

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

**ESTUDO COMPARATIVO DA FUNÇÃO TESTICULAR E EFICIÊNCIA  
ESPERMATOGÊNICA EM TRÊS DIFERENTES ESPÉCIES DE MAMÍFEROS  
SILVESTRES COM POTENCIAL INTERESSE ECONÔMICO.**

MESTRANDO: Guilherme Mattos Jardim Costa  
ORIENTADOR: Luiz Renato de França

BELO HORIZONTE  
2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

GUILHERME MATTOS JARDIM COSTA

**ESTUDO COMPARATIVO DA FUNÇÃO TESTICULAR E EFICIÊNCIA  
ESPERMATOGÊNICA EM TRÊS DIFERENTES ESPÉCIES DE MAMÍFEROS  
SILVESTRES COM POTENCIAL INTERESSE ECONÔMICO.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Biologia Celular.

Área de concentração: Biologia Celular  
Orientador: Prof. Dr. Luiz Renato de França.

BELO HORIZONTE

2009

## AGRADECIMENTOS:

Ao professor Dr. Luiz Renato de França pela amizade, competente orientação, dedicação e preciosos ensinamentos;

À minha família, em especial aos meus pais, Elcio Wanderley Costa e Tereza Maura Mattos Jardim Costa, e meus irmãos Alexandre e Luciano, pelo amor incondicional e incentivo constante.

À Samyra Nassif, companheira nas diversas corridas da vida, pelo apoio, carinho e incentivo;

À professora Tânia Mara Segatelli e ao Francisco Bernardo Arreguy de Oliveira pelas amizades e aconselhamentos;

Ao Marcelo de Castro Leal pela grande ajuda durante a execução do trabalho;

À todos os amigos do Laboratório de Biologia Celular e da Veterinária, pelos constantes momentos de alegria e aprendizado;

Aos demais colegas do curso de pós-graduação em Biologia Celular;

Ao Adriano, Mara e Rachel, técnicos do Laboratório de Biologia Celular;

À secretaria do curso de Pós-Graduação, Sibele das Graças Abreu.

Às fundações CNPq e FAPEMIG;

Ao corpo administrativo do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular;

A todos os professores e colegas do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular;

Meus sinceros agradecimentos.

Esta dissertação foi realizada no Laboratório de Biologia Celular do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação do Prof. Luiz Renato de França e com o auxílio das seguintes instituições:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG)

*“Temos uma tendência de focar virtualmente toda a nossa atenção e nossos recursos num total de 15 espécies, acreditando e supondo erroneamente que os mecanismos reprodutivos são razoavelmente uniformes para todas elas”*  
(Wildt, 2005).

## RESUMO

No presente trabalho foram investigadas três importantes espécies de mamíferos da fauna brasileira: o cateto (*Tayassu tajacu*), que é encontrado amplamente pelas Américas e que apresenta um alto potencial para domesticação e exploração comercial; a cutia (*Dasyprocta leporina*) e a paca (*Agouti pacá*), que estão entre as maiores espécies de roedores neotropicais, pertencentes à subordem *Hystrichomorpha*, e que também apresentam um alto potencial econômico. Como previamente estabelecido, o conhecimento da fisiologia e biologia reprodutiva, principalmente dos aspectos ligados à espermatogênese, é crucial para prevenir a extinção das espécies, melhorar o manejo das mesmas, e utilizar os melhores machos em programas de reprodução natural ou artificial. Contudo, a literatura disponível relacionada à biologia reprodutiva e a função testicular das três espécies selvagens em estudo ainda é muito escassa. Desta maneira, os objetivos do presente estudo foram obter dados que potencialmente podem ser utilizados em programas de melhoramento reprodutivo e animal. Além disto, este estudo fornecerá importantes informações que poderão ser utilizadas para estudos em biologia reprodutiva comparada envolvendo outras espécies de mamíferos já investigadas. Seis pacas, oito cutias e doze catetos foram utilizados. Estes animais foram obtidos da Universidade Federal do Pará e da EMBRAPA/PA. Os fragmentos testiculares foram fixados em glutaraldeído a 4%, incluídos em glicol-metacrilato, e rotineiramente processados para realização de análises estereológicas e histológicas, visando-se investigar a estrutura testicular, a eficiência da célula de Sertoli, eficiência espermatogênica e a duração da espermatogênese. A última foi realizada através da injeção de timidina triciada e investigação das freqüências dos diferentes estádios do ciclo do epitélio seminífero, caracterizado de acordo com o sistema da morfologia tubular.

Os resultados encontrados para catetos demonstraram que o peso testicular e o índice gonadossomático foram  $23,7 \pm 1,8$  gramas e  $0,2 \pm 0,1\%$ , respectivamente. A proporção volumétrica de túbulos seminíferos foi de  $77,4 \pm 1,7\%$ . As células de Leydig ocuparam  $12,8 \pm 1,8\%$  do parênquima testicular e apresentaram uma citoarquitetura peculiar na periferia dos lóbulos dos túbulos seminíferos. As freqüências das fases pre-meióticas, meiótica, e pós-meióticas foram muito similares aos valores encontrados para o javali e o porco doméstico. O ciclo espermatogênico e todo o processo espermatogênico (baseado em 4,5 ciclos) duraram aproximadamente  $12,3 \pm 0,2$  e  $55,1 \pm 0,7$  dias, respectivamente. A produção espermática diária por grama de testículo foi de aproximadamente  $23,4 \pm 2 \times 106$ , valor que é similar ao encontrado para o javali e o porco doméstico.

Em relação aos dados obtidos para cutias e pacas, cada ciclo espermatogênico durou  $9,5 \pm 0,03$  e  $11,5 \pm 0,16$  dias, respectivamente, enquanto a duração total da espermatogênese para estas duas espécies foi de  $42,8 \pm 0,16$  e  $51,6 \pm 0,7$  dias. A maioria dos parâmetros espermatogênicos investigados para cutias e pacas no presente estudo foram similares aos dados obtidos para os outros membros da subordem *hystrichomorpha*, incluindo as freqüências das fases pré-meióticas, meiótica e pós-meiótica, que são consideradas filogeneticamente determinadas. Como resultado da combinação de altos valores da proporção volumétrica para túbulos seminíferos, número de células de Sertoli por grama

de testículo, eficiência da célula de Sertoli e uma duração relativamente curta da espermatogênese, as eficiências espermatogênicas encontradas em cutias ( $52 \pm 2 \times 10^6$ ) e em pacas ( $39 \pm 2 \times 10^6$ ) foram particularmente altas quando comparadas com outras espécies de mamíferos já investigadas.

Em conclusão, é esperado que os dados obtidos, no presente trabalho, para as três espécies de mamíferos selvagens possam ser úteis em estudos relacionados a programas de conservação, reprodução/produção e melhoramento animal, fornecendo também importantes informações que podem ser utilizadas em estudos sobre a biologia reprodutiva comparada com outras espécies de mamíferos previamente investigadas.

## ABSTRACT

In the present work we have investigated three important mammalian species from the Brazilian fauna: the collared peccary (*Tayassu tajacu*) that is found throughout the Americas, with a high potential for domestication and commercial exploitation; and the agouti (*Dasyprocta leporina*) and paca (*Agouti paca*), which are among the largest Neotropical rodent species alive, belonging to the Hystrichomorpha suborder, and that present high economic potential. As it is already established, the knowledge of reproductive biology and physiology, mainly those aspects related to spermatogenesis, is critical for preventing species from extinction, improving species management, and utilizing males in natural and artificial reproductive programs. However, the literature available related to the reproductive biology and testicular function for these three wild species is still scarce. Therefore, the objectives of the present study were to obtain data that potentially could be utilized in reproductive and animal improvement programs. Besides that, this study will provide important information that can be used for comparative reproductive biology with others mammalian species already investigated. Six pacas, eight agoutis, and twelve adult peccaries were utilized. These animals were obtained from the Federal University of Pará and EMBRAPA/PA. The testes fragments were fixed in 4% buffered glutaraldehyde, embedded in glycol methacrylate, and routinely processed for stereological and histological analyses, aiming to investigate testis structure, Sertoli cell efficiency, spermatogenic efficiency, and the duration of spermatogenesis. The latter was accomplished by injecting tritiated thymidine and investigating the frequencies of the different stages of the seminiferous epithelium cycle, characterized according to the tubular morphology system.

The results found for peccaries showed that the testis weight and gonadosomatic index were  $23.7 \pm 1.8$  grams and  $0.2 \pm 0.1\%$ , respectively. Seminiferous tubule volume density was  $77.4 \pm 1.7\%$ . Leydig cells occupied  $12.8 \pm 1.8\%$  of the testis parenchyma and presented a peculiar cytoarchitecture in the periphery of the seminiferous tubule lobes. The premeiotic, meiotic and postmeiotic phase frequencies were very similar to those found for wild and domestic boars. The spermatogenic cycle and entire spermatogenic process (based on 4.5 cycles) lasted approximately  $12.3 \pm 0.2$  and  $55.1 \pm 0.7$  days, respectively. Daily sperm production per gram of testis in the collared peccary was approximately  $23.4 \pm 2 \times 10^6$ , which is similar to that of domestic and wild boars.

In relation to the data obtained for agoutis and pacas each spermatogenic cycle lasted  $9.5 \pm 0.03$  and  $11.5 \pm 0.16$  days, respectively, whereas the total duration of spermatogenesis for these two species were  $42.8 \pm 0.16$  and  $51.6 \pm 0.7$  days. Most of the parameters investigated in the present study for agoutis and pacas were similar to those obtained for the other members from the hystrochomorpha suborder, including the premeiotic, meiotic and postmeiotic stage frequencies, that are considered to be phylogenetically determined. As a result of the combination of high values of seminiferous tubule volume density, number of Sertoli cells per testis gram, Sertoli cell efficiency and a relatively short duration of spermatogenesis, the spermatogenic

efficiencies found in agoutis ( $52 \pm 2 \times 10^6$ ) and pacas ( $39 \pm 2 \times 10^6$ ) were particularly high when compared to the mammalian species already investigated.

In conclusion, we expect that the data obtained in the present work for the three mammalian wild species investigated could be useful in studies related to animal reproduction/production and improvement and conservational programs, providing also important information that may be used for comparative reproductive biology with previously investigated mammalian species.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA -----</b>	<b>1</b>
1.1 Cateto ( <i>Tayassu tajacu</i> ) -----	2
1.2 Cutia ( <i>Dasyprocta sp</i> ) -----	3
1.3 Paca ( <i>Agouti paca</i> ) -----	4
1.4 Posição testicular em mamíferos -----	5
1.5 Forma e estrutura do testículo em mamíferos -----	8
1.6 Espermatogênese em mamíferos -----	10
1.7 Células de Sertoli -----	13
1.8 Células de Leydig -----	14
1.9 Duração da espermatogênese -----	14
2.0 Quantificação da espermatogênese -----	15
<b>2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS -----</b>	<b>18</b>
2.1 Justificativa -----	19
2.2 Objetivo geral -----	19
2.3 Objetivos específicos -----	19
<b>3. ARTIGOS -----</b>	<b>20</b>
<b>3.1 Artigo 1.</b> Spermatogenic cycle and sperm production in a feral pig species (collared peccary, <i>Tayassu tajacu</i> ). -----	<b>21</b>
<b>3.2 Artigo 2.</b> Duration of spermatogenesis and spermatogenic efficiency in two large Neotropical rodent species: the agouti ( <i>Dasyprocta leporina</i> ) and paca ( <i>Agouti paca</i> ). -----	<b>49</b>
<b>4. DISCUSSÃO -----</b>	<b>83</b>
<b>5. PERSPECTIVAS -----</b>	<b>90</b>
<b>6. CONCLUSÕES -----</b>	<b>93</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----</b>	<b>95</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1 – INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

### 1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil conta com número variado e complexo de recursos naturais de grande potencial econômico que necessitam ainda de ser investigados tanto do ponto de vista básico quanto aplicado. No que concerne à fauna, poucas espécies selvagens têm sido investigadas, principalmente nos aspectos relacionados com a proteção, conservação e aproveitamento econômico das mesmas. Por exemplo, na região Amazônica são várias as espécies silvestres que fazem parte dos hábitos alimentares de populações rurais, dentre elas podem ser mencionadas a paca (*Agouti paca*), a cutia (*Dasyprocta leporina*) e o cateto (*Tayassu tajacu*) (Curtis & Saavedra, 1991; Baía Junior, 2006; Guimarães et al., 2008). No entanto, é necessário o manejo adequado destas espécies, para que represente nesta região uma fonte de consumo protéico permanente. Uma das formas de se contornar a questão do estoque populacional, e ao mesmo tempo contemplar a demanda sócio-econômica natural, é a criação e exploração de animais selvagens com potencial zootécnico, tanto com objetivo comercial quanto para conservação dos mesmos (Hosken, 1999; Guimarães et al., 2005; Guimarães et al., 2008; Mayor et al., 2007). No intuito de regulamentar a criação e exploração comercial de animais silvestres, o IBAMA, através da Instrução Normativa número 169 (IN169 - IBAMA, 2008), dita que apenas o cateto, a queixada, a capivara, a cutia e a paca podem ser criados, comercializados e abatidos. A criação em cativeiro de espécies silvestres pode, também, representar uma forma de aumentar a produtividade de áreas rurais consideradas marginais (Nogueira-Filho, 1997; Baía Junior & Guimarães, 2006), possibilitando ainda a não introdução de outras espécies de mamíferos exóticos com objetivos comerciais e que potencialmente poderiam causar danos ecológicos. Desta forma, para que sejam formados sistemas de criação eficientes e produtivos, vários parâmetros básicos sobre a biologia destas espécies devem ser conhecidos. Dentre eles, seguramente, um dos mais importantes seria o conhecimento detalhado sobre a biologia reprodutiva destas espécies. Segue abaixo uma breve caracterização das três espécies investigadas no presente estudo, que são o cateto, a cutia e a paca.

#### 1.1. CATETO (*Tayassu tajacu*)

Embora os pecarídeos e os porcos apresentem aparente semelhança, sua classificação e distribuição geográfica são diferentes (Adega et al., 2008). Os pecarídeos pertencem à família dos mamíferos *Tayassuidae* (3 espécies) e são nativos do Novo Mundo, enquanto os porcos pertencem à família *Suidae* (16 espécies) e são nativos do Velho Mundo (Bosma et al., 2004). O cateto ou catitu (*Tayassu tajacu*; ver Figura 1 abaixo) é uma das duas espécies de pecarídeos mais difundidas, sendo a outra espécie a queixada (*Tayassu pecari*) (Keuroghlian et al., 2004).



Figura 1. Exemplar de *Tayassu tajacu*. Fonte: <http://www.vivaterra.org.br/cateto>

O cateto possui pelagem cinza escuro e caracteriza-se pela presença de uma faixa de pêlos brancos ao redor do pescoço. O comprimento corporal varia de 75 a 100 cm e o peso corporal de 14 a 30 kg. (Sonner et al., 2004). As matrizes de cateto podem começar a se reproduzir a partir dos 8-10 meses de idade. O período de gestação dura aproximadamente 145 dias com 70% das fêmeas apresentando dois partos por ano, e cada ninhada geralmente é composta por dois filhotes (Mayor et al., 2007). Infelizmente, o cateto está entre os animais selvagens mais caçados na América Latina (Redford & Robinson, 1991), principalmente pelo fato de sua carne servir de fonte protéica para populações de baixa renda (Bodmer et al., 1997). Uma das formas de se tentar diminuir a caça predatória seria conservar as populações naturais de cateto, através do manejo sustentável e criação em cativeiro desta espécie (Sowls, 1984), o que já vem sendo realizado com sucesso em algumas propriedades rurais. Outro fator de interesse comercial dos catetos está relacionado com a qualidade de sua carne, visto que o seu sabor é bastante apreciado e possui um baixo conteúdo de colesterol (Lopes, 2007). Além da carne, existe grande interesse em seu couro, para o qual há uma grande demanda no mercado internacional. Os principais países importadores do couro de cateto são a Itália, a Alemanha e a França. Nestes países, ele é industrializado na forma de artigos de luxo como calçados finos, luvas, casacos, carteiras e cintos, que por sua vez são exportados principalmente para os EUA e Japão (Sowls, 1997). A biologia reprodutiva dos catetos tem sido muito pouco estudada, os dados disponíveis na literatura relacionados com a histologia e a fisiologia testicular nesta espécie são raros (Andréa et al., 2001; Sonner et al., 2004; Filgueira et al., 2005; Souza, 2008; Batha, 2009) e pouco esclarecedores. Desta forma, como será descrito adiante, o presente trabalho teve como um dos seus objetivos principais investigar detalhadamente a função testicular em catetos, empregando-se material preparado com técnicas morfológicas que permitem análises bastante precisas.

## 1.2. CUTIA (*Dasyprocta* sp.)

As cutias pertencem à família *Dasyproctidae* e ao gênero *Dasyprocta*, que comprehende doze espécies e 33 subespécies (Moreira & MacDonald, 1997). Possuem ampla variabilidade geográfica distribuindo-se desde o sul do México até o norte da

Argentina. As mesmas estão presentes em diversos habitats, como floresta de terra firme, várzea, mata ciliar, savana úmida, savana arbustiva, florestas secundárias e em áreas cultivadas (Moreira & MacDonald, 1997). A cutia (ver Figura 2 abaixo) é um animal exclusivamente terrestre alimentando-se principalmente de folhas, raízes e frutos.



Figura 2. Exemplar de *Dasyprocta sp.* Fonte: <http://www.vivaterra.org.br/cutia>

Esta espécie pode ser domesticada facilmente e sua carne possui alto valor econômico e nutricional, sendo rica em proteínas (27,7%), com baixo teor de lipídeos (2,4%), carboidratos (1,6%), fibras (0,3%) e resíduos (2,9%) (Roman, 1997). Dentre as várias espécies de cutia, o tamanho (41,5 a 62 cm) e o peso corporal (1,3 a 4 kg) são bastante variáveis. O período de gestação é em média 104 dias e a duração média de seu ciclo estral é em torno de 32 dias. Sabe-se que em cativeiro a cutia se reproduz o ano inteiro. A mesma apresenta reprodução do tipo poliestral contínua, sendo, portanto, um animal de fácil adaptação ao cativeiro (Guimarães, 1997). A puberdade da fêmea ocorre em média aos 9 meses de idade (Ferreira, 2004). Nos machos, a puberdade é alcançada por volta dos 8-9 meses e a maturidade sexual entre o 16º e 17º mês de idade (Ferreira, 2004). No nosso conhecimento, a literatura sobre a biologia da reprodução de cutias machos é ainda muito incipiente (Ferreira, 2004; Assis-Neto, 2003a; Assis-Neto, 2003b; Menezes et al., 2003).

### **1.3. PACA (*Agouti paca*)**

A paca (*Agouti paca*; ver Figura 3 abaixo) pertence à família *Agoutidae* e ao gênero *Agouti*. A mesma é um dos maiores roedores nativos dos bosques da América Tropical, perdendo em tamanho apenas para a capivara (Matamoros, 1982) e se distribui desde o Sul do México até o Paraguai (Mondolfi, 1972).



Figura 3. Exemplar de *Agouti pacá*. Fonte: <http://www.vivaterra.org.br/paca>

Este roedor, de pelagem curta e castanha, com faixas claras e irregulares na porção lateral do corpo, possui um corpo alongado com patas curtas e unhas muito afiadas propícias para cavar as tocas (Oliveira, 2002). Esta espécie vive em torno de 10 a 15 anos na natureza e cerca de vinte anos quando em cativeiro (Oliveira et al., 2007). Os animais adultos de ambos os sexos pesam entre 7 a 10 kg. Em condições naturais, estes animais são de natureza agressiva e solitária, territorial e socialmente intolerante, de hábito noturno e se reproduzem durante todo o ano, apesar de possuírem baixo índice reprodutivo (Oliveira et al., 2007). Já em cativeiro, as pacas podem mudar de seu comportamento agressivo e anti-social para animais sociáveis e de fácil manejo, após somente uma geração, vivendo, inclusive, em grupos de qualquer tamanho e composição sexual (Oliveira et al., 2007). Ao que parece, a paca atinge a maturidade sexual em torno de 10 meses de idade e seu período de gestação é de aproximadamente 115 dias, ao término do qual nasce normalmente um filhote (Oliveira et al., 2007; Guimarães et al., 2008) e raramente dois ou mesmo três filhotes são observados (Lange, 1998). Porém, a fêmea possui dois pares de glândulas mamárias demonstrando este caráter que mais filhotes podem ser procriados (Smythe, 1995). A espécie é apreciada pelo sabor considerado excelente de sua carne e possui potencial relativamente alto para ser domesticado e explorado economicamente (Smythe, 1987), fornecendo ainda couro de boa qualidade. Tais características fazem da paca uma das espécies mais caçadas na América Latina (Stradiotti, 2006). Segundo a União Internacional para a Conservação da Natureza (International Union for Conservation of Nature – IUCN, 2009), a paca encontra-se com baixo risco de extinção, embora essa situação não seja estável. Apesar da paca ser potencialmente viável do ponto de vista econômico, existem poucos trabalhos publicados à respeito de sua biologia reprodutiva, os quais, geralmente, fazem abordagem superficial dos aspectos relacionados com a morfologia do sistema genital e com o processo espermatogênico (Matamoros, 1981; Pashov & Matamoros, 1984; Urena et al., 1988; Carretta Júnior, 2008). Também em relação ao estudo das características físicas e morfológicas do sêmen de paca, os resultados podem ser considerados ainda preliminares (Machado & Ohashi, 1996).

#### **1.4. POSIÇÃO TESTICULAR EM MAMÍFEROS**

Embora na maioria dos mamíferos, os testículos localizem-se dentro do escroto, em algumas espécies os testículos estão permanentemente ou mesmo transitoriamente localizados na cavidade abdominal (Setchell & Breed, 2006). As espécies nas quais o

descenso testicular foi completo durante a vida fetal passam a apresentar os testículos dentro do escroto, tornando-se os mesmos pendulosos (Ex. primatas e artiodáctilos). Já as espécies que possuem os testículos situados dentro da cavidade abdominal, os mesmos podem estar localizados em diferentes regiões. Por exemplo, em baleias, tatus e tamanduás, os testículos se localizam próximos da bexiga e da parede abdominal dorsal. Já em morcegos, ouriços e focas, os testículos se localizam próximo aos rins e da parede abdominal ventral. Enquanto em mussaranhos e topeiras os testículos estão localizados numa evaginação que é denominada de saco cremastérico situado na região posterior da cavidade abdominal (Setchell & Breed, 2006).

O significado biológico da evolução do escroto é ainda uma das áreas que despertam intenso debate (Setchell & Breed, 2006). Alguns grupos de pesquisa postulavam que a migração testicular para o escroto ocorria para diminuir a temperatura na cauda do epidídimo, permitindo assim o armazenamento dos espermatozóides (Wenderlin & Nilsonne, 1999). Por outro lado, outros grupos também demonstraram que a espermatogênese ficava interrompida nas fases meióticas e espermiogênicas quando se aumentava a temperatura escrotal para valores similares à temperatura corporal. Desta forma, foi concluído que a passagem do testículo para o escroto representava uma adaptação secundária à necessidade metabólica das citadas fases espermatogênicas (Bedford et al., 1982). Também já foi proposto que o descenso testicular prevenia uma alta taxa de mutação que poderia ocorrer nas células germinativas (Short, 1997). No entanto, uma vez que em várias espécies de mamíferos os testículos permanecem dentro da cavidade abdominal, ao que parece a necessidade funcional para que ocorra o descenso testicular continua ainda em aberto e mais estudos são necessários para que este importante aspecto da biologia da reprodução nos machos seja esclarecido.

O descenso testicular pode ser dividido em três fases: translocação abdominal, migração transinguinal e migração inguinoescrotal (Amann & Veeramachaneni, 2007). As duas primeiras fases ocorrem durante a vida fetal. Enquanto a última fase ocorre após o nascimento em alguns roedores e no cão doméstico e, durante a vida fetal, em humanos, suínos, bovinos e carneiros (Setchell & Breed, 2006). Em roedores, é observado que o canal inguinal não regredie, permitindo que, mesmo em animais adultos, o testículo possa migrar rapidamente do escroto para a cavidade abdominal. Já em humanos, o canal inguinal fecha normalmente após o descenso testicular (Setchell & Breed, 2006). Anatomicamente, é possível perceber algumas diferenças entre o cateto e as outras duas espécies de roedores investigadas neste trabalho. Maior detalhamento a respeito da posição testicular nas três espécies em estudo é tratado a seguir.

#### **1.4.1 Cateto (*Tayassu Tajacu*)**

Nos catetos, o escroto é facilmente observado e localiza-se ventralmente ao ânus, projetando-se na superfície corporal. À semelhança do restante do corpo, a pele do escroto apresenta pigmentação, estando, no entanto, desprovida dos pêlos típicos dos Tayassuidos, (que são caracteristicamente longos e espessos) possuindo apenas alguns pêlos mais delicados. Em estação, os testículos projetam-se caudalmente na superfície corporal, são facilmente distinguíveis sob o escroto e a rafe escrotal é profunda,

separando o escroto em duas lojas testiculares bem pronunciadas (Miglino et al., 2004; ver Figura 4 abaixo).



Figura 4. Localização do escroto (E) em catetos em A e presença da rafe escrotal pronunciada em B.  
Fonte: modificado de Sonner et al., 2004

#### 1.4.2 Cutia (*Dasyprocta sp.*)

Na cutia não foram observados limites externos nítidos do escroto. Porém, o mesmo é visível externamente quando os testículos são pressionados da região abdominal em direção à região pélvica (Menezes et al., 2003; ver Figura 5 abaixo).

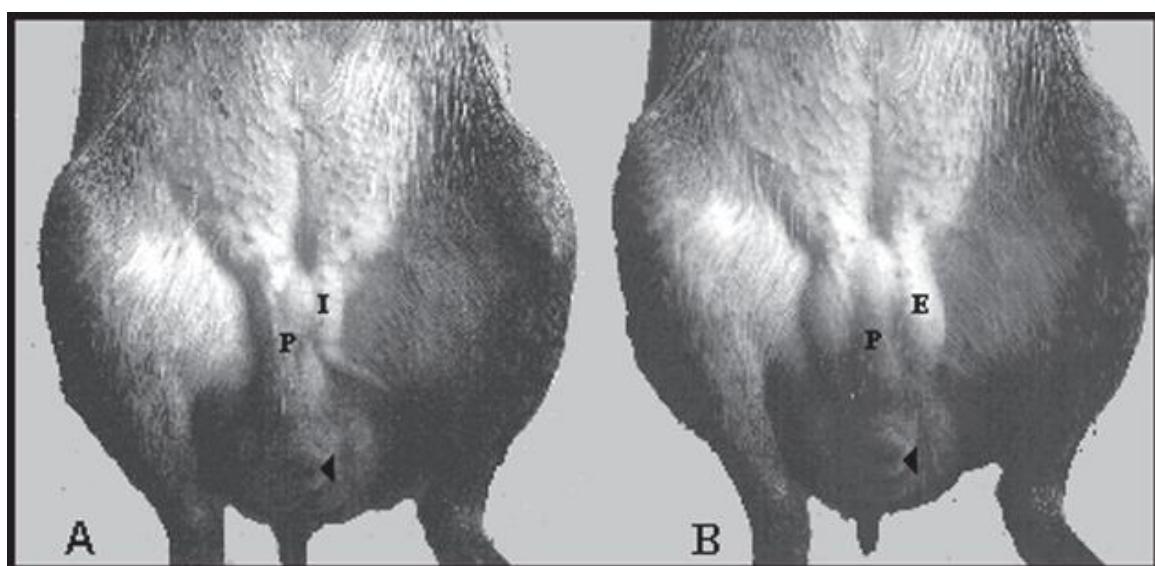


Figura 5. Fotografia da região inguinal da cutia. Evidencia-se em A a região inguinal (I) desprovida da presença do escroto. Em B observa-se, após pressão exercida na região abdominal, a presença dos testículos no escroto (E). Nota-se, ainda, o óstio prepucial (cabeça de seta) e o pênis (P) em posição ventral. Fonte: Menezes et al., 2003.

### 1.4.3 Paca (*Agouti paca*)

Na paca, assim como na cutia (MENEZES, 2003), dependendo da época da reprodução, os testículos localizam-se temporariamente na cavidade abdominal, no escroto ou no trajeto inguinal devido ao fato destas espécies apresentarem uma comunicação livre entre a cavidade peritoneal e o escroto. Segundo Borges (2003), o escroto de pacas foi evidenciado em apenas um espécime de seu estudo, enquanto nos demais exemplares não foi notado qualquer esboço externo do escroto (ver Figura 6 abaixo).



Figura 6. Fotografia da região inguinal de pacas. Em A, observa-se apenas a região escrotal (seta branca) e, em B, o escroto é bem evidente (seta preta). Fonte: modificado de Borges, 2003.

### 1.5. FORMA E ESTRUTURA DO TESTÍCULO EM MAMÍFEROS

Embora de maneira geral o testículo seja um órgão ovóide ou arredondado na maioria das espécies de mamíferos, outras formas, mais alongadas, podem também ser observadas (Setchell & Breed, 2006). O testículo é um órgão com funções exócrina e endócrina envolvido por uma espessa cápsula de tecido conjuntivo, a túnica albugínea. Esta túnica, de maneira variada nas diferentes espécies de mamíferos, envia trabéculas de tecido conjuntivo, os septos testiculares, para o interior do órgão até a região do mediastino testicular, dividindo o testículo em lóbulos. Existe uma grande variação entre as diferentes espécies de mamíferos com relação à quantidade de tecido conjuntivo que forma estas trabéculas (Russell et al., 1990), bem como na quantidade do mesmo na região do mediastino testicular (França & Russell, 1998; Paula, 1999). A artéria testicular e seus ramos e veias correm na face interna da túnica albugínea, sendo normalmente bastante visíveis externamente (Amann, 1981).

Funcionalmente, o testículo dos mamíferos pode ser dividido em dois compartimentos principais: o compartimento intertubular ou intersticial, também chamado de espaço intertubular, e o compartimento de túbulos seminíferos (Russell et al., 1990). Os elementos componentes do compartimento intertubular são as células de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e uma população celular variável constituída principalmente de fibroblastos, macrófagos e mastócitos (Russell et al.,

1990). Apesar de existir grande variação entre as diversas espécies quanto à proporção volumétrica dos diferentes componentes do compartimento intertubular (Fawcett et al., 1973; França & Russell, 1998), a célula de Leydig é usualmente o tipo celular mais freqüente neste compartimento. Assim, por exemplo, o percentual ocupado pelas mesmas nos testículos de animais sexualmente maduros e no período reprodutivo pode variar de aproximadamente 1% em carneiros até cerca de 35% em capivaras (França & Russell, 1998; Paula, 1999). O compartimento dos túbulos seminíferos constitui a maior parte do testículo, ocupando, na grande maioria dos mamíferos, de 70% a 90% do parênquima testicular (França & Russell, 1998). Estes túbulos formam alças bastante contorcidas, as quais possuem suas duas extremidades conectadas à rede testicular, localizada numa região bastante rica em vasos e tecido conjuntivo e também denominada de mediastino testicular. A partir desta região, a rede testicular encontra-se conectada ao epidídio através dos díctulos eferentes.

Os túbulos seminíferos são constituídos por túnica própria, epitélio seminífero e lume tubular. A túnica própria reveste o túculo externamente, sendo composta de células peritubulares mióides e matriz extracelular. No epitélio seminífero são encontrados dois tipos celulares de origem embriológica distintas: as células germinativas originárias do epiblasto e as células de Sertoli provenientes do epitélio celomático (Karl & Capel, 1998; DeFalco & Capel, 2009). Juntamente com as células peritubulares mióides, as células de Sertoli elaboram a membrana basal que serve de suporte estrutural para a própria célula de Sertoli e para as células germinativas que se encontram na porção basal do epitélio seminífero. As células de Sertoli, através de junções de oclusão, dividem o epitélio seminífero em dois compartimentos, o compartimento basal onde se localizam as espermatogônias e os espermatócitos primários na fase inicial da prófase meiótica (pré-leptótenos e leptótenos), e o compartimento adluminal, no qual encontram-se os espermatócitos primários a partir da fase de zigóteno, espermatócitos secundários e espermátides. Desta forma, o compartimento adluminal está totalmente sob o controle das células de Sertoli, que propicia um microambiente isolado e imunoprivilegiado (barreira de célula de Sertoli) essencial para o desenvolvimento do processo espermatogênico (Russell et al., 1990; Fijak & Meinhardt, 2006). No lume tubular encontram-se o fluido secretado pelas células de Sertoli e os espermatozoides recém-espermiados. Com exceção das células germinativas que se originam do epiblasto, as células somáticas constituintes dos testículos são consideradas procedentes do mesonéfro e do epitélio celomático (Karl & Capel, 1998; DeFalco & Capel, 2009).

Existe grande variação no número e nas dimensões (diâmetro e comprimento) dos túbulos seminíferos nas diferentes espécies de mamíferos (França & Russell, 1998). O camundongo, por exemplo, possui aproximadamente 20 túbulos seminíferos por testículo perfazendo no total cerca de 2 metros de comprimento tubular por testículo (Bascom & Ostrud, 1925). Já no suíno doméstico existem de várias centenas a alguns poucos milhares de túbulos seminíferos por testículo e aproximadamente 5000 metros de túbulos no total (França & Russell, 1998). De maneira geral, o valor observado para o diâmetro tubular na grande maioria das espécies de mamíferos está na faixa de 180 $\mu$ m a 300 $\mu$ m (Roosen-Runge, 1977).

## 1.6. ESPERMATOGÊNESE EM MAMÍFEROS

A espermatogênese é um processo altamente complexo e bem organizado, que ocorre nos túbulos seminíferos, e que dura cerca de 40 a 60 dias na maioria dos mamíferos (França & Russell, 1998; França et al., 1998; Godinho, 1999, Hess & França, 2007). Baseado em características morfológicas e funcionais, o processo espermatogênico pode ser dividido em três fases: (a) fase proliferativa ou espermatogonal, caracterizada por várias e sucessivas divisões mitóticas dos diferentes tipos de espermatogônias; (b) fase meiótica ou espermatocitária, na qual ocorre a duplicação do DNA, a recombinação gênica e duas divisões meióticas (reduçional e equacional) que resultam na formação de uma célula haplóide denominada espermálide; e (c) fase de diferenciação ou espermiogênica, onde as espermárides arredondadas passam por drásticas alterações morfológicas e funcionais tais como a formação do acrosoma, do flagelo e a condensação nuclear, resultando numa célula altamente especializada, o espermatozóide, o qual estará apto para o processo de capacitação (Russell et al., 1990; Sharpe, 1994).

### 1.6.1 Fase espermatogonal

Na fase espermatogonal ou proliferativa, as espermatogônias tronco se dividem originando outras espermatogônias tronco (autorenovação) ou células germinativas comprometidas com a formação de espermatozoides (diferenciação). As espermatogônias tronco fazem parte de uma subpopulação de espermatogônias denominadas de indiferenciadas, compostas pelas espermatogônias A<sub>isoladas</sub> (espermatogônias tronco), espermatogônias A<sub>pareadas</sub> e espermatogônias A<sub>alinhasdas</sub>. A outra subpopulação é denominada espermatogônias diferenciadas, sendo compostas das espermatogônias A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>3</sub>, A<sub>4</sub>, Intermediárias e espermatogônias tipo B. Além desta definição funcional, no testículo de mamíferos as espermatogônias tronco são morfologicamente caracterizadas como as únicas espermatogônias sem pontes intercelulares (de Rooij & Russell, 2000). As espermatogônias A<sub>pareadas</sub> e A<sub>alinhasdas</sub>, que estão mais comprometidas com a diferenciação e a formação de espermatozoides, quando sofrem injúrias ou mesmo quando são transplantadas em um testículo de animal receptor, quebram suas pontes citoplasmáticas, comportam-se como espermatogônias tronco (de Rooij & Grootegeed 1998; de Rooij 2001; Nakagawa et al., 2007). Neste contexto funcional, as espermatogônias tronco A<sub>isoladas</sub> podem ser denominadas de espermatogônias tronco atual e as espermatogônias A<sub>pareadas</sub> e A<sub>alinhasdas</sub> de espermatogônias tronco potencial (Nakagawa et al., 2007).

Trabalhos, fundamentados em características morfológicas, sugerem que as espermatogônias indiferenciadas possuem localização preferencial (nicho) nos túbulos seminíferos em camundongos, ratos e hamsteres (Chiarini-Garcia et al., 2001; Chiarini-Garcia et al., 2003; do Nascimento et al., 2009). Resultados semelhantes foram obtidos utilizando-se diversas técnicas, tais como transplante de células germinativas, as quais demonstraram que as espermatogônias indiferenciadas se localizam preferencialmente em regiões dos túbulos seminíferos adjacentes aos vasos sanguíneos e as células de

Leydig (nicho) e, à medida que se diferenciam, as células resultantes se afastam dessa região do túbulo (Yoshida et al., 2007). Outros estudos indicam que as células de Sertoli presentes nos túbulos seminíferos também participam da formação do nicho, secretando fatores de crescimento que regulam a autorrenovação das espermatogônias tronco, como ERM (Ets related molecule ou ETV5–Ets variant gene 5), GDNF (Stem Cell Factor) e FGF2 (Stem Cell Factor), além de fatores que promovem a diferenciação das mesmas, tais como a activina A, BMP4 e SCF, enquanto as células de Leydig contribuem com a secreção do CSF1, que também pode ser importante na formação e manutenção do nicho (Chen et al., 2005; Morrow et al., 2007; de Rooij, 2009). As espermatogônias apresentam o CSF1R (Stem cell factor) e quando estes receptores são ativados, as espermatogônias tronco se proliferam (Kokkinaki et al., 2009).

### **1.6.2 Fase espermatocitária**

As espermatogônias B sofrem a última divisão mitótica e originam dois espermatócitos primários conhecidos como pré-leptóteno. Estas células representam o começo da prófase meiótica (Hess & França, 2007). A prófase da primeira divisão meiótica é longa e subdividida em cinco estágios denominados de pré-leptóteno, leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno. No estágio inicial, os espermatócitos primários em pré-leptóteno realizam a última síntese de DNA nas células germinativas. No estágio seguinte, os espermatócitos em leptóteno apresentam aumento do volume celular e distribuição homogênea de cromatina no núcleo. Nos espermatócitos em zigóteno ocorre espessamento cromossômico, início de pareamento dos cromossomos homólogos e formação do complexo sinaptonêmico, sendo este último visível somente sob microscopia eletrônica de transmissão (Billard, 1986; Grier & Neidig, 2000, Nóbrega, 2006). Este complexo persiste até o final do estágio de paquíteno que é a fase mais longa da prófase meiótica, na qual ocorre a recombinação e a segregação gênica, importante para a diversidade de indivíduos da mesma espécie, com os cromossomos apresentando-se completamente pareados e compactos. Durante a Meiose I, os paquítenos aumentam também de tamanho antes de se transformarem em diplótenos que se dividem para formar os espermatócitos secundários (células 2n). Essas células, caracterizadas pela morfologia arredondada, citoplasma escasso e núcleo com cromatina condensada, passam rapidamente por uma segunda divisão meiótica (Meiose II) para produzir células haplóides (células 1n), denominadas de espermátides (Billard, 1969; Russell et al., 1990; Hess & França, 2007).

### **1.6.3 Fase espermiogênica**

A fase que corresponde à transformação de espermátides arredondadas em espermátides alongadas e a maturação e espermiação dos espermatozóides no lúmen do túbulo seminífero é conhecida como fase espermiogênica ou de diferenciação (Hess & França, 2007). Baseado no sistema de desenvolvimento do acrossoma, esta fase de diferenciação das espermátides requer pelo menos 4 etapas conhecidas como: fase de

Golgi, fase dos grânulos acrossomais (Capuz), fase acrossomal e fase de maturação (Russel et al., 1990; Hess & França, 2007).

#### **1.6.3.1 Fase de Golgi**

O aparelho de Golgi é muito importante durante os estádios iniciais da espermatogênese e a formação do acrossomo depende, principalmente, desta organela. Uma característica especial do aparelho de Golgi é que o mesmo produz vesículas e grânulos ricos em componentes enzimáticos que serão fundamentais para o desenvolvimento dos grânulos acrossônicos (Russel et al., 1990; Hess & França, 2007).

#### **1.6.3.2 Fase dos grânulos acrossomais (capuz)**

As espermátidess arredondadas iniciais usualmente apresentam duas pequenas vesículas nas quais somente ocasionalmente os grânulos pré-acrossônicos estão presentes. No final deste estádio, os pequenos grânulos pré-acrossônicos coalescem para formar uma grande vesícula acrossônica contendo um único grânulo acrossônico e esta vesícula geralmente se encontra em contato com o núcleo e começa a se espalhar e achatar levemente (Russel et al., 1990; Hess & França, 2007).

#### **1.6.3.3 Fase acrossomal**

Esta fase é caracterizada por modificações nos núcleos, acrossomos e nas caudas das espermátidess em desenvolvimento. Desta forma, as modificações de desenvolvimento são favorecidas pela rotação de cada espermátide de modo que o acrossomo é direcionado à base do túbulo seminífero, e a cauda por sua vez em direção ao lúmen. As espermátidess sofrem marcante remodelamento e redução de tamanho. Essa redução se deve basicamente pela grande condensação da cromatina, alcançada pela substituição das histonas pelas protaminas no núcleo, o que permite maior compactação do DNA; e pela eliminação do excesso de citoplasma, que é usualmente fagocitado pelas células de Sertoli (França et al., 1994; Hess & França, 2007). O acrossomo, externamente aderente ao núcleo, também se condensa e se alonga com a finalidade de corresponder à forma do núcleo. Estas modificações na forma de núcleo e do acrossomo parecem ser “moldadas” pelas células de Sertoli circundantes. Durante a espermiogênese também ocorre a formação do flagelo e da peça intermediária onde se concentram as mitocôndrias.

#### **1.6.3.4 Fase de Maturação**

Envolve a transformação final das espermátidess alongadas em espermatozóides que serão liberadas para a luz dos túbulos seminíferos. A modificação da forma do núcleo e do acrossomo de cada espermátide, iniciada na fase anterior, produz espermatozóides característicos para cada espécie. Dentro do núcleo, os grânulos de cromatina sofrem progressiva condensação até formarem um fino material homogêneo que preenche

totalmente, ou mesmo parcialmente, o núcleo dos espermatozóides (Russel et al., 1990; Hess & França, 2007).

Nos túbulos seminíferos, as células germinativas não estão organizadas ao acaso e sim em associações celulares características denominadas de estádios, os quais se sucedem com o tempo de maneira bastante ordenada, formando o ciclo do epitélio seminífero. Os estádios do ciclo podem ser classificados pelo método da morfologia tubular (Berndtson, 1977; França & Russell, 1998; Hess & França, 2007) e pelo método do sistema acrossômico (Leblond & Clermont, 1952; Russell et al., 1990; Hess & França, 2007). No primeiro caso, 8 estádios do ciclo são obtidos para todas as espécies, enquanto pelo sistema acrossômico o número de estádios varia de seis a quatorze nas espécies já investigadas (Russell et al., 1990; França & Russell, 1998; França et al., 1999; Hess & França, 2007).

## 1.7. CÉLULAS DE SERTOLI

Durante o processo espermatogênico, as células de Sertoli e as células germinativas interagem de maneira bastante complexa, tanto física quanto bioquimicamente. Existem diversas formas de junções intercelulares entre estes dois tipos celulares, incluindo-se os desmossomos, junções do tipo “gap”, junções à base de actina, conhecidas como especializações ectoplasmáticas, e complexos túbulos-bulbares. Apesar de serem postuladas várias funções para estes dispositivos juncionais, existem ainda poucas evidências experimentais para sustentar o papel preciso dos mesmos (Russell & Griswold, 1993). No entanto, fica bastante evidente a necessidade da interação das células germinativas com os componentes somáticos do testículo, principalmente células de Sertoli, Leydig e peritubulares mióides, para que o processo espermatogênico transcorra de maneira normal e eficiente (Russell et al., 1994; França & Russell, 1998; Welsh et al., 2009). A integridade funcional da membrana basal elaborada pelas células de Sertoli e peritubulares mióides é também essencial para o processo espermatogênico (Dym, 1994).

Nos testículos de animais sexualmente maduros, as células de Sertoli estão completamente diferenciadas. A variação considerável na forma e estrutura da célula de Sertoli, durante o ciclo do epitélio seminífero, demonstra o alto grau de plasticidade desta célula, o que reflete as alterações morfológicas e funcionais que ocorrem nas células germinativas (Russell et al., 1993). Além da formação da barreira de célula de Sertoli já comentada anteriormente, as células de Sertoli desempenham outras funções essenciais para o desenvolvimento das células germinativas. Assim, podem ser citadas o fornecimento de nutrientes e inúmeros outros fatores importantes para as células germinativas, mediação da ação do FSH e da testosterona na espermatogênese, fornecimento de suporte físico (sustentação) para as células espermatogênicas, participação ativa no processo de liberação (espermiação) das espermárides para o lume tubular, fagocitose do excesso de citoplasma (corpos residuais) resultante da liberação das células espermiadas e fagocitose de células germinativas que sofrem apoptose. As células de Sertoli secretam ainda fluido em direção ao lume tubular, o qual possui

substâncias importantes para a função epidimária e maturação espermática, servindo também de veículo para o transporte dos espermatozóides. A secreção de fluido também ocorre em direção ao compartimento intertubular, estando a mesma envolvida com os mecanismos de regulação parácrina de outros tipos celulares do testículo tais como as células peritubulares mióides, Leydig e musculares lisas dos vasos (Russell & Griswold, 1993; Sharpe, 1994; França & Russell, 1998; Hess & França, 2007). As células de Leydig e as células peritubulares mióides também possuem importantes interações funcionais com as células de Sertoli, conforme já foi sugerido anteriormente.

### **1.8. CÉLULAS DE LEYDIG**

As células de Leydig são bastante conhecidas por sua marcante produção de andrógenos, os quais são sintetizados a partir de uma molécula base, o colesterol (Bardin, 1996). Esta produção de andrógenos ocorre através de estímulos do LH (hormônio luteinizante) em receptores localizados na membrana citoplasmática das células de Leydig. À semelhança do FSH, o LH é uma glicoproteína sintetizada e secretada na adenohipófise sob a influência do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) proveniente do hipotálamo. O controle “feedback” negativo do LH é exercido pela testosterona tanto na adenohipófise quanto no hipotálamo (Shupnik & Schreihofe, 1997). Nos testículos, existem receptores para andrógenos nas células de Sertoli, células peritubulares mióides, musculares lisas dos vasos e na própria célula de Leydig (Suárez-Quian et al., 1999). Dentre os andrógenos sintetizados pelas células de Leydig incluem-se a testosterona e a diidrotestosterona, os quais são responsáveis pela diferenciação do trato genital masculino e da genitália externa na fase fetal (Pelleniemi et al., 1996) e pelo aparecimento dos caracteres sexuais secundários e a manutenção quantitativa da espermatogênese a partir da puberdade (Sharpe, 1994; Zirkin et al., 1994; De Gendt et al., 2004) embora tenha sido demonstrado recentemente que o FSH também participa na manutenção da espermatogênese (Russell et al., 1993; Meachem et al., 1999). Particularmente, a diidrotestosterona é responsável pela manutenção funcional das glândulas性uais acessórias e do epidídimos (Fan & Robaire, 1998; Goyal et al., 1999).

### **1.9. DURAÇÃO DA ESPERMATOGÊNESE**

O processo espermatogênico dura cerca de 30 a 75 dias nos mamíferos já estudados (Russell et al., 1990; França & Russell, 1998; Hess & França, 2007). A duração deste evento é considerada como uma constante biológica espécie-específica que está sob o controle do genótipo da célula germinativa (França et al., 1998). De maneira geral, em torno de 4,5 ciclos são necessários para que o processo espermatogênico se complete em mamíferos, ou seja, desde uma espermatogônia do tipo A até a liberação dos espermatozóides no lume do túbulo seminífero (Amann & Schanbacher, 1983; França & Russell, 1998). Também é importante ser mencionado que os valores encontrados para a duração da espermatogênese nas espécies de mamíferos investigadas até o presente momento (~1,5% de aproximadamente 4.000

espécies existentes; Nowak, 1999) indicam que fatores filogenéticos não são determinantes para a duração da espermatogênese (França & Cardoso, 1998; França et al., 2005). No entanto, considerável número de estudos sugere fortemente que as frequências dos estádios do ciclo, quando agrupados em fases pré-meiótica e pós-meiótica, podem ser determinadas pela proximidade filogenética entre as diferentes espécies de mamíferos (França & Russell, 1998; Leal & França, 2006; Almeida et al., 2006; Costa et al., 2008).

Diversas metodologias tais como irradiações por raios-X, raios gama e injeções de radioisótopos têm sido empregadas para se estimar a duração do ciclo do epitélio seminífero (França, 1991). Dentre estas, as mais utilizadas atualmente são a injeção de timidina triciada e a injeção de bromodeoxiuridina (França, 1991; Nakai, 2004). No caso específico da timidina triciada, os estudos são desenvolvidos através de técnica denominada de radioautografia, a qual permite detectar, com alto poder de resolução em microscopia de luz (Swierstra & Foote, 1965), a energia beta emitida pelo radioisótopo que se incorporou às células investigadas, e que possui a propriedade de sensibilizar emulsões fotográficas (Blumen & Merzel, 1976; Bundy, 1995). Conforme Clermont e colaboradores (1959), a timidina triciada é um marcador específico para células que estejam sintetizando DNA no momento de injeção do radioisótopo. Tais células no epitélio seminífero compreendem os diferentes tipos de espermatogônias encontradas em todos os estádios do ciclo do epitélio seminífero e os espermatócitos primários em preleptóteno/leptóteno, ocorrendo nestes espermatócitos a última síntese de DNA nas células espermatogênicas. Desta forma, preleptótenos/leptótenos marcados são pontos de referência para se calcular a duração da espermatogênese a partir da injeção de timidina triciada nos diferentes intervalos de tempo eventualmente utilizados (França, 1991).

O conhecimento das freqüências relativas dos estádios do ciclo do epitélio seminífero, aliado às análises dos radioautogramas, permite o cálculo da duração do ciclo espermatogênico e dos demais eventos do processo espermatogênico (Clermont & Trott, 1969; Clermont, 1972; França & Cardoso, 1998; França et al., 1999), bem como a estimativa da produção espermática diária.

## **2.0. QUANTIFICAÇÃO DA ESPERMATOGÊNESE**

Normalmente existe correlação positiva entre o diâmetro tubular e a atividade espermatogênica do testículo (França & Russell, 1998). Assim, o estudo quantitativo das células que compõem o epitélio seminífero, em secções transversais de túbulos seminíferos, é importante para o entendimento do processo espermatogênico (Roosen-Runge & Giesel Jr., 1950; França, 1991; França & Russell, 1998; Godinho, 1999; Hess & França, 2007). Este estudo permite, ainda, entendimento mais completo da espermatogênese e também de como a estrutura testicular se comporta em condições experimentais e patológicas (França et al., 1995; Rocha et al., 1999). Também neste aspecto, a obtenção da proporção volumétrica (%) entre os diversos componentes do testículo, bem como a estimativa do tamanho e número de células de Leydig por

testículo, fornecem importantes dados para se avaliar a função testicular (Russell et al., 1990; França, 1991).

Estudos recentes mostram que o número de células de Sertoli por testículo é o principal fator na determinação da produção espermática e do tamanho do testículo (Hess et al., 1993; França et al., 1995; Rocha et al., 1999). Tal pressuposto baseia-se no fato de que as células de Sertoli têm capacidade de suporte de células germinativas relativamente fixa para cada espécie, e que a população deste tipo celular mantém-se estável após a puberdade (França & Russell, 1998; Sharpe et al., 2003), não havendo alteração no seu número ao longo dos estádios do ciclo do epitélio (Roosen-Runge & Giesel, 1950; Bustos-Obregon, 1970; Wing & Chistensen, 1982; França, 1991; França et al., 1994). Desta forma, o número de células germinativas suportadas por uma única célula de Sertoli é a melhor indicação da eficiência funcional da célula de Sertoli e da produção espermática (Sinha-Hikim et al., 1988; França & Russell, 1998; Hess & França, 2007). A relação da produção espermática diária com o número de células de Sertoli, ou com o peso do testículo, é estabelecida na fase espermatogonal (Johnson et al., 1994; Johnson et al., 2008). Em termos de eficiência da produção espermática por unidade de área de túbulo seminífero o índice mais importante é o número de espermátides alongadas por célula de Sertoli (Sinha-Hikim et al., 1988; França & Russell, 1998; Hess & França, 2007). Os índices de células de Sertoli, que correspondem às razões entre o número de células germinativas e o número de células de Sertoli propiciam, ainda, base para o estudo de alterações no processo espermatogênico, em decorrência de condições patológicas e terapêuticas (Sinha-Hikim et al., 1985; Russell et al., 1990), dentre outras.

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

Para avaliação da produção espermática diária, vários métodos têm sido utilizados. Dentre estes métodos, podem ser citados aqueles que se baseiam na histologia quantitativa dos testículos, na estimativa da reserva espermática testicular através da contagem hemocitométrica de células espermáticas em homogeneizados do parênquima testicular, na quantificação de espermatozoides ejaculados. E na coleta de espermatozoides diretamente através de canulação do ducto deferente ou da rede testicular (Amann, 1970; Berndtson, 1977). Cada uma destas técnicas apresenta vantagens e desvantagens, envolvendo o tempo do procedimento, a determinação do evento espermatogênico submetido a alguma alteração, a necessidade da caracterização dos estádios do ciclo do epitélio seminífero, a possíveis perdas de espermatozóide eventualmente fagocitados no epidídimos, a capacidade reprodutiva futura do animal e o tempo de permanência da cânula na rede testicular ou ducto deferente. A escolha da técnica para o cálculo da produção espermática é variável de acordo com o que se

deseja investigar no experimento. Os métodos histológicos e hemocitométricos são igualmente válidos para se estimar a produção espermática de animais normais. No Laboratório de Biologia Celular do ICB-UFMG, o método histológico é empregado mais rotineiramente para o cálculo da produção espermática, sendo levado em consideração o comprimento total de túbulos seminíferos por testículo, número de células de Sertoli por testículo, razão entre o número de espermátides por célula de Sertoli e freqüência e duração de um determinado estádio do ciclo, dependendo da espécie investigada (França, 1992; Godinho, 1999; Rocha, 1999; Costa et al., 2008; Silva et al., 2009). Este método histométrico é relativamente simples e tem propiciado resultados tão acurados quanto aqueles obtidos com metodologias mais tradicionais (Amann & Almquist, 1962). Além de estimar a eficiência espermatogênica, a análise histológica do testículo nos possibilita verificar se o processo espermatogênico ocorre normalmente ou não e no último caso, se uma eventual anormalidade, deve-se a falha na divisão de células específicas e/ou se maior número de perdas celulares (apoptoses) são encontradas e, ainda, quais células são as mais acometidas por apoptose.

## 2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

## **2 – JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS**

### **2.1. JUSTIFICATIVA**

Na utilização de machos para a reprodução, tanto natural quanto artificial, é fundamental o conhecimento da função testicular, principalmente dos aspectos relacionados à atividade espermatogênica. Este conhecimento torna-se mais relevante em espécies de importância econômica e que possam ser criadas em cativeiro para comercialização. A instrução normativa número 169 do IBAMA indica que apenas cinco espécies de mamíferos silvestres poderiam ser utilizadas para este fim e, dentre elas, encontramos a paca, a cutia e o cateto. Neste contexto, dentre outros parâmetros, a determinação da eficiência espermatogênica (produção espermática diária por grama de testículo) poderia propiciar eventualmente o melhor manejo e exploração dos reprodutores de destacado potencial genético (Amann, 1970; Amann & Schanbacher, 1983; França, 1991).

### **2.2. OBJETIVO GERAL**

Conforme já foi comentado anteriormente, a literatura disponível até o presente momento sobre a biologia reprodutiva de machos adultos de paca, cutia e cateto, é bastante escassa. Desta forma, o objetivo do presente estudo é de caracterizar a estrutura e a função testiculares tanto do ponto de vista qualitativo e quantitativo, através de análises microscópicas. Em última análise, os resultados obtidos propiciarão importantes dados básicos sobre a eficiência espermatogênica destas importantes espécies silvestres.

### **2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- **Capítulo 1** - Realizar a análise biométrica, histológica e morfométrica do testículo e, também, estimar a duração do processo espermatogênico, a eficiência da célula de Sertoli e a produção espermática diária em catetos sexualmente maduros.
- **Capítulo 2** - Realizar análise comparativa sobre a biometria, histologia e morfometria testicular e, também, determinar a duração da espermatogênese, eficiência da célula de Sertoli e produção espermática diária em cutias e pacas sexualmente maduras.

### 3. ARTIGOS

## 3.1 ARTIGO 1

**Spermatogenic cycle length and sperm production in a feral pig species (collared peccary, *Tayassu tajacu*)**

Running head – Spermatogenic efficiency in peccaries

Summary sentence: Peccaries and domestic pigs belong to the Artiodactyla Order and, although spermatogenic cycle length is much longer for peccaries, these two species have similar spermatogenic and Sertoli cell efficiency.

Guilherme M. J. Costa<sup>1\*</sup>, Marcelo C. Leal<sup>1\*</sup>, Jurupytan V. Silva<sup>2</sup>, Ana Cássia S. Ferreira<sup>2</sup>, Diva A. Guimarães<sup>2</sup> and Luiz R. França<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Cellular Biology, Department of Morphology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil 31270-901.

<sup>2</sup>Laboratory of Animal Reproduction, Biological Sciences Centre, Federal University of Pará, Belém, PA, Brazil 66075-900.

\*These authors contributed equally to this work.

<sup>3</sup>Correspondence and reprint requests to:

Dr. Luiz Renato de França

Phone: 55-31-34092816; fax: 55-31-34092780

e-mail [lrfranca@icb.ufmg.br](mailto:lrfranca@icb.ufmg.br)

**Financial support: EMBRAPA/PA, FAPEMIG and CNPq**

## Abstract

Although the collared peccary (*Tayassu tajacu*) is found throughout the Americas, with a high potential for domestication and commercial exploitation, there are few data on the reproductive biology of this mammalian species. The aim of the present study was to investigate testis structure, spermatogenic cycle length, Sertoli cell efficiency and spermatogenic efficiency. Twelve adult peccaries were used for biometrical, histological and stereological analyses, three of which received intratesticular injections of  $^3\text{H}$ -thymidine for the determination of the duration of spermatogenesis. Testis weight and gonadosomatic index were  $23.7 \pm 1.8$  grams and  $0.2 \pm 0.1\%$ , respectively. Seminiferous tubule volume density was  $77.4 \pm 1.7\%$ . Leydig cells occupied  $12.8 \pm 1.8\%$  of the testis parenchyma and presented a peculiar cytoarchitecture in the periphery of the seminiferous tubule lobes. The premeiotic, meiotic and postmeiotic stage frequencies were very similar to those found for wild and domestic boars. The spermatogenic cycle and entire spermatogenic process (based on 4.5 cycles) lasted approximately  $12.3 \pm 0.2$  and  $55.1 \pm 0.7$  days, respectively. Daily sperm production per gram of testis in the collared peccary was approximately  $23.4 \pm 2 \times 10^6$ , which is similar to that of domestic and wild boars. The knowledge generated in the present study could be used in reproduction and animal improvement programs and provides important information that may be used for comparative reproductive biology with previously investigated mammalian species.

Key words: testis, spermatogenesis, stereology, spermatogenic efficiency, spermatogenic cycle; collared peccary (*Tayassu tajacu*).

## 1. Introduction

Knowledge on the reproductive biology and physiology of mammals remains extremely limited, especially with regard to the most basic reproductive parameters of wild animals (Wildt, 2005). The collared peccary (*Tayassu tajacu*) is found in a variety of habitats from the southwestern United States to southern Paraguay (Gilbert, 1999), such as the Sonoran desert, chaco, rainforest, Brazilian savannah, wetlands and deciduous forest (Emmons and Feer, 1997). Collared Peccaries normally feed on fruits, roots, tubers, palm nuts, grasses, invertebrates and small vertebrates. Also, collared peccaries are diurnal animals that live in groups of one to twenty individuals, averaging between six and nine members (Sowls, 1997). Among the terrestrial vertebrates in neotropical forests, the collared peccary is one of the most hunted species (Robinson and Redford, 1991; Peres, 1996) as an important source of protein (Bodmer et al, 1997). Due to the importance of its meat and the pelt trade in local economies, such as the Amazon region, the collared peccary is considered a suitable species for captive breeding programs in many Latin America countries (Bodmer et al, 1997; Sowls, 1984).

Knowledge on the male reproductive biology and physiology – especially aspects related to spermatogenesis – is fundamental to preventing species from extinction as well as improving species management and enhancing male reproductive capacity in natural and artificial breeding programs (Comizzoli et al, 2000). Although testis structure and organization are very similar in mammals, each species may exhibit particular morphofunctional characteristics, such as those related to phylogenetic aspects, reproductive strategy/behavior (Setchell and Breed, 2006; Kerr et al, 2006).

The total duration of spermatogenesis takes approximately 4.5 cycles and lasts from 30 to 75 days in mammals (França and Russell, 1998; Leal and França, 2006; Hess

and França, 2007). Cycle length is generally considered constant for a given species (Clermont, 1972) and is under the control of germ cell genotype (França et al, 1998). Knowledge on spermatogenic cycle length is fundamental for determining spermatogenic efficiency (daily sperm production per gram of testis), which is useful for comparisons between species (Hess and França, 2007; Amann, 1962; França et al, 2005; Costa et al, 2008).

There are few reports in the literature concerning male reproductive biology of the collared peccary. Thus, the main objectives of the present study were to perform a detailed, comprehensive, biometrical, histological and stereological analysis of the testis as well as estimate spermatogenic cycle length, spermatogenic efficiency and Sertoli cell efficiency in sexually mature collared peccaries.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Animals

Twelve adult peccaries weighing approximately  $23 \pm 3$  kg were analyzed. The animals were obtained from the Federal University of Pará and EMBRAPA/PA, located in northern Brazil (Amazon rainforest;  $1^{\circ} 27' S$   $48^{\circ} 29' W$ ). Based on testicular weights and histological evaluations, Low (1970) did not find any evidence of circannual reproductive rhythm in the collared peccary and males from this species remain reproductively fertile throughout the year (Hellgren et al, 1989). Testis samples from peccaries utilized in the present study were collected in August/September and December. Before surgery, all animals received i.m. injections with 1 mL/20 Kg of Stresnil® (Janssen Pharmaceutica, São Paulo, SP/Brazil) + 1 mL/5 Kg of Amplictil

(Rhodia Farma Ltda, São Paulo, Brazil). All surgical procedures were performed by a veterinarian and followed approved guidelines for the ethical treatment of animals.

After orchiectomy, testes were separated from the epididymis and weighed, then cut longitudinally by hand with a razor blade into small fragments. Subsequently, these fragments, taken from different regions of the testis and avoiding areas nearby the mediastinum, were fixed by immersion in 4 to 5% buffered glutaraldehyde for 12 hours. Tissue samples measuring 2 to 3 mm in thickness were routinely processed and embedded in plastic (glycol methacrylate) for histological and stereological analyses.

## 2.2 Thymidine injections and tissue preparation

In order to estimate the duration of spermatogenesis, intratesticular injections (75 µCi/testis) of tritiated thymidine [thymidine (methyl-3H), specific activity 82.0 Ci/mmol, Amersham, Life Science, England] – a specific marker of cells that are synthesizing DNA at the moment of injection – were performed prior to orchiectomy at three sites (25 µCi/site) near the epididymal cauda, using a sterile hypodermic needle. Two time intervals following thymidine injections were considered (1 hour and 21 days). Tissue samples measuring 2 to 3 mm in thickness were collected near the site of thymidine injections, were routinely fixed and embedded as described above.

For the autoradiographic analysis, unstained testis sections (4 µm) were dipped in autoradiographic emulsion (Kodak NTB-2, Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA) at 43 to 45° C. After drying for approximately one hour at 25° C, the testis sections were placed in sealed black boxes and stored in a refrigerator at 4° C for approximately 4 weeks. Subsequently, these testis sections were developed in Kodak D-19 (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA) at 15° C (Bundy, 1995) solution and stained with toluidine blue.

Analyses of these sections were performed by light microscopy to detect the most advanced germ cell type labeled at the different time periods following thymidine injections. Cells were considered labeled when four or more grains were present over the nucleus on a low to moderate background.

### **2.3 Sudan III and Sudan black staining**

For the investigation of the presence of lipids in peccary Leydig cells, testis sections (5 µm) embedded in paraffin were deparaffinized and rehydrated in diluted ethanol (100% to 70%). These sections were then immersed in the Sudan III (Chroma, Kongen, Germany) solution and Sudan Black (Sigma Chemical Co, São Paulo, Brazil) solution for 20 minutes in a darkroom (van Straaten et al, 1978).

### **2.4 Testis stereology**

The volume densities of the testicular tissue components were determined by light microscopy using a 441-intersection grid placed in the ocular of the light microscope. Fifteen randomly chosen fields (6615 points) were scored per testis for each animal at 400x magnification. Seminiferous tubule diameter and epithelium height were measured at 200x magnification using an ocular micrometer calibrated with a stage micrometer. Thirty round or nearly round tubule profiles were chosen randomly and measured for each animal. Epithelium height was obtained in the same tubules used to determine tubule diameter. The total length of seminiferous tubules (meters) was obtained by dividing seminiferous tubule volume by the squared radius of the tubule times  $\pi$  (Johnson and Neaves, 1981).

## 2.4 Stages of the seminiferous epithelium cycle

Stages of the cycle in collared peccary were characterized based on the shape and location of spermatid nuclei, presence of meiotic divisions and overall composition of the seminiferous epithelium (Leal and França, 2006; Amann, 1962; Courot et al, 1970). This method – known as the tubular morphology system – provided eight stages of the seminiferous epithelium cycle, the limits of which were quite similar to those reported by Amann (1962). As a tubular cross section could occasionally have more than one stage, stage frequencies were based on the predominant cellular association observed (Amann, 1962). Relative stage frequencies were determined from the analysis of 150 seminiferous tubule cross sections per animal at 400x magnification. Both testes were analyzed for each animal. The histological sections used were those with better quality and more tubule cross sections.

## 2.5 Length of the seminiferous epithelium cycle

The duration of the spermatogenic cycle was estimated based on stage frequencies and most advanced germ cell type labeled at different times following thymidine injection. The total duration of spermatogenesis took into account that approximately 4.5 cycles are necessary for this process to be completed from type A spermatogonia to spermiation (Amann and Schanbacher, 1983). Because primary spermatocytes' nuclear volume grows markedly during meiotic prophase (França et al, 1995; Neves et al, 2002; Leal and França, 2006), the size of their nuclei was used to determine more precisely the location of the most advanced labeled germ cell, particularly when these cells were present in stages showing high frequency.

## 2.6 Cell counts and cell numbers

### *Germ and Sertoli cells*

All germ cell nuclei and Sertoli cell nucleoli present in Stage 1 of the cycle were counted in ten randomly selected round (or nearly round) seminiferous tubule cross sections for each animal. These counts were corrected for section thickness and nucleus or nucleolus diameter based on the method described by Abercrombie (1946) and modified by Amann (1962). For this purpose, 10 nuclei or nucleoli diameters were measured (per animal) for each cell type analyzed. Cell ratios were obtained from the corrected counts obtained in Stage 1.

The total number of Sertoli cells was determined from the corrected counts of Sertoli cell nucleoli per seminiferous tubule cross section and the total length of seminiferous tubules (Hochereau-de-Reviers and Lincoln, 1978). Daily sperm production (DSP) per testis and per gram of testis (spermatogenic efficiency) was obtained according to the following formula: DSP = total number of Sertoli cells per testis x the ratio of round spermatids to Sertoli cells in Stage 1 x Stage 1 relative frequency (%)/Stage 1 duration (d) (França, 1992).

### *Leydig cells*

Individual Leydig cell volume was obtained from nucleus volume and the proportion between nucleus and cytoplasm. As the Leydig cell nucleus in the collared peccary is spherical, the nucleus volume was calculated from the mean nucleus diameter. For this purpose, 30 nuclei with an evident nucleolus were measured for each animal. Leydig cell nucleus volume was expressed in  $\mu\text{m}^3$  and obtained from the formula  $4/3\pi R^3$ , in which  $R$  = nuclear diameter/2. To calculate the proportion between nucleus and cytoplasm, a 441-point square lattice was placed over the sectioned material at 400x magnification and 1000 points over Leydig cells were counted for each

animal. The total number of Leydig cells per testis was estimated from the individual Leydig cell volume and the volume occupied by Leydig cells in the testis parenchyma.

### 3. Results

#### 3.1 Biometric data and testis volume density

Mean testis weight for the collared peccaries investigated in the present study was  $23.7 \pm 1.8$  g, providing a gonadosomatic index (testis mass divided by body weight) of  $0.21 \pm 0.1\%$  (Table 1). The mean percentage for the tunica albuginea was  $11.9 \pm 0.9\%$ . Volume density of seminiferous tubules and Leydig cells was  $77.4 \pm 1.7$  and  $12.8 \pm 1.8\%$ , respectively (Table 1). Therefore, Leydig cells occupied nearly 60% of the intertubular compartment. In all samples evaluated, these cells exhibited a peculiar organization and were located mainly in the periphery of the seminiferous tubule lobe (Fig. 1A). Moreover, their cytoplasm was heavily filled with dark pigments (Fig. 1B), which were demonstrated to be lipids by Sudan black and Sudan III staining (Fig. 1C-D). Mean tubular diameter and epithelium height were  $255 \pm 6$  and  $80 \pm 2$   $\mu\text{m}$ , respectively (Table 1). Based on the volume of the testis parenchyma (testis volume minus weight of tunica albuginea), volume occupied by seminiferous tubules in the testis and tubular diameter, there were  $15.3 \pm 1$  and  $320 \pm 31$  meters of seminiferous tubules per gram of testis and per testis, respectively.

#### 3.2 Stages of the seminiferous epithelium cycle and relative stage frequencies

Based on the criteria used for determination of stages using the tubule morphology system, eight stages of the cycle were characterized, as follows (Figure 2):

*Stage 1*

Only one spermatid generation was present in this stage. Spermatids exhibited round nuclei and formed several layers within the upper part of the seminiferous epithelium. Type B spermatogonia and preleptotene were located closer to the basal lamina; and pachytene spermatocytes were usually sandwiched between round spermatids and preleptotene spermatocytes.

#### *Stage 2*

In this stage, spermatid nuclei began elongation and the chromatin of the early elongated spermatids was more condensed than in the previous stage. Primary spermatocytes were in transition from preleptotene to leptotene. Type A spermatogonia were also observed in this stage.

#### *Stage 3*

Elongated spermatids first formed bundles with their heads oriented towards the Sertoli cell nuclei, usually located at the base of the tubule. Young primary spermatocytes exhibited characteristics of leptotene cells. At the end of this stage, pachytene spermatocyte transitioned into the diplotene phase of the first meiotic prophase. The nuclei in type A spermatogonia were more frequent and similar in appearance to those seen in the previous stages.

#### *Stage 4*

The main characteristic of this stage was the presence of meiotic figures of the first and second divisions. Secondary spermatocytes and early round spermatids were also observed. Zygote and diplotene spermatocytes were present. Elongated spermatid bundles were located within Sertoli cell crypts at about the middle portion of

the seminiferous epithelium. A higher number of type A spermatogonia nuclei were present.

#### *Stage 5*

Two generations of spermatids were found in this stage: newly-formed round and elongated spermatids. Elongated spermatid bundles were more packed and some were located deep within the epithelium. Type A spermatogonia nuclei were observed at the base of the tubule. Early pachytene spermatocytes were the predominant cell type located between round spermatids and the basal lamina.

#### *Stage 6*

The elongated spermatids bundles had moved toward the seminiferous tubule lumen. In comparison to the previous stage, pachytene spermatocytes nuclei were more distant from the basal lamina. Intermediate spermatogonia were found and type A spermatogonia were occasionally present in this stage.

#### *Stage 7*

Elongated spermatids bundles had dissociated and spermatid nuclei were located close to the tubular lumen; small residual bodies were also present. Type B spermatogonia were found in this stage and the nuclei of this cell type were characterized by a round to ovoid shape and large amount of heterochromatin. Pachytene spermatocytes, round and elongated spermatids were the other germ cell types found in this stage.

#### *Stage 8*

The main characteristic of this stage was the location of elongated spermatids just being released at the luminal portion of the seminiferous tubule. Large residual bodies were observed just below elongated spermatids. Overall, the nuclear morphology of the round spermatids, pachytene spermatocytes and type B spermatogonia in this stage were similar to those in the previous stage.

The mean percentage of each of the eight stages was as follows: Stage 1- 16.3%  $\pm$  1; Stage 2- 11.1%  $\pm$  0.7; Stage 3- 10.8%  $\pm$  0.7; Stage 4- 11.3%  $\pm$  1; Stage 5- 12%  $\pm$  0.9; Stage 6- 12.3%  $\pm$  0.9; Stage 7- 8.9%  $\pm$  0.7; and Stage 8- 17.3%  $\pm$  0.8. Thus, Stages 8 and 1 were the most frequent and Stage 7 was the least frequent. The frequencies of the premeiotic (Stages 1 to 3), meiotic (Stage 4) and postmeiotic (Stages 5 to 8) stages were approximately 38%, 11%, and 51%, respectively.

### 3.3 Length of the seminiferous epithelium cycle

The most advanced labeled germ cell types observed at the different time periods investigated after thymidine injections are displayed in Table 2 and Figures 3 and 4. Approximately one hour after injection, these cells present at the end of Stage 2 (they went through 98% of this stage) and located in the basal compartment, were identified as preleptotene spermatocytes or cells in the transition from preleptotene to leptotene (Fig. 3A). The most advanced germ cells labeled 21 days after thymidine injection were round spermatids at the end of Stage 8 and these cells have traversed approximately 90% of this stage (Fig. 3B).

Based on the most advanced labeled germ cell type and stage frequencies, the mean duration of the seminiferous epithelium cycle was estimated as  $12.3 \pm 0.2$  days. The duration of the various stages of the cycle was determined taking into account cycle

length and the percentage of occurrence of each stage. As expected, the shortest was Stage 7 (1.09 days) and the longest was Stage 8 (2.13 days). As approximately 4.5 cycles are necessary for the spermatogenic process to be completed, the total length of spermatogenesis in the collared peccary was estimated as  $55.1 \pm 0.7$  days.

### 3.4 Testis stereology

Tables 3 and 4 display the data related to testis stereology. The meiotic index (measured as the number of round spermatids produced per pachytene primary spermatocyte) was  $3.2 \pm 0.1$ . This result demonstrated that at least 20% of cell loss occurs during the meiotic prophase. Sertoli cell efficiency in the collared peccary (estimated from the number of round spermatids per Sertoli cell) was  $11.1 \pm 0.7$ . The number of Sertoli cells per gram of testis was  $28 \pm 2 \times 10^6$ , whereas this number per testis was  $5.8 \pm 0.7 \times 10^8$ . Regarding spermatogenic efficiency, the daily sperm production per gram of testis and per testis was approximately  $23.4 \pm 2 \times 10^6$  and  $4.9 \pm 0.6 \times 10^8$ , respectively. Nucleus volume and size in Leydig cells were  $193 \pm 24$  and  $1170 \pm 99 \mu\text{m}^3$ , respectively. The number of Leydig cells per gram of testis was  $120 \pm 21 \times 10^6$ , whereas  $2.5 \pm 0.5 \times 10^9$  cells were found per testis.

## 4. Discussion

Despite its considerable economic potential, there are very few studies in the literature on the reproductive biology of the collared peccary (*T. tajacu*), particularly data related to testis structure and function. The results of the present study demonstrate that although the cycle length in the collared peccary is not short, spermatogenic efficiency and Sertoli cell efficiency are relatively high, suggesting that this species has

a fairly good potential for use in reproduction and animal improvement programs aimed at exploiting the species commercially.

The relative mass of seminiferous tissue determines how much space is devoted to sperm production. In general, species with testes that have a high proportion of seminiferous tubule tissue produce more sperm per unit mass, mainly when this aspect is associated with a higher number of Sertoli cells per testis and higher number of germ cells per Sertoli cell (Sertoli cell efficiency) (França and Russell, 1998; Hess and França, 2007; França et al, 2000; Johnson et al, 2008). Furthermore, germ cell loss (apoptosis), which occurs normally during spermatogenesis, plays an important role in establishing sperm production (Hess and França, 2007). Table 5 compares several important testicle parameters between the collared peccary and both domestic and wild boars. Despite the longer duration of spermatogenesis in the collared peccary, the spermatogenic efficiency found for this species was similar to that cited in the literature for domestic and wild boars. It is likely that the slower germ cell pace in peccaries is compensated by the higher number of Sertoli cells per gram of testis and greater Sertoli cell efficiency in comparison to domestic and wild boars, respectively. Germ cell loss during meiosis is similar in peccaries and domestic pigs.

Peccaries and pigs belong to the Artiodactyla order and respectively to the Tayassuidae and Suidae families, having diverged approximately 40 million years ago from a common ancestor (Adega et al, 2008). The gonadosomatic index of peccaries is half the value found for domestic pigs. This is perhaps the result of extensive reproductive selection to which most domestic pig breeds have been submitted over the centuries.

Leydig cells are important to quantitatively normal spermatogenesis (Ewing and Zirkin, 1983; Deslypere and Vermeulen, 1984) and other important functional aspects,

such as the function of male accessory organs/glands and sexual behavior/strategy (Setchell and Breed, 2006; Kerr et al, 2006). The size and number of Leydig cells per gram of testis are also known to exhibit remarkable variation between different mammalian species (Hess and França, 2007; Christensen and Fawcett, 1966). A number of studies comparing different mammalian species have demonstrated the amount of testosterone produced is strongly correlated with the bulk of the smooth endoplasmic reticulum and mitochondria in Leydig cells (Haider, 2004; Saraiva et al, 2008). Although Leydig cells size in peccaries may differ from the values observed for domestic and wild boars (França et al, 2005; França and Cardoso, 1998; Almeida et al, 2006), the number per gram of testis in these three related species is quite high and situated on the upper level for the mammalian species investigated thus far (Hess and França, 2007). Moreover, the amazingly large number of lipids found in peccary Leydig cells could represent an interesting model for investigating the steroidogenic pathway in mammals. However, we do not know why Leydig cells in peccaries have a peculiar organization and distribution around the lobes of the seminiferous tubules. In an attempt to better understand the organization and cytoarchitecture of the testis in the collared peccary, we are developing longitudinal studies evaluating different testis regions, from the mediastinum/rete testis to the tunica albuginea. As spermatogonial stem cells are preferentially located in microenvironments called “niches”, and this microenvironment is provided in the somatic Sertoli cell, the basement membrane and cellular components of the intertubular space (Hofmann, 2008), peccaries might represent an interesting model for investigating spermatogonial stem cell niche regulation and Sertoli/Leydig cell interactions.

The frequencies of the eight stages characterized and grouped in the premeiotic and postmeiotic phases of spermatogenesis are similar in the collared peccary, wild boar

and domestic pigs (Almeida et al, 2006). This observation is in agreement with a number of reports in the literature (França and Russell, 1998; Costa et al, 2008; Almeida et al, 2006; Neves et al, 2002; Leal and França, 2009), suggesting that phylogeny is strongly related to stage frequencies when grouped in premeiotic and postmeiotic phases. Although the morphology of germ cells in peccaries was very similar to those described for the domestic (Swierstra, 1968; França and Cardoso, 1998) and wild pigs (Almeida et al., 2006), the germ cells associations in peccaries resembled more those observed for the wild boar. For instance, the most advanced labeled germ cells 1-5 hours post-thymidine injection was preleptotene/leptotene present in stage 1 in the domestic pig (Swierstra, 1968; França and Cardoso, 1998), whereas these labeled cells were located at the end of stage 2 in peccaries (present study) and wild boar (Almeida et al., 2006).

Comprehensive investigations on testis structure and function are essential for comparative studies and a better understanding of reproductive biology, behavior and strategy. Despite the considerable economic potential of the collared peccary, this species remains poorly investigated. The results of the present study demonstrate that, in spite of its longer spermatogenic cycle length, spermatogenic efficiency in peccaries is similar to that obtained for the previously investigated species of the Suidae family. The results on Sertoli cell efficiency in the collared peccary suggest that this Tayassuidae species has a fairly good potential for increasing its reproductive performance. Therefore, we expect the knowledge generated by the present study to be useful in the near future for improvement programs aimed at the commercial exploitation of this interesting species.

### **5. Acknowledgements:**

The scholarships awarded to Guilherme Mattos Jardim Costa and Marcelo de Castro Leal from the Minas Gerais State Foundation (FAPEMIG) and the Brazilian National Research Council (CNPq) are fully appreciated. Technical help from Adriano Moreira and Mara L. Santos is also highly appreciated.

### **6. References**

1. Abercrombie M. Estimation of nuclear populations from microtome sections. Anat Record 1946; 94:238-248
2. Adega F, Chaves R, Guedes-Pinto H. Suiformes orthologous satellite DNAs as a hallmark of *Pecari tajacu* and *Tayassu pecari* (Tayassuidae) evolutionary rearrangements. Micron 2008; 39:1281-1287.
3. Almeida FF, Leal MC, França LR. Testis morphometry, duration of spermatogenesis, and spermatogenic efficiency in the wild boar (*Sus scrofa scrofa*). Biol Reprod 2006; 75:792-799.
4. Amann RP. Reproductive capacity of dairy bulls. III. The effect of ejaculation frequency, unilateral vasectomy, and age on spermatogenesis. Am J Anat 1962; 110:49-67.
5. Amann RP, Schanbacher BD. Physiology of male reproduction. J Anim Sci 1983; 57:380-403.
6. Bodmer RE, Penn JW, Puertas PE, Moya LI, Fang TG. Conserving Amazonian forests through sustainable use of natural resources: interdisciplinary, community-based management of the Reserva Comunal Tamshiyacu-Tahuayo. In: Freese C eds, Harvesting Wild Species. Johns Hopkins University Press: Baltimore & London, 1997: 315-318.

7. Bundy DC. Photographic emulsions and processing. In: Stumpf WE, Solomon HF eds, Autoradiography and correlative imaging. San Diego, CL: Academic Press, 1995: 49–57.
8. Christensen AK, Fawcett DW. The fine structure of testicular interstitial cells in mice. Am J Anat. 1966; 118:551-571.
9. Clermont Y. kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renew. Physiol Rev 1972; 52:198-236.
10. Comizzoli P, Mermilliod P, Mauget R. Reproductive biotechnologies for endangered mammalian species. Reprod Nutr Dev 2000; 40: 493-504
11. Costa GMJ, Chiarini-Garcia H, Morato RG, Alvarenga RLLS, França LR. Duration of spermatogenesis and daily sperm production in the jaguar (*Panthera onca*). Theriogenology 2008; 70:1136-1146.
12. Courot M, Hochereau-de Reviers MT, Ortavant R. Spermatogenesis. In: Johnson AD, Gomes WR, Vandemark NL eds, The testis. New York: Academic Press, 1970: 339-432.
13. Deslypere JP, Vermeulen A. Leydig cell function in normal men: effect of age, life-style, residence, diet, and activity. J Clin Endocrinol Metab 1984; 59:955-962.
14. Emmons LH, Feer F. Neotropical Rainforest Mammals: A Field Guide. Chicago, USA: University of Chicago Press, 1997: 175-185
15. Ewing LL, Zirkin B. Leydig cell structure and steroidogenic function. Recent Prog Horm Res 1983; 39:599-635.
16. França LR. Daily sperm production in Piau boars estimated from Sertoli cell population and Sertoli cell index. In: Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, vol. 4, 1992: 1716-1718.

17. França LR, Ye SJ, Ying L, Sandberg M, Russell LD. Morphometry of rat germ cells during spermatogenesis. *Anat Rec.* 1995; 241:181-204.
18. França LR, Cardoso FM. Duration of spermatogenesis and sperm transit time through the epididymis in the Piau boar. *Tissue Cell* 1998; 30:573-582.
19. França LR, Ogawa T, Avarbock MR, Brinster RL, Russell LD. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biol Reprod* 1998; 59:1371-1377.
20. França LR, Russell LD. The testis of domestic animals. In: Martínez F., Regadera J. eds, *Male Reproduction: A multidisciplinary overview*. Madrid, Spain: Churchill Livingston, 1998: 197-219.
21. França LR, Silva VA Jr, Chiarini-Garcia H, Garcia SK, Debeljuk L. Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. *Biol Reprod* 2000; 63:1629-1636.
22. França LR, Avelar GF, Almeida FF. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology* 2005; 63:300-318.
23. Gilbert B. "Do Not Take the Javelina Lightly." *Smithsonian* 1999; 30:52-60.
24. Haider SG. Cell biology of Leydig cells in the testis. *Int Rev Cytol* 2004; 233:181-241.
25. Hellgren EC, Lochmiller RL, Amoss MS Jr, Seager SW, Magyar SJ, Coscarelli KP, Grant WE. Seasonal variation in serum testosterone, testicular measurement and semen characteristics in the collared peccary (*Tayassu Tajacu*). *J Reprod Fertil* 1989; 85:677-686.
26. Hess RA, França LR. Spermatogenesis. Cycle of the seminiferous epithelium. In: Cheng CY eds, *Molecular mechanisms in spermatogenesis*. Landes Bioscience, 2007: 1-15.

27. Hochereau-de-Reviers MT, Lincoln GA. Seasonal variation in the histology of the testis of the red deer, *Cervus elephas*. J Reprod Fertil 1978; 54:209-213.
28. Hofmann MC. Gdnf signaling pathways within the mammalian spermatogonial stem cell niche. Mol Cell Endocrinol 2008; 288:95-103.
29. Johnson L, Neaves WB. Age-related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules and sperm production in stallions. Biol Reprod 1981; 24:703-712.
30. Johnson L, Thompson DL Jr, Varner DD. Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. Anim Reprod Sci. 2008; 105:23-51.
31. Kerr JB, Loveland KL, O'Bryan MK, Kretser DM. Cytology of the testis and intrinsic control mechanisms. In: Neill JD eds, Physiology of Reproduction. Elsevier, 2006: 827-947.
32. Leal MC, França LR. The Seminiferous Epithelium Cycle Length in the Black Tufted-Ear Marmoset (*Callithrix penicillata*) Is Similar to Humans. Biol Reprod 2006; 74: 616-624.
33. Leal MC, França LR. Slow increase of Sertoli cell efficiency and daily sperm production causes delayed establishment of full sexual maturity in the rodent *Chinchilla lanigera*. Theriogenology 2009; 71:509-518.
34. Low WA, eds. The influence of aridity on reproduction of the collared peccary (*Dicotyles tajacu*). Texas: University of British Columbia; 1970
35. Neves ES, Chiarini-Garcia H, França LR. Comparative testis morphometry and seminiferous epithelium cycle length in donkeys and mules. Biol Reprod 2002; 67:247-255

36. Peres CA. Population status of white-lipped *Tayassu pecari* and collared peccaries *T. tajacu* in hunted and unhunted amazonian forests. Biol Conserv 1996; 77: 115-123.
37. Robinson JG, Redford KH. The use and conservation of wildlife. In: Robinson J.G. and Redford K.H. eds, Neotropical Wildlife Use and Conservation. University of Chicago Press, Chicago, 1991: 3-5.
38. Saraiva KL, Silva VA Jr, Torres Dde O, Donato MA, Peres NG, Souza JR, Peixoto CA. Changes in mouse Leydig cells ultrastructure and testosterone secretion after diethylcarbamazine administration. Micron 2008; 39:580-586
39. Setchell BP, Breed WG. Anatomy, vasculature and innervation of the male reproductive tract. In: Neill JD eds, Physiology of Reproduction. Elsevier, 2006: 771-825.
40. Sowls LK, eds. The peccaries. The University of Arizona Press. Tucson: Arizona; 1984.
41. Sowls LK, eds. Javelinas and Other Peccaries: Their Biology, Management, and Use. Texas A&M University Press. College Station: Texas; 1997
42. Swierstra EE. A comparison of spermatozoa production and spermatozoa output of Yorkshire and Lacombe boars. J Reprod Fertil. 1968; 17: 459-69.
43. van Straaten HW, Ribbers-de Ridder R, Wensing CJ. Early deviations of testicular Leydig cells in the naturally unilateral cryptorchid pig. Biol Reprod. 1978; 19:171-176.
44. Wildt DE. Lions, tigers, and pandas, oh my. J Androl 2005; 26:452-45.

## 7. Tables

**Table 1.** Mean ( $\pm$ SEM) biometric and morphometric data regarding spermatogenesis in collared peccary.

Parameters	
Body weight (Kg)	<b>22.6 <math>\pm</math> 0.8</b>
Testis weight (g)	<b>23.7 <math>\pm</math> 1.8</b>
Gonadosomatic index (%)	<b>0.21 <math>\pm</math> 0.1</b>
Tunica albuginea (%)	<b>11.9 <math>\pm</math> 0.9</b>
Testis parenchyma volume density (%)	
Tubular compartment	<b>77.4 <math>\pm</math> 1.7</b>
Tunica propria	<b>2.9 <math>\pm</math> 0.9</b>
Seminiferous epithelium	<b>62.6 <math>\pm</math> 1.7</b>
Lumen	<b>11.9 <math>\pm</math> 1.4</b>
Intertubular compartment	<b>22.6 <math>\pm</math> 1.8</b>
Leydig cell	<b>12.8 <math>\pm</math> 1.8</b>
Others	<b>9.8 <math>\pm</math> 0.8</b>
Tubular diameter ( $\mu$ m)	<b>255 <math>\pm</math> 6</b>
Seminiferous epithelium height ( $\mu$ m)	<b>80 <math>\pm</math> 2</b>
Tubular length per gram of testis (meters)	<b>15.3 <math>\pm</math> 1</b>
Total tubular length per testis (meters)	<b>320 <math>\pm</math> 31</b>

**Table 2.** Mean ( $\pm$ SEM) length (d) of the seminiferous epithelium cycle in collared peccary.

Animal	Time after injection	Most advanced germ cell type labelled	Stage of the cycle	Number of cycles traversed	Cycle length based on labeling in leptotene
1	1 hour 20.924 days <sup>c</sup>	PI/L <sup>a</sup> R <sup>b</sup>	2 8	- 1.690	- 12.38
2	1 hour 20.831 days <sup>c</sup>	PI/L <sup>a</sup> R <sup>b</sup>	2 8	- 1.745	- 11.94
3	1 hour 20.826days <sup>c</sup>	PI/L <sup>a</sup> R <sup>b</sup>	2 8	- 1.674	- 12.44

Mean duration of the cycle = **12.3  $\pm$  0.16 days**.

<sup>a</sup> PI/L, Preleptotene/leptotene primary spermatocytes;

<sup>b</sup> R, round spermatids;

<sup>c</sup> Total time after thymidine injection minus 1 hour.

**Table 3.** Mean ( $\pm$ SEM) cell counts, cell ratios and sperm in collared peccary.

<b>Parameters</b>	
Round spermatids : pachytene spermatocyte	<b>3.2 <math>\pm</math> 0.1 : 1</b>
Round spermatids : Sertoli cell nucleoli	<b>11.1 <math>\pm</math> 0.7 : 1</b>
Sertoli cell number per gram of testis (million)	<b>28 <math>\pm</math> 2</b>
Sertoli cell number per testis ( $\times 10^8$ )	<b>5.8 <math>\pm</math> 0.7</b>
Daily sperm production per gram of testis (million)	<b>23.4 <math>\pm</math> 2</b>
Daily sperm production per testis ( $\times 10^8$ )	<b>4.9 <math>\pm</math> 0.6</b>

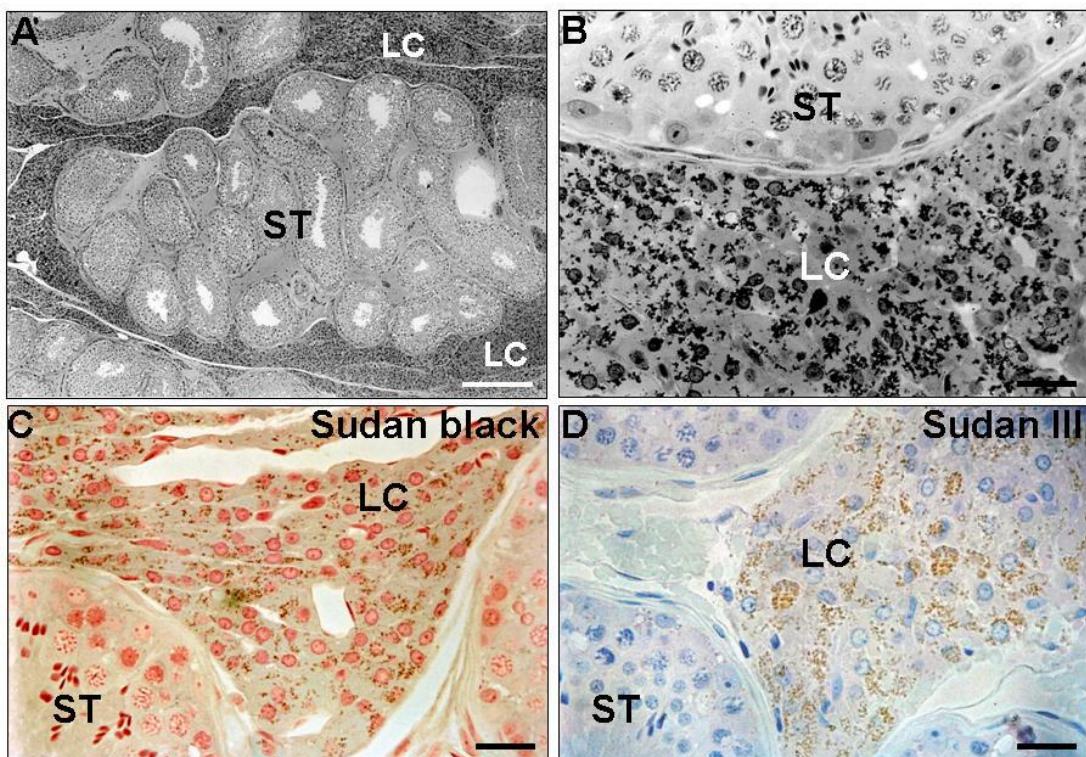
**Table 4.** Mean ( $\pm$ SEM) Leydig cell morphometry in collared peccary.

<b>Parameters</b>	
Nuclear diameter ( $\mu\text{m}$ )	<b>7 <math>\pm</math> 0.3</b>
Leydig cell volume ( $\mu\text{m}^3$ )	<b>1.170 <math>\pm</math> 99</b>
Nucleus volume ( $\mu\text{m}^3$ )	<b>193 <math>\pm</math> 24</b>
Cytoplasm volume ( $\mu\text{m}^3$ )	<b>977 <math>\pm</math> 84</b>
Leydig cell number per testis (billion)	<b>2.5 <math>\pm</math> 0.5</b>
Leydig cell number per gram of testis (million)	<b>120 <math>\pm</math> 21</b>

**Table 5.** Comparative parameters related to the testis morphometry and spermatogenic events in sexually mature collared peccary, domestic and wild boar.

<b>Parameters</b>	<b>Collared peccary</b>	<b>Domestic boar<sup>a</sup></b>	<b>Wild boar<sup>b</sup></b>
Gonadosomatic index (%)	0.2	0.4	0.3
Seminiferous tubule (%)	77	83-85	87
Sertoli cells per gram of testis (million)	28	20	42
Sertoli cell efficiency (spermatids per SC)	11.1	12.4	6.6
Meiotic index (%)	3.2 (20)	3.2 (20)	2.7 (33)
Leydig cells (%)	13	10	6
Leydig cell individual size ( $\mu\text{m}^3$ )	1200	1100-2200	400
Leydig cells per gram of testis (million)	120	60-120	157
Spermatogenic cycle length (day)	12.3	8.6-9	9
Total duration of spermatogenesis (day)	55.1	38.7-40.5	40.5
Spermatogenic efficiency (DSP per gram of testis)	23.4	24-27	29

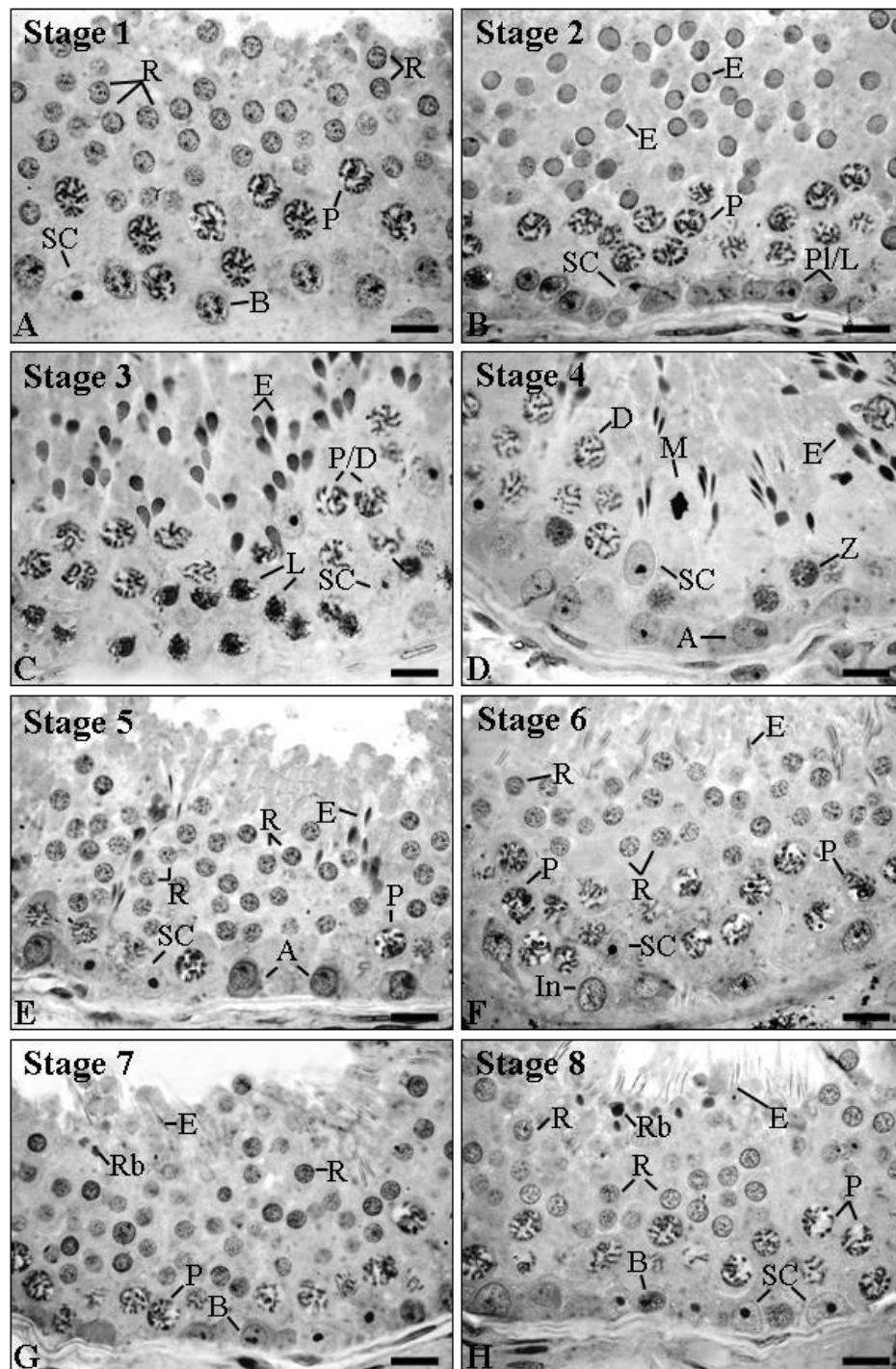
## 8. Figures and Legends for figures



**Figure 1 -**

**Figure 1.** Peccary testis parenchyma. At low magnification: (A) peculiar organization of Leydig cells (LC) around the seminiferous tubule lobe (ST). Apparently no Leydig cells are present in the seminiferous tubule that constitutes a lobe. At greater magnification: (B) Leydig cell cytoplasm is heavily filled with dark pigments, which denote lipids, according to Sudan black and Sudan III staining (C-D).

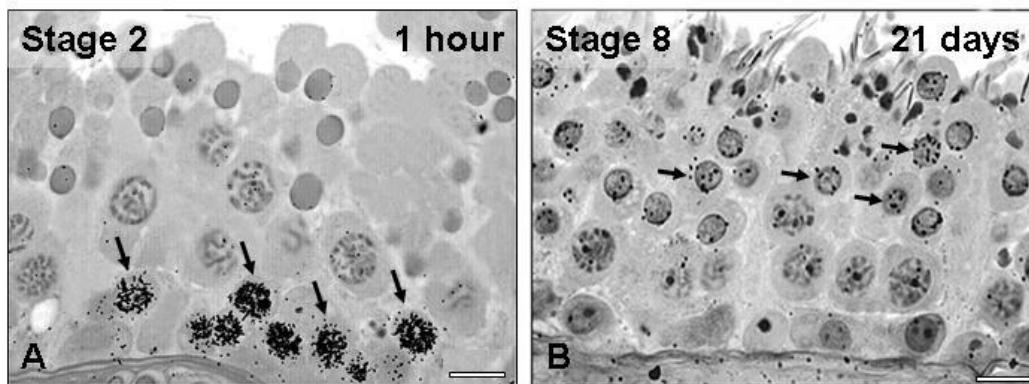
White bar = 250µm; black bar = 30µm.



**Figure 2.** Stages 1-8 of the seminiferous epithelium cycle characterized based on tubular morphology system: Type A spermatogonia (A); intermediate spermatogonia (In); Type B spermatogonia (B); pre-leptotene (Pl); leptotene (L); zygotene (Z); pachytene (P); diplotene (D) primary spermatocytes; meiotic figure (M); round

spermatids (R); elongating/elongated spermatids (E); Sertoli cells (SC); and residual bodies (Rb).

Bar = 20 $\mu$ m.



**Figure 3 -**

**Figure 3.** Most advanced labeled germ cells found at one hour (A) and twenty one days (B) following intratesticular injections of tritiated thymidine. Cells indicated by arrows are preleptotene/leptotene spermatocytes in Stage 2 and round spermatids in Stage 8.

Bar = 20 $\mu$ m.

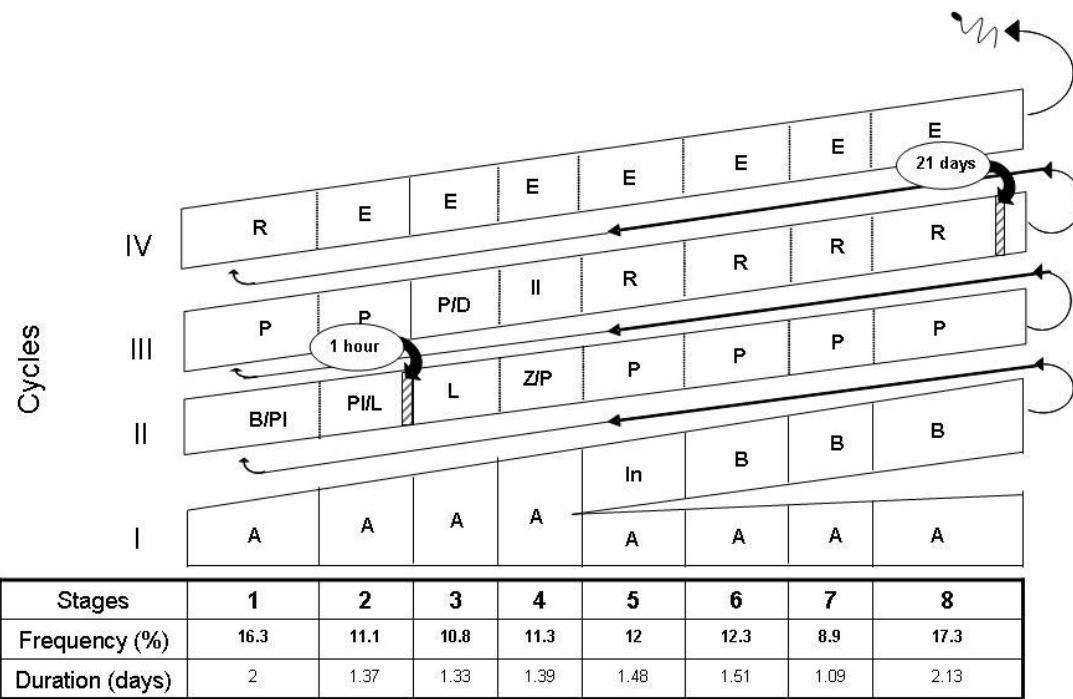


Figure 4

**Figure 4.** Germ cell composition and the most advanced germ cell type labeled in the eight cycle stages and at different time periods (1 hour and 21 days) following tritiated thymidine injections. Arabic numerals indicate stage; Roman numerals indicate the spermatogenic cycle. The space given for each stage is a proportional representation of its frequency and duration. Letters within each column indicate the germ cell types in each stage of the cycle. A, Type A spermatogonia; In, intermediate spermatogonia; B, Type B spermatogonia; Pl, pre-leptotene spermatocytes; L, leptotene; Z, zygotene; P, pachytene; D, diplotene; II, meiotic division; R, round spermatids; E, elongated spermatids.

## 3.1 ARTIGO 2

**Duration of spermatogenesis and spermatogenic efficiency in two large Neotropical rodent species: the agouti (*Dasyprocta leporina*) and paca (*Agouti paca*)**

Short running head – Spermatogenesis in *D. leporina* and *A. paca*

Summary sentence: The agouti and paca are among the largest rodent species alive and have considerable economic potential. In comparison to previously investigated mammalian species spermatogenic efficiency in these two Neotropical rodent species was particularly high

Guilherme M. J. Costa<sup>1</sup>, Marcelo C. Leal<sup>1</sup>, Ana Cássia S. Ferreira<sup>2</sup>, Diva A. Guimarães<sup>2</sup> and Luiz R. França<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Cellular Biology, Department of Morphology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil 31270-901.

<sup>2</sup>Laboratory of Animal Reproduction, Biological Sciences Center, Federal University of Pará, Belém, PA, Brazil 66075-900.

<sup>3</sup>Correspondence and reprint requests to:

Dr. Luiz Renato de França

Phone: 55-31-34092816; fax: 55-31-34092780

e-mail lrfranca@icb.ufmg.br

**Financial support: EMBRAPA/PA, FAPEMIG and CNPq**

## Abstract

The agouti (*Dasyprocta leporina*) and paca (*Agouti paca*) are among the largest rodent species alive. Although these species have considerable economic potential, there are few reports in the literature concerning male reproductive biology in sexually mature agoutis and pacas. The objectives of the present study were to perform a detailed stereological and histological analysis of the testis and estimate spermatogenic cycle length in these two Neotropical rodent species as well as to compare the data with those from other well-studied rodent members of the Hystrichomorpha and Myomorpha suborders. Eight adult agoutis and six adult pacas were used. The spermatogenic cycle in agoutis and pacas lasted  $9.5 \pm 0.03$  and  $11.5 \pm 0.16$  days, respectively, whereas the total duration of spermatogenesis for these two species was  $42.8 \pm 0.16$  and  $51.6 \pm 0.7$  days, respectively. Most of the parameters investigated were similar to those obtained for the other members of the Hystrochomorpha suborder. As a result of the combination of high values of seminiferous tubule volume density, number of Sertoli cells per gram of testis, Sertoli cell efficiency and a relatively short duration of spermatogenesis, the spermatogenic efficiency found in agoutis ( $52 \pm 2 \times 10^6$ ) and pacas ( $39 \pm 2 \times 10^6$ ) was particularly high when compared to previously investigated mammalian species. The data presented in this investigation would be useful for studies related to animal production as well as improvement and conservation programs involving these two large Neotropical rodent species.

**Key words:** testis, spermatogenesis, stereology, spermatogenic efficiency, Sertoli cells; Leydig cells; spermatogenic cycle; Agouti (*Dasyprocta sp.*); Paca (*Agouti paca*)

## 1. Introduction

The most basic reproductive characteristics of wild animals, especially Neotropical mammals, have rarely been investigated (Dobust et al., 2004; Wildt, 2005). Agoutis (*Dasyprocta leporina*) and pacas (*Agouti paca*) are Neotropical hystricomorph rodents found in a variety of habitats from Mexico to Argentina, such as forests (e.g rainforest), thick brush, savannahs and cultivated areas (Nowak, 1999). These species belongs to two families of hystricomorph rodents: the Dasyproctidae (*Dasyprocta leporina*) and Agoutidae (*Agouti paca*). They are intensively hunted by people for their meat, which is considered to be a delicacy. In some areas, their numbers have declined dramatically because of both hunting and habitat destruction (Leopold, 1959; Hall and Dalquest, 1963; Grimwood, 1969; Baker, 1974; Mares et al., 1981; Smythe, 1978). *D. leporina* and *A. paca* have also good potential for domestication as a protein source (Smith, 1974; Smythe, 1978; Pachaly and Werner, 1998). In this context, the study of the reproductive biology of these two wildlife species is of considerable economic and conservational importance.

Knowledge on male reproductive biology and physiology – especially aspects related to spermatogenesis – is fundamental to preventing species from extinction as well as improving species management and enhancing male reproductive capacity in natural and artificial breeding programs (Comizzoli et al., 2000). Although testis structure and organization are very similar in mammals, each species may exhibit particular morphofunctional characteristics, such as those related to phylogenetic aspects and reproductive strategy/behavior (Setchell and Breed, 2006; Kerr et al., 2006; Costa et al., 2009). The total duration of spermatogenesis takes approximately 4.5 cycles and lasts from 30 to 75 days in mammals (França and Russel, 1998; Leal and França, 2006; Hess and França, 2007; Leal and França, 2009). Cycle length is generally

considered constant for a given species (Clermont, 1972) and is under the control of the germ cell genotype (França et al., 1998). Knowledge on spermatogenic cycle length is fundamental for determining spermatogenic efficiency (daily sperm production per gram of testis), which is useful for comparisons between species (Hess and França, 2007; Amann, 1962; França et al., 2005; Costa et al., 2008; Costa et al., 2009).

There are few reports in the literature concerning male reproductive biology in sexually mature *D. leporina* and *A. paca*. Thus, the main objectives of the present study were to perform a comparative and detailed biometrical, histological and stereological analysis of the testis as well as to estimate spermatogenic cycle length, spermatogenic efficiency and Sertoli cell efficiency in these species.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Animals

Eight *D. leporina* specimens (1.5 to 2.5 years old) weighing  $2.5 \pm 0.1$  kg and six *A. paca* specimens (2 to 4 years old) weighing  $5.4 \pm 0.5$  kg were analyzed. As reported in other studies (Smythe, 1991; Ferreira, 2004), sexual maturation of these two large rodents occurs at 5 and 12 months of age, respectively. The animals were obtained from the Federal University of Pará, located in northern Brazil (Amazon rainforest). As *D. leporina* breeds year round (Juhani Ojasti, 1996) and the male *A. paca* remains reproductively fertile throughout the year (Juhani Ojasti, 1996; Dobust et al., 2004), testis samples from these two rodent species were collected during the Brazilian winter (August).

Before surgery, all animals received i.m. injections with 1 ml/20 kg of Stresnil® (Janssen Pharmaceutica, São Paulo, SP/Brazil) + 1 ml/5 kg of Amplictil (*Rhodia Farma*

Ltda, São Paulo, Brazil). All surgical procedures were performed by a veterinarian and followed approved guidelines for the ethical treatment of animals. After orchectomy, testes were separated from the epididymis and weighed, then cut longitudinally by hand with a razor blade into small fragments. Subsequently, these fragments were fixed by immersion in 4% buffered glutaraldehyde for 12 hours. Tissue samples measuring 2 to 3 mm in thickness were routinely processed and embedded in plastic (glycol methacrylate) for histological and stereological analyses.

## 2.2 Thymidine injections and tissue preparation

In order to estimate the duration of spermatogenesis, intratesticular injections (75 µCi/testis) of tritiated thymidine [thymidine (methyl-3H), specific activity 82.0 Ci/mmol, Amersham, Life Science, England] – a specific marker of cells that are synthesizing DNA at the moment of injection – were performed prior to orchectomy in three sites (25 µCi/site) near the epididymal cauda, using a sterile hypodermic needle. Two time intervals following thymidine injections were considered per each *D. leporina* (1 hour and 21 days) and *A. paca* (1 hour and 19 days). Tissue samples measuring 2 to 3 mm in thickness were collected near the site of thymidine injections, routinely fixed and embedded as described above. Three *D. leporina* and two *A. paca* specimens were used for these procedures.

For the autoradiographic analysis, unstained testis sections (4 µm) were dipped in autoradiographic emulsion (Kodak NTB-2, Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA) at 43 to 45° C. After drying for approximately one hour at 25° C, the testis sections were placed in sealed black boxes and stored in a refrigerator at 4° C for approximately 4 weeks. Subsequently, these testis sections were developed in Kodak D-

19 (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA) solution at 15° C (Bundy, 1995) and stained with toluidine blue.

Analyses of these sections were performed by light microscopy to detect the most advanced germ cell type labeled at the different time periods following the thymidine injections. Cells were considered labeled when five or more grains were present over the nucleus on a low to moderate background.

### 2.3 Testis stereology

The volume densities of the testicular tissue components in *D. leporina* and *A. paca* were determined by light microscopy using a 441-intersection grid placed in the ocular of the light microscope. Fifteen randomly chosen fields (6615 points) were scored per testis for each animal at 400x magnification. Seminiferous tubule diameter and epithelium height were measured at 200x magnification using an ocular micrometer calibrated with a stage micrometer. Thirty round or nearly round tubule profiles were chosen randomly and measured for each animal. Epithelium height was obtained in the same tubules used to determine tubule diameter. The total length of seminiferous tubules (meters) was obtained by dividing seminiferous tubule volume by the squared radius of the tubule times  $\pi$  (Johnson and Neaves, 1981).

### 2.4 Stages of the seminiferous epithelium cycle

Stages of the cycle in *D. leporina* and *A. paca* were characterized based on the shape and location of spermatid nuclei, presence of meiotic divisions and overall composition of the seminiferous epithelium (Leal and França, 2006; Amann, 1962; Courot et al., 1970; Leal and França, 2009; Costa et al., 2009). This method – known as

the tubular morphology system – provided eight stages of the seminiferous epithelium cycle, the limits of which were quite similar to those reported by Amann (1962). As a tubular cross section could occasionally have more than one stage, stage frequencies were based on the predominant cellular association observed (Amann, 1962). Relative stage frequencies were determined from the analysis of 150 seminiferous tubule cross sections per animal at 400x magnification. Both testes from each animal were analyzed. The histological sections used were those with better quality and more tubule cross sections.

## 2.5 Length of the seminiferous epithelium cycle

The duration of the spermatogenic cycle was estimated based on stage frequencies and most advanced germ cell type labeled at different times following thymidine injection. The total duration of spermatogenesis took into account that approximately 4.5 cycles are necessary for this process to be completed from type A spermatogonia to spermiation (Amann, 1983). As the nuclear volume of primary spermatocytes grows markedly during meiotic prophase (França et al., 1995; Neves et al., 2002; Leal and França, 2006; Costa et al., 2009), the size of the nuclei was used to determine more precisely the location of the most advanced labeled germ cell, particularly when these cells were present in stages with high frequency.

## 2.6 Cell counts and cell numbers

### *Germ and Sertoli cells*

All germ cell nuclei and Sertoli cell nucleoli in Stage 1 of the cycle were counted in ten randomly selected round (or nearly round) seminiferous tubule cross sections for each animal. These counts were corrected for section thickness (4 $\mu$ m) and

nucleus or nucleolus diameter based on the method described by Abercrombie (1946) and modified by Amann (1962). For this purpose, 10 nuclei or nucleoli diameters per animal were measured for each cell type analyzed. Cell ratios were obtained from the corrected counts obtained in Stage 1.

Adopting the assumption that there are no significant losses during spermiogenesis (Russell and Clermont, 1977), the number of round spermatids computed in Stage 1 of the seminiferous epithelium cycle in these two species was considered the population of spermatozoa. The total number of Sertoli cells per testis and per gram of testis parenchyma (testis weight minus mediastinum and tunica albuginea weight) was determined from the corrected counts of Sertoli cell nucleoli per seminiferous tubule cross section and the total length of seminiferous tubules (Hocheareau-de-Reviers and Lincoln, 1978). Daily sperm production (DSP) per testis and per gram of testis parenchyma (spermatogenic efficiency) was obtained according to the following formula: DSP = total number of Sertoli cells per testis x the ratio of round spermatids to Sertoli cells in Stage 1 x Stage 1 relative frequency (%)/Stage 1 duration (days) (França, 1992).

#### *Leydig cells*

Individual Leydig cell volume was obtained from nucleus volume and the proportion between nucleus and cytoplasm. As the Leydig cell nucleus in *D. leporina* and *A. paca* are spherical, the nucleus volume was calculated from the mean nucleus diameter. For such, 30 nuclei with an evident nucleolus were measured for each animal. Leydig cell nucleus volume was expressed in  $\mu\text{m}^3$  and obtained from the formula  $4/3\pi R^3$ , in which  $R$  = nuclear diameter/2. To calculate the proportion between nucleus and cytoplasm, a 441-point square lattice was placed over the sectioned material at 400x magnification and 1000 points over Leydig cells were counted for each animal. The

total number of Leydig cells per testis and per gram of testis parenchyma was estimated from the individual Leydig cell volume and the volume occupied by Leydig cells in the testis parenchyma.

### 3. Results

#### 3.1 Biometric data and testis volume density

Mean body weight in *A. paca* ( $5.4 \pm 0.5$  kg) was more than 100% higher than that found for *D. leporina* ( $2.5 \pm 0.1$  kg). Mean testis weight for *D. leporina* and *A. paca* was  $4.1 \pm 0.6$  g and  $5.9 \pm 1.1$  g, respectively (Table 1). The gonadosomatic index (GSI) (testis mass divided by body weight) for *D. leporina* ( $0.33 \pm 0.01$ ) was nearly 50% higher than that found for *A. paca* ( $0.22 \pm 0.01$ ) (Table 1). Volume density of seminiferous tubules, mean tubule diameter and epithelium height were very similar in *D. leporina* and *A. paca* (Table 1). However, the volume density for Leydig cells in *D. leporina* was nearly 40% higher than in *A. paca* (Table 1). Based on the volume of the testis parenchyma (testis volume minus weight of tunica albuginea), volume occupied by seminiferous tubules in the testis and tubule diameter, the value found for seminiferous tubules per gram of testis was similar for both species (Table 1). A particular characteristic of both rodents investigated in the present study is the inguinal location of the testes, which can occasionally be found in the scrotum. This feature has already been reported by Matamoros (1981) and Menezes (2003) for pacas and agoutis, respectively.

#### 3.2 Stages of seminiferous epithelium cycle and relative stage frequencies

Germ cell association in the seminiferous tubules was similar in these two hystricomorph rodents and, based on the criteria used for the determination of stages using the tubule morphology methodology, eight stages of the cycle were characterized in *D. leporina* and *A. paca*, as follows (Figure 1):

### *Stage 1*

Only one spermatid generation was present in this stage. Spermatids exhibited round nuclei and formed several layers within the upper part of the seminiferous epithelium. Preleptotene spermatocytes were located closer to the basal lamina and pachytene spermatocytes were usually sandwiched between round spermatids and preleptotene spermatocytes. Type A spermatogonia were also observed in this stage.

### *Stage 2*

In this stage, spermatid nuclei began elongation and the chromatin of the early elongated spermatids was more condensed than in the previous stage. Primary spermatocytes were preleptotene in transition to leptotene and pachytene spermatocytes. Type A spermatogonia were also present in this stage.

### *Stage 3*

Elongated spermatids first formed bundles with their heads oriented towards the Sertoli cell nuclei, usually located at the base of the tubule. Young primary spermatocytes were in leptotene and diplotene. Type A spermatogonia were also observed and their nuclei were similar in appearance to those seen in the previous stages.

#### *Stage 4*

The main characteristic of this stage was the presence of meiotic figures of the first and second divisions. Secondary spermatocytes were also observed. Zygote and diplotene spermatocytes were present. Elongated spermatid bundles were located within Sertoli cell crypts at about the middle and upper portion of the seminiferous epithelium. Type A spermatogonia were also observed in this stage.

#### *Stage 5*

Two generations of spermatids were found in this stage: newly-formed round and elongated spermatids. Elongated spermatid bundles were more packed and some were located deep within the epithelium. Type A spermatogonia nuclei were observed at the base of the tubule. Early pachytene spermatocytes were the predominant cell type located between round spermatids and the basal lamina.

#### *Stage 6*

The elongated spermatids bundles had moved toward the seminiferous tubule lumen. In comparison to the previous stage, pachytene spermatocyte nuclei were more distant from the basal lamina. Intermediate spermatogonia were found and type A spermatogonia were occasionally present in this stage.

#### *Stage 7*

Elongated spermatids bundles had dissociated and spermatid nuclei were located close to the tubule lumen; small residual bodies were also present. Type B spermatogonia were found in this stage and the nuclei of this cell type were characterized by a round to ovoid shape and large amount of heterochromatin. Type A

spermatogonia were occasionally present in this stage. Pachytene spermatocytes, round and elongated spermatids were the other germ cell types found in this stage.

### *Stage 8*

The main characteristic of this stage was the location of elongated spermatids just being released at the luminal portion of the seminiferous tubule. Large residual bodies were observed just below elongated spermatids. Preleptotene spermatocytes were located closer to the basal lamina. Overall, the nuclear morphology of the round spermatids and pachytene spermatocytes in this stage were similar to those observed in the previous stage.

### *Relative stage frequencies*

The mean percentage of each of the eight stages for *D. leporina* and *A. paca* are displayed in Table 2. Overall, the mean stage frequencies were similar for both species investigated. Stages 1 and 8 were the most frequent and Stages 6 and 7 were the least frequent for these species. The frequencies of the pre-meiotic (Stages 1 to 3), meiotic (Stage 4) and post-meiotic (Stages 5 to 8) phases of spermatogenesis were similar between *D. leporina* and *A. paca* and the pre-meiotic phase was slightly more frequent (Table 2).

### **3.3 Length of seminiferous epithelium cycle**

The most advanced labeled germ cell types observed at the different time periods investigated after thymidine injections for *D. leporina* and *A. paca* are displayed in Table 3 and Figures 2 and 3.

In *D. leporina*, approximately one hour after injection, the cells located in the basal compartment and present in Stage 1 (went through 60% of this stage) were identified as preleptotene spermatocytes or cells in the transition from preleptotene to leptotene (Figure 2A and Figure 3). The most advanced germ cells labeled 21 days after thymidine injection were elongated spermatids at the end of Stage 2 and these cells had traversed approximately 70% of this stage (Figure 2B and Figure 3).

In *A. paca*, approximately 1 hour after injection, the most advanced labeled germ cells were also identified as either preleptotene spermatocytes or cells in the transition from preleptotene to leptotene (Figure 2C). Similar to *D. leporina*, these cells were present in Stage 1. Based on the mean pachytene nucleus diameter, the cells traversed approximately 40% of this stage. At 19 days, these cells were round spermatids present in Stage 7 that went through 60% of this stage (Figure 2D and Figure 3).

Based on the most advanced labeled germ cell type and stage frequencies, the mean duration of the seminiferous epithelium cycle estimated for *D. leporina* and *A. paca* was  $9.5 \pm 0.03$  and  $11.5 \pm 0.16$  days, respectively (Table 3). As approximately 4.5 cycles are necessary for the spermatogenic process to be completed, the total length of spermatogenesis estimated for *D. leporina* and *A. paca* was  $42.8 \pm 0.16$  and  $51.6 \pm 0.7$  days, respectively.

### 3.4 Testis stereology

Tables 4 and 5 display the data related to testis stereology for *D. leporina* and *A. paca*. The number of round spermatids per Sertoli cell (Sertoli cell efficiency) was around 10 for both species. Germ cell loss during meiosis was 26 and 21% for *D.*

*leporina* and *A. paca*, respectively. Although the number of Sertoli cells per gram of testis was ~30% higher in *D. leporina*, the total number of this somatic cell per testis was the same for both species (Table 4). A similar trend was observed for spermatogenic efficiency (daily sperm production per gram of testis).

Individual Leydig cell size was nearly 30% lower in *D. leporina*. However, both Leydig cell numbers per testis and per gram of testis were quite similar in these two rodent species (Table 5).

#### 4. Discussion

The present study is the first to perform a detailed stereological evaluation of the testis, estimate the duration of spermatogenesis and measure spermatogenic and Sertoli cell efficiencies in two rodent species from the Hystrichomorpha suborder – the agouti (*Dasyprocta leporina*) and paca (*Agouti paca*). These species have considerable economic potential and are widespread in Latin America. As they are intensively hunted, the knowledge obtained in the present investigation could also be useful for conservation purposes.

The results reveal that, in comparison to previously investigated mammalian species (França and Russell, 1998; Johnson et al., 2000; França et al., 2005; Hess and França, 2007), these two rodent species have high spermatogenic efficiency which results from a combination of high values of seminiferous tubule volume density, number of Sertoli cells per gram of testis, Sertoli cell efficiency and a relatively short duration of spermatogenesis. Therefore, these findings suggest that agoutis and pacas have a fairly good potential for increasing their reproductive performance in animal improvement programs, which have not yet been successfully implemented.

There are few rodent species for which comprehensive quantitative data related to testis structure and spermatogenesis are available. Table 6 is a compilation of several important parameters obtained in our laboratory for other well-investigated rodent species from the suborder Hystricomorpha and well-studied laboratory rodents belonging to the Myomorpha suborder. In order to have a more contextual comparison of the data obtained for pacas and agoutis, most of the discussion below is based on the information in this table.

Studies developed in our laboratory with several mammalian species (França et al., 2005; Costa et al., 2008; Silva et al., 2009) strongly suggest that, among members of the same family, phylogeny is usually related to stage frequencies when these frequencies are grouped in pre-meiotic and post-meiotic phases. Table 6 shows that two patterns are readily observed for rodents when the frequencies of the pre and post-meiotic phases of spermatogenesis are considered: species in which the pre-meiotic frequency is about one quarter of the entire spermatogenic cycle and species that have a relative equilibrium between pre and post-meiotic phase frequencies. As *D. leporina* and *A. paca* belong to the Hystrichomorpha suborder and are closely related phylogenetically, confirming our previous studies, they have the same pattern of phase frequencies. On the other hand, although the duration of spermatogenesis is considered to be species-specific (Clermont, 1972; Amann and Schanbacher, 1983) and controlled by the germ cell genotype (França et al., 1998), this important reproductive parameter is not phylogenetically determined (Clermont, 1972; Amann and Schanbacher, 1983). In most mammalian species, the duration of each spermatogenic cycle is situated in an interval of 9 to 12 days. Particularly for rodents, spermatogenic cycle length is a little faster, in the range of ~8 to 12 days (Russell et al., 1990; França and Russell, 1998; Hess and França, 2007). Thus, the values

observed for the spermatogenic cycle length in *D. leporina* and *A. paca* are within these predominant ranges (Table 6).

As the number of Sertoli cells is stable in the adult animal and throughout the different stages of the cycle, these cells are used as a reference point to quantify and functionally evaluate the spermatogenic process (França and Russell, 1998; Johnson et al., 2000; França and Hess, 2005). The total number of Sertoli cells, which is established before puberty (Orth et al., 1988; Sharpe et al., 2003; França et al., 2005; Holsberger and Cooke, 2005), determines the upper limit of daily sperm production per gram of testis (spermatogenic efficiency) (Johnson et al., 2000; Hess and França, 2007), mainly because the number of germ cells supported by each Sertoli cell (Sertoli cell efficiency) is relatively constant for each species (França and Russell, 1998; Johnson et al., 2000; França et al., 2005; França and Hess, 2005). While the number of Sertoli cells per gram of testis found in *D. leporina* and *A. paca* is situated at the upper level ( $\sim 40$  to  $60 \times 10^6$ ), the values found for Sertoli cell efficiency in these two rodents are in the mean range when compared to different rodent species (Table 6) and even other well-investigated mammalian species (França and Russell, 1998; Johnson et al., 2000; França et al., 2005; França and Hess, 2005). The combination of these two important parameters resulted in very high spermatogenic efficiency for *D. leporina* and *A. paca*, which was only lower than the value obtained for chinchilla, which has prominent Sertoli cell efficiency. Seminiferous tubule volume density, which is very high and similar in both rodents species investigated here, usually has a significant, positive correlation with sperm production (Russell et al., 1990; França and Russell, 1998). As *D. leporina* exhibited a shorter duration ( $\sim 12\%$ ) of spermatogenesis and higher number ( $\sim 30\%$ ) of Sertoli cells per gram of gram, even with its lower Sertoli cell efficiency ( $\sim 12\%$ ) in comparison to *A. paca*,

this species produced thirty percent more sperm per day. Interestingly, considering the duration of spermatogenesis and Sertoli cell efficiency in both species, one single Sertoli cell would release the same number of sperm per day.

In contrast to the very high values observed for the seminiferous tubule volume density in *D. leporina* and *A. paca*, as expected, the volume occupancy of Leydig cells in the testis parenchyma and the number of these steroidogenic somatic cells per gram of testis are similar to the other rodent species investigated thus far, except for capybaras (Table 6). A similar trend also occurred for individual Leydig cell size. Regarding germ cell loss or apoptosis during meiosis, the values found for agoutis and pacas are within the range observed for most mammals investigated (20 to 30%) (Roosen-Runge, 1973; França and Russell, 1998; Johnson et al., 2000; França et al., 2005; Hess and França, 2007) and lower than the data found in capybaras and several mice strains (Table 6). As already well established in the literature, germ cell loss plays an important role in seminiferous epithelium homeostasis and occurs mainly in the spermatogonial phase and during meiosis, regulating germ cell density (de Rooij and Lok, 1987; de Rooij and Russell, 2000) and eliminating cells that are defective or carry DNA mutations (Sinha Hikim et al., 1985; Weinbauer et al., 2001; Baum et al., 2005), respectively.

There are a large number of genes and gene products involved in the regulation of testis descent, such as products from *Insl3*, *MIS*, androgen receptor and *CGRP* genes as well as those involved in testosterone production (Amann and Veeramachaneni, 2007). Other factors such as intra-abdominal pressure are also involved in the control of testis descent (Amann and Veeramachaneni, 2007). In both rodent species investigated in the present study, the testes can be found either in the inguinal canal or inside the scrotum. According to the literature (Amann and

Veeramachaneni, 2007), after gonad differentiation, the testes are relocated to the scrotum in three sequential phases: abdominal translocation, transinguinal migration and inguinoscrotal migration. In rodents, it is known that the inguinal canal does not constrict after the last phase of testicular descent and the testes can readily pass from the scrotum into the abdominal cavity, even in adults (Setchell and Breed, 2006). In all species from the Hstrichomorpha suborder listed in Table 6, the testes are usually located in the inguinal canal. However, except for capybaras, this location apparently does not affect spermatogenic efficiency in these species. It should be mentioned that the reason for the incomplete testis descent into the scrotum is still an important unsolved question of male reproductive biology (Setchell and Breed, 2006).

In comparison with animals from the Myomorpha suborder, rodent species belonging to the Hystrichomorpha suborder have a greater body weight (Table 6). Capybaras and pacas, in particular, are the largest rodents alive (Henrique-Silva et al., 2007; Orsi et al., 2009). However, except for chinchillas, the ratio between testis mass and body weight (gonadosomatic index) for this suborder is very low (Table 6) and these three rodent species have a monogamous mating system, longer life spans, produce few litters per year (generally one to two) and have a spatulate sperm head shape (Eisenberg, 1981; Eddy and O'Brien, 1994). In contrast, gerbils, hamsters, mice and rats have short life expectancies and a promiscuous mating system, produce multiple litters per year and have a falciform sperm head (Eisenberg, 1981; Eddy and O'Brien, 1994). There is abundant evidence on a wide range of mammalian and non-mammalian species that the relative size of the testis and morphology of the spermatozoa are infallible predictors of the mating system (Short, 1997). According to the author cited, species with larger testis/body weight ratios and better

spermatozoa quality/morphology have a promiscuous mating system in which sperm competition operates.

Most of the parameters investigated in the present study for agoutis and pacas were similar to those obtained for other members to the Hystrochomorpha suborder. As a result of a combination of higher values for several important testis and spermatogenic parameters in comparison to previously investigated mammalian species, the data of the present study revealed that spermatogenic efficiency in these two Neotropical rodent species was particularly high. As the agouti and paca are among the largest rodent species alive and have considerable economic potential, the knowledge obtained in the present study concerning the reproductive biology of these species would be very important and useful for animal production and conservational purposes.

### **5. Acknowledgements**

The scholarships awarded to Guilherme Mattos Jardim Costa and Marcelo de Castro Leal from the Minas Gerais State Foundation (FAPEMIG) and the Brazilian National Research Council (CNPq) are highly appreciated. Technical help from Adriano Moreira and Mara L. Santos is also highly appreciated.

### **6. References**

45. Abercrombie M. Estimation of nuclear populations from microtome sections. *Anat Record* 1946;94:238-248.
46. Amann RP, Schanbacher BD. Physiology of male reproduction. *J Anim Sci* 198;57:380–403.
47. Amann RP, Veeramachaneni DN. Cryptorchidism in common eutherian mammals. *Reproduction*. 2007;133:541-561.

48. Amann RP. Endocrine changes associated with onset of spermatogenesis in Holstein bulls. *J Dairy Sci.* 1983;66:2606-2622.
49. Amann RP. Reproductive capacity of dairy bulls. III. The effect of ejaculation frequency, unilateral vasectomy, and age on spermatogenesis. *Am J Anat* 1962;110:49–67.
50. Avelar GF, Leal MC, França LR. Sertoli and Leydig cells number per testis and daily sperm production in different mice strains. In: Levy FO, Taskén K, Hansson V, eds. 13th european workshop on molecular & cellular endocrinology of testis. Dunblane: 13th european workshop on molecular & cellular endocrinology of the testis - programme & miniposters, 2004:H1-H1.
51. Baum JS, St George JP, McCall K. Programmed cell death in the germline. *Semin Cell Dev Biol.* 2005;16:245-259.
52. Bundy DC. Photographic emulsions and processing. In: Stumpf WE, Solomon HF eds. *Autoradiography and correlative imaging.* San Diego: Academic Press, 1995:49–57.
53. Clermont Y, Harvey SC. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium of normal, hypophysectomized and hypophysectomized-hormone treated albino rats. *Endocrinology.* 1965;76:80-89.
54. Clermont Y, Trott M. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium in the mouse and hamster determined by means of 3H-thymidine and radioautography. *Fertil Steril.* 1969;20:805-817.
55. Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev.* 1972;52:198-236.
56. Comizzoli P, Mermilliod P, Mauget R. Reproductive biotechnologies for endangered mammalian species. *Reprod Nutr Dev.* 2000;40:493-504

57. Costa G, Leal M, Silva J, Ferreira AC, Guimaraes DA, França LR. Spermatogenic Cycle Length and Sperm Production in a Feral Pig Species (collared peccary, *Tayassu tajacu*). *J Androl*. 2009; in press.
58. Costa GMJ, Chiarini-Garcia H., Morato R.G., Alvarenga R.L.L.S., França L.R. Duration of spermatogenesis and daily sperm production in the jaguar (*Panthera onca*). *Theriogenology*. 2008;15;70:1136-1146.
59. Courot M, Hochereau-de Reviers MT, Ortavant R. Spermatogenesis. In: Johnson AD, Gomes WR, Vandemark NL, eds. *The testis*. New York: Academic Press, 1970: 339–432.
60. de Franca LR, Franca LR. Espermatogénesis (Espermatogénesis, producción y tránsito del esperma a través del epidídimo). *Separata*. 2007;15:16-27.
61. de Rooij DG, Lok D. Regulation of the density of spermatogonia in the seminiferous epithelium of the Chinese hamster: II. Differentiating spermatogonia. *Anat Rec*. 1987;217:131-136.
62. de Rooij DG, Russell LD. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl*. 2000;21:776-798.
63. Dubost G, Henry O, Comizzoli P. Seasonality of reproduction in the three largest terrestrial rodents of French Guiana forest. *Mammalian Biology*. 2005;70:93-109.
64. Eddy EM, O'Brien DA. The spermatozoon. In *The Physiology of Reproduction*, Knobil E, Neill JD, eds. New York: Raven Press, 1994:29–78.
65. Eisenberg, JF, ed. *The Mammalian Radiations*. 1st ed. Chicago: The University of Chicago press; 1981.
66. Ferreira ACS, Guimaraes DA, Luz-Ramos RS, Souza PC, Batista CR, Ohashi OM. Reproductive developmental phases of male agouti (*Dasyprocta sp.*) raised in captivity

- determined by quantitative analysis of spermatogenic cells. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 2004;28:196-201.
67. França LR, Avelar GF, Almeida FF. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology* 2005;63:300-318.
68. França LR, Hess RA. Structure of the Sertoli cell. In: Michael Skinner, Michael Griswold, eds. *Sertoli cell Biology*. San Diego - California: Elsevier Academic Press, 2005:19-40.
69. França LR, Ogawa T, Avarbock MR, Brinster RL, Russell LD. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biol Reprod* 1998;59:1371–1377.
70. França LR, Russell LD. The testis of domestic animals. In: Martínez F, Regadera J, eds. *Male Reproduction: A multidisciplinary overview*. Madrid, Spain: Churchill Livingston, 1998:197–219.
71. França LR, Russell LD. The testis of domestic animals. In: Martínez F, Regadera J, eds. *Male Reproduction: A multidisciplinary overview*. Madrid, Spain: Churchill Livingston, 1998:197-219.
72. França LR, Ye SJ, Ying L, Sandberg M, Russell LD. Morphometry of rat germ cells during spermatogenesis. *Anat Rec*. 1995;241:181-204.
73. França LR. Daily sperm production in Piau boars estimated from Sertoli cell population and Sertoli cell index. In: Dieleman SJ, eds. *Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*. Elsevier Science Ltd, 1992:1716–1718.
74. Grimwood IR, eds. Notes of the distribution and status of some Peruvian mammals in 1968. 1st ed. New York Zoological Society, Bronx; 1969.
75. Hall ER, Dalquest WW. The mammals of Veracruz, University of Kansas Publication, Museum of Natural History. 1963;14:165–362.

76. Henrique-Silva F, Cervini M, Rios WM, Lusa AL, Lopes A, Gonçalves D, Fonseca D, Franzin F, Damazio J, Scaramuzzi K, Camilo R, Ferrarezi T, Liberato M, Mortari N, Matheucci E Jr. Rapid identification of capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) using allele-specific PCR. *Braz J Biol.* 2007; 67:189-190.
77. Hess RA, França LR, Spermatogenesis. Cycle of the seminiferous epithelium. In: Cheng CY, eds. Molecular mechanisms in spermatogenesis. Landes Bioscience; 2007: 1–15.
78. Hochereau-de-Reviers MT, Lincoln GA. Seasonal variation in the histology of the testis of the red deer, *Cervus elephas*. *J Reprod Fertil.* 1978;54:209–213.
79. Holsberger DR, Cooke PS. Understanding the role of thyroid hormone in Sertoli cell development: a mechanistic hypothesis. *Cell Tissue Res.* 2005;322:133-140.
80. Johnson L, Neaves WB. Age-related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules and sperm production in stallions. *Biol Reprod.* 1981;24:703–712.
81. Johnson L, Varner DD, Robert ME, Smith TL, Keillor GE, Scrutchfield WL. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. *Anim Reprod Sci.* 2000;60–61:471–480.
82. Juhani Ojasti. Wildlife Utilization in Latin America: Current Situation and Prospects for Sustainable Management. In: Juhani Ojasti, eds. Rodents. Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO, 1996.
83. Kerr JB, Loveland KL, O'Bryan MK, Kretser DM. Cytology of the testis and intrinsic control mechanisms. In: Neill JD, eds. Physiology of Reproduction. Elsevier; 2006:827-947.
84. Leal MC, França LR. Slow increase of Sertoli cell efficiency and daily sperm production causes delayed establishment of full sexual maturity in the rodent Chinchilla lanigera. *Theriogenology* 2009;71:509-18.

85. Leal MC, França LR. The Seminiferous Epithelium Cycle Length in the Black Tufted-Ear Marmoset (*Callithrix penicillata*) Is Similar to Humans. *Biol Reprod.* 2006; 74:616-624.
86. Leopold A. Wildlife of Mexico, the game birds and mammals. 1st ed. Berkeley: University of California Press;1959.
87. Mares MA, Willig MR, Streilein KE, Lacher TE. The mammals of northeastern Brazil: a preliminary assessments. *Annals of the Carnegie Museum of Natural History.* 1981;50:81-110.
88. Matamoros Y. Anatomia e histología del sistema reproductor del tepezcuinte (*Cuniculus paca*). *Ver. Biol. Trop* 1981;29:155-164.
89. Menezes DJA, Carvalho MAM, Assis Neto AC, Oliveira MF, Farias EC, Miglino MA, Medeiros GX. Morphology of the external male genital organs of agouti (*Dasyprocta aguti*. Linnaeus, 1766). *Braz j vet res anim Sci* 2003;40:148-153.
90. Neves ES, Chiarini-Garcia H, França LR, Comparative testis morphometry and seminiferous epithelium cycle length in donkeys and mules. *Biol Reprod.* 2002; 67:247-455
91. Nowak RM. Walker's Mammals of the World. 1st ed. Baltimore: The Johns Hopkins press; 1999.
92. Ojasti J. Wildlife Utilization in Latin America: Current Situation and Prospects for Sustainable Management. 1ed. Food and Agriculture Organization of the United Nations: FAO; 1996.
93. Orsi AM, Simões K, Domeniconi RF, da Cruz C, Machado MRF, Filho JG, Vas Deferens Surface Epithelium of *Agouti paca*: Fine Structural Features. *Int. J. Morphol.* 2009;27: 89-96.

94. Orth JM, Gunsalus GL, Lamperti AA. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology*. 1988;122:787-94.
95. Pachaly JR, Werner PR. Restraint of the paca (Agouti paca) with ketamine hydrochloride, acetylpromazine maleate, and atropine sulfate. *J Zoo Wildl Med*. 1998;29:303-6.
96. Paula TAR, Thesis. Avaliação histológica e funcional do testículo de capivaras adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 1999.
97. Rocha DCM, Debeljuk L, Franca LR. Exposure to constant light during testis development increases daily sperm production in adult Wistar rats. *Tissue & Cell*. 1999;31:372-379.
98. Roosen-Runge EC. Germinal-cell loss in normal metazoan spermatogenesis. *J Reprod Fertil*. 1973;35:339-348.
99. Russell LD, Clermont Y. Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats. *Anat Rec*. 1977;187:347-66.
100. Russell LD, Ren HP, Sinha Hikim I, Schulze W, Sinha Hikim AP. 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*. 1990;188:21–30.
101. Russell LD, Ren HP, Sinha Hikim I, Schulze W, Sinha Hikim AP. 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*. 1990;188: 21-30.

102. Segatelli TM, França LR, Pinheiro PF, Alemida CC, Martinez M, Martinez FE. Spermatogenic cycle length and spermatogenic efficiency in the gerbil (*Meriones unguiculatus*). J Androl. 2004;25:872-880.
103. Setchell BP, Breed WG. Anatomy, vasculature and innervation of the male reproductive tract. In: Neill JD, eds. Physiology of Reproduction. Elsevier, 2006:771-825.
104. Sharpe RM, Fraser HM, Brougham MF, McKinnell C, Morris KD, Kelnar CJ, Wallace WH, Walker M. Role of the neonatal period of pituitary-testicular activity in germ cell proliferation and differentiation in the primate testis. Hum Reprod. 2003;18:2110-2117.
105. Short RV. The testis: the witness of the mating system, the site of mutation and the engine of desire. Acta Paediatr Suppl. 1997;422:3-7.
106. Silva RC, Costa GM, Andrade LM, França LR. Testis stereology, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in the ocelot (*Leopardus pardalis*). Theriogenology. 2009; in press.
107. Sinha Hikim AP, Bartke A, Russell LD. Morphometric studies on hamster testes in gonadally active and inactive states: light microscope findings, Biol. Reprod. 1988;39:1225–1237.
108. Sinha Hikim AP, Chakraborty J, Jhunjhunwala JS. Germ cell quantitation in human testicular biopsy. Urol Res. 1985;13:111-115.
109. Smith NJ. Agouti and babassu. Oryx 1974;12:581-582.
110. Smythe N. The natural history of the Central American agouti (*Dasyprocta punctata*). Smithson Contr Zool 1978;257:1-52.

111. Smythe, N. Steps toward domesticating the paca and prospects for the future. In: Robinson JG, Redford KH, eds. Chicago: Neotropical Wildlife Use and Conservation. University of Chicago Press; 1991:202-216
112. van Haaster LH, de Rooij DG. Spermatogenesis is accelerated in the immature Djungarian and Chinese hamster and rat. *Biol Reprod.* 1993;49:1229-1235.
113. Weinbauer GF, Aslam H, Krishnamurthy H, Brinkworth MH, Einspanier A, Hodges JK. Quantitative analysis of spermatogenesis and apoptosis in the common marmoset (*Callithrix jacchus*) reveals high rates of spermatogonial turnover and high spermatogenic efficiency. *Biol Reprod.* 2001;64:120-126.
114. Wildt DE. Lions, tigers, and pandas, oh my. *J Androl.* 2005;26:452-454

## 7. Tables

**Table 1** - Biometric and testis stereological data in agouti (*Dasyprocta sp*) and paca (*Agouti paca*) (mean  $\pm$  SEM)

Parameters	<i>Dasyprocta leporina</i>	<i>Agouti paca</i>
Body weight (kg)	2.5 $\pm$ 0.1	5.4 $\pm$ 0.5
Testis weight (g)	4.1 $\pm$ 0.6	5.9 $\pm$ 1.1
Gonadosomatic index (%)	0.33 $\pm$ 0.01	0.22 $\pm$ 0.01
Testis parenchyma volume density (%)		
Tubular compartment	91.4 $\pm$ 0.7	93.4 $\pm$ 0.8
Tunica propria	4.9 $\pm$ 0.2	3.2 $\pm$ 0.1
Seminiferous epithelium	80.5 $\pm$ 1.2	84.7 $\pm$ 1
Lumen	6 $\pm$ 0.8	5.5 $\pm$ 0.8
Intertubular compartment	8.6 $\pm$ 0.7	6.6 $\pm$ 0.8
Leydig cell	2.2 $\pm$ 0.3	1.6 $\pm$ 0.5
Blood vessels	1.2 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.1
Connective tissue	1.5 $\pm$ 0.3	0.8 $\pm$ 0.3
Tubular diameter ( $\mu$ m)	193 $\pm$ 6	185 $\pm$ 5
Seminiferous epithelium height ( $\mu$ m)	74 $\pm$ 3	72 $\pm$ 2
Tubular length per gram of testis (m)	32 $\pm$ 2	35 $\pm$ 2
Total tubular length per testis (m)	118 $\pm$ 18	172 $\pm$ 19

**Table 2** - Relative frequencies of the stages and phases of the seminiferous epithelium cycle in agouti (*Dasyprocta sp*) and paca (*Agouti paca*) (mean  $\pm$  SEM)

Stages and phases of the seminiferous epithelium cycle	Frequencies (%)	
	<i>Dasyprocta leporina</i>	<i>Agouti paca</i>
Stage 1	18.9 $\pm$ 1.1	23.0 $\pm$ 1.8
Stage 2	15.1 $\pm$ 0.9	12.3 $\pm$ 0.9
Stage 3	11.4 $\pm$ 1.3	9.7 $\pm$ 0.5
Stage 4	14.3 $\pm$ 1.2	11.9 $\pm$ 0.8
Stage 5	9.2 $\pm$ 1.3	7.6 $\pm$ 1.0
Stage 6	7.1 $\pm$ 0.8	7.0 $\pm$ 0.2
Stage 7	4.1 $\pm$ 0.3	6.9 $\pm$ 1.3
Stage 8	19.9 $\pm$ 1.0	21.6 $\pm$ 2.0
Pre-meiotic phase <sup>1</sup>	45.4 $\pm$ 1.5	45 $\pm$ 2.0
Meiotic phase <sup>2</sup>	14.3 $\pm$ 1.3	11.9 $\pm$ 0.8
Post-meiotic phase <sup>3</sup>	40.3 $\pm$ 1.4	43.1 $\pm$ 1.6

<sup>1</sup> After spermiation and prior to metaphase.

<sup>2</sup> Meiosis I through meiosis II.

<sup>3</sup> After completion of meiosis until spermiation.

**Table 3** - Length (days) of seminiferous epithelium cycle in agouti (*Dasyprocta sp*) and paca (*Agouti pacas*) (mean  $\pm$  sem)

Species	Animal	Time after injection	Most advanced germ cell type labelled	Stage of the cycle	Number of cycles traversed	Cycle length based on labelling in leptotene
<i>Dasyprocta leporina</i>	1	1 hour 20.85 days <sup>d</sup>	PI/L <sup>a</sup> El <sup>b</sup>	1 2	- 2.20	- 9.48
	2	1 hour 20.86 days <sup>d</sup>	PI/L <sup>a</sup> El <sup>b</sup>	1 2	- 2.18	- 9.55
Mean duration of the cycle based on PI/L = 9.52 $\pm$ 0.03 days.						
<i>Agouti pacas</i>	1	1 hour 18.89 days <sup>d</sup>	PI/L <sup>a</sup> R <sup>c</sup>	1 7	- 1.61	- 11.77
	2	1 hour 18.90 days <sup>d</sup>	PI/L <sup>a</sup> R <sup>c</sup>	1 7	- 1.65	- 11.44
	3	1 hour 18.91 days <sup>d</sup>	PI/L <sup>a</sup> R <sup>c</sup>	1 7	- 1.69	- 11.20
Mean duration of the cycle based on PI/L = 11.47 $\pm$ 0.17 days.						

<sup>a</sup> PI/L, Preleptotene/leptotene primary spermatocytes.

<sup>b</sup> El, elongated spermatids.

<sup>c</sup> R, round spermatids.

<sup>d</sup> Total time after thymidine injection minus 1 hour.

**Table 4** - Cell counts, cell ratios and sperm production in agouti (*Dasyprocta sp*) and paca (*Agouti pacas*) (mean  $\pm$  SEM)

Parameters	<i>Dasyprocta leporina</i>	<i>Agouti pacas</i>
Round spermatids : pachytene spermatocyte	3.0 $\pm$ 0.1 : 1	3.15 $\pm$ 0.3
Round spermatids : Sertoli cell nucleoli	9.2 $\pm$ 0.9 : 1	10.9 $\pm$ 1.2 : 1
Sertoli cell number per gram of testis (x10 <sup>6</sup> )	57 $\pm$ 6	43 $\pm$ 3
Sertoli cell number per testis (x10 <sup>6</sup> )	204 $\pm$ 30	204 $\pm$ 13
Daily sperm production per gram of testis (x10 <sup>6</sup> )	52 $\pm$ 2	39 $\pm$ 2
Daily sperm production per testis (x10 <sup>6</sup> )	201 $\pm$ 38	196 $\pm$ 27

**Table 5** - Leydig cell stereology in agouti (*Dasyprocta sp*) and paca (*Agouti pacas*) (mean  $\pm$  SEM)

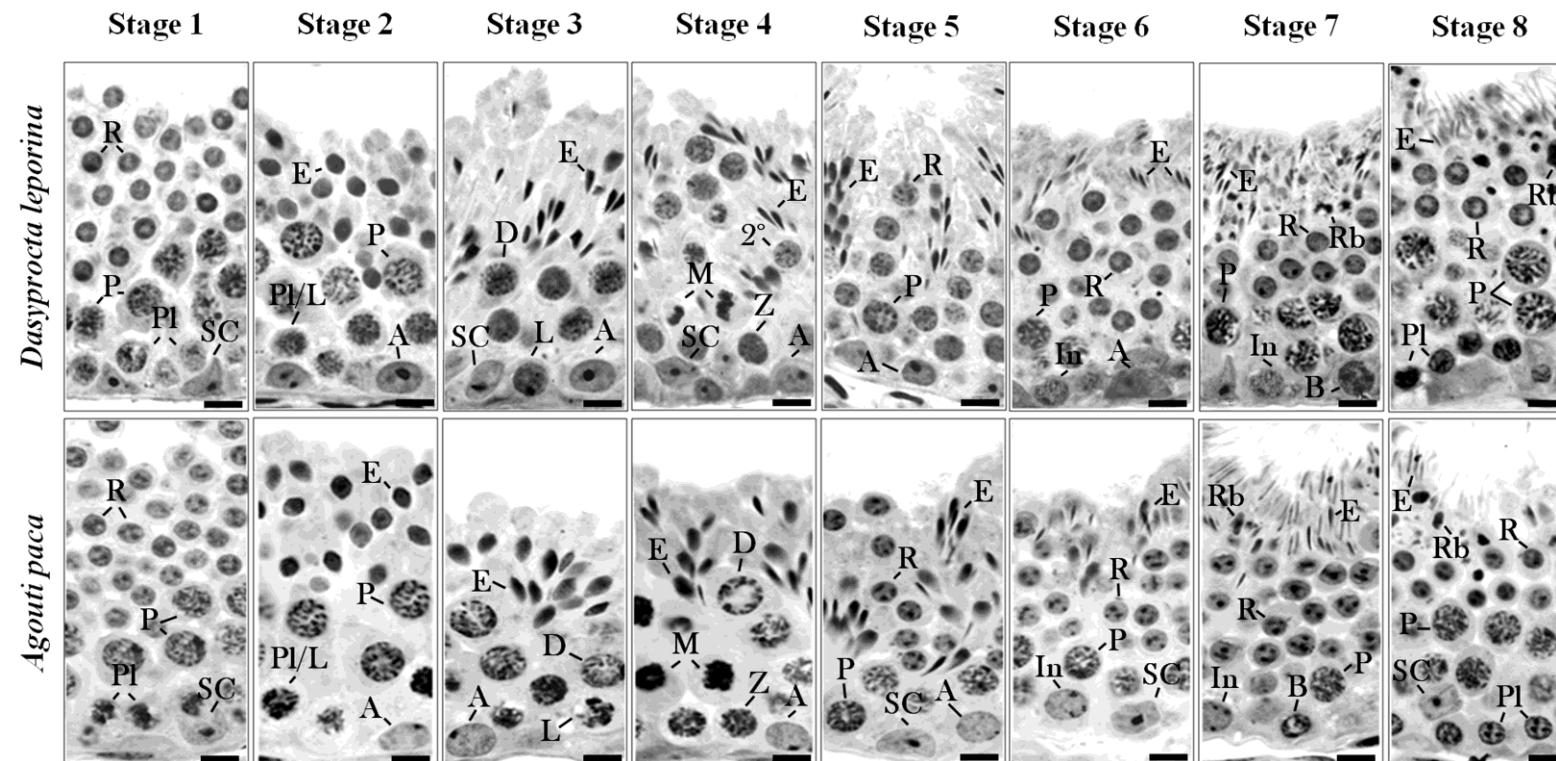
Parameters	<i>Dasyprocta leporina</i>	<i>Agouti pacas</i>
Nuclear diameter ( $\mu$ m)	8.2 $\pm$ 0.1	7.2 $\pm$ 0.2
Leydig cell volume ( $\mu$ m <sup>3</sup> )	1230 $\pm$ 70	960 $\pm$ 130
Nucleus volume ( $\mu$ m <sup>3</sup> )	280 $\pm$ 12	200 $\pm$ 13
Cytoplasm volume ( $\mu$ m <sup>3</sup> )	950 $\pm$ 60	760 $\pm$ 120
Leydig cell number per testis (x10 <sup>6</sup> )	70 $\pm$ 19	74 $\pm$ 34
Leydig cell number per gram of testis (x10 <sup>6</sup> )	18 $\pm$ 3	17 $\pm$ 5

**Table 6** - Comparative parameters related to the testis stereology and spermatogenic events in several sexually mature rodent species

Parameters	Suborder Hystricomorpha				Suborder Myomorpha			
	Agouti	Paca	Chinchilla <sup>a</sup>	Capybara <sup>b</sup>	Gerbil <sup>c</sup>	Hamster <sup>d</sup>	Rat <sup>e</sup>	Mouse <sup>f</sup>
Body weight (kg)	2.5	5.4	0.5	54.1	0.08	0.16	0.414	0.026 - 0.039
Testis weight (g)	4.1	5.9	2.5	31.7	0.54	1.7	1.57	0.095 - 0.113
Gonadosomatic index (%)	0.33	0.22	0.8	0.12	0.72	2.13	0.76	0.76-0.55
Seminiferous Tubule (%)	91	93	95	50	92	93	89	91 - 93
Leydig cell (%)	2.2	1.6	1.0	32.1	3.0	2.7	1.4	3.7-5.3
Leydig cell size ( $\mu\text{m}^3$ )	1230	960	1381	2029	1148	1092	1207	1021 - 1450
Leydig cell number per gram of testis ( $\times 10^6$ )	18	17	7.3	186	28	55	12.6	29-49
Pre-meiotic phase <sup>1</sup> (%)	46	45	50	45	55	25.8	24	22
Meiotic phase <sup>2</sup> (%)	14	12	9	15	9	7.5	6	9
Post-meiotic phase <sup>3</sup> (%)	40	43	41	41	36	66.7	71	69
Meiotic index <sup>4</sup>	3.0 (26%)	3.15 (21%)	3 (25%)	2.1 (48%)	2.8 (30%)	3.3 (17%)	3.4 (15%)	2.3 - 2.8 (43-30%)
Spermatogenic cycle length (days)	9.5	11.5	10.2	11.9	10.6	8.7	12.9	8.6 - 8.9
Total duration of spermatogenesis (days)	42.8	51.6	45.8	53.5	47.7	39.2	58	38.7 - 40
Sertoli cells per gram of testis ( $\times 10^6$ )	57	43	44	19	28	44.5	27	39 - 41
Round spermatids per Sertoli cell	9.2	10.9	14.0	5.6	12.6	8.2	8.0-10.3	10.5 - 11.5
Daily sperm production per gram of testis ( $\times 10^6$ )	52	39	61	10	33	24	17-24	45 - 48

<sup>1</sup>After spermiation and prior to metaphase.<sup>2</sup>Meiosis I through meiosis II.<sup>3</sup>After completion of meiosis until spermiation.<sup>4</sup>Measured as the number of round spermatids produced per pachytene primary spermatocyte.**References**<sup>a</sup>Leal and França, 2008 and 2009.<sup>b</sup>Paula et al., 1999.<sup>c</sup>Segatelli et al., 2004.<sup>d</sup>Sinha Hikim et al., 1988 ; Van Haaster and De Rooij, 1993.<sup>e</sup>Clermont and Harvey, 1965; Rocha et al., 1999; França, 2007.<sup>f</sup>Clermont and Trott, 1969; Avelar et al, 2004.

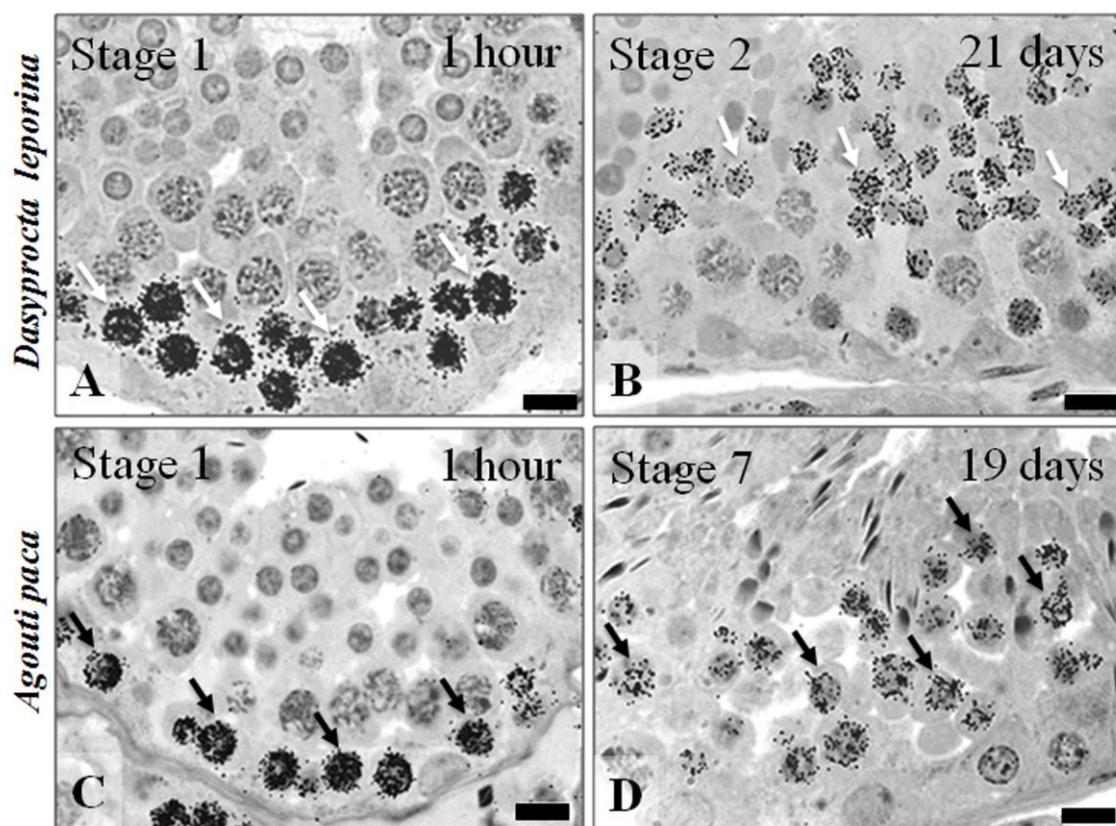
### 8. Figures and Legends for tables and figures



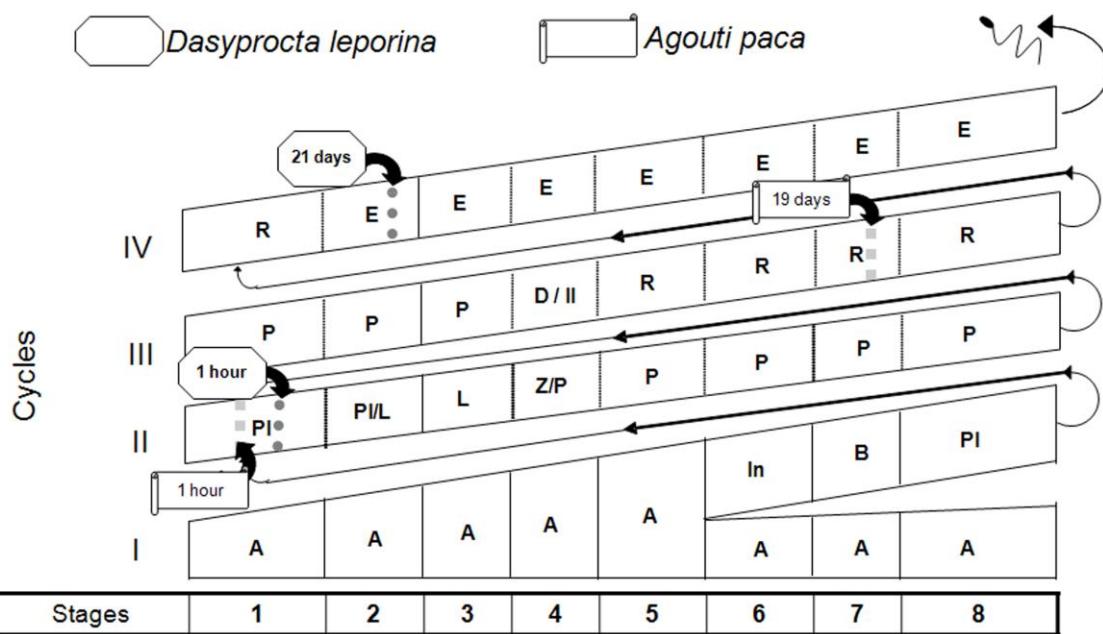
**Figure 1**

**Figure 1** - Stages 1 to 8 of the seminiferous epithelium cycle characterized based on tubule morphology methodology in agouti (*Dasyprocta sp*; top panels) and paca (*Agouti paca*; bottom panels): Type A spermatogonia (A); intermediate spermatogonia (In); Type B spermatogonia (B); pre-

leptotene (Pl); leptotene (L); zygotene (Z); pachytene (P); diplotene (D) primary spermatocytes; meiotic figure (M); secondary spermatocyte ( $2^o$ ); round spermatids (R); elongating/elongated spermatids (E); residual bodies (Rb); and Sertoli cell (SC); Bar = 10 $\mu$ m



**Figure 2** - Most advanced germ cells labeled following intratesticular injections of tritiated thymidine in agouti (*Dasyprocta* sp; white arrows) and paca (*Agouti pacá*; black arrows); Two time intervals were considered for agouti [1 hour (A) and 21 days (B)] and paca [1 hour (C) and 19 days (D)]. Bar = 10 $\mu$ m



**Figure 3** - Germ cell composition and the most advanced germ cell type labeled in the eight cycle stages at different time periods in agouti (*Dasyprocta sp*; 1 hour and 21 days) and paca (*Agouti pacas*; 1 hour and 19 days) following tritiated thymidine injections; Arabic numerals indicate stage; Roman numerals indicate the spermatogenic cycle; Letters within each column indicate the germ cell types in each stage of the cycle; A, Type A spermatogonia; In, intermediate spermatogonia; B, Type B spermatogonia; Pl, pre-leptotene spermatocytes; L, leptotene; Z, zygotene; P, pachytene; D, diplotene; II, meiotic division; R, round spermatids; E, elongated spermatids

## 4. DISCUSSÃO

## 4 – DISCUSSÃO

Na região Amazônica, são várias as espécies selvagens que fazem parte dos hábitos alimentares de populações rurais. Dentre elas podem ser destacadas o cateto (*Tayassu tajacu*), a paca (*Agouti paca*) e a cutia (*Dasyprocta leporina*) (Curtis & Saavedra, 1991; Baía Junior, 2006; Guimarães et al., 2008). Em 20 de fevereiro de 2008, estas três espécies silvestres com alto potencial econômico despertaram a atenção especial de criadores locais devido à regulamentação, realizada pelo IBAMA, sobre a criação, comercialização e abate das mesmas (IN169 – IBAMA, 2008). Com o intuito de fornecer subsídios para a criação comercial destas espécies, estudos sobre a biologia reprodutiva destes mamíferos silvestres foram realizados através de colaborações entre a Universidade Federal de Minas Gerais, a Universidade Federal do Pará e a EMBRAPA/PA. Neste contexto, o presente estudo está sendo o primeiro a investigar detalhadamente a estrutura testicular, a duração da espermatogênese e as eficiências da célula de Sertoli e espermatogênica em catetos, cutias e pacas.

A proporção entre os compartimentos tubular (espermatogênico) e intertubular (esteroidogênico) é bastante variável em mamíferos (França & Russell, 1998; Godinho, 1999; Neves, 2001; Almeida, 2002), sendo um dos principais fatores responsáveis pelas diferenças observadas na eficiência de produção espermática entre as várias espécies (França & Russell, 1998; França et al, 2000; Johnson et al, 2000; Hess & França, 2007). Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que a estrutura testicular em cutias, pacas e no cateto são muito diferentes quanto à proporção de túbulos seminíferos presentes no parênquima testicular. Em cutias e pacas, verificou-se que os percentuais de túbulos seminíferos estão entre os mais altos (>90%) quando comparados com outros mamíferos já investigados (França and Russell, 1998; Johnson et al, 2000; Hess & França, 2007), enquanto o espaço ocupado pelas células de Leydig é muito pequeno (~2%). Já em catetos, apesar de apresentarem quinze por cento a menos de túbulos seminíferos, o espaço ocupado pelas células de Leydig é aproximadamente sete vezes maior do que os valores encontrados para as duas espécies de roedores neotropicais acima citadas.

De acordo com Fawcett e colaboradores (1973), o arranjo e a proporção dos elementos constituintes do espaço ou compartimento intertubular nas diferentes espécies de mamíferos estudadas seguem três padrões distintos: (I) espécies nas quais as células de Leydig e o tecido conjuntivo ocupam área muito pequena no compartimento intertubular, contrastando com extensos sinusóides linfáticos ou espaços linfáticos (ex: rato, camundongo, hamster, guinea pig e chinchilla); (II) espécies que apresentam grupos de células de Leydig espalhados em abundante tecido conjuntivo frouxo, o qual é drenado por um vaso linfático localizado central ou excentricamente no espaço intertubular (ex: bovino, ovino, macaco e homem); e (III) espécies nas quais abundantes agrupamentos de células de Leydig ocupam grande parte do compartimento intertubular, apresentando pouco tecido conjuntivo e vasos linfáticos (ex: suínos e zebra). Mais recentemente, observou-se que as capivaras apresentam organização do compartimento intertubular com características do padrão dos tipos I e III (Paula, 1999), mostrando que

a classificação estabelecida por Fawcett e colaboradores não é ainda definitiva (Russell, 1996). Assim, a análise histológica e morfométrica do compartimento intertubular em cutias e pacas sugere que, apesar de não apresentarem abundância de vasos/sinusóides linfáticos, nestas espécies o arranjo deste compartimento do testículo é mais próxima da classificação do tipo I citada por Fawcett et al. (1973), enquanto o arranjo do compartimento intertubular em catetos segue padrão totalmente diferente daquele já caracterizado para outros mamíferos. Pois, nos catetos observa-se grande quantidade de células de Leydig e distribuição peculiar das mesmas ao redor dos túbulos seminíferos, delimitando externamente os lóbulos testiculares contendo estes túbulos.

As células de Leydig e seus produtos são importantes para que ocorra o desenvolvimento completo da espermatogênese (Ewing and Zirkin, 1983; Deslypere & Vermeulen, 1984; De Gendt et al, 2004) e são também fundamentais para a função das glândulas sexuais anexas e estratégias reprodutivas (Setchell and Breed, 2006; Kerr et al, 2006). Na maioria dos mamíferos investigados, o número de células de Leydig por grama de testículo situa-se entre 20 e 40 milhões (Russell, 1996; França & Russell, 1998, Hess & França, 2007). O menor número de células de Leydig por grama de testículo citado é do guinea pig (6 milhões, Mori et al., 1980), enquanto para o javali foram encontrados 157 milhões de células de Leydig por grama de parênquima testicular (Almeida, 2002). Para o tamanho/volume individual da célula de Leydig, os dados disponíveis na literatura mostram que o mesmo pode variar de  $\sim 400\mu\text{m}^3$  em ovinos e javalis (Lunstra & Schanbacher, 1988; Almeida, 2002) a  $\sim 5000\mu\text{m}^3$  em eqüinos (Johnson & Neaves, 1981), estando o valor observado para a maioria dos mamíferos investigados situado na faixa compreendida entre 1000 e  $2000\mu\text{m}^3$  (Almeida, 2002). Em cutias e pacas, o número destas células somáticas esteroidogênicas por grama de testículo assemelha-se aos valores encontrados para outras espécies de roedores já investigadas (10 a 30 milhões). Padrões similares a outros roedores e mamíferos em geral também foram observados para o volume individual das células de Leydig. Em catetos, embora o tamanho das células de Leydig possa diferir dos valores observados para suínos domésticos e javalis (França et al, 2005; Almeida et al, 2006), o número destas células por grama de testículo nestas três espécies é bastante elevado e superior às espécies investigadas até o momento (Hess & França, 2007). Particularmente em catetos, o número surpreendentemente elevado de lipídios encontrados em células de Leydig faz desta espécie um modelo bastante interessante para se investigar a esteroidogênese em mamíferos.

A eficiência da espermatogênese, definida como o número de espermatozoides produzidos diariamente por grama de parênquima testicular (Johnson et al., 2000), é o melhor parâmetro para se efetuar estudos comparativos entre as diferentes espécies de mamíferos. A análise ampla da literatura permite agrupar a produção espermática diária por grama de testículo em no mínimo três patamares distintos: espécies com eficiência espermatogênica considerada alta e com produção acima de 25 milhões como o jumento, camundongo, caprino, coelho e o suíno doméstico; espécies com eficiência espermatogênica considerada média, que produzem em torno de 15 a 25 milhões de espermatozoides, dentre as quais se encontram o hamster, rato, eqüino e o gato; e espécies com produção espermática abaixo de 15 milhões, como, por exemplo, o

bovino, a capivara e o homem (Leal, 2004). Neste cenário, conforme ocorre para a maioria das espécies de roedores, a produção espermática diária por grama de testículo em pacas e cutias situa-se no patamar considerado de alta ou mesmo muito alta eficiência espermatogênica. Já em catetos, a produção espermática diária por grama de testículo está situada na transição da faixa intermediária para a de alta eficiência, conforme foi também observado para suínos e javalis (Hess & França, 2007).

Pelo fato do número de células de Sertoli ser estável no animal adulto e também durante as diferentes fases do ciclo espermatogênico, estas células são utilizadas como ponto de referência para se quantificar e avaliar funcionalmente o processo espermatogênico (França e Russell, 1998; Johnson et al. 2000; França & Hess, 2005). O número total de células de Sertoli por testículo, que é estabelecido durante o período pré-púbere (Orth, 1993; França et al., 2000), e regulado principalmente pelo FSH e hormônios tireoidianos (Orth, 1993; Cooke et al., 1994; França et al., 2000; Holsberger et al., 2003), determina a magnitude da eficiência espermatogênica (Johnson et al., 2000; Hess & França, 2007). Neste contexto, os resultados do presente estudo demonstraram que a cutia, que apresentou o maior número de células de Sertoli por grama de testículo, produz diariamente mais espermatozoides por grama de testículo, quando comparada com as outras duas espécies investigadas no presente estudo. De forma bastante ilustrativa, considerando-se a duração da espermatogênese e o número de espermátides por células de Sertoli (eficiência da célula de Sertoli ou índice de célula de Sertoli) para pacas, cutias e catetos, verifica-se que uma única célula de Sertoli é capaz de liberar aproximadamente o mesmo número de espermatozoides por dia. Desta forma, o fator que mais influenciou na diferença da produção espermática entre as espécies foi o número de célula de Sertoli por grama de testículo.

A duração do ciclo do epitélio seminífero em mamíferos é tida como uma constante biológica espécie-específica (Ortavant et al., 1977; França et al., 1998; Amann & Schanbacher, 1983). Uma vez que não houve alteração na duração da espermatogênese de ratos no testículo de camundongos, estudo utilizando o transplante de espermatogônias de ratos para camundongos mostrou que a duração da espermatogênese é controlada pelo genótipo da célula germinativa (França et al., 1998). Dentre as várias dezenas de espécies de mamíferos já investigadas até o presente momento, o gambá *Didelphis albiventris* (Queiroz & Nogueira, 1992) e o roedor *Clethrionomys glareolus* (Grocock & Clark, 1976) são aquelas que apresentam a duração da espermatogênese mais longa (~78 dias) e mais curta (~30 dias), respectivamente. Trabalhos desenvolvidos até o presente momento sugerem que a duração da espermatogênese não é filogeneticamente determinada, uma vez que espécies muito próximas na escala filogenética podem apresentar a duração da espermatogênese bastante distinta. Por exemplo, na ordem Rodentia, duas espécies de hamster (o hamster chinês e o hamster Djungarian) apresentam a duração de um ciclo espermatogênico de 17 e 7,9 dias, respectivamente. Em quase metade das espécies de mamíferos já investigadas, os valores encontrados para a duração de um ciclo espermatogênico (a duração total deste processo leva aproximadamente 4,5 ciclos) ficam situados no intervalo de ~9 a ~12 dias, porém, especialmente em roedores, a duração

do ciclo espermatogênico é um pouco mais rápida e está situada na faixa de ~8 a ~12 dias (Russell et al., 1990; França & Russell, 1998; Hess & França, 2007). Assim, os valores observados para a duração do ciclo espermatogênico em cutias e pacas estão situados nessas faixas predominantes. Em catetos, apesar da eficiência espermatogênica encontrada para esta espécie ser semelhante ao citado na literatura para suínos domésticos e javalis, os mesmos apresentam duração mais longa da espermatogênese. É provável que o ritmo mais lento da célula germinativa nesta espécie seja compensado pelo maior número de células de Sertoli por grama de testículo e pela maior eficiência das células de Sertoli, em comparação com porcos domésticos e javalis (Hess & França, 2007).

A freqüência relativa dos diferentes estádios constituintes do ciclo do epitélio seminífero reflete o ritmo de evolução das células germinativas e a duração destes estádios (Clermont, 1972). Esta freqüência é considerada classicamente como uma constante para determinada espécie (Hochereau, 1963). Dados recentes na literatura sugerem que a filogenia pode estar envolvida na determinação da freqüência dos estádios do ciclo, quando os mesmos são agrupados em fases pré e pós-meióticas. Desta forma, de maneira geral, as espécies pertencentes a uma mesma Ordem ou mesmo Família apresentam freqüências mais próximas (França & Russell, 1998; Hess & França, 2007; Costa et al., 2008; Silva et al., 2009). As freqüências das fases pré e pós-meióticas em cutias e pacas apresentaram um grande equilíbrio e foram muito semelhantes para as duas espécies. Já nos catetos, a distribuição da freqüência destas fases foi diferente e, assim como o suíno e no javali, que são espécies próximas filogeneticamente, mais de cinqüenta por cento das secções transversais de túbulos apresentaram-se na fase pós-meiótica. Portanto, os resultados obtidos no presente trabalho corroboram estudos prévios, os quais sugerem que espécies filogeneticamente próximas apresentam padrão semelhante de distribuição de freqüências para as fases pré e pós-meióticas da espermatogênese.

O equilíbrio entre proliferação celular e apoptose desempenha papel muito importante na regulação do número de células espermatogênicas no epitélio seminífero. Particularmente na fase espermatogonal, o mecanismo homeostático de regulação de apoptoses é considerado densidade-dependente, limitando a quantidade de células germinativas que entram na fase meiótica a um número que possa ser suportado pelas células de Sertoli disponíveis (Huckins, 1978; De Rooij & Lok, 1987; Sharpe, 1994; De Rooij, 1998). De uma outra forma, este mecanismo de regulação numérica das células germinativas pode ser traduzido como uma competição por fatores de crescimento ou outros fatores importantes para a progressão destas células durante a espermatogênese (Jacobson et al., 1997). Em mamíferos é usual observar perda celular em torno de 25% na fase meiótica (Roosen-Runge, 1973; França & Russell, 1998; Johnson et al., 2000). A literatura considera que as apoptoses que ocorrem na meiose fazem parte de mecanismo de eliminação de células com cromossomos anormais ou aberrantes (Sinha-Hikim et al, 1985; Weinbauer et al, 2001; Baum et al., 2005; Roosen-Runge, 1973; Sharpe, 1994), os quais são detectados através de mecanismos de *checkpoints* (Blanco-Rodriguez, 2001). O índice obtido pela razão entre espermátides arredondadas recém-formadas e espermatócitos primários em paquíteno (índice meiótico) indica as perdas celulares que

ocorrem durante a prófase meiótica. Desta forma, quanto menor o índice meiótico, maiores são as perdas celulares que acontecem durante a meiose e, consequentemente, menor quantidade de espermárides arredondadas serão formadas, influenciando assim na capacidade de suporte das células de Sertoli. Por exemplo, a capivara apresenta baixo índice meiótico (2,1) e baixa eficiência de célula de Sertoli (5,6) (Paula, 1999). Em contraste, o coelho apresenta alto índice meiótico (3,3) e alta eficiência de célula de Sertoli (12,2) (Amann, 1970). No presente estudo, a cutia apresentou menor índice meiótico (3) e eficiência da célula de Sertoli (9,2), enquanto o cateto mostrou maior índice meiótico (3,2) e eficiência desta célula (12,1). Os valores encontrados para perdas de células germinativas durante a meiose em catetos, cutias e pacas, estão no mesmo patamar observado (20-30%) para a maioria das espécies de mamíferos já investigados (Roosen-Runge, 1973; França e Russell, 1998; Johnson et al. 2000; França et al., 2005; Hess & França, 2007).

Existe grande variação para o índice gonadossomático (IGS) em mamíferos. O mais completo trabalho de revisão neste aspecto, envolvendo mais de 130 diferentes espécies de mamíferos (Kenagy & Trombaluk, 1986) relata que o IGS pode variar de 0,01% em baleias a 8,4% no *Tatera afra*, que é um roedor da família Cricetidae. Segundo estes mesmos autores, em geral, as espécies que apresentam menor peso corporal alocam maior percentual de massa corporal para o tecido testicular, despendendo assim mais energia para este órgão e, consequentemente, para a reprodução. Quando o IGS e a eficiência espermatogênica são levados em consideração no presente trabalho, observamos que, enquanto a cutia apresentou o maior IGS e maior eficiência espermatogênica, o cateto apresentou os menores índices de IGS e produção espermática por grama de testículo. Além do peso corporal, existe consenso de que maior variação para o peso testicular é observada para espécies que não sofreram seleção contínua para a reprodução (Johnson et al., 1980; Clemons et al., 1995; Paula, 1999; Godinho, 1999; Almeida, 2002). Provavelmente, como resultado de extensiva seleção reprodutiva ao longo dos séculos para as diferentes raças de suínos domésticos, o índice gonadossomático para esta espécie doméstica tenha atingido praticamente o dobro do valor encontrado para catetos. A possibilidade do tamanho do testículo estar correlacionado com o comportamento sexual também é considerada na literatura. Assim, existem fortes evidências para uma grande variedade de espécies de mamíferos e não mamíferos, demonstrando que o tamanho relativo dos testículos é um previsor infalível do sistema de acasalamento (Short, 1997). Segundo este autor, pelo fato da competição ser por maior quantidade de sêmen depositado no trato genital feminino, as espécies que apresentam comportamento sexual promíscuo ou poligâmico feminino (vários machos cruzam com a mesma fêmea num mesmo ciclo estral) tendem a mostrar relativamente testículos maiores do que aquelas que são monogâmicas ou poligâmicas masculinas. Neste contexto, o presente estudo reforça esta teoria uma vez que em pacas e cutias a relação entre a massa testicular e peso corporal (índice gonadossomático) é baixa, e estas espécies apresentam um sistema de acasalamento monogâmico (Eisenberg, 1981). Já para os catetos, o comportamento reprodutivo precisa ainda ser melhor investigado.

Porém, é sabido que os mesmos vivem em grupos estáveis e que o macho dominante cruza com todas as fêmeas (Bissonete, 1982).

## 5. PERSPECTIVAS

## 5 – PERSPECTIVAS

Pelo fato da distribuição e citoarquitetura das células de Leydig em catetos ter sido bastante peculiar, conforme será comentado a seguir, esta espécie apresenta-se como interessante modelo experimental para se investigar o desenvolvimento, a estrutura e a função testiculares, incluindo-se estudos envolvendo a ontogenia e diferenciação gonadal, o nicho das espermatogônias tronco, e as interações celulares no testículo. Ainda neste contexto, a partir dos resultados encontrados para o testículo, estudos abordando a caracterização da estrutura ovariana também podem ser realizados em fêmeas desta espécie. Além disso, estudo longitudinal acerca do desenvolvimento do testículo em catetos, desde a diferenciação gonadal até o estabelecimento da puberdade, permitirão investigar se os mecanismos envolvidos na organogênese e citoarquitetura do testículo são semelhantes ou não em comparação com as espécies de mamíferos melhor investigadas neste aspecto, tais como por exemplo o camundongo e o rato. Do ponto de vista estrutural, cortes longitudinais do testículo avaliando diferentes regiões, desde o mediastino testicular até a túnica albugínea, permitirão avaliar se as células de Leydig seguem um mesmo padrão quanto à distribuição. Pois este aspecto não foi investigado nos catetos adultos por nós estudados. Num outro aspecto, a grande quantidade de lípides encontrada nas células de Leydig de catetos torna esta espécie um atraente modelo para se investigar a esteroidogênese.

Em relação às células-tronco espermatogoniais, atualmente é sabido que as mesmas estão preferencialmente localizadas num microambiente especializado denominado 'nicho', que é essencial para a manutenção e auto-renovação destas importantes células espermatogênicas. No testículo de mamíferos, os principais componentes do nicho incluem as células de Sertoli, fatores de crescimento produzidos por esta célula, a membrana basal, e estímulos da rede vascular presente no espaço ou compartimento intertubular (Hofmann, 2008). Baseados principalmente em características morfológicas, trabalhos recentes sugerem que as espermatogônias indiferenciadas (dentre elas encontram-se as espermatogônias tronco) possuem localização preferencial nos túbulos seminíferos em camundongos (Chiarini-Garcia et al., 2001), ratos (Chiarini-Garcia et al., 2003) e hamsters (Nascimento et al., 2009). Resultados semelhantes foram obtidos utilizando-se, dentre outras, técnica de transplante de células germinativas, que demonstrou que as espermatogônias indiferenciadas se localizam preferencialmente em regiões dos túbulos seminíferos adjacentes aos vasos sanguíneos e células de Leydig (Yoshida et al., 2007). À medida que estas espermatogônias se diferenciam as células resultantes se afastam dessa particular região do túbulo seminífero. Organização incomum do compartimento intertubular foi observada em catetos, especificamente em relação às células de Leydig. Desta forma, o cateto também representa um bom modelo para se investigar a influência dos elementos somáticos do testículo na distribuição das espermatogônias indiferenciadas/tronco, bem como a elucidação dos possíveis mecanismos regulatórios envolvidos na distribuição das espermatogônias tronco e, em última análise, a influência dos mesmos nos nichos espermatogoniais em mamíferos.

Conforme já foi abordado em outro tópico desta dissertação, existe um grande número de genes e produtos de genes envolvidos na regulação da descida dos testículos, como os produtos de INSL3, hormônio anti-mülleriano, receptores de andrógeno, e os genes CGRP, e aqueles envolvidos na produção de testosterona (Amann & Veeramachaneni, 2007). Outros fatores como a pressão intra-abdominal também estão envolvidos no controle da descida dos testículos (Amann & Veeramachaneni, 2007). Em pacas e cutias, os testículos podem ser encontrados tanto no canal inguinal quanto no interior do escroto. Em roedores, já se sabe que o canal inguinal não se contrai após a última fase do descenso testicular e este órgão pode rapidamente passar do escroto para a cavidade abdominal, mesmo em adultos (Setchell & Breed, 2006). Merece ser ressaltado que a razão para a descida incompleta dos testículos para o escroto é uma questão importante da biologia reprodutiva masculina que está ainda muito pouco esclarecida (Setchell & Breed, 2006). Desta forma, as duas espécies de roedores aqui investigados se apresentam como modelo em potencial para estudos envolvendo descenso e/ou termoregulação testicular em mamíferos.

Investigações mais compreensivas sobre a função testicular são essenciais para estudos comparativos e um melhor entendimento da biologia e estratégia reprodutiva. Finalmente, esperamos que o conhecimento obtido no presente estudo, acerca da estrutura e composição do testículo, eficiências das células de Sertoli e espermatogênica, bem como duração do processo espermatogênico, possa ser utilizado como subsídio na criação e exploração comercial de pacas, cutias e catetos. Permitindo também a preservação destas três importantes espécies de mamíferos silvestres da fauna brasileira.

## 6. CONCLUSÕES

## 6. CONCLUSÕES

As células de Leydig de cateto apresentam distribuição e citoarquitetura ímpar dentre as espécies de mamíferos já investigadas, e esta peculiar disposição pode fornecer importantes informações à respeito do desenvolvimento do testículo, interações celulares e regulação do nicho espermatogonial em mamíferos.

Ainda em catetos, os resultados encontrados mostraram que, embora a duração da espermatogênese seja mais alta, a eficiência espermatogênica desta espécie é semelhante aos valores obtidos para outras espécies já investigadas da família dos Suidae. Além disso, os resultados obtidos para a eficiência das células de Sertoli em catetos sugerem que esta espécie apresenta alto potencial para aumentar o seu desempenho reprodutivo.

Em comparação com outras espécies de mamíferos já investigados, bem como outros roedores da subordem Hystrichomorpha, os dados obtidos para pacas e cutias mostraram que estas duas espécies apresentam alta eficiência espermatogênica (produção espermática diária por grama de testículo). Esta alta eficiência espermatogênica resulta da combinação de alto percentual de túbulos seminíferos no parênquima testicular, alto número de células de Sertoli por grama de testículo, alta eficiência das células de Sertoli e duração relativamente curta da espermatogênese.

Finalmente, os resultados obtidos no presente trabalho permitiram o melhor entendimento da função reprodutiva das três espécies de mamíferos silvestres por nós investigadas. Apesar da cutia e da paca estar entre as maiores espécies de roedores vivos e apresentarem alto potencial econômico, poucos estudos sobre a biologia reprodutiva destes roedores silvestres havia sido realizados. Provavelmente, este conhecimento será bastante útil para programas de reprodução em cativeiro de pacas, cutias e catetos, bem como no auxílio da preservação destas espécies e estudos envolvendo a biologia reprodutiva comparada.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEGA, F; CHAVES, R; GUEDES-PINTO, H. Suiformes orthologous satellite DNAs as a hallmark of *Pecari tajacu* and *Tayassu pecari* (Tayassuidae) evolutionary rearrangements. *Micron*. 39:1281-1287. 2008.
- AHMAD, E; BROOKS, JE; HUSSAIN, H; KHAN, MH. Reproduction in eurasian wild boar in central Punjab, Pakistan. *Acta Theriologica*. 40:163-173.1995.
- ALHO, CJR. Criação e Manejo de Capivaras em Pequenas Propriedades Rurais. Brasilia: EMBRAPA. 48p. 1986.
- ALHO, CRJ. Capivaras: uma vida em família. *Ciência Hoje*. 23:64-68. 1986.
- ALHO, CRJ; CAMPOS, ZMS; GONÇALVES, HC. Ecologia de capivara (*Hidrochaeris hydrochaeris*, Rodentia) do Pantanal. I. Habitats, densidades e tamanho de grupo. *Rev. Bras. Biol.* 2:87-97. 1987.
- ALHO, CRJ; CAMPOS, ZMS; GONÇALVES, HC. Ecologia de capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*,Rodentia) do Pantanal. II. Atividade, sazonalidade, uso do espaço e manejo. *Rev. Bras. Biol.* 2:99-110. 1987.
- ALHO, CRJ; CAMPOS, ZMS; GONÇALVES, HC. Ecology, social behavior and management of the capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) in the Pantanal of Brazil. In: REDFORD, K.H.; EISENBERG, J.F. (Eds.). *Advances in Neotropical Mammalogy*. Sandhill Crane Press.163-194. 1989.
- ALMEIDA, FFL. Estrutura e função testiculares em *javalis* (*Sus scrofa scrofa*) sexualmente maduros. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 2002.
- ALMEIDA, FF; LEAL, MC; FRANÇA, LR. Testis morphometry, duration of spermatogenesis, and spermatogenic efficiency in the wild boar (*Sus scrofa scrofa*). *Biol Reprod.* 75:792-799. 2006
- AMANN, RP; ALMQUIST, JO. Reproductive capacity of dairy bulls. VI. Effect of unilateral vasectomy and ejaculation frequency on sperm reserves; aspects of epididymal physiology. *J Reprod Fertil*. 3:260-8. 1962.
- AMANN, RP. The male rabbit. IV. Quantitative testicular histology and comparisons between daily sperm production as determined histologically and daily sperm output. *Fertil Steril*. 21:662-72. 1970.
- AMANN, RP. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. *J. Androl*. 2:37-58.1981.

- AMANN, RP; SCHANBACHER, BD. Physiology of male reproduction. *J. Anim. Sci.* Suppl. 57:380-403. 1983.
- AMANN, RP; VEERAMACHANENI, DN. Cryptorchidism in common eutherian mammals. *Reproduction*. 133:541-61. 2007.
- ANDREA, MV; OLIVEIRA, C; ROCHA, GT. Cytogenetical and histological studies in testis of Tayassu tajacu (cateto), Tayassu pecari (queixada) and a natural interspecific hybrid. *J. Anim. Brred. Genet.* 118:125-133. 2001.
- ASSIS-NETO, AC; MELO, MIV; CARVALHO, MAM; MIGLINO, MA; OLIVEIRA, MF. Analise Histométrica do Desenvolvimento Testicular de Cutias (*Dasyprocta aguti*) Criadas em Cativeiro. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 40: 202-208. 2003.
- ASSIS-NETO, AC; MELO, MIV; CARVALHO, MAM; MIGLINO, MA; OLIVEIRA, MF; MENEZES, DJA; PAPA, PC; KFOURY JUNIOR, JR. Análise qualitativa do estabelecimento da espermatogênese em cutias (*Dasyprocta aguti*) criadas em cativeiros. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 40:180-184. 2003.
- BAÍA JÚNIOR, PC. Carne de animais silvestres no cardápio regional. *Jornal Beira do Rio*, Belém, 01 mar. 2006
- BAIA JUNIOR, PC; GUIMARAES, DAA. Caracterização do comércio ilegal de animais silvestres na feira livre do município de Abaetetuba, Pará, Brasil. In: XXVI Congresso Brasileiro de Zoologia, Londrina. Anais do XXVI Congresso Brasileiro de Zoologia. 2006.
- BARDIN, CW. Androgens: early attempts to evaluate Leydig cell function in man. In: PAYNE, A.H., HARDY, M.P., RUSSELL, L.D. (Eds). *The Leydig cell*. Viena: Cache River Press. 31-42. 1996.
- BARTHA, MM. Análise Microbiológica do Sêmen de Caititu (Tayassu tajacu) Criados em Cativeiro. 2009. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Belém, PA. 2009.
- BASCOM, KF; OSTRUUD, HL. Quantitative studies of testicle. II Pattern and total tubule length in the testicles of certain common mammals. *Anat. Rec.* 31:159-169. 1925.
- BAUM, JS; GEORGE, JP; MCCALL, K. Programmed cell death in the germline. *Semin Cell Dev Biol.* 16:245-259. 2005.
- BEDFORD JM; BERRIOS M; DRYDEN GL. Biology of the scrotum. IV. Testis location and temperature sensitivity. *J Exp Zool.* 224:379-388. 1982
- BERG, AK; CLAUSEN, OP; HUITFELDT, HS. The spermatogenic cycle in the blue fox (*Alopex Lagopus*): relative frequency and absolute duration of the different stages. *Int. J. Androl.* 13: 3215-3326. 1990.

- BERNDTSON, W.E. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *J.Anim. Sci.* 44: 818-883. 1977.
- BILLARD, R. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reprod Nutr Develop* 26:877-920. 1986.
- BISSONETTE, JOHN. Ecology and Ecological Behavior of Collared Peccaries in Big Bend National Park, Texas; Series 6. Washington D.C.: U.S. Department of the Interior National Parks Service. 39-43.1982.
- BLANCO-RODRÍGUEZ, J. Mitotic/meiotic checkpointsand germ cell apoptosis. In: ROBAIRE, B; CHEMES, H; MORALES, C.R. (Eds.). Andrology in the 21st Century. Montreal: Medimond.173-184. 2001.
- BLUMEN, G; MERZEL, J. Radioautografia: princípios, aplicações e técnicas. Piracicaba: Faculdade de Odontologia de Piracicaba. 1976.
- BODMER, RE; PUERTAS, P; AQUINO, R; REYES, C; FANG, T; GOTTDENKER, N. Manejo y uso sustentable de peccaries en la Amazonia Peruana. Occasional Paper of the IUCN Species Survival Commission.18. 1997.
- BORGES, E. M. Morfologia dos órgãos genitais masculinos em pacas (*Agouti paca*, Linnaeus, 1766). Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 2003.
- BOSMA, AA; DE HAAN, NA; ARKESTEIJN, GJ; YANG, F; YERLE, M; ZIJLSTRA, C. Comparative chromosome painting between the domestic pig (*Sus scrofa*) and two species of peccary, the collared peccary (*Tayassu tajacu*) and the white-lipped peccary (*T. pecari*): a phylogenetic perspective. *Cytogenet Genome Res.* 105:115-21. 2004.
- BUNDY, D.C. Photographic emulsions and processing. In: STUMPF, W.E., SOLOMON, H.F. (Eds.) Autoradiography and correlative imaging. San Diego: Academic Press. 49-57. 1995.
- BUSTOS-OBREGON, E. et al. Morphological appraisal of gametogenesis. Spermatogenic process in mammals with particular reference to man. *Andrologia.* 7:141-163. 1975.
- CARDOSO, FM. Morfologia, cinética e quantificação da espermatogênese em zebus (*Bos indicus*). Tese (Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 1981.
- CARDOSO, FM; GODINHO, HP. Cycle of the seminiferous epithelium and its duration in the zebu, *Bos indicus*. *Anim. Reprod. Sci.* 5:231-245. 1982.
- CARRETA JUNIOR, M. Avaliação morfológica do processo espermatogênico de pacas (*Cuniculus paca*, Linnaeus, 1776) adultas. 2008. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. 2008.
- CHEN, C; OUYANG, W; GRIGURA, V; ZHOU, Q; CARNES, K; LIM, H; ZHAO, GQ; ARBER, S; KURPIOS, N; MURPHY, TL; CHENG, AM; HASSELL, JA;

- CHANDRASHEKAR, V; HOFMANN, MC; HESS, RA; MURPHY, KM. ERM is required for transcriptional control of the spermatogonial stem cell niche. *Nature*. 436:1030-1034. 2005.
- CHIARINI-GARCIA, H; HORNICK, JR; GRISWOLD, MD; RUSSELL, LD. The distribution of type A spermatogonia in the mouse is not random. *Biol Reprod*. 65:1179-1185. 2001.
- CHIARINI-GARCIA, H; RAYMER, AM; RUSSELL, LD. Non-random distribution of spermatogonia in rats: evidence of niches in the seminiferous tubules. *Reproduction*. 126: 669-680. 2003.
- CLEMMONS, AJ; THOMPSON Jr., DL; JOHNSON, L. Local initiation of spermatogenesis in the horse. *Biol. Reprod.* 52:1258-1267. 1995.
- CLERMONT, V; LEBLOND, CP; MESSIER, B. Duree de cycle de l'épithelium seminal du rat. *Arch. Anat. Micr. Morph. Exp.* 48:37-55. 1959.
- CLERMONT, Y. Différenciation et evolution des cellules sexuelles: cinétique de la spermatogenèse chez les mammifères. *Arch. Anat. Microsc.* 5614:7-60. 1967.
- CLERMONT, Y; Trott, M. Duration of the cycle of the seminiferous epithelium in the mouse and hamster determined by means of <sup>3</sup>H-thymidine and radioautography. *Fert. Steril.* 20:805-817. 1969.
- CLERMONT, Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals, seminiferous epithelium cycle and spermatogonial review. *Physiol. Rev.* 52:198- 236. 1972.
- COOKE, PS; ZHAO, YD; BUNICK, D. Triiodothyronine inhibits proliferation and stimulates differentiation of cultured neonatal Sertoli cells: possible mechanism for increased adult testis weight and sperm production induced by neonatal goitrogen treatment. *Biol. Reprod.* 51:1000-1005. 1994.
- COSTA, GMJ; CHIARINI-GARCIA, H; MORATO, RG; ALVARENGA, RLLS; FRANÇA, LR. Duration of spermatogenesis and daily sperm production in the jaguar (*Panthera onca*). *Theriogenology*. 70:1136-1146. 2008.
- COUROT, M. et al. Spermatogenesis. In: JOHNSON, A.D., GOMES, W.R., VANDEMARK, N.L. (Eds.). *The testis*. New York: Academic Press. 339-432. 1970.
- CURTIS, HF; SAAVEDRA, CJ. Prospects for wildlife management in Latin American and Caribbean. In: Neotropical Wildlife Use and Conservation. ROBINSON, JG; REDFORD, KH. (Eds). University of Chicago press. 430-444. 1991.
- DE GENDT, K; SWINNEN, JV; SAUNDERS, PT; SCHOONJANS, L; DEWERCHIN, M; DEVOS, A; TAN, K; ATANASSOVA, N; CLAESSENS, F; LÉCUREUIL, C; HEYNS, W; CARMELIET, P; GUILLOU, F; SHARPE, RM; VERHOEVEN, G. A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:1327-32. 2004.

- DE ROOIJ, DG; LOK, D. Regulation of the density of spermatogonia in the seminiferous epithelium of the Chinese hamster: II. Differentiating spermatogonia. *Anat. Rec.* 217: 131-36. 1987.
- DE ROOIJ, DG. Stem cells in the testis. *Int. Jo. Exp. Path.* 79:57-80. 1998.
- DE ROOIJ, DG; GROOTEGOED, JA. Spermatogonial stem cells. *Current opinion in cell biology.* 10:694-701. 1998.
- De ROOIJ, DG; RUSSELL, LD. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *Journal of Andrology.* 21:776-98. 2000.
- DE ROOIJ, DG. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction (Cambridge, England).* 121:347-54. 2001.
- DE ROOIJ, DG. The spermatogonial stem cell niche. *Microsc Res Tech.* 72:580-585. 2009.
- DeFALCO, T; CAPEL, B. Gonad morphogenesis in vertebrates: divergent means to a convergent end. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 25:457-482. 2009.
- DESLYPERE, JP; VERMEULEN, A. Leydig cell function in normal men: effect of age, life-style, residence, diet, and activity. *J Clin Endocrinol Metab.* 59:955-62. 1984.
- DO NASCIMENTO, HF; DRUMOND, AL; DE FRANÇA, LR; CHIARINI-GARCIA, H. Spermatogonial morphology, kinetics and niches in hamsters exposed to short- and long-photoperiod. *Int J Androl.* 32:486-497. 2009.
- DYM, M. Spermatogonial stem cells of the testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:11298-11302. 1994.
- EISENBERG, JF. The mammalian radiations: An analysis of trends in evolution, adaptation, and behavior. Chicago: University of Chicago Press. 1981.
- EWING, LL; ZIRKIN, BR. Leydig cell structure and steroidogenic function. *Recent Prog Horm Res.* 39:599–635. 1983.
- FAN, X; ROBAIRE, B. Orchidectomy induces a wave of apoptotic cell death in the epididymis. *Endocrinology.* 139:2128-2136. 1998.
- FAWCETT, DW. Observations on the organization of the interstitial tissue of the testis and on the occluding cell junctions in the seminiferous epithelium. *Adv Biosci.* 10:83-99. 1973.
- FERREIRA, ACS. Determinação de puberdade em cutias (Rodentia: Dasyprotidae) criadas em cativeiro, através da quantificação das células espermáticas. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Belém, PA. 2002.

- FERREIRA, ACS; GUIMARAES, DA; LUZ-RAMOS, RS; SOUZA, PC; BATISTA, CR; OHASHI, OM. Reproductive developmental phases of male agouti (*Dasyprocta* sp.) raised in captivity determined by quantitative analysis of spermatogenic cells. *Revista Brasileira de Reprodução Animal.* 28:196-201. 2004.
- FIJAK, M; MEINHARDT, A. The testis in immune privilege. *Immunol Rev.* 213:66-81. 2006.
- FILGUEIRA, KD; MOURA, CEB; BATISTA, JS; SILVA, SMMS; OLIVEIRA, MF; ALBUQUERQUE, JFG; MIGLINO, M. A. Biometria e alterações histopatológicas em testículos de catetos (*Tayassu tajacu*) criados em cativeiro no semi-árido nordestino, Brasil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.* 42:19-25. 2005.
- FRANÇA, LR. Análise morfológica da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. Tese (Doutorado em Ciências): UFMG. 1991.
- FRANÇA, LR. Daily sperm production in Piau boars estimated from Sertoli cell population and Sertoli cell index. In: DIELEMAN, SJ (Ed). *Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination.* Elsevier Science. 1716–1718. 1992.
- FRANCA, LR; BARTKE, A; BORG, KE; CECIM, M; FADDEN, CT; YAGI, A; RUSSELL, LD. Sertoli cells in testes containing or lacking germ cells: a comparative study of paracrine effects using the W (c-kit) gene mutant mouse model. *Anat Rec.* 240:225-232. 1994.
- FRANÇA, LR; YE, SJ; YING, L; SANDBERG, M; RUSSELL, LD. Morphometry of rat germ cells during spermatogenesis. *Anat Rec.* 241:181-204. 1995.
- FRANÇA, LR ; OGAWA, T ; AVARBOCK, M.R. et al. Germ cell genotype control cells cycle during spermatogenesis in the rat. *Biol. Reprod.* 59:1371-1377. 1998.
- FRANÇA, LR; CARDOSO, FM. Duration of spermatogenesis and sperm transit time through the epididymis in the piau boar. *Tissue & Cel.* 30:573-582. 1998.
- FRANÇA, LR; RUSSELL, LD. The testis of domestic animals. In: REGADERA, J; GARCIA, M (Ed.). *Male reproduction: a multidisciplinary overview.* Madrid: Churchill Livingstone.197-219. 1998.
- FRANÇA, LR; BECKER-SILVA, SC; CHIARINI-GARCIA, H. The length of the seminiferous cycle in goats (*Capra hircus*). *Tissue & Cell.* 31:274-280. 1999.
- FRANÇA, LR; SILVA Jr; CHIARINI-GARCIA, H. et al. Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. *Biol. Reprod.* 63:1629-1636. 2000.
- FRANCA, LR; HESS, RA. Structure of the Sertoli cell. In: SKINNER, M; GRISWOLD, M. (Eds). *Sertoli cell Biology.* San Diego - California: Elsevier Academic Press. 19-40. 2005.

- FRANÇA, LR; AVELAR, GF; ALMEIDA, FF. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*. 63:300-318. 2005.
- GENOV, PW; MASSEI, G; KOSTOVA, W. The utilization of wild boar (*Sus scrofa L*) in Europe in theory and practice. *Zeitschrift Fur Jagdwissenschaft*. 40:263-267.1994.
- GIUFFRA, E. et al. The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression. *Genetics*. 154:1758-1791. 2000.
- GODINHO, CL. Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*), sexualmente maduros. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 1999.
- GOYAL, SR; TALIB, VH; KHURANA, SK. An overview of PSA/free PSA with special reference to recent trends in diagnosis of prostatic cancer. *Indian J Pathol Microbiol*. 42:171-178. 1999.
- GRIER, H; NEIDIG, C. Gonads and gamets of fishes. In: TIERSCH, TR; MAZUR, PM. (Eds). *Cryopreservation in Aquatic Species*. Baton Rouge: The World Aquaculture Society. 2000.
- GROCOCK, CA; CLARK, JR. Duration of spermatogenesis in the vole (*Microtus agrestis*) and bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *J. Reprod. Fert.* 47:133-135. 1976.
- GUERRA, MO. Comparação entre dois métodos de determinação da frequência relativa dos estádios do ciclo do epitélio seminífero, em dados de literatura. *Rev. Bras. Biol.* 43:385-394. 1983.
- GUIMARAES, DAA; MOREIRA, D; VALE, WG. Determinação do ciclo reprodutivo da cutia (*Dasyprocta prymnolopha*) através do diagnóstico colpocitológico. *Acta Amazonica*, Manaus-Amazonas. 27:55-64. 1997.
- GUIMARÃES, DAA. Aspectos reprodutivos e endócrinos da puberdade, ciclo estral, gestação e cio pós-parto de cutias (Rodentia: Dasyproctidae), criadas em cativeiro. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Pará, Belém, PA. 2000.
- GUIMARAES, DAA; ALBUQUERQUE, N; Le PENDU, Y; SILVA, JV; DIAS, HLT. Manejo reprodutivo e produtivo do caititu (*Tayassu tajacu*) em cativeiro. *Revista de Ciências Agrárias* (Belém). 43:1-5. 2005.
- GUIMARAES, DAA; BASTOS, LV; FERREIRA, ACS; RAMOS, RSL; OHASHI, OM; RIBEIRO, HFL. Características Reprodutivas da Paca Fêmea (*Agouti pacá*) Criada em Cativeiro. *Acta Amazonica* . 38:531-538. 2008.
- HAASTER, LH; DE ROOIJ, DG. Cycle of the seminiferous epithelium in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus sungorus*). *Biology of reproduction*. 48:515-521. 1993.

- HESS, R.A. et al. Frequency of the seminiferous epithelium in the rat. *Biol. Reprod.* 43:517-524. 1990.
- HESS, RA; COOKE, PS; BUNICK, D; KIRBY, JD. Adult testicular enlargement induced by neonatal hypothyroidism is accompanied by increased Sertoli and germ cell numbers. *Endocrinology*. 132:2607-2613. 1993.
- HESS, RA; FRANCA, LR. Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. In: CHENG, CY (Ed). *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*. N.Y.: Landes Bioscience. 2007.
- HOCHEREAU, MT. Constance des frequencies relatives des stades du cycle de l'épithelium seminifère chez le taureau et chez le rat. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 3:93-102. 1963.
- HOLZBERGER, DR; JIRAWTNOTAI, S; KIYOKAWA, H.; COOKE, PS. Thyroid hormone regulates the cell cycle inhibitor p27Kip1 in postnatal murine Sertoli cells. *Endocrinology*. 144: 3732-3738. 2003.
- HOSKEN, FM. Criação de capivaras. SEBRAE/MT. Cuiabá. 1999.
- HUCKINS, C. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analyses using a simplified classification of the germinal epithelium. *Anat. Rec.*, 190: 905-926. 1978.
- IBAMA. Instrução Normativa Nº 169, de 20 de Fevereiro de 2008. Diário Oficial da União de 27 de abril de 2007; Processo Ibama nº 02001.005418/ 2007- 11. 2007.
- JACOBSON, MD; WEIL, M; RAFF, MC. Programmed cell death in animal development. *Cell*. 88:347-354. 1997.
- JOHNSON, L; PETTY, CS; NEAVES, WB. A comparative study of daily sperm production and testicular composition in humans and rat. *Biol. Reprod.* 22:1233-1243. 1980.
- JOHNSON, L; NEAVES, WB. Age related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules and sperm population in stallions. *Biol. Reprod.* 24:703-712. 1981.
- JOHNSON, L; CARTER, GK; VARNER, DD; TAYLOR, TS; BLANCHARD, TL; REMBERT, MS. The relationship of daily sperm production with number of Sertoli cells and testicular size in adult horses: role of primitive spermatogonia. *J Reprod Fertil.* 100:315-321. 1994.
- JOHNSON, L; VARNER, DD ; ROBERTS, ME. et al. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. *Anim. Reprod. Sci.* 61: 471-480. 2000.
- JOHNSON, L; THOMPSON DL; VARNER DD. Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. *Anim Reprod Sci.* 105:23-51. 2008.

- KAHWAGWE, PR. Eletroejaculação em caititus (*Tayassu tajacu*) cativos e avaliação de suas características seminais pré e pós-resfriamento. 2009. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Belém, PA. 2009.
- KARL, J; CAPEL, B. Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. *Dev Biol.* 203:323-33. 1998.
- KENAGY, GJ; TROMBALUK, C. Size and function of mammalian testes in relation to body size. *J. Mammal.* 67:1-22. 1986.
- KENNELLY, JJ. Coyote reproduction: 1- The duration of the spermatogenic cycle and epididymal sperm transport. *J. Reprod. Fert.* 31:163-170. 1972.
- KERR, JB; LOVELAND, KL; O'BRYAN, MK; KRETSER, DM. Cytology of the testis and intrinsic control mechanisms. In: NEILL, JD (Ed). *Physiology of Reproduction* Elsevier. 2006.
- KEUROGLIAN, A.; EATON DP; LONGLAND WS. Area use by white-lipped and collared peccaries (*Tayassu pecari* and *Tayassu tajacu*) in a tropical forest fragment. *Biological Conservation.* 120:411-425. 2004.
- KOKKINAKI, M; LEE, TL; HE, Z; JIANG, J; GOLESTANEH, N; HOFMANN, MC; CHAN, WY; DYM, M. The molecular signature of spermatogonial stem/progenitor cells in the 6-day-old mouse testis. *Biol Reprod.* 80:707-717. 2009.
- LANGE, R.R. Criação e relocação de cutias *Dasyprocta azarae* Lichtenstein, 1823 (Dasyproctidae, Mammalia) em área verde urbana. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. 1998.
- LEAL, M.C. Análise morfométrica e funcional do testículo e eficiência espermatogênica em *saguinus Callithrix penicillata* (Primates: Callitrichidae). Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 2004
- LEAL, MC; FRANÇA, LR. The Seminiferous Epithelium Cycle Length in the Black Tufted-Ear Marmoset (*Callithrix penicillata*) Is Similar to Humans. *Biol Reprod.* 74:616-624. 2006.
- LEBLOND, CP; CLERMONT, Y. Definition of the stages of the seminiferous epithelium in the rat. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 55:548-573. 1952.
- LOPES, KRF; BEZERRA, FJ; NOGUEIRA, CM; BARRETO JÚNIOR, RA; DE PAULA VV. Teores de colesterol e ácidos graxos em carne de catetos (*Tayassu tajacu*) criados em cativeiro Caatinga (Mossoró, Brasil). 20:70-76. 2007.
- LUNSTRA, DD; SCHANBACHER, BD. Testicular function and Leydig cell ultrastructure in long-term bilateral cryptorchid rams. *Biol. Reprod.* 38: 211-220. 1988.
- MACHADO, AAC; OHASHI, OM. Estudo das características físicas e morfológicas do sêmen de Agouti paca (Linnaeus, 1766) (Agoutidae). In: XXI Congresso brasileiro de zoologia Porto Alegre. 1996.

- MASSEI, G; GENOV, PV; STAINES, BW. Diet, food availability and reproduction of wild boar in a Mediterranean coastal area. *Acta Theriologica*. 41:307-320. 1996.
- MATAMOROS, H.Y. Notas sobre la biología del tepezcuíte (Cuniculus paca, Brisson) (Rodentia: Dasyproctidae) en cautiverio. *Brenesia*. 20:71-82. 1982.
- MONDOLFI, E. La laca o paca. *Defensa de la Naturaleza*. 2:4-16. 1972.
- MATAMOROS, Y. Anatomía e histología del sistema reproductor del tepezcuíte (Cuniculus paca). *Rev. Biol. Trop.* 29:155-164. 1981.
- MATAMOROS, Y. Anatomía e histología del sistema reproductor del tepezcuíte (Cuniculus paca). *Revista de Biología Tropical*. 29:155-164. 1981.
- MAYOR, P; GUIMARÃES, DA; LE PENDU, Y; DA SILVA, JV; JORI, F; LÓPEZ-BÉJAR, M. Reproductive performance of captive collared peccaries (*Tayassu tajacu*) in the eastern Amazon. *Anim Reprod Sci*. 102:88-97. 2007.
- MEACHEM, SJ; MCLACHLAN, RI; STANTON, PG; ROBERTSON, DM; WREFORD, NG. FSH immunoneutralization acutely impairs spermatogonial development in normal adult rats. *J Androl*. 20:756-62. 1999.
- MENEZES, DJA; CARVALHO, MAM; ASSIS NETO, AC; OLIVEIRA, MF; FARIA, EC; MIGLINO, MA; MEDEIROS, GX. Morfologia dos órgãos genitais externos do macho de cutia (*Dasyprocta aguti*, Linnaeus, 1766). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 40:148-153. 2003.
- MOREIRA, JR; CLARKE, JR; MACDONALD, DW. The testis of capybaras *Hydrochaeris hydrochaeris* - Rodentia.. *Journal of Mammalogy*. 78:1096-1100. 1997.
- MOREIRA, JR; MACDONALD, DW. Técnicas de manejo de capivaras e outros grandes roedores da Amazônia. In: PÁDUA, CV; BODMER, RE (Eds). *Manejo e Conservação de Vida Silvestre no Brasil*. Sociedade Civil Mamarauá: MCT-CNPq. 1997.
- MORI, H; SHIMIZU, D; TAKEDA, A; et al. Stereologic analysis of Leydig cells in normal guinea pig testis. *J. Electron Microsc*. 29: 8-21, 1980.
- MORROW, C; HOSTETLER, C; GRISWOLD, M; HOFMANN, MC; MURPHY, K; COOKE, P; HESS, R. ETV5 is required for continuous spermatogenesis in adult mice and may mediate blood testes barrier function and testicular immune privilege. *Ann N Y Acad Sci*. 1120: 144–215. 2007.
- NAKAGAWA, T; NABESHIMA, Y; YOSHIDA, S. Functional identification of the actual and potential stem cell compartments in mouse spermatogenesis. *Dev Cell*. 12:195-206. 2007.
- NAKAI, M; VAN CLEEFF, J.K; BAHR, JM. Stages and duration of spermatogenesis in the domestic ferret (*Mustela putorius furo*) *Tissue and Cell*. 36:439-446. 2004.

NASCIMENTO, HF. Morfologia e distribuição topográfica dos diferentes tipos de espermatogônias de golden hamsters submetidos a fotoperíodo curto e longo. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, Belo Horizonte, MG. 2004.

NEVES, ES; CHIARINI-GARCIA, H; FRANÇA, LR. Seminiferous epithelium cycle length in donkeys. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANDROLOGY. Montreal. American Society of Andrology. 2001.

NÓBREGA, RH. Alterações do epitélio germinativo masculino, células endócrinas testiculares e células gonadotrópicas durante o ciclo reprodutivo de *Serrasalmus spiropleura* (Kner, 1859) e *Pimelodus maculatus* (Lacépède, 1803). Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Campinas, Campinas, SP. 2006.

NOGUEIRA-FILHO, SLG. Criação comercial de capivara. Departamento de Zoologia. ESALQ/USP. 1997.

NOWAK, RM. Walker's Mammals of the World. Vol. 1 and 2. The Johns Hopkins press, Baltimore. 1999.

OLIVEIRA, FB. Diagnóstico e acompanhamento ultra-sonográfico da prenhez em pacas (*Agouti paca*, Linnaeus, 1776). Dissertação (Mestrado) em Reprodução Animal. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP. 2002.

OLIVEIRA, FS; MACHADO, MRF; CANOLA, JC; CAMARGO, MHB. Uniparidade em pacas criadas em cativeiro (*Agouti paca*, Linnaeus, 1766). Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Online). 59:387-389. 2007.

ORTAVANT, R; COUROT, M; HOCHEREAU-DE-REVIRS, MT. Spermatogenesis in domestic mammals. In: COLE, HH; CUPPS, PT (Eds). Reproduction in domestic mammals. New York: Academic Press. 203-227. 1977.

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

OUD, JL; DE ROOIJ, DG. Spermatogenesis in the chinese hamster. Anat. Rec. 187:113-124. 1977.

PASHOV, B; MATAMOROS, Y. Description histologica del epitelio seminifero del testículo del tepezcuinte (*Cuniculus paca*, Brisson, 1762) e identificación de sus diferentes etapas. Cienc. Vet. 1:9-15. 1984.

PAULA, TAR. Estudo histológico quantitativo da atividade espermatogênica do cão, em diferentes faixas estárias após a puberdade. 1992. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. 1992.

- PAULA, TAR. Análise histométrica e funcional do testículo de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) adultas. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 1999.
- PAULA, TAR; CHIARINI-GARCIA, H; FRANÇA, LR. Seminiferous epithelium cycle and its duration in capybaras (*Hydrocoerus hydrochaeris*). *Tissue & Cell* 31 :327-334. 1999.
- PELLINIEMI, LJ; KUOPIO, T; FROJDMAN, K. The cell biology and function of the fetal Leydig cell. In: PAYNE, A.H.; HARDY, M.P.; RUSSELL, L.D. (Eds). *The Leydig Cell*. Ed. Cache River Press. Vienna. 143-157. 1996.
- QUEIROLO, D; VIEIRA, E; EMMONS, L; SAMUDIO, R. 2008. Cuniculus paca. In: IUCN 2009. IUCN Red List of Threatened Species. 2009.
- QUEIROZ, GF; NOGUEIRA, C. Duration of the cicle of the seminiferous epithelium and quantitative histology of the testis of the south american White-belly opossum (*Didelphis albiventris*), marsupialia. *Reprod. Fert. Dev.* 4:213-222. 1992.
- REDFORD, KH; ROBINSON, JG. Subsistence and comercial uses of wildlife in latin America. In: ROBINSON, JG; REDFORD, KH. (Eds). *Neotropical wildlife use and conservation*. Chicago: University of Chicago. 1991.
- ROCHA, DCM; DEBELJUK, L; FRANCA, LR. Exposure to constant light during testis development increases daily sperm production in adult Wistar rats. *Tissue & Cell*. 31:372-379. 1999.
- ROMAN, MT. Guia para el manejo y cría del Aguti, Picturi, Guatusa, Neque, Dasyprocta punctata y sasyprocta fuliginosa. Ciencia y tecnología. SECAB, Guadalupe ED, 64. 1997.
- ROOSEN-RUNGE, EC; GIESEL Jr, L.O. Quantitative estudies on spermatogenesis in the albino rat. *Am. J. Anat.* 87:1-30. 1950.
- ROOSEN-RUNGE, EC. Germinal-cell loss in normal metazoan spermatogenesis. *J. Reprod. Fertil.* 35:339-348. 1973.
- ROOSEN-RUNGE, EC. The process of spermatogenesis in animals. Cambridge: University Press. 1977.
- ROSIEPEN, G; CHAPIN, RE; WEINBAUER, GF. The duration of the cycle of the seminiferous epithelium is altered by administration of 2,5-hexanedione in the adult Sprague-Dawley rat. *Journal of Andrology*. 16:127-135. 1995.
- ROSIEPEN, G. et al. Estimation of the duration of the cycle of the seminiferous epithelium in the non-human primate *Macaca mulatta* using the 5-bromodeoxyuridine technique. *Cell & Tissue Research*. 288:265-269. 1997.
- ROWLEYCONWY, P. Wild or domestic: on the evidence for the earliest domestic cattle and pigs in south Scandinavia and Iberia. *Int. J. Osteoarcheology*. 5:115-126. 1995.

- RUSSELL, LD; ETTLIN, RA; SINHA-HIKIM, AP; CLEGG, ED. Histological and histopathological evaluation of the testis. Clearwater: Cache River Press. 1990.
- RUSSEL, LD; GRISWOLD, MD. The Sertoli cell. (1 ed). 1993.
- RUSSELL, L.D; CORBIN, TJ; BORG, KE; et al. Recombinant human follicle-stimulating hormone is capable of exerting a biological effect in the adult hypophysectomized rat by reducing the numbers of degenerating germ cells. *Endocrinology*. 133:2062-2070. 1993.
- RUSSELL, L.D; SINHA-HIKIM, AP; GHOSH, S. et al. Structure-function relationships in somatic cells of the testis and accessory reproductive glands. In: BARTKE, A (Ed). Function of somatic cells in the testis. New York: Springer-Verlag. 1994.
- RUSSELL, LD. Mammalian Leydig cell structure. In: PAYNE, AH; HARDY, MP; RUSSELL, LD (Eds.). The Leydig cell. Vienna: Cache River Press. 43-96. 1996.
- SCHOPPER, D; GAUS, J; CLAUS, R; BADER, H. Seasonal reproduction in the domestic and wild boar. *Zuchthygiene Reproduction in Domestic Animals*. 18:103. 1983.
- SETCHELL, BP; BREED, WG. Anatomy, vasculature and innervation of the male reproductive tract. In: NEILL, JD (Ed), *Physiology of Reproduction*. Elsevier. 771-825. 2006.
- SHARPE, RM. Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL, E; NEIL, JD. (Eds). *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press. 1363-1434. 1994.
- SHARPE, RM; MCKINNELL, C; KIVLIN, C; FISHER, JS. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction*. 125:769-84. 2003.
- SHORT, RV. The testis: the witness of the mating system, the site of mutation and the engine of desire. *Acta Paediatr Suppl*. 422:3-7. 1997.
- SHUPNIK, MA; SCHREIHOFER, DA. Molecular aspects of steroid hormone action in the male reproductive axis. *J Androl*. 18:341-344. 1997.
- SILVA, LFW. Criação de capivaras em cativeiro. São Paulo: Nobel. 1986.
- SILVA, RC; COSTA, GM; ANDRADE, LM; FRANÇA, LR. Testis stereology, seminiferous epithelium cycle length, and daily sperm production in the ocelot (*Leopardus pardalis*). *Theriogenology*. 2009.
- SILVA, SCB. Caracterização histológica e seminal do desenvolvimento sexual de caprinos Saanen, criados em sistema extensivo. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 2000.
- SINHA-HIKIM, AP; CHAKRABORTY, J; JHUNJHUNWALA, JS. Germ cell quantitation in human testicular biopsy. *Urol Res*. 13:111-115. 1985.

SINHA-HIKIM, AP; BARTKE, A; RUSSELL, LD. Morphometric studies on hamster testes in gonadally active and inactive states: light microscope findings, Biol. Reprod. 39:1225–1237. 1988.

SMITHWICK, EB; YOUNG, LG; GOULD, KG. Duration of spermatogenesis and relative frequency of each stage in the seminiferous epithelial cycle of the chimpanzee. Tissue & Cell. 28:357-366. 1996.

SMYTHE, N. The natural history of the central American agouti *Dasyprocta punctata*. Smithsonian Contribution for Zoology. 257:1-52. 1987.

SMYTHE, N; BROWN DE LA GUANTI, O. La domesticación de la paca (Agouti paca). Guía de Conservación FAO, Roma, Itália. 1995.

SONNER, JB; MIGLINO, MA; DOS SANTOS, TC; CARVALHAL, R; ASSIS NETO, AC; MOURA, CEB; OLIVEIRA, M F. Aspectos macroscópicos e morfométricos dos testículos em catetos e queixadas. Biota Neotropica. 4:2. 2004.

SOUZA, A L P. Características do sêmen de catetos (*Tayassu tajacu*, Linnaeus, 1758) coletados por eletroejaculação utilizando diferentes protocolos anestésicos Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Semi-Árido, Mossoró, RN. 2008

SOWLS, L K. The Peccaries. University of Arizona Press: Tucson. 1984.

SOWLS, LK. Javelinas and other peccaries: Their biology, management, and use 2nd ed. Tucson, Arizona: University of Arizona Press. 1997.

SPRADLING, A; DRUMMOND-BARBOSA, D; KAI, T. Stem cells find their niche. Nature.. 414:98-104. 2001.

STRADIOTTI, C.P. 2006. Anatomia dos órgãos reprodutivos do macho e método de coleta de sêmen em pacas (Agouti paca). Dissertação (Mestrado)- Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ. 2006.

SUÁREZ-QUIAN, CA; MARTÍNEZ-GARCÍA, F; NISTAL, M; REGADERA, J. Androgen receptor distribution in adult human testis. J Clin Endocrinol Metab. 84:350-358. 1999.

SWIERSTRA, EE; FOOTE, RH. Duration of spermatogenesis and spermatozoan transport in the rabbit based on cytological changes, DNA synthesis and labeling with tritiated thymidine. Am. J. Anat. 116: 401-412. 1965.

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

- SWIERSTRA, EE; GEBAUER, MR; PICKET, BW. Reproductive physiology of the stallion, I- Spermatogenesis and testis composition. *J. Reprod. Fert.* 40:113-123. 1974.
- TAST, A. et al. Seasonal alterations in circadian melatonin rhythms of the European wild boar and domestic gilt. *J. Pineal Res.* 30:43-49. 2001.
- TAYLOR, RB; HELLGREN, EC; GABOR, TM; ILSE, LM. Reproduction of feral pigs in southern Texas. *Journal of Mammalogy.* 79:1325-1331. 1998.
- TORRES, CN; GODINHO, HP; SETCHELL, BP. Frequency and duration of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium of the nine-banded armadillo (*Dasypus novemcinctus*). *J. Reprod. Fert.* 61:335-340. 1981. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.
- URENA, F; BOLANOS, R. Tipos de espermatogonios en “Tepezcuíntle” (*Cuniculus paca*). Estudio ultraestructural. *Rev. Biol. Trop.* 36:325-328. 1988.
- UREÑA, F; BOLAÑOS, R; ROJAS, N; SUÁREZ, R; QUESADA, R. Spermatogonia types in tepezcuíntle (*Cuniculus paca*). Ultrastructural study *Rev Biol Trop.* 36:325-328. 1988.
- WEILER, U. et al., Influence of the photoperiod and a light reverse program on metabolically active hormones and food intake in domestic pigs compared with a wild boar. *Canadian Journal of Animal Science.* 76:531-539. 1996.
- WEINBAWER, GF; ASLAM, H; KRISHNAMURTHY, H. et al. Quantitative analysis of spermatogenesis and apoptosis in the common marmoset (*Callithrix jacchus*) reveals high rates of spermatogonial turnover and high spermatogenic efficiency. *Biol. Reprod.*, 64: 120-126. 2001.
- WELSH, M; SAUNDERS, PT; ATANASSOVA, N; SHARPE, RM; SMITH, LB. Androgen action via testicular peritubular myoid cells is essential for male fertility. *FASEB J.* 2009.
- WERDELIN, L; NILSONNE, A. The evolution of the scrotum and testicular descent in mammals: a phylogenetic view. *J Theor Biol.* 196:61-72. 1999.
- YOSHIDA, S; NABESHIMA, Y; NAKAGAWA, T. Stem cell heterogeneity: actual and potential stem cell compartments in mouse spermatogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 1120:47-58. 2007.
- ZIRKIN, BR; AWONIYI, C; GRISWOLD, MD; RUSSELL, LD; SHARPE, R. Is FSH required for adult spermatogenesis? *J Androl.* 15:273-6. 1994.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)

[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)

[Baixar livros de Literatura Infantil](#)

[Baixar livros de Matemática](#)

[Baixar livros de Medicina](#)

[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)

[Baixar livros de Meio Ambiente](#)

[Baixar livros de Meteorologia](#)

[Baixar Monografias e TCC](#)

[Baixar livros Multidisciplinar](#)

[Baixar livros de Música](#)

[Baixar livros de Psicologia](#)

[Baixar livros de Química](#)

[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)

[Baixar livros de Serviço Social](#)

[Baixar livros de Sociologia](#)

[Baixar livros de Teologia](#)

[Baixar livros de Trabalho](#)

[Baixar livros de Turismo](#)