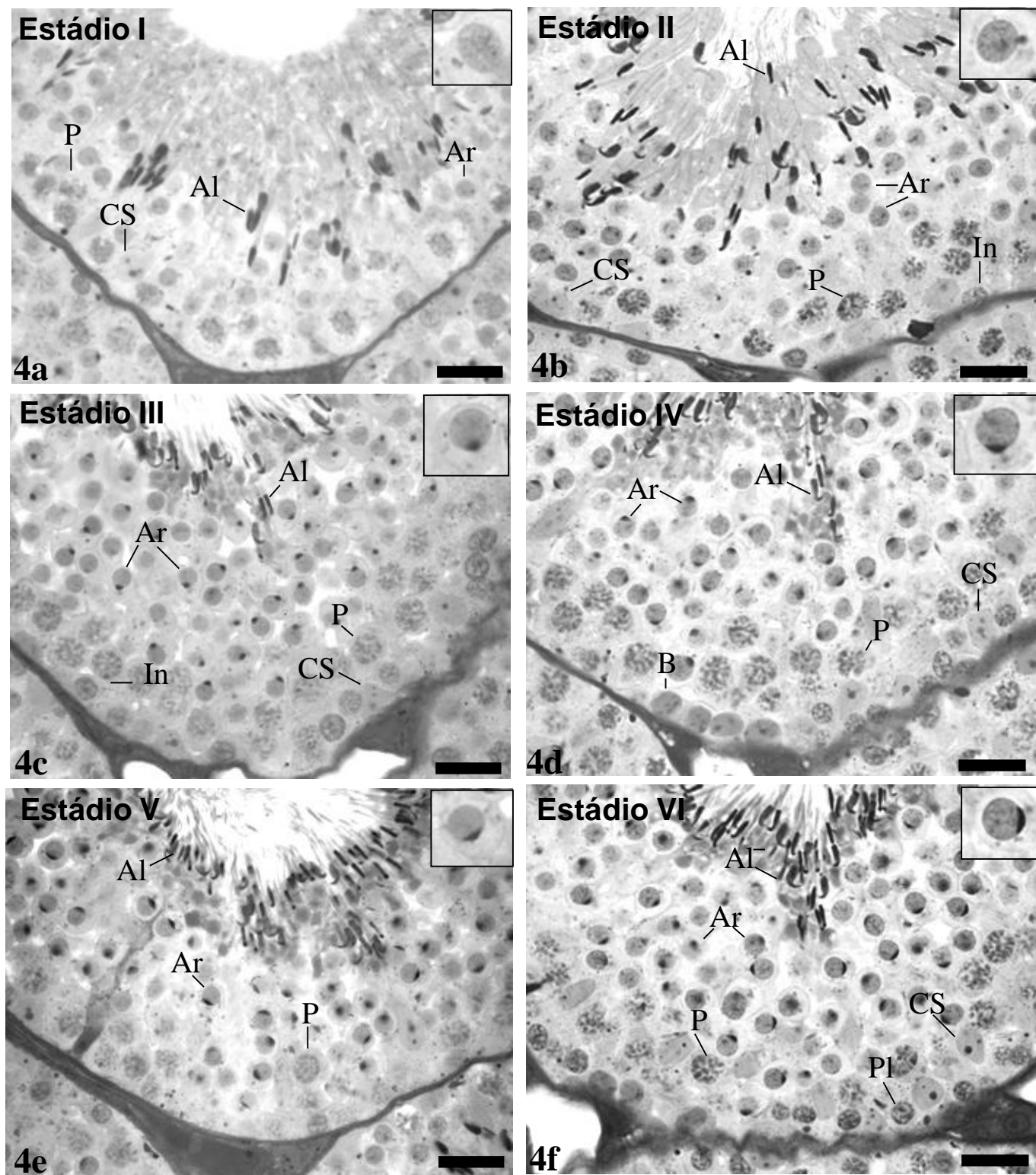
FIGURA 2 - *A. montensis* (continuação)

FIGURA 3 – *N. lasiurus**N. lasiurus*

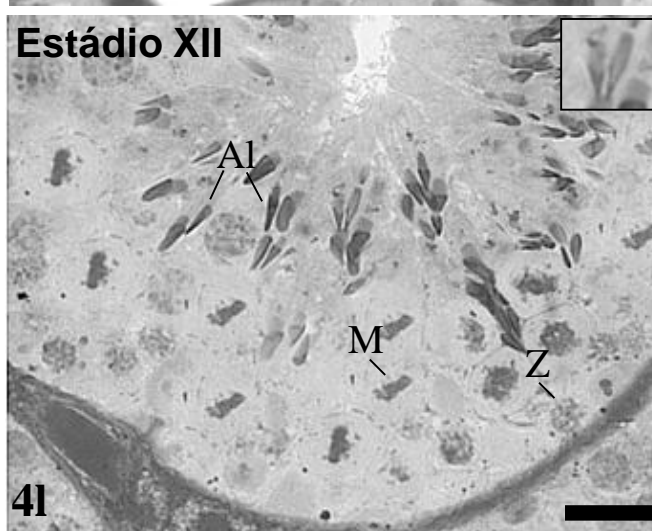
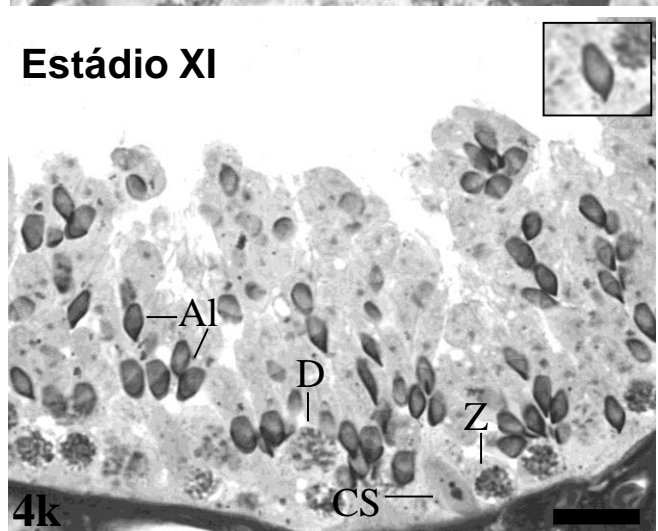
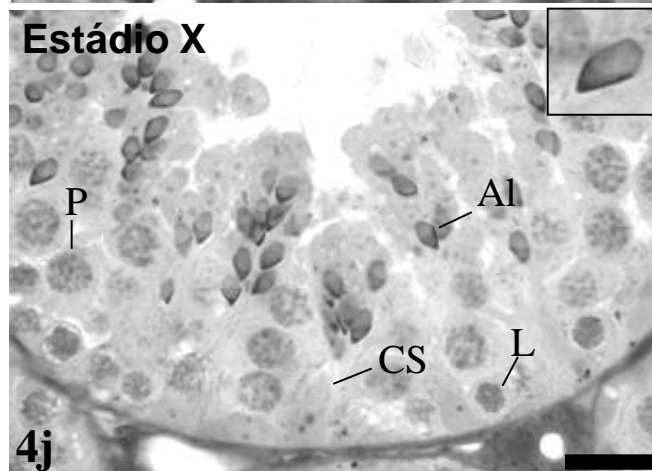
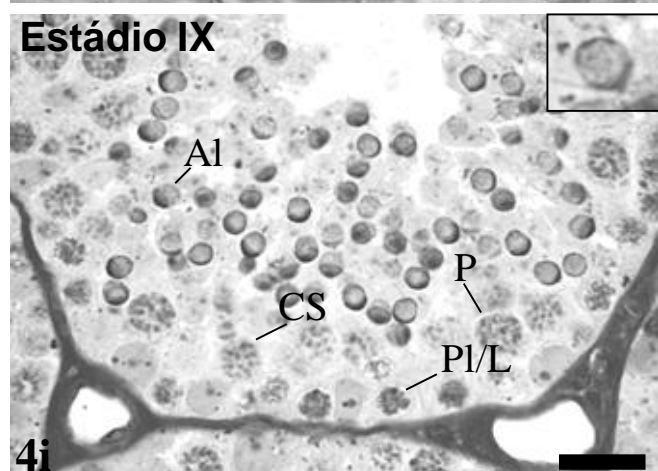
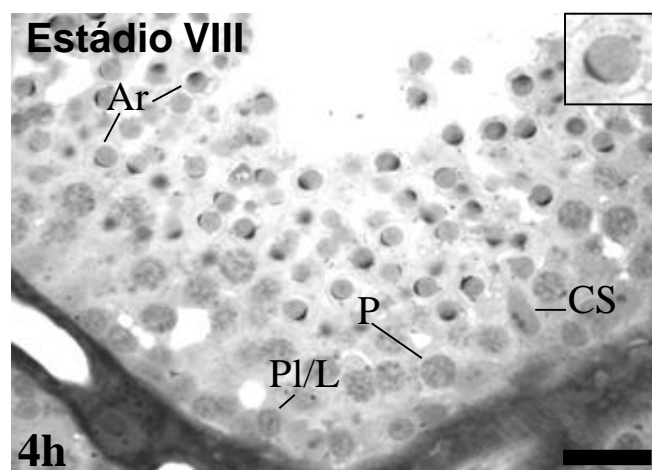
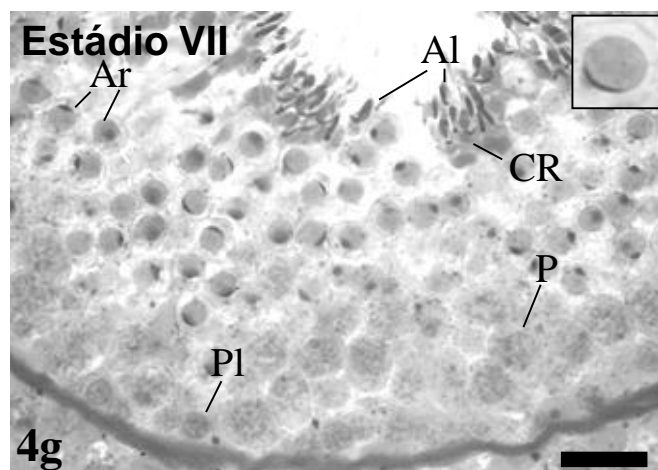
Aumento 1000X

FIGURA 3 - *N. lasiurus* (continuação)*N. lasiurus*

Aumento 1000X

FIGURA 4 – *O. nigripes**O. nigripes*

Aumento 1000X

FIGURA 4 - *O. nigripes* (continuação)*O. nigripes*

Aumento 1000X

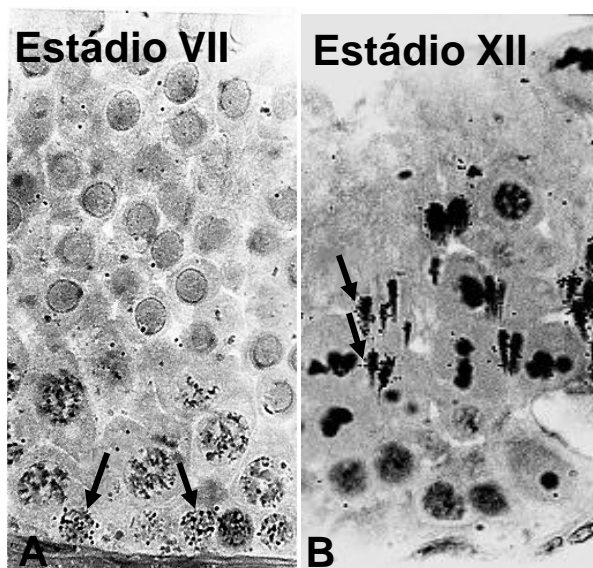


FIGURA 5 – Células germinativas mais avançadas marcadas com timidina triçada (setas) em *A. cursor*: (A) 1 hora pré-leptóteno/leptóteno no estágio VII; (B) 20 dias espermátides alongadas no estágio XII.

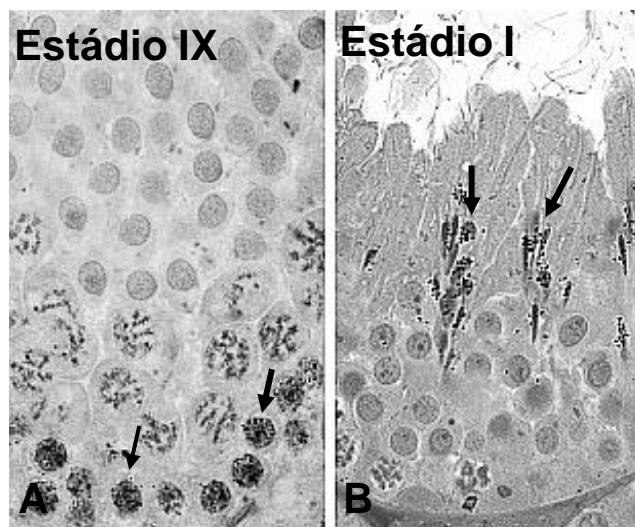


FIGURA 6 - Células germinativas mais avançadas marcadas com timidina triçada (setas) em *A. montensis*: (A) 1 hora pré-leptóteno/leptóteno estágio IX e (B) 20 dias espermátides alongadas no estágio I.

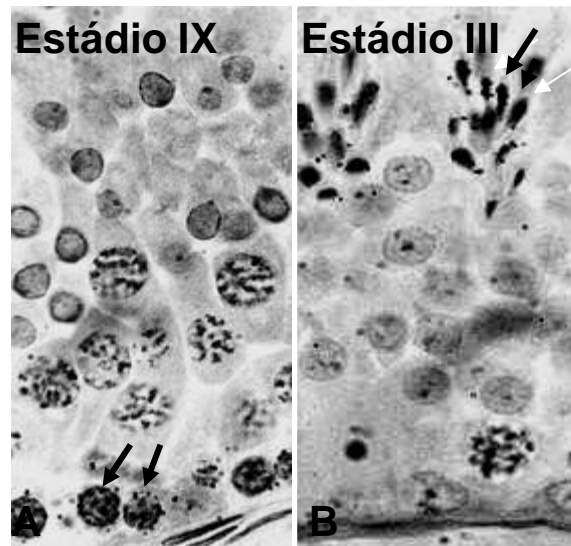


FIGURA 7 - Células germinativas mais avançadas marcadas com timidina triçada (setas) em *N. lasiurus*: (A) 1 hora pré-leptóteno/leptóteno no estágio IX; (B) 20 dias espermátides alongadas no estágio III.

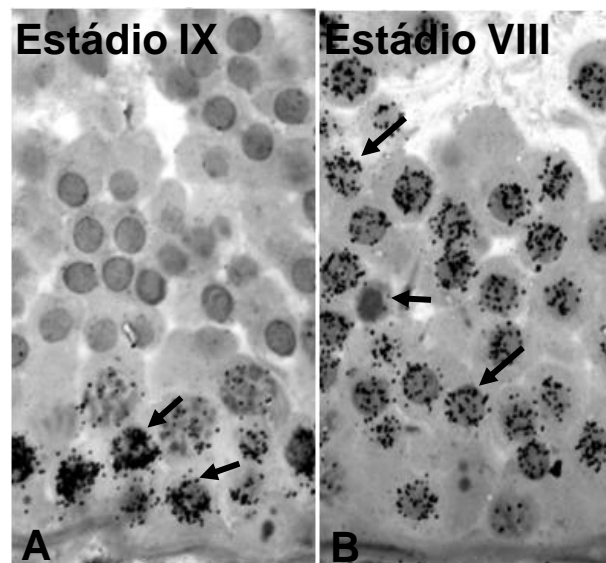
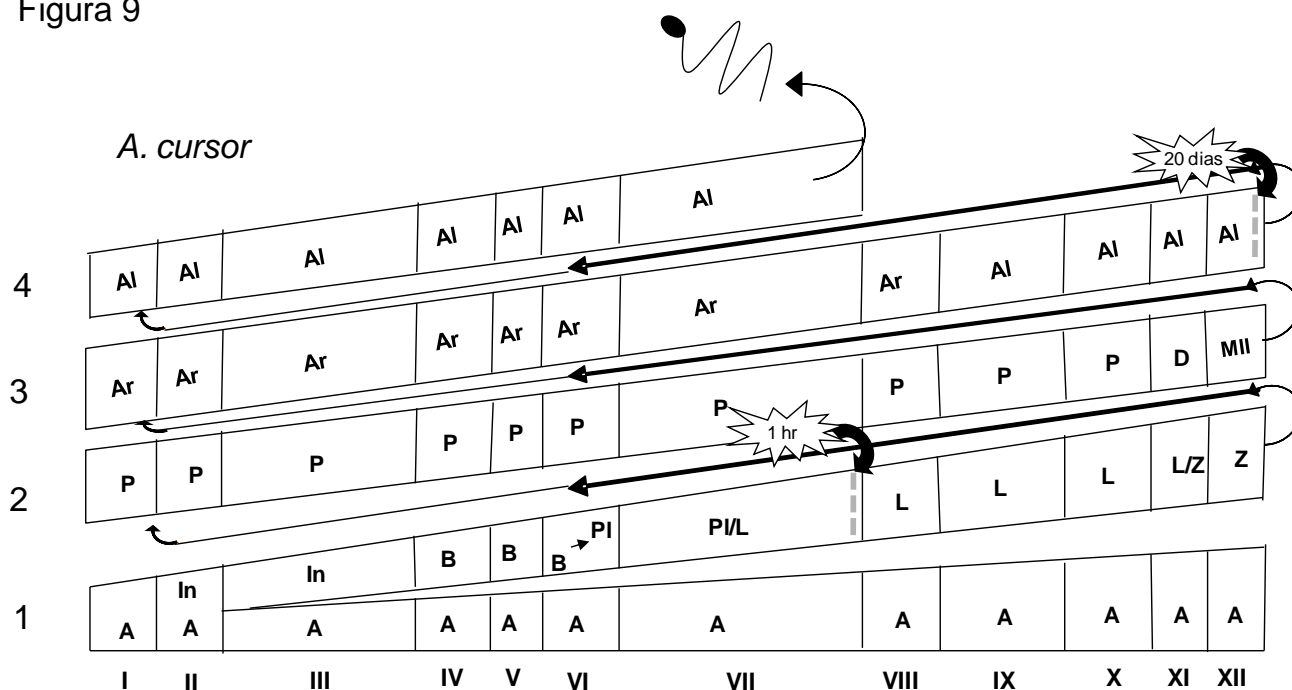


FIGURA 8 - Células germinativas mais avançadas marcadas com timidina triçada (setas) em *O. nigripes* (A) 1 hora pré-leptóteno/leptóteno no início do estágio IX e (B) 15 dias espermátides arredondadas no início estágio VIII.

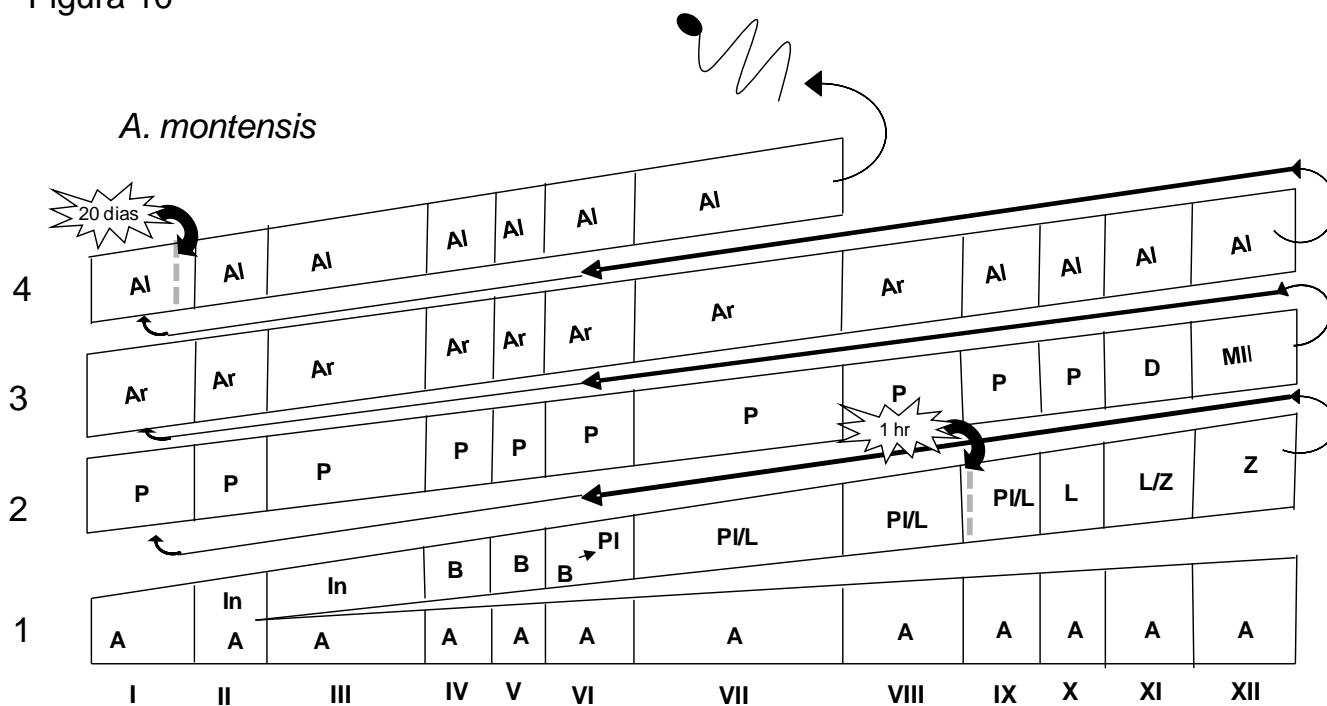
Figuras 9-12 - Diagramas mostrando a composição de células germinativas, frequência (%) e duração (em dias) de cada estágio do ciclo do epitélio seminífero nas quatro diferentes espécies de roedores investigadas, conforme segue: *A. cursor* (Fig. 9); *A. montensis* (Fig. 10); *N. lasiurus* (Fig. 11); *O. nigripes* (Fig. 12). Também representadas estão as células germinativas marcadas mais avançadas nos doze estágios do ciclo nos dois intervalos de tempo (1 hora e 15 dias ou 1 hora e 20 dias) utilizados após a injeção de timidina triciada. O espaço para cada estágio é proporcional a sua frequência e duração. As letras inseridas em cada coluna indicam o tipo de célula germinativa presente em cada estágio do ciclo. Letras presentes em cada coluna indicam os tipos de células germinativas que compõe cada estágio do ciclo, conforme segue: A, espermatogônia do tipo A; In, espermatogônia intermediária; B, espermatogônia do tipo B; Pl, espermatócitos primários em pré-leptóteno; Pl/L, pré-leptóteno em transição para leptóteno; L, leptóteno; L/Z, leptóteno em transição para zigóteno; Z, zigóteno; P, paquíteno; D, diplóteno; II, espermatócito secundário; Ar, espermátides arredondadas; e Al, espermátides em alongamento/alongadas.

Figura 9



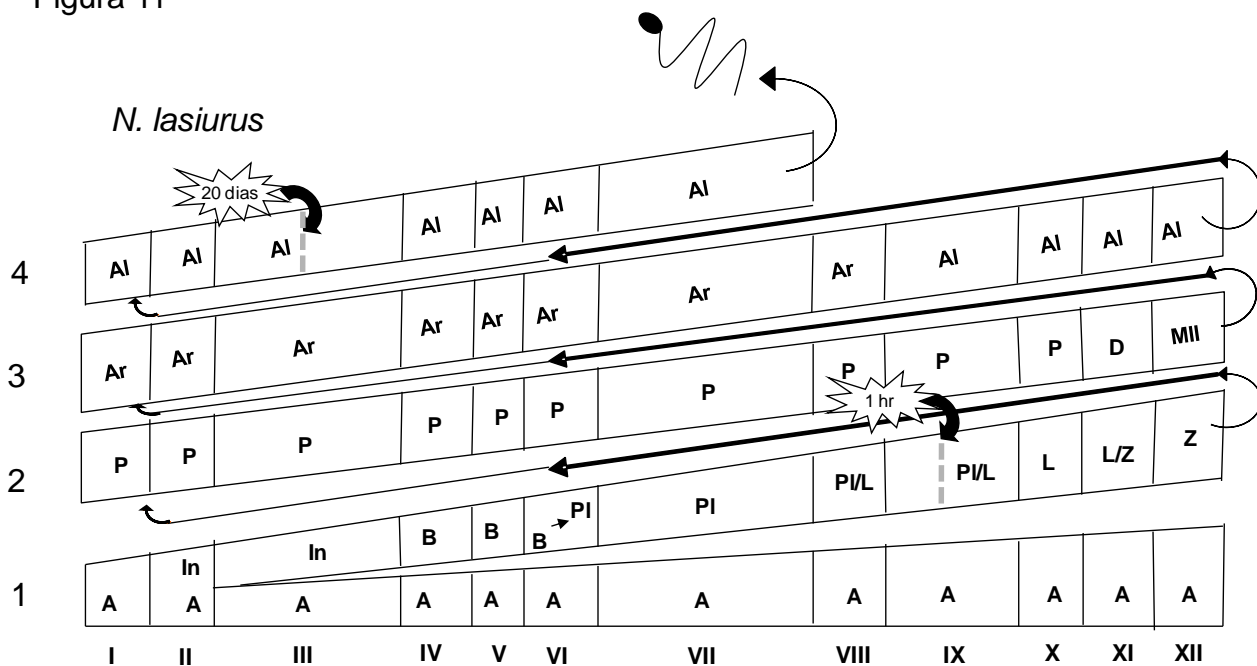
Estádio	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Frequência (%)	4,2	4,1	15,7	6,3	4,5	7,0	20,4	7,1	12,6	8,6	5,0	4,5
Duração (dias)	0,35	0,34	1,32	0,53	0,38	0,59	1,71	0,60	1,06	0,72	0,42	0,38

Figura 10



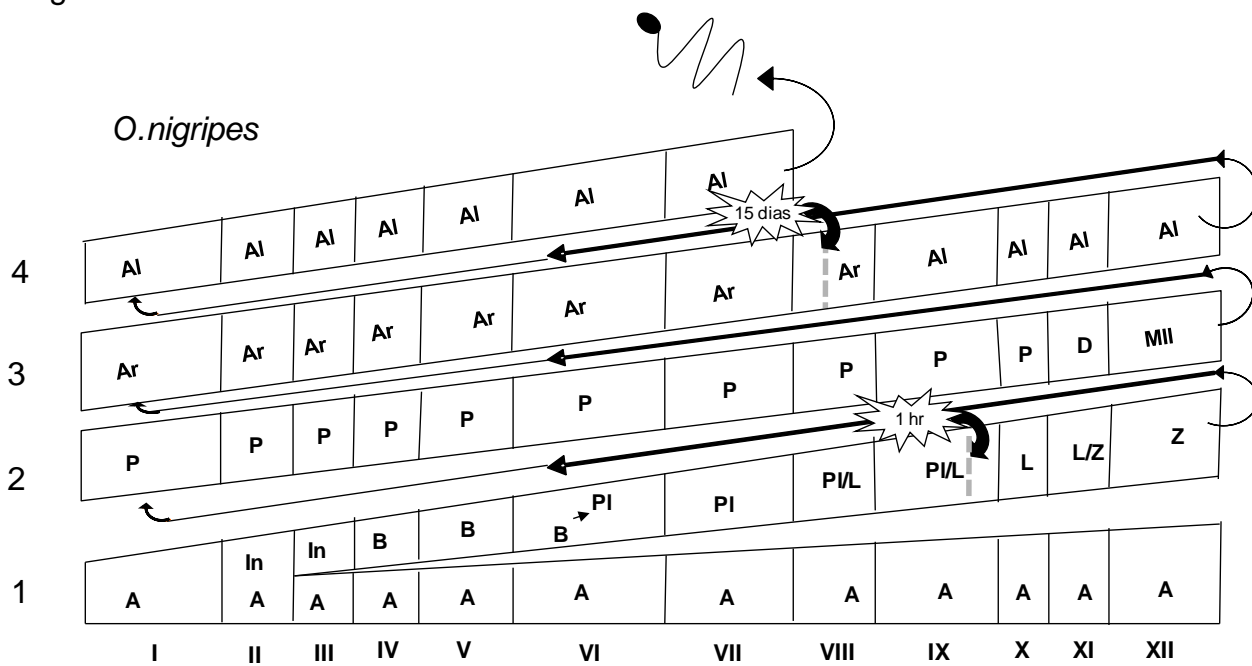
Estádio	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Frequência (%)	8,6	6,4	14,5	6,9	4,0	6,5	17,2	9,1	6,2	5,9	6,2	8,2
Duração (dias)	0,77	0,57	1,29	0,61	0,36	0,58	1,53	0,81	0,55	0,53	0,55	0,73

Figura 11



Estádio	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Frequência (%)	4,6	4,7	16,3	6,1	3,8	6,7	19,0	6,5	12,7	5,5	6,8	7,2
Duração (dias)	0,36	0,37	1,27	0,48	0,30	0,52	1,48	0,51	0,99	0,43	0,53	0,56

Figura 12



Estádio	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
Frequência (%)	11,0	6,1	5,3	5,8	7,5	12,9	10,9	7,0	10,5	6,3	6,5	10,1
Duração (dias)	0,87	0,48	0,42	0,46	0,59	1,02	0,86	0,55	0,83	0,50	0,51	0,80

6 - TABELAS

TABELA 1 – Tabela comparada mostrando as frequências das fases pré-meiótica, meiótica e pós-meiótica dos estádios do ciclo do epitélio seminífero e as durações de cada ciclo e total da espermatogênese, em mamíferos.

Espécies	Pré-meiótico (%) ¹	Meiótico (%) ²	Pós-meiótico (%) ³	Duração do ciclo (dias)	Duração da espermatogênese (dias) ⁴	Referências
Rodentia						
Rato						
Sprague-Dawley	23,7	5,7	70,6	12,9	58	CLERMONT e HARVEY, 1965
Sherman	24,8	4,9	70,3	12,0	54	CLERMONT et al., 1959
Bandicoot				10,0	45	SINHA-HIKIM et al., 1985b
Camundongo						
Balb C	18,5	11,2	70,3	8,9	40,1	AVELAR et al., 2003
C3H	23,1	10,0	66,9	8,6	38,7	OAKBERG, 1956
	21,8	10,5	67,7	8,6	38,7	CLERMONT e TROTT, 1969
C57	19,3	9,1	71,6	8,7	39,2	AVELAR et al., 2004
Swiss-White	22,2	8,9	68,9	8,9	40	CLERMONT e TROTT, 1969
Swiss-White	17,7	11,3	71,0	8,8	39,6	AVELAR et al., 2004
Hamster						
Chinês	29,1	5,5	65,4	17,0	76,5	LOUD e DE ROOIJ, 1977
Sírio	25,8	7,5	66,7	8,7	39,2	CLERMONT e TROTT, 1969
Djungarian	15,8	6,8	77,4	7,9	35,5	VAN HAASTER e DE ROOIJ, 1993a
<i>Microtus agrestis</i>	29,0	9,2	61,8			GROCOCK e CLARKE, 1975
	32,1	9,5	58,4	7,9	35,5	GROCOCK, 1972
<i>M. ochrogaster</i>	23,7	6,5	69,8	7,2	32,4	SCHULER e GIER, 1976
<i>C. glareolus</i>	26,2	8,8	65,0	6,7	30,2	GROCOCK e CLARKE, 1976
Plain rat						
Plain rat	24,6	10,5	64,9			PIERCE e BREED, 1987
Hopping mouse	40,9	8,1	51,0			PIERCE e BREED, 1987
Gerbil	41,2	10,3	48,5			BILASPURI e KAUR, 1994
	39,4	11,8	48,8			SEGATELLI et al., 2002
Esquilo	28,5	10,4	61,1			TAIT e JOHNSON, 1982
Guinea pig	31,3	7,4	61,3	8,5	38,3	NOLLER et al., 1977
Capivara	44,8	14,6	40,6	11,9	53,5	PAULA et al., 1999
<i>Cunicullus paca</i>	48,2	9,8	42,0			PASHOV e MATAMOROS, 1984
Cutia	43,2	11,1	45,8			FERREIRA, 2002
Chinchilla	50,1	8,8	41,1	10,2	45,8	LEAL e FRANÇA, 2002
Scandentia						
Musaranho	45,9	3,6	50,5			MAEDA et al., 1996
Lagomorpha						
Coelho						
	48,4	11,0	40,6	10,9	49	SWIERSTRA e FOOTE, 1965
	45,6	5,3	49,1	11,2	50,4	ORGBIN-CRIST, 1968
Artiodactyla						
Bovino						
	64,7	8,8	26,5	14,0	63	CARDOSO e GODINHO, 1983
	60,0	12,8	27,2	13,5	60,8	HOCHEREAU-DE REVIERS et al., 1964
Búfalo	64,8	9,2	26,0	8,6	38,7	SHARMA e GUPTA, 1980
	56,0	9,9	34,1	8,7	39,2	McCOOL et al., 1989
Camelo	46,4	8,2	45,4			OSMAN et al., 1979
	51,5	8,1	40,4			ELWISHY, 1988
Lhama	40,0	14,1	45,9			DELHON e LAWZEWITSCH, 1987
Ovino	48,2	8,2	43,6	10,5	47,3	ORTAVANT, 1956
	52,7	7,2	40,1	10,6	47,7	CARDOSO e QUEIROZ, 1988
Caprino	58,7	9,4	31,9			BILASPURI e GURAYA, 1984
	49,1	10,7	40,2	10,6	47,7	FRANÇA et al., 1999
Suíno	28,3	11,7	60,0	8,6	38,7	SWIERSTRA, 1968
	31,4	12,1	56,5	9,0	40,5	FRANÇA e CARDOSO, 1998
Javali	35,2	14,4	50,4	9,1	40,5	ALMEIDA et al., 2006
Cateto	38	11	51	12,6	55,1	COSTA et al., 2009
Perissodactyla						
Equino	35,0	15,8	49,2	12,2	54,9	SWIERSTRA et al., 1974
Jumento	33,0	19,3	47,7	10,5	47,2	NEVES et al., 2002
Jumento africano	29,4	11,8	58,8			NIPKEN e WROBEL, 1997
Carnívora						
Cão						
	37,4	11,5	51,1	13,6	61,2	FOOTE et al., 1972
	41,5	7,8	50,7			PAULA, 1992
SRD (sem raça definida)	40	8	52	13,6	61	SOARES et al., 2009
Pinscher	39	7	54	13,8	61,9	SOARES et al., 2009
Beagle	39	9	52	13,8	61,9	SOARES et al., 2009
Pit Bull	36	7	57	12,6	56,5	SOARES et al., 2009
Poodle	37	8	55	13,8	61,9	SOARES et al., 2009
Labrador	37	7	56	13,8	61,9	SOARES et al., 2009
Raposa	44,2	5,9	49,9	12,0	54	BERG et al., 1990
Coíote	43,9	10,0	46,0	13,6	61,2	KENNELLY, 1972
Vison	27,8	8,6	63,6			TIBA et al., 1968
Gato	45,5	17,6	36,9	10,4	46,8	GODINHO, 1999
Onça-pintada	24,9	19,7	55,4	12,8	57,6	COSTA et al., 2008
Jaguaritica	51	9	40	12,5	56,3	SILVA et al., 2009

Continua na próxima página....

TABELA 1 – Continuação.....

Espécies	Pré-meiótico (%)	Meiótico (%)	Pós-meiótico (%)	Duração do ciclo (dias)	Duração da espermatogênese (dias)*	Referências
Primates						
Homem				16,0	72	HELLER e CLERMONT, 1963
	51,8	6,8	41,5			HELLER et al., 1968
	45,4	5,2	49,4			CLERMONT, 1963
	75,5	4,8	19,9			WISTUBA et al., 2003
Chimpanzé	51,4	4,3	44,3	14,0	63	SMITHWICK et al., 1996
	62,6	3,7	33,3			WISTUBA et al., 2003
<i>Pan paniscus</i>	74,8	5,1	20,5			WISTUBA et al., 2003
<i>Pongo pygmaeus</i>	60,4	5,9	34,33			WISTUBA et al., 2003
<i>Papio anubis</i>	42,3	10,8	46,9	11,0	49,5	CHOWDHURY e STEINBERGER, 1976
<i>P. cynocephalus</i>				10,2	45,9	BARR, 1973
<i>P. hamadryas</i>	49,3	6,3	44,7			WISTUBA et al., 2003
<i>Cercopithecus aethiops</i>	54,1	4,2	41,4			WISTUBA et al., 2003
<i>C. sabaues</i>				10,2	45,9	BARR, 1973
<i>Macaca mulatta</i>	46,6	7,3	46,2	10,5	47,3	DE ROOIJ et al., 1986
				9,5	42,8	BARR, 1973
<i>M. arctoides</i>	49,6	8,3	42,1	11,6	52,2	CLERMONT e ANTAR, 1973
<i>M. fascicularis</i>	41,5	11,7	46,8	9,3	41,9	DANG, 1971
	46,9	7,0	46,1	10,5	47,3	FOUQUET e DADOUNE, 1986
	39,8	6,5	55,3			WISTUBA et al., 2003
<i>M. nigra</i>	46,5	5,6	46,2			WISTUBA et al., 2003
<i>M. thibetana</i>	49,0	5,7	46,1			WISTUBA et al., 2003
<i>Mandrillus sphinx</i>	63,2	5,8	30,8			WISTUBA et al., 2003
<i>Callithrix jacchus</i>				10,0	45	MILLAR et al., 2000
	55,5	7,1	34,8			WISTUBA et al., 2003
<i>Callithrix penicillata</i>	61	8	31	15,4	69,1	LEAL e FRANÇA, 2006
<i>Saguinus fuscicollis</i>	55,5	6,4	37,9			WISTUBA et al., 2003
<i>Saguinus oedipus</i>	44,6	6,2	50,0			WISTUBA et al., 2003
<i>Saimiri sciureus</i>				10,2	45,9	BARR, 1973
	56,6	6,7	36,7			WISTUBA et al., 2003
<i>Cebus apella</i>	49,4	6,5	44,2			WISTUBA et al., 2003
<i>Microcebus murinus</i>	32,78	6,0	61,3			WISTUBA et al., 2003
<i>Otlemur sp.</i>	47,8	9,6	42,6			WISTUBA et al., 2003
Xenarthra						
Tatu	37,0	9,1	53,9	8,2	36,9	TORRES et al., 1981
Didelphimorphia						
Gambá	48,9	4,8	46,3	17,3	77,9	QUEIROZ e NOGUEIRA, 1992
Diprotodontia						
<i>Trichosurus vulpecula</i>	37,2	4,9	58,3	13,5	60,8	LIN et al., 2004
Proboscidea						
Elefante	43,0	10,0	47,0			JOHNSON e BUSS, 1967

¹Após espermiacão e antes da metáfase.

²Meiose I para meiose II.

³Após a conclusão da meiose até a espermiacão

* A duração total da espermatogênese corresponde ao valor de um ciclo multiplicado por 4,5.

TABELA 2 - Dados comparativos da composição testicular, eficiência de célula de Sertoli, número de células de Sertoli por grama de testículo, duração do ciclo do epitélio seminífero (CES) e produção espermática diária (PED) por grama de testículo em mamíferos.

Espécies	Túbulo seminífero (%)	Célula de Leydig (%)	Nº de células de Sertoli por grama de testículo ($\times 10^6$)	Nº de espermátides por célula de Sertoli	Duração do CES (dias)	PED por grama de testículo ($\times 10^6$)	Referências
Caprino	88	1,4	21	15,4	10,6	30	FRANÇA et al., 1999 FRANÇA et al., 2000b
Javali	86,9	6,3	42,4	6,6	9,0	29	ALMEIDA, 2006
Suíno	83	10,0	20	12,4	9,0	25	FRANÇA, 1991 FRANÇA et al., 2000a
Coelho	87	2,2	25	12,2	10,9	26	AMANN, 1970b EWING et al., 1979 RUSSELL e PETERSON, 1984 SWIERSTRA e FOOTE, 1965 RUSSELL et al., 1990b
Hamster	93	1,4	44	10,8	8,7	24	SINHA HIKIM et al., 1988 RUSSELL e PETERSON, 1984 SHARPE, 1994 CLERMONT e TROTT, 1969
Equino	73	18,4	28	8,7	12,2	19	SWIERSTRA et al., 1974 CLEMMONS et al., 1995 JOHNSON e THOMPSON, 1983
Rato	82,4	2,7	26	9,1	12,0	21	MORI e CHRISTENSEN, 1980 JOHNSON et al., 1980 CLERMONT et al., 1959 BERNDTSON e THOMPSON, 1990 MIRANDA, 2002
Camundongo	84,5	3,9	36	7,2	8,6	38	BARTKE et al., 1974
Chinchila	95	1	41	14,5	10,5	58	LEAL e FRANÇA, 2008 RUSSELL et al., 1990b AVELAR et al., 2000
Jumento	84	3,1	29	15,1	10,5	42	NEVES, 2001
Bovino	81,4	4,8	29	8,0	13,3	13	AMANN e ALMQUIST, 1962 FRANÇA e RUSSELL, 1998 CARDOSO, 1981 BERNDTSON e IGBOELI, 1989
Capivara	50	35	20	5,6	11,9	10	PAULA, 1999
Cão	87	4-9	33-41	5-8	61,9	14-22	SOARES, 2009
Gato	88	6,0	32	5,1	10,4	16	FRANÇA e GODINHO, 2003
Onça	75	17	29	7,9	12,8	17	COSTA, et al, 2008
Sagui	92	2	35	8	15,4	18	LEAL e FRANÇA, 2006
Homem	62	6,4	48	3,9	16,0	3,1	HELLER e CLERMONT, 1963 JOHNSON et al., 1980 SHARPE, 1994 RUSSELL et al., 1990b

Tabela 3 - Biometria e morfometria testicular nas quatro diferentes espécies de roedores investigadas (média ± EPM).

Parâmetros	Espécies			
	<i>A. cursor</i>	<i>A. montensis</i>	<i>N. lasiurus</i>	<i>O. nigripes</i>
Peso corporal (g)	54 ± 3	37 ± 2	60 ± 3	23 ± 1
Peso testicular médio (mg)	288 ± 27	217 ± 20	237 ± 15	63 ± 4
Peso do testículo direito	295 ± 26	207 ± 19	235 ± 15	65 ± 4
Peso do testículo esquerdo	282 ± 28	226 ± 21	240 ± 115	61 ± 4
Índice gonadossomático (%)	1,07 ± 0,1	1,1 ± 0,05	0,80 ± 0,04	0,5 ± 0,02
Proporção volumétrica (%)				
Compartimento tubular	95,5 ± 0,7	96,6 ± 0,6	95,5 ± 0,4	96,3 ± 0,9
Túnica própria	3,1 ± 0,1	2,7 ± 0,1	3,5 ± 0,1	2,9 ± 0,1
Epitélio Seminífero	86,7 ± 1,1	86,1 ± 0,2	85,1 ± 0,6	87,1 ± 0,4
Lume	5,7 ± 0,6	7,8 ± 0,2	6,9 ± 0,3	6,3 ± 0,3
Compartimento intertubular	4,5 ± 0,3	3,4 ± 0,1	4,5 ± 0,3	3,7 ± 0,2
Células de Leydig	2,03 ± 0,4	1,1 ± 0,1	1,6 ± 0,2	1,4 ± 0,1
Vasos sanguíneos	1,0 ± 0,3	1,0 ± 0,1	1,4 ± 0,3	1,0 ± 0,2
Vasos/Espaços linfáticos	0,5 ± 0,2	0,3 ± 0,02	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,02
Outros	1,0 ± 0,3	1,0 ± 0,04	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,08
Túnica albugínea (%)	4,1 ± 0,2	4 ± 0,6	3,8 ± 0,2	6,7 ± 0,2
Diâmetro tubular (µm)	245 ± 3	233 ± 3	246 ± 6	181 ± 5
Altura do epitélio seminífero (µm)	92 ± 2	90 ± 2	86 ± 2	69 ± 1
Comprimento total de túbulos seminíferos				
Gramas por testículo (metros)	20 ± 1	22 ± 1	21 ± 1	35 ± 3
Total por testículo (metros)	5,7 ± 0,3	4,2 ± 0,6	4,7 ± 0,3	2,1 ± 0,1

Tabela 4- Freqüências relativas dos doze estádios do ciclo do epitélio seminífero nas quatro diferentes espécies de roedores investigadas (média ± EPM).

Espécie	Estádios											
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII
<i>A. cursor</i>	4,2 ± 0,3	4,1 ± 0,4	15,7 ± 0,5	6,3 ± 0,5	4,5 ± 0,5	7,0 ± 1,0	20,4 ± 0,9	7,1 ± 0,3	12,6 ± 0,6	8,6 ± 0,9	5,0 ± 0,6	4,5 ± 0,4
<i>A. montensis</i>	8,6 ± 1,4	6,4 ± 0,7	14,5 ± 1,1	6,9 ± 1,5	4,0 ± 0,4	6,5 ± 1,3	17,5 ± 1,8	9,1 ± 1,0	6,2 ± 0,9	5,9 ± 0,6	6,2 ± 0,8	8,2 ± 1,3
<i>N. lasiurus</i>	4,6 ± 0,5	4,7 ± 0,3	16,3 ± 0,6	6,1 ± 0,4	3,8 ± 0,4	6,7 ± 0,6	19,1 ± 0,8	6,5 ± 0,8	12,7 ± 0,7	5,5 ± 0,6	6,8 ± 0,7	7,2 ± 0,7
<i>O. nigripes</i>	11,1 ± 1,2	6,1 ± 0,4	5,3 ± 0,7	5,8 ± 0,1	7,5 ± 1,3	12,9 ± 1,0	10,9 ± 1,1	7,0 ± 1,1	10,5 ± 0,8	6,3 ± 0,6	6,5 ± 0,9	10,1 ± 0,8

Tabela 5 - Percentual das fases pré-meiótica, meiótica e pós-meiótica nas quatro diferentes espécies de roedores investigadas (média ± EPM).

Espécies	Estádios agrupados de acordo com a divisão meiótica (%)		
	Pré-meiótica ¹	Meiótica ²	Pós-meiótica ³
<i>A. cursor</i>	33,3 ± 1,9	4,5 ± 0,3	62,2 ± 3,4
<i>A. montensis</i>	28,0 ± 3,4	8,2 ± 1,2	63,8 ± 3,1
<i>N. lasiurus</i>	31,5 ± 2,8	7,2 ± 0,7	61,3 ± 3,7
<i>O. nigripes</i>	29,9 ± 3,4	9,6 ± 0,9	60,5 ± 7,1

¹Após espermiacão e antes da metáfase.

²Meiose I para meiose II.

³Após a conclusão da meiose até a espermiacão.

Tabela 6 - Duração (dias) do ciclo do epitélio seminífero nas quatro diferentes espécies de roedores investigadas (*A. cursor*, *A. montensis*, *N. lasiurus* e *O. nigripes*) (média ± EPM).

Espécies	Animal	Tempo decorrido após a injeção	Célula germinativa marcada mais avançada	Estádios do Ciclo	Número de ciclos percorridos	Duração do ciclo
<i>A. cursor</i>	1	1 hora	PI/L	VII	-	-
		19,8 dias*	AI	XII	2,33	8,49
	2	1 hora	PI/L	VII	-	-
		19,8 dias*	AI	XII	2,37	8,35
Duração média do ciclo baseada em PI/L = 8,42 ± 0,1 dias.						
<i>A. montensis</i>	1	1 hora	PI/L	IX	-	-
		21,79 dias*	AI	I	2,44	8,93
	2	1 hora	PI/L	IX	-	-
		21,8 dias*	AI	I	2,46	8,86
Duração média do ciclo baseada em PI/L = 8,89 ± 0,04 dias.						
<i>N. lasiurus</i>	1	1 hora	PI/L	IX	-	-
		20,1 dias*	AI	III	2,58	7,79
	2	1 hora	PI/L	IX	-	-
		20,1 dias*	AI	III	2,57	7,82
Duração média do ciclo baseada em PI/L = 7,8 ± 0,02 dias.						
<i>O. nigripes</i>	1	1 hora	PI/L	IX	-	-
		14,65 dias*	Ar	VIII	1,83	8,00
	2	1 hora	PI/L	IX	-	-
		14,64 dias*	Ar	VIII	1,86	7,87
Duração média do ciclo baseada em PI/L = 7,94 ± 0,1 dias.						

PI/L - espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno.

AI - espermatídes alongadas.

Ar- espermatídes arredondadas.

* Tempo total após a injeção de timidina menos 1 hora.

Tabela 7 – Razões entre números celulares corrigidos, obtidos no estágio VIII do CES, número de células de Sertoli e produção espermática diária por testículo e por grama de testículo nas quatro diferentes espécies de roedores investigadas (média ± EPM).

Parâmetro	Espécies			
	<i>A. cursor</i>	<i>A. montensis</i>	<i>N. lasiurus</i>	<i>O. nigripes</i>
Espermátide Ar: Espermatócito I P	2,9 ± 0,2	3,1 ± 0,3	3,03 ± 0,1	2,6 ± 0,1
Espermátide Ar: Célula de Sertoli	10,9 ± 0,8	10,3 ± 0,7	13,2 ± 0,5	8,4 ± 0,2
Número de células de Sertoli por grama de testículo (x 10 ⁶)	52,1 ± 4,3	54,7 ± 4,3	47,9 ± 3,7	69,2 ± 4,7
Número de células de Sertoli por testículo (x 10 ⁶)	14,4 ± 1,6	11,3 ± 0,9	10,9 ± 8,1	4,1 ± 0,3
Produção espermática diária por grama de testículo (x 10 ⁶)	65,9 ± 3,8	62 ± 2,8	79 ± 5,1	74 ± 3
Produção espermática diária por testículo (x 10 ⁶)	18,5 ± 2,2	13,2 ± 0,9	18,1 ± 1,3	4,8 ± 0,4

P - Espermatócitos primários em paquíteno.

Ar - Espermátides arredondadas.

Tabela 8 - Morfometria e número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo nas quatro diferentes espécies de roedores investigadas (média ± EPM).

Parâmetro	Espécies			
	<i>A. cursor</i>	<i>A. montensis</i>	<i>N. lasiurus</i>	<i>O. nigripes</i>
Diâmetro nuclear (µm)	8,0 ± 0,2	7,3 ± 0,1	7,6 ± 0,1	6,5 ± 0,1
Volume da célula de Leydig (µm ³)	1092 ± 131	807 ± 49	967 ± 21	393 ± 18
Volume nuclear (µm ³)	275 ± 17	204 ± 11	235 ± 7	146 ± 4
Volume citoplasmático (µm ³)	817 ± 115	603 ± 40	732 ± 52	247 ± 15
Número de células de Leydig por grama de testículo (x10 ⁶)	19,4 ± 4,2	14,6 ± 1,8	17,1 ± 2,3	33,2 ± 2,9
Número de células de Leydig por testículo (x10 ⁶)	5,2 ± 1,0	3,1 ± 0,5	4,0 ± 0,7	1,9 ± 0,1

Tabela 9 - Parâmetros comparativos relacionados à estereologia testicular e eventos espermatogênicos em roedores sexualmente maduros.

	Subordem Myomorpha								Suborder Hystricomorpha				
	<i>A. cursor</i>	<i>A. montensis</i>	<i>N. lasiurus</i>	<i>O. nigripes</i>	Gerbil ^a	Hamster ^b	Rato ^c	Camundongo ^d	Cutia ^e	Paca ^f	Chinchilla ^g	Capivara ^h	<i>T. moojeni</i> ⁱ
Peso corporal (g)	54	37	60	23	80	160	414	26 - 39	2500	5400	500	54100	207
Peso testicular (g)	0,28	0,22	0,24	0,06	0,54	1,7	1,57	0,095 - 0,113	4,1	5,9	2,5	31,7	0,97
Índice gonadossomático (%)	1,07	1,1	0,8	0,5	0,72	2,13	0,76	0,76-0,55	0,33	0,22	0,8	0,12	0,93
Túbulos seminíferos (%)	96	97	96	96	92	93	89	91 - 93	91	93	95	50	98
Célula de Leydig (%)	2	1,1	1,6	1,4	3	2,7	1,4	3,7-5,3	2,2	1,6	1	32,1	0,3
Volume da célula de Leydig (µm ³)	1092	807	967	393	1148	1092	1207	1021 - 1450	1230	960	1381	2029	799
Número de células de Leydig g/test. (x10 ⁶)	19	15	17	33	28	55	12,6	29-49	18	17	7	186	4
Fase pré-meiótica ¹ (%)	33	28	32	30	55	26	24	22	46	45	50	45	40
Fase meiótica ² (%)	5	8	7	10	9	8	6	9	14	12	9	15	7
Fase pós-meiótica ³ (%)	62	64	61	61	36	67	71	69	40	43	41	41	53
Índice meiótico ⁴	2,9 (25%)	3,1 (22%)	3 (25%)	2,6 (35%)	2,8 (30%)	3,3 (17%)	3,4 (15%)	2,3 - 2,8 (43 - 20%)	3,0 (26%)	3,2 (21%)	3 (25%)	2,1 (48%)	3 (26%)
Ciclo espermatogênico (dias)	8,4	8,9	7,8	7,9	10,6	8,7	12,9	8,6 - 8,9	9,5	11,5	10,2	11,9	8,6
Duração total de espermatogênese (dias)	37,9	40,0	35,1	35,7	47,7	39,2	58	38,7 - 40	42,8	51,6	45,8	53,5	38,7
Células de Sertoli por grama de testículo (x10 ⁶)	52,1	54,7	47,9	69,2	28,0	44,5	27	39 - 41	57	43	44	19	53
Espermátides arredondadas por células de Sertoli	10,9	10,3	13,2	8,4	12,6	8,2	8,0-10,3	10,5 - 11,5	9,2	10,9	14	5,6	14,7
Produção espermática diária g/test. (x10 ⁶)	66	62	79	74	33	24	17-24	45 - 48	52	39	61	10	82

¹ Após espermição e antes da metáfase.

² Meiose I para meiose II.

³ Após a conclusão da meiose até espermição.

⁴ Mensuração do número de espermátides arredondadas produzidas por espermátocito primário em paquíteno. Os números entre parênteses correspondem ao percentual de perdas celulares.

Referências

^aSegatelli et al., 2004.

^bSinha Hikim et al., 1988; Van Haaster e De Rooij, 1993.

^cClermont e Harvey, 1965; Rocha et al., 1999; França, 2007.

^dClermont e Trott, 1969; Avelar et al., 2004.

^eCosta e França, 2009.

^fCosta e França, 2009.

^gLeal e França, 2008 e 2009.

^hPaula et al., 1999; Paula, 1999.

ⁱCordeiro Jr. et al., 2009.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERCROMBIE, M.; M. L. JOHNSON. Quantitative histology of Wallerian degeneration I. Nuclear population in rabbit sciatic nerve. J. Anat. Lond. vol. 80, pp. 37-50, 1946.

ALMEIDA, F.F., LEAL, M.C., FRANÇA, L.R. Testis morphometry, duration of spermatogenesis, and spermatogenic efficiency in the wild boar (*Sus scrofa scrofa*). Biol Reprod 75, 792-799, 2006.

AMANN, R. P. Reproductive physiology and endocrinology of the dog. In: Current therapy in theriogenology (ed. Morrow DA), pp. 531-538. Saunders, London, UK, 1986.

AMANN, R.P. Sperm production rates. In: JOHNSON, A. D.; GOMES, W. R.; VANDEMARK, N.L. (Eds.). The testis. New York: Academic Press, v.1, cap.7, p.433-482, 1970a.

AMANN, R.P. The male rabbit. IV. Quantitative testicular histology and comparisons between daily sperm production as determined histologically and daily sperm output. Fertil. Steril., v.21, n.1, p.662-672, 1970b.

AMANN, R.P.; ALMQUIST, J.O. Reproductive capacity of dairy bulls. VIII. Direct and indirect measurement of testicular sperm production. J. Dairy Sci., v.45, n.1, p.774-781, 1962.

AMANN, R.P.; ALMQUIST, J.O. Reproductive capacity of dairy bulls. VI. Effect of unilateral vasectomy and ejaculation frequency on sperm reserves; aspects of epididymal physiology. J Reprod Fertil. 3:260-8, 1962.

AMANN, RP; SCHANBACHER, BD. Physiology of male reproduction. J. Anim. Sci. Suppl.57:380-403. 1983.

ATTAL, J.; COUROT, M. Développement testiculaire et établissement de la spermatogénèse chez le taureau. Ann Biol. Anim. Bioch. Biophys., v.3, p.219- 241, 1963.

AVELAR, G. F. ; LEAL, M. C. ; FRANÇA, L. R. Avaliação morfofuncional do testículo, duração do ciclo do epitélio seminífero e produção espermática diária em três diferentes linhagens de camundongos. In: Congresso de integração em biologia da reprodução, 2003, Ribeirão Preto. Anais do 2o Congresso de Integração em Biologia da Reprodução, 2003.

AVELAR, G.F.; RUSSELL, L.D.; FRANÇA, L.R. Histometria testicular e frequência dos estádios do ciclo do epitélio seminífero em camundongos adultos da linhagem ICR. Braz. J. Morphol. Sci. (supl.), v.17, p.169-170, 2000.

BARR, A.B. Timing of spermatogenesis in four nonhuman primate species. Fertil. Steril., v.24, n.5, p.381-389, 1973.

BARTKE, A.; WEIR, J.A.; MATHISON, P. Testicular function in mouse strains with different age of sexual maturation. *J. Hered.*, v.65, n.1, p.204-208, 1974.

BAUM, JS; GEORGE, JP; MCCALL, K. Programmed cell death in the germline. *Semin Cell Dev Biol.* 16:245-259. 2005.

BERG, A.K.; CLAUSEN, O.P.; HUITFELDT, H.S. The spermatogenic cycle in the blue fox (*Alopex lagopus*): relative frequency and absolute duration of the different stages. *Int. J. Androl.*, v.13, n.4, p.3215-326, 1990.

BERNDTSON, W.E.; IGBOELI, G. Number of Sertoli cells, quantitative rates of sperm production, and the efficiency of spermatogenesis in relation to the daily sperm output and seminal quality of young beef bulls. *Am. J. Vet. Res.*, v.50, n.8, p.1193-1197, 1989.

BERNDTSON, W.E.; THOMPSON, T.L. Changing relationships between testis size, Sertoli cell number and spermatogenesis in Sprague-Dawley rats. *J. Androl.*, v.11, p.429-435, 1990.

BILASPURI GS, GURAYA SS. 1984. The seminiferous epithelial cycle and spermatogenesis in goats (*Caprahircus*). *J Agric Sci, Camb*, 103, 359-368.

BILASPURI, G.S.; KAUR, R. Spermatogenic cells and stages of the seminiferous epithelial cycle in the indian gerbil field rat, *Tatera indica*. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.6, n.6, p.699-704, 1994.

BONVICINO, C. R.; LEMOS, B.; WEKSLER, M. Small mammals of Chapada dos Vedeiros national park (Cerrado of central Brazil). *Ecologic, Karyologic and taxonomic considerations. Brazilian Journal of Biology.* V.65, n.3. São Carlos: 2005, p. 395-406.

BUENO, A. de A. Vulnerabilidade de pequenos mamíferos em áreas abertas à vertebrados predados na estação ecológica de Itirapina, SP. 99p. Dissertação (Mestrado em Ecologia). Universidade de São Paulo, 2003.

BUNDY, D.C. Photographic emulsions and processing. In: STUMPF, W.E.; SOLOMON, H.F. (Eds.) *Autoradiography and correlative imaging*. San Diego: Academic Press, p.49-57, 1995.

CAPEL, B. The battle of the sexes. *Mech. Dev.*, v.92, p.89-103, 2000.

CARDOSO, F.M. Morfologia, cinética e quantificação da espermatogênese em zebus (*Bos indicus*). 203p. Tese (doutorado em ciências), UFMG, 1981.

CARDOSO, F.M.; GODINHO, H.P. Cycle of the seminiferous epithelium and its duration in the zebu, *Bos indicus*. *Anim. Reprod. Sci.*, v.5, p.231-245, 1983.

CARDOSO, F.M.; QUEIROZ, G.F. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium and daily sperm production of brazilian hairy rams. *Anim. Reprod. Sci.*, v.17, p.77-84, 1988.

CHOWDHURY, A.K.; STEINBERGER, E. A quantitative study of the effect of heat on germinal epithelium of rat testes. *Am. J. Anat.*, v.115, p.509-524, 1964.

CHOWDHURY, A.K.; STEINBERGER, E. A study of germ cell morphology and duration of spermatogenic cycle in the baboon, *Papio anubis*. *Anat. Rec.*, v.185, n.2, p.155-170, 1976.

CLEMMONS, A.J.; THOMPSON Jr., D.L.; JOHNSON, L. Local initiation of spermatogenesis in the horse. *Biol. Reprod.*, v.52, p.1258-1267, 1995.

CLERMONT, Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man. *Am. J. Anat.*, v.112, p.35-51, 1963.

CLERMONT, Y.; ANTAR, M. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium and the spermatogonial renewal in the monkey *Macaca arctoides*. *Am. J. Anat.*, v.136, p.153-166, 1973.

CLERMONT, Y.; HARVEY, S.C. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium of normal, hypophysectomized and hypophysectomized-hormone treated albino rat. *Endocrinology*, v.76, p.80-89, 1965.

CLERMONT, Y.; LEBLOND, C.P.; MESSIER, B. Durée du cycle de l'épithelium séminal du rat. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Suppl.*, v.48, p.37-55, 1959.

CLERMONT, Y.; MORGENTALER, H. Quantitative study of spermatogenesis in the hypophysectomized rat. *Endocrinology*, v.57, p. 369-382, 1955.

CLERMONT, Y.; TROTT, M. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium in the mouse and hamster determined by means of 3H-thymidine and radioautography. *Fert. Steril.*, v.20, p.805-817, 1969.

CLERMONT, Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals, seminiferous epithelium cycle and spermatogonial review. *Physiol. Rev.* 52:198- 236. 1972.

CORDEIRO-JR, D.A.; TALAMONI, S. A. New data on the life history and occurrence of spiny rats *T. moojeni* (Rodentia: Echimyidae), in southeastern Brazil. *Acta Theriol.*, 51 (2): 163-168, 2006.

CORDEIRO-JR, D.A.; COSTA, G.M.J.; TALAMONI, S.A.; FRANÇA, L.R. Spermatogenic efficiency in the spiny rat, *Trinomys moojeni* (Rodentia:Echimyidae), *Anim. Reprod. Sci.*, "in press", 2009.

COOKE, P.S.; ZHAO, Y.D.; BUNICK, D. Triiodothyronine inhibits proliferation and stimulates differentiation of cultured neonatal Sertoli cells: possible mechanism for increased adult testis weight and sperm production induced by neonatal goitrogen treatment. *Biol. Reprod.*, v.51, p.1000-1005, 1994.

COSTA, G.M.J. Estudo comparativo da função testicular e eficiência espermatogênica em três espécies diferentes de mamíferos silvestres com potencial interesse econômico. 113p. Dissertação (mestrado em Biologia Celular)- UFMG, 2009.

COSTA, G.M.J Spermatogenic cycle length and sperm production in a feral pig species (collared peccary, *Tayassu tajacu*. *J Androl*, “in press”, 2009.

COSTA, G. M. J. ; GARCIA, H. C. ; MORATO, R. G. ; Alvarenga RLLS ; FRANCA, L. R. . Duration of spermatogenesis and daily sperm production in the jaguar (*Panthera onca*). *Theriogenology*, v. 70, p. 1136-1146, 2008.

COUTO, D.; TALAMONI, S. A. . Reproductive condition of *Akodon montensis* Thomas and *Bolomys lasiurus* (Lund) (Rodentia, Muridae) based on histological and histometric analyses of testes and external characteristics of gonads. *Acta Zoologica*, Stockholm, v. 86, p. 111-118, 2005.

D’ELÍA, G.; MORA, I.; MYERS, P.; OWEN, R.D. New and noteworthy records of Rodentia (Erethizontidae, Sciuridae, and Cricetidae) from Paraguay. *Zootaxa*. 1784:39-57, 2008.

DANG, D.C. Durée du cycle de l’épithelium séminifère du singe crabier, *Macaca fascicularis*. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.*, v.11, n.3, p.373-377, 1971.

DE ROOIJ, D.G.; ALPHEN, M.M.A.; VAN DE KANT, H.J.G. Duration of the seminiferous epithelium and its stages in the *Rhesus monkey* (*Macaca mulata*). *Biol. Reprod.*, v.35, p.587-591, 1986.

DE ROOIJ, D.G.; LOK, D. Regulation of the density of spermatogonia in the seminiferous epithelium of the chinese hamster: II. Differentiating spermatogonia. *Anat. Rec.*, v.217, p.131-136, 1987.

DE ROOIJ, D.G.; RUSSELL, L. D. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J. Androl.*, v.21, n.6, p.776-798, 2000.

DELHON, G.A.; VON LAWZEWITSCH, I. Reproduction on the male llama (*Lama glama*), a South American camelid. I. spermatogenesis and organization of the intertubular space of the mature testis. *Acta Anat.*, v.129, n.1, p.59-66, 1987.

DORST, V.J.; SAJONSKI, H. Morphometrische untersuchunhen am tubulussystem des schweinehodens während der postnatalen entwicklug. *Monatsh. Vet. Med.*, v.29, p.650-652, 1974.

- DUARTE, A.P.G. Aspectos reprodutivos de *Akodon montensis* (Rodentia, Muridae) e *Artibeus lituratus* (Chiroptera, Phyllostomidae) em áreas de mata no sudeste do Brasil. 52p. Dissertação (Mestrado em Zoologia), PUC-Minas, 2003.
- EDDY, E.M., O'BRIEN, D.A., 1994. The spermatozoon. In: Knobil, E., Neil, J.D. (Eds.), *The physiology of reproduction*. Raven, New York, pp. 29-77.
- EISENBERG, JF. *The mammalian radiations: An analysis of trends in evolution, adaptation, and behavior*. Chicago: University of Chicago Press. 1981.
- ELWISHY, A.B. Reproduction in the male dromedary (*Camelus dromedarius*): a review. *Anim. Reprod. Sci.*, v.17, p.217-241, 1988.
- EWING, L.L.; ZIRKIN, B.R.; COCHRAN, R.C. et al. Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cell mass. *Endocrinology*, v.105, n.5, p.1135-1142, 1979.
- FERREIRA, A.C.S. Determinação de puberdade em cutias (Rodentia: Dasyproctidae) criadas em cativeiro, através da quantificação das células espermatogênicas. 62p. Dissertação (mestrado em Zoologia). UFPA, 2002.
- FONSECA, G.A.B., HERRMANN, G., LEITE, Y.L.R., MITTERMEIER, R.A., RYLANDS, A.B., PATTON, J.L. 1996. Lista anotada dos mamíferos do Brasil. *Occasional Papers in Conservation Biology*. 4, 1-38.
- FOOTE, R.H.; SWIERSTRA, E.E.; HUNT, W.L. Spermatogenesis in the dog. *Anat. Rec.*, v.173, p.341-352, 1972.
- FOUQUET, J.P.; DADOUNE, J.P. Renewal of spermatogonia in the monkey (*Macaca fascicularis*). *Biol. Reprod.*, v.35, n.1, p.199-207, 1986.
- FRANÇA L.R.; GODINHO, C.L. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). *Biol. Reprod.* 68:1554-1561, 2003.
- FRANÇA, L. R.; SILVA Jr.; CHIARINI-GARCIA, H. et al. Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. *Biol. Reprod.*, v.63, p.1629-1636, 2000a.
- FRANÇA, L.R. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. 185p. Tese (doutorado em ciências), UFMG, 1991.
- FRANÇA, L.R. Daily sperm production in Piau boars estimated from Sertoli cell population and Sertoli cell index. In: DIELEMAN, SJ (Ed). *Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*. Elsevier Science. 1716–1718, 1992.

FRANCA, L.R. Espermatogénesis (Espermatogénesis, producción y tránsito del espermatozoides a través del epidídimo). *separata*, v. 15, p. 16-27, 2007.

FRANÇA, L.R.; BECKER-SILVA, S.C.; CHIARINI-GARCIA, H. The length of the seminiferous cycle in goats (*Capra hircus*). *Tiss. Cell*, v.31, n.89, p.274-280, 1999.

FRANÇA, L.R.; CARDOSO, F.M. Duration of spermatogenesis and sperm transit time through the epididymis in the Piau boar. *Tiss. Cel.*, v.30, n.5, p.573-582, 1998.

FRANÇA, L.R.; HESS, R.A.; COOKE, P.S. et al. Neonatal hypothyroidism causes delayed Sertoli cell maturation in rats treated with propylthiouracil: evidence that the Sertoli cell controls testis growth. *Anat. Rec.*, v.242, p.57, 1995.

FRANCA, L.R.; HESS, R.A. Structure of the Sertoli cell. In: SKINNER, M.; GRISWOLD, M. (Eds). *Sertoli cell Biology*. San Diego - California: Elsevier Academic Press. 19-40. 2005.

FRANÇA, L.R.; LEAL, M.C.; BECKER-SILVA, S.C. et al. Testis morphometry and daily sperm production in goats (*Capra hircus*). In: 11th EUROPEAN WORKSHOP ON MOLECULAR AND CELLULAR ENDOCRINOLOGY OF THE TESTIS, 11, 2000, Bretagne, France. Programme e Miniposters...Bretagne: (s.n.), 2000b. p.B25.

FRANÇA, L.R.; OGAWA, T.; AVARBOCK, M.R. et al. Germ cell genotype control cells cycle during spermatogenesis in the rat. *Biol. Reprod.*, v.59, p.1371-1377, 1998.

FRANÇA, L.R.; RUSSEL, L.D. The testis of domestic animals. In: REGADERA, J.; MARTINEZ GARCIA (ed.). *Male reproduction: a multidisciplinary overview*. Madrid: Churchill Livingstone, 1998. p.197-219

FRANÇA, LR; AVELAR, GF; ALMEIDA, FF. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*. 63:300-318. 2005.

GENTILE, R. Population Dynamics and Reproduction of Marsupials and Rodents in a Brazilian Rural Study: A Five Year Study. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 35: 1-9, 2000.

GODINHO, C.L. Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*), sexualmente maduros. 80p. Dissertação (mestrado em biologia celular): UFMG, 1999.

GRAIPEL, M.E.; MILLER,P.R.M. GLOCK,L. Padrão de atividade de *A. montensis* e *Oryzomys russatus* na reserva de Volta Velha, Santa Catarina, sul do Brasil. *Mastozoologia Neotropical*. V. 10, n.2. Tucumán: 2003, p. 255-160.

GROCOCK, C.A. A study of spermatogenesis in the developing and mature vole (*Microtus agrestis*). *J. Reprod. Fertil.*, v.29, n.1, p.153-154, 1972.

GROCOCK, C.A.; CLARK, J.R. Duration of spermatogenesis in the vole (*Microtus agrestis*) and bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *J. Reprod. Fert.*, v.47, p.133-135, 1976.

GROCOCK, C.A.; CLARK, J.R. Spermatogenesis in mature and regressed testes of the vole (*Microtus agrestis*). *J. Reprod. Fertil.*, v.43, p.461-470, 1975.

HART, B.L., ECKSTEIN, R.A. The role of gonadal hormones in the occurrence of objectionable behaviours in dogs and cats. *Applied Animal Behaviour Science* 52, 331-344, 1997.

HELLER, C. G.; LALLI, M. F.; ROWLEY, M. J. Factors affecting testicular function in man. III International Pharmacological Congress, Sao Paulo, Brazil, July 1966. *Pharmacology of Reproduction. E. Diczfalusy (e d.)*, Pergamon Press Ltd. pp. 61-73, Vol. 2, 1968.

HELLER, C.G.; CLERMONT, Y. Spermatogenesis in man: an estimate of its duration. *Science*, v.140, p.184-186, 1963.

HELLER, C.G.; HELLER, G.V.; ROWLEY, M.J. Human spermatogenesis: an estimate of the duration of each cell association and of each cell type. *Excerpta. Med. F. I.*, v.184, p.1012-1018, 1969.

HERRMANN, G. Estrutura de comunidades de pequenos mamíferos em áreas secundária de mata atlântica. Instituto de Ciências Biológicas. Belo Horizonte, UFMG, 111 pp., (Mestrado), 1991.

HESS, R.A.; FRANÇA, L.R. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: *Molecular mechanisms in spermatogenesis* (ed.Cheng CY), pp. 1-15. Landes Bioscience, 2007.

HOCHEREAU, M.T. Constance des frequencias relatives des stades du cycle de l'epithelium seminifere chez le taureau et chez le rat. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.*3:93-102, 1963.

HOCHEREAU-DE-REVIERS, M.T.; COUROT, M.; ORTAVANT, R. Marquage des cellules germinales du belier et du taureau par injection de thymidine tritiee dans l'artere spermatique. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.*, v.2, p.157-159, 1964.

HOCHEREAU-DE-REVIERS, M.T.; LINCOLN, G.A. Seasonal-variation in histology of testis of red deer, cervus-elaphus. *J. Reprod. Fertil.*, v.54, n.2, p.209-213, 1978.

JOHNSON, L.; PETTY, C.S.; NEAVES, W.B. A comparative study of daily sperm production and testicular composition in humans and rat. *Biol. Reprod.*, v.22, p.1233-1243, 1980.

JOHNSON, L.; THOMPSON Jr., D.L. Age-related and seasonal variation in the Sertoli cell population, daily sperm production and serum concentrations of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone in stallions. *Biol. Reprod.*, v.29, p.777-789, 1983.

JOHNSON, L., VARNER, D.D., ROBERTS, M.E. et al. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61: 471-480, 2000.

JOHNSON, O.W.; BUSS, I.O. The testis of the african elephant (*Loxodonta africana*). *J. Reprod. Fertil.*, v.13, p.11-21, 1967.

KENAGY, G.J., TROMBULAK, S.C.. Size of mammalian testes in relation to body size. *J. Mammal.* 67, 1-22, 1986.

KENNELLY, J.J. Coyote reproduction: 1- The duration of the spermatogenic cycle and epididymal sperm transport. *J. Reprod. Fert.*, v.31, p.163-170, 1972.

KERR, J.B.; LOVELAND, K.L.; O'BRYAN, M.K.; KRETZER, D.M. Cytology of the testis and intrinsic control mechanisms. In: *Physiology of Reproduction* (ed. Neill JD), pp. 827-947 Elsevier, 2006.

LAGE, R.R., SCHMIDT, E.M.S.. Rodentia – Roedores Silvestres (Capivara, Cutia, Paca, Ouriço), in: Cubas, Z.S., Silva, J.C.R., Catão-Dias, J.L. (Eds.), *Tratado de Animais Selvagens Medicina Veterinária*. Roca, São Paulo, pp. 475-491, 2007.

LEAL, M.C.; FRANÇA, L.R. Slow increase of Sertoli cell efficiency and daily sperm production causes delayed establishment of full sexual maturity in the rodent *Chinchilla lanigera*. *Theriogenology*, "in press", 2008

LEAL, M.C.; FRANÇA, L.R. Desenvolvimento pós-natal do testículo e duração do ciclo do epitélio seminífero em *Chinchilla lanigera*. XI Semana de Iniciação Científica, UFMG: Belo Horizonte, 2002.

LEAL, M.C.; SIVA JUNIOR, V.A.; PAULA, T.A.R. et al. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle and sperm production in peccaries (*Tayassu tajacu*). *Acta Microscopica, Suppl. C*, v.8, p.553-554, 1999.

LEAL, MC; FRANÇA, LR. The Seminiferous Epithelium Cycle Length in the Black Tufted-Ear Marmoset (*Callithrix penicillata*) Is Similar to Humans. *Biol Reprod.* 74:616-624. 2006.

LEBLOND, CP; CLERMONT, Y. Definition of the stages of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 55:548-573. 1952.

LIN, M.; HARMAN, A.; FLETCHER, T. P. Cycle of the seminiferous epithelium in a marsupial species, the bushtail possum (*Trichosurus vulpecula*), and estimation of its duration. *Reproduction, Fertility and Development* 16, 307-313, 2004.

LIZZARRALDE et al. Ecologia de dos poblaciones de roedores de Tierra Del Fuego. II. Area habitacional, movilidad y su heredabilidad. *Physis* (Bueno Aires), v. 44, n.106, p. 73-81, 1986.

LUNSTRA, DD; SCHANBACHER, BD. Teticular function and Leydig cell ultrastructure in long-term bilateral cryptorchid rams. *Biol. Reprod.* 38: 211-220. 1988.

MAEDA, S.; ENDO, H.; KIMURA, J. et al. Classification of the cycle of the seminiferous epithelium in the common tree shrew (*Tupaia glis*). *J. Vet. Med. Sci.*, v.58, n.5, p.481-484, 1996.

McCOOL, C.J.; ENTWISTLE, K.W.; TOWNSEND, M.P. The cycle of the seminiferous epithelium in the australian swamp buffalo. *Theriogenology*, v.319, n.2, p.399-417, 1989.

MILLAR, M.R.; SHARPE, R.M.; WEINBAUER, G.F. et al. Marmoset spermatogenesis: organizational similarities to the human. *Int. J. Androl.* v.23, n.5, p.266-277, 2000.

MIRANDA, J.R. Efeitos do tratamento neonatal com 6-N-Propil-2-Tiouracil (PTU) e FSH na proliferação das células de Sertoli e função testicular em ratos Wistar adultos. 75p. Dissertação (mestrado em Medicina Veterinária) UFMG, 2002.

MORI, H.; CHRISTENSEN, A.K. Morphometric analyses of Leydig cells in the normal rat testis. *J. Cell Biol.*, v.84, p.340-354, 1980.

NEVES, E.S.; CHIARINI-GARCIA, H.; FRANÇA, L.R. Comparative testis morphometry and seminiferous epithelium cycle length in donkeys and mules. *Biol. Reprod.*, v.67, n.1, p.247-455, 2002.

NEVES, E.S.; CHIARINI-GARCIA, H.; FRANÇA, L.R. Seminiferous epithelium cycle length in donkeys. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANDROLOGY, 7., 2001, Montreal. Abstracts... Montreal: American Society of Andrology. June, 2001. p.158.

NIPKEN, C.; WROBEL, K.H. A quantitative morphological study of age-related changes in the donkey testis in the period between puberty and senium. *Andrologia*, v.29, p.149-161, 1997.

NOLLER, D.W.; FLICKINGER, C.J.; HOWARDS, S.S. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium in the guinea pig determined by triated thymidine autoradiography. *Biol. Reprod.*, v.17, p.532-532, 1977.

NOWAK, R.M. Walker's mammals of the world. 6 ed., Vol. 2. London: Johns Hopkins University Press, 1999. p.1053-1062.

OAKBERG, E.F. Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *Am. J. Anat.*, v.99, p.507-516, 1956.

OLIVEIRA, J.A.; BONVICINO, C.R. Ordem Rodentia. In N.R. Reis, A.L. Peracchi, W.A. Pedro,; I.P. Lima (eds.). *Mamíferos do Brasil*. Imprensa da UEL, Londrina, p. 347-406, 2006.

ORGBIN-CRIST, M.C. Gonadal and epididymal sperm reserves in the rabbit: Estimation of the daily sperm production. *J. Reprod. Fertil.*, v.15, p.15-25, 1968.

ORTAVANT, R. Autoradiographie des cellules germinales du testicule de bélier durée des phénomènes spermatogénétiques. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.*, v.45, n.1, p.1-10, 1956.

ORTH, JM. Cell biology of testicular development in fetus and neonate. In: DESJARDINS, C; EWING, LL (Eds.). *Cell and molecular biology of the testis*. New York: Oxford University Press. 3-42. 1993.

ORTH, J.M.; GUNSALUS, G.L.; LAMPERTI, A.A. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology*, v.122, p.787-794, 1988.

OSMAN, D.I.; MONIEM, K.A.; TINGARI, M.D. Histological observations on the testis of the camel, with special emphasis on spermatogenesis. *Acta Anat.*, v.104, n.2, p.164-171, 1979.

ODD, J.L.; DE ROOIJ, D.G. Spermatogenesis in the chinese hamster. *Anat. Rec.*, n.187, p.113-124, 1977.

PARREIRA, G.G.; CARDOSO, F.M. Biologia reprodutiva de machos *Bolomys lasiurus* Lund, 1841 (Rodentia, Cricetidae). I. Morfologia da espermatogênese e ciclo do epitélio seminífero. *Rev. Bras. Biol.*, v.51, n.3, p.639-646, 1991.

PASHOV, B.; MATAMOROS, H.Y. Ciclo estral del tepezcuinte (*Cuniculus paca*) (Rodentia: Dasyproctidae) en cautiverio. *Brenesia*, n.22, p.249-260, 1984.

PATTON, J., F. SMITH. Diversification in the Genus *Akodon*(Rodentia: Sigmodontiane) in Southeastern South America: Mitochondrial DNA Sequence Analysis. *Journal of Mammalogy*, 82: 92-101, 2001.

PAULA, T.A.R. Análise histométrica e funcional do testículo de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) adultas. 84p. Tese (doutorado em Biologia Celular), UFMG, 1999.

PAULA, T.A.R. Estudo histológico quantitativo da atividade espermatogênica do cão, em diferentes faixas estárias após a puberdade. 1992. 65p. Dissertação (mestrado em Morfologia)- UFMG, 1992.

PAULA, T.A.R.; CHIARINI-GARCIA, H.; FRANÇA, L.R. Seminiferous epithelium cycle and its duration in capybaras (*Hydrocoerus hydrochaeris*). *Tiss. Cell*, v.31, p.327-334, 1999.

PIERCE, E.J.; BREED, W.G. Cytological organization of the seminiferous epithelium in the australian rodents *Pseudomys australis* e *Notomys alexis*. *J. Reprod. Fertil.*, v.80, n.1, p.91-103, 1987.

QUEIROZ, G.F.; NOGUEIRA, J.C. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium and quantitative histology of the testis of the south american White-belly opossum (*Didelphis albiventris*), marsupialia. *Reprod. Fert. Dev.*, v.4, p.213-222, 1992.

REDFORD, K., J. EISENBERG . *Mammals of the Neotropics*. Chicago: University of Chicago Press, 1992.

ROOSEN-RUNGE, EC. Germinal-cell loss in normal metazoan spermatogenesis. *J. Reprod. Fertil.* 35:339-348. 1973.

ROOSEN-RUNGE, E.C. *The process of spermatogenesis in mammals*. Cambridge: University Press, 1977.

RUSSELL, L.D., SINHA-HIKIM, A.P., GHOSH, S. et al. Structure-function relationships in somatic cells of the testis and accessory reproductive glands. In: BARTKE, A. (Ed). *Function of somatic cells in the testis*. New York: Springer-Verlag, 1994, p.55-83.

RUSSELL, L.D.; ETTLIN, R.A.; SINHA-HIKIN, A.P. et al. *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. Clearwater: Cache River Press, 1990a. 286p.

RUSSELL, L.D.; FRANÇA, L.R. Building a testis. *Tiss. Cell*, v.27, p.129-147, 1995

RUSSELL, L.D.; PETERSON, R.N. Determination of the elongate spermatid-Sertoli cell ratio in various mammals. *J. Reprod. Fert.*, v.70, p.635-664, 1984.

RUSSELL, L.D.; REN, H.P.; SINHA-HIKIN, I. et al. A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes, and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell. *Am. J. Anat.*, v.118, p.21-30, 1990b.

RUSSELL, LD; ETTLIN, RA; SINHA-HIKIM, AP; CLEGG, ED. *Histological and histopathological evaluation of the testis*. Clearwater: Cache River Press. 1990.

RUSSELL, LD. Mammalian Leydig cell structure. In: PAYNE, AH; HARDY, MP; RUSSELL, LD (Eds.). *The Leydig cell*. Vienna: Cache River Press. 43-96. 1996.

SCHULER, H.M.; GIER, H.T. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium in the prairie vole (*Microtus ochrogaster ochrogaster*). *J. Exp. Zool.*, v.197, n.1, p.1-11, 1976.

SEGATELLI, T.M.; ALMEIDA, C.C.D.; PINHEIRO, P.F.F. et al. Kinetics of spermatogenesis in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Tiss. Cell*, v.24, n.1, p.7-13, 2002.

SETCHELL, B.P.; MADDOCKS, S.; BROOKS, D.E. Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. (Eds.) *The Physiology of Reproduction*. 2 ed. New York: Raven Press, 1994. p.1063-1175.

SETCHELL, B.P., BREED, W.G. Anatomy, vasculature and innervation of the male reproductive tract. In: *Physiology of Reproduction* (ed. Neill JD), pp. 771-825. Elsevier, 2006.

SETCHELL, B.P.; BREED, W.G. Anatomy, vasculature and innervation of the male reproductive tract. In: *Physiology of Reproduction* (ed. Neill JD), pp. 771-825. Elsevier, 2006.

SHARMA, A.K.; GUPTA, R.C. Duration of seminiferous epithelial cycle in buffalo bulls (*Bubalus bubalis*). *Anim. Reprod. Sci.*, v.3, p.217-224, 1980.

SHARPE, R.M. Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. (Eds.). *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press, 1994. p. 1363-1434.

SHARPE, RM; MCKINNELL, C; KIVLIN, C; FISHER, JS. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction*. 125:769-84. 2003.

SHORT, R.V. The testis: the witness of the mating system, the site of mutation and the engine of desire. *Acta Paediatr Suppl*. 422:3-7. 1997.

SILVA, R.C. Transplante singênico e xenogênico de espermatogônias tronco em gatos domésticos (*Felis catus*) adultos. 101p. Tese (doutorado em Biologia Celular), UFMG, 2009.

SILVA, J. A. ; TALAMONI, S. A. . Core area and centre of activity of maned wolves, *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1815) (Mammalia, Canidae), submitted to supplemental feeding.. *Revista Brasileira de Zoologia*, Brasil, v. 21, n. 2, p. 391-395, 2004.

SINHA-HIKIM, A.P.; BARTKE, A.; RUSSELL, L.D. Morphometric studies on hamster testes in gonadally active and inactive states: light microscope findings. *Biol. Reprod.*, v.39, p.1225-1237, 1988.

SINHA-HIKIM, A.P.; MAITI, B.R.; GHOSH, A. Spermatogenesis in the bandicoot rat. I. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium. *Arch. Androl.*, v.14, p.151-154, 1985b.

SMITHWICK, E.B.; YOUNG, L.G.; GOULD, K.G. Duration of spermatogenesis and relative frequency of each stage in the seminiferous epithelial cycle of the chimpanzee. *Tiss. Cell*, v.28, n.3, p.357-366, 1996.

SOARES, J.M. Análise morfométrica do testículo, duração da espermatogênese e eficiência espermatogênica em diferentes raças de cães. 89p. Tese (doutorado em Biologia Celular), UFMG, 2009.

SOURDANE, P. Regulation paracrine de La fonction testiculaire chez La roussette (*Scyliorhinus canícula* L.): développement d' un module experimental. 179p Tese (docteur, mention sciences biologiques): L'Universite de Rennes I, France, 1992.

SWIERSTRA, E.E. A comparison of spermatozoa production and spermatozoa output of Yorkshire and Lacombe boars. *J. Reprod. Fertil.*, v.17, p.459-469, 1968b.

SWIERSTRA, E.E. Cytology and duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the boar: duration of spermatozoan transit through the epididymis. *Anat. Rec.*, v.161, p.171-186, 1968a.

SWIERSTRA, E.E.; FOOTE, R.H. Duration of spermatogenesis and spermatozoan transport in the rabbit based on cytological changes, DNA synthesis and labeling with tritiated thymidine. *Am. J. Anat.*, v.116, p. 401-412, 1965.

SWIERSTRA, E.E.; GEBAUER, M.R.; PICKET, B.W. Reproductive physiology of the stallion, I- Spermatogenesis and testis composition. *J. Reprod. Fert.*, v.40, p.113-123, 1974.

TAIT, A.J.; JOHNSON, E. Spermatogenesis in the grey squirrel (*Sciurus carolinensis*) and changes during sexual regression. *J. Reprod. Fertil.*, v.65, p.53-58, 1982.

COUTO, D. ; TALAMONI, S. A. . Reproductive condition of *Akodonn montensis* Thomas and *Bolomys lasiurus* (Lund) (Rodentia, Muridae) based on histological and histometric analyses of testes and external characteristics of gonads. *Acta Zoologica*, Stockholm, v.86, p. 111-118, 2005.

TALAMONI, S. A., COUTO, D., LOPES, M. O. G.; D. A. CORDEIRO J. R. Dieta de algumas espécies de pequenos mamíferos do sudeste brasileiro. *Bios*, 7: 51-56, 1999.

TALAMONI, S. A.; SILVA, J. A. ; FALCÃO, F. ; CORDEIRO JR, D. A. ; FREITAS, V. R. Caracterização da fauna de mamíferos da Reserva Particular do Patrimônio Natural Santuário do Caraça, Catas Altas, MG. 2001 (Relatório Técnico).

TIBA, T.; ISHIKAWA, T.; MURAKAMI, A. Histologische untersuchung der kinetik des spermatogenese beim mink. II. Samenepithelwelle in der Paarungszeit. *Japan Vet. Res.*, v.16, p.159-187, 1968.

TORRES, C.N.; GODINHO, H.P.; SETCHELL, B.P. Frequency and duration of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium of the nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*). J. Reprod. Fert., v.61, p.335-340, 1981.

VAN HAASTER, L.H.; DE ROOIJ, D.G. Cycle of the seminiferous epithelium in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus sungorus*). Biol. Reprod., v.48, n.3, p.515-521, 1993a.

VIEIRA, E.M.; BAUMGARTEN, L.C. Daily activity patterns of small mammal in a cerrado area from central Brazil. Journal of Tropical Ecology. V. 11, Cambridge: 1995, p. 255-262.

WEINBAWER, GF; ASLAM, H; KRISHNAMURTHY, H. et al. Quantitative analysis of spermatogenesis and apoptosis in the common marmoset (*Callithrix jacchus*) reveals high rates of spermatogonial turnover and high spermatogenic efficiency. Biol. Reprod., 64: 120-126. 2001.

WILDT, D. E.. Lions, Tigers, and Pandas, Oh My. J. androl. 26, 452-454, 2005.

WISTUBA, T. J.; KEGLEY, E. B.; J. K. Apple, and D. C. Rule. Feeding feedlot steers fish oil differentially enhances the fattyacid composition of muscle tissue. Pages 21–25 in AR Anim. Sci. Dept. Rep., AR Agric. Exp. Sta. Res. Series 509. Fayetteville, AR., 2003.

YADAV, S.K.; SHARMA, A.K. Seminiferous length in normal buffalos-bulls and bucks. Int. J. Anim. Sci., v.9, p.293-296, 1994.