

**FLAVIANA LIMA GUIÃO LEITE**

**ANÁLISE MORFOLÓGICA DO TESTÍCULO E DO  
PROCESSO ESPERMATOGÊNICO DA ONÇA PARDA  
(*Puma concolor*, Wozencraft, 1993) ADULTA.**

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

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2002**

**FLAVIANA LIMA GUIÃO LEITE**

**ANÁLISE MORFOLÓGICA DO TESTÍCULO E DO  
PROCESSO ESPERMATOGÊNICO DA ONÇA PARDA  
(*Puma concolor*, Wozencraft, 1993) ADULTA.**

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

APROVADA: 04 de Fevereiro de 2002

---

Prof. Sergio Luis Pinto da Matta  
(Conselheiro)

---

Prof. Cláudio César Fonseca  
(Conselheiro)

---

Prof. Deiler Sampaio Costa

---

Prof. German A. B. Mahecha

---

Prof. Tarcízio Antônio Rego de Paula  
(Orientador)

**Como não dedicar este trabalho aos animais se toda minha vida vem sendo dedicada a eles...**

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), através do Departamento de Veterinária e Conselho de Pós-Graduação, pela oportunidade.

Ao Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral da UFV, na pessoa do Prof. Sérgio da Matta.

Ao Prof. Marco Antônio Gioso.

Ao Departamento de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da USP, nas pessoas do Prof. Rui Jaegger e da Técnica Patrícia.

Ao Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia Vegetal da UFV, na pessoa do Prof. Eldo A. M. da Silva.

Ao Departamento de Fitopatologia, na pessoa do Prof. Kioshi Matsuoka.

Ao CNPq, pela concessão do auxílio financeiro.

Ao meu orientador Prof. Tarcízio Antônio Rego de Paula, pela paciência, pela generosidade em partilhar comigo seu conhecimento.

Ao Centro Nacional de Conservação de Felinos Neotropicais e Zoológicos de Belo Horizonte, Brasília, Paulínia e Ribeirão Preto, pela confiança em mim depositada.

Aos professores e funcionários do Departamento de Veterinária, por tudo que aprendi, nas salas de aula e fora delas, por tudo que fez desse lugar minha casa no período em que estive em Viçosa, sentirei muitas saudades.

Aos Profs. Cláudio e Marco Túlio, pelo apoio e conselhos.

Ao Luciano e à Nilza, pela boa vontade, sempre.

Aos colegas e amigos: Alene, Alessandra, Ana Paula Cavalari, Ana Paula Reis, Carla, Carla Omura, Cinthia, Cristiane, Cristiano, Damaris, Danielle, Débora, Eduardo Souto, Esther, Eunice, Fabiana, Fernanda, Fernandinha, Giovanni, Helen, Marcelo, Mário, Renato, Ricardo, Richard, Roberto, Rodolfo, Tatiana e Viviane por estarem sempre presentes.

Aos estagiários do Setor de Morfologia: Andréa, Andréia, Eduardo Ávila, Atsuka, Juliano, Patrícia, Priscila, Taciana e Helen pelos ótimos momentos.

Ao Pretão e à Zoinha, pela companhia e proteção.

Aos amigos Tarcízio, Regina, Rebeca e Tarcizinho por me mostrarem como uma família deve ser.

À minha mãe, Lêda, por ter me ensinado a lutar, a ser forte e a vencer.

A Antônio de Castro Gabriel e meus irmãos: João Flávio, Fernando, Luciana e Juliana pelo alegre incentivo.

À minha avó D. Edith, pelo exemplo e carinho.

À minha tia Cecília, por ter acreditado em mim e na minha força de vontade.

Ao meu amor, João Luiz, por estar sempre ao meu lado, nos bons e maus momentos, “também!”.

À D. Bernadete e Sr. João Rossi, pela generosidade, por abrirem as portas de sua casa quando eu precisei, por me receberem tão bem em sua família.

À Deus, por colocar todos vocês no meu caminho e/ou vice-versa e por sempre fazer-se presente, agradeço.

## **BIOGRAFIA**

FLAVIANA LIMA GUIÃO LEITE, filha de João Flávio Guião Leite e Lêda Maria Lima Leite, nasceu em 22 de Novembro de 1973, em Araraquara-SP.

Em janeiro de 2000, graduou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.

Em março de 2000, iniciou o Curso de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Morfologia, junto ao Departamento de Veterinária, nessa mesma Instituição.

## CONTEÚDO

	Página
<b>RESUMO</b>	<b>viii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>x</b>
<b>1.0-INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>2.0-REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>03</b>
<b>2.1-O Puma.....</b>	<b>03</b>
<b>2.2- Os Testículos.....</b>	<b>06</b>
<b>2.2.1-Compartimento Intertubular e as células de Leydig.....</b>	<b>07</b>
<b>2.2.2-O Túbulo Seminífero.....</b>	<b>08</b>
<b>2.2.3-Peso Testicular e Índice Gonadossomático.....</b>	<b>12</b>
<b>2.3-Biópsia Testicular.....</b>	<b>13</b>
<b>3.0-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>14</b>
<b>4.0-DESCRIÇÃO MORFOFUNCIONAL E HISTOMÉTRICA DO TESTÍCULO DA ONÇA PARDA (Puma concolor) ADULTA</b>	
<b>Resumo.....</b>	<b>23</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>24</b>
<b>Material e Métodos.....</b>	<b>24</b>
<b>Resultados e Discussão.....</b>	<b>27</b>

<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>33</b>
<b>5.0-O CICLO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO E SUA DURAÇÃO NA ONÇA PARDA (Puma concolor)</b>	
<b>Resumo.....</b>	<b>36</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>37</b>
<b>Material e Métodos.....</b>	<b>38</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>40</b>
<b>Discussão.....</b>	<b>47</b>
<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>59</b>
<b>6.0-O RENDIMENTO INTRÍNSECO DA ESPERMATOGÊNESE, O ÍNDICE DE CÉLULAS DE SÉRTOLI E A PRODUÇÃO ESPERMÁTICA DIÁRIA DA ONÇA PARDA (Puma concolor)</b>	
<b>Resumo.....</b>	<b>52</b>
<b>Summary.....</b>	<b>53</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>53</b>
<b>Material e Métodos.....</b>	<b>55</b>
<b>Resultados e Discussão.....</b>	<b>57</b>
<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>60</b>
<b>7.0-CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>63</b>



## RESUMO

LEITE, Flaviana L. G., M.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2002. **Análise morfológica do testículo e do processo espermatogênico da onça parda (*Puma concolor*, Wozencraft, 1993)**. Orientador: Tarcízio Antônio Rêgo de Paula. Conselheiros: Cláudio César Fonseca, José Domingos Guimarães, Luiz Gonzaga Pompermayer, Sérgio Luís Pinto da Matta

Embora a onça parda seja o segundo maior felino das Américas e apresente uma ampla distribuição latitudinal, abrangendo os mais diversos habitats, muito pouco se sabe a respeito de sua morfofisiologia testicular, incluindo o processo espermatogênico.

Os parâmetros de biometria corporal e morfofisiologia testicular são de suma importância no desenvolvimento de protocolos para reprodução assistida nas diferentes espécies. Foram estudados no presente experimento nove onças pardas adultas provenientes de cativeiro, estes animais pesaram em média 45Kg com massa testicular média de 7,45 g tendo apresentando assim índice gonadossomático de 0,03%. O volume médio de túbulos seminíferos por testículo foi de 5,2 ml, o que representou cerca de 78% do parênquima testicular. Em relação à massa corporal, cerca de 0,02% desta é alocada em túbulos seminíferos, ou seja, o índice tubulossomático. A onça parda adulta apresentou cerca de 18 metros de túbulo seminífero por grama de testículo. O compartimento intertubular representou cerca de 22% do parênquima testicular, o que equivale à cerca de 1,5 ml por testículo. Já as células de Leydig isoladamente, corresponderam a 8% do parênquima testicular, sendo o índice leydigossomático 0,002%. O espaço intertubular foi caracterizado como sendo do tipo II segundo a classificação de FAWCETT et al. (1973). O diâmetro e altura do epitélio seminífero foram em média 227,37 $\mu$ m e 67,78 $\mu$ m, respectivamente. Os valores registrados neste estudo encontram-se dentro da amplitude observada para as demais espécies já estudadas.

Neste estudo, a duração do ciclo do epitélio seminífero foi estimada usando-se

injeções intratesticulares de timidina triciada. A duração total do ciclo do epitélio seminífero da onça parda foi calculada em 9,96 dias e como aproximadamente 4,5 ciclos do epitélio seminífero são necessários para que todo o processo espermatogênico seja completado, cerca de 44,8 dias são despendidos na produção de espermatozóides, a partir de uma espermatogônia. A duração da espermiogênese, prófase e demais eventos da meiose da onça parda adulta foram respectivamente 14,08; 15,2 e 1,79 dias. Foram descritos oito estádios do ciclo do epitélio seminífero, através do método da morfologia tubular, o qual se baseia na forma e posição do núcleo das espermátides e na ocorrência de divisões meióticas. Os valores observados na onça parda para a frequência relativa das fases pré-meiótica, meiótica e pós-meiótica foram respectivamente 4,0; 1,8 e 4,15 dias.

O estudo do processo espermatogênico torna-se extremamente relevante, subsidiando com informações básicas o desenvolvimento e sedimentação de tecnologias em reprodução assistida. Embora a onça parda (*Puma concolor*) seja o segundo maior felino das Américas e apresente uma ampla distribuição latitudinal, muito pouco se sabe a respeito de sua morfofisiologia testicular, incluindo a sua espermatogênese. Neste trabalho estimou-se que na onça parda cerca de 7,7 espermatócitos primários são produzidos a partir de uma espermatogônia do tipo A. O rendimento meiótico foi em torno de 3,0 células, o que equivale a uma perda de 25% no processo meiótico; o rendimento geral da espermatogênese foi de 22,7 células. Cada célula de Sertoli é capaz de sustentar cerca de 12,5 células germinativas, das quais 7,3 são espermátides arredondadas. A onça parda, com aproximadamente vinte e seis milhões de espermatozóides produzidos por grama de testículo por dia, encontra-se classificada entre as espécies de alta eficiência espermatogênica.

## ABSTRACT

LEITE, Flaviana L. G., M.S., Universidade Federal de Viçosa, February of 2002.

**Morphologic analysis of the testicule and the spermatogenic process of Puma (Puma concolor, Wozencraft, 1993).** Adviser: Tarcízio Antonio Rêgo de Paula. Council members: Cláudio Cesar Fonseca, Jose Guimarães Sundays, Luiz Gonzaga Pompermayer, Sergio Luis Pinto da Matta.

Although the puma is the bigger feline of Americas and presents an ample latitudinal distribution, enclosing most diverse habitats, much little is known regarding its morfofisiologia to testicular, including the spermatogenic process. The parameters of corporal biometry and morfofisiology of testis are of utmost importance in the development of protocols for reproduction attended in the different species. Nine adult pumas proceeding from captivity had been studied in the present experiment, these animals had weighed in average 45Kg with mass to testicular average of 7,45 g having thus presenting gonadossomatic index of 0,03%. The average volume of seminiferous tubules for testicule was of 5,2 ml, what it represented about 78% of testis. In relation to the corporal mass, about 0,02% of this it is placed in seminiferous tubules, or either, the tubulesomatic index. The adult puma presented about 18 meters of seminiferous tubules for gram of testicule. The intertubular compartment represented about 22% of testis, what it is equivalent to 1,5 ml of the testis. The Leydig cells separately, had corresponded 8% of the testis, being leydigossomatic index 0,002%. The intertubular space was characterized as being of type II according to classification of FAWCETT et al., (1973). The diameter and height of the seminiferous epithelium had been in average 227,37mm and 67,78mm, respectively. The values registered in this study meet inside of the amplitude observed for the already studied species. In this study.

The duration of the cycle of the seminiferous epithelium was observed using intratesticular injections of tritium thymidine. A total duration of the cycle of the seminiferous epithelium of the puma was calculated in 9,96 days and as approximately 4,5 cycles of the seminiferous epithelium are necessary so that all spermatogenic process is completed, about 44,8 days are expended in the production of spermatozoa, from a espermatogônia. The duration of spermiogenesis, prophase and other events of meiosis of the puma had been respectively 14,08; 15,2 and 1,79 days. Eight stadiums of the cycle of the seminiferous epithelium had been described, through the method of the tubular morphology, which is based on the form and position of the nucleus of spermatides and on the occurrence of meiotic divisions. The values observed in the puma for the relative frequency of the phases daily pre-meiotic, meiotic and pos-meiotic had been respectively 4,0; 1,8 and 4,15 days. In this work it was observed that in the puma about 7,7 primary espermatócitos are produced from a espermatogônia of the type A; the meiótico income was around 3,0 cells, what is equivalent to a loss of 25% in the meiótico process; the general income of spermatogenesis was of 22,7 cells. Each cell of Sertoli is capable to support about 12,5 germ cells, them which 7,3 is rounded spermatides. The puma, with approximately twenty and six million spermatozoa produced per gram of testis per day, meets classified between the species of high spermatogenic efficiency.

## **1.0-INTRODUÇÃO**

O processo de extinção de uma espécie pode ser um evento natural, decorrente da própria evolução. Porém, sabe-se que este processo é predominantemente causado por atividades humanas. A destruição do habitat, a introdução de espécies exóticas e a predação direta são as principais causas da perda da diversidade biológica. Segundo CORSON (1996), até o início deste século, poderemos ter perdido um milhão ou mais de espécies de plantas, animais e outros organismos - mais do que a extinção maciça na história geológica, incluindo o desaparecimento dos dinossauros.

Os predadores da ordem Carnivora podem ser utilizados como alicerce para à identificação dos problemas relativos à diminuição da biodiversidade, pois ocupam o topo da cadeia alimentar sendo co-responsáveis pelo equilíbrio dos ecossistemas onde ocorrem. Alimentando-se de animais mais fracos, evitam que a superpopulação cause danos ao ambiente ou leve à disseminação de doenças. Assim, quando se trabalha para a preservação destes animais, outras espécies indiretamente são preservadas.

Visto a importância dos felinos neotropicais no ecossistema e a carência de informações em sua morfofisiologia reprodutiva, a onça parda (*Puma concolor*), com sua relativa abundância em cativeiro, torna-se um bom modelo experimental para estudo e coleta de amostras.

Os esforços para conservação devem incluir um arranjo de opções e não somente depender de uma abordagem pontual para a preservação de uma única espécie ou um único

ecossistema. O desenvolvimento de tecnologias em reprodução assistida, tais como inseminação artificial, congelamento de sêmen e mesmo transplante de espermatogônias, podem responder por uma porção importante dentro destas opções. Neste sentido, o estudo do processo espermatogênico torna-se extremamente relevante tanto na determinação da taxa de produção espermática e correlação desta com parâmetros biométricos, o que possibilita o melhor manejo e utilização dos reprodutores, como subsidiando com informações básicas o desenvolvimento e sedimentação de novas tecnologias.

## 2.0-REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1-O Puma

Em 1771 a onça-parda foi classificada por Linnaeus no gênero Felis o mesmo dos pequenos gatos, porém WOZENCRAFT (1993) o classificou num gênero próprio, Puma, pois apesar de terem muitas características dos pequenos gatos, são muito semelhantes aos grandes felinos. É também conhecido por “cougar”, “onça parda”, “onça vermelha”, “suçuarana” entre outros nomes. “Cougar” e “Puma” derivam da linguagem dos nativos da América do Sul, o primeiro vem do Tupi, e é traduzido como “falso cervo”, enquanto “Puma” deriva da linguagem de índios peruanos quéchuas e significa “animal mágico e poderoso” (KOBALENKO, 1997). Têm ampla distribuição latitudinal, abrangendo assim, os mais diversos habitats ocorrendo desde o Canadá até o Chile, incluindo também o Brasil (Figura 1), (REDFORD & EISENBERG, 1992).

Esbelto e flexível, a onça-parda tem membros fortes e musculosos, sendo que os pélvicos são mais compridos que os torácicos (Figura 2) esta diferença é a maior dentre os gatos sendo possivelmente uma adaptação para saltos, bem como a cauda, pesada e cilíndrica que funciona como contrapeso (GONYEA, 1976). Em regiões tropicais, a pelagem é curta e eriçada, em latitudes extremas é mais longa, densa e macia; numa mesma região a coloração pode variar consideravelmente; existem dois tipos básicos de coloração,

a vermelha e a cinza, a vermelha tem variações em dourado e canela que predominam em regiões tropicais, a cinza tende do prateado ao azulado e animais mais escuros são encontrados nas florestas úmidas na costa norte do Pacífico, sendo as formas negras ou melânicas registradas nas Américas do Sul e Central, mas nunca na América do Norte (KITCHENER, 1991).



Figura 1- Distribuição atual do Puma concolor.





Figura 2- Fêmea de Puma concolor com dois filhotes.

A onça-parda é essencialmente carnívora e predadora generalista, sendo os cervos suas principais presas em todo seu território, principalmente na América do Norte (RABINOWITZ & NOTTINGHAM, 1986; EMMONS, 1987; CRAWSHAW & QUIGLEY (in prep.); IRIARTE et al 1991).

São animais territorialistas e utilizam suas fezes como sinal olfativo ou visual para os semelhantes da espécie, normalmente depositando pilhas de fezes ao longo de caminhos, trilhas e outros lugares conspícuos; acredita-se que as fezes transmitam vários tipos de informações para outros indivíduos da população, tais como identidade, sexo, condição reprodutiva, social etc. (EWER, 1968 e 1973).

O período reprodutivo ocorre provavelmente durante todo o ano (SWEANOR & LOGAN, 1992; ROSS & JALKOTZY, 1992). A gestação dura de 92 a 96 dias, o estro 8 dias e o ciclo estral 23 dias (HANSEN 1992). Nascem em média 2 a 3 filhotes (ANDERSON, 1983; CURRIER, 1983; ROSS & JALKOTZY, 1992).

Machos e fêmeas alcançam a maturidade sexual por volta dos 24 meses, mas as fêmeas podem ser mais precoces, por volta dos 20 meses (LINDZEY, 1987), contudo o primeiro período de acasalamento é dependente do estabelecimento territorial pela fêmea (HORNOCKER, 1970; SEIDENSTICKER et al., 1973). Fêmeas em populações estáveis

raramente cruzam com mais de um macho durante o estro (HEMKER 1992). O intervalo entre os nascimentos pode ser de um ano (ROBINETTE et al. 1961), mas geralmente é de 18 a 24 meses (LINDZEY, 1987). A maioria dos estudos reporta que a razão de fêmeas:machos no período de acasalamento é de 2:1, contudo grandes variações têm sido encontradas (BEIER, 1991).

As onças-pardas em cativeiro podem viver até 20 anos e cerca de 12 anos em vida livre. Na natureza ocorre freqüentemente consangüinidade, por restrição territorial causada principalmente pela fragmentação dos habitats, devido à atividade humana.

A União Internacional para Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN) lista as subespécies *P.c.cougar* e o *P.c.coryi* como criticamente ameaçados. No Chile a onça-parda é tida como “vulnerável” na maioria das regiões, mas no norte é considerada “ameaçada”. A Lista dos Animais Ameaçados de Extinção (IBAMA), não faz distinção entre as diferentes subespécies, classificando a todas como de menor preocupação. O comércio internacional para as subespécies *cougar*, *coryi* e *costaricensis* é proibido pelo Apêndice I da Convenção em Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas (CITES). O comércio de outras subespécies está regulamentado no Apêndice II e é extremamente limitado (CITES Appendix II).

## **2.2-Os Testículos**

O primeiro método para o estudo da biologia da reprodução foi a castração, método clássico introduzido por Aristóteles em 300 AC, contudo, os constituintes celulares dos testículos somente puderam ser observados após o advento do microscópio, quando Antony Von Leeuwenhoek em 1679, relatou seus achados sobre os espermatozóides (JOHNSON et al., 1991). Em 1841 Von Kolliker descobriu que os espermatozóides se desenvolvem de células especializadas localizadas nos túbulos seminíferos; em 1850 e 1865 Franz Von Leydig e Enrico Sertoli descreveram as duas principais células somáticas, implicadas no processo espermatogênico, respectivamente a célula de Leydig e a célula de Sertoli (JOHNSON et al., 1991). Ainda segundo JOHNSON et al., 1991), em 1876, Von La Vallete classificou as células germinativas morfologicamente, e o processo

espermatogênico começou a ser mais bem entendido com os trabalhos de Von Ebner (1871) e Benda (1887). Até os dias atuais, com os inúmeros estudos desenvolvidos, muito conhecimento foi adquirido sobre o processo espermatogênico, porém, muito ainda há de ser esclarecido principalmente em espécies selvagens.

A posição dos testículos é variável entre as diversas espécies, podendo localizar-se tanto em posição intra quanto extra-abdominal, quando extra-abdominal situam-se na região pré-púbica, circundados num divertículo do abdome, denominado escroto. O testículo é um órgão com função exócrina e endócrina e que se apresenta revestido por uma espessa cápsula conjuntiva, a túnica albugínea, a qual envia septos para o interior formando o mediastino testicular e também dividindo o testículo em lóbulos. Este órgão é constituído por dois compartimentos: o compartimento tubular e o intertubular; no primeiro localizam-se as células germinativas e as células de Sertoli e no segundo está todo o aporte de vasos sanguíneos e linfáticos, células de Leydig, fibroblastos, macrófagos e mastócitos. Apesar da estrutura geral do testículo seguir um padrão relativamente rígido para as diversas espécies de mamíferos, existe muitas variações no que concerne a proporção volumétrica dos diferentes componentes que o constituem, principalmente em relação aos túbulos seminíferos, células de Leydig e vasos e espaços linfáticos.

### **2.2.1-Compartimento Intertubular e as células de Leydig**

O compartimento intertubular é composto pelas células de Leydig, vasos linfáticos e sanguíneos, nervos e uma população celular variável que inclui fibroblastos, macrófagos e mastócitos (SHARPE, 1994). A organização e proporção volumétrica dos vasos linfáticos e células de Leydig variam muito entre os mamíferos (FAWCETT et al., 1973).

Além do já conhecido controle endócrino através do eixo hipotálamo-hipófise-testículo, um elaborado sistema de comunicação intercelular é desenvolvido no testículo para assegurar o perfeito funcionamento do processo espermatogênico (ROSER, 2000). Assim, as células direta ou indiretamente envolvidas na produção dos gametas masculinos: células de Sertoli, células germinativas, células de Leydig, células mióides peritubulares, leucócitos, etc, mantêm um sistema parácrino/autócrino, que modula esta intrincada rede de

interação celular, que é fundamental para o perfeito funcionamento do testículo (SCHLATT et al., 1997). A contribuição da célula de Leydig nesta comunicação parácrina no testículo, envolve a produção de uma grande quantidade de fatores (LEJEUNE et al., 1997; ROSER, 2000). No entanto, esta produção aliada à grande produção de testosterona não justifica a enorme variação observada para o percentual ocupado por estas células no testículo.

A proporção volumétrica de tecido intertubular no testículo dos animais domésticos, varia de 10% no cão a 40% no camelo (FRANÇA & RUSSELL, 1998). Ao que parece, fatores filogenéticos não são responsáveis pela determinação do percentual ocupado pelo compartimento intertubular nas diferentes espécies de mamíferos. Assim, dentre os roedores pode-se observar que no rato, 7,7% (RUSSELL & FRANÇA, 1995) e na capivara, 50% (PAULA, 1999) do testículo é ocupado por tecido intertubular. Grandes variações ainda são observadas, mesmo quando se considera roedores do mesmo gênero (BREED, 1982).

Estudos correlacionando a estrutura e a função das células de Leydig, em várias espécies de mamíferos, mostraram que variações na secreção de testosterona resultam mais da capacidade individual desta célula em secretar este hormônio do que de diferenças do volume total das mesmas no testículo (EWING et al., 1979). Esta capacidade está altamente associada com a quantidade de retículo endoplasmático liso presente na célula de Leydig (ZIRKIN et al., 1980).

### **2.2.2-O Túbulo Seminífero**

Os túbulos seminíferos são constituídos, da sua porção externa para interna de: túnica própria, epitélio seminífero e lume. Na túnica própria são observadas as células mióides ou peritubulares, a membrana basal e fibras colágenas. Dois tipos celulares de origens diferentes estão presentes no epitélio seminífero: as células de Sertoli de natureza somática e as células germinativas ou espermatogênicas. No lume tubular encontram-se o fluido secretado pelas células de Sertoli e os espermatozóides (RUSSELL et al., 1990).

As células de Sertoli desempenham papel fundamental na regulação da espermatogênese (RUSSELL & GRISWOLD, 1993). A quantidade impressionante de

funções desempenhadas por esta célula inclui, dentre outras: o suporte e nutrição das células germinativas em desenvolvimento, a compartimentalização do epitélio seminífero, a liberação de espermatozóides no lume tubular, a secreção de fluidos e proteínas, a fagocitose de células germinativas em degeneração e do excesso de citoplasma das espermátides em espermiação (FRANÇA & RUSSELL, 1998). A célula de Sertoli também desempenha papel chave na mediação da ação do FSH e da testosterona na espermatogênese, provavelmente de maneira cíclica (RUSSELL et al., 1990)

O número de células de Sertoli por testículo é o principal fator na determinação da produção espermática e no tamanho do testículo (FRANÇA et al., 1995). Tal assertiva 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 desse tipo celular não aumenta após a puberdade (STEINBERGER & STEINBERGER, 1971; ORTH, 1982; ORTH et al., 1988; FRANÇA & RUSSELL, 1998). Desta forma, o número de células germinativas suportado por uma única célula de Sertoli (índice de células de Sertoli) é o melhor indicativo da eficiência funcional destas células (RUSSELL & PETERSON, 1984).

Segundo FRANÇA (1991), considerando-se que a população de células de Sertoli é estável ao longo dos estádios do ciclo do epitélio seminífero, estas podem ser utilizadas como ponto de referência para a quantificação e a correção de contagens de células germinativas. As células de Sertoli constituem, também base para o estudo de alterações no processo espermatogênico, em decorrência de fatores patológicos e terapêuticos (ROWLEY & HELLER, 1971; RUSSELL & CLERMONT, 1977; SINHA-HIKIM et al., 1985; RUSSELL et al., 1990).

Particularmente entre as células de Sertoli, existem junções altamente especializadas conhecidas como zônulas de oclusão ou "tight junctions". Estas junções formam a barreira de células de Sertoli (também conhecida como barreira hemato-testicular), a qual, além de controlar o fluxo de substâncias no epitélio seminífero, delimita neste dois compartimentos, o basal e o adluminal (RUSSELL et al., 1990). No primeiro, encontram-se as espermatogônias e os espermátócitos primários nas fases iniciais (pré-leptóteno/leptóteno). Já no compartimento adluminal são encontrados os espermátócitos primários, em fases mais adiantadas de desenvolvimento (zigóteno, paquíteno e diplóteno), os espermátócitos

secundários e as espermatídes arredondadas e alongadas (LEBLOND & CLERMONT, 1952; RUSSELL & CLERMONT, 1977; RUSSELL et al., 1990).

Nos túbulos seminíferos de animais sexualmente maduros, as células espermatogênicas não estão arrançadas ao acaso, mas sim organizadas numa série bem definida de associações celulares ou estádios. Dentre os sistemas utilizados para se estudar os estádios do ciclo do epitélio seminífero, o mais empregado é aquele baseado na forma e na localização dos núcleos das espermatídes e na presença de figuras de divisões meióticas (ROOSEN-RUNGE & GIESEL JR., 1950; COUROT et al., 1970; BERNDTSON, 1977; ORTAVANT et al., 1977; GUERRA, 1983; FRANÇA, 1991). Este sistema, designado como método da morfologia tubular por BERNDTSON (1977), permite a padronização de oito estádios do ciclo em todos os mamíferos. Outra classificação, designada como método do sistema acrossômico, é baseada nas características das espermatídes, em particular no desenvolvimento do acrossoma, com este método o número de estádios para cada espécie é variado (RUSSELL et al., 1990).

Com exceção de algumas espécies de primatas, o arranjo dos estádios do ciclo do epitélio seminífero é segmentar em todos os mamíferos investigados e usualmente existe somente um estádio por secção transversal de túbulo seminífero (LEBLOND & CLERMONT, 1952; RUSSELL et al., 1990). Os estádios se sucedem numa determinada área do epitélio seminífero, com o decorrer do tempo, esta seqüência, constitui o processo denominado ciclo do epitélio seminífero (LEBLOND & CLERMONT, 1952; ORTAVANT et al., 1977; RUSSELL et al., 1990). Von Ebner (1871), observou, ao longo do túbulo seminífero em ratos, a formação de uma organização seqüencial dos estádios do ciclo do epitélio seminífero (PEREY et al., 1961). Estes mesmos autores denominaram de onda espermatogênica esta organização e observaram sua distribuição decrescente a partir da extremidade do túbulo seminífero. Como o túbulo seminífero apresenta duas extremidades, conectadas à rete testis e em ambas é iniciada uma seqüência decrescente, é esperado que em algum ponto ao longo deste túbulo haverá o encontro destas duas seqüências. Este ponto é denominado sítio de reversão e é encontrado muito próximo ao ponto médio do túbulo seminífero (RUSSELL et al., 1990).

A espermatogênese é um processo complexo e bem organizado, que pode ser dividido em três fases baseadas em considerações morfológicas e funcionais: (1) fase

proliferativa (espermatogonial), na qual as células sofrem rápidas e sucessivas divisões mitóticas; (2) fase meiótica (espermatócitos), na qual o material genético é duplicado e passa por recombinação genética; e (3) fase de diferenciação ou espermiogênica (espermátides), na qual as espermátides sofrem enormes modificações, transformando-se em células muito especializadas e estruturalmente equipadas para alcançar e fertilizar os ovócitos (RUSSELL et al., 1990).

De maneira geral, nos animais sexualmente maduros, as espermatogônias podem ser classificadas em duas categorias básicas, espermatogônias indiferenciadas e diferenciadas. As espermatogônias isoladas ( $A_i$ ), pareadas ( $A_{pr}$ ) e alinhadas ( $A_{al}$ ) pertencem a primeira categoria, sendo que as espermatogônias isoladas de origem das espermatogônias tronco. Já as espermatogônias do tipo A, intermediárias (In) e do tipo B pertencem a categoria das espermatogônias diferenciadas, estando comprometidas de forma irreversível com a formação de espermatozóides (DE ROOIJ, 1998). Vale ressaltar que existem consideráveis diferenças em relação ao número de gerações de espermatogônias diferenciadas nas diversas espécies de mamíferos, no entanto, este número geralmente não ultrapassa seis gerações (RUSSELL et al., 1990; FRANÇA & RUSSELL, 1998; DE ROOIJ, 1998; DE ROOIJ & GROOTEGOED, 1998). A produção total desta primeira fase da espermatogênese é ajustada numericamente para capacidade de suporte de células de Sertoli, fazendo com que ocorram degenerações em um grande número de células (DE ROOIJ & LOK, 1987)

Os espermatócitos primários formados a partir das espermatogônias do tipo B, iniciam a prófase meiótica e migram para o compartimento adluminal, onde concluem as divisões meióticas, culminando com a produção de espermátides arredondadas (SHARPE, 1994). O rendimento meiótico expressa o número de espermátides arredondadas produzidas por um espermatócito primário, esta razão é teoricamente de 1:4, já que envolve duas divisões meióticas (FOOTE et al., 1972). As espermátides arredondadas iniciam um processo denominado espermiogênese o qual resume sua transformação até uma das mais especializadas e diferenciadas células do corpo, o espermatozóide (SHARPE, 1994).

Nem todo espermatócito que entra em meiose, completa seu desenvolvimento em espermátide e é liberado como espermatozóide. Alguma degeneração ocorre durante a meiose ou raramente durante a espermiogênese, sendo que o período mais crítico para que

isto ocorra é a metáfase, no fim da meiose II. A degeneração durante a metáfase é um fator comum à maioria dos mamíferos (ROOSEN-RUNGE, 1973).

O ciclo do epitélio seminífero refere-se ao período de tempo em que, em um mesmo segmento do túbulo, um dado estágio volta a se repetir. Cerca de 4,5 ciclos são necessários para que todo o processo espermatogênico ocorra, ou seja, a cada ciclo que se repete, a célula germinativa apresenta-se em uma fase mais avançada do processo, até que de uma espermatogônia produz-se espermatozóides liberados no lume tubular (PAULA et al, 1999).

A duração do ciclo do epitélio seminífero é uma constante biológica espécie específica, a qual está sob o controle do genótipo da célula germinativa (FRANÇA et al., 1998), não sendo influenciada por qualquer fator conhecido (CLERMONT, 1972; AMANN & SCHANBACHER, 1983). O processo espermatogênico, dura de 40 a 60 dias na maioria dos mamíferos investigados (FRANÇA & RUSSELL, 1998).

A determinação da taxa de produção espermática possibilita o melhor manejo e a exploração dos reprodutores de destacado potencial genético (AMANN, 1970; AMANN & SCHAMBACHER, 1983; FRANÇA, 1991). Para se avaliar a produção espermática, vários métodos têm sido utilizados. O método da histologia quantitativa do epitélio seminífero, baseia-se no cálculo da reserva espermática ( população celular nas secções transversais x comprimento total do túbulo) e inferindo-se a este a duração do ciclo, obtém-se a produção espermática diária (PAULA et al., 1999). Outros métodos para estimativa da reserva espermática testicular, baseiam-se na contagem hemocitométrica de células espermáticas em homogeneizados do parênquima testicular, na quantificação de espermatozóides ejaculados e na colheita de espermatozóides diretamente através de canulação do ducto deferente ou da rede testicular (AMANN, 1970; BERNDTSON, 1977).

### **2.2.3-Peso Testicular e Índice Gonadossomático**

Há uma grande variação no peso dos testículos e no índice gonadossomático, nas várias espécies animais. O índice gonadossomático corresponde à proporção do peso corporal alocada em ambos os testículos, e é um parâmetro representativo do investimento



específico na produção espermatogênica, visto a alta correlação entre esta produção e o peso testicular (AMANN, 1970). Segundo KENAGY & TROMBULAK (1986), o investimento em massa testicular, não é espécie específico nem se correlaciona com a posição dos testículos no corpo (abdominal ou escrotal) ou à forma deste e seu modo de locomoção (terrestre, aquática ou aérea). Ainda segundo KENAGY & TROMBULAK (1986), o tamanho testicular é inversamente proporcional ao tamanho corporal, porém, está intimamente relacionado com o comportamento reprodutivo. Assim, animais com sistemas monogâmicos ou poligâmicos masculinos, onde um único macho detém o direito ao cruzamento com uma determinada fêmea, apresentam um menor peso testicular relativo que espécies com sistemas reprodutivos promíscuos ou poligâmicos femininos, onde uma maior produção espermática é necessária, devido à competição entre espermatozóides de diferentes machos na fertilização da mesma fêmea.

### **2.3-Biópsia Testicular**

A biópsia testicular é um procedimento utilizado em muitos casos para avaliação de patologias relacionadas à infertilidade (NSEYO et al., 1984). Algumas das patologias mais observadas incluem, aplasia de células germinativas, hipoespermatogênese, condições inflamatórias e neoplasias (LOPATE et al., 1989). Os métodos mais comuns de biópsia testicular são a biópsia aspirativa e a biópsia incisional (FINCO, 1974; LOPATE et al., 1989).

As potenciais complicações da biópsia testicular são os danos ao parênquima, que localmente vão interromper a espermatogênese, ou adesões que podem impedir a termoregulação testicular. Tais complicações têm feito com que a técnica de biópsia testicular seja pouco aceita, tendo assim um uso limitado (ATTIA et al., 2000). Ainda que danos histológicos estejam presentes nos testículos de cães após a biópsia, efeitos permanentes na produção e motilidade dos espermatozóides após repetidas biópsias em testículos alternados (JAMES et al., 1979), biópsia unilateral (HUNT et al., 1965), ou biópsia unilateral após orquiectomia unilateral (HUNT & FOOTE, 1997) parecem insignificantes. Cavalos castrados após biópsia incisional unilateral demonstraram apenas um transitório aumento na degeneração de espermátócitos em pré-leptótenos e

espermatogônias do tipo B no testículo biopsiado (DELVENTO et al., 1992). Neste sentido, a biópsia testicular mostra-se muito efetiva para a coleta de material biológico sem maiores danos reprodutivos à longo prazo, nas diferentes espécies estudadas (GALINA, 1971; LOPATE et al, 1989; FELDMAN & NELSON, 1996; MUNSON et al., 1996).

Ainda que procedimentos invasivos nos testículos e epidídimos possam induzir a produção de anticorpos antiespermatozóides, a duração destes anticorpos é transitória, não havendo efeitos negativos na produção espermática e na motilidade dos espermatozóides. Assim, a associação de anticorpos à diminuição na porcentagem de espermatozóides normais não é clinicamente significativa, concluindo-se que a biópsia testicular e a aspiração do epidídimo são procedimentos diagnósticos seguros (ATTIA, 2000)

### **3.0-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

AMANN, R.P. & SCHANBACHER, B.D. 1983. Physiology of male reproduction. **J. Anim. Sci. Suppl.**, v.57 (2), p.380-403.

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

ANDERSON, A. 1983. A critical review of literature on puma (*Felis concolor*). Special report 45, Colorado State Division of Wildlife.

ATTIA, K.A., ZAKI, A.A., EILTS, B.E., PACCAMONTI, D.L 2000. Anti-sperm antibodies and seminal characteristics after testicular biopsy or epididimal aspiration in dogs. **Theriogenology**, v.53, p.1355-1363

BEIER, P. 1991. Cougar attacks on humans in the United States and Canada. **Wildl. Soc. Bull.**, v. 19, p.403-412.

- BERNDTSON, W.E. 1977. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. **J. Anim. Sci.**, v.44, n.5, p.818-83,
- BREED, W. G. 1982. Morphological variation in the testes and accessory sex organs of Australian rodents in the genera *Pesudomys* and *Notomys*. **J. Reprd. Fert.** v.66, p.607-613.
- CITES - CONVENTION ON INTERNATIONAL TRADE IN ENDANGERED SPECIES OF WILD FAUNA AND FLORA. Tenth Conference of the Parties. Harare, Zimbabwe June 9-20,1997.
- CLERMONT, Y. 1972. Kinetics of spermatogenesis in mammals, seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. **Physiol. Rev.** v.52, n.1, p.198-236.
- CORSON, W.H. 1996. Manual Global de Ecologia. Ed. Augustus. 2<sup>a</sup> ed., São Paulo.
- COUROT, M., HOCHEREAU-DE-REVIERS, M.T., ORTAVANT, R.1970. Spermatogenesis. In: JOHSON, A.D., GOMES, W.R., VANDEMARK, N.L. (ed). The testis. New York: Academic Press, , v.1, cap. 6, p. 339-432.
- CRAWSHAW, P.G. & QUIGLEY, H.B. Notes on jaguar and puma feeding habits in the Pantanal of Mato Grosso, Brazil, with implications for their management and conservation. Unpubl. report, Manitoba Dept. of Natural Resources, Winnipeg. In: [www.lynx.uio.no/catfolk/puma-04.htm](http://www.lynx.uio.no/catfolk/puma-04.htm)
- CURRIER, M.J.P. 1983. *Felis concolor*. **Mammalian Species**, v.200, p.1-7.
- DE ROOIJ, D. G. & GROOTEGOED, J. A. 1998. Spermatogonial stem cells. **Current Opinion in Cell Biology**, v.10, p.694-701.

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

DE ROOIJ, D. G. 1998. Stem cells in the testis. **Int. J. Exp. Path.**, v.79, p.67-80.

DELVENTO, V.R., AMANN, R.P., TROTTER, G.W., VEERAMACHANENI, D.N., SQUIRES, E.L. 1992. Ultrasonographic and quantitative histologic assessment of sequelae to testicular biopsy in stallions. **Am. J. Vet. Res.**, v.53, n.11, p.2094-2101

EMMONS, L.H. 1987. Comparative feeding ecology of felids in a neotropical rainforest. **Behav. Ecol. Sociobiol.**, v.20, p.271-283.

EWER, R.F. 1968. Ethology of mammals. Logos Press Limited, England

EWER, R.F. 1973. The Carnivores. Cornell University Press, Ithaca

EWING, L. L., ZIRKIN, B. R., COCHRAN, R. C., KROMANN, N., PETERS, C., RUIZ-BRAVO, N. 1979. Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cell mass. **Endocrinology**. v.105, n.5, p.1135-1142.

FAWCETT, D. W., NEAVES, W. B., FLORES, M. N. 1973. Comparative observations on intertubular lymphatic and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. **Biol. Reprod.**, v.9, p500- 532.

FELDMAN, E. C. & NELSON, R. W. 1996. Canine and feline endocrinology and reproduction. Ed. Sanders, 2ed. Philadelphia. p.673-691.

FINCO, D.R. 1974. Biopsy of the testicle. **Vet. Clin. North Am.**, v.4, p.377-381

- FOOTE, R.H., SWIERSTRA, E.E., HUNT, W.L. 1972. Spermatogenesis in the Dog. **The Anatomical Record**, v.173, n.3, p.341-352.
- FRANÇA , L. R. & RUSSELL, L. D. 1998. The testis of domestic animals. In: Regadera, J. & Martinez-Garcia (eds.). Male reproduction. A multidisciplinary overview. Churchill Livingstone, Madrid, p.197-219.
- FRANÇA , L. R. 1991. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais. 185p.
- FRANÇA , L. R., OGAWA, T., AVARBOCK, M. R., BRINSTER, R. L., RUSSELL, L. D. 1998. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. **Biol. Reprod.** v.59, p.1371-1377.
- FRANÇA , L.R., YE, S-J., YING, L., SANDBERG, M., RUSSELL, L.D. 1995 Morphometry of rat germ cells during spermatogenesis. **Anat. Rec.**, v.241, p.181-204.
- GALINA, C. 1971. An evaluation of testicular biopsy in farm animals. **The Veterinary Record**. v.88, p.628-631.
- GONYEA, W.J. 1976. Adaptive differences in the body proportions of large felids. **Acta. Anat.**, v.96, p.81-96.
- GUERRA, M.O. 1983. Comparação entre dois métodos de determinação da frequência relativa dos estádios do ciclo do epitélio seminífero, em dados da literatura. **Rev. Bras. Biol.**, v.43, n.4, p. 385-394.
- HANSEN, K. 1992. Cougar: the American lion. Flagstaff: Mountain Lion Foundation and Northland Press.

- HEMKER, T.P. 1992. Population characteristics and movement patterns of cougars in southern Utah. **J. Wildl. Manage.** v.48, p.1275-1284
- HORNOCKER, M.G. 1970. An analysis of mountain lion predation upon mule deer and elk in the Idaho Primitive Area. **Wildl. Monogr.**,v.21, p.1-39.
- HUNT, W.L., FOOTE,R.H. 1997. Effect of repeated testicular biopsy on testis function and semen quality in dogs. **J Androl.**, v.18, p.740-744.
- HUNT, W.L., PAUFLER, S.K., FOOTE,R.H. 1965. Testicular biopsies and spermatogenesis in dogs. **J Anim Sci.**, v.24, p.921(abstr.).
- IRIARTE, J.A., JOHNSON, W.E. AND FRANKLIN, W.L. 1991. Feeding ecology of the Patagonia puma in southernmost Chile. **Revista Chilena de Historia Natural**, v.64, p.145-156.
- JAMES, R.W., HEYWOOD, R.,FOWLER, D.J. 1979. Serial percutaneous testicular biopsy in the Beagle dog. **J Small Anim Pract.**, v.20, p.219-228.
- JOHNSON, L., PETTY, C.S., NEAVES, W.B. 1991 The relationship of biopsy evaluations and testicular measurements to over-all daily sperm production in human testes. **Fertil Steril.**, v.34, p.36-40.
- KENAGY, G. J. & TROMBULAK, S. C. 1986. Size and function of mammalian testes in relation to body size. **J. Mamm.**, v.67, n.1, p.1-22.
- KITCHENER, A. 1991. The natural history of the wild cats. Christopher Helm, London
- KOBALENKO, J. 1997. Forest Cats of North America. Ontario: Firefly Books

- LEBLOND, C.P. & CLERMONT, Y. 1952. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v.55, p.548-584.
- LEJEUNE, H., CHUZEL, F., SANCHEZ, P., DURAND, P., MATHER, J.P. AND SAEZ, J.M. 1997. Stimulation of both recombinant inhibin A and activin A on immature Leydig cell function in vitro. **Endocrinology**, v.138, p.4783-4791.
- LINDZEY, F. 1987. Mountain lion. Pp 656-668 In: M. NOVAK, J. BAKER, M. OBBARD, AND B. MALLOCH, eds. Wild furbearer management and conservation in North America. Ministry of Natural Resources, Toronto, Ontario.
- LOPATE, C.;THRELFALL, W. R.; ROSOL, T. J. 1989. Histopatologic and gross effects of testicular biopsy in the dog. **Theriogenology**, v.32, n.4, p. 585-602.
- MUNSON, L., BROWN, J.L., BUSH, M., PACKER, C., JANSSEN, D., REIZISS, S. M., WILDT, D.E. 1996. Genetic diversity affects testicular morphology in free-ranging lions (*Panthera leo*) of Serengeti Plains and Ngorongoro Crater. **J. Reprod. Fertil.** v.108, p.11-15
- NSEYO, U.O., ENGLANDER, L.S., HUBEN,R.P., PONTES, J.E. 1984. Aspiration biopsy of testis: another method for histologic examination. **Fertil. Steril.**, v.42, n.2, p.281-284.
- ORTAVANT, R., COUROT, M. HOCHEREAU-DE-REVIERS, M.T. 1977. Spermatogenesis in domestic mammals. In: COLE, H.H., CUPPS, P.T. (ed). *Reproduction in domestic animals*. 3 ed. New York: Academic Press.Cap. 8, p.203-227.
- ORTH, J. M., GUNSALUS, G. L., LAMPERTI, A. A. 1988. Evidentce from Setoli cell-depleted rats indicates that spematid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal developmente. **Endocrinology**. v.122, p.787-794.

- ORTH, J.M. 1982. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. **Anat. Rec.**, v.203, p.485-492.
- PAULA, T.A.R. Avaliação Histológica e Funcional do Testículo de Capivaras Adultas (Hydrochoerus hydrochaeris). Belo Horizonte: UFMG, 1999, 84p. Tese (Doutorado em Biologia Celular). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.
- PAULA, T.A.R.; CHIARINI-GARCIA, H.; FRANÇA, R. 1999 Semiferous epithelium cycle and its duration in capybaras (Hydrochoerus hydrochaeris). **Tissue & Cell**, v.31, n.3, p.327-334.
- PEREY, B., CLERMONT, Y., LEBLOND, C.P. 1961 The Wave of seminiferous epithelium. **Am. J. Anat.** v.108, p.47
- RABINOWITZ, A.R. & NOTTINGHAM, B.G. 1986. Ecology and behaviour of the jaguar (Panthera onca) in Belize, Central America. **J. Zool.**, Lond., v.210, p.149-159
- REDFORD, K.H. & EISENBERG, J.F. 1992. Mammals of the Neotropics, Vol. 2: the southern cone. Univ. Chicago Press, Chicago.
- ROBINETTE, W.I., GASHWILER, J.S., MORRIS, O.W. 1961. Notes on cougar productivity and life history. **J. Mammal.**, v.42, p.204-217.
- ROOSEN- RUNGE, E. C. 1973. Germinal-cell loss in normal metazoan spermatogenesis. **J. Reprod. Fertil.** v.35, p.339-348.
- ROOSEN-RUNGE, E.C., GIESEL, Jr.L.O. 1950. Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. **Am J. Anat.**, v.87, n.1, p.1-30.



- ROSER, J.F. Reproductive endocrinology of the stallion. 2000. In: SAMPER, J.C. (Ed.), Equine Breeding Management and Artificial Insemination. Saunders Company, Philadelphia, p.41-52
- ROSS, P.I. & JALKOTZY, M.G. 1992. Characteristics of a hunted population of cougars in south-western Alberta. **J. Wildl. Manage.**, v.56, n.3, p.417-426.
- ROWLEY, M. J. & HELLER, C. G. 1971. Quantification of the cells of the human testis employing the Sertoli cells as a constant. **Z. Zellforsch.**, v.115, p.461-472.
- RUSSELL, L. D. & CLERMONT, Y. 1977. Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats. **Anat. Rec.**, v.187, p. 347-366.
- RUSSELL, L. D. & PETERSON, R. N. 1984. Determination of the alongate spermatid-Sertoli cell ratio in various mammals. **J. Reprod. Fert.** v.70, p.635-641.
- RUSSELL, L.D., ETTLIN, R.A., SINHA HIKIM, E.P., CLEGG, E.D. Histological and histopathological evaluation of the testis. Cleanwater, FL, Cache River Press, 1990, 286p.
- RUSSELL, L.D., FRANÇA , L.R. 1995. Building a testis. **Tiss. Cell.** v.27, n.2, p.129-147.
- SCHLATT, S., MEINHARDT, A. AND NIESCHLAG, E., 1997. Paracrine regulation of cellular interactions in the testis: factors in search of a function. **Eur. J. Endocrinol.** v.137, p. 107-117.
- SEIDENSTICKER, J., HORNOCKER, M., WILES, W. AND J. MESSICK. 1973. Mountain lion social organization in the Idaho Primitive Area. **Wildl. Monogr.**, v.35, p.1-61

SHARPE, R. M. 1994. Regulation of spermatogenesis. In. Knobil, E. & Neil, J. D. (eds) *The physiology of reproduction*, 2ed. Raven Press, N.Y. 1363-1434

SINHA-HIKIM, A.P., CHAKRABORTY, J., JHUNJHUNWALA, J.S. 1985. Germ cell quantitation in human testicular biopsy. **Urol Res.**, v.13, p.111-115.

STEINBERGER, A., STEINBERGER, E. 1971. Replication pattern of Sertoli cells in maturing rat testis in vivo and in organ culture. **Biol. Reprod.**, v.4, p.84-87.

SWEANOR, L.L. & LOGAN, K.A. 1992. Life among desert cougars. **New Mexico Wildlife**, November-December, n.2, p.26.

WOZENCRAFT, C. 1993. A Taxonomy of the Felidae. **Cat News** v.18, n. 24.



## 4.0- DESCRIÇÃO MORFOFUNCIONAL E HISTOMÉTRICA DO TESTÍCULO DA ONÇA PARDA (*Puma concolor*) ADULTA

### Resumo

Os parâmetros de biometria corporal e morfofisiologia testicular são de suma importância no desenvolvimento de protocolos para reprodução assistida nas diferentes espécies. Foram estudados no presente experimento nove onças pardas adultas provenientes de cativeiro, estes animais pesaram em média 45Kg com massa testicular média de 7,45 g tendo apresentando assim índice gonadossomático de 0,03%. O volume médio de túbulos seminíferos por testículo foi de 5,2 ml, o que representou cerca de 78% do parênquima testicular. Em relação à massa corporal, cerca de 0,02% desta é alocada em túbulos seminíferos, ou seja, o índice tubulossomático. A onça parda adulta apresentou cerca de 18 metros de túbulo seminífero por grama de testículo. O compartimento intertubular representou cerca de 22% do parênquima testicular, o que equivale à cerca de 1,5 ml por testículo. Já as células de Leydig isoladamente, corresponderam a 8% do parênquima testicular, sendo o índice leydigossomático 0,002%. O espaço intertubular foi caracterizado como sendo do tipo II segundo a classificação de Fawcett et al. (1973). O diâmetro e altura do epitélio seminífero foram em média 227,37 $\mu$ m e 67,78 $\mu$ m, respectivamente. Os valores registrados neste estudo encontram-se dentro da amplitude observada para as demais espécies já estudadas.

**Palavras-chave:** testículo, espermatogênese, índice gonadossomático, índice leydigossomático, índice tubulossomático, *Puma concolor*.

## **Introdução**

A onça parda ou suçuarana (*Puma concolor*) é o segundo maior felino do continente americano, podendo atingir mais de 100 Kg, perdendo apenas para a onça pintada (*Panthera onca*), embora indivíduos de distribuição equatorial sejam menores que os de latitudes extremas (Kitchener, 1991). Possui ampla distribuição latitudinal, abrangendo assim, os mais diversos habitats, ocorrendo desde o Canadá até o Chile, incluindo também o Brasil (Redford and Eisenberg, 1992). Quanto ao status de conservação é considerada uma espécie ameaçada de extinção, mas em algumas áreas de floresta atlântica, cerrado e caatinga foram praticamente exterminadas.

A presença de predadores da ordem carnívora pode ser utilizada como indicadora da higidez de um ecossistema, por ocuparem o topo da cadeia alimentar. Estes animais são co-responsáveis pelo equilíbrio das áreas onde ocorrem. Os felídeos, na região neotropical, são os principais representantes desta ordem. A carência de informações na morfofisiologia reprodutiva da onça parda (*Puma concolor*) e sua relativa abundância em cativeiro tornam esta espécie um bom modelo experimental para a coleta de dados.

O estudo da morfologia testicular e processo espermatogênico é fundamental para o estabelecimento de padrões fisiológicos com os quais pode-se estabelecer protocolos para reprodução assistida. Estes padrões fornecem ainda subsídios para o conhecimento de uma gama de particularidades sobre a biologia reprodutiva das diferentes espécies (Fawcett et al., 1973).

## **Material e Métodos**

Foram utilizadas nove onças pardas, machos adultos, procedentes de Zoológicos do Distrito Federal, Minas Gerais e São Paulo, por ocasião do manejo realizado pelos pesquisadores do Centro Nacional de Conservação de Felinos Neotropicais, Jundiaí-SP (CNCFN), o qual foi criado pela portaria 106 de 26 de dezembro de 1996, dando a esta

ONG o direito de manejo em cativeiro e formação de um plantel próprio das seis espécies de pequenos felinos e das duas espécies de grandes felinos, todas ameaçadas de extinção.

Os animais foram contidos quimicamente, com a utilização de dardos anestésicos, e mantidos sob anestesia geral com o uso de 10mg/kg de ketamina associada à 1mg/kg de xilazina. Todo o procedimento foi monitorado, aferindo-se temperatura, movimentos respiratórios e batimentos cardíacos em intervalos de dez minutos. Uma vez anestesiado o animal foi pesado e foram coletados materiais biológicos (pêlo, pele, sangue e fezes) e dados biométricos corporais como protocolo do Centro Nacional de Conservação de Felinos Neotropicais. Os testículos foram mensurados percutaneamente quanto à largura, o comprimento e a espessura antes dos preparativos para o procedimento cirúrgico.

Para a realização da biópsia foram feitas a tricotomia do escroto e antissepsia local. Utilizou-se um “punch” de pele com 4 mm de diâmetro e, para facilitar a introdução deste no parênquima testicular, uma pequena incisão na pele e na túnica fibrosa foram feitas. Obteve-se um fragmento da região média do testículo direito ou esquerdo. Este fragmento foi cuidadosamente manipulado e imediatamente imerso em solução de aldeído glutárico (Merck®) 4% em tampão fosfato 0,1M pH 7,4, por duas horas, sendo então armazenados sob refrigeração a 4°C, no mesmo tampão até o processamento histológico. Foram suturadas separadamente a albugínea testicular, a túnica fibrosa e a pele utilizando-se fio absorvível (Vicryl®), O animal recebeu antibioticoterapia profilática.

Para estudos em microscopia de luz os fragmentos foram desidratados em bateria de etanol em concentrações crescentes (70<sup>o</sup>, 80<sup>o</sup>, 90<sup>o</sup> e 100<sup>o</sup>), infiltrados em solução de glicol metacrilato (Historesin, Leica Instruments®) e incluídos, no mesmo meio por adição do catalisador (Dimetil Sulfóxido). Secções de quatro micrômetros (4  $\mu$ m) de espessura foram obtidas através de micrótomo rotativo, dotado de navalha de vidro. Estes cortes foram montados em lâminas de vidro após coloração por solução de Azul de Toluidina-Borato de Sódio a 1%.

Para estudo em microscopia eletrônica de transmissão um fragmento de 2mm de largura por 2mm de comprimento do testículo de cada animal foi pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% e ferrocianato de potássio a 1,5% em tampão fosfato de sódio 0,1M (pH 7,4) por 1,5 horas. Após desidratação em série crescente de álcoois e passagens em acetona, esses fragmentos foram incluídos em Epon. Cortes ultrafinos foram obtidos em ultra-

micrótomo, coletados em tela de cobre e contrastados com acetato de uranila a 3% e citrato de chumbo. Este material foi analisado e fotografado em microscópio eletrônico EM-10 Zeiss.

O volume dos testículos foi calculado através da fórmula:  $\frac{4}{3} \pi \times ABC$ , onde A é a metade do comprimento, B é a metade da largura e C metade da espessura (Moreira, 1995). Como a densidade volumétrica do testículo é muito próxima de 1 (Paula, 1999), o volume do mesmo foi transformado em gramas para o cálculo do índice gonadossomático, que representa o percentual do massa corporal alocado em testículos. Para o cálculo do volume do parênquima testicular foram descontados 10%, referentes ao volume ocupado pelo mediastino e albugínea testiculares.

Para o cálculo da proporção volumétrica dos componentes do parênquima testicular, foram obtidas 25 imagens aleatórias, em microscópio de luz equipado com câmera digital, dos cortes histológicos de seis animais. Estas imagens foram analisadas em monitor de microcomputador de 15 polegadas ao qual foi aplicada uma grade dotada de 441 intersecções consideradas como pontos sendo computados os pontos coincidentes sobre túbulos seminíferos, células de Leydig, vasos linfáticos, vasos sangüíneos, células conjuntivas e artefatos. O volume dos diferentes componentes do parênquima testicular foi calculado baseado no volume total do parênquima em relação a proporção volumétrica de cada um destes.

Os índices leydigossomático e tubulossomático, representam o percentual do massa corporal alocados respectivamente em células de Leydig e túbulos seminíferos e foram calculados inferindo-se ao índice gonadossomático o percentual do parênquima testicular ocupado por estes componentes.

O diâmetro médio dos túbulos seminíferos foi obtido através de medidas de 20 secções transversais de túbulos, de contorno o mais circular possível, para cada um dos animais. Considerou-se, para tal abordagem, o menor diâmetro em cada secção transversal. As medidas foram feitas com o auxilio de ocular micrométrica e objetiva de 40X em microscópio de luz. Na mesma secção em que se obteve o diâmetro tubular mediu-se também a altura média do epitélio seminífero, desde a membrana basal até a borda luminal.

O comprimento total do túbulo seminífero por testículo, foi calculado com base na fórmula do volume do cilindro, que representa a forma do conjunto de túbulos seminíferos.

Assim, o comprimento total dos túbulos seminíferos corresponde ao volume total de túbulos dividido pela área da secção transversal do túbulo, estimada a partir dos valores obtidos do diâmetro tubular (Dorst & Sajonski, 1974).

Os resultados foram expressos em média e respectivo desvio padrão.

## **Resultados e Discussão**

A massa corporal média dos animais utilizados foi de 45 kg, dos quais apenas 0,03% estão alocados em massa testicular, ou seja índice gonadossomático (Tabela 1). Este índice é menor que o observado para o gato doméstico e para o *Felis silvestris* (0,07% e 0,05%) (Godinho, 1999; Kenagy & Trombulak, 1986). Segundo Kenagy & Trombulak (1986), este parâmetro não está relacionado com o tamanho e localização do testículo, forma do corpo ou modo de locomoção (terrestre, aquático ou aéreo), porém, mamíferos de menor porte tendem a alocar maior proporção de massa corporal em testículos, que os de maior porte. O tamanho relativo dos testículos correlaciona-se funcionalmente com o sistema de acasalamento (Dixson, 1993) e desta forma, espécies de mamíferos onde uma fêmea cruza com vários machos durante o período fértil do ciclo ovariano, apresentam maiores índices gonadossomáticos em relação às espécies onde um único macho é responsável pela cópula. Isto se deve ao fato de, no primeiro caso, haver necessidade de maior produção espermática, uma vez que a competição pela fertilização ocorre no interior do trato genital feminino. Assim, o menor índice gonadossomático da onça parda em relação ao gato doméstico é reflexo de seu maior massa corporal e do seu comportamento reprodutivo no qual raramente uma fêmea copula com mais de um macho durante o cio (Hemker et al., 1992).

O parênquima testicular representa o volume do testículo descontado os percentuais ocupados pela albugínea e mediastino testiculares. Nos animais domésticos estes ocupam cerca de 10 a 15% (França & Russell, 1998). Assim, no presente experimento, como os animais foram apenas biopsiados, estimou-se a proporção volumétrica destes componentes como sendo 10%.



O túbulo seminífero é o principal componente do testículo na grande maioria dos mamíferos, exercendo grande influência sobre a massa testicular e a produção espermática (Amann, 1970). O volume médio de túbulos seminíferos observados em onça parda foi de 5,2 ml por testículo, o que representou cerca de 78% do parênquima testicular (Tabela 1), sendo que esta proporção volumétrica é menor que os quase 90% observados no gato (Godinho, 1999) e no cão (Paula, 1992), porém, aproximou-se da média observada nos demais animais domésticos (França & Russell, 1998). Em relação à massa corporal a onça parda apresenta cerca de 0,02% desta alocada em túbulos seminíferos, ou seja, o índice tubulossomático (Tabela 1). Já no gato doméstico este índice é bem superior, cerca de 0,06% (Godinho, 1999). A onça parda adulta apresenta cerca de 18 metros de túbulo seminífero por grama de testículo (Tabela 1), acima dos 10 a 15 metros observados para a maioria dos animais domésticos (França & Russell, 1998), porém, abaixo dos 23 metros registrados no gato doméstico (Godinho, 1999). Estes parâmetros denotam maior investimento na produção espermática em gatos domésticos, em relação à onça parda, reafirmando as diferenças quanto às estratégias reprodutivas destas duas espécies.

O comprimento total do túbulo seminífero é diretamente relacionado ao tamanho do testículo e a onça parda apresenta cerca de 136 metros de túbulos seminíferos por testículo (Tabela 1). Porém, uma comparação entre diferentes espécies quanto a este parâmetro não é significativa visto a grande variação no tamanho testicular. Assim, o comprimento tubular por grama de testículo é um parâmetro mais acurado para a comparação interespecífica.

O tecido intertubular é composto por células de Leydig, vasos sangüíneos e linfáticos, nervos e uma população variada de outras células como mastócitos, macrófagos e fibroblastos. De acordo com Fawcett et al. (1973), a drenagem linfática, aliada à quantidade de células de Leydig no espaço intertubular nas diferentes espécies de mamíferos segue, em geral, três padrões distintos: (I) espécies nas quais as células de Leydig e o tecido conjuntivo ocupam uma área muito pequena no compartimento intertubular, contrastando com extensos sinusóides ou espaços linfáticos interpostos aos túbulos seminíferos; (II) espécies que apresentam grupos de células de Leydig espalhados em abundante tecido conjuntivo frouxo edemaciado, o qual é drenado por um vaso linfático localizado central ou excentricamente no espaço intertubular; e (III) espécies nas quais abundantes grupamentos de células de Leydig ocupam praticamente todo o compartimento

intertubular, apresentando pouco tecido conjuntivo e linfáticos. Diferente do observado no arranjo do tipo III, o espaço intertubular em onças pardas apresentou pequenos grupamentos de células de Leydig e geralmente um vaso linfático centralmente localizado (Figura 1). Também diferiu do arranjo do tipo I devido à presença de abundante tecido conjuntivo frouxo edemaciado alocado entre os grupamentos de células de Leydig e os túbulos seminíferos em detrimento dos sinusóides linfáticos, conforme observação sob microscopia eletrônica (Figura 2). Desta forma a onça parda parece possuir organização do tipo II na classificação de Fawcett et al., (1973).

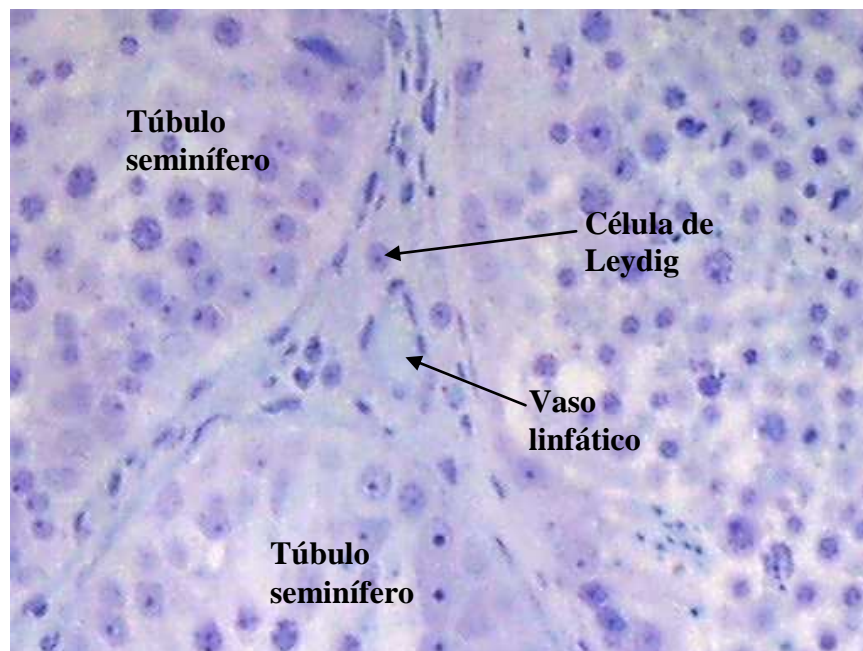


Figura 1-Espaço intertubular da onça parda adulta, ao microscópio de luz, demonstrando um vaso linfático centralmente localizado. Azul de toluidina (300X)

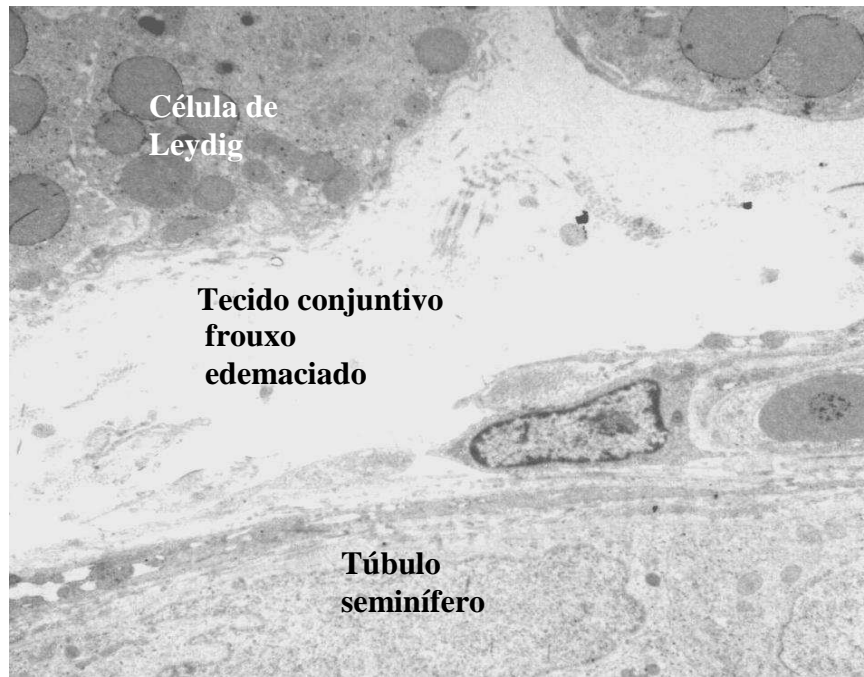


Figura 2- Espaço intertubular de onça parda adulta ao microscópio eletrônico, demonstrando tecido conjuntivo frouxo edemaciado, interposto às células de Leydig e ao túbulo seminífero. (3500X).

A quantidade de células de Leydig é bastante variada entre as diversas espécies de mamíferos, não sendo esta variação encontrada para outras glândulas endócrinas (Fawcett et al., 1973). Os outros componentes do espaço intertubular apresentam variações menos evidentes nas diferentes espécies. Por exemplo, o tecido conjuntivo intertubular corresponde à cerca de 7% do parênquima testicular no suíno piau (França, 1991), 7,5% no cão (Paula & Cardoso, 1994) e 8% em capivaras (Paula, 1999). Na onça parda adulta o compartimento intertubular representa cerca de 22% do parênquima testicular, o que equivale à cerca de 1,5 ml por testículo. Já as células de Leydig isoladamente, correspondem a 8% do parênquima testicular (Tabela 1), enquanto no gato estas células correspondem a 6% (Godinho, 1999). Embora a proporção volumétrica testicular de células de Leydig do gato seja menor que a observada na onça parda, o índice leydigossomático, ou seja a proporção da massa corporal alocada em células de Leydig, no gato, 0,004% (Godinho, 1999), é o dobro do observado na onça parda, 0,002% (Tabela 1).

Tabela 1 – Biometria e histometria do testículo de onça parda adulta.

Parâmetro	n	Média ± Desvio padrão
Massa corporal (Kg)	5	45,0±7,79
Massa testicular médio (g)	5	7,45±2,45
Índice gonadossomático (%)	6	0,033±0,006
Índice Leydigossomático (%)	4	0,002±0,005
Índice tubulossomático (%)	4	0,02±0,001
Túbulo seminífero (%)	6	78,07±6,01
Células de Leydig (%)	6	8,24±3,16
Tecido Conjuntivo (%)	6	9,53±2,14
Vasos linfáticos (%)	6	0,21±0,16
Vasos sanguíneos (%)	6	3,87±2,39
Intertúbulo (%)	6	21,88±6,00
Diâmetro tubular (µm)	7	227,37±16,48
Altura do epitélio seminífero (µm)	7	67,78±9,11
Comprimento de túbulo seminífero* (m/g)	4	18,27±3,42
Comprimento total de túbulo seminífero (m)	4	136,10±53,68

\*Comprimento de túbulo seminífero por grama de testículo

O principal produto das células de Leydig é a testosterona, que desempenha um papel primordial no processo espermatogênico, estando ainda envolvida na manifestação comportamental e fenotípica das características sexuais. Porém, o real significado da grande variação na proporção volumétrica testicular de células de Leydig, nas diferentes espécies, permanece não totalmente esclarecido. Inúmeros fatores podem influir na quantidade de células de Leydig por animal, dentre os quais podem ser destacados: a quantidade de LH disponível; o número de receptores de LH por célula; a quantidade de testosterona que a célula de Leydig é capaz de secretar em um dado tempo; a velocidade pela qual a testosterona deixa o testículo via vasos linfáticos, vasos sanguíneos e fluido

seminal; a síntese de outros tipos de esteróides; o volume sangüíneo do animal e a taxa de metabolismo da testosterona (Fawcett et al., 1973; Russell et al., 1994; Russel, 1996). O índice leydigossomático parece refletir com maior fidelidade o requerimento de células de Leydig por espécie. De maneira mais acentuada do que o observado entre o gato e a onça parda, a capivara e o rato apresentam grande variação na proporção volumétrica testicular de células de Leydig (33% e 2,2% respectivamente), porém os valores para os índices leydigossomáticos nestas duas espécies comportam-se de forma inversa (0,041% e 0,094% respectivamente), (Paula, 1999). O significado exato da variação no investimento em células de Leydig nas diferentes espécies permanece ainda por ser esclarecido.

Em investigações envolvendo o processo espermatogênico, como o estabelecimento do período de puberdade e a maturidade sexual, os efeitos da idade, a sazonalidade, os estudos toxicológicos e o estabelecimento de padrões normais em espécies ainda não estudadas, o diâmetro tubular e a altura do epitélio seminífero são parâmetros classicamente utilizados como indicadores da atividade espermatogênica (Attal & Courrot, 1963; Godinho & Cardoso, 1979; Parreira & Cardoso, 1991; Russell et al., 1990; Paula & Cardoso, 1994; Paula, 1999). Isto deve-se ao fato de o diâmetro tubular e a altura do epitélio seminífero contribuírem diretamente para o tamanho e população das células de Sertoli e células germinativas.

O diâmetro do túbulo seminífero permanece relativamente constante nos animais não sazonais e sexualmente maduros (Paula, 1999), no entanto, o valor tipicamente observado na maioria dos amniotas apresenta uma variação de 180 a 300 $\mu$ m (Roosen-Runge, 1977). A onça parda adulta apresenta aproximadamente 227  $\mu$ m de diâmetro tubular, muito próximo ao observado no gato doméstico (Godinho, 1999) e dentro da amplitude citada para os demais espécies estudadas.

A altura do epitélio seminífero é um parâmetro que está limitado às 4 ou 5 camadas de células germinativas que compõem os diferentes estádios do ciclo do epitélio seminífero. A população celular nestas camadas varia, nas diferentes espécies, com a capacidade de suporte das células de Sertoli (Russell & Peterson, 1984). Embora o tamanho e população de células germinativas estejam sujeitos a variações espécie específicas em seu tamanho, o número destas camadas não sofre alterações devido a constante produção de espermátócitos primários na porção basal e simultânea liberação destas células como espermatozóides na

porção luminal (Russell et al., 1990a) A altura do epitélio seminífero de onças pardas adultas foi em média 67 $\mu$ m, abaixo dos 81 $\mu$ m observados no gato doméstico (Godinho, 1999), porém, dentro da amplitude observada nos animais domésticos, que é de 60 a 100  $\mu$ m (França & Russell, 1998).

### Referências Bibliográficas

- Amann, R.P. 1970. Sperm production rates. In: Johson, A.D., Gomes, W.R., Vandemark, N.L. (eds). The testis. New York: Academic Press. Pp. 433-482
- Attal, J., Courot, M. 1963. Développement testiculaire et établissement de la spermatogénèse chez le taureau. Ann Biol. Anim. Bioch. Biophys. 3: 219- 241.
- Dixson, A.F. 1993. Sexual Selection, Sperm Competition and the Evolution of Sperm Length. Folia Primatol. 61:221-227.
- Dorst, V. J.; Sajonski, H. 1974. Morphometrische untersuchunhen am tubulussystem des schweinehodens während der postnatalen entwicklug. Monotsh. Ver. Med. 29: 650- 652.
- Fawcett, D. W., Neaves, W. B., Flores, M. N. 1973. Comparative observations on intertubular lymphatic and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. Biol. Reprod. 9: 500- 532.
- França, L. R., Russell, L. D. 1998. The testis of domestic animals. In: Regadera, J. & Martinez-Garcia (eds.). Male reproduction. A multidisciplinary overview. Churchill Livingstone, Madrid. Pp. 197-219.
- França, L. R. 1991. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais. 185p.

- Godinho, H. P., Cardoso, F. M. 1979. Desenvolvimento sexual de porcos Yorkshire. II. Estabelecimento e evolução da espermatogênese. Arq. Esc. Vet. UFMG. 31 (3): 351-361.
- Godinho, C. L. 1999. Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*) sexualmente maduros. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais. 123p.
- Hemker, T.P., Lindzey, F.G., and Ackerman, B.B. 1992. Population Characteristics and Movement Patterns of Cougars in Southern Utah. *Journal of Wildlife Management* 48: 1275-1284
- Kenagy, G. J., Trombulak, S. C. 1986. Size And Function Of Mammalian Testes In relation to body size. *J. Mamm.* 67(1): 1-22.
- Kitchener, A. 1991. The natural history of the wild cats. Christopher Helm, London
- Moreira, J. R. 1995. The reproduction, demography and management of capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) on Marajó Island- Brazil. Doctorate Thesis. University of Oxford.
- Parreira, G. G. , Cardoso, F. M. 1991. Biologia reprodutiva de machos *Bolomys Lasius* Lund, 1841 ( Rodentia, Cricetidae). I. Morfologia da espermatogênese e ciclo do epitélio seminífero. *Rev. Brasil. Biol.* 51(3): 639-646.
- Paula, T. A. R. , Cardoso, F. M. 1994. Alterações etárias na espermatogênese do cão. I. Análise histométrica. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 46(1): 19-30.
- Paula, T.A.R. 1992. Estudo histológico quantitativo da atividade espermatogênica de cães s.r.d. em diferentes faixas etárias após a puberdade. Belo Horizonte: UFMG, 62p. Tese (Mestrado em Morfologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

- Paula, T.A.R. 1999. Avaliação Histológica e Funcional do Testículo de Capivaras Adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Belo Horizonte: UFMG, 84p. Tese (Doutorado em Morfologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.
- Redford, K.H. , Eisenberg, J.F. 1992. Mammals of the Neotropics, Vol. 2: the southern cone. Univ. Chicago Press, Chicago.
- Roosen-Runge, E.C. 1977. The process of spermatogenesis in animals. Cambridge: University Press.
- Russell, L. D. 1996. Mammalian Leydig cell structure. In: Payne, A. H., Hardy, M. P., Russell, L. D. (eds). The Leydig cell. Cache River Press. Vienna, IL.
- Russell, L. D. , Peterson, R. N. 1984. Determination of the alongate spermatid-Sertoli cell ratio in various mammals. *J. Reprod. Fert.* 70: 635-641.
- Russell, L. D., Ettlin, R. A., Sinha-Hikim, A. P., Clegg, E. D. 1990a. Histological and histopathological evaluation of the testis. Cache River Press, Clearwater, Florida.
- Russell, L. D., Ren, H. P., Sinha-Hikin, I., Schulze, W., Sinha-Hikin, A. P. 1990b. A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell. *Am. J. Anat.* 188(1): 21-30.
- Russell, L. D., Chandrashekar, V., Bartke, A., Sinha-Hikim, A. P. 1994. The hamstes Sertoli cell in early testicular regression and early recrudescence: a stereological and endocrine study. *Int. J. Androl.* 17(2): 93-106.
- Sampaio, I.B.M. 1998. Estatística aplicada à experimentação animal. Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, MG, Brasil



## **5.0-O CICLO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO E SUA DURAÇÃO NA ONÇA PARDA (*Puma concolor*)**

### **Resumo**

Embora a onça parda seja o segundo maior felino das Américas e apresente uma ampla distribuição latitudinal, abrangendo os mais diversos habitats, muito pouco se sabe a respeito de sua morfofisiologia testicular, incluindo o processo espermatogênico. Neste estudo, a duração do ciclo do epitélio seminífero foi estimada usando-se injeções intratesticulares de timidina triciada. A duração total do ciclo do epitélio seminífero da onça parda foi calculada em 9,96 dias e como aproximadamente 4,5 ciclos do epitélio seminífero são necessários para que todo o processo espermatogênico seja completado, cerca de 44,8 dias são despendidos na produção de espermatozóides, a partir de uma espermatogônia. A duração da espermiogênese, prófase e demais eventos da meiose da onça parda adulta foram respectivamente 14,08; 15,2 e 1,79 dias. Foram descritos oito estádios do ciclo do epitélio seminífero, através do método da morfologia tubular, o qual se baseia na forma e posição do núcleo das espermátides e na ocorrência de divisões meióticas. Os valores observados na onça parda para a frequência relativa das fases pré-meiótica, meiótica e pós-meiótica foram respectivamente 4,0; 1,8 e 4,15 dias.

**Palavras-chave:** espermatogênese, duração do ciclo do epitélio seminífero, *Puma concolor*

## Introdução

A onça parda ou suçuarana (*Puma concolor*) é o segundo maior felino do continente americano, podendo atingir mais de 100 Kg, perdendo apenas para a onça pintada (*Panthera onca*), embora indivíduos de distribuição equatorial sejam menores que os de latitudes extremas (Kitchener, 1991). Possui ampla distribuição latitudinal, abrangendo assim, os mais diversos habitats, ocorrendo desde o Canadá até o Chile, incluindo também o Brasil (Redford & Eisenberg, 1992). Quanto ao status de conservação é considerada uma espécie ameaçada de extinção, mas em algumas áreas de floresta atlântica, cerrado e caatinga já foram praticamente exterminadas.

A presença de predadores da ordem carnívora pode ser utilizada como indicadora da higidez de um ecossistema, por ocuparem o topo da cadeia alimentar. Estes animais são co-responsáveis pelo equilíbrio das áreas onde ocorrem. Os felídeos, na região neotropical, são os principais representantes desta ordem. A carência de informações na morfofisiologia reprodutiva da onça parda (*Puma concolor*) e sua relativa abundância em cativeiro tornam esta espécie um bom modelo experimental para a coleta de dados.

O processo espermatogênico ocorre de modo altamente organizado, espacial e cronologicamente, em associações predeterminadas entre diferentes tipos celulares. Pode ser dividido em três fases, baseadas em considerações morfológicas e funcionais: (1) fase proliferativa (espermatogonial), na qual as células sofrem rápidas e sucessivas divisões mitóticas; (2) fase meiótica (espermatócitos), na qual o material genético é duplicado e passa por recombinação genética; e (3) fase de diferenciação ou espermiogênica (espermátides), na qual as espermátides sofrem enormes modificações, transformando-se em células muito especializadas e estruturalmente equipadas para alcançar e fertilizar os ovócitos, os espermatozóides (Russell et al., 1990).

O ciclo do epitélio seminífero refere-se ao período de tempo em que, em um mesmo segmento do túbulo, um dado estágio volta a se repetir. Cerca de 4,5 ciclos são necessários para que todo o processo espermatogênico ocorra (Berndston, 1977), ou seja, a cada ciclo que se repete, a célula germinativa apresenta-se em uma fase mais avançada do processo, até que de uma espermatogônia produz-se espermatozóides liberados no lume tubular (Paula, 1999).

A duração do ciclo do epitélio seminífero é uma constante biológica espécie específica, a qual está sob o controle do genótipo da célula germinativa (França et al., 1998), não sendo influenciada por qualquer fator conhecido (Clermont, 1972; Amann & Schanbacher, 1983).

O estudo sobre a morfologia testicular e o processo espermatogênico, em uma dada espécie, é fundamental para o estabelecimento dos padrões fisiológicos com os quais pode-se estabelecer protocolos para reprodução assistida. Estes padrões fornecem ainda subsídios para o conhecimento de uma gama de particularidades sobre a biologia reprodutiva das diferentes espécies (Fawcett et al., 1973).

## **Material e Métodos**

Foram utilizadas nove onças pardas, machos adultos, procedentes de Zoológicos do Distrito Federal, Minas Gerais e São Paulo, por ocasião do manejo realizado pelos pesquisadores do Centro Nacional de Conservação de Felinos Neotropicais, Jundiaí-SP (CNCFN), o qual foi criado pela portaria 106 de 26 de dezembro de 1996, dando a esta ONG o direito de manejo em cativeiro e formação de um plantel próprio das seis espécies de pequenos felinos e das duas espécies de grandes felinos, todas ameaçadas de extinção.

Os animais foram contidos quimicamente, com a utilização de dardos anestésicos e mantidos em anestesia geral com a associação cloridrato de ketamina / xilazina. Todo o procedimento foi monitorado, aferindo-se temperatura, movimentos respiratórios e batimentos cardíacos em intervalos de dez minutos. Uma vez anestesiado o animal era pesado e eram coletados materiais biológicos (pêlo, pele, sangue e fezes) e dados biométricos corporais segundo protocolo do Centro Nacional de Conservação de Felinos Neotropicais. Os testículos foram mensurados quanto à largura, comprimento e espessura antes dos preparativos para o procedimento cirúrgico.

Para a determinação da duração do ciclo do epitélio seminífero, empregou-se como marcador das células da linhagem espermatogênica solução de 0,1% de timidina triciada ([metil-<sup>3</sup>H]timidina, Amersham, Life Science, England), numa concentração radioativa de 1,0 mCi/ml. Para tal um animal adulto recebeu, através de seringa hipodérmica, injeções

intratesticulares em três pontos distintos de 0,1 ml de timidina triciada, na extremidade caudata do testículo direito, o qual foi biopsiado sete dias depois.

O procedimento cirúrgico de biópsia foi iniciado com a tricotomia do escroto e antissepsia local. Uma pequena incisão na pele foi feita e através de um “punch” de pele com 4 mm de diâmetro, para remoção de um fragmento da região média do testículo direito ou esquerdo. Este fragmento foi cuidadosamente manipulado e imediatamente imerso em solução de aldeído glutárico (Merck®) 4% em tampão fosfato 0,1M pH 7,4, por duas horas, sendo então armazenados sob refrigeração a 4°C, no mesmo tampão até o processamento histológico. Foi suturada separadamente a albugínea testicular, a túnica fibrosa e a pele utilizando-se fio absorvível (Vicryl®). O animal recebeu antibioticoterapia profilática.

Para estudos em microscopia de luz os fragmentos foram desidratados em bateria de etanol em concentrações crescentes (70<sup>o</sup>, 80<sup>o</sup>, 90<sup>o</sup> e 100<sup>o</sup>), infiltrados em solução de glicol metacrilato (Historesin, Leica Instruments) e incluídos, no mesmo meio por adição do catalisador (Dimetil sulfóxido). Cortes de quatro micrômetros (4  $\mu$ m) de espessura foram obtidos através micrótomo rotativo, dotado de navalha de vidro. Estes cortes foram montados em lâminas de vidro após coloração por solução de Azul de Toluidina-Borato de Sódio a 1%.

As lâminas foram analisadas em microscópio de luz para caracterização dos oito estádios do ciclo do epitélio seminífero segundo o método da morfologia tubular. Foram computadas as frequências relativas destes estádios em cerca de 150 secções transversais de túbulos seminíferos, observados aleatoriamente em cada animal.

Para a identificação das células marcadas pela timidina triciada foi executado processamento radioautográfico conforme técnica descrita por Bundy (1995). As preparações histológicas dos fragmentos testiculares biopsiados próximos ao local de injeção de timidina triciada foram cobertas com emulsão fotográfica Kodak NTB-2 (Eastman Kodak Co., Rochester, NY, EUA). Este procedimento foi executado em câmara totalmente escura através de imersão das lâminas em emulsão mantida líquida em banho-maria a 45°C. Estas lâminas foram então acondicionadas em uma caixa à prova de luz e armazenadas em geladeira, a 4°C por dois meses. Este período é considerado suficiente para a sensibilização dos grãos de prata da emulsão, pelo radioisótopo. Após este período as lâminas foram reveladas, em câmara totalmente escura, com solução aquosa (1:1) do

revelador Kodak D-19 por 4 minutos, à temperatura de 15°C. As lâminas foram então lavadas em água destilada e fixadas em fixador Kodak F5 por cinco minutos, à temperatura ambiente. Novamente lavadas em água destilada, as lâminas foram secas à temperatura ambiente, cobertas com lamínulas de vidro e analisadas em microscópio de luz. Baseando-se na posição da célula marcada mais avançada após a injeção e nas frequências relativas dos estádios do ciclo do epitélio seminífero, calculou-se a duração total do ciclo do epitélio seminífero.

## **Resultados**

O ciclo do epitélio seminífero da onça parda foi dividido didaticamente em oito estádios baseados na forma, presença e localização dos núcleos de espermatogônias, espermatócitos primários, espermatídes, e na presença de Figuras de divisões meióticas, e descritos como se seguem:

### **Estádio 1**

O estágio 1 foi caracterizado pela presença de uma geração de espermatídes, com núcleos arredondados e escuros, os quais em geral formavam três a quatro camadas na parte superior do epitélio seminífero. Os núcleos das células de Sertoli apresentaram um nucléolo bem desenvolvido, medindo cerca de 2,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro, e cromatina frouxa. Espermatogônias do tipo A e espermatócitos primários, na transição pré-leptóteno para leptóteno, foram observados próximo à membrana basal. Espermatócitos em paquíteno estavam localizados entre as espermatídes arredondadas e espermatócitos em pré-leptóteno/leptóteno (Figura 1a).

### **Estádio 2**

Neste estágio foram observadas espermatídes com núcleos em fase de alongamento e orientados em direção aos núcleos de células de Sertoli. Espermatócitos primários em leptótenos, localizados próximos à lâmina basal, e espermatócitos primários em paquíteno, na transição para espermatócitos em diplóteno, foram também observados. Núcleos e nucléolos de célula de Sertoli, e espermatogônias do tipo A apresentaram morfologia semelhante àquela observada no estágio anterior. (Figura 1b)

### Estádio 3

Espermátides alongadas formavam feixes compostos por poucos núcleos. Duas gerações de espermatócitos primários estavam presentes neste estágio: espermatócitos em zigóteno e diplóteno com seus núcleos caracteristicamente grandes. Núcleos de células de Sertoli com seu nucléolo proeminente e espermatogônia do tipo A foram observados próximos à lâmina basal. (Figura 1c).

### Estádio 4

A ocorrência de duas divisões meióticas foi o aspecto mais característico deste estágio, com a observação de placas metafásicas. Espermatócitos em diplótenos formam espermatócitos secundários, os quais se dividem produzindo espermátides arredondadas. Feixes de espermátides alongadas e espermatócitos primários na transição zigóteno para paquíteno também foram observados. Núcleos de células de Sertoli eram semelhantes aos observados no estágio anterior. (Figura 1d).

### Estádio 5

Duas gerações de espermátides estavam presentes neste estágio, espermátides arredondadas recém-formadas e espermátides alongadas. Embora tenha apresentado diâmetro menor, a morfologia do núcleo de espermátides arredondadas foi similar à observada para espermatócitos secundários. Feixes de espermátides alongadas estavam localizados em criptas das células de Sertoli, não sendo incomum a observação de alguns núcleos situados profundamente no epitélio seminífero. Espermatócitos primários na transição de zigóteno para paquíteno foram observados entre as espermátides arredondadas e o compartimento basal. Espermatogônias do tipo A estavam presentes na base do túbulo. Núcleos de células de Sertoli com nucléolo proeminente apresentavam seu eixo longitudinal, de maneira geral, perpendicular à lâmina basal. (Figura 1e).

### Estádio 6

Todos os tipos celulares observados no estágio anterior estavam presentes, com exceção dos espermatócitos em zigóteno. O aspecto característico deste estágio foi que os feixes de espermátides estavam, de maneira geral, mais próximos do lume tubular. Espermatócitos primários em paquítenos encontravam-se na região média do epitélio seminífero. Núcleos de células de Sertoli e espermatogônias do tipo A estavam presentes próximos à lâmina basal. Espermatogônias intermediárias foram também observadas neste

estádio. Este tipo celular apresentava núcleo menor e mais escuro quando comparado com àqueles de espermatogônias do tipo A. (Figura 1f).

#### Estádio 7

Neste estágio, os feixes de espermátides alongadas apresentavam-se dissociados e estavam localizados próximos ao lume tubular. Núcleos dos espermátócitos primários em paquíteno foram observados na região média do epitélio. As espermatogônias do tipo B, também presentes neste estágio apresentavam nucléolos arredondados ou ovóides e com grande quantidade de heterocromatina. Os outros tipos celulares presentes neste estágio foram as espermátides arredondadas, espermatogônias do tipo A e células de Sertoli. (Figura 1g).

#### Estádio 8

O aspecto mais característico deste estágio foi a localização das espermátides alongadas prontas para serem liberadas do epitélio seminífero. Corpos residuais eram pouco evidenciados e estavam situados na borda luminal do epitélio. Espermátócitos em paquíteno, espermátides arredondadas, espermatogônias do tipo A e células de Sertoli estavam também presentes. Espermátócitos em pré-leptóteno foram observados próximos à lâmina basal. (Figura 1h).

A frequência relativa de cada estágio do ciclo do epitélio seminífero da onça parda está representada na tabela 1 e na tabela 2, pode-se observar o agrupamento destes estágios nas fases pré-meiótica (estádios 1 ao 3), meiótica (estádio 4) e pós-meiótica (estádio 5 a 8).

A duração total do ciclo do epitélio seminífero da onça parda foi calculada em 9,96 dias, visto que as células contendo marcação radioativa mais avançada, após uma semana da aplicação do radioisótopo, foram os espermátócitos primários em paquíteno no estágio 5 (Figura 2), sendo 70,7 % do ciclo percorridos neste período (Figura 3). A duração dos diferentes estágios do ciclo do epitélio seminífero e das fases pré-meiótica, meiótica e pós-meiótica estão descritos nas tabelas 1 e 2. Como aproximadamente 4,5 ciclos do epitélio seminífero são necessários para que todo o processo espermatogênico seja completado, cerca de 44,8 dias são despendidos na produção de espermatozóides a partir de uma espermatogônia. Com base nestes dados foi possível estimar que a duração da

espermiogênese, prófase e demais eventos da meiose da onça parda adulta foram respectivamente 14,08; 15,2 e 1,79 dias.

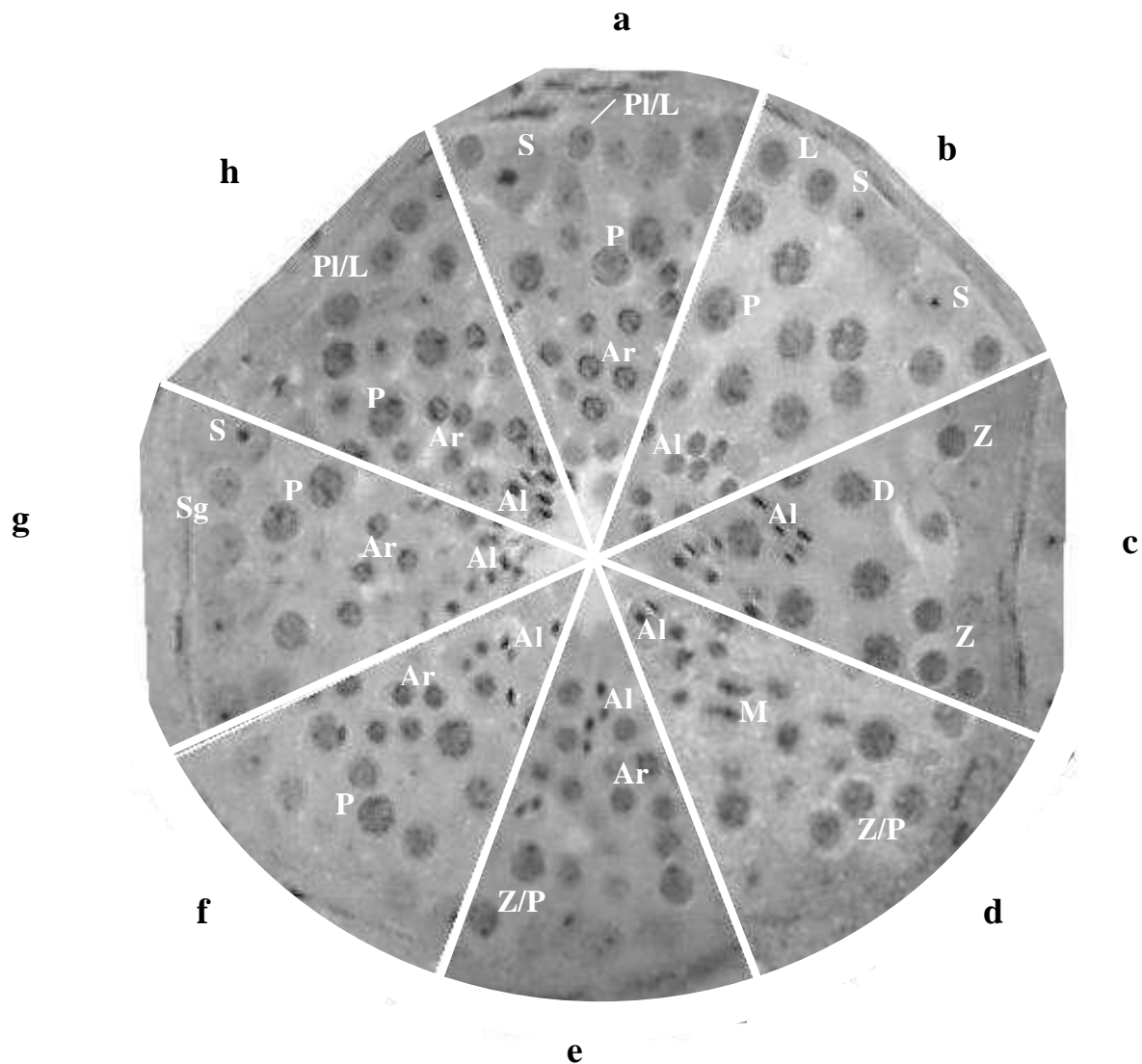


Figura 1- Montagem fotográfica contendo os oito estádios do ciclo do epitélio seminífero da onça parda. Estádio 1 (a); estágio 2 (b); estágio 3 (c); estágio 4 (d); estágio 5 (e); estágio 6 (f); estágio 7 (g); estágio 8 (h). Célula de Sertoli (S); espermatogônia (Sg); espermatócito primário na transição pré-leptóteno/leptóteno (PI/L); espermatócito primário em leptóteno (L); espermatócito primário em zigóteno (Z); espermatócito primário na transição zigóteno/paquítenu (Z/P); espermatócito primário em paquíteno (P); espermatócito primário em diplóteno (D); placas metafásicas (M); espermátides arredondadas (Ar); espermátides alongadas (Al). Azul de toluidina (400X).



Tabela 1- Frequência relativa e duração dos estádios do ciclo do epitélio seminífero em onças pardas.

Estádios	Frequência (%)*	Duração (dias)
1	13 ± 3,3	1,29
2	14,4 ± 2,0	1,43
3	12,7 ± 2,6	1,26
4	18 ± 1,8	1,79
5	12,6 ± 4,6	1,25
6	7,9 ± 2,2	0,78
7	8,4 ± 1,7	0,83
8	12,7 ± 2,1	1,26

\*média ± desvio padrão, n=5.

Tabela 2- Frequência relativa e duração das fases pré-meiótica, meiótica e pós-meiótica do ciclo do epitélio seminífero em onças pardas.

	Fase pré-meiótica	Fase meiótica	Fase pós-meiótica
Frequência (%)*	40,1±4,5	18±1,8	41,7±3,9
Duração (dias)	4,0	1,8	4,15

\* média ± desvio padrão, n=5.

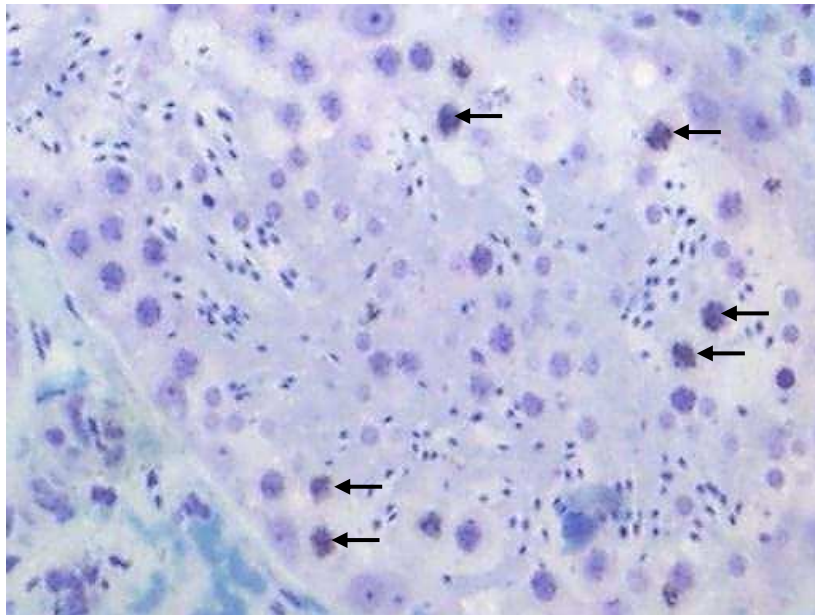
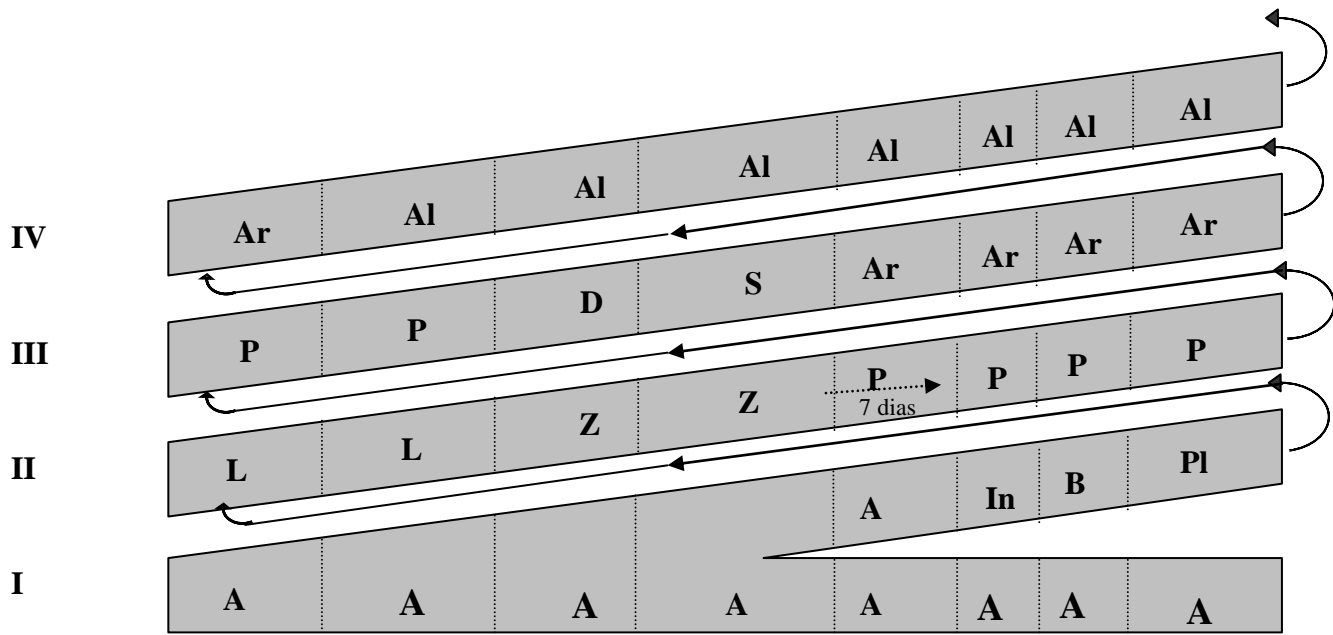


Figura 2- Estádio 5 do ciclo do epitélio seminífero de onça parda adulta, após uma semana da aplicação do radioisótopo, demonstrando marcação autoradiográfica em espermatócitos primários em paquíteno. Azul de toluidina (300X).

Espermatozóide



Estádios	1	2	3	4	5	6	7	8
Frequência (%)	13,0	14,4	12,7	18,0	12,6	7,9	8,4	12,7
Duração (dias)	1,29	1,43	1,26	1,79	1,25	0,78	0,83	1,26

Figura 3 – Diagrama (Paula,1999) mostrando a célula germinativa marcada mais avançada (seta) nos oito estádios do ciclo, após uma semana da injeção de timidina triciada. Números romanos indicam o ciclo espermatogênico. O espaço dado a cada coluna é proporcional à sua frequência relativa. Letras em cada coluna indicam as células germinativas características de cada estágio do ciclo. Espermatogônia do tipo A (A); espermatogônia intermediária (In); espermatogônia do tipo B (B); espermatócito primário: em pré-leptóteno (Pl); em leptóteno (L); em zigóteno (Z); em paquíteno (P); em diplóteno (D); espermatócito secundário (S); espermátide arredondada (Ar); espermátide alongada (Al).

## Discussão

O processo espermatogênico refere-se a uma série de eventos que ocorrem no epitélio seminífero desde a divisão da espermatogônia do tipo  $A_1$  até a liberação de espermatozóides no lume tubular (Ortavant et al., 1977; Russell et al., 1990a). Conceitualmente, este processo é didaticamente descrito como uma seqüência cíclica de sucessões ordenadas de associações celulares, ou estádios, que ocorrem no tempo em uma dada área do epitélio seminífero (Russell et al., 1990a ; Sharpe, 1994). O ciclo do epitélio seminífero refere-se ao período de tempo em que, em um mesmo segmento do túbulo, um dado estágio volta a se repetir (Leblond & Clermont, 1952; Clermont, 1972; Berndtson, 1977; Amann & Schanbacher, 1983; Russell et al., 1990a; Castro et al., 1997). Cerca de 4,5 ciclos são necessários para que todo o processo espermatogênico ocorra (Figura 3), ou seja, a cada ciclo que se repete, a célula germinativa apresenta-se em uma fase mais avançada do processo, até que de uma espermatogônia produz-se espermatozóides liberados no lume tubular (Paula, 1999).

Conforme já citado, no presente trabalho os estádios do ciclo foram classificados de acordo com o método da morfologia tubular, o qual se baseia na forma e posição do núcleo das espermátides e na ocorrência das divisões meióticas. A onça parda apresenta, de maneira geral, a espermatogênese muito semelhante à descrita para o gato e demais espécies já estudadas (Godinho, 1999; Russell et al., 1990a; De Rooij, 1998).

Usualmente, um único estágio do ciclo do epitélio seminífero foi observado por secção transversal de túbulo seminífero em onça parda. Esta observação está de acordo com o relatado na literatura, onde, com exceção de alguns primatas, o arranjo dos estádios do ciclo espermatogênico é segmentar em todos os mamíferos já investigados (Sharpe, 1994).

Apesar da frequência relativa dos estádios do ciclo ser considerada classicamente como uma constante para uma determinada espécie, variação individual de até 50% acima ou abaixo do valor médio encontrado foi observada no presente estudo. Embora com maior amplitude, estes achados estão de acordo com os resultados encontrados por Hess et al.

(1990) para o rato, França & Cardoso (1998) para o suíno, França et al. (1999) para o caprino e muito próximos ao observado por Godinho (1999) para o gato.

Os diferentes estádios podem ser agrupados em três fases tomando-se como ponto de referência a meiose, conforme descrito a seguir: fase pré-meiótica, possui uma geração de espermatídes e inclui os estádios do ciclo compreendidos entre o final da espermiacção e antes das divisões meióticas; fase meiótica, compreende o estádio no qual ocorrem as duas divisões meióticas e os espermatócitos secundários estão presentes; e fase pós-meiótica, que contem duas gerações de espermatídes e vai desde a formação de novas espermatídes arredondadas até a espermiacção das espermatídes alongadas. Os valores observados na onça parda para a freqüência relativa das fases pré-meiótica, meiótica e pós-meiótica aproximam-se daqueles encontrados para o gato doméstico (45,5; 17,6; 36,9 respectivamente) (Godinho, 1999) e está dentro da amplitude observada para a maioria das espécies já estudadas (Guerra, 1983).

A timidina triciada é incorporada ao núcleo das células germinativas que estão sintetizando DNA no momento da injeção, especificamente espermatogônias e espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno no estádio 1 do ciclo do epitélio seminífero. Portanto, coletando-se fragmentos testiculares em intervalo de tempo conhecido após a injeção, é possível através da identificação das células marcadas e o estádio em que se encontram, estimar o percentual do ciclo percorrido e assim inferir sua duração em dias (Figura 2). Em mamíferos de maneira geral, a duração mais curta do ciclo (6,7 dias) ocorre no roedor “bank vole” (*Cletheriomys glareolus*) (Grocock & Clarke, 1976), enquanto as mais longas citadas foram para o gambá (*Didelphis albiventris*, 17,3 dias) (Queiroz & Nogueira, 1992) e para o hamster chinês (*Cricetulus griseus*, 17,0 dias) (Oud & De Rooij, 1977). Dentre cerca de 30 diferentes espécies de mamíferos investigadas até o presente momento, a duração de um ciclo espermatogênico ficou entre 10 e 14 dias em 60% delas, enquanto em 30% esta duração foi de 7 dias a 9 dias. Assim, a duração da espermatogênese na onça parda está dentro da faixa observada para a maioria dos mamíferos estudados. A duração do ciclo do epitélio seminífero bem como da espermiogênese, da prófase meiótica e das demais fases da meiose da onça parda, foram muito próximas às observadas no gato doméstico (Godinho, 1999) e este fato aparentemente corrobora com a teoria da proximidade filogenética entre o gato doméstico e o puma (Hast 1989).

## Referências Bibliográficas

- Amann, R.P. , Schanbacher, B.D. (1983) Physiology of male reproduction. J. Anim. Sci. Suppl. 57 (2): 380-403.
- Berndtson, W.E. (1977) Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. J. Anim. Sci, 44(5): 818-83.
- Bundy, D. C. (1995) Fotografic emulsions and processing In: Autoradiography and correlative Imaging, Stumpf, W.E.; Solomon, H.F. Eds., Academic Press, San Diego, Cl, USA. pp: 49-57
- Castro, A. C. S., Berndtson,W. E., Cardoso, F. M. (1997) Cinética e quantificação da espermatogênese: bases morfológicas e suas aplicações em estudos da reprodução de mamíferos. Rev. Bras. Reprod. Anim. 21(1): 25-34
- Clermont, Y. (1972) Kinetics of spermatogenesis in mammals, seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. Physiol. Rev. 52(1): 198-236
- De Rooij, D. G. (1998) Stem cells in the testis. Int. J. Exp. Path. 79: 67-80.
- Fawcett, D. W., Neaves, W. B., Flores, M. N. (1973) Comparative observations on intertubular lymphatic and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. Biol. Reprod. 9: 500- 532.
- França, L. R., Cardoso, F. M. (1998) Duration of spermatogenesis and sperm transit time through the epididymis in the piau boar. Tiss. Cell. 30(5): 573-582.

- França, L. R., Becker-Silva, S. C., Chiarini-Garcia, H. (1999) The length of the cycle of seminiferous epithelium in goats (*Capra hircus*). *Tissue & Cell*, 31(3): 274-280.
- Godinho, C. L. (1999) Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*) sexualmente maduros. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais. 124p.
- Grocock, C. A. , Clark, J. R. (1976) Duration of spermatogenesis in the vole (*Microtus agrestis*) and the bank vole (*Cletherionomys glareolus*). *J. Reprod. Fertil.* 47: 133-135.
- Guerra, M.O. (1983) Comparação entre dois métodos de determinação da frequência relativa dos estádios do ciclo do epitélio seminífero, em dados da literatura. *Rev. Bras. Biol.*, 43(4): 385-394.
- Hast, M.H. (1989) The larynx of roaring and non-roaring cats. *J. Anat.* 163:117-121.
- Hess, R. A., Schaeffer, D. J., Eroschenko, V. P., Keen, J. E. (1990) Frequency of the seminiferous epithelium in the rat. *Biol. Reprod.* 43(3): 517-524
- Kitchener, A. (1991). *The natural history of the wild cats*. Christopher Helm, London
- Leblond, C.P., Clermont, Y. (1952) Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 55:548-584.
- Ortavant, R., Courot, M. Hochereau-De-Reviere, M.T. (1977) Spermatogenesis in domestic mammals. In: COLE, H.H., CUPPS, P.T. (eds). *Reproduction in domestic animals*. 3 ed. New York: Academic Press. Cap. 8, pp.203-227.

- Oud, J. L., De Rooij, D. G. 1977. Spermatogenesis in the chinese hamster. *Anat. Rec.* 187(1): 113-124.
- Paula, T.A.R. (1999) Avaliação Histológica e Funcional do Testículo de Capivaras Adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Belo Horizonte: UFMG, 84p. Tese (Doutorado em Morfologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.
- Queiroz, G. F., Nogueira, J. C. 1992. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium and quantitative histology of the testis of the south american white belly opossum (*Didelphis albiventris*), Marsupialia. *Reprod. Fertil.* 4: 213-222.
- Redford, K.H. , Eisenberg, J.F. 1992. *Mammals of the Neotropics, Vol. 2: the southern cone.* Univ. Chicago Press, Chicago.
- Russell, L. D., Ettlin, R. A., Sinha-Hikim, A. P., Clegg, E. D. (1990) *Histological and histopathological evaluation of the testis.* Cache River Press, Clearwater, Florida.
- Sharpe, R. M. (1994) Regulation of spermatogenesis. In. Knobil, E. & Neil, J. D. (eds) *The physiology of reproduction*, 2ed. Raven Press, N.Y. 1363-1434



## **6.0-O RENDIMENTO INTRÍNSECO DA ESPERMATOGÊNESE, O ÍNDICE DE CÉLULAS DE SERTOLI E A PRODUÇÃO ESPERMÁTICA DIÁRIA DA ONÇA PARDA (*Puma concolor*)**

### **Resumo**

O estudo do processo espermatogênico torna-se extremamente relevante, subsidiando com informações básicas o desenvolvimento e sedimentação de tecnologias em reprodução assistida. Embora a onça parda (*Puma concolor*) seja o segundo maior felino das Américas e apresente uma ampla distribuição latitudinal, muito pouco se sabe a respeito de sua morfofisiologia testicular, incluindo a sua espermatogênese. Neste trabalho estimou-se que na onça parda cerca de 7,7 espermátócitos primários são produzidos a partir de uma espermatogônia do tipo A. O rendimento meiótico foi em torno de 3,0 células, o que equivale a uma perda de 25% no processo meiótico; o rendimento geral da espermatogênese foi de 22,7 células. Cada célula de Sertoli é capaz de sustentar cerca de 12,5 células germinativas, das quais 7,3 são espermátides arredondadas. A onça parda, com aproximadamente vinte e seis milhões de espermatozóides produzidos por grama de testículo por dia, encontra-se classificada entre as espécies de alta eficiência espermatogênica.

**Palavras chave:** rendimento intrínseco da espermatogênese, índice de células de Sertoli, produção espermática diária, *Puma concolor*.

## Summary

The study of the spermatogenic process is extremely important, subsidizing with basic information the development and sedimentation of technologies in attended reproduction. Although the puma (*Puma concolor*) is the second biggest cat of Americas and present an ample latitudinal distribution, much little are known regarding its testicular morfofisiology, including its spermatogenesis. In this work it was estimated that in the puma about 7.7 primary spermatocytes are produced from a spermatogonia of the type A. To the meiotic yield was around 3.0 cells, what is equivalent to a loss of 25% in the meiotic process; the general yield of spermatogenesis was 22.7 cells. Each Sertoli cell is capable to support about 12.5 germinatives cells, of which 7.3 are rounded spermatides. The puma, with approximately twenty six million spermatozoa produced per gram of testicule per day, is classified in the highest spermatogenic efficiency species.

**Keywords:** intrinsic yield of spermatogenesis, Sertoli cell index, daily sperm production, *Puma concolor*

## Introdução

A onça parda ou suçuarana (*Puma concolor*) é o segundo maior felino do continente americano, podendo atingir mais de 100 Kg, perdendo apenas para a onça pintada (*Panthera onca*), embora os indivíduos de distribuição equatorial sejam menores que os de latitudes extremas (KITCHENER, 1991). Possui ampla distribuição latitudinal, abrangendo assim, os mais diversos habitats, ocorrendo desde o Canadá até o Chile, incluindo também o Brasil (REDFORD and EISENBERG, 1992). Quanto ao status de conservação é considerada uma espécie ameaçada de extinção, mas em algumas áreas de floresta atlântica, cerrado e caatinga já foram praticamente exterminadas.

A presença de predadores da ordem carnívora pode ser utilizada como indicadora da higidez de um ecossistema, por que ocupam o topo da cadeia alimentar, sendo co-responsáveis pelo equilíbrio das áreas onde ocorrem. Os felídeos, nas regiões neotropicais, são os principais representantes desta ordem.

A carência de informações sobre a morfofisiologia reprodutiva da onça parda (*Puma concolor*) e sua relativa abundância em cativeiro, tornam esta espécie um bom modelo experimental para a coleta de dados.

A eficiência do processo espermatogênico pode ser acuradamente avaliada através das razões obtidas a partir das populações celulares nos diferentes estádios do ciclo do epitélio seminífero. Esta prática permite a comparação entre diferentes espécies uma vez que reflete numericamente a produção entre as diferentes fases do processo espermatogênico. Estas razões ou índices celulares constituem o rendimento intrínseco da espermatogênese e referem-se ao coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais, rendimento meiótico e rendimento geral da espermatogênese. Além desse método de avaliação do processo espermatogênico a determinação da produção espermática diária por grama de testículo constitui num dos parâmetros mais efetivos e de fácil comparação entre as espécies, pois elimina a disparidade exercida pelo peso testicular e a duração da espermatogênese.

O número de células de Sertoli por testículo é o principal fator na determinação da produção espermática e no tamanho do testículo (FRANÇA et al., 1995). Tal assertiva 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 não aumenta após a puberdade (STEINBERGER & STEINBERGER, 1971; ORTH, 1982; ORTH et al., 1988; FRANÇA & RUSSELL, 1998). Desta forma, o número de células germinativas suportado por uma única célula de Sertoli (índice de células de Sertoli) é o melhor indicativo da eficiência funcional destas células (RUSSELL & PETERSON, 1984).

O estudo sobre a morfologia testicular e o processo espermatogênico são fundamentais para o estabelecimento dos padrões fisiológicos com os quais pode-se estabelecer protocolos para reprodução assistida. Estes padrões fornecem ainda subsídios para o conhecimento de uma gama de particularidades sobre a biologia reprodutiva das diferentes espécies (FAWCETT et al., 1973).

## Material e Métodos

Foram utilizadas nove onças pardas, machos adultos, procedentes de Zoológicos do Distrito Federal, Minas Gerais e São Paulo, por ocasião do manejo realizado pelos pesquisadores do Centro Nacional de Conservação de Felinos Neotropicais, Jundiaí-SP (CNCFN), o qual foi criado pela portaria 106 de 26 de dezembro de 1996, dando a esta ONG o direito de manejo em cativeiro e formação de um plantel próprio das seis espécies de pequenos felinos e das duas espécies de grandes felinos, todas ameaçadas de extinção.

Foram utilizadas nove onças pardas, machos adultos, oriundos de Zoológicos do Distrito Federal, Minas Gerais e São Paulo, por ocasião do manejo realizado pelos pesquisadores do Centro Nacional de Conservação de Felinos Neotropicais, Jundiaí-SP (CNCFN), com autorização do Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA).

Os animais foram contidos quimicamente, com a utilização de dardos anestésicos, e mantidos em anestesia geral com o uso de 10mg/kg de ketamina associada à 1mg/kg de xilazina. Todo o procedimento foi monitorado, aferindo-se temperatura, movimentos respiratórios e batimentos cardíacos em intervalos de dez minutos. Uma vez anestesiado o animal era pesado e eram coletados materiais biológicos (pêlo, pele, sangue e fezes) e dados biométricos corporais como protocolo do Centro Nacional de Conservação de Felinos Neotropicais. Os testículos foram mensurados percutaneamente quanto à largura, comprimento e espessura antes dos preparativos para o procedimento cirúrgico.

O procedimento cirúrgico de biópsia foi iniciado com a tricotomia do escroto e antissepsia local. Utilizou-se um punch de pele com 4 mm de diâmetro, para facilitar a introdução do “punch”, no parênquima testicular, uma pequena incisão na pele foi feita. Obteve-se um fragmento da região média do testículo direito ou esquerdo. Este fragmento foi cuidadosamente manipulado ao ser removido do punch e imediatamente imerso em solução de aldeído glutárico (Merck®) 4% em tampão fosfato 0,1M pH 7,4, por duas horas, sendo então armazenados sob refrigeração a 4°C, no mesmo tampão até o processamento. Foi suturada separadamente a albugínea testicular, a túnica fibrosa e a pele utilizando-se fio absorvível (Vicryl®). O animal recebeu antibioticoterapia profilática.

Para estudos em microscopia deluz os fragmentos foram desidratados em bateria de álcoois de concentrações crescentes (70<sup>0</sup>, 80<sup>0</sup>, 90<sup>0</sup> e 100<sup>0</sup>), infiltrados em solução de glicol metacrilato (Historesin, Leica Instruments) e incluídos, no mesmo meio por adição do catalisador (Dimetil sulfóxido). Cortes de quatro micrômetros (4  $\mu$ m) de espessura foram obtidos através micrótomo rotativo, dotado de navalha de vidro e corados com solução de Azul de Toluidina/ Borato de sódio a 1%.

As populações das células germinativas e células de Sertoli foram computadas em 10 secções transversais de túbulos, em cada um dos oito estádios do ciclo do epitélio seminífero. Devido às variações no diâmetro das diferentes células, foi necessário a correção numérica da população celular, assim, a contagem obtida para cada tipo celular foi corrigida a partir da fórmula de ABERCROMBIE (1946) modificada por AMANN & ALMQUIST (1962) que considera o diâmetro nuclear médio e a espessura do corte. Pelo fato da célula de Sertoli apresentar núcleo irregular, a correção da população da mesma foi feita a partir do diâmetro nucleolar médio.

O rendimento intrínseco da espermatogênese foi estimado com base nas razões encontradas entre os números celulares corrigidos obtidos por secção transversal de túbulo seminífero. Foram calculados: o coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais (razão entre o número de espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno e o número de espermatogônias do tipo A, no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero); o rendimento meiótico (razão entre o número de espermátides arredondadas no estágio 5 e o número de espermatócitos primários em diplóteno, no estágio 3 do ciclo do epitélio seminífero); e o rendimento geral da espermatogênese (razão entre o número de espermátides arredondadas e o número de espermatogônias do tipo A, no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero).

Com o objetivo de se investigar a capacidade de suporte das células de Sertoli, foram estimadas as razões entre a população das células germinativas e a população de células de Sertoli, observadas no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero.

A produção espermática diária, foi calculada a partir da fórmula: PED= população de espermátides arredondadas por secção de túbulo seminífero no estágio 1 x comprimento total de túbulos seminíferos (Item 4.0) / espessura do corte histológico x duração do ciclo do epitélio seminífero, (calculado em 9,96 dias, através do uso de timidina triciada como

marcador celular; (Item 5.0)). A partir do peso do testículo foi calculada a produção espermática diária por grama.

## **Resultados e Discussão**

A eficiência do processo espermatogênico pode ser acuradamente avaliada através das razões obtidas a partir das populações celulares nos diferentes estádios do ciclo do epitélio seminífero. Esta prática permite a comparação entre diferentes espécies uma vez que reflete numericamente a produção entre as diferentes fases do processo espermatogênico. Estas razões ou índices celulares referem-se ao coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais, ao rendimento meiótico e ao rendimento geral da espermatogênese.

O coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais é uma quantificação das perdas ou degenerações ocorridas durante a fase espermatogonial. Estas degenerações celulares referem-se a apoptoses, densidade dependentes, que visam a adequação da população de células germinativas à capacidade de suporte das células de Sertoli (DE ROOIJ & LOK, 1987; SHARPE, 1994). O coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais é a razão entre a população de espermatócitos primários em Pré-leptóteno/leptóteno e a população de espermatogônias do tipo A no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero. Na onça parda cerca de 7,7 espermatócitos primários são produzidos a partir de uma espermatogônia do tipo A (Tabela 1), valor este muito próximo ao observado para o gato doméstico (8,4) (GODINHO, 1999), porém muito abaixo da amplitude observada deste coeficiente para a maioria dos animais domésticos (14,6 a 24, 8, FRANÇA & RUSSELL, 1998).

Nem todo espermatócito que entra em meiose completa seu desenvolvimento em espermátide e é liberado como espermatozóide. Alguma degeneração ocorre durante a meiose ou raramente durante a espermiogênese, sendo que o período mais crítico para que isto ocorra é a metáfase, no fim da meiose, a degeneração durante a metáfase é um fator comum à maioria dos mamíferos (ROOSEN-RUNGE, 1973). O rendimento meiótico

refere-se à eficiência das divisões meióticas durante o processo espermatogênico. Embora teoricamente 4 espermátides possam ser produzidas a partir de um espermatócito primário, uma perda de 5 a 30% é observada ao final da meiose nos animais domésticos (FRANÇA & RUSSELL, 1998). A onça parda apresentou um rendimento meiótico de 3,0( ±1,3) células (Tabela1), o que equivale a uma perda de 25% no processo meiótico, muito próximo ao observado para o gato doméstico (2,8) (GODINHO, 1999).

Tabela 1- Rendimento intrínseco da espermatogênese e índices de células de Sertoli em onça parda adulta.

Parâmetros	Média±desvio padrão
Coefficiente de mitoses espermatogoniais	7,7 ± 1,6
Rendimento meiótico	3,0 ± 1,3
Rendimento geral da espermatogênese	22,7 ± 3,1
Índice de células de Sertoli por total de células germinativas	12,5 ± 1,2
Índice de células de Sertoli por espermátides arredondadas	7,3 ± 0,7
Produção espermática diária por grama de testículo	26,8x 10 <sup>6</sup> ± 5,3x 10 <sup>6</sup>

O rendimento geral da espermatogênese avalia a eficiência do processo espermatogênico como um todo, utilizando para isto a razão entre a população de espermátides arredondadas e de espermatogônias no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero, uma vez que durante a fase espermiogênica (transição espermátide-espermatozóide) a perda celular é insignificante (RUSSELL & CLERMONT, 1977). A onça parda apresentou um rendimento geral da espermatogênese de 22,7 células, muito baixo em relação à maioria dos animais domésticos (FRANÇA & RUSSELL, 1998) e animais de laboratório (FRANÇA et al., 1999), mas acima do observado para o gato doméstico (16,3; GODINHO, 1999). No entanto em todos os mamíferos investigados somente cerca de 15% a 30% dos espermatozóides teoricamente esperados são produzidos (HUCKINS, 1978; FRANÇA & RUSSELL, 1998; SWERDLOFF et al., 1998), ou seja, as perdas celulares são um componente inerente ao processo espermatogênico.

A célula de Sertoli ocupa um papel fundamental na morfofisiologia da espermatogênese e suas funções incluem desde a sustentação física das células germinativas, até a produção de inúmeros fatores parácrinos/autócrinos que modulam a produção espermática. Assim, o número de células de Sertoli por testículo é o principal fator na determinação da produção espermática e no tamanho do testículo (FRANÇA et al., 1995). Tal assertiva 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 não aumenta após a puberdade (STEINBERGER & STEINBERGER, 1971; ORTH, 1982; ORTH et al., 1988; FRANÇA & RUSSELL, 1998). Desta forma, o índice de células de Sertoli, razão entre a população de células germinativas e de células de Sertoli, é o melhor indicativo da eficiência funcional destas células para uma dada espécie (RUSSELL & PETERSON, 1984). Cada célula de Sertoli em onças pardas é capaz de sustentar cerca de 12,5 células germinativas das quais 7,3 são espermátides arredondadas (Tabela 1). Este último valor aproxima-se dos valores mais baixos encontrados para este parâmetro nas espécies domésticas, porém acima do observado para o gato doméstico (GODINHO, 1999).

A produção espermática diária por grama de testículo é o parâmetro mais efetivo e de fácil comparação entre as espécies, pois elimina a disparidade exercida pelo peso testicular e a duração da espermatogênese. A alta eficiência espermatogênica observada em alguns mamíferos deve-se principalmente à curta duração da espermatogênese, ao alto número de células de Sertoli por grama de parênquima testicular e alta capacidade de suporte das células de Sertoli, a alta densidade volumétrica (%) de túbulos seminíferos no testículo, ao grande número de gerações de espermatogônias e a baixa perda celular durante o processo espermatogênico (FRANÇA & RUSSELL, 1998).

A análise da literatura permite agrupar a produção espermática diária por grama de testículo em três patamares: espécies com alta eficiência espermatogênica e que produzem cerca de vinte a trinta milhões de espermatozoides, incluindo-se aí animais domésticos como o suíno, equino, ovino e o coelho (FRANÇA & RUSSELL, 1998), o rato (ROBB et al., 1978) e o macaco rhesus (AMANN et al., 1976); espécies com eficiência espermatogênica média, produzindo de dez a vinte milhões de espermatozoides, dentre as quais se encontram o bovino e o búfalo (FRANÇA & RUSSELL, 1998), o gato doméstico (GODINHO, 1999) e a capivara (PAULA, 1999); e por último, espécies que produzem



abaixo de dez milhões de espermatozoides como por exemplo o homem (AMANN, 1981) e o gambá (*Didelphis albiventris*) (QUEIROZ & NOGUEIRA, 1992). Conforme pode ser observado, a onça parda, com produção diária de aproximadamente vinte e seis milhões de espermatozoides por grama de testículo (Tabela 1), encontra-se entre as espécies de alta eficiência espermatogênica.

### **Referências Bibliográficas**

ABERCROMBIE, M. Estimation of nuclear populations from microtome sections. *Anat. Rec.*, v.94, p.238-248, 1946

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, p.774-781, 1962

AMANN, R.P., JOHNSON, L., THOMPSON Jr, D.L. et al, Daily spermatozoal production, epidymal spermatozoal reserves and transit time of spermatozoa through the epididymis of the Rhesus monkey. *Biol. Reprod.*, n.15, p.586-592, 1976

AMANN, R.P. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. *J. Androl.*, v.2, p.37-58, 1981

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

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

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

FRANÇA, L.R., YE, S-J., YING, L. et al, Morphometry of rat germ cells during spermatogenesis. Anat. Rec., v.241, p.181-204, 1995

FRANÇA, L. R., BECKER-SILVA, S. C., CHIARINI-GARCIA, H. The length of the cycle of seminiferous epithelium in goats (*Capra hircus*). Tissue & Cell, 31(3): 274-280, 1999

GODINHO, C. L. Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*) sexualmente maduros. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 1999. 124p. Dissertação (Mestrado em Morfologia)

HUCKINS, C. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. Anat. Rec., v.190, n.4, p.905-926, 1978

KITCHENER, A. The natural history of the wild cats. Christopher Helm, London 1991

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 number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. Endocrinology. v.122, p.787-794, 1988

REDFORD, K.H. , EISENBERG, J.F. Mammals of the Neotropics, Vol. 2: the southern cone. Univ. Chicago Press, Chicago, 1992.

PAULA, T.A.R. Avaliação Histológica e Funcional do Testículo de Capivaras Adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 1999. 84p. Tese (Doutorado em Morfologia)

QUEIROZ, G.F., NOGUEIRA, J.C. Duration of the cycle of the seminiferous eepithelium and quantitative histology of the testis of the south american white belly opossum (*Didelphis albiventris*), Marsupialia. *Reprod. Fertil.*, v.4, p.213-222, 1992

ROBB, G.E., AMANN, R.P., KILLIAN, G.J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats. *J. Reprod. Fertil.*, v.54, p.103-107, 1978

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

RUSSELL, L. D., CLERMONT, Y. Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats. *Anat. Rec.*, v.187, p.347-366, 1977

RUSSELL, L. D., PETERSON, R. N. Determination of the alongate spermatid-Sertoli cell ratio in various mammals. *J. Reprod. Fert.*, v.70, p. 635-641, 1984

SHARPE, R. M. Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL, E., NEIL, J. D. (eds) *The physiology of reproduction*, 2ed. Raven Press, N.Y., 1994, p. 1363-1434

STEINBERGER, A., STEINBERGER, E. Replication pattern of Sertoli cells in maturing rat testis in vivo and in organ culture. *Biol. Reprod.*, v.4, p.84-87, 1971.

SWERDLOFF, R.S., LUE, Y., WANG, C. et al, Hormonal regulation of germ cell apoptosis. In: ZIRKIN, B.R. (ed.) *Germ cell development, division, disruption and death*. Springer-Veerlag, New York. Inc., 1998

## CONCLUSÕES GERAIS

Com base nos dados obtidos é possível concluir que, para a onça parda adulta:

1. O índice gonadossomático foi 0,03%.
2. O volume médio de túbulos seminíferos por testículo foi de 5,2 ml, o que representou cerca de 78% do parênquima testicular.
3. Em relação à massa corporal, cerca de 0,02% desta é alocada em túbulos seminíferos, ou seja, o índice tubulossomático.
4. A onça parda adulta apresenta cerca de 18m de túbulos seminíferos por grama de testículo.
5. O compartimento intertubular representa cerca de 22% do parênquima testicular, o que equivale à cerca de 1,5 ml por testículo.
6. As células de Leydig isoladamente correspondem a 8% do parênquima testicular, sendo o índice leydigossomático 0,002%.
7. O espaço intertubular foi caracterizado como sendo do tipo II segundo a classificação de Fawcett et al, (1973).
8. O diâmetro e a altura do epitélio seminífero foram em média 227,37 $\mu$ m e 67,78 $\mu$ m respectivamente.
9. A duração total do ciclo do epitélio seminífero da onça parda foi calculada em 9,96 dias, sendo cerca de 44,8 dias despendidos na produção de espermatozóides a

partir de uma espermatogônia. A duração da espermiogênese, prófase e demais eventos da meiose foram respectivamente 14,08; 15,2 e 1,79 dias.

10. Quanto ao rendimento intrínseco da espermatogênese estimou-se que o rendimento meiótico foi em torno de 3,0 células, o que equivale a uma perda de 25% no processo meiótico; cerca de 7,7 espermatócitos primários são produzidos a partir de uma espermatogônia do tipo A e o rendimento geral da espermatogênese foi de 22,7 células.
11. Cada célula de Sertoli é capaz de sustentar 12,5 células germinativas, das quais 7,3 são espermátides arredondadas.
12. A onça parda produz ao dia por grama de testículo cerca de vinte e seis milhões de espermatozoides, sendo classificada dentre as espécies de alta eficiência espermatogênica.