

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**ANÁLISE MORFOFUNCIONAL DA
ESPERMATOGÊNESE DO CAVALO
DA RAÇA CRIOULA**

TESE DE DOUTORADO

Giuliano Moraes Figueiró

**Santa Maria, RS, Brasil
2010**

ANÁLISE MORFOFUNCIONAL DA ESPERMATOGÊNESE DO CAVALO DA RAÇA CRIOULA

por

Giuliano Moraes Figueiró

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Fisiopatologia da Reprodução, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Medicina Veterinária.**

Orientador: Prof. Carlos Antonio Mondino Silva
Co-orientador: Deiler Sampaio Costa

Santa Maria, RS, Brasil
2010

© 2010

Todos os direitos autorais reservados a Giuliano Moraes Figueiró. A reprodução de partes ou do todo

deste trabalho só poderá ser feita com autorização por escrito do autor.

Endereço: Embryolab, Laboratório de Embriologia Animal. Departamento de Clínica de Grandes Animais, Prédio 97, Bloco 4, Área Sul, Sala 428. Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria. 97.105-900 Santa Maria, RS, Brasil. (55)3220-8501.

e-mail: figueirogm@hotmail.com

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**

A comissão examinadora, abaixo assinada,
aprova Tese de Doutorado

**ANÁLISE MORFOFUNCIONAL DA ESPERMATOGÊNESE
DO CAVALO DA RAÇA CRIOULA**

elaborada por

Giuliano Moraes Figueiró

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Carlos Antônio Mondino Silva, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Deiler Sampaio Costa, Dr. (UFMS)

Daniela dos Santos Brum, Dr^a (UNIPAMPA)

Mara Iolanda Batistella Rubin, Dra (UFSM).

Mario Kurtz Filho, Dr (UFSM)

Santa Maria, 2 de março de 2010.

Agradecimentos

Agradeço a meus pais (Flavio e Sonia Mara), pelo exemplo de vida, pelo carinho e estímulo e apoio na realização de mais esta etapa de minha vida.

A meus irmãos, pelo companheirismo e estímulo na realização desta jornada, principalmente ao Laurence, que sempre me auxiliou nesta empreitada, participando da coleta dos testículos e também pela entrega da documentação durante este quatro anos.

À Marina, pelo carinho, companheirismo, compreensão nos momentos de ausência e incansável auxílio na realização desta tese.

A meu orientador, Dr Carlos Antonio Mondino Silva, pelo apoio, que já vem desde a época de estagiário no Laboratório, por ter me aceito mais uma vez e pelos conselhos, ensinamentos e exemplo de vida.

A Dr^a Mara Iolanda Batistella Rubin, pelos ensinamentos e repetidas tentativas de ensino sobre organização, por mostrar que temos que sempre tentar modificar o ambiente a nossa volta e, por suportar meus pedidos de última hora.

Ao Dr. Rodrigo Costa Mattos, que sempre me incentivou durante nossas conversas no Espírito Santo, pelo exemplo e por aceitar participar desta pesquisa.

Aos proprietários da Estância Artigas, Cabanha Nossa Senhora da Penha, Cabanha Trevo Branco, Cabanha Infinito e Fazenda Pantanal por permitir o acesso aos animais e realização deste experimento.

Ao Médico Veterinário Marcelo Napoleão e aos proprietários e funcionários da Cabanha Itapitocai, que permitiram a utilização de seus animais e instalação para o treinamento na realização da metodologia deste experimento.

Aos colegas do Embryolab, atuais e os de “antigamente”, pelo auxílio e também pelas boas lembranças.

Aos distantes, mas sempre lembrados, Dr Eduardo Malchitsky e Dr^a Neiva Medianeira Depra, que são exemplos de vida pessoal e que são, em grande parte, responsáveis pelos rumos de minha vida profissional.

Aos grandes amigos, Dr^a. Daniela dos Santos Brum, Dr. Sergio da Silva Fialho, Dr. Fabio Gallas Leivas, Dr. Mario Kurtz Filho pelo auxílio e participação desta pesquisa.

Ao meu grande amigo e co-orientador, Deiler Sampaio Costa, pelo estímulo na realização do doutorado, pela idéia e incansável auxílio no meu treinamento para a realização desta pesquisa durante estes quatro anos. A sua família pela acolhida em sua casa nas viagens para Campo Grande.

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

ANÁLISE MORFOFUNCIONAL DA ESPERMATOGÊNESE DO CAVALO DA RAÇA CRIOLA

AUTOR: GIULIANO MORAES FIGUEIRÓ

ORIENTADOR: CARLOS ANTÔNIO MONDINO SILVA

CO-ORIENTADOR: DEILER SAMPAIO COSTA

Santa Maria, 2 de março de 2010.

Os objetivos deste experimento foram descrever a biometria testicular, a morfologia dos túbulos seminíferos, determinar o rendimento intrínseco da espermatogênese, estimar a produção espermática diária e a capacidade de suporte das células de Sertoli em equinos Crioulos, fora da temporada de monta, utilizando-se 10 garanhões com idade e peso médio de 48 meses e 377Kg, respectivamente. O peso médio dos garanhões foi de 377,5kg, o peso testicular médio foi de 162,9g, o índice gonadossomático de 0,087% e o índice tubulossomático de 0,067%. A proporção de túbulos seminíferos foi de 77,97% e a de tecido intertubular foi de 22,03%. O diâmetro tubular corrigido foi de 205 μ m e a altura do epitélio seminífero de 70 μ m. O comprimento dos túbulos seminíferos por grama de testículo foi 26,09m. Estimou-se o índice de eficiência das mitoses espermatogoniais em 3,9 espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno produzidos a partir de cada espermatogônia A. O rendimento meiótico foi de 3,9 células, e o valor estimado de perdas celulares durante a prófase meiótica de 10%. O rendimento geral da espermatogênese foi de 13,9 células. O número de células de Sertoli por grama de testículo estimado foi de 54,80 milhões e, cada uma, teve capacidade para sustentar 10,4 células germinativas. A reserva espermática total foi estimada em 46,8 bilhões, e a produção espermática diária de 3,8 bilhões de espermatozóides por testículo, o que equivale a 23,5 milhões de espermatozóides por grama de testículo. Conclui-se que os dados da biometria testicular, os da morfologia dos túbulos seminíferos, o rendimento meiótico, o índice de perdas celulares e a capacidade de suporte das células de Sertoli aqui encontrados foram semelhantes as demais raças de equinos. Já o número de células de Sertoli por grama de testículo, a produção espermática diária total e por grama de testículo foram superiores, indicando uma possível superioridade da fertilidade potencial da raça Crioula.

Palavras chave: equino, crioulo, rendimento intrínseco da espermatogênese, produção espermática diária

ABSTRACT

Doctoral Thesis
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

MORPHO-FUNCTIONAL ANALYSIS OF SPERMATOGENESIS OF THE CRIOULO HORSE

AUTHOR: GIULIANO MORAES FIGUEIRÓ

ADVISER: CARLOS ANTÔNIO MONDINO SILVA

COADVISER: DEILER SAMPAIO COSTA

Santa Maria, March 2nd, 2010.

The goal of this experiment was to describe the testicular biometry, the morphology of seminiferous tubules, determine the intrinsic income of spermatogenesis, and estimate the daily sperm production and the support capacity of Sertoli cells of Crioulo horses out of the breeding season. Ten stallions with a mean age of 48 months were used in this study. The mean body weight of the stallions was of 377.5 kg. The mean testicular weight was of 162.9 grams, the gonadosomatic index was 0.087% and the tubulosomatic index was 0.067%. The proportion of seminiferous tubuli and of intertubular tissue was of 77.97% and 22.03%, respectively. The tubular diameter was of 205 μ m and the seminiferous epithelium height was of 70 μ m. The length of the seminiferous tubuli per gram of testicle was of 26.09 meters. The spermatogonial mitosis efficiency coefficient was estimated in 3.9 preleptotene/leptotene spermatocytes produced from each type A spermatogonia. The meiotic index was of 3.9 cells, and the estimated value of cell loss during prophase in meiosis was of 10%. The overall rate of spermatogenesis was of 13.9 cells. The estimated number of Sertoli cells per gram of testis was of 54.8 million, and each Sertoli cell had the capacity to support 9.0 germ cells. The total sperm reserve was an estimated 46.8 billion, and the daily sperm production was of 3.8 billion sperm per testicle, which is equivalent to 23.5 million of sperm per gram of testicle. It was concluded that the data found in this study were similar to other horse breeds. However, the number of Sertoli cells per gram of testicle, the total and per gram daily sperm production was higher to those published in other breeds of horses, which indicate a possible superiority of potential fertility of the Crioulo breed.

Key words: equine, crioulo, intrinsic income of spermatogenesis, daily sperm production

LISTA DE TABELAS

3 CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Peso corporal, peso médio do testículo e índice gonadossomático de 10 equinos crioulos de três a seis anos de idade.....	40
Tabela 2 – Peso do testículo descongelado, peso do parênquima testicular, pesos e valores percentuais da albugínea e mediastino testicular de 9 equinos crioulos de 3 a 6 anos de idade.....	40
Tabela 3 – Diâmetro tubular, altura do epitélio seminífero e área da secção transversal de túbulo seminífero (μm^2) de 10 equinos crioulos de 3 a 6 anos de idade.....	41
Tabela 4 – Biometria e histometria do testículo de dez eqüinos da raça crioula fixados com método de karnovisky e processados segundo Costa et al. (2004).....	41

4 CAPÍTULO 2

Tabela 1 -. Diâmetro nucleolar das células de Sertoli e nuclear das espermatogônias A (A), espermatócitos I em pré-leptóteno/leptóteno (PL/L), espermatócitos I em paquíteno (PQ) e espermatídes arredondadas (Ar) de dez equinos adultos, expressos em micrômetros..	59
Tabela 2 – População celular (Células de Sertoli, espermatogônias A, espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno, espermatócitos primários em paquíteno e espermatídes arredondadas) no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero obtido de dez equinos crioulos adultos.....	59
Tabela 3 –. Razões entre os números corrigidos de células germinativas por secção transversal de túbulo seminífero no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero de dez cavalos crioulos adultos.....	60
Tabela 4 – Razões entre os números corrigidos de células germinativas por secção transversal de túbulo seminífero no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero e de células de Sertoli em dez cavalos crioulos adultos.	60

LISTA DE FIGURAS

2 REVISÃO

Figura 1 - Diagrama demonstrando possíveis rotas para redistribuição das junções intercelulares das células de Sertoli (Kerr et al., 2006)..... 16

Figura 2 – Espermatogênese e estádios dos ciclos do epitélio seminífero em equinos, onde podemos visualizar a espermatogênese, meiose e espermiogênese, combinadas com os oito estádios do ciclo do epitélio seminífero (I-VIII). As letras representam a fase de desenvolvimento celular, os números associados com cada célula germinativa indicam a idade em dias. O comprimento do ciclo é de 12,2 dias e a duração da espermatogênese é de 57 dias (Varner e Johnson, 2007)..... 19

3 CAPÍTULO 1

Figura 1 Secções transversais de túbulos seminíferos caracterizando os estádios 1 (**a**), 2 (**b**), 3 (**c**) e 4 (**d**) do ciclo do epitélio seminífero de testículos de equinos crioulos orquiectomizados fora da temporada reprodutiva, demonstrando os seguintes grupos celulares: “**a**” – espermatócitos primários em pré-leptóteno (PL), espermatócitos primários em paquíteno (PQ) e espermatídes arredondadas (Ar); “**b**” - S, espermatócitos primários em leptóteno (L), PQ, espermatídes em alongamento (Al); “**c**” - espermatócitos primários em zigóteno (Z), espermatócitos primários em diplóteno (D) e Al em feixes; “**d**” – Z, PQ, D, figuras de meiose (M), espermatócitos secundários (II), Ar e feixes de Al. Todos os estágios apresentaram espermatogônias do tipo A (A) e células de Sertoli (S). Azul de toluidina, 400x..... 42

Figura 2 - Secções transversais de túbulos seminíferos caracterizando os estádios 5 (**a**), 6 (**b**), 7 (**c**) e 8 (**d**) do ciclo do epitélio seminífero de testículos de equinos crioulos orquiectomizados fora da temporada reprodutiva, demonstrando os seguintes grupos celulares: “**a**” – espermatogônias do tipo A (A), espermatócitos primários em paquíteno (PQ), espermatídes arredondadas (Ar) e espermatídes alongadas (Al) formando feixes compactos; “**b**” – espermatogônias do tipo B (B), ‘PQ’, ‘Ar’ e feixes de ‘Al’ migrando em direção ao lúmen tubular; “**c**” – ‘A’, ‘B’, ‘PQ’, ‘Ar’, ‘Al’ não mais formando feixes e próximos ao lúmen, corpos residuais (CR); “**d**” – ‘A’, ‘B’, espermatócitos primários em pré-leptóteno (PL), ‘PQ’, ‘Ar’, ‘Al’ em forma de paliçada na borda luminal e ‘CR’. Todos os estágios apresentaram células de Sertoli (S). Azul de toluidina, 400x..... 43

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO.....	12
2.1 O CAVALO CRIOULO	12
2.2 ESTRUTURA E FUNCIONAMENTO DO TESTÍCULO	13
2.3 ESPERMATOGÊNESE.....	15
2.4 CICLO ESPERMATOGÊNICO	17
2.5 APOPTOSE.....	20
2.6 QUANTIFICAÇÃO DA ESPERMATOGÊNESE	21
3 CAPÍTULO 1.....	23
INTRODUÇÃO	25
MATERIAL E MÉTODOS	26
<i>Colheita dos testículos e biometria testicular</i>	<i>26</i>
<i>Processamento histológico.....</i>	<i>27</i>
<i>Biometria e análise morfométrica dos testículos</i>	<i>27</i>
<i>Comprimento total dos túbulos seminíferos (CTT)</i>	<i>28</i>
<i>Análise estatística.....</i>	<i>29</i>
RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
<i>Biometria e análise morfométrica dos testículos</i>	<i>29</i>
<i>Estádios do ciclo do epitélio seminífero em cavalos crioulos.....</i>	<i>31</i>
<i>Proporção Volumétrica.....</i>	<i>34</i>
<i>Diâmetro dos Túbulos Seminíferos.....</i>	<i>35</i>
<i>Altura e área do epitélio seminífero</i>	<i>35</i>
<i>Índice tubulossomático (ITS).....</i>	<i>36</i>
<i>Comprimento Tubular Total (CTT).....</i>	<i>36</i>
CONCLUSÕES	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
4 CAPÍTULO 2.....	44
INTRODUÇÃO	46
MATERIAL E MÉTODOS	47
<i>Colheita dos testículos e biometria testicular</i>	<i>47</i>
<i>Processamento histológico.....</i>	<i>48</i>
<i>Rendimento intrínseco da espermatogênese.....</i>	<i>49</i>
<i>Índice de células de Sertoli.....</i>	<i>49</i>
<i>Número total de células de Sertoli.....</i>	<i>50</i>
<i>Reserva espermática testicular e produção espermática diária esperada</i>	<i>50</i>
RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
<i>População celular</i>	<i>51</i>
<i>Rendimento intrínseco da espermatogênese.....</i>	<i>52</i>
<i>Índice de células de Sertoli.....</i>	<i>53</i>
<i>Número total de células de Sertoli.....</i>	<i>54</i>
<i>Reserva espermática testicular e produção espermática diária.....</i>	<i>55</i>
CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
5 DISCUSSÃO GERAL	61
<i>Estádios do ciclo do epitélio seminífero em cavalos crioulos.....</i>	<i>63</i>
<i>Proporção Volumétrica.....</i>	<i>66</i>
<i>Diâmetro dos Túbulos Seminíferos.....</i>	<i>66</i>
<i>Altura e área do epitélio seminífero</i>	<i>67</i>
<i>Índice tubulossomático (ITS).....</i>	<i>68</i>

<i>Comprimento Tubular Total (CTT)</i>	68
<i>População celular</i>	68
<i>Rendimento intrínseco da espermatogênese</i>	69
<i>Índice de células de Sertoli</i>	71
<i>Número total de células de Sertoli</i>	72
<i>Reserva espermática testicular e produção espermática diária</i>	72
6 CONCLUSÕES GERAIS	74
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
ANEXO I	78

1 INTRODUÇÃO

A primeira descrição sobre os espermatozóides foi feita por Von Leeuwenhoek em 1679, e a descoberta de que eles eram provenientes de células específicas localizadas nos túbulos seminíferos foi realizada em 1841 por Von Kolliker (Johnson, 1991). As primeiras descrições das células somáticas presentes no tecido testicular foi feita em 1850 por Franz Von Leydig e, em 1865, por E. Sertoli, as quais, e por isso mesmo, receberam seus nomes (Johnson, 1991). Desde então inúmeros estudos foram realizados ampliando o conhecimento sobre o complexo processo espermatogênico.

Geralmente os espermatozóides são descritos como células altamente especializadas e com uma única função, que é a fertilização. No entanto, vale ressaltar que o espermatozóide é a etapa final de um processo extremamente complexo, onde esta célula é desenvolvida e aprimorada para exercer sua função na fecundação (Varner e Johnson, 2007).

Este processo de especialização, com suas alterações bioquímicas e biofísicas é tão complexo que, até hoje, o mecanismo exato no seu aspecto celular e molecular ainda não foi completamente esclarecido (Varner e Johnson, 2007).

Cinco subtipos de espermatogônias são descritos para garanhões: as do tipo A₁ (núcleo pequeno e achatado), as do A₂ (núcleos grandes), as do A₃ (núcleo maior que a anterior com um ou vários nucléolos aparentes), as do B₁ ou intermediárias (núcleo grande e formato ovalado a esférico, com grandes flocos de cromatina) e as do B₂ (com núcleos pequenos flocos de cromatina). As espermatogônias do tipo B₂ dividem-se em dois espermatócitos primários em pré leptóteno (Johnson et al., 1997).

Este estudo teve como objetivo geral avaliar a biometria dos testículos e a morfologia dos túbulos seminíferos de cavalos crioulos, assim como determinar o rendimento intrínscio da espermatogênese. O Primeiro Capítulo deste trabalho teve como objetivos específicos estabelecer a proporção volumétrica do parênquima

testicular, a caracterização dos estádios do ciclo do epitélio seminífero, do diâmetro e do comprimento tubular e da altura do epitélio seminífero. O Segundo Capítulo 2 teve como objetivo específico estimar a produção espermática diária e a capacidade de suporte das células de Sertoli em equinos da raça Crioula.

2 REVISÃO

2.1 O cavalo Crioulo

O cavalo da raça Crioula descende daqueles trazidos da península ibérica, para a América do Sul, a partir do início do século XVI, pelos colonizadores espanhóis e portugueses. A organização do registro genealógico da raça se inicia, no Rio Grande do Sul, em 1932, com o registro dos primeiros animais e a importação de animais do Uruguai e da Argentina, para melhorar os animais criados no estado. A criação do cavalo Crioulo nas últimas três décadas expandiu-se no Rio Grande do Sul e, mais tarde, para todo o Brasil e alguns países fora da América do Sul.

Os cavalos Crioulos são bons cavalos de serviço e servem com muita docilidade para o trabalho pecuário. A prova do “Freio de Ouro” é a prova máxima de seleção, patrocinada e organizada anualmente pela Associação Brasileira de Criadores de Cavalo Crioulo (ABCCC) para indicar os expoentes da raça. Atualmente existem mais de 200.000 animais registrados no Registro Genealógico da raça. O cavalo crioulo está muito bem adaptado no ambiente do Rio Grande do Sul e serve muito bem ao que se presta. A tendência é a de aumentar o número de animais no estado e fora dele devido ao trabalho de estímulo da ABCCC à expansão das atividades da raça (Freitas et al., 2006). Sua estatura é pequena, sendo aceitos no registro genealógico aqueles cuja estatura varia entre um metro e trinta e oito centímetros a um metro e cinquenta centímetros na cernelha. A rusticidade do cavalo crioulo vem do longo processo de seleção natural a que foi submetido no pampa sul-americano e, mais tarde, manipulada pela intromissão do homem, a partir de 1927 (Solonet, 1946), com restrições impostas pela associação de criadores argentina e, mais tarde pela ABCCC, almejando que suas características para a

adaptação ao ambiente fossem preservadas e aprimoradas. Através da característica principal de rusticidade parecem surgir como resultantes as de fertilidade e longevidade.

2.2 Estrutura e funcionamento do testículo

O testículo possui duas funções: a *exócrina* – relativa a espermatogênese – e a *endócrina* – que se ocupa da produção hormonal responsável pela diferenciação sexual, pelas características sexuais secundárias e pela libido (Varner e Johnson, 2007).

A estrutura testicular é composta pelo parênquima testicular envolto pela túnica albugínea, que se infiltra separando o órgão em diferentes lóbulos. A túnica é composta de colágeno e fibras elásticas, células mióides e uma rede de vasos sanguíneos. O parênquima testicular ocupa entre 80 e 90% da massa testicular total. Os túbulos seminíferos representam aproximadamente 70% do parênquima. A porção intertubular é composta por células de Leydig, fibroblastos, linfócitos, mastócitos, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e tecido conjuntivo (Neves, 2001, Costa e Paula, 2003, Varner e Johnson, 2007).

Os andrógenos produzidos pelas células de Leydig são difundidos para os vasos sanguíneos e linfáticos circunjacentes aos túbulos seminíferos através da ABP. A complexa ligação entre as células de Sertoli (CS) forma uma barreira hematotesticular garantindo uma região protegida para o desenvolvimento das células germinativas (Amann, 1993), promovendo a compartimentalização do epitélio seminífero além de fornecerem sustentação e nutrição para estas células (Neves, 2001), espermição das espermátides, movimento das linhagens jovens, fagocitose das células germinativas degeneradas e corpos residuais, secreção de fluído luminal e comunicação intercelular (Dym e Madhwa Raj, 1977).

Células mióides com filamentos de actina auxiliam no transporte dos espermatozóides pelo lúmen tubular e também, sob influência da testosterona

auxiliam na regulação das células de Leydig através de ações das ABP e modulam o funcionamento das células de Sertoli; além de contribuir para a estabilidade da barreira hematotesticular, podendo também estar envolvidas, com o passar do tempo na progressão da fibrose testicular e ainda em garanhões mais velhos com degeneração testicular (Chenier, 2007).

Os efeitos da variação estacional do fotoperíodo em garanhões parecem ser menos intensos que nas éguas, que apresentam um período fisiológico de anestro estacional. O aumento no tamanho do testículo durante a temporada reprodutiva, bem como da sua produção espermática e a manifestação da libido se explicam pela maior liberação de GnRH e pelo estímulo à produção espermática (Amann, 1993, Chenier, 2007).

Servindo como gatilho do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal a glândula pineal, através da variação estacional da produção e liberação da melatonina pelo estímulo ótico através da retina, é o centro controlador das manifestações reprodutivas no equino. Na primavera e no verão os reprodutores são expostos a uma maior intensidade luminosa fazendo com que a produção/liberação de melatonina diminua. Sua produção/liberação no período vernal é maior, sendo responsável pela diminuição da secreção/liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Este hormônio é produzido pelo hipotálamo em resposta a vários estímulos, como o ótico, olfatório, tátil e auditivo, e, quando liberado no eixo hipotalâmico-hipofisário vai agir na hipófise anterior estimulando a secreção e a liberação de LH e FSH (Chenier, 2007).

De acordo com Chenier (2007), em garanhões adultos, o LH estimula as células de Leydig a produzir e liberar estrógenos e testosterona. O FSH, por sua vez, estimula as células de Sertoli a produzir e liberar inibina, ativina, proteína transportadora de andrógenos (ABP) e fatores de crescimento derivados da insulina (IGF). Estes hormônios e proteínas farão a auto-regulação da liberação pulsátil de GnRH e também do LH e FSH. A liberação do LH é regulada pelo nível sérico de estrógenos produzidos pelas células de Leydig e, a liberação do FSH pela concentração sérica de testosterona e inibina (Kerr et al., 2006).

2.3 Espermatogênese

É um processo altamente sincronizado e organizado onde células diplóides (espermatogônias) se diferenciam numa célula haplóide madura (espermatozóide), dentro de um emaranhado de túbulos seminíferos que tem suas duas aberturas direcionadas para a *rete testis* e liberadas para o epidídimo e ducto deferente. Estes túbulos, na espécie eqüina, apresentam um comprimento médio de 2.419 metros em cada testículo e são compostos por células germinativas em diferentes graus de desenvolvimento, intercaladas e sustentadas por células de Sertoli, que se fixam na membrana basal e se estendem até o lúmen (Varner e Johnson, 2007).

A espermatogênese pode ser dividida em três fases distintas, a espermatocitogênese, a meiose e a espermiogênese (Johnson et al., 1997). Através das junções das células de Sertoli o epitélio seminífero é dividido em compartimento basal e ad-luminal. Estas células são as responsáveis pela sustentação das células germinativas, favorecendo a proliferação das espermatogônias até o estágio de espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno que ocorre no compartimento basal. Logo após, ocorre a migração dessas células germinativas, no início da fase de leptóteno, para o compartimento ad-luminal, durante a primeira divisão meiótica, dando início, então, a espermiogênese (Amann, 1993, Costa e Paula, 2003).

A função da barreira criada pelas células de Sertoli (barreira hemato-testicular) é a de segregar as células germinativas, em meiose e pós-meiose, da agressão que poderia ocorrer pelo sistema imune, providenciando um microambiente específico para os estádios finais da diferenciação dessas células (Costa e Paula, 2003). Pode-se ver na **Figura 1**, a representação esquemática da distribuição dos nutrientes e suas várias e possíveis rotas (Kerr et al., 2006).

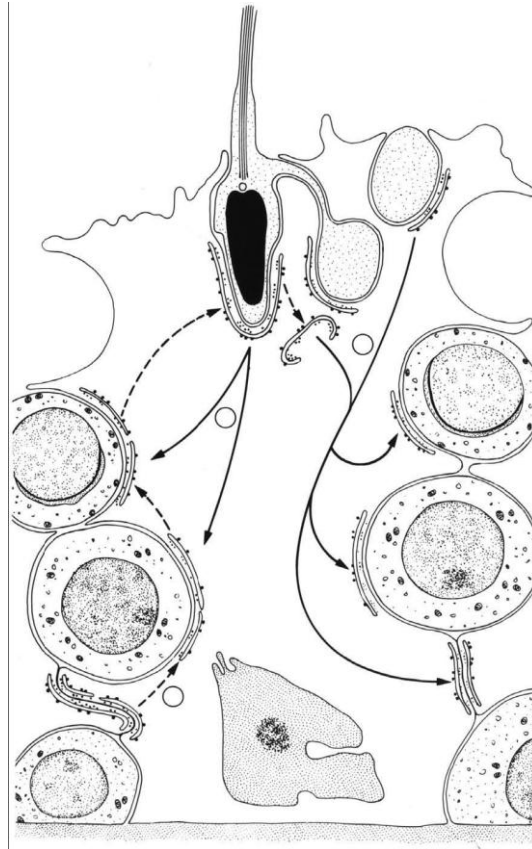


Figura 1 - Diagrama demonstrando possíveis rotas para redistribuição das junções intercelulares das células de Sertoli (Kerr et al., 2006).

O processo da espermatogênese envolve a proliferação das células germinativas, a diferenciação e, também, a morte celular programada (apoptose). Sua duração é de aproximadamente 57 dias no ganhão, sendo controlada por via endócrina, parácrina e autócrina (Swierstra et al., 1974, Varner e Johnson, 2007). Ela envolve, também, uma série de transformações celulares para chegar ao seu produto final, o espermatozóide. Estas modificações são representadas pela compactação dos cromossomos, pela formação de um flagelo, pela criação de uma vesícula secretória extremamente complexa, que é o acrossoma, e a retenção de RNAm, as quais caracterizarão a série de eventos que ocorrem antes, durante e após a fertilização (Miller e Ostermeier, 2006, Varner e Johnson, 2007).

A espermatogênese é um processo altamente produtivo que rende, diariamente, cerca de 5 a 6 bilhões de espermatozoides em ganhões adultos. Isto significa 30 a 40 trilhões de espermatozoides durante uma vida, considerando que a

vida média dos cavalos é de 19-20 anos. O estoque de células germinativas no testículo não se esgota, sofrendo constante renovação a cada início do processo, o que pode ser visualizado na representação esquemática da Figura 2 (Varner e Johnson, 2007). O processo se divide em três fases: a *espermatocitogênese* (fase de proliferação), a *meiose* (fase de multiplicação) e a *espermiogênese* (fase de diferenciação).

Durante a *espermatocitogênese* (fase de proliferação), as células germinativas mais jovens – as espermatogônias – se dividem em cinco gerações celulares (A_1 , A_2 , A_3 , B_1 e B_2). Durante esta fase parte do citoplasma dessas células continua unido, formando as pontes intercelulares que são importantes por permitir a comunicação direta entre as células irmãs, garantindo o desenvolvimento sincronizado desta linhagem celular (Johnson et al., 1997, Neves 2001).

Terminada a *espermatocitogênese* (fase de proliferação), inicia-se a *meiose* (fase de multiplicação), caracterizada pela duplicação e troca de material genético por recombinação e, depois, duas divisões meióticas que dão origem a duas espermatídes arredondadas e haplóides. Durante esta fase, essas células (*espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno*) passam pela barreira hematotesticular em direção ao compartimento ad-luminal. Já na *espermiogênese* (fase de diferenciação) as espermatídes arredondadas sofrem uma transformação severa com compactação da cromatina, formação do flagelo, do acrossoma e perde citoplasma para, então, ser liberadas no lúmen do túbulo seminífero como espermatozóides, processo ao qual é dado o nome de *espermição*. Durante esta fase a célula – o *espermatozóide* – fica mais vulnerável a defeitos estruturais e genéticos (Amann, 1993, Kerr et al., 2006).

2.4 Ciclo espermatogênico

Também conhecido como ciclo do epitélio seminífero, representa uma série de mudanças numa dada região do túbulo seminífero entre duas aparições de células no mesmo estágio (Jonhson, 1985). Uma das definições propostas por Leblond e Clermont em 1952, citada numa revisão bibliográfica realizada por Costa

e Paula (2003), é a de que o ciclo do epitélio seminífero pode ser definido como o período compreendido entre o desaparecimento de um determinado estágio celular até o seu reaparecimento neste mesmo segmento ou corte transversal do túbulo seminífero.

A duração do ciclo do epitélio seminífero é constante para cada espécie, variando entre as espécies (Costa e Paula, 2003). A duração é de 12,2 dias no garanhão (Swierstra et al., 1974) e 10,5 dias no jumento Pega (Neves, 2001). Geralmente, a partir de uma espermatogônia A_1 , quatro a cinco ciclos são necessários para a liberação dos espermatozoides no lúmen (Franca e Russel, 1998). Convencionou-se dizer, também, que, na maioria dos mamíferos, estas associações de células germinativas se dividem em oito diferentes estádios, conforme visualizado na **Figura 2** (Swierstra et al., 1974). Estes estádios apresentam certa sequência nos túbulos seminíferos, fazendo com que, frequentemente, um segmento transversal em determinado estágio esteja ao lado de outro segmento em um estágio seguinte, determinando uma disposição sequencial que é chamada de onda do epitélio seminífero (Varner e Johnson, 2007).

Esta situação de sincronia entre os diferentes estádios não tem sua origem conhecida (Johnson et al., 1997), mas acredita-se que seja devido à divisão sincrônica, mas não simultânea, de espermatogônias tronco em segmentos adjacentes de túbulos seminíferos. Johnson (1991) descreveu que esta sincronia proporcionaria uma liberação constante de espermatozoides, reduziria a competição por hormônios e outras substâncias utilizadas em determinado estágio. Diminuiria ainda o acúmulo de espermatozoides por segmento caso a espermiação fosse toda ao mesmo tempo, assegurando um fluxo constante de fluidos no túbulo seminífero, facilitando a maturação dos espermatozoides no epidídimo por manter um fluxo constante de fluídos e células oriundas do testículo.

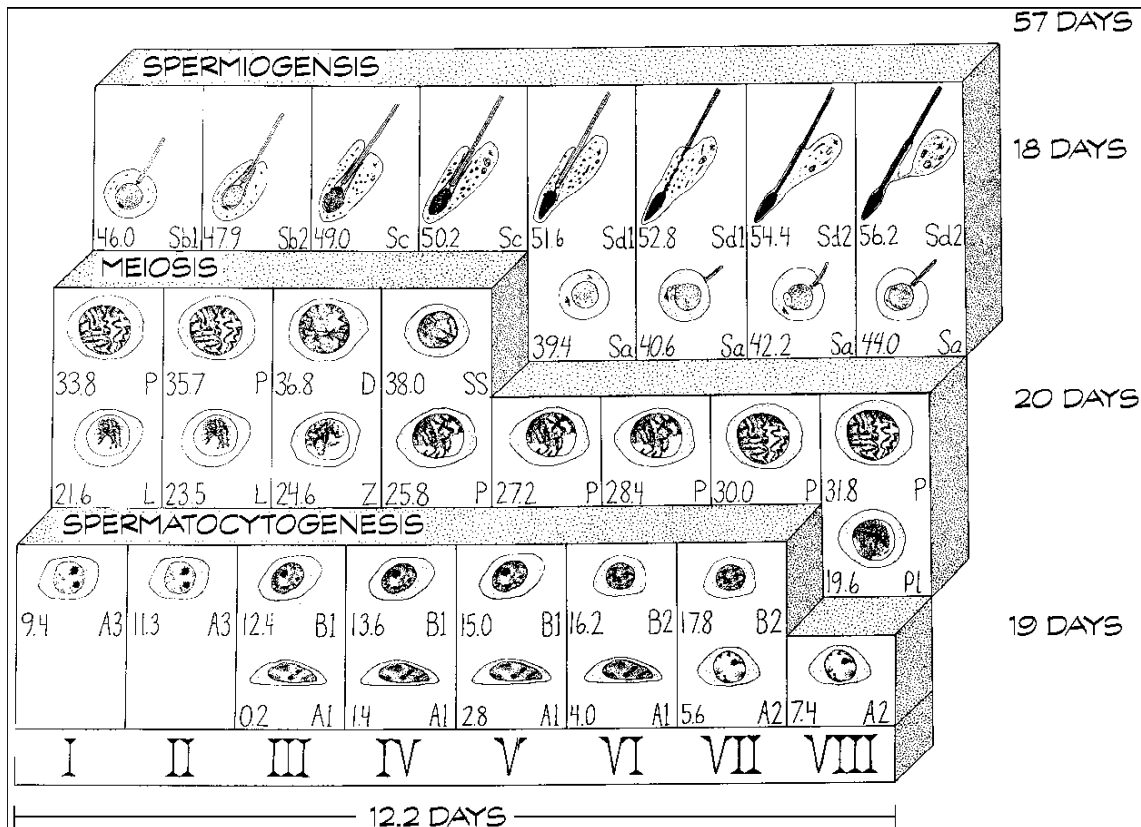


Figura 2 – Espermatogênese e estádios dos ciclos do epitélio seminífero em equinos, onde podemos visualizar a espermatocitogênese, meiose e espermiogênese, combinadas com os oito estádios do ciclo do epitélio seminífero (I-VIII). As letras representam a fase de desenvolvimento celular, os números associados com cada célula germinativa indicam a idade em dias. O comprimento do ciclo é de 12,2 dias e a duração da espermatogênese é de 57 dias (Varner e Johnson, 2007).

Segundo Amann (1993), a cada 12,2 dias, numa determinada região do túbulo seminífero, uma espermatogônia A_1 se divide e forma uma nova família de células germinativas. Esta mesma região, aproximadamente 4,7 ciclos após, irá liberar espermatozóides no lúmen do túbulo seminífero (Swierstra et al., 1974).

Berndtson e Desjardins (1974), citados por Costa e Paula (2003), sugerem que, nos mamíferos, pode-se identificar três diferentes tipos de espermatogônias: a tipo A, a intermediária e a tipo B. O número estimado de gerações de espermatogônias varia de quatro a seis, na maior parte das espécies estudadas (Clermont, 1972). Em touros, carneiros e no cão são seis gerações. No cavalo (A_1 , A_2 , A_3 , B_1 e B_2 – Johnson et al., 1994) são cinco (França e Russel, 1998).

Após a última divisão espermatogonial, estas passam a se chamar de espermatócitos; os da primeira divisão meiótica são os espermatócitos primários e os da segunda são os espermatócitos secundários (Costa e Paula, 2003).

Os espermatócitos primários em pré-leptóteno têm seu número semelhante aos da espermatogônia B₂. Logo após, eles vão para a fase de leptóteno e, sequencialmente, zigóteno, onde ocorre o pareamento dos cromossomos homólogos, assumindo a forma chamada por Clermont (1972) de “buquet”. Logo após, os cromossomos compactam-se e entram na fase de paquíteno, sequencialmente, de diplóteno onde eles se separam parcialmente. O núcleo, agora, passa pela metáfase, anáfase e telófase da primeira divisão meiótica para produzir os espermatócitos secundários, que apresentam os núcleos menores que os do espermatócito primário em paquíteno e, sem que ocorra duplicação de DNA (Clermont, 1972).

Após a segunda divisão meiótica, os espermatócitos secundários dividem-se e passam a ser denominadas espermátides arredondadas; aqui a espermiogênese tem início com o processo de diferenciação celular, descrito anteriormente até a formação dos espermatozóides (Guraya, 1987).

Mesmo os espermatozóides chegando ao lúmen dos túbulos seminíferos, estes ainda precisam sofrer o processo de maturação espermática no epidídimo e de capacitação no trato genital feminino para se tornarem aptos à fertilização (Costa e Paula, 2003).

2.5 Apoptose

A morte ou perda das células germinativas durante a espermatogênese pode aumentar em ganhões com função testicular anormal, mas pode ocorrer, também, como um processo fisiológico. Clermont (1962) e Huckins (1978) relatam que, durante a espermatogênese, pode ocorrer uma perda de 25 a 75% no número potencial de espermatozóides em ratos. Em ganhões, esta perda é mais

acentuada durante a estação reprodutiva (Johnson, 1985). Na fase de desenvolvimento das espermatogônias, estas estão mais vulneráveis a apoptose (Heninger et al., 2004), provavelmente para evitar uma sobrecarga sobre as células de Sertoli, tornando assim a apoptose um mecanismo necessário para a manutenção fisiológica da espermatogênese.

A morte celular programada (*apoptose*) pode funcionar como um dos principais fatores que antagonizam a proliferação das células germinativas, regulando assim a atividade testicular durante a estação reprodutiva (Blottner et al., 1995). Fora da estação reprodutiva o maior impacto das apoptoses acontece na espermatocitogênese (Johnson et al., 1997).

2.6 Quantificação da espermatogênese

O conhecimento do ciclo, bem como a caracterização dos estádios, a sua frequência, o cálculo da duração dos eventos durante a espermatogênese, o diâmetro tubular, além da definição do tipo celular que habita o epitélio seminífero em secções transversais, são muito importantes para a compreensão da espermatogênese, principalmente quando oferece base fisiológica para a comparação de condições hígdas com condições experimentais ou de alteração (França et al., 1993).

A identificação dos diferentes estádios é adequada para a realização de estudos quantitativos da espermatogênese, pois, com isso, pode-se determinar fases específicas do processo que possam ser afetadas por diferentes situações (Leite, 2002). Foi determinado por Swierstra et al. (1974), que existe variação entre garanhões e entre estações reprodutivas sobre diversos parâmetros relacionados com a produção espermática de acordo com a estação reprodutiva (Johnson, 1991).

A eficiência espermatogênica pode ser avaliada através da produção espermática diária por grama de testículo, sendo um parâmetro útil para comparação entre espécies. A eficiência da espermatogênese é freqüentemente

relacionada com o número de células de Sertoli por grama de testículo, maior índice tubulossomático (ITS), maior número de gerações de espermatogônias, baixo índice de perdas celulares e um menor intervalo entre os ciclos do epitélio seminífero (Franca e Russel, 1998; Johnson et al., 2000).

3 CAPÍTULO 1

Biometria testicular e morfologia dos túbulos seminíferos de cavalos Crioulos

Giuliano Moraes Figueiró^{1a*}

¹ Embryolab – Laboratório de Embriologia Animal. Departamento de Clínica de Grandes Animais. Centro de Ciências Rurais Universidade Federal Santa Maria, Santa Maria - RS, Brasil;

^a Setor de clínica e cirurgia de grandes animais. Hospital Veterinário, Universidade Vila Velha, Vila Velha - ES, Brasil.

Este trabalho será enviado para a revista Pesquisa Veterinária Brasileira.

* Endereço para correspondência: Embryolab, Laboratório de Embriologia Animal. Departamento de Clínica de Grandes Animais, Prédio 97, Bloco 4, Área Sul, Sala 428. Centro de Ciências Rurais Universidade Federal de Santa Maria. 97.105-900 Santa Maria RS Brasil. Phone/fax: 55-55-32208501.

e-mail address: figueirogm@hotmail.com

Resumo

Os objetivos deste experimento foram descrever a biometria testicular e a morfologia dos túbulos seminíferos de cavalos crioulos. Neste experimento foram utilizados testículos de dez animais sexualmente maduros com idade variando de três a seis anos (média de 48 meses). Os testículos foram perfundidos com solução heparinizada e, logo após, com solução de Karnovisky para fixação das estruturas. O peso médio dos garanhões foi de 377,5kg, o peso testicular médio foi de 162,9g, o índice gonadossomático de 0,087% e o índice tubulossomático de 0,067%. A proporção de túbulos seminíferos foi de 77,97% e a de tecido intertubular foi de 22,03%. O diâmetro tubular corrigido foi de 205 μ m e a altura do epitélio seminífero de 70 μ m. O comprimento total dos túbulos seminíferos por testículo foi de 4085,1m e o comprimento por grama foi de 26,09m. Há semelhança entre os dados da biometria testicular e da morfologia dos túbulos seminíferos dos cavalos Crioulos e de outras raças.

Palavras chave: equino, crioulo, espermatogênese.

Introdução

Não existem dados na literatura sobre a biometria testicular e a morfologia dos túbulos seminíferos de cavalos Crioulos, raça desenvolvida através da seleção natural no habitat pampeano – habitat caracterizado pelas planícies do sul da América do Sul – a partir do século XVI e que somente a partir da metade do século passado sofreu manipulação do processo seletivo pelo homem. Os espermatozoides, descritos como células altamente especializadas com a função única da fertilização, é o resultado final de um processo extremamente complexo, onde se desenvolve, se modifica e se especializa para exercer essa sua função na fecundação. Esse processo, chamado de espermatogênese pode ser separado em três fases: a espermatocitogênese ou fase de multiplicação, a meiose ou fase proliferação e a espermiogênese ou fase de diferenciação (Johnson et al., 1997). O processo ocorre nos túbulos seminíferos, onde as células de Sertoli, que dividem o epitélio, têm a função de segregar as células germinativas da agressão pelo sistema imune. O estudo da morfologia testicular e da espermatogênese é necessário para o estabelecimento de padrões fisiológicos. O objetivo deste estudo foi avaliar a biometria dos testículos e a morfologia dos túbulos seminíferos de cavalos crioulos, dando ênfase a proporção volumétrica do parênquima testicular, a caracterização dos estádios do ciclo do epitélio seminífero, do diâmetro dos túbulos seminíferos, do comprimento tubular e da altura do epitélio seminífero.

Material e Métodos

Colheita dos testículos e biometria testicular

Foram coletados testículos de 10 equinos da raça crioula, de três a seis anos de idade, oriundos da fronteira oeste e região central do Rio Grande do Sul e região norte do Espírito Santo. Todos os animais estavam em pastagem nativa característica da região e com suplementação mineral. As coletas ocorreram entre maio e setembro de 2008 e abril de 2009, fora da estação reprodutiva natural do hemisfério sul. Os animais foram castrados sob anestesia geral de acordo com o protocolo do Comitê de Ética e Experimentação Animal nº 23081.013329/2009-20 da Universidade Federal da Santa Maria – Sta. Maria-RS, Brasil. Os testículos colhidos foram separados dos respectivos epidídimos, pesados em balança digital, medidos para obtenção do comprimento, largura e espessura. O testículo contralateral foi congelado para posterior análise do percentual ocupado pela túnica albugínea e mediastino.

Imediatamente após a dissecação do epidídimo e pesagem, o testículo esquerdo foi perfundido com uma solução de NaCl 0,9% acrescida de 10 UI heparina/ml e logo após, perfundido com solução de glutaraldeído a 4 4% em tampão fosfato a 0,1M (pH 7.4 - Anexo I) por até 30 minutos. Os fragmentos (5 x 4 x 3mm) foram imersos novamente nesta solução e refrigerados no máximo em até 90 dias para o processamento histológico.

Processamento histológico

As amostras foram submetidas ao processo de desidratação numa sequência de banhos de imersão em álcool com graduação alcoólica crescente (50°, 70°, 80°, 90°, 95° e 100°) por 30 minutos em cada. Em seguida, os fragmentos foram imersos em uma solução de infiltração (2-hidroxietil-metacrilato) por 12 horas, sendo transferidos, por mais duas horas, para uma solução de infiltração nova. Foram incluídos por adição de dibenzolperóxido (endurecedor) à solução de infiltração, conforme a recomendação do fabricante (*Leica historesin embedding kit*[®]) e foram mantidos em recipiente com sílica gel até que ficassem completamente secos. Os fragmentos foram submetidos a cortes de 4 μ m de espessura por meio de micrótomo rotativo dotado de navalha de vidro. Os cortes foram montados em lâminas e corados com solução de azul de toluidina - borato de sódio a 1% e estas montadas com Entellan[®] (Merck).

Biometria e análise morfométrica dos testículos

A proporção volumétrica dos componentes do parênquima testicular foi obtida com auxílio do programa "ImageJ 1.34s" (Rasband, 2005), utilizando-se uma gráticula com 494 intercessões consideradas como pontos. Os seguintes componentes do parênquima testicular foram computados: células de Leydig, células e fibras do tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e linfáticos, parede do túbulo seminífero, epitélio seminífero e lúmen tubular, em 10 campos por animal escolhidos ao acaso por meio de varredura horizontal dos cortes histológicos. As proporções volumétricas expressas em porcentagem foram calculadas sobre 4940 pontos por testículo. O aumento utilizado para esta análise foi de 400x, sob microscópio de luz.

O volume do parênquima testicular foi calculado subtraindo-se do peso do testículo, o peso da albugínea e do mediastino que foram determinados a partir da dissecação dos testículos armazenados. Uma vez que a densidade do testículo é muito próxima de um (Johnson et al., 1981), o peso foi considerado igual ao volume.

Os índices leydigosomático e tubulossomático representam a proporção que as células de Leydig e os túbulos seminíferos tem sobre o peso corpóreo, respectivamente, e o índice gonadossomático representa o percentual de massa corpórea que é alocada nos testículos.

O diâmetro dos túbulos seminíferos foi calculado através da medida de 20 secções transversais de túbulos de contorno mais circular possível, por animal, onde foi realizada a média entre o maior e menor diâmetro de cada secção. A mensuração da altura média do epitélio seminífero iniciou na membrana basal até a borda adluminal, com auxílio do programa "ImageJ 1.34s" (Rasband, 2005). A área da secção do túbulo seminífero foi obtida pela multiplicação do quadrado do raio por π (3,14159).

Comprimento total dos túbulos seminíferos (CTT)

O comprimento total dos túbulos seminíferos foi calculado de acordo com o proposto por Attal e Courot (1963), sendo obtido pela divisão do valor corrigido do volume total dos TS pela área da secção transversal destes (Johnson and Neaves, 1981).

Os valores da área da secção transversal e do volume total corrigido dos túbulos seminíferos foram estimados considerando-se um fator de retração linear de

5% (Amann, 1981). O volume total corrigido foi obtido através da multiplicação da proporção de túbulo seminífero pelo peso do parênquima testicular.

O resultado do comprimento total dos túbulos foi expresso em metros e o valor do comprimento por grama foi realizado pela divisão deste valor pelo peso do testículo.

Análise estatística

O cálculo da média e desvio padrão, foram realizadas com auxílio do programa estatístico BioEstat 3.0 (Ayres et al., 2003), com 95% de probabilidade.

Resultados e Discussão

Biometria e análise morfométrica dos testículos

Os animais utilizados neste experimento representam uma população homogênea e representativa de garanhões jovens e sexualmente maduros (3 a 6 anos – 377,5Kg). Todos os animais eram criados a campo com suplementação mineral. Na Tabela 1 pode-se ver o peso dos animais, o peso testicular e o índice gonadossomático.

Melo e colaboradores (1998) estudaram garanhões adultos da raça Pantaneira, de origem genética e porte semelhantes aos da raça Crioula, com 36 a 40 meses de idade e peso médio de 315 Kg de média de peso corpóreo.

A média de peso testicular verificado neste experimento ($162,9 \pm 48,4\text{g}$), foi semelhante ao peso testicular médio de $163 \pm 8\text{g}$ verificado por Swierstra et al. (1974) em 12 garanhões abatidos com idade entre 3 e 10 anos e peso médio de 473Kg. Porém, a idade média mais alta e o peso mais elevado dos garanhões avaliados por eles indicam um peso relativo maior dos testículos dos garanhões da raça Crioula aqui estudados. Já a média de peso encontrada por Jones (1998) em eqüinos brasileiro de hipismo com 30 meses de idade (73,3g) foi bem mais baixa que a aqui verificada. Esses cavalos, comumente de compleição avantajada, sabidamente tardios no desenvolvimento, que, possivelmente, aos 2,5 anos de idade não deviam estar sexualmente maduros quando castrados como os objeto deste estudo, o que poderia justificar a diferença. Se compararmos o peso médio aqui observado com o verificado por Blanchard et al (2001) – 70 a 80g – em 53 garanhões de oito raças distintas com três anos de idade, provavelmente estes deveriam ser imaturos e de raças de grande porte, para com 3 anos apresentarem testículos tão leves. Já o peso médio de 123,8g por testículo encontrado por Melo et al (1998) em cavalos pantaneiros criados em condições naturais, com idades variando entre 36 a 40 meses (3 a 3,5 anos) e peso corporal de 315Kg, se situa abaixo do aqui verificado, diferença que provavelmente se possa atribuir ao peso corporal mais baixo dos animais pantaneiros, o que leva a um índice gonadosomático semelhante. Se compararmos também com os volumes testiculares verificados durante e fora da temporada de monta (144 e 103ml) por Johnson e Nguyen (1986) em 56 garanhões abatidos com idade variando de 4 a 20 anos, ou por Johnson (1991) – na temporada = 163g; fora da temporada = 126g; n = 90 – podemos supor que o tamanho dos testículos dos garanhões crioulos são relativamente maiores que os de outras raças, já que o peso aqui verificado, fora da estação de monta, se iguala ao encontrado por

esses autores durante a estação e são de peso maior do que os encontrados por eles fora da temporada. Há que considerar para esta suposição a idade mais avançada daqueles quando comparados aos avaliados neste estudo.

A relação entre peso corpóreo e peso testicular, ou o que se convencionou chamar de índice gonadossomático (IGS), encontrado neste estudo ($0,087 \pm 0,024\%$) foi semelhante ao relatado por Setchell (1991), mas superior ao relatado por Swierstra et al. (1974) em equinos sem raça definida, por Jones (1998) em eqüinos Brasileiro de Hipismo, o que indicaria que os cavalos da raça Crioula possuem um IGS superior as demais raças, especialmente se considerarmos que os garanhões aqui estudados, apesar de maduros sexualmente, eram muito jovens, e todos se encontravam fora da estação de monta. O IGS encontrado por Melo et al. (1998), semelhante ao aqui observado, pode ser explicado pela origem semelhante das 2 raças e pelas mesmas condições de manejo e alimentação.

O cavalo crioulo evoluiu sem a interferência do homem desde o século XVI até o segundo quarto do século passado. Garanhões trabalhando em liberdade e disputando a liderança das manadas era a característica onde vencida o mais forte. A seleção de animais com melhor desempenho reprodutivo e funcional, reprodutivo e nutricional.

Estádios do ciclo do epitélio seminífero em cavalos crioulos

As associações celulares características dos oito estádios do ciclo do epitélio seminífero em cavalos crioulos estão descritas a seguir:

Estádio 1 – Neste estágio observou-se no compartimento basal do epitélio seminífero a presença de espermatogônias do tipo A (A) e espermatócitos primários

em pré-leptoteno/leptoteno (PL/L). No compartimento adluminal observou-se espermátocitos primários em paquíteno (PQ) e espermátides arredondadas (Ar), em várias camadas (**Figura 1a**).

Estádio 2 – Foi caracterizado pela presença de espermatogônias tipo A, espermátocitos primários em leptoteno (L) próximos a membrana basal. O restante do epitélio seminífero constitui-se de PQ e espermátides em fase de alongamento (AL - **Figura 1b**).

Estádio 3 – No compartimento basal, encontrou-se espermatogônias tipo A, espermátocitos primários em zigoteno (Z) e diplóteno (D). No restante encontrou-se espermátides alongadas (**Figura 1c**).

Estádio 4 – Foi caracterizado pela presença de espermatogônias do tipo A no compartimento basal e por espermátocitos primários jovens que se encontravam na transição de zigoteno para paquíteno, diplótenos, espermátocitos secundários (II), espermátides arredondadas recém formadas e feixes compactos de espermátides alongadas (**Figura 1d**).

Estádio 5 – Na porção basal, encontraram-se espermatogônias do tipo A, espermátocitos primários em PQ, espermátides arredondadas recém formadas e espermátides alongadas em feixes foram encontradas no compartimento adluminal (Figura 2a).

Estádio 6 – Espermatogônias B₁ predominaram no compartimento basal. No compartimento adluminal foram observados espermátocitos primários em paquíteno, espermátides arredondadas e feixes de espermátides alongadas, com menor compactação que no estágio 5 dirigindo-se para o lúmen do epitélio seminífero (**Figura 2b**).

Estádio 7 – No compartimento basal encontrou-se as espermatogônias do tipo B₂ (com núcleo menor que as do tipo B₁) com esparsas espermatogônias do tipo A, enquanto que no compartimento adluminal observou-se espermatócitos primários em paquíteno, espermatídes arredondadas e espermatídes alongadas, que quando comparadas ao estágio anterior estavam com feixes de espermatídes mais próximos a borda luminal. Notou-se a presença de corpos residuais pequenos e pouco delimitados, resultantes do citoplasma das espermatídes alongadas em preparação para a espermição (**Figura 2c**).

Estádio 8 – Na base do epitélio seminífero encontraram-se algumas espermatogônias do tipo B₂ e espermatócitos primários em pré-leptóteno, espermatogônias do tipo A. No compartimento adluminal verificou-se o arranjo na forma clássica de paliçada das espermatídes alongadas na borda luminal, com várias delas sendo liberadas para o lume tubular no processo da espermição. Na borda luminal foram observados corpos residuais de coloração mais escura e bem maior do que aqueles do estágio 7 verificou-se também a presença de espermatócitos primários em paquíteno e espermatídes arredondadas (**Figura 2d**).

Constatou-se a presença de espermatogônias do tipo A em todos os ciclos do epitélio seminífero, não sendo possível, devido a metodologia utilizada, caracterizá-las em imaturas (indiferenciadas) e maduras (diferenciadas) ou nos diferentes subtipos destas duas classes de espermatogônias.

As células de Sertoli caracterizaram-se pelo contorno indefinido, núcleo irregular e nucléolo bem evidente, visualizadas em todos os estádios descritos anteriormente. A maior parte dos núcleos com disposição perpendicular encontraram-se mais afastados da membrana basal.

Proporção Volumétrica

O percentual representado pela túnica albugínea e pelo mediastino (Tabela 2) em relação ao peso testicular foi semelhante ao descrito por Swierstra et al. (1974) e por França et al. (2002). Encontrou-se 78% de túbulos seminíferos em relação aos outros componentes do parênquima testicular (Figura 1) o que se assemelha aos valores encontrados em equinos de outras raças (Johnson e Neaves, 1981, Jones, 1998, Varner e Johnson, 2007). Os valores de tecido intertubular em jumentos pêga (*Equus asinus*) são de 16% (Neves, 2001), 22% em jumentos africanos (*Equus asinus africanus* - Nipken e Wroble, 1997) e 39% em burros (Neves, 2001). Swierstra et al (1974) encontraram em equinos 38,7% de tecido intertubular, na pesquisa de Clemmons et al. (1995) 28% e 25% no trabalho descrito por Jones (1998) em cavalos Brasileiro de Hipismo. A proporção volumétrica varia entre mamíferos, sendo que normalmente 10 a 30% são de tecido intertubular e de 70 a 90% são de túbulos seminíferos (França e Russel, 1998; Godinho, 1999) ou de 60 a 90% segundo Setchell (1982).

O percentual de células de Leydig aqui encontrado (7,96%) foi inferior aos descrito por Johnson e Neaves (1981) em eqüinos abatidos. O número de células de Leydig por grama de testículo não varia entre as estações, fato que ocorre quando se considera o número de células de Leydig por testículo (Johnson e Thompson, 1986).

O percentual de estroma aqui encontrado (22%) foi semelhante ao encontrado em equinos por Swierstra et al. (1974).

Diâmetro dos Túbulos Seminíferos

A variação do diâmetro dos túbulos seminíferos (Tabela 3) é decorrente de vários fatores, sendo utilizado como indicador da atividade espermatogênica em investigações envolvendo a função testicular. Geralmente este diâmetro não sofre alterações em animais sexualmente maduros da mesma espécie que se encontram no período reprodutivo, mas variações significativas podem ser verificadas em animais de diferentes raças e até mesmo em linhagens diferentes (França e Russel, 1998).

O diâmetro médio dos túbulos seminíferos dos cavalos crioulos foi de 205 μ m. O diâmetro médio de 156 μ m relatado por Swierstra et al. (1974) em equinos sem raça definida com 3-10 anos de idade também são um indicativo do tamanho maior das estruturas do testículo do garanhão crioulo, já que os animais avaliados pelo autor eram mais velhos e, por isso mesmo, deveriam apresentar medidas mais elevadas. Swierstra et al. (1974) relatam que existe variação entre garanhões dentro e fora da estação reprodutiva. Essa variação pode se dever a desconsideração da retração tecidual durante o preparo histológico, utilização de animais impúberes ou pré-púberes, número de células mióides que formam a túnica própria, diferença na população de células de Sertoli e pelos padrões de secreção de fluído por estas células o que determinará o lúmem tubular (Paula, 1999).

Altura e área do epitélio seminífero

A altura média do epitélio seminífero aqui observada (70,56µm) está de acordo com o relatado por França e Russel (1998) que citam uma variação entre 60 a 100µm nas espécies domésticas.

Não foram encontradas discrepâncias entre os valores da área do túbulo seminífero deste experimento, quando considerada a aplicação da fórmula e a utilização do programa “ImageJ”, concordando com o relatado por Menezes (2006), de que não existiria diferença significativa ($p < 0,01$) ao comparar seus resultados com a fórmula da área da circunferência (πr^2), que é a utilizada comumente em artigos nesta área (Costa et al., 2004).

Índice tubulossomático (ITS)

O índice tubulossomático (ITS) aqui encontrado ($0,067 \pm 0,017\%$) foi superior ao encontrado pelos demais autores estudados e, representa, possivelmente a maior capacidade funcional do testículo dos garanhões crioulos.

Comprimento Tubular Total (CTT)

O CTT ($4.085,10 \pm 1.170,68\text{m}$) foi superior aos 2.419 metros relatado por Swierstra et al. (1974) em equinos e aos 2.808m relatados por Jones (1998) em equinos Brasileiro de Hipismo com 30 meses de idade e ao relatado por Johnson e Neaves (1981), que descreveram um aumento no comprimento tubular de acordo com a idade (2 a 3, 4 a 5 e 13 a 20 anos – 2040m, 2390m e 2790m) e, semelhante ao relatado por Neves (2001) com jumentos, que obteve 3.806 metros.

Quando comparamos o comprimento de túbulos seminíferos por grama de testículo nos equinos crioulos ($26,09 \pm 10,63$), temos valores superiores aos relatados

por Swierstra et al. (1974) em equinos abatidos e semelhante aos 22 metros/grama encontrados por Neves (2001) em jumentos.

Conclusões

Os resultados obtidos de IGS, peso testicular, diâmetro do túbulo seminífero, altura do epitélio do túbulo seminífero, área do túbulo seminífero, comprimento do túbulo seminífero por grama de testículo, proporção de túnica albugínea e mediastino testicular, proporção de células de Leydig, proporção do parênquima testicular e tecido intertubular em cavalos Crioulos são semelhantes aos encontrados nas outras raças eqüinas.

O comprimento tubular total obtido neste experimento foi superior a todas as outras raças estudadas.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Cabanha Nossa Senhora da Penha e Fazenda Pantanal, no Espírito Santo, e Cabanha Trevo Branco, Cabanha Infinito e Estância Artigas no Rio Grande do Sul pela concessão dos animais para a pesquisa.

Referências bibliográficas

- Amann, R. P. 1981. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. *J. Androl.*, 2, 37-58.
- Attal, J., Courot, M. 1963. Développement testiculaire et établissement de la spermatogénèse chez le taureau. *Ann Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 3, 219-241.

- Ayres, M., Ayres JR., M., Ayres, D. L., Santos, A. S. 2003. Bio Estat. Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biológicas e Médicas. Belém: Sociedade Civil Maniraua, Brasília CNPq.
- Blanchard, T. L., Johnson, L., Brinsko, S. P., Varner, D. D., Rigby, S. L., Hurtgen, J. P. 2001. Evaluation of Testicular Size and Function In 1–3-Year-Old Stallions. Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, 47, 232-235.
- Clemmons, A. J., Thompson, D. L., Johnson, L. 1995. Local initiation of spermatogenesis in the horse. Biol. Reprod., 52, 1258-1267.
- Costa, D. S., Henry, M., Paula, T. A. R. 2004. Espermatogênese de catetos (*Tayassu tajacu*). Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, 56(1), 46-51.
- França, L. R., Russel, L. D. 1998. The testis of domestic animals. In: Regadera, J. e Martinez-Garcia (eds.) Male Reproduction. A multidisciplinary overview. Churchill Livingstone, Madrid, p. 197-219.
- Franca, LR, Chiarinigarcia, H, Neves, E. S. 2002. Comparative testis morphometry and seminiferous epithelium cycle length in donkeys and mules. Biology of Reproduction, USA, 67, 247-255.
- Godinho, H. P., Cardoso, F. M. 1979. Desenvolvimento sexual de porcos Yorkshire. II. Estabelecimento e evolução da espermatogênese. Arq. Esc. Vet. UFMG. 31(3), 351-361.
- Johnson, L. 1991. Seasonal differences in equine spermatocytogenesis. Biology of Reproduction, 44, 284-291.
- Johnson, L. Blanchard, T. L., Varner, D. D., Scrutchfield, W. L. 1997. Factors affecting spermatogenesis in the Stallion. Theriogenology, 48, 1199-1216.
- Johnson, L., Neaves, W. B. 1981. Age-related changes in the Leydig Cell population, seminiferous tubules and sperm production in stallions. Biol. Reprod. 24, 703-712.
- Johnson, L., Nguyen, H. B. 1986. Annual cycle of the Sertoli cell population in adult stallions. J. Reprod. Fert. 76, 311-316.
- Johnson, L., Thompson, Jr, D. L. 1986. Seasonal variation in the total volume of leydig cells in stallions is explained by variation in cell number rather than cell size. Biology of Reproduction, 35, 971-979.
- Jones, D. N. 1998. Desenvolvimento testicular de equinos mestiços da raça Brasileira de Hipismo, de 1 a 30 meses de idade. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária). Belo Horizonte – MG, Universidade Federal de Minas Gerais, 89p.
- Melo, M. I. V., Sereno, J. R. B., Henry, M., Cassali, G. D. 1998. Peripuberal sexual development of Pantaneiro Stallions. Theriogenology, 50, 727-737.
- Menezes, C. M. C. 2006. Análise morfofuncional da espermatogênese de queixadas (*Tayassu pecari*, Link, 1795). Tese (Mestrado em Produção Animal). Campos dos Goytacazes – RJ, Universidade Estadual Norte Fluminense, 64p.

- Neves, E. S. 2001. Estudo comparativo da estrutura do testículo e do processo espermatogenico em jumentos (*Equus asinus*) e burros (*Equus mulus mulus*). Tese (Doutorado em Biologia Celular). Belo Horizonte – MG, Universidade Federal de Minas Gerais, 135p.
- Nipken. C., Wroblel, K. H. 1997. A quantitative morphological study of age-related changes in the donkey testis in the period between puberty and senium. *Andrologia*, 29, 149-161.
- Paula, T. A. R. 1999 Avaliação histológica e funcional do testículo de capivaras adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Tese (Doutorado em morfologia). Belo Horizonte – MG, Universidade Federal de Minas Gerais, 84p.
- Rasband, W. 2005. National Institute of Health, USA. Software disponível em <http://rsb.info.nih.gov/ij/>
- Setchell, B. P. 1982. Spermatogenesis and spermatozoa. In: Austin, C. R., Short, R. V. (eds). *Reproduction in mammalian*. London: Elek, 1(4), 63-101.
- Setchell, B. P. 1991. Male reproductive organs and semen. In: Cupps, P. T. (ed.) *Reproduction in domestic animals*. Academic Press, 221-249.
- Swiesrstra. E. E., Gebauer, M. R., Pickett, B. W. 1974. Reproductive physiology of the stallion I. Spermatogenesis and testis composition. *J. Reprod. Fertil.* 40, 113-123.
- Varner, D. D., Johnson, L. 2007. From a Sperm's Eye View—revisiting our perception of this intriguing cell. In: *Proceedings of the American Association of Equine Practitioners*. 53, 104-177.

Tabela 1 – Peso corporal, média de peso entre os testículos do mesmo animal e índice gonadossomático de 10 equinos crioulos de três a seis anos de idade.

Animal	Peso Corporal (%)	Peso médio testículo (g)	Índice Gonadossomático (%)
1	440	145	0,0659
2	440	200	0,0909
3	325	202,5	0,1262
4	390	189,8	0,0973
5	370	237,2	0,1282
6	435	172,5	0,0793
7	330	115,9	0,0702
8	350	139,5	0,0797
9	325	100,5	0,0634
10	370	221,2	0,0655
Média ±	377,5	162,9	0,087
desvio padrão	± 45,8	± 48,4	± 0,024

Tabela 2 – Peso do testículo perfundido, peso do parênquima testicular, pesos e valores percentuais da albugínea e mediastino testicular de 10 equinos crioulos de 3 a 6 anos de idade.

Equino	Peso do testículo	Parênquima testicular		Albugínea		Mediastino	
	(g)	(g)	%	(g)	%	(g)	%
1	140,0	114,2	81,57	19,6	14,00	6,2	4,43
2	190,0	159,6	84,00	23,6	12,42	6,8	3,58
3	200,0	172,8	86,39	20,46	10,23	6,8	3,39
4	199,7	174,7	87,48	19,8	9,91	5,2	2,60
5	242,2	207,3	85,59	26,8	11,07	8,1	3,34
6	197,8	158,1	79,93	28,9	14,61	10,8	5,46
7	138,8	112,8	81,27	18,7	13,47	7,3	5,26
8	101,3	82,0	80,95	14,5	14,31	4,8	4,74
9	160,0	136,4	85,25	17,6	11,00	6,0	3,75
10	121,5	101,2	83,29	14,6	12,02	5,7	4,69
Média	169,13	141,91	83,57	20,46	12,30	6,8	4,12
Desvio padrão	43,72	39,1	2,58	4,76	1,73	1,72	0,93

Tabela 3 – Diâmetro tubular*, altura do epitélio seminífero* e área* da secção transversal de túbulo seminífero (μm^2) de 10 equinos crioulos de 3 a 6 anos de idade.

Animal	Diâmetro do túbulo seminífero (μm)	Altura do epitélio seminífero (μm)	Área da secção transversal de túbulo seminífero (μm^2)
1	183,05	61,09	26316,55
2	226,27	85,26	40210,87
3	214,96	74,66	36291,49
4	247,55	86,06	48129,95
5	259,78	95,19	53003,06
6	236,74	76,03	44018,25
7	171,12	52,75	22998,05
8	180,30	64,98	25531,77
9	149,78	44,79	17619,65
10	180,42	64,81	25565,77
Média	205,00	70,56	33968,54
(\pm desvio padrão)	($\pm 36,91$)	($\pm 2,82$)	($\pm 12000,90$)

* Corrigidos conforme fator de retração linear de 5% (Amann, 1981)

Tabela 4 – Biometria e histometria do testículo de dez equinos da raça crioula fixados com método de Karnovsky e processados segundo Costa et al. (2004).

Parâmetro	Média \pm desvio padrão
Peso Corporal (Kg)	377,5 \pm 45,8
Peso testicular médio (g)	162,9 \pm 48,4
Índice gonadossomático (%)	0,087 \pm 0,024
Índice leydigossomático (%)	0,007 \pm 0,002
Índice tubulossomático (%)	0,067 \pm 0,017
Células de Leydig (%)	7,96 \pm 4,12
Tecido conjuntivo (%)	11,97 \pm 3,75
Vasos sanguíneos (%)	2,10 \pm 0,57
Tecido intertubular	22,03 \pm 6,34
Parede do túbulo seminífero (%)	7,54 \pm 2,54
Epitélio do Túbulo Seminífero (%)	63,74 \pm 6,21
Lúmen do túbulo seminífero (%)	6,69 \pm 3,54
Túbulo Seminífero (%)	77,97 \pm 6,34
Diâmetro tubular* (μm)	205,00 \pm 36,91
Altura do epitélio seminífero* (μm)	70,56 \pm 2,82
Comprimento de túbulo seminífero* (m/g)	26,09 \pm 10,63
Comprimento total de túbulo seminífero* (m)	4085,10 \pm 1.170,68

* Corrigidos conforme fator de retração linear de 5% (Amann, 1981)

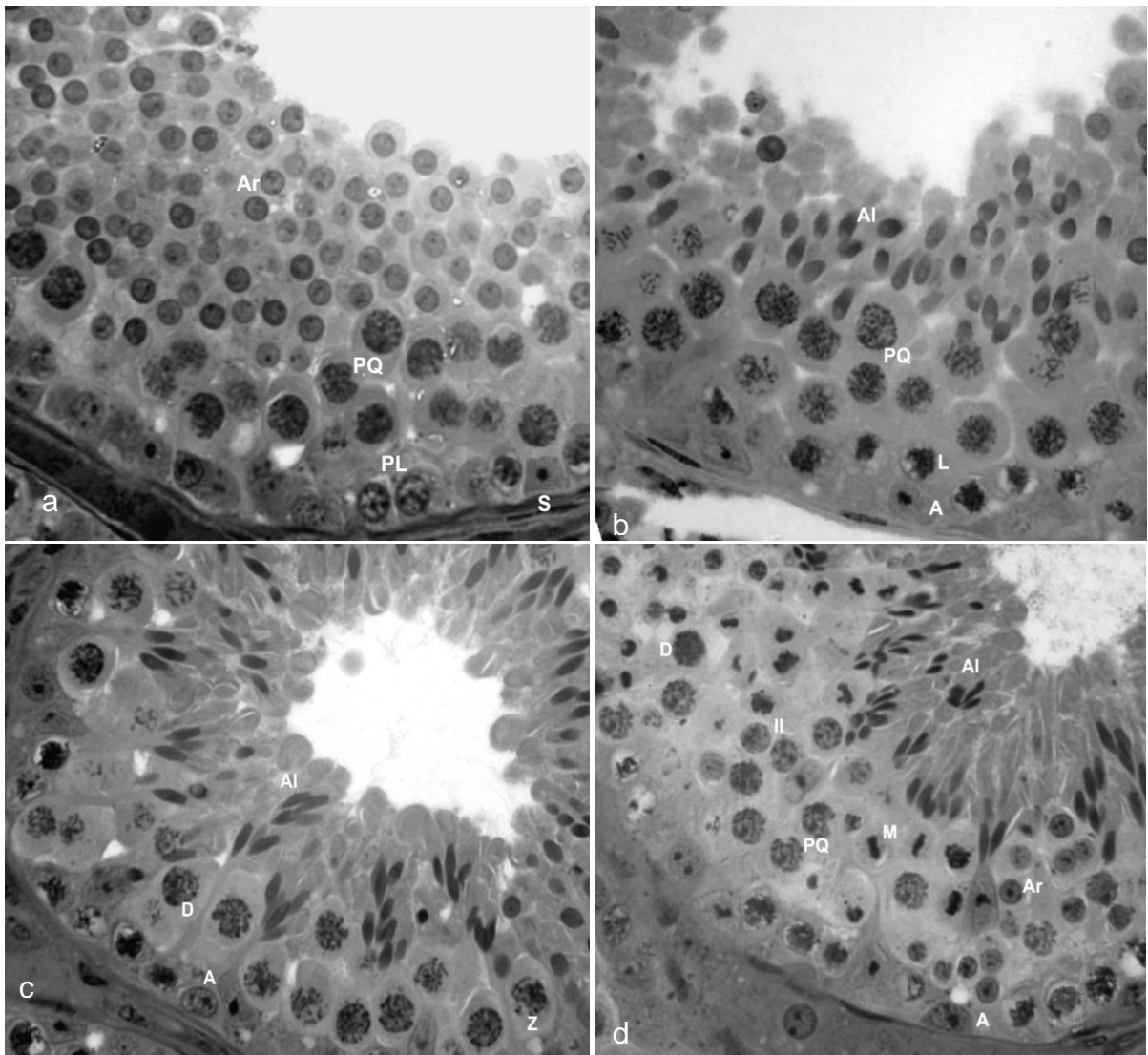


Figura 1 - Secções transversais de túbulos seminíferos caracterizando os estádios 1 (**a**), 2 (**b**), 3 (**c**) e 4 (**d**) do ciclo do epitélio seminífero de testículos de equinos crioulos orquiectomizados fora da temporada reprodutiva, demonstrando os seguintes grupos celulares: “**a**” –espermátocitos primários em pré-leptóteno (PL), espermátocitos primários em paquíteno (PQ) e espermátides arredondadas (Ar); “**b**” - espermátocitos primários em leptóteno (L), ‘PQ’, espermátides em alongamento (AI); “**c**” - espermátocitos primários em zigóteno (Z), espermátocitos primários em diplóteno (D) e AI em feixes; “**d**” – ‘Z’, ‘PQ’, ‘D’, figuras de meiose (M), espermátocitos secundários (II), ‘Ar’ e feixes de ‘AI’. Todos os estágios apresentaram espermatogônias do tipo A (A) e células de Sertoli (S). Azul de toluidina, 400x.

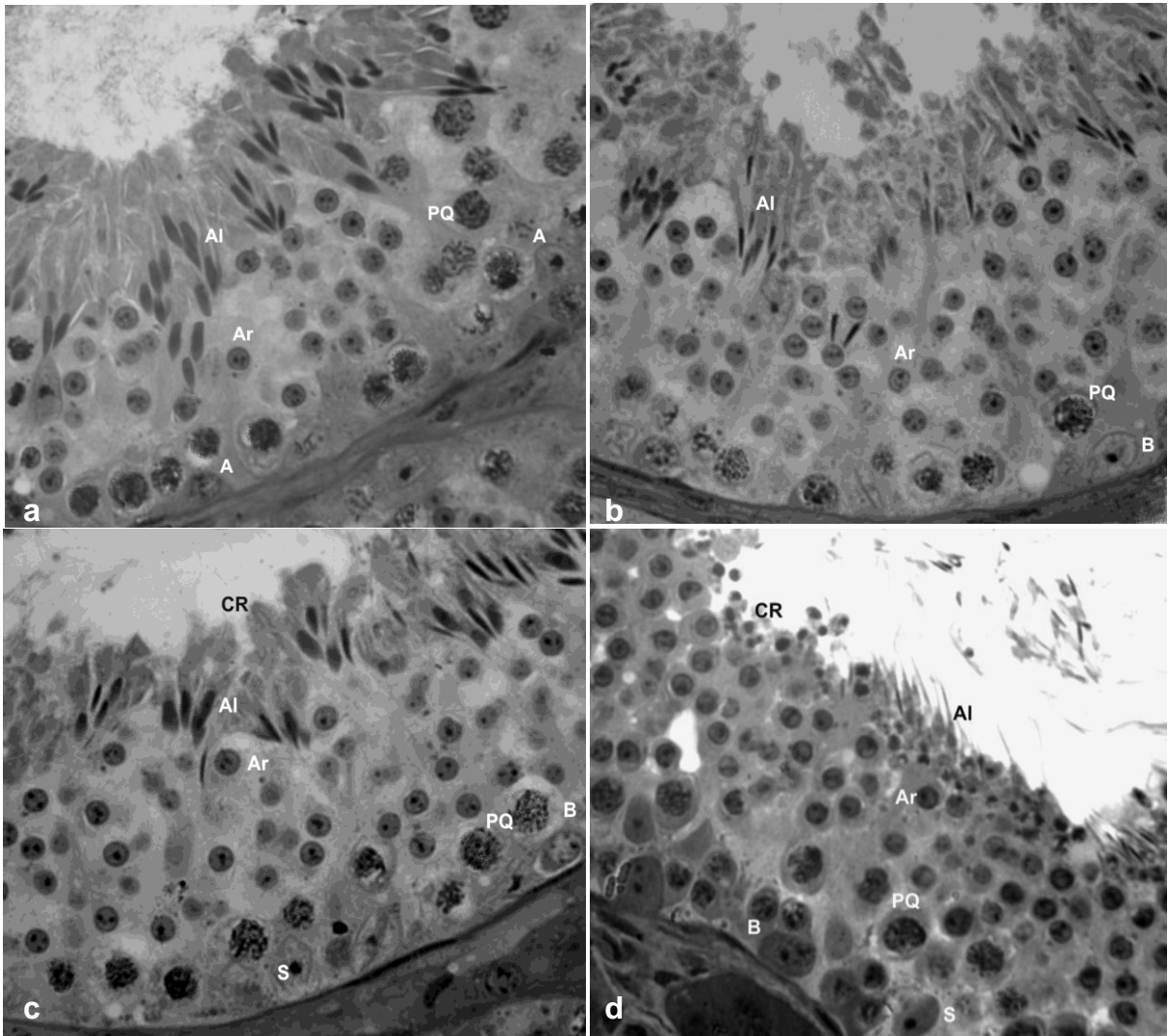


Figura 2 - Secções transversais de túbulos seminíferos caracterizando os estádios 5 (**a**), 6 (**b**), 7 (**c**) e 8 (**d**) do ciclo do epitélio seminífero de testículos de equinos crioulos orquiectomizados fora da temporada reprodutiva, demonstrando os seguintes grupos celulares: “**a**” – espermatogônias do tipo A (A), espermatócitos primários em paquíteno (PQ), espermatídes arredondadas (Ar) e espermatídes alongadas (Al) formando feixes compactos; “**b**” – espermatogônias do tipo B (B), ‘PQ’, ‘Ar’ e feixes de ‘Al’ migrando em direção ao lúmen tubular; “**c**” – ‘A’, ‘B’, ‘PQ’, ‘Ar’, ‘Al’ não mais formando feixes e próximos ao lúmen, corpos residuais (CR); “**d**” – ‘A’, ‘B’, espermatócitos primários em pré-leptoteno (PL), ‘PQ’, ‘Ar’, ‘Al’ em forma de paliçada na borda luminal e ‘CR’. Todos os estágios apresentaram células de Sertoli (S). Azul de toluidina, 400x.

4 CAPÍTULO 2

Rendimento intrínseco da espermatogênese e produção espermática diária de cavalos Crioulos adultos

Giuliano Moraes Figueiró^{1a}

¹ Embryolab – Laboratório de Embriologia Animal. Departamento de Clínica de Grandes Animais. Centro de Ciências Rurais Universidade Federal Santa Maria 97.105-900 Santa Maria RS, Brasil;

^a Setor de clínica e cirurgia de grandes animais. Hospital Veterinário, Universidade Vila Velha, Vila Velha ES, Brasil

Este trabalho será enviado para a revista *Animal Reproduction Science*.

Resumo

O objetivo deste estudo foi determinar o rendimento intrínseco da espermatogênese, estimar a produção espermática diária e a capacidade de suporte das células de Sertoli em equinos Crioulos, fora da temporada de monta, utilizando-se 10 garanhões com idade e peso médio de 48 meses e 377Kg, respectivamente. Estimou-se o índice de eficiência das mitoses espermatogoniais em 3,9 espermátocitos primários em pré-leptóteno/leptóteno produzidos a partir de cada espermatogônia A. O rendimento meiótico foi de 3,9 células, e o valor estimado de perdas celulares durante a prófase meiótica de 10%. O rendimento geral da espermatogênese foi de 13,9 células. O número de células de Sertoli estimado por testículo foi de 8,7 bilhões e 54,80 milhões por grama de testículo e, cada uma, teve sua capacidade estimada para sustentar 10,0 células germinativas. A reserva espermática total foi estimada em 46,8 bilhões, e a produção espermática diária de 3,8 bilhões de espermatozóides por testículo, o que equivale a 23,5 milhões de espermatozóides por grama de testículo. Conclui-se que o rendimento meiótico, o índice de perdas celulares e a capacidade de suporte das células de Sertoli aqui encontrados foram semelhantes as demais raças de eqüinos. Já o número de células de Sertoli por grama de testículo, a produção espermática diária total e por grama de testículo foram superiores, indicando uma possível superioridade da fertilidade potencial da raça Crioula.

Palavras-chave: eqüino, produção espermática diária, rendimento intrínseco da espermatogênese

Introdução

Os eqüinos são modelos adequados para a compreensão da variação na espermatogênese, uma vez que apresentam um número maior de espermatogônias durante a estação de monta, o que pode acarretar alterações estacionais na produção espermática diária (Johnson, 1991). As células de Sertoli (CS) promovem a compartimentalização do epitélio seminífero, além de fornecerem a sustentação e a nutrição para as células germinativas, a espermição das espermátides, o movimento de células jovens, a fagocitose das células germinativas degeneradas e de corpos residuais, a secreção de fluido luminal, a formação da barreira hematotesticular e a comunicação intercelular (Neves, 2001; Dym e Madhwa Raj, 1977) e, devido a estas funções, são consideradas determinantes na produção espermática diária (França e Russel, 1998). A determinação da população celular e seu número por grama de testículo são formas de padronizar os dados observados em equinos. Vários fatores podem levar a danos temporários ou permanentes nas células germinativas, afetando a capacidade de suporte das células de Sertoli levando a diminuição na produção diária de espermatozóides e a degeneração testicular (Johnson et al., 1997). O cavalo Crioulo é o resultado da seleção natural por quatro séculos no Pampa Sul Americano, onde as características de rusticidade e resistência, devido a ausência da interferência humana, se fortaleceram (Solonet, 1946). A fertilidade e a longevidade parecem ser atributos resultantes desse tipo de adaptação. Este estudo teve como objetivo determinar o rendimento intrínseco da espermatogênese, estimar a produção espermática diária e a capacidade de suporte das células de Sertoli em equinos Crioulos.

Material e Métodos

Colheita dos testículos e biometria testicular

Foram coletados testículos de 10 equinos da raça crioula, de três a seis anos de idade, oriundos da fronteira oeste e região central do Rio Grande do Sul e região norte do Espírito Santo. Todos os animais estavam em pastagem nativa característica da região e com suplementação mineral. As coletas ocorreram entre maio e setembro de 2008 e abril de 2009, fora da estação reprodutiva natural do hemisfério sul. Os animais foram castrados sob anestesia geral de acordo com o protocolo do Comitê de Ética e Experimentação Animal nº 23081.013329/2009-20 da Universidade Federal da Santa Maria – Sta. Maria-RS, Brasil. Os testículos colhidos foram separados dos respectivos epidídimos, pesados em balança digital, medidos para obtenção do comprimento, largura e espessura. O testículo contralateral foi congelado para posterior análise do percentual ocupado pela túnica albugínea e mediastino.

Imediatamente após a dissecação do epidídimo e pesagem, o testículo esquerdo foi perfundido com uma solução de NaCl 0,9% acrescida de 10 UI heparina/ml e logo após, perfundido com solução de glutaraldeído a 4% em tampão fosfato a 0,1M (pH 7.4 - Anexo I) por até 30 minutos. Os fragmentos (5 x 4 x 3mm) foram imersos novamente nesta solução e refrigerados no máximo em até 90 dias para o processamento histológico.

Processamento histológico

As amostras foram submetidas ao processo de desidratação numa sequência de banhos de imersão em álcool com graduação alcoólica crescente (50°, 70°, 80°, 90°, 95° e 100°) por 30 minutos em cada. Em seguida, os fragmentos foram imersos em uma solução de infiltração (2-hidroxietil-metacrilato) por 12 horas, sendo transferidos, por mais duas horas, para uma solução de infiltração nova. Foram incluídos por adição de dibenzolperóxido (endurecedor) à solução de infiltração, conforme a recomendação do fabricante (*Leica historesin embedding kit*[®]) e foram mantidos em recipiente com sílica gel até que ficassem completamente secos. Os fragmentos foram submetidos a cortes de 4 μ m de espessura por meio de micrótomo rotativo dotado de navalha de vidro. Os cortes foram montados em lâminas e corados com solução de azul de toluidina - borato de sódio a 1% e estas montadas com Entellan[®] (Merck).

População celular

A população celular foi determinada pela contagem dos núcleos das células do epitélio seminífero no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero (CES), classificado pelo método da morfologia tubular (Costa et al., 2004).

Esta contagem foi feita com o programa "ImageJ 1.34s" (Rasband, 2005), com imagens microscópicas digitalizadas de 10 secções transversais de túbulos que estavam no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero, determinado pelo método da Morfologia tubular (Costa et al., 2004).

Após a contagem, corrigiu-se o número de células através da fórmula de Abercrombie (1946), modificada por Amann (1962), conforme abaixo:

$$\text{Número Corrigido} = \frac{\text{Contagem obtida} \times \text{espessura do corte}}{\text{Espessura do corte} + \sqrt{(\text{DMN}/2)^2 - (\text{DMN}/4)^2}}$$

Em que o DMN é o diâmetro nucleolar ou nuclear médio, obtido pela média de 10 núcleos de cada célula germinativa ou 10 nucléolos das células de Sertoli, também no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero.

Rendimento intrínseco da espermatogênese

Foi determinado a partir das razões entre os números corrigidos de células germinativas obtidas no estágio 1 do CES, onde as seguintes razões foram calculadas (Costa et al., 2004):

- Coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais: número de PL/L sobre o número de espermatogônias tipo A;
- Rendimento meiótico: número de Ar sobre o número de PQ;
- Rendimento geral da espermatogênese: número de Ar sobre o número de espermatogônias tipo A;
- Perdas celulares durante a prófase meiótica: número de PQ sobre o número de PL/L.

Índice de células de Sertoli

Devido a relação entre o número de células de Sertoli (CS) e a produção espermática, determinamos, por uma série de razões sobre a população celular em

um dado segmento do estágio 1 do CES, os diversos índices destas células, como os descritos abaixo:

- Número de espermatogônias tipo A dividido pelo número de CS;
- Número de espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno pelo número de CS;
- Número de espermatócitos primários em paquíteno pelo número de CS;
- Número de espermátides arredondadas pelo número de CS;
- Número total de células germinativas sobre o número de CS.

Número total de células de Sertoli

Este dado foi obtido pelo método proposto por Hochereau-de Reviere e Lincoln (1978), onde devemos multiplicar o número corrigido de células de Sertoli por secção transversal pelo resultado da divisão do comprimento tubular pela espessura do corte (4 µm). Para o cálculo do número de células de Sertoli por grama de testículo este número foi dividido pelo peso líquido do testículo.

Reserva espermática testicular e produção espermática diária esperada

Para o cálculo da Reserva espermática testicular, utilizou-se a fórmula abaixo (Costa et al., 2004):

$$RET = Ar \times \frac{CTT}{\text{Espessura do corte}}$$

Sendo:

RET = reserva espermática total

Ar = número corrigido de espermátides arredondadas por secção transversal.

Para o cálculo da produção espermática diária, utilizou-se basicamente a mesma fórmula da RET, com a diferença que a espessura do corte foi multiplicada pela duração do ciclo do epitélio seminífero (12,2 – Swierstra et al., 1974) antes de ser utilizada como denominador para dividir o comprimento tubular total. Para o cálculo da reserva espermática por grama de testículo dividiu-se o valor da RET pelo peso líquido dos testículos.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada com auxílio do programa estatístico BioEstat 3.0 (Ayres et al., 2003), para o cálculo das médias e do seu desvio padrão.

Resultados e Discussão

População celular

A eficiência do processo espermatogênico pode ser avaliada através das razões entre as células germinativas presentes nos estádio 1 do ciclo do epitélio seminífero (CES). O diâmetro nuclear ou nucleolar médio (Tabela 1) foi utilizado para a obtenção do número celular corrigido (Tabela 2). O número proporcional de células germinativas obtidas no estádio 1 do CES (Tabela 2) foi superior ao relatado por Jones (2001) em eqüinos brasileiros de hipismo com 30 meses de idade (2,5 anos), o que pode estar ligado à imaturidade dos animais por ele estudado.

Rendimento intrínseco da espermatogênese

O coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais (EME), que é determinado pela divisão do número de espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno sobre o número de espermatogônias do tipo A, é uma quantificação da eficiência das divisões celulares durante a espermatogênese. Devido as perdas celulares que ocorrem por apoptose (De Rooij e Lok, 1987), a eficiência das mitoses espermatogoniais dificilmente chega a 100%. Neste estudo (Tabela 3), este número de EME (3,9) ficou abaixo do encontrado para a maioria dos animais domésticos (14,6 à 24,8), conforme descrito por França e Russel, (1998). Este valor pode ser explicado pelo fato de as orquiectomias terem sido realizadas fora da estação de monta e que existem variações, entre garanhões e estações reprodutivas, sobre a produção espermática (Swierstra et al., 1974). Johnson (1991) relata que, em eqüinos, os testículos têm o dobro do número de espermatogônias na temporada de monta, quando comparados com os do período fora da temporada.

Nem todo espermatócito que entra em meiose completa seu desenvolvimento em espermátide e espermatozóide, no entanto, este processo é esperado, pois embora quatro espermátides possam ser produzidas a partir de um espermatócito primário, perdas de até 30% são observadas no final da meiose nos mamíferos domésticos (França e Russel, 1998). O rendimento meiótico aqui observado foi de 3,9 espermátides arredondadas por espermatócito I em paquíteno (PQ), corroborando, em parte, os resultados obtidos por Jones (1998) – 3,1 espermátides arredondadas por PQ – e por Naden et al. (1990) – 3,4 espermátides arredondadas por PQ. A degeneração das espermátides em equinos é mais acentuada fora da estação reprodutiva (Johnson et al., 1997). Se os resultados obtidos por Jones (1998) e Naden et al. (1990) foram obtidos durante a estação de monta, o

rendimento meiótico em crioulos pode ser caracterizado como superior, já que foram obtidos fora da temporada de monta, quando seria esperado um rendimento menor devido a degeneração mais acentuada das espermatídes.

O rendimento geral da espermatogênese (RGE), representado pelo número de espermatozoides produzidos por espermatogônia A, foi de 13,9 neste estudo. Jones e Berndtson (1986) encontraram um RGE de 26,2; isso pode ser explicado pelo fato de que os animais aqui utilizados estavam no período fora da temporada de monta e os de Jones e Berndtson (1986) em plena temporada.

O índice de perdas celulares (IPC) aqui observado foi de 10%, semelhante ao relatado para a maioria dos animais domésticos, onde obtivemos 0,90 espermatócitos primários em PQ para cada espermatócito primário em PL/L. Heninger et al. (2004) relataram que a apoptose é um mecanismo ativo para a remoção seletiva de células germinativas dos túbulos seminíferos de garanhões férteis (Schwartzman e Cidlowski, 1993) que pode estar exacerbado em animais com baixa produção espermática (Blanchard and Johnson, 1997). Blottner et al. (1995) propuseram que a morte celular programada funciona como um dos principais fatores que antagonizam a proliferação das células germinativas, regulando assim a atividade testicular durante as diferentes estações.

Índice de células de Sertoli

O índice de células de Sertoli por espermatogônias tipo A encontrado neste estudo foi de 0,4. Encontrou-se 1,7 espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno para cada célula de Sertoli, 1,5 espermatócitos primários em paquíteno para cada CS e 5,8 espermatídes arredondadas por CS, valor 45%

superior ao encontrado por Jones (1998), que trabalhou com animais provavelmente imaturos, e semelhante ao encontrado por Naden et al. (1990) e Johnson et al (1991), que trabalharam com animais de mais de 3 anos de idade. O total de células germinativas (CG) por CS no estágio 1 do epitélio seminífero (10,4) teve relação levemente superior quando comparada com os resultados obtidos por Jones (1998) – 6,6 – e Jones e Berndtson (1986), e pelas mesmas razões acima expostas. O número de células de Sertoli está relacionado, em equinos e humanos, com a produção espermática diária por testículo e tem maior relação com o peso testicular em equinos do que em humanos (Johnson e Thompson, 1986, Johnson et al., 1984). A relação entre o número de células de Sertoli, a produção espermática diária e o número de espermatogônias A₁ foi comprovada por Johnson et al. (1994). Existem evidências de que o aumento do número de células de Sertoli, principalmente em equinos, pode acontecer durante a temporada reprodutiva (Johnson et al., 2008). A célula de Sertoli participa da sustentação física das células germinativas, produção de fatores parácrinos e autócrinos que modulam a produção espermática, e é um dos principais fatores na determinação da produção espermática e do tamanho do testículo (Johnson et al., 1997, Varner e Johnson, 2007).

Número total de células de Sertoli

O número total de células de Sertoli por testículo observado neste estudo foi de $8,7 \times 10^9 \pm 2,4 \times 10^9$ e o número dessas células por grama de testículo foi de $54,8 \times 10^6 \pm 19,2 \times 10^6$. Johnson e Thompson (1986) encontraram $2,5 \times 10^9$ células nos dois testículos e $23,6 \times 10^6$ dessas mesmas células por grama de testículo. Já Johnson e Nguyen (1986) encontraram $3,0 \times 10^9$ CS por testículo $23,0 \times 10^6$ CS por grama de testículo em equinos com idades variando entre 4 e 20 anos; esses

autores detectaram diferença significativa entre o número de células por testículo dentro e fora da estação de monta, mas não encontraram esta diferença quando fizeram a comparação por grama de testículo. O fato de ter-se aqui observado um número maior de células de Sertoli que o referido para as outras raças pode ser um indicativo do maior potencial de fertilidade da raça crioula.

Reserva espermática testicular e produção espermática diária

Levando-se em consideração a espessura do corte ($4\mu\text{m}$), o comprimento tubular total (4805 metros), peso médio dos testículos (169,1 gramas - Figueiró et al., 2010) e o número corrigido de espermatídes arredondadas por secção transversal se chegou a estimativa de uma reserva espermática total (RET) de $46,9 \times 10^9 \pm 16,3 \times 10^9$ e a reserva espermática por grama de testículo como sendo $286,6 \times 10^6 \pm 105,5 \times 10^6$ nos garanhões Crioulos objeto deste estudo.

Quando foi feita a estimativa da produção espermática diária por testículo, chegou-se ao número de $3,8 \pm 1,2 \times 10^9$ espermatozoides e na da produção espermática diária por grama de testículo ao de $23,5 \pm 8,2 \times 10^6$ espermatozoides, um pouco acima do descrito por Pickett et al. (1989), que relataram 16×10^6 espermatozoides por grama de testículo e uma produção diária de $2,7 \times 10^9$ espermatozoides por testículo. Estrada e Samper (2007) relatam que a produção diária de espermatozoides por grama de testículo durante a estação reprodutiva é de $19,0 \times 10^6$ e, fora da estação reprodutiva, $15,0 \times 10^6$; os resultados 60% superiores por grama de testículo nos equinos crioulos aqui obtidos são de orquiectomias realizadas fora da estação de monta e, mesmo levando em consideração as diferenças de metodologia, indicam uma fertilidade potencial mais elevada nos garanhões desta raça.

Conclusões

O rendimento meiótico, o número de células de Sertoli por grama de testículo, a produção espermática diária total e por grama de testículo observados neste estudo foram mais elevados que o descrito para outras raças. O índice de perdas celulares e a capacidade de suporte obtida das células de Sertoli foram semelhantes às demais raças descritas na literatura.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Cabanha Nossa Senhora da Penha, a Fazenda Pantanal, a Cabanha Trevo Branco, a Cabanha Infinito e a Estância Artigas no Rio Grande do Sul pela concessão dos animais para a pesquisa.

Referências Bibliográficas

- Amann, R. P. 1962. Reproductive capacity of dairy bulls. III The effect of ejaculation frequency, unilateral vasectomy and age on spermatogenesis. *Am. J. Anat.*, 110(1), 49-67.
- Ayres, M., Ayres JR., M., Ayres, D. L., Santos, A. S. 2003. *Bio Estat. Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Biológicas e Médicas*. Belém: Sociedade Civil Maniraua, Brasília CNPq.
- Blanchard, T.L., Johnson, L., 1997. Increased germ cell degeneration and reduced germ cell: Sertoli cell ratio in stallions with low sperm production. *Theriogenology* 47, 665–667.
- Blottner, S., Hingst, O., Meyer, H. H. D. 1995. Inverse relationship between testicular proliferation and apoptosis in mammalian seasonal breeders. *Theriogenology* 44, 320-328.

- Costa, D. S., Henry, M., Paula, T. A. R. 2004. Espermatogênese de catetos (*Tayassu tajacu*). Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Belo Horizonte, 56(1), 46-51.
- De Rooj, D. G., Lok, D. 1987. Regulation of the density of spermatogonia in the seminiferous epithelium of the chinese hamster: II Differentiating spermatogonia. Anat. Rec., 217, 131-136.
- Dym, M., Madhwa Raj, H. G. 1977. Response of adult rat Sertoli cells and Leydig cells to depletion of luteinizing hormone and testosterone. Biol. Reprod. 17, 676-696.
- Estrada, A. J., Samper, J. C. 2007. Evaluation of raw semen. In: Samper, J. C., Pycocock, J. F., Mckinnon, A. O. Current therapy in equine reproduction, 235-257.
- França, L. R., Russel, L. D. 1998. The testis of domestic animals. In: Regadera, J. e Martinez-Garcia (eds.) Male Reproduction. A multidisciplinary overview. Churchill Livingstone, Madrid, p. 197-219.
- Heninger, N.L., Staub, C., Blanchard, T.L., Johnson, L., Varner, D.D., Forrest, D.W., 2004. Germ cell apoptosis in the testes of normal stallions. Theriogenology 62, 283–297.
- Hochereau-de Reviers, M. T., Lincoln, G. A. 1978. Seasonal variation in the histology of testis of the red deer, *Cervus elaphus*. J. reprod. Fert. 54, 209-213.
- Johnson, L. 1991. Seasonal differences in equine spermatocytogenesis. Biology of reproduction, 44, 284-291.
- Johnson, L. Blanchard, T. L., Varner, D. D., Scrutchfield, W. L. 1997. Factors affecting spermatogenesis in the Stallion, 48, 1199-1216.
- Johnson, L., Carter, G.K., Varner, D.D., Taylor, T.S., Blanchard, T.L., Rembert, M.S., 1994. 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.
- Johnson, L., Nguyen, H. B. 1986. Annual cycle of the Sertoli cell population in adult stallions. J. Reprod. Fert. 76, 311-316.
- Johnson, L., Thompson Jr., D. L. 1986. Seasonal Variation in the Total Volume of Leydig Cells in Stallions Is Explained by Variation in Cell Number Rather Than Cell Size. Biology of reproduction, 35, 971-979.
- Johnson, L., Thompson Jr., D. L., Varner, D. D. 2008. Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. Animal Reproduction Science 105, 23–51.
- Johnson, L., Varner, D. D. Tatum, M. E., et al. 1991. Season no age affects Sertoli cell number in adult stallions. Biol. Reprod., 45, 404-410.
- Johnson, L., Zane, R. S., Petty, C. S., Neaves, W. B., 1984. Quantification of the human Sertoli cell population: its distribution, relation to germ cell numbers, and age-related decline. Biol. Reprod. 31, 785–795.
- Jones, L. S., Berndtson, W. E. 1986. a quantitative study of Sertoli cell and germ cell populations as related to sexual development and aging in the stallion. Biol. Reprod., 35, 138-148.

- Jones, D. N. 1998. Desenvolvimento testicular de equinos mestiços da raça Brasileira de Hipismo, de 1 a 30 meses de idade. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária). Belo Horizonte – MG, Universidade Federal de Minas Gerais, 89p.
- Naden, J., Amann, R. P., Squires, E. L. 1990. Testicular growth, hormone concentrations, seminal characteristics and sexual behaviour in stallions. *J. Reprod. Fert.*, 88, 167-176.
- Neves, E. S. 2001. Estudo comparativo da estrutura do testículo e do processo espermatogênico em jumentos (*Equus asinus*) e burros (*Equus mulus mulus*). Tese (Doutorado em Biologia Celular). Belo Horizonte – MG, Universidade Federal de Minas Gerais, 135p.
- Pickett, B. W. 1993. Factors affecting sperm production and output. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. (Eds.). *Equine Reproduction*. Lea & Febiger, 689-704.
- Rasband, W. 2005. National Institute of Health, USA. Software disponível em <http://rsb.info.nih.gov/ij/>
- Schwartzman U, Cidlowski J. A. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocr Rev*, 14(2), 133,151.
- Solanet, E. 1946. Tratado de hipotecnia. Ed. Morata, Buenos Aires, 401p.
- Swiesrstra. E. E., Gebauer, M. R., Pickett, B. W. 1974. Reproductive physiology of the stallion I. Spermatogenesis and testis composition. *J. Reprod. Fertil.* 40, 113-123.
- Varner, D. D., Johnson, L. 2007. From a Sperm's Eye View—revisiting our perception of this intriguing cell. In: *Proceedings of the American Association of Equine Practitioners*. 53, 104- 177.

Tabela 1 - Diâmetro nucleolar das células de Sertoli e nuclear das espermatogônias A (A), espermatócitos I em pré-leptóteno/leptóteno (PL/L), espermatócitos I em paquíteno (PQ) e espermátides arredondadas (Ar) de dez equinos adultos, expressos em micrômetros.

Equinos	Sertoli	A	PL/L	PQ	Ar
A2	2,40	8,19	5,58	8,49	4,61
A4	2,80	9,55	6,24	9,28	4,66
A6	2,77	7,69	6,28	9,39	4,95
E2	3,04	9,87	5,74	10,53	5,00
E4	3,13	9,91	7,39	11,08	5,20
F3	3,10	9,58	5,86	10,67	4,88
K2	2,49	8,50	7,55	9,90	5,05
K3	2,54	9,04	7,00	9,14	5,16
K6	2,90	9,02	7,03	9,76	4,77
L4	2,85	9,06	6,59	10,11	5,69
Média	2,80	9,04	6,53	9,83	5,00
Desvio padrão (\pm)	0,26	0,73	0,70	0,79	0,31

Tabela 2 – População celular (Células de Sertoli, espermatogônias A (A), espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno (PL/L), espermatócitos primários em paquíteno (PQ) e espermátides arredondadas (Ar)) no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero obtido de dez equinos crioulos adultos.

Equino	Número não corrigido*					Número corrigido**				
	Sertoli	A	PL/L	PQ	Ar	Sertoli	A	PL/L	PQ	Ar
A2	10,8	8	20,5	23,1	75,4	8,29	4,04	12,01	11,19	48,92
A4	13,5	8,7	33,2	24,1	111,9	10,36	4,40	19,45	11,68	72,60
A6	13,5	7,3	37,5	32,5	106,6	10,36	3,69	21,97	15,75	69,16
F3	9,5	7,4	34,5	30,8	102,9	7,29	3,74	20,21	14,92	66,76
E2	8,8	6,7	24	27,7	87,8	6,75	3,39	14,06	13,42	56,97
K3	12,7	7,8	26,4	28,6	95,4	9,75	3,94	15,47	13,86	61,90
K2	10,6	4,7	19,4	25,8	58,9	8,13	2,38	11,37	12,50	38,22
L4	12,8	7,3	15,1	26,9	72,7	9,82	3,69	8,85	13,03	47,17
K6	10,7	7,4	16	22,8	8,8	8,21	3,74	9,37	11,05	5,71
E4	9,7	6,4	16,8	23,2	54,1	7,44	3,23	9,84	11,24	35,10
Média	11,26	7,17	24,34	26,55	77,45	8,64	3,62	14,26	12,86	50,25
\pm^{***}	1,73	1,08	8,23	3,38	31,17	1,33	0,55	4,58	1,64	20,22
%	8,0	5,1	17,3	18,9	55,1	10,20	4,28	16,83	15,18	59,29

* número obtido através da contagem de 10 secções transversais de túbulos seminíferos por animal

** Valores corrigidos segundo Amann (1962a).

*** Desvio padrão das médias

Tabela 3 - Razões entre os números corrigidos de células germinativas por secção transversal de túbulo seminífero no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero de dez cavalos crioulos adultos.

Tipos Celulares	Razões
Preleptóteno/leptóteno (PL/L) : Espermatogônia A	3,9
Paquíteno (PQ) : PL/L	0,9
Espermátide arredondada (Ar) : PQ	3,9
Ar : Espermatogônia A	13,9

Tabela 4 - Razões entre os números corrigidos de células germinativas por secção transversal de túbulo seminífero no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero e de células de Sertoli (CS) em dez cavalos crioulos adultos.

Tipos Celulares	Razões
CS: Espermatogônias A	0,4
CS: PL/L	1,7
CS: PQ	1,5
CS: Ar	5,8
CS: total de células germinativas	10,4

5 DISCUSSÃO GERAL

Todos os animais utilizados nesta pesquisa seriam submetidos a orquiectomia bilateral, independente da realização deste experimento. Os animais foram pesados, e o protocolo anestésico constou de sedação com 1,0 mg/kg de cloridrato de xilazina por via intravenosa seguido de indução anestésica com 2 mg/kg de cetamina associada à 0,1 mg/kg de diazepam por via intravenosa e bloqueio no cordão espermático com lidocaína 2% sem vasoconstritor.

Biometria e análise morfométrica dos testículos

Os animais utilizados neste experimento representam uma população homogênea e representativa de garanhões jovens e sexualmente maduros (3 a 6 anos – 377,5Kg). Todos os animais eram criados a campo com suplementação mineral. Na Tabela 1 pode-se ver o peso dos animais, o peso testicular e o índice gonadosomático.

Melo e colaboradores (1998) estudaram garanhões adultos da raça Pantaneira, de origem genética e porte semelhantes aos da raça Crioula, com 36 a 40 meses de idade e peso médio de 315 Kg de média de peso corpóreo.

A média de peso testicular verificado neste experimento ($162,9 \pm 48,4g$), foi semelhante ao peso testicular médio de $163 \pm 8g$ verificado por Swierstra et al. (1974) em 12 garanhões abatidos com idade entre 3 e 10 anos e peso médio de 473Kg.

Porém, a idade média mais alta e o peso mais elevado dos garanhões avaliados por eles indicam um peso relativo maior dos testículos dos garanhões da raça Crioula aqui estudados. Já a média de peso encontrada por Jones (1998) em eqüinos brasileiro de hipismo com 30 meses de idade (73,3g) foi bem mais baixa que a aqui verificada. Esses cavalos, comumente de compleição avantajada, sabidamente tardios no desenvolvimento, que, possivelmente, aos 2,5 anos de idade não deviam estar sexualmente maduros quando castrados como os objeto deste estudo, o que poderia justificar a diferença. Se compararmos o peso médio aqui observado com o verificado por Blanchard et al (2001) – 70 a 80g – em 53 garanhões de oito raças distintas com três anos de idade, provavelmente estes deveriam ser imaturos e de raças de grande porte, para com 3 anos apresentarem testículos tão leves. Já o peso médio de 123,8g por testículo encontrado por Melo et al (1998) em cavalos pantaneiros criados em condições naturais, com idades variando entre 36 a 40 meses (3 a 3,5 anos) e peso corporal de 315Kg, se situa abaixo do aqui verificado, diferença que provavelmente se possa atribuir ao peso corporal mais baixo dos animais pantaneiros, o que leva a um índice gonadossomático semelhante. Se compararmos também com os volumes testiculares verificados durante e fora da temporada de monta (144 e 103ml) por Johnson e Nguyen (1986) em 56 garanhões abatidos com idade variando de 4 a 20 anos, ou por Johnson (1991) – na temporada = 163g; fora da temporada = 126g; n = 90 – podemos supor que o tamanho dos testículos dos garanhões crioulos são relativamente maiores que os de outras raças, já que o peso aqui verificado, fora da estação de monta, se iguala ao encontrado por esses autores durante a estação e são de peso maior do que os encontrados por eles fora da temporada. Há que considerar para esta suposição a idade mais avançada daqueles quando comparados aos avaliados neste estudo.

A relação entre peso corpóreo e peso testicular, ou o que se convencionou chamar de índice gonadosomático (IGS), encontrado neste estudo ($0,087 \pm 0,024\%$) foi semelhante ao relatado por Setchell (1991), mas superior ao relatado por Swierstra et al. (1974) em equinos sem raça definida, por Jones (1998) em eqüinos Brasileiro de Hipismo, o que indicaria que os cavalos da raça Crioula possuem um IGS superior as demais raças, especialmente se considerarmos que os garanhões aqui estudados, apesar de maduros sexualmente, eram muito jovens, e todos se encontravam fora da estação de monta. O IGS encontrado por Melo et al. (1998), semelhante ao aqui observado, pode ser explicado pela origem semelhante das 2 raças e pelas mesmas condições de manejo e alimentação.

O cavalo crioulo evoluiu sem a interferência do homem desde o século XVI até o segundo quarto do século passado. Garanhões trabalhando em liberdade e disputando a liderança das manadas era a característica onde venciam o mais forte. A seleção de animais com melhor desempenho reprodutivo e funcional, reprodutivo e nutricional.

Estádios do ciclo do epitélio seminífero em cavalos crioulos

As associações celulares características dos oito estádios do ciclo do epitélio seminífero em cavalos crioulos estão descritas a seguir:

Estádio 1 – Neste estágio observou-se no compartimento basal do epitélio seminífero a presença de espermatogônias do tipo A (A) e espermatócitos primários em pré-leptoteno/leptoteno (PL/L). No compartimento adluminal observou-se espermatócitos primários em paquíteno (PQ) e espermátides arredondadas (Ar), em várias camadas (Figura 1a).

Estádio 2 – Foi caracterizado pela presença de espermatogônias tipo A, espermatócitos primários em leptóteno (L) próximos a membrana basal. O restante do epitélio seminífero constitui-se de PQ e espermátides em fase de alongamento (AL - Figura 1b).

Estádio 3 – No compartimento basal, encontrou-se espermatogônias tipo A, espermatócitos primários em zigóteno (Z) e diplóteno (D). No restante encontrou-se espermátides alongadas (Figura 1c).

Estádio 4 – Foi caracterizado pela presença de espermatogônias do tipo A no compartimento basal e por espermatócitos primários jovens que se encontravam na transição de zigóteno para paquíteno, diplótenos, espermatócitos secundários (II), espermátides arredondadas recém formadas e feixes compactos de espermátides alongadas (Figura 1d).

Estádio 5 – Na porção basal, encontraram-se espermatogônias do tipo A, espermatócitos primários em PQ, espermátides arredondadas recém formadas e espermátides alongadas em feixes foram encontradas no compartimento adluminal (Figura 2a).

Estádio 6 – Espermatogônias B₁ predominaram no compartimento basal. No compartimento adluminal foram observados espermatócitos primários em paquíteno, espermátides arredondadas e feixes de espermátides alongadas, com menor compactação que no estágio 5 dirigindo-se para o lúmen do epitélio seminífero (Figura 2b).

Estádio 7 – No compartimento basal encontrou-se as espermatogônias do tipo B₂ (com núcleo menor que as do tipo B₁) com esparsas espermatogônias do tipo A, enquanto que no compartimento adluminal observou-se espermatócitos primários

em paquíteno, espermatídes arredondadas e espermatídes alongadas, que quando comparadas ao estágio anterior estavam com feixes de espermatídes mais próximos a borda luminal. Notou-se a presença de corpos residuais pequenos e pouco delimitados, resultantes do citoplasma das espermatídes alongadas em preparação para a espermição (Figura 2c).

Estádio 8 – Na base do epitélio seminífero encontraram-se algumas espermatogônias do tipo B₂ e espermatócitos primários em pré-leptóteno, espermatogônias do tipo A. No compartimento adluminal verificou-se o arranjo na forma clássica de paliçada das espermatídes alongadas na borda luminal, com várias delas sendo liberadas para o lume tubular no processo da espermição. Na borda luminal foram observados corpos residuais de coloração mais escura e bem maior do que aqueles do estágio 7 verificou-se também a presença de espermatócitos primários em paquíteno e espermatídes arredondadas (Figura 2d).

Constatou-se a presença de espermatogônias do tipo A em todos os ciclos do epitélio seminífero, não sendo possível, devido a metodologia utilizada, caracterizá-las em imaturas (indiferenciadas) e maduras (diferenciadas) ou nos diferentes subtipos destas duas classes de espermatogônias.

As células de Sertoli caracterizaram-se pelo contorno indefinido, núcleo irregular e nucléolo bem evidente, visualizadas em todos os estádios descritos anteriormente. A maior parte dos núcleos com disposição perpendicular encontraram-se mais afastados da membrana basal.

Proporção Volumétrica

O percentual representado pela túnica albugínea e pelo mediastino em relação ao peso testicular foi semelhante ao descrito por Swierstra et al. (1974) e por Neves (2001). Encontrou-se 78% de túbulos seminíferos em relação aos outros componentes do parênquima testicular o que se assemelha aos valores encontrados em equinos de outras raças (Johnson e Neaves, 1981, Jones, 1998, Varner e Johnson, 2007). Os valores de tecido intertubular em jumentos pêga (*Equus asinus*) são de 16% (Neves, 2001), 22% em jumentos africanos (*Equus asinus africanus* - Nipken e Wroble, 1997) e 39% em burros (Neves, 2001). Swierstra et al (1974) encontraram em equinos 38,7% de tecido intertubular, na pesquisa de Clemmons et al. (1995) 28% e 25% no trabalho descrito por Jones (1998) em cavalos Brasileiro de Hipismo. A proporção volumétrica varia entre mamíferos, sendo que normalmente 10 a 30% são de tecido intertubular e de 70 a 90% são de túbulos seminíferos (França e Russel, 1998) ou de 60 a 90% segundo Setchell (1982).

O percentual de células de Leydig aqui encontrado (7,96%) foi inferior aos descrito por Johnson e Neaves (1981) em eqüinos abatidos. O número de células de Leydig por grama de testículo não varia entre as estações, fato que ocorre quando se considera o número de células de Leydig por testículo (Johnson e Thompson, 1986).

O percentual de estroma aqui encontrado (22%) foi semelhante ao encontrado em equinos (Johnson e Varner, 2007).

Diâmetro dos Túbulos Seminíferos

A variação do diâmetro dos túbulos seminíferos é decorrente de vários fatores, sendo utilizado como indicador da atividade espermatogênica em

investigações envolvendo a função testicular. Geralmente este diâmetro não sofre alterações em animais sexualmente maduros da mesma espécie que se encontram no período reprodutivo, mas variações significativas podem ser verificadas em animais de diferentes raças e até mesmo em linhagens diferentes (França e Russel, 1998).

O diâmetro médio dos túbulos seminíferos dos cavalos crioulos foi de 205 μ m. O diâmetro médio de 156 μ m relatado por Swierstra et al. (1974) em equinos sem raça definida com 3-10 anos de idade também são um indicativo do tamanho maior das estruturas do testículo do garanhão crioulo, já que os animais avaliados pelo autor eram mais velhos e, por isso mesmo, deveriam apresentar medidas mais elevadas. Swierstra et al. (1974) relatam que existe variação entre garanhões dentro e fora da estação reprodutiva. Essa variação pode se dever a desconsideração da retração tecidual durante o preparo histológico, utilização de animais impúberes ou pré-púberes, número de células mióides que formam a túnica própria, diferença na população de células de Sertoli e pelos padrões de secreção de fluído por estas células o que determinará o lúmem tubular (Paula, 1999).

Altura e área do epitélio seminífero

A altura média do epitélio seminífero aqui observada (70,56 μ m) está de acordo com o relatado por França e Russel (1998) que citam uma variação entre 60 a 100 μ m nas espécies domésticas.

Não foram encontradas discrepâncias entre os valores da área do túbulo seminífero deste experimento, quando considerada a aplicação da fórmula e a utilização do programa "ImageJ", concordando com o relatado por Menezes (2006),

de que não existiria diferença significativa ($p < 0,01$) ao comparar seus resultados com a fórmula da área da circunferência (πr^2), que é a utilizada comumente em artigos nesta área (Costa et al., 2004).

Índice tubulossomático (ITS)

O índice tubulossomático (ITS) aqui encontrado ($0,067 \pm 0,017\%$) foi semelhante ao encontrado por outros autores em equinos.

Comprimento Tubular Total (CTT)

O CTT ($4085,10 \pm 1.170,68\text{m}$) foi superior aos 2.419 metros relatado por Swierstra et al. (1974) em equinos e aos 2.808m relatados por Jones (1998) em equinos Brasileiro de Hipismo com 30 meses de idade e ao relatado por Johnson e Neaves (1981), que descreveram um aumento no comprimento tubular de acordo com a idade (2 a 3, 4 a 5 e 13 a 20 anos – 2040m, 2390m e 2790m) e, semelhante ao relatado por Neves (2001) com jumentos, que obteve 3.806 metros.

Quando comparamos o comprimento de túbulos seminíferos por grama de testículo nos equinos crioulos ($26,09 \pm 10,63$), temos valores superiores aos relatados por Swierstra et al. (1974) em equinos abatidos e semelhante aos 22 metros/grama encontrados por Neves (2001) em jumentos.

População celular

A eficiência do processo espermatogênico pode ser avaliada através das razões entre as células germinativas presentes nos estágio 1 do ciclo do epitélio

seminífero (CES). O diâmetro nuclear ou nucleolar médio foi utilizado para a obtenção do número celular corrigido. O número proporcional de células germinativas obtidas no estágio 1 do CES (Tabela 2) foi superior ao relatado por Jones (2001) em eqüinos brasileiros de hipismo com 30 meses de idade (2,5 anos), o que pode estar ligado a imaturidade dos animais por ele estudado.

Rendimento intrínseco da espermatogênese

O coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais (EME), que é determinado pela divisão do número de espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno sobre o número de espermatogônias do tipo A, é uma quantificação da eficiência das divisões celulares durante a espermatogênese. Devido as perdas celulares que ocorrem por apoptose (De Rooij e Lok, 1987), a eficiência das mitoses espermatogoniais dificilmente chega a 100%. Neste estudo, este número de EME (3,9) ficou abaixo do encontrado para a maioria dos animais domésticos (14,6 à 24,8), conforme descrito por França e Russel, (1998). Este valor pode ser explicado pelo fato de as orquiectomias terem sido realizadas fora da estação de monta e que existem variações, entre gananhões e estações reprodutivas, sobre a produção espermática (Swierstra et al., 1974). Johnson (1991) relata que, em eqüinos, os testículos têm o dobro do número de espermatogônias na temporada de monta, quando comparados com os do período fora da temporada.

Nem todo espermatócito que entra em meiose completa seu desenvolvimento em espermátide e espermatozóide, no entanto, este processo é esperado, pois embora quatro espermátides possam ser produzidas a partir de um espermatócito primário, perdas de até 30% são observadas no final da meiose nos mamíferos domésticos (França e Russel, 1998). O rendimento meiótico aqui observado foi de

3,9 espermátides arredondadas por espermatócito I em paquíteno (PQ), corroborando, em parte, os resultados obtidos por Jones (1998) – 3,1 espermátides arredondadas por PQ – e por Naden et al. (1990) – 3,4 espermátides arredondadas por PQ. A degeneração das espermátides em equinos é mais acentuada fora da estação reprodutiva (Johnson et al., 1997). Se os resultados obtidos por Jones (1998) e Naden et al. (1990) foram obtidos durante a estação de monta, o rendimento meiótico em crioulos pode ser caracterizado como superior, já que foram obtidos fora da temporada de monta, quando seria esperado um rendimento menor devido a degeneração mais acentuada das espermátides.

O rendimento geral da espermatogênese (RGE), representado pelo número de espermátides arredondadas produzidos por espermatogônia A, foi de 13,9 neste estudo. Jones e Berndtson (1986) encontraram um RGE de 26,2; isso pode ser explicado pelo fato de que os animais aqui utilizados estavam no período fora da temporada de monta e os de Jones e Berndtson (1986) em plena temporada.

O índice de perdas celulares (IPC) aqui observado foi de 10%, semelhante ao relatado para a maioria dos animais domésticos, onde obtivemos 0,90 espermatócitos primários em PQ para cada espermatócito primário em PL/L. Heninger et al. (2004) relataram que a apoptose é um mecanismo ativo para a remoção seletiva de células germinativas dos túbulos seminíferos de garanhões férteis (Schwartzman e Cidlowski, 1993) que pode estar exacerbado em animais com baixa produção espermática (Blanchard and Johnson, 1997). Blottner et al. (1995) propuseram que a morte celular programada funciona como um dos principais fatores que antagonizam a proliferação das células germinativas, regulando assim a atividade testicular durante as diferentes estações.

Índice de células de Sertoli

O índice de células de Sertoli por espermatogônias tipo A encontrado neste estudo foi de 0,4. Encontrou-se 1,7 espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno para cada célula de Sertoli, 1,5 espermatócitos primários em paquíteno para cada CS e 5,8 espermátides arredondadas por CS, valor 45% superior ao encontrado por Jones (1998), que trabalhou com animais provavelmente imaturos, e semelhante ao encontrado por Naden et al. (1990) e Johnson et al (1991), que trabalharam com animais de mais de 3 anos de idade. O total de células germinativas (CG) por CS no estágio 1 do epitélio seminífero (10,4) teve um valor 34% superior com os resultados obtidos por Jones (1998) – 6,6 – e Jones e Berndtson (1986), e pelas mesmas razões acima expostas. O número de células de Sertoli está relacionado, em equinos e humanos, com a produção espermática diária por testículo e tem maior relação com o peso testicular em equinos do que em humanos (Johnson e Thompson, 1986, Johnson et al., 1984). A relação entre o número de células de Sertoli, a produção espermática diária e o número de espermatogônias A₁ foi comprovada por Johnson et al. (1994). Existem evidências de que o aumento do número de células de Sertoli, principalmente em equinos, pode acontecer durante a temporada reprodutiva (Johnson et al., 2008). A célula de Sertoli participa da sustentação física das células germinativas, produção de fatores parácrinos e autócrinos que modulam a produção espermática, e é um dos principais fatores na determinação da produção espermática e do tamanho do testículo (Johnson et al., 1997, Varner e Johnson, 2007).

Número total de células de Sertoli

O número total de células de Sertoli por testículo observado neste estudo foi de $8,7 \times 10^9 \pm 2,4 \times 10^9$ e o número dessas células por grama de testículo foi de $54,8 \times 10^6 \pm 19,2 \times 10^6$. Johnson e Thompson (1986) encontraram $2,5 \times 10^9$ células nos dois testículos e $23,6 \times 10^6$ dessas mesmas células por grama de testículo. Já Johnson e Nguyen (1986) encontraram $3,0 \times 10^9$ CS por testículo $23,0 \times 10^6$ CS por grama de testículo em equinos com idades variando entre 4 e 20 anos; esses autores detectaram diferença significativa entre o número de células por testículo dentro e fora da estação de monta, mas não encontraram esta diferença quando fizeram a comparação por grama de testículo. O fato de ter-se aqui observado um número maior de células de Sertoli que o referido para as outras raças pode ser um indicativo do maior potencial de fertilidade da raça crioula.

Reserva espermática testicular e produção espermática diária

Levando-se em consideração a espessura do corte, o comprimento tubular total e o número corrigido de espermátides arredondadas por secção transversal se chegou a estimativa de uma reserva espermática total (RET) de $46,9 \times 10^9 \pm 16,3 \times 10^9$ e a reserva espermática por grama de testículo como sendo $286,6 \times 10^6 \pm 105,5 \times 10^6$ nos ganhões Crioulos objeto deste estudo.

Quando foi feita a estimativa da produção espermática diária por testículo, chegou-se ao número de $3,8 \pm 1,2 \times 10^9$ espermatozoides e na da produção espermática diária por grama de testículo ao de $23,5 \pm 8,2 \times 10^6$ espermatozoides, um pouco acima do descrito por Pickett et al. (1989), que relataram 16×10^6 espermatozoides por grama de testículo e uma produção diária de $2,7 \times 10^9$

espermatozóides por testículo. Estrada e Samper (2007) relatam que a produção diária de espermatozóides por grama de testículo durante a estação reprodutiva é de $19,0 \times 10^6$ e, fora da estação reprodutiva, $15,0 \times 10^6$; os resultados 60% superiores por grama de testículo nos equinos crioulos aqui obtidos são de orquiectomias realizadas fora da estação de monta e, mesmo levando em consideração as diferenças de metodologia, indicam uma fertilidade potencial mais elevada nos garanhões desta raça.

6 CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados obtidos de IGS, peso testicular, diâmetro do túbulo seminífero, altura do epitélio do túbulo seminífero, área do túbulo seminífero, comprimento do túbulo seminífero por grama de testículo, proporção de túnica albugínea e mediastino testicular, proporção de células de Leydig, proporção do parênquima testicular, tecido intertubular, a capacidade de suporte obtida das células de Sertoli e o índice de perdas celulares em cavalos Crioulos são semelhantes aos encontrados nos outros eqüídeos.

O comprimento tubular total, o rendimento meiótico, o número de células de Sertoli por grama de testículo, a produção espermática diária total e por grama de testículo foram superiores a todas as outras raças estudadas.

Verificamos também a lacuna que existe na padronização dos métodos de aferição dos dados de histometria testicular para equinos e a falta de alguns índices que são comumente relatados em outras espécies, como o índice Leydigsomático e tubulossomático, além de dados básicos e necessários como os de biometria testicular.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMANN, R. P. **Physiology and endocrinology**. In: McKinnon, A. O.; Voss, J. L. (Eds.). **Equine Reproduction**. Lea & Febiger, c. 76, p. 645-657, 1993.
- BLANCHARD, T. L., JOHNSON, L., BRINSKO, S. P., VARNER, D. D., RIGBY, S. L., HURTGEN, J. P. Evaluation of Testicular Size and Function In 1–3-Year-Old Stallions. **Proceedings of the Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners**, v. 47, p. 232-235, 2001.
- BLOTTNER, S.; HINGST, O.; MEYER, H. H. D. Inverse relationship between testicular proliferation and apoptosis in mammalian seasonal breeders. **Theriogenology**, v. 44, p. 320-328. 1995.
- CHENIER, T. S. **The Normal Male Reproductive System**. In.: Samper, J. C., Pycocock, J. F., Mckinnon, A. O. (eds). **Current Therapy in Equine reproduction**. Saunders, USA, p. 167-170, 2007.
- CLEMMONS, A. J., THOMPSON, D. L., JOHNSON, L. Local initiation of spermatogenesis in the horse. **Biol. Reprod.**, v. 52, p. 1258-1267, 1995.
- CLERMONT, Y. Kinetics of spermatogenesis in mammal, seminiferous epithelium cycle and the spermatogonial renewal. **Physiol. Rev.**, v. 52, n. 1, p. 198-236, 1972.
- CLERMONT, Y. Quantitative analysis of spermatogenesis of the rat: a revised model for the renewal of spermatogonia. **Am J Anat.**, v. 111, p. 111–129, 1962.
- COSTA, D. S., HENRY, M., PAULA, T. A. R. Espermatogênese de catetos (*Tayassu tajacu*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 56(1), p. 46-51, 2004.
- COSTA, D. S.; PAULA, T. A. R. Espermatogênese em mamíferos. **Scientia**, Vila Velha, v. 4, n. 1-2, p. 53-72, 2003.
- DE ROOJ, D. G., LOK, D. Regulation of the density of spermatogonia in the seminiferous epithelium of the chinese hamster: II Differentiating spermatogonia. **Anat. Rec.**, v. 217, p. 131-136, 1987.
- DYM, M.; MADHWA RAJ, H. G. Response of adult rat Sertoli cells and Leydig cells to depletion of luteinizing hormone and testosterone. **Biol Reprod.**, v. 17, p. 676-696, 1977.
- ESTRADA, A. J., SAMPER, J. C. Evaluation of raw sêmen. In: SAMPER, J. C., PYCOCK, J. F., MCKINNON, A. O. **Current therapy in equine reproduction**, p. 235-257, 2007.
- FRANÇA, L. R.; GHOSH, S.; YE, S. J.; RUSSEL, L. D. Surface and surface-to-volume relationships of the Sertoli cell during the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. **Biol. Reprod.**, v. 49, p. 1215-1228, 1993.
- FRANÇA, L. R.; RUSSEL, L. D. **The testis of domestic animals**. In: Regadera, J. e Martinez-Garcia (eds.) Male Reproduction. A multidisciplinary overview. Churchill Livingstone, Madrid, p. 197-219, 1998.
- FREITAS, C. C de. **Comportamento reprodutivo de garanhões crioulos a campo**. 2005. 55p. Tese (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, 2005.

- GURAYA, S. S. **Biology of spermatogenesis and spermatozoa in mammals**. Spring-Verlag Berlen Heidelberg. 430p. 1987.
- HENINGER, N.L.; STAUB, C.; BLANCHARD, T.L.; JOHNSON, L.; VARNER, D.D., FORREST, D.W. Germ cell apoptosis in the testes of normal stallions. **Theriogenology**, v. 62, p. 283–297, 2004.
- HUCKINS, C. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. **Anat. Rec.**, v. 190, p. 905–926, 1978.
- JOHNSON L. Increased daily sperm production in the breeding season of stallions is explained by an elevated population of spermatogonia. **Biol Reprod.**, v. 32, p. 1190-1195, 1985.
- JOHNSON, L. BLANCHARD, T. L., VARNER, D. D., SCRUTCHFIELD, W. L.. Factors affecting spermatogenesis in the Stallion, **Theriogenology**, v. 48(7), p. 1199-1216, 1997.
- JOHNSON, L. Seasonal differences in equine spermatocytogenesis. **Biology of Reproduction**, v. 44, p. 284-291, 1991.
- JOHNSON, L., NGUYEN, H. B. Annual cycle of the Sertoli cell population in adult stallions. **J. Reprod. Fert**, v. 76, p. 311-316, 1986.
- JOHNSON, L., THOMPSON JR., D. L., VARNER, D. D. Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 23–51, 2008.
- JOHNSON, L., ZANE, R. S., PETTY, C. S., NEAVES, W. B. Quantification of the human Sertoli cell population: its distribution, relation to germ cell numbers, and age-related decline. **Biol. Reprod.**, v. 31, p. 785–795, 1984.
- JOHNSON, L.; CARTER, G.K.; VARNER, D.D.; TAYLOR, T.S.; BLANCHARD, T.L.; REMBERT, M.S. The relationship of daily sperm production with number of Sertoli cells and testicular size in adult horses: role of primitive spermatogonia. **J. Reprod. Fertil.**, v. 100, p. 315–321, 1994.
- JOHNSON, L.; NEAVES, W. B. Age-related changes in the Leydig Cell population, seminiferous tubules and sperm production in stallions. **Biol. Reprod.**, v. 24, p. 703-712, 1981.
- JOHNSON, L.; THOMPSON JR., D. L. Seasonal Variation in the Total Volume of Leydig Cells in Stallions Is Explained by Variation in Cell Number Rather Than Cell Size. **Biology of reproduction**, v. 35, p. 971-979, 1986.
- JOHNSON, L.; VARNER. D. D.; ROBERTS, M. E.; SMITH, T. L.; KEILLOR, G. E.; SCRUTCHFIELD, W. L. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 60-61, p. 471-480, 2000.
- JONES, D. N. **Desenvolvimento testicular de equinos mestiços da raça Brasileira de Hipismo, de 1 a 30 meses de idade**. 1998. 89p. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG, 1998.
- JONES, L. S.; BERNDTSON, W. E. A quantitative study of Sertoli cell and germ cell populations as related to sexual development and aging in the stallion. **Biol. Reprod.**, v. 35, p. 138-148, 1986.
- KERR, J. B.; LOVELAND, K. L.; O'BRYAN, M. K., KRETSEY, D. M. Cytology of the Testis and Intrinsic Control Mechanisms. In: Neill, J. D. (ed.) **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**, Third Edition, p. 827-947, 2006.
- LEITE, F. L. G. **Análise morfológica do testículo e do processo espermatogênico da onça parda (Puma concolor, Wozencraft, 1993) Adulta**. 2002. 65p. Tese (Mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG, 2002.
- MELO, M. I. V., SERENO, J. R. B., HENRY, M., CASSALI, G. D. Peripuberal sexual development of Pantaneiro Stallions. **Theriogenology**, v. 50, p. 727-737, 1998.

- MENEZES, C. M. C. **Análise morfofuncional da espermatogênese de queixadas (*Tayassu pecari*, Link, 1795)**. 2006. 64p. Tese (Mestrado em Produção Animal) - Universidade Estadual Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes – RJ, 2006
- MILLER, D.; OSTERMEIER, G. C. Towards a better understanding of RNA carriage by ejaculate spermatozoa. **Hum Reprod Update.**, v. 12, p. 757–767, 2006.
- NADEN, J.; AMANN, R. P.; SQUIRES, E. L. Testicular growth, hormone concentrations, seminal characteristics and sexual behaviour in stallions. **J. Reprod. Fert.**, v. 88, p. 167-176, 1990.
- NEVES, E. S. **Estudo comparativo da estrutura do testículo e do processo espermatogenico em jumentos (*Equus asinus*) e burros (*Equus mulus mulus*)**. 2001. 135p. Tese (Doutorado em Biologia Celular) - Universidade Federal de Minas Gerais, . Belo Horizonte – MG, 2001.
- NIPKEN. C., WROBLEL, K. H. A quantitative morphological study of age-related changes in the donkey testis in the period between puberty and senium. **Andrologia** v. 29, p. 149-161, 1997.
- PAULA, T. A. R. 1999 **Avaliação histológica e funcional do testículo de capivaras adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*)**. Tese (Doutorado em morfologia). Belo Horizonte – MG, Universidade Federal de Minas Gerais, 84p.
- PICKETT, B. W.; et al. Management of the Stallion for maximum reproductive efficiency. **II Animal Reproduction Laboratory Bulletin**. Fort Collins, Colorado state University, 1989.
- SCHWARTZMAN U, CIDLOWSKI J. A. Apoptosis: the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. **Endocr Rev.**, v. 14(2), p. 133,151, 1993.
- SETCHELL, B. P. Male reproductive organs and semen. In: CUPPS, P. T. (ed.) **Reproduction in domestic animals**. Academic Press, p. 221-249, 1991.
- SETCHELL, B. P. Spermatogenesis and spermatozoa. In: AUSTIN, C. R., SHORT, R. V. (eds). **Reproduction in mammalian**. London: Elek, v. 1(4), p. 63-101, 1982.
- SOLANET, E. 1946. **Tratado de hipotecnia**. Ed. Morata, Buenos Aires, 401p.
- SWIESRSTRA. E. E.; GEBAUER, M. R.; PICKETT, B. W.. Reproductive physiology of the stallion I. Spermatogenesis and testis composition. **J. Reprod. Fertil.** v. 40, p. 113-123, 1974
- VARNER, D. D.; JOHNSON, L. From a Sperm's Eye View—revisiting our perception of this intriguing cell. In: **Proceedings of the American Association of Equine Practitioners**, v. 53, p. 104-177, 2007.

ANEXO I

Solução de KARNOVSKY

Produto	Quantidade
paraformaldeido.....	4,0 g
hidróxido de sódio.....	1 a 3 gotas
glutaraldeido (25%).....	20 ml
água destilada.....	40 ml
Tampão fosfato.0,2M (qsp).....	100 ml

- misturar paraformaldeido com água destilada. Aquecer a 60-70°C.
- adicionar hidróxido de sódio até ficar transparente.
- esperar esfriar. Filtrar.
- adicionar glutaraldeido e tampão pH 7,4.
- trabalhar em capela (paraformaldeido é cancerígeno)

→ preferencialmente deve-se usar no mesmo dia

➔ *Tampão fosfato*

- atentar para o n° de moléculas de água nos sais
- caso contrário a molaridade pode ficar incorreta.

Solução A: fosfato de sódio monobásico a 0,2 M

se $(\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}) \dots \dots \dots 2,76 \text{ g}/100 \text{ ml}$ água destilada

se $(\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) \dots \dots \dots 3,12 \text{ g}/100 \text{ ml}$ água destilada

Solução B: fosfato de sódio dibásico a 0,2 M

se $(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) \dots \dots \dots 3,56 \text{ g}/100 \text{ ml}$ água destilada

se $(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}) \dots \dots \dots 5,37 \text{ g}/100 \text{ ml}$ água destilada

se $(\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}) \dots \dots \dots 7,17 \text{ g}/100 \text{ ml}$ água destilada

→ para pH = 7,4 e 0,2M

- misturar 19,0ml de sol. A + 81,0ml de sol. B