

JOÃO BOSCO GONÇALVES DE BARROS

**ANÁLISE MORFOFUNCIONAL DO TESTÍCULO E DA  
ESPERMATOGÊNESE DE LEÕES AFRICANOS  
(*Panthera leo*, Linnaeus, 1758) ADULTOS**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2005

**JOÃO BOSCO GONÇALVES DE BARROS**

**ANÁLISE MORFOFUNCIONAL DO TESTÍCULO E DA  
ESPERMATOGÊNESE DE LEÕES AFRICANOS  
(*Panthera leo*, Linnaeus, 1758) ADULTOS**

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

APROVADA: 16 de dezembro de 2005.

---

Prof. Sérgio Luís Pinto da Matta  
(Conselheiro)

---

Prof. Cláudio César Fonseca  
(Conselheiro)

---

Prof. Fabiano Rodrigues de Melo

---

Prof. Laércio dos Anjos Benjamin

---

Prof. Tarcízio Antônio Rego de Paula  
(Orientador)

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus queridos pais Toninho e Dora, pelo incentivo, carinho, amor, compreensão e constante aprendizado para a vida.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus e aos meus amados pais, por acreditarem e confiarem em mim. Sou eternamente grato por tudo que fizeram. Vocês são o meu orgulho! Amo você Pai. Amo você Mãe.

Ao meu irmão Bilt, fiel escudeiro, meus sinceros agradecimentos pelo constante e inestimável apoio. Tanga, “eu não caí no truque da banana...”

À minha irmã Pitucha, sempre me “beijocando”, meu muitíssimo obrigado pela paciência e compreensão. E seja bem vinda à vida “Pituchinha”...Que Deus nos ajude!

À minha Jujuba, presente nos momentos bons e difíceis, pronta a me ouvir. Você é nota 10! Te amo!

Aos estimados amigos, Júlio César de C. Balieiro e Priscila C. de Oliveira, pelo companheirismo e apoio que nunca me faltaram, mesmo que à distância. Vocês são meus eternos “Mestres”.

Aos amigos/irmãos, Bião, PC, Mafia e Ítalo, por estarem presentes em minha vida mesmo à distância. Tenho em vocês a verdadeira amizade.

À Universidade Federal de Viçosa, em particular aos professores e funcionários do Departamento de Veterinária, pelo acolhimento e aprendizado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo fornecimento de bolsa de estudo durante o Curso.

Ao Professor Tarcízio Antônio Rêgo de Paula, pela orientação eficiente, amizade, compreensão, paciência e, sobretudo, pelos ensinamentos transmitidos, tanto para a vida quanto para a profissão.

Ao Professor Sérgio Luís Pinto da Matta, do Laboratório de Biologia Estrutural do Departamento de Biologia Geral da UFV, que tanto contribuiu para a realização deste estudo. Obrigado pelos valiosos conselhos.

Aos Professores do Setor de Morfologia do Departamento de Veterinária, Cláudio César Fonseca, Marco Túlio David das Neves e Laércio dos Anjos Benjamin, pelo incentivo, confiança e experiências transmitidas.

À Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte, na pessoa da Doutora Maria Elvira.

Ao Zoológico Municipal de Paulínia/SP, na pessoa do Doutor Marcelo.

Ao Zoológico Municipal de Americana/SP, na pessoa da Doutora Amanda Capozzi.

Ao Zoológico Municipal de Limeira/SP, na pessoa do Doutor Danielo.

Ao Parque Zoobotânico Municipal de Pouso Alegre, nas pessoas da Diretora Meri, Doutora Ivete e Doutor Carlos Alberto.

À Regina, Rebeca e Tarcizinho, pelos momentos compartilhados.

Aos amigos João Rossi e Flaviana, pela imensa ajuda com os animais.

À querida Rosi, por sempre “salvar a nossa pele” e simplificar a burocracia. Você é demais!

Aos colegas de Pós Graduação, Luíz, Fá-Biona, Marcos, Amanda, Manuela, Adolfo, Priscilla, Emily, Evandro e Lukiya, pela amizade e convivência sadia.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste estudo.

## **BIOGRAFIA**

JOÃO BOSCO GONÇALVES DE BARROS, filho de Antônio Alberto Alessandro de Barros e Maria Auxiliadora Gonçalves de Barros, nasceu em 07 de outubro de 1976, em Viçosa-MG.

Em dezembro de 1992, concluiu o Ensino Fundamental pela Escola Normal Nossa Senhora do Carmo, em Viçosa-MG.

Em março de 1993 iniciou os estudos do Ensino Médio no Colégio Universitário (COLUNI/UFV-MG). Em 1996 terminou os estudos pelo Colégio Anglo de Viçosa-MG.

Em fevereiro de 1999 ingressou no Curso de Medicina Veterinária pelo Centro Universitário da Fundação de Ensino “Octávio Bastos”, em São João da Boa Vista-SP, onde em dezembro de 2003 graduou-se nesta Instituição.

Em agosto de 2004, ingressou no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária com área de concentração em Morfologia, junto ao Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa-MG.

## CONTEÚDO

RESUMO .....	viii
ABSTRACT.....	x
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	02
2.1. O LEÃO AFRICANO .....	02
2.2. O TESTÍCULO E O PROCESSO ESPERMATOGÊNICO .....	05
2.2.1. Biometria e função testicular.....	05
2.2.2. População celular, índices indicativos do rendimento da espermatogênese .....	08
2.2.3. Organização dos elementos do espaço intertubular .....	10
2.2.4. Biópsia testicular.....	11
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	13
Artigo I	
MORFOMETRIA TESTICULAR E O TÚBULO SEMINÍFERO DE LEÕES AFRICANOS ( <i>Panthera leo</i> , Linnaeus, 1758) ADULTOS, MANTIDOS EM CATIVEIRO.....	18
RESUMO .....	18
SUMMARY.....	18
1. INTRODUÇÃO.....	19
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3. RESULTADOS.....	24
4. DISCUSSÃO.....	24
5. CONCLUSÕES.....	29
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
7. Apêndice I: Tabela 1 .....	35
8. Apêndice II: Tabela 2 .....	36
9. Apêndice III: Tabela 3 .....	37

Artigo II

POPULAÇÃO DO EPITÉLIO SEMINÍFERO, ÍNDICES INDICATIVOS DO RENDIMENTO DA ESPERMATOGÊNESE E A RESERVA ESPERMÁTICA TESTICULAR EM LEÕES AFRICANOS ( <i>Panthera leo</i> , Linnaeus, 1758) ADULTOS, MANTIDOS EM CATIVEIRO .....	38
RESUMO .....	38
SUMMARY.....	38
1. INTRODUÇÃO.....	39
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3. RESULTADOS.....	43
4. DISCUSSÃO .....	44
5. CONCLUSÕES.....	47
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
7. Apêndice IV: Tabela 1.....	53
8. Apêndice V: Tabela 2.....	54
9. Apêndice VI: Tabela 3.....	55

Artigo III

ORGANIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS ELEMENTOS DO ESPAÇO INTERTUBULAR DO TESTÍCULO DE LEÕES AFRICANOS ( <i>Panthera leo</i> , Linnaeus, 1758) ADULTOS, MANTIDOS EM CATIVEIRO .....	56
RESUMO .....	56
SUMMARY.....	56
1. INTRODUÇÃO.....	56
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	58
3. RESULTADOS.....	58
4. DISCUSSÃO .....	60
5. CONCLUSÕES.....	63
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63
4. CONCLUSÕES GERAIS .....	65

## RESUMO

BARROS, João Bosco Gonçalves de, M.S., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2005. **Análise morfofuncional do testículo e espermatogênese de leões africanos (*Panthera leo*, Linnaeus, 1758) adultos**. Orientador: Tarcízio Antônio Rêgo de Paula. Conselheiros: Sérgio Luís Pinto da Matta e Cláudio César Fonseca.

O estudo da morfologia testicular e do processo espermatogênico em animais selvagens é fundamental para o conhecimento de padrões fisiológicos, pelos quais podem-se estabelecer protocolos em reprodução assistida. Os objetivos deste estudo foram descrever dados de morfometria testicular e túbulo seminífero, quantificar as relações populacionais do epitélio seminífero, índice de células de Sertoli e a reserva espermática testicular, e ainda, caracterizar e descrever o arranjo dos componentes do espaço intertubular, em leões africanos (*Panthera leo*) adultos, mantidos em cativeiro. Para tal, foram utilizados fragmentos testiculares obtidos de cinco leões adultos, provenientes de Parques Zoológicos dos Estados de São Paulo e Minas Gerais, os quais foram submetidos a biópsias testiculares a fim de se obter material biológico para avaliação histológica dos fragmentos obtidos. Nos animais estudados, o peso corporal médio foi de 183,7 kg, dos quais 0,015% estão alocados em massa testicular e 0,009%, especificamente em túbulos seminíferos, os quais representaram 75,6% do parênquima testicular. O diâmetro médio dos túbulos seminíferos foi de 252,7 $\mu$ m e a espessura média do epitélio seminífero foi de 93,2 $\mu$ m. Os leões africanos apresentaram, em média, 12,3 metros de túbulo seminífero por grama de testículo. No epitélio seminífero destes animais, 10,3 espermatócitos primários em pré-leptóteno são produzidos por espermatogônias do tipo A. Durante as divisões meióticas, apenas 2,7 espermátides foram produzidas a partir de espermatócitos primários. O

rendimento geral da espermatogênese de leões africanos mantidos em cativeiro foi de 22,1 células e, cada célula de Sertoli, foi capaz de sustentar e manter 14,9 células da linhagem germinativa, das quais 7,9 são espermátides arredondadas. A cada ciclo do epitélio seminífero, cerca de 103 milhões de espermatozoides são produzidos por grama de testículo. Em relação ao compartimento intertubular do testículo de leões africanos, cerca de 16% do parênquima testicular é ocupado por células de Leydig, 7,1% por tecido conjuntivo e 0,7 % por vasos sanguíneos. O volume médio das células de Leydig e o seu diâmetro nuclear médio, encontrados foram, respectivamente,  $2578 \mu\text{m}^3$  e  $7,1 \mu\text{m}$ . As células de Leydig ocuparam em média 0,0019% do peso corporal e seu número médio por grama de testículo apresentou-se superior ao encontrado para a maioria dos mamíferos, ultrapassando os 50 milhões.

## ABSTRACT

BARROS, João Bosco Gonçalves de, M.S., Universidade Federal de Viçosa, December 2005. **Morphofunctional analysis of the testis and spermatogenesis in adult African lions (*Panthera leo*, Linnaeus, 1758)**. Advisor: Tarcízio Antônio Rêgo de Paula. Committee members: Sérgio Luís Pinto da Matta and Cláudio César Fonseca.

The study of the testis morphology and the spermatogenetic process in wild animals is fundamentally important for the knowledge about the physiologic patterns by which the assisted reproduction protocols are established. The following objectives were proposed in this study: to describe the data of both testis morphometry and seminiferous tubule; to quantify the population relationships of the seminiferous epithelium, Sertoli cell indexes, and the testis spermatid reserve, as well as to characterize and describe the arrangement of the intertubular space components in adult African lions (*Panthera leo*) kept in captivity. So, testis fragments taken from five adult lions proceeding from zoological parks located in São Paulo and Minas Gerais states. The animals were submitted to testis biopsies in order to obtain biological material for the histological evaluation of the obtained fragments. The average body weight of these animals was 183.7 kg, from which 0.015% were allocated in testis mass and 0.009% were specifically in the seminiferous tubules that represented 75.6% of the testis parenchyma. The average diameter of the seminiferous tubules was 252.7  $\mu$ m and the average thickness of the seminiferous epithelium was 93.2  $\mu$ m. The African lions averaged 12.3 meters for seminiferous tubule per testis gram. In these animals' seminiferous epithelium, 10.3 primary spermatocytes at pre-leptotene phase are produced by A-type spermatogonia. During meiotic divisions, only 2.7 spermatids were produced from primary spermatocytes. The general spermatogenesis production of the African lions kept in captivity was 22.1 cells, and each Sertoli cell was able to sustain and maintain 14.9

cells of the germinative line, from which 7.9 are round spermatids. At each seminiferous epithelium cycle, approximately 103 million spermatozoids are produced by each gram of testis. In relation to the intertubular compartment in African lions' testis, about 16% of the testis parenchyma is occupied by Leydig cells, 7.1% by conjunctive tissue, and 0.7% by blood vessels. The average volume of the Leydig cells and their average nuclear diameter were found to be  $2578 \mu\text{m}^3$  and  $7.1 \mu\text{m}$ , respectively. The Leydig cells occupied 0.0019% of the corporal weight, on the average, and their average number for each testis gram was superior to that found for most mammals, as exceeding 50 million.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O processo de extinção de algumas espécies de plantas e animais pode ser um evento natural, decorrente da própria evolução. Atualmente, sabe-se que este processo é predominantemente causado pela ação humana. A destruição de habitat, a introdução de espécies exóticas e a predação direta constituem as principais causas da perda da diversidade biológica (CITES, 2005). De acordo com CORSON (1996), até o início deste século poderemos ter perdido um milhão ou mais de espécies de plantas, animais e outros organismos, somando mais que a extinção maciça na história geológica, incluindo o desaparecimento dos dinossauros.

Os predadores da ordem *Carnivora* podem ser utilizados como alicerce para a identificação dos problemas relativos à diminuição da biodiversidade, pois ocupam o topo da cadeia alimentar, sendo co-responsáveis pelo equilíbrio dos ecossistemas onde ocorrem. Predando animais mais fracos, evitam que a superpopulação cause danos ao ambiente ou leve à disseminação de doenças. Deste modo, quando se trabalha para a preservação destes animais, outras espécies indiretamente também serão preservadas (ESTES, 1993; CAT SPECIALIST GROUP, 2003).

Os mecanismos que envolvam tentativas de conservação devem incluir um arranjo de opções e não somente depender de uma abordagem pontual para a preservação de uma dada espécie ou um único ecossistema. O desenvolvimento de tecnologias em reprodução assistida, tais como a inseminação artificial, criopreservação de sêmen e mesmo transplante de espermatogônias, podem responder por uma importante parcela dentro destas opções. Neste sentido, o estudo do processo espermatogênico torna-se extremamente relevante, tanto na determinação da taxa de produção espermática quanto na correlação desta com parâmetros biométricos, o que possibilita o melhor manejo e utilização de reprodutores, fornecendo informações básicas para o desenvolvimento e sedimentação de novas técnicas (BERNDTSON, 1977; KENAGY & TROUMBULAK, 1986; FRANÇA & RUSSELL, 1998).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. O leão africano

Em 1758, Linnaeus classificou o leão como pertencente ao reino *Animalia*, subreino *Eumetazoa*, ramo *Bilateria*, filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata*, classe *Mammalia*, subclasse *Eutheria*, ordem *Carnivora*, superfamília *Feloidea*, família *Felidae*, subfamília *Pantherinae*, gênero *Panthera* e espécie *leo* (ALDEN et al., 1998).

O leão é considerado o segundo maior felino existente, sendo menor apenas que o tigre (*Panthera tigris*). Com membros torácicos bem desenvolvidos, o leão apresenta um grande alcance de movimento, habilitando-o a golpes suficientemente potentes para subjulgar presas de porte superior (GONYEA, 1976). O corpo é coberto por uma pelagem marrom na grande maioria das subespécies de leão, todavia, ocorrem pelagens mais esbranquiçadas, especialmente na região de Timbavati, África do Sul (STOFFEL, 2005). Os leões são encontrados ao longo da África (FIGURA 1), especialmente na parte sudeste do continente, habitando planícies de gramíneas, savanas, áreas semi-desérticas e de arbustos. Atualmente, à exceção de parques onde são protegidos, estes animais são raros, devido a perda de habitat e, principalmente, à predação humana (CAT SPECIALIST GROUP, 2003).

Os leões são animais sociais, onde a caça sempre é realizada em grupo com a particularidade de somente as fêmeas atacarem até a morte por sufocamento da presa, enquanto um ou dois machos dominantes do grupo se encarregam de cuidados com a prole (EWER, 1986). São essencialmente carnívoros, constituindo o segundo maior grupo predador depois das hienas manchadas (*Crocuta crocuta*), sendo as zebras (*Equus burchelli*), gnus (*Connochaetes taurinus*) e búfalos (*Syncerus caffer*) suas principais presas. Em relação à audição como ferramenta de caça, as

orelhas podem ser rotacionadas em um ângulo amplo, favorecendo a percepção de sons distantes. Os rugidos destes animais são utilizados como mecanismos de demonstração hierárquica como também demarcação territorial (URBAN & WEST, 2002; CAT SPECIALIST GROUP, 2003)

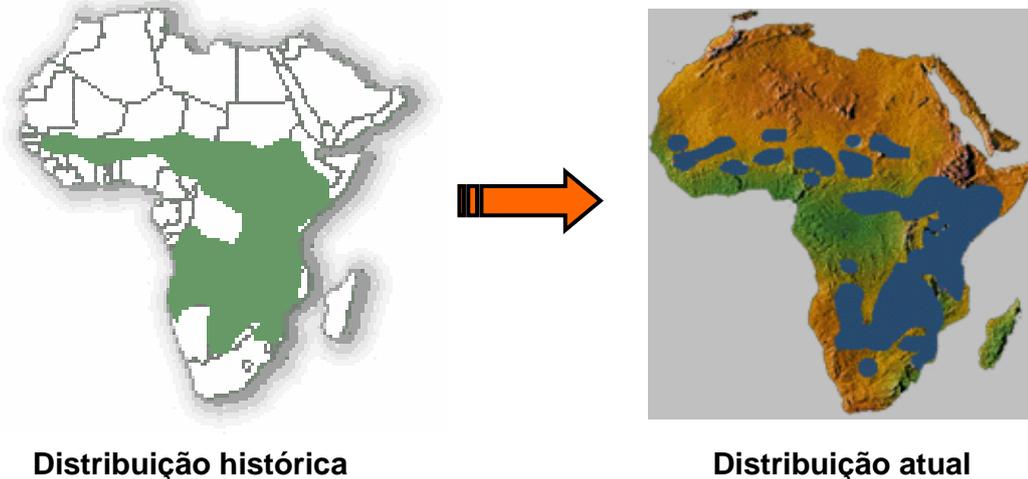


FIGURA 1–Distribuição histórica e atual de *Panthera leo*.

Fonte: URBAN & WEST (2002)

Leões machos e fêmeas tornam-se sexualmente maduros aos três anos de idade, sendo que o período reprodutivo ocorre provavelmente durante todo o ano (ESTES, 1993). A gestação tem duração média de 90 a 110 dias e o estro de oito dias. Existem relatos de leões em vida livre acasalando mais de 30 vezes em um dia (ESTES, 1993). As fêmeas podem acasalar com machos diferentes, sendo este comportamento importante para a variabilidade genética da espécie (STOFFEL, 2005). Leões em cativeiro (FIGURA 2) podem viver até os 20 anos em média, enquanto que os animais em vida livre (FIGURA 3) atingem apenas 12 anos (URBAN & WEST, 2002).

Os leões ainda podem ser encontrados por todo o continente africano, mas populações significativas só existem em parques nacionais na Tanzânia e África do Sul (ALDEN et al., 1998; CAT SPECIALIST GROUP, 2003; WIKIPEDIA, 2005). O isolamento geográfico de populações distintas de leões em vida livre, devido principalmente a ação humana, no leste africano

e no oeste indiano, tem levado à perda da variabilidade genética, tendo como consequência direta o aumento de anormalidades espermáticas e o desbalanceamento endócrino de hormônios reprodutivos, afetando a espermatogênese, ovulação e morbidade e mortalidade perinatal (WILDT *et al.*, 1987; MUNSON *et al.*, 1996).



FIGURA 2 – Exemplar macho de *Panthera leo* adulto em cativeiro.

Fonte: CAT SPECIALIST GROUP (2003)

A perda da variabilidade genética, em populações de felinos selvagens, vem sendo associada a um aumento na incidência de espermatozoides estruturalmente anormais, tanto em populações de vida livre como em cativeiro (WILDT *et al.*, 1987). Experimentos vêm sendo conduzidos em parques nacionais africanos, no sentido de introduzir, através de inseminação artificial, novo conjunto gênico em populações de vida livre (TRIVEDI, 2002).

Apesar de sua relativa abundância em cativeiro, as subespécies existentes de leão africano (*P. leo azandica*, *P. leo bleyenberghi*, *P. leo hollisteri*, *P. leo krugeri*, *P. leo massaicus*, *P. leo nubica*, *P. leo roosevelti*, *P. leo senegalensis*, *P. leo somaliensis* e *P. leo verneyi*) são listadas no apêndice II da CITES (Convention on International Trade in Endangered Species) sendo classificadas assim como espécies ameaçadas à extinção e também na lista vermelha da IUCN (The World Conservation Union) como espécies vulneráveis (IUCN, 2004; CITES, 2005; WIKIPEDIA, 2005).

De acordo com WILDT et al. (1995), pesquisas combinadas da espermatologia simultaneamente com estudos em endocrinologia, embriologia e criopreservação, podem levar à aplicabilidade com sucesso na reprodução assistida. Neste sentido, várias pesquisas envolvendo a morfofisiologia reprodutiva de animais silvestres e selvagens já foram desenvolvidos com a finalidade de se obter informações básicas, subsidiando o desenvolvimento de novas técnicas em reprodução assistida.



FIGURA 3 – Exemplar macho de *Panthera leo* adulto em vida livre.

Fonte: CAT SPECIALIST GROUP (2003)

Estudos sobre o processo espermatogênico de grandes felinos neotropicais, como a onça parda (*Puma concolor*) e a onça pintada (*Panthera onca*), ambos em condições de cativeiro, foram conduzidos na Universidade Federal de Viçosa, com os quais pretende-se verificar a título comparativo, os dados obtidos em leões africanos.

## **2.2. O testículo e o processo espermatogênico**

### **2.2.1. Biometria e função testicular**

O testículo é um órgão com função exócrina e endócrina e que se apresenta revestido por uma espessa cápsula conjuntiva, a albugínea, a qual envia septos para o interior, formando o mediastino testicular e também

dividindo o testículo em lóbulos. Este órgão é constituído por dois compartimentos: o compartimento tubular e o intertubular. No primeiro, responsável pela produção de espermatozóides, encontram-se os túbulos seminíferos, os quais conectam-se através de duas extremidades à *rete testis*, localizada na região do mediastino testicular. Os túbulos seminíferos são constituídos à partir de sua porção externa para a interna, de túnica própria, epitélio seminífero e lume. Na túnica própria podem ser observadas as células mióides ou peritubulares, a lâmina basal e fibras colágenas. Dois tipos celulares de origens diferentes estão presentes no epitélio seminífero: as células de Sertoli, de origem somática, e as células germinativas ou espermatogênicas (FAWCETT et al., 1973; FRANÇA & RUSSELL, 1998; PAULA, 1999).

Há uma relação direta entre o peso testicular e a produção espermática (AMANN, 1970; OLAR et al, 1983; FRANÇA & RUSSELL, 1998): quanto maior o testículo, maior a produção de espermatozóides. Porém, a quantidade de espermatozóides produzidos é sempre maior que o número necessário para a fecundação e não necessariamente, o tamanho do testículo acompanha proporcionalmente o tamanho corporal, uma vez que animais de grande porte produziram um enorme excedente (FRANÇA & RUSSELL, 1998; PAULA, 1999).

O índice gonadossomático representa a proporção do peso corporal alocado em testículo. Segundo KENAGY & TROMBULAK (1986), a função  $Y = 0,035 X^{0,72}$  ( $Y$  = massa de ambos os testículos em gramas,  $X$  massa do corpo em gramas) descreve o índice gonadossomático (IGS) para 133 espécies diferentes de mamíferos, embora haja diferença desta fórmula em agrupamentos de ordens e subordens distintas. Segundo estes mesmos autores, mamíferos de menor porte alocam maiores proporções de massa corporal e gasto de energia para tecido testicular que mamíferos de maior porte. Assim um animal de 10g apresenta IGS de 1,8%, enquanto um animal de 10 ton apresenta IGS de 0,04%. Considerando-se somente os roedores, é possível uma variação do índice gonadossomático de 0,1 a 8% (ROOSEN-RUNGE & GIESEL, 1950). KENAGY & TROMBULAK (1986) não observaram nenhuma correlação entre o tamanho do testículo e sua localização no corpo, embora exista relação funcional entre o tamanho

relativo dos testículos e o sistema de acasalamento. De acordo com estes pesquisadores, testículos são relativamente pequenos em animais monogâmicos ou poligâmicos e são relativamente maiores em animais com sistema promíscuo ou poliândrico, como, por exemplo, o chimpanzé que apresenta sistema promíscuo de acasalamento com índice gonadossomático de 0,27%. Já o gorila apresenta sistema poligâmico, com IGS de 0,02% (no homem o IGS é de aproximadamente 0,08%). Outros fatores podem influenciar o IGS, devido a variações no tamanho do testículo tais como: localização geográfica, tipo de habitat, idade, sazonalidade e raças.

A seleção presumivelmente atua no estabelecimento do tamanho dos testículos como um balanço funcional da demanda de hormônios e espermatozoides e na otimização do gasto de energia para crescimento, manutenção e produção testicular (KENAGY & TROMBULAK, 1986). A produção de hormônios apresenta custo energético muito menor que aquele observado para a produção de espermatozoides. Assim, raramente se observam grandes investimentos em células de Leydig e demais elementos do espaço intertubular, em relação aos túbulos seminíferos (SHORT, 1997). O cavalo e o camelo são os animais domésticos a apresentar as maiores proporções volumétricas de tecido intertubular, chegando a cerca de 38% do volume testicular (FRANÇA & RUSSELL, 1998). Já o cão e o gato apresentam os menores valores, variando de 11 a 12% (PAULA, 1992; GODINHO, 1999). Dentre os animais silvestres já estudados, as maiores proporções volumétricas de tecido intertubular foram observados em toupeiras 60% (FAWCETT et al., 1973) e em capivaras 50% (PAULA, 1999).

O túbulo seminífero apresenta grande variação na densidade volumétrica no testículo entre as diferentes espécies, porém, é geralmente o componente mais abundante do parênquima testicular (FRANÇA & RUSSELL, 1998). Todos os parâmetros quantitativos relacionados com o túbulo seminífero, como diâmetro tubular, espessura do epitélio seminífero e o comprimento total e por grama de testículo, apresentam relação positiva com a atividade espermatogênica (FRANÇA & RUSSELL, 1998; PAULA, 1999).

### **2.2.2. População celular e índices indicativos do rendimento da espermatogênese**

Nos túbulos seminíferos de animais sexualmente maduros, as células espermatogênicas não estão arranjadas ao acaso, mas sim organizadas em séries bem definidas de associações celulares ou estádios. Com exceção de algumas espécies de primatas, o arranjo dos estádios do ciclo do epitélio seminífero é segmentar em todos os mamíferos investigados, existindo somente um estádio por secção transversal de túbulo seminífero (LEBLOND & CLERMONT, 1952; RUSSELL et al., 1990a). Os estádios se sucedem numa determinada área do epitélio seminífero, com o decorrer do tempo. Esta seqüência, assim ordenada, constitui o processo denominado ciclo do epitélio seminífero (LEBLOND & CLERMONT, 1952; ORTAVANT et al., 1977; RUSSELL et al., 1990a). Dentre os sistemas utilizados para se estudar os estádios do ciclo do epitélio seminífero, o mais empregado é aquele baseado na forma e na localização dos núcleos das espermátides e na presença de figuras de divisões meióticas (ROOSEN-RUNGE & GIESEL Jr., 1950; COUROT et al., 1970; BERNDTSON, 1977; ORTAVANT et al., 1977; GUERRA, 1983; FRANÇA, 1991). Este sistema, designado como método da morfologia tubular por BERNDTSON (1977), permite a obtenção de oito estádios do ciclo. Outra classificação, designada como método do sistema acrossômico, é baseada nas características das espermátides, em particular na forma do núcleo e no desenvolvimento do acrossoma. Com este método, no qual os estádios são arbitrariamente definidos, o número de estádios para cada espécie é variado (RUSSELL et al., 1990b; FRANÇA & RUSSELL, 1998).

O epitélio seminífero compõe-se de quatro camadas de gerações distintas de células germinativas, que se apresentam em arranjos distintos. No estádio 1 do ciclo do epitélio seminífero, observam-se camadas basais de espermatogônias e espermátócitos primários em pré-leptóteno, camada intermediária de espermátócitos primários em paquíteno e uma camada adluminal de espermátides arredondadas. As razões entre os diferentes tipos de células germinativas constituem uma maneira bastante acurada de se analisar a eficiência do processo espermatogênico. Classicamente, três

índices avaliando as diferentes fases da espermatogênese são utilizados: 1) o coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais, o qual quantifica o grau de perdas celulares na fase espermatogonial ou proliferativa, estimando as degenerações que ocorrem nas conversões celulares de espermatogônias do tipo A<sub>1</sub> até a formação de espermatócitos primários em pré-leptóteno; 2) o rendimento meiótico, que avalia a eficiência das duas divisões meióticas; e 3) o rendimento geral da espermatogênese, no qual a eficiência do processo espermatogênico como um todo (de A<sub>1</sub> até espermátides arredondadas) (RUSSELL et al., 1990a; FRANÇA & RUSSELL, 1998; PAULA, 1999).

A apoptose celular, tem sido um dos tópicos mais intensamente estudados em ciências biológicas nos últimos anos. Este processo desempenha papel fundamental durante o desenvolvimento normal e na homeostase dos organismos multicelulares (JACOBSON et al., 1997; SINHA-HIKIM & SWERDLOFF, 1999). No epitélio seminífero, a apoptose ocorre normalmente de forma espontânea ou em resposta a vários fatores, tais como quimioterapia, temperatura elevada, distúrbios hormonais e diminuição de fatores de crescimento, dentre outros (BLANCO-RODRÍGUEZ & MARTÍNEZ-GARCIA, 1998; HENRIKSÉN & PARVINEN, 1998; SINHA-HIKIM & SWERDLOFF, 1999). A apoptose espontânea no epitélio seminífero é uma degeneração densidade-dependente citada como mecanismo adequadador da população de células germinativas a um número que pode ser suportado pelas células de Sertoli disponíveis (HUCKINS, 1978; DE ROOIJ & JANSSEN, 1987; DE ROOIJ & LOK, 1987; SHARPE, 1994; DE ROOIJ, 1998). Talvez este mecanismo seja, na realidade, uma competição por fatores de crescimento e outros fatores, conforme sugerido por JACOBSON et al. (1997). No entanto, merece ser ressaltado que, para cada espécie, a célula de Sertoli suporta um número limitado de células germinativas (ORTH et al., 1988; FRANÇA & RUSSELL, 1998). Assim, mesmo em espécies com alta produção espermática, as perdas celulares durante as divisões espermatogoniais podem ser consideravelmente altas, visto que o número de células iniciando a fase meiótica deve ser ajustado para o número que a célula de Sertoli pode suportar (ROOSEN-RUNGE & GIESEL Jr., 1950; SHARPE, 1994). Ainda de acordo com ROOSEN-RUNGE & GIESEL Jr.

(1950), o grau e o modo de degeneração das células germinativas e capacidade suporte da célula de Sertoli são espécie-específicos, mas em geral as degenerações ocorrem durante as divisões mitóticas e meióticas. Degenerações de espermatídes alongadas raramente são observadas (RUSSELL & PETERSON, 1984).

As interações entre as células de Sertoli e as células germinativas são cruciais para a manutenção da produção espermática normal (GRISWOLD, 1995). Pelo fato de sua população ser estável após a puberdade e ao longo dos diferentes estádios do ciclo do epitélio seminífero, a célula de Sertoli serve como referência para se quantificar e avaliar funcionalmente o processo espermatogênico (RUSSELL & PETERSON, 1984; FRANÇA & RUSSELL, 1998).

### **2.2.3. Organização dos elementos do espaço intertubular**

Em termos funcionais, o testículo de mamíferos pode ser dividido em dois compartimentos básicos, o tubular ou espermatogênico e o compartimento intertubular ou androgênico. A proporção entre estes compartimentos é bastante variável, sendo um dos principais fatores responsáveis pela diferença observada para a eficiência na produção espermática nas diversas espécies (RUSSELL et al. 1990a; FRANÇA & RUSSELL, 1998; PAULA, 1999).

Durante o desenvolvimento testicular, mais precisamente na puberdade, e durante a recrudescência testicular em animais sazonais, a célula de Sertoli, principal reguladora do processo espermatogênico, deixa de ser modulada unicamente pelo hormônio folículo estimulante (FSH), que gradativamente é substituído pela testosterona (MEANS et al., 1976; JÉGOU et al., 1983; SHARPE, 1994). Assim, como preparação para esta substituição, as células de Leydig devem ser adequadas numérica e fisiologicamente para dar suporte ao novo requerimento de testosterona, sendo que o FSH parece influenciar diretamente no desenvolvimento desta população (SHARPE, 1994).

FAWCETT et al. (1973) descreveram três modelos para o arranjo dos componentes do espaço intertubular nas diferentes espécies, indicando

grande variação em relação à quantidade de células de Leydig e à disposição de vasos/espacos linfáticos. Apesar do pouco conhecimento a respeito das implicações fisiológicas desta variação, FAWCETT et al. (1973) especularam que a mesma está provavelmente relacionada com a habilidade dos linfáticos de mover, para fora dos testículos, materiais vascularmente secretados e de manter as concentrações adequadas de andrógenos no testículo e nos vasos sangüíneos.

Inúmeros fatores podem influir na quantidade de células de Leydig por animal, dentre os quais podem ser destacados a quantidade de hormônio luteinizante (LH) disponível; o número de receptores de LH por célula; a quantidade de testosterona que a célula de Leydig é capaz de secretar em um dado período de tempo; a velocidade com que a testosterona deixa o testículo via vasos linfáticos, vasos sangüíneos e fluido seminal; o volume sangüíneo do animal; e a taxa de metabolismo da testosterona (RUSSELL et al., 1994; RUSSELL, 1996). Neste sentido, observando que apenas 2,2% do testículo de ratos são ocupados por células de Leydig (MENDIS-HANDAGAMA et al., 1988), nota-se que este valor é muito inferior aos 33% observados no testículo de capivaras (PAULA, 1999). Porém, se inferirmos estes valores ao percentual do peso corporal alocado em testículo (índice gonadossomático) para o rato, de 4,26% (KENAGY & TROMBULAK, 1986) e para a capivara, de 0,125% (PAULA, 1999), o percentual de massa corporal alocado em célula de Leydig (índice Leydigossomático) para o rato é de 0,094 % e para a capivara é de 0,041%. Assim, proporcionalmente, o rato apresenta na verdade cerca de duas vezes a quantidade de células de Leydig observada em capivaras. Desta forma, a proporção volumétrica testicular parece não refletir o real requerimento fisiológico de células de Leydig por animal.

#### **2.2.4. Biópsia testicular**

A biópsia testicular é um procedimento utilizado em muitos casos para avaliação de patologias relacionadas à infertilidade (NSEYO et al., 1984). Algumas das patologias mais freqüentemente observadas incluem aplasia de células germinativas, hipoespermatogênese, condições inflamatórias e

neoplasias (LOPATE et al., 1989). Os métodos mais comuns de biópsia testicular são a aspirativa e a incisional (FINCO, 1974; LOPATE et al., 1989).

As potenciais complicações da biópsia testicular são os danos ao parênquima, que localmente vão interromper a espermatogênese, ou adesões que podem impedir a termoregulação testicular. Tais complicações têm feito com que a técnica de biópsia testicular seja pouco aceita, tendo assim uso limitado (ATTIA et al., 2000). Ainda que danos histológicos estejam presentes nos testículos de cães após a biópsia, efeitos permanentes na produção e motilidade dos espermatozóides após repetidas biópsias em testículos alternados (JAMES et al., 1979), biópsia unilateral (HUNT et al., 1965), ou biópsia unilateral após orquiectomia unilateral (HUNT & FOOTE, 1997; MASCARENHAS et al., 2005) parecem insignificantes. Cavalos castrados após biópsia incisional unilateral apresentaram apenas aumento transitório na degeneração de espermatócitos em pré-leptóteno e espermatogônias do tipo B no testículo biopsiado (DELVENTO et al., 1992). Neste sentido, a biópsia testicular mostra-se muito efetiva para a coleta de material biológico sem maiores danos reprodutivos a longo prazo, nas diferentes espécies estudadas (GALINA, 1971; LOPATE et al., 1989; FELDMAN & NELSON, 1996; MUNSON et al., 1996; MASCARENHAS et al., 2005).

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

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDEN, P., ESTES, R., SCHLITTER, D., MCBRIDE, B. 1998. **National Audubon Society Field Guide to African Wildlife**. New York: Alfred A. Knopf Incorporation. pp. 112-128.
- AMANN, R.P. 1970. Sperm production rates. In: JOHNSON, A.D., GOMES, W.R., VANDEMARK, N.L. (eds). **The testis**. New York: Academic Press. pp. 433-482.
- ATTIA, K.A., ZAKI, A.A., EILTS, B.E., PACCAMONTI, D.L. 2000. Anti-sperm antibodies and seminal characteristics after testicular biopsy or epididymal aspiration in dogs. **Theriogenology**, v.53, p.1355-1363
- BERNDTSON, W.E. 1977. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. **J. Anim. Sci.**, v.44, n.5, p.818-83.
- BLANCO-RODRÍGUEZ, J., MARTÍNEZ-GARCIA, C. 1998. Apoptosis pattern elicited by several apoptogenic agents on the seminiferous epithelium of the adult rat testis. **J. Androl.** v.19, n. 4, p.487-497.
- CAT SPECIALIST GROUP. 2003. "*Panthera leo*". 2003 IUCN Red list of Threatened Species. Disponível em: <http://www.redlist.org/search/details.php?species=15951>. Acesso em: 12 fevereiro 2005.
- CITES, CONVENTION ON INTERNATIONAL TRADE IN ENDANGERED SPECIES. 2005. Disponível em: [http://www.ukcites.gov.uk/intro/cites\\_species.htm](http://www.ukcites.gov.uk/intro/cites_species.htm). Acesso em: 29 outubro 2005.
- CORSON, W. H. 1996. **Manual global de ecologia**. 2 ed. São Paulo: Editora Augustus. 413p.
- COUROT, M., HOCHEREAU-DE-REVIERS, M.T., ORTAVANT, R. 1970. **Spermatogenesis**. In: Johnson, A.D., Gomes, W.R., Vandemark, N.L. (ed). **The testis**. New York: Academic Press. v.1, cap. 6 : 339-432.
- DE ROOIJ, D. G. & JANSSEN, J. M. 1987. Regulation of the density spermatogonia in the seminiferous epithelium of the chinese hamster: I. Undifferentiated spermatogonia. **Anat. Rec.** v.217, n.2, p.124-130.
- DE ROOIJ, D. G. & LOK, D. 1987. Regulation of the density of spermatogonia in the seminiferous epithelium of the chinese hamster: II. Differentiating spermatogonia. **Anat. Rec.** v. 217, p.131-136.

- DE ROOIJ, D. G. 1998. Stem cells in the testis. **Int. J. Exp. Path.** V.79, p.67-80.
- DELVENTO, V.R., AMANN, R.P., TROTTER, G.W., VEERAMACHANENI, D. N., SQUIRES, E.L. 1992. Ultrasonographic and quantitative histologic assessment of sequelae to testicular biopsy in stallions. **Am. J. Vet. Res.**, v.53, n.11, p.2094-2101.
- ESTES, R. 1993. **The Safari Companion: A Guide to Watching African Mammals**. Vermont: Chelsea Green Publishing Company. pp. 89-103.
- EWER, R. F. 1986. **The carnivores**. Ithaca: Cornell University Press. 500p.
- FAWCETT, D. W., NEAVES, W. B., FLORES, M. N. 1973. Comparative observations on intertubular lymphatic and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. **Biol. Reprod.** v.9, p.500- 532.
- FELDMAN, E. C.; NELSON, R. W. 1996. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. W. B. Saunders Company. Philadelphia.785p.
- FINCO, D. R. Biopsy of the testicle. 1974. **Vet. Clin. Of North American**, v. 2,. n. 4, p. 377 – 381.
- FRANÇA, L. R. 1991. **Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais. 185p.
- FRANÇA, L. R., RUSSELL, L. D. 1998. The testis of domestic animals. In: Regadera, J. & Martinez-Garcia (eds.). **Male reproduction. A multidisciplinary overview**. Churchill Livingstone, Madrid. pp. 197-219.
- GALINA, C. 1971. An evaluation of testicular biopsy in farm animals. **The Veterinary Record.**, v.88, p.628-631.
- GODINHO, C. L. 1999. **Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*) sexualmente maduros**. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais. 123p.
- GONYEA, W. J. 1976. Adaptive differences in the body proportions of large felids. **Acta. Anat.**, v.96, p.81-96.
- GRISWOLD, M. D. 1995. Interaction between germ cells and Sertoli cells in the testis. **Biol. Reprod.**, v.52, p.211-216.
- GUERRA, M.O. 1983. Comparação entre dois métodos de determinação da frequência relativa dos estádios do ciclo do epitélio seminífero, em dados da literatura. **Rev. Bras. Biol.**, v.43, n. 4, p.385-394.

- HENRIKSÉN, K. & PARVINEN, M. 1998. Stage-specific apoptosis of male germ cells in the rat: mechanisms of cell death studied by supravital squash preparations. **Tissue & Cell.**, v.30, n.6, p.692-701.
- HUCKINS, C. 1978. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. **Anat. Rec.**, v.190, n.4, p.905-26.
- HUNT, W.L., FOOTE, R.H. 1997. Effect of repeated testicular biopsy on testis function and semen quality in dogs. **J. Androl.**, v.18, p.740-744.
- HUNT, W.L., PAUFLER, S.K., FOOTE, R.H. 1965. Testicular biopsies and spermatogenesis in dogs. **J. Anim. Sci.**, v.24, p.921.
- IUCN Red List, THE WORLD CONSERVATION UNION, "*Panthera leo*". 2004. Disponível em: <http://lynx.uio.no/catfolk/lion>>. Acesso em: 12 fevereiro 2005.
- JACOBSON, M. D., WEIL, M., RAFF, M. C. 1997. Programmed cell death in animal development. **Cell.**, v.88, p.347-354.
- JAMES, R.W., HEYWOOD, R., FOWLER, D.J. 1979. Serial percutaneous testicular biopsy in the Beagle dog. **J Small Anim. Pract.**, v.20, p.219-228.
- JÉGOU, B.; Le GAC, F.; IRBY, D.C.; De KRESTSER, D.M. 1983. Studies on seminiferous tubule fluid production in the adult rat: Effect of hypophysectomy and treatment with FSH, LH and testosterone. **Int. J. Androl.**, v.6, p.249-260.
- KENAGY, G. J., TROMBULAK, S. C. 1986. Size And Function of Mammalian Testes In relation to body size. **J. Mamm.**, v.67, n.1, p.1-22.
- LEBLOND, C.P. & CLERMONT, Y. 1952. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v.55, p.548-584.
- LOPATE, C.; THRELFALL, W. R.; ROSOL, T. J. 1989. Histopatologic and gross effects of testicular biopsy in the dog. **Theriogenology**, v.32, n.4, p. 585-602.
- MASCARENHAS, R.M., PAULA, T.A.R., CARRETTA JÚNIOR, M., RIBEIRO, E.C.S., BORBOLETA, L.R., MATTA, S.L.P. (2005) Efeitos da biópsia incisional testicular sobre o rendimento intrínseco da espermatogênese e índices de células de sertoli em cães. **Revista CERES** (no prelo).
- MEANS, A.R., FAKUNDING, J. L., HUCKINS, C., TINDALL, D.J., VITALE, R. 1976. Follicle-stimulating hormone, the Sertoli cell and spermatogenesis. **Recent Prog. Horm. Res.**, v.32, p.477-527.

- MENDIS-HANDAGAMA, S.M.; ZIRKIN, B.R.; EWING, L.L. 1988. Comparison of components of the testis interstitium with testosterone secretion in hamster, rat, and guinea pig testes perfused in vitro. **Am. J. Anat.**, v.181,n.1, p.12-22.
- MUNSON, L., BROWN, J.L., BUSH, M., PACKER, C., JANSSEN, D., REIZISS, S. M., WILDT, D.E. 1996. Genetic diversity affects testicular morphology in free-ranging lions (*Panthera leo*) of Serengeti Plains and Ngorongoro Crater. **J. Reprod. Fertil.** v.108, p.11-15.
- NSEYO, U.O., ENGLANDER, L.S., HUBEN,R.P., PONTES, J.E. 1984. Aspiration biopsy of testis: another method for histologic examination. **Fertil. Steril.**, v.42, n.2, p.281-284.
- OLAR, T. T.; AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. 1983. Relationships among testicular size, daily production and output of spermatozoa and extragonadal spermatozoa reserves of the dog, **Biol. Reprod.**, v. 29, p. 1114 – 1120.
- ORTAVANT, R., COUROT, M., HOCHEREAU-DE-REVIERS, M.T. 1977. Spermatogenesis in domestic mammals. In: COLE, H.H., CUPPS, P.T. (eds). **Reproduction in domestic animals**. 3 ed. New York: Academic Press. Cap. 8, p.203-227.
- ORTH, J. M., GUNSALUS, G. L., LAMPERTI, A. A. 1988. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. **Endocrinology.**, v.122, p.787-794.
- PAULA, T.A.R. 1992. **Estudo histológico quantitativo da atividade espermatogênica de cães s.r.d. em diferentes faixas etárias após a puberdade**. Belo Horizonte: UFMG, 62p. Tese (Mestrado em Morfologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.
- PAULA, T.A.R. 1999. **Avaliação Histológica e Funcional do Testículo de Capivaras Adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*)**. Belo Horizonte: UFMG, 84p. Tese (Doutorado em Morfologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.
- ROOSEN-RUNGE, E.C., GIESEL, Jr. L.O. 1950 Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. **Am. J. Anat.**, v. 87, n.1, p.1-30.
- RUSSELL, L. D. & PETERSON, R. N. 1984. Determination of the alongate spermatid-Sertoli cell ratio in various mammals. **J. Reprod. Fert.**, v.70, p.635-641.
- RUSSELL, L. D., REN, H. P., SINHA-HIKIN, I., SCHULZE, W., SINHA-HIKIN, A. P. 1990a. A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes and numerical densities of selected testis components,

- emphasizing those related to the Sertoli cell. **Am. J. Anat.**, v.188, n.1, p.21-30.
- RUSSELL, L.D., ETTLIN, R.A., SINHA HIKIM, E.P., CLEGG, E.D. **Histological and histopathological evaluation of the testis**. Cleanwater, FL, Cache River Press, 1990b, 286p.
- RUSSELL, L. D., CHANDRASHEKAR, V., BARTKE, A., SINHA-HIKIM, A. P. 1994. The hamstes Sertoli cell in early testicular regression and early recrudescence: a stereological and endocrine study. **Int. J. Androl.**, v.17, n.2, p.93-106.
- RUSSELL, L. D. 1996. **Mammalian Leydig cell structure**. In: PAYNE, A. H., HARDY, M. P., RUSSELL, L. D. (eds). The Leydig cell. Cache River Press. Vienna, IL.
- SHARPE, R. M. 1994. Regulation of spermatogenesis. In. KNOBIL, E. & NEIL, J. D. (eds) **The physiology of reproduction**, 2ed. Raven Press, N.Y. pp.1363-1434.
- SHORT, R.V. 1997. The testis: the witness of the mating system, the site of mutation and the engine of desire. **Acta Paediatr. Suppl.**, v.422, p.3-7.
- SINHA-HIKIM, A. P., SWERDLOFF, R. 1999. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. **Reviews of Reproduction.**, v.4, p.38-47.
- STOFFEL, T. 2005. "Lion facts". Disponível em: <http://www.lionlmb.org/lion/lionfact.html>. Acesso em: 28 outubro 2005.
- TRIVEDI, B.P., 2002. To Boost Gene Pool, Lions Artificially Inseminated. Disponível em: [http://news.nationalgeographic.com/news/2002/06/0612\\_020612\\_TVlion.html](http://news.nationalgeographic.com/news/2002/06/0612_020612_TVlion.html). Acesso em: 12 de novembro de 2005.
- URBAN, M., WEST, P. 2002. "Lion Research Center". Disponível em: <http://animaldiversity.ummz.umich.edu/local/redirect.php/http://www.lionresearch.org/>. Acesso em: 15 de abril de 2005.
- WILDT, E.D., BUSH, M., GOODROWE, K.L., PACKER, C., PUSEY, A.E., BROWN, J.L., JOSLIN, P., O'BRIEN, S.J. (1987). Reproductive and genetic consequences of founding isolated lion populations. **Nature**, v.329, p.328-331.
- WILDT, D.E., PUKAZHENTHI, B., BROWN, J., MONFORT, S., HOWARD, J.G., ROTH, T.L. (1995). Spermatology for understanding managing and conserving rare species. **Rep. Fert. Develop.**, v.7, p.812-824.
- WIKIPEDIA, 2005. "*Panthera leo*". Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Le%C3%A3o>. Acesso em: 12 de novembro de 2005.

**Morfometria testicular e o túbulo seminífero de leões africanos  
(*Panthera leo*, Linnaeus, 1758) adultos, mantidos em cativeiro**

**Resumo**

Uma relação direta entre peso testicular e produção espermática é observada em diferentes animais já investigados. O tamanho testicular reflete principalmente o comprimento total do túbulo seminífero, visto ser este seu principal componente. A composição do parênquima testicular e o tamanho relativo dos testículos podem fornecer valiosas informações quanto à fisiologia reprodutiva. O peso corporal médio dos leões africanos neste estudo foi de 183,7 kg, dos quais cerca de 0,015% são alocados em massa testicular e 0,009% especificamente em túbulos seminíferos, que representaram cerca de 75,6% do parênquima testicular. O diâmetro médio dos túbulos seminíferos foi de 252,7 $\mu$ m e, a espessura média do epitélio seminífero, de 93,2 $\mu$ m. O leão africano apresenta 12,3 metros de túbulo seminífero por grama de testículo.

**Palavras chave:** testículo, túbulo seminífero, leão, *Panthera leo*

**Summary**

A direct relationship between the testis weight and spermatid production is observed in different animals already investigated. The testis size primarily reflects the total length of the seminiferous tubule, since this one is its main component. The composition of the testis parenchyma and the relative size of the testis can provide valuable information concerning to reproductive physiology. In this study, the average body weight of the African lions were 183.7 kg, from which approximately

0.015% are allocated in the testis mass and 0.009% are specifically in the seminiferous tubules, which represented about 75.6% of the testis parenchyma. The average diameter of the seminiferous tubules was 252.7  $\mu\text{m}$ , and the average thickness of the seminiferous epithelium was 93.2  $\mu\text{m}$ . The African lion presents 12.3 m seminiferous tubule by each gram of testis.

**Keywords:** testis, seminiferous tubule, lion, *Panthera leo*

## 1. Introdução

O leão (*Panthera leo*) é o segundo maior felino do mundo podendo atingir até 230 kg, sendo menor apenas que o tigre (*Panthera tigris*). Diferente da maioria dos gatos, o leão possui hábitos gregários, formando grupos de até 30 animais. As fêmeas são encarregadas da caça e cuidam da prole, enquanto um ou dois machos dominantes se responsabilizam pela proteção do grupo (Alden *et al.*, 1998).

Leões africanos vivem em planícies ou savanas, onde constituem o segundo maior grupo predador depois das hienas manchadas (*Crocota crocuta*). Podem viver ainda em áreas arborizadas, montanhosas e mesmo em habitats semi-desérticos (Estes, 1993). Esse felino possui pelame curto e cauda longa com um topete preto em sua extremidade. São sexualmente dimórficos, visto que além de maior altura e peso corporal apenas os machos possuem juba (Estes, 1993; Alden *et al.*, 1998). Existem pelo menos cinco subespécies de leões africanos, sendo cada uma delas identificada pela região geográfica em que ocorre, fato este contestado por alguns autores (Urban & West, 2002). Embora ainda haja abundância destes animais em cativeiro, todas as subespécies de leão africano são listadas no apêndice II da CITES (Convention on International Trade in Endangered Species, 2005) sendo classificada assim, como espécie ameaçada de extinção na lista vermelha da IUCN (The World Conservation

Union, 2004) como espécie vulnerável (Cat Specialist Group, 2003). Em alguns países africanos, os leões foram praticamente exterminados, ocorrendo em vida livre somente em alguns parques nacionais (Alden *et al.*, 1998; Cat Specialist Group, 2003). O isolamento geográfico de populações distintas de leões em vida livre no leste africano e no oeste indiano tem levado a uma perda da variabilidade genética, tendo como consequência direta o aumento de anormalidades espermáticas e o desbalanceamento endócrino de hormônios reprodutivos, afetando a espermatogênese, ovulação, morbidade e mortalidade perinatal (Wildt *et al.*, 1987; Munson *et al.*, 1996).

De acordo com alguns pesquisadores, existe um direto relacionamento do peso testicular com a produção espermática: quanto maior o testículo, maior a produção de espermatozóides (Amann, 1970; Olar *et al.*, 1983; França & Russell, 1998). Porém, a quantidade de espermatozóides produzidos é sempre maior que o número necessário para a fecundação, e não necessariamente o tamanho do testículo acompanha proporcionalmente o tamanho corporal, uma vez que animais de grande porte produziram quantidade excedente (Paula, 1999).

A composição do parênquima testicular (Paula, 1999) e o tamanho relativo dos testículos (Kenagy & Troumbulak, 1986) em uma dada espécie, podem fornecer valiosas informações quanto a fisiologia reprodutiva e até mesmo quanto ao seu sistema de acasalamento. Assim sendo, o estudo da morfologia testicular e do processo espermatogênico em animais selvagens é fundamental para o estabelecimento de padrões fisiológicos, com os quais pode-se estabelecer protocolos em reprodução assistida.

O processo de biópsia testicular vem sendo amplamente utilizado em estudos que envolvam a fisiopatologia reprodutiva de animais domésticos e selvagens, por

ser um método conservativo da capacidade reprodutiva, não apresentando efeitos deletérios na produção espermática a longo prazo (Lopate *et al.*, 1989; Threlfall & Lopate, 1993; Attia *et al.*, 2000; Bittencourt *et al.*, 2004; Azevedo *et al.*, 2005; Mascarenhas *et al.*, 2005; Guião-Leite *et al.*, 2006). Esta metodologia é uma excelente opção frente à castração ou hemicastração uma vez que fornece material suficiente para a análise microscópica representativa do testículo, pelo fato de não se observarem diferenças significativas na composição do parênquima testicular entre diferentes regiões do testículo (Amann, 1970; Berndtson, 1977; Amann & Schanbacher, 1983).

O objetivo deste estudo foi descrever dados de morfometria testicular e do túbulo seminífero e indexá-los com a massa corporal em leões africanos adultos mantidos em cativeiro.

## **2. Material e métodos**

Foram utilizados cinco leões africanos adultos, provenientes de parques zoológicos dos estados de São Paulo e Minas Gerais. Os animais utilizados no presente estudo foram incluídos em programas de controle populacional e, no momento da deferentectomia foram submetidos ainda à biópsia testicular. Os animais foram contidos através de dardos anestésicos e mantidos em anestesia geral com a utilização da associação tiletamina/zolazepan na dose de 10 mg/kg.

Para a determinação do volume testicular, ambos os testículos foram mensurados percutaneamente quanto à: largura, espessura e comprimento com a utilização de paquímetro digital. A espessura da pele escrotal também foi mensurada e descontada das dimensões testiculares. Através da fórmula  $4/3\pi ABC$ , onde A= metade da largura, B= metade da espessura e C metade do comprimento, foi

calculado o volume de cada testículo (Moreira, 1995). O volume testicular foi diretamente convertido em gramas, visto que a densidade volumétrica do testículo de mamíferos é muito próxima a um (Johnson *et al.*, 1981; Paula, 1999). A albugínea e o mediastino testiculares foram estimados em 18% da massa testicular, uma vez que esta média foi observada em todos os carnívoros domésticos e selvagens já estudados (Godinho, 1999; França & Godinho, 2003; Bittencourt *et al.*, 2004; Mascarenhas *et al.*, 2005; Azevedo *et al.*, 2005; Guião Leite *et al.*, 2006), e assim, para o cálculo do peso do parênquima testicular este valor foi descontado do volume total dos testículos.

Após tricotomia e anti-sepsia local, a pele do escroto foi incisada e, com o uso de um bisturi circular de 4 mm de diâmetro, foi obtido um fragmento da região média percutaneamente do testículo, direito ou esquerdo. O fragmento foi imediatamente fixado, utilizando-se solução de aldeído glutárico (Merck) 4% em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4 à temperatura ambiente por um mínimo de duas horas, sendo posteriormente armazenado sob refrigeração no mesmo tampão. A lesão foi suturada em planos distintos com fio sintético absorvível, sendo na pele utilizada sutura intradérmica com extremidades embutidas. Cada animal recebeu agentes antibióticos e antiflogísticos como terapia preventiva e foi clinicamente acompanhado até o seu pleno restabelecimento.

Os procedimentos adotados na metodologia deste estudo, no que se refere ao bem estar dos animais envolvidos, estão de acordo com Processo N° 27/2005, aprovado pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa em 01/04/2005.

Para estudos em microscopia de luz os fragmentos foram desidratados em séries de concentrações crescentes de álcoois (70°, 80°, 90° e 100° GL) e incluídos

em resina plástica à base de glicol metacrilato. Foram obtidos tantos cortes histológicos quanto possível, de modo seqüencial, por meio de micrótomo rotativo dotado de navalha de vidro, com quatro  $\mu\text{m}$  de espessura, os quais foram corados com solução de azul de toluidina / borato de sódio a 1%.

Ao microscópio de luz, com auxílio de ocular integradora dotada de 100 pontos em aumento de 400 vezes, foram avaliadas as proporções volumétricas de túbulos seminíferos e do espaço intertubular no parênquima testicular, através da contagem destes elementos teciduais correspondentes aos pontos em dez campos aleatoriamente distribuídos, em cada animal. Inferindo-se a estas proporções o volume total do parênquima testicular, foram obtidos os volumes totais de cada componente testicular em todos animais. O diâmetro médio dos túbulos seminíferos e a espessura do epitélio seminífero foram obtidos pela média das mensurações, através de ocular micrométrica, em 20 secções transversais de túbulos seminíferos, o mais circular possível, em cada animal.

Devido ao formato cilíndrico do túbulo seminífero, utilizou-se para o cálculo de seu comprimento, a derivação da fórmula volumétrica do cilindro, onde comprimento tubular = volume de túbulos seminíferos/área da secção transversal do túbulo seminífero. Através do peso estimado de ambos os testículos, foi possível calcular o índice gonadossomático, o qual refere-se ao percentual de massa corporal alocado em gônadas. Já para o cálculo do índice tubulossomático, inferiu-se ao índice anterior a proporção volumétrica correspondente aos túbulos seminíferos.

Os dados foram analisados estatisticamente quanto a média, desvio padrão e, em alguns casos, quanto ao coeficiente de variação, utilizando-se para isto o programa SAEG (Sistema para Análise Estatística e Genética, 2001).

### **3. Resultados**

O peso corporal médio dos animais estudados foi de 183,7 kg (Tabela 1), variando entre 150 e 220 kg, dentro de uma faixa considerada normal para a espécie. Nos leões africanos estudados, o peso total dos testículos apresentou uma variação considerável ( $cv = 46,6$ ) (Tabela 1), porém, altamente correlacionado com a massa corporal ( $r = 0,9$ ). Esses animais apresentaram índice gonadossomático (IGS) médio de 0,015% (Tabela 1), sendo este parâmetro consistente quanto à similaridade do tamanho relativo dos testículos.

Os animais estudados apresentaram cerca de 75,6 % de túbulo seminífero no parênquima testicular, o que corresponde em média a 17 ml alocados em ambos os testículos (Tabela 2). O índice tubulossomático (ITS) foi, em média, de 0,009% nos animais estudados (Tabela 2).

Os valores encontrados em leões africanos foram, em média, 252,7  $\mu m$  de diâmetro tubular e 93,2  $\mu m$  de espessura média do epitélio seminífero (Tabela 3). O comprimento total do túbulo seminífero, uma vez que representa o principal componente testicular, refletiu, nestes animais, uma grande variação ( $cv = 44,6$ ) também observada no tamanho testicular. Já o comprimento tubular por grama de testículo apresentou homogeneidade entre os animais estudados ( $cv = 3,08$ ), sendo em média 12,3 metros de túbulo seminífero por grama de testículo (Tabela 3).

### **4. Discussão**

O peso testicular foi calculado a partir de suas dimensões, uma vez que, para este estudo, foram realizadas coletas de fragmentos através de biópsias testiculares. A estimativa do volume através da fórmula matemática utilizada, mostrou-se efetiva em testículos de cães submetidos à castração, apresentando alta correlação com os

valores correspondentes do peso testicular (Mascarenhas *et al.*, 2005). Esta técnica foi utilizada com o mesmo propósito para a onça parda (Guião Leite & Paula, 2003), para o lobo guará (Bittencourt *et al.*, 2004) e para a onça pintada (Azevedo *et al.*, 2005). De acordo com Johnson *et al.* (1981), a densidade volumétrica média do testículo é de aproximadamente 1,046g/ml, e em decorrência deste fato, assumiu-se no presente trabalho, o volume testicular em mililitros igual à sua massa em gramas. O peso dos testículos em leões africanos não sofreu variação significativa entre os antímeros (teste *t* de Student a 5%), confirmando o observado para todos os mamíferos já pesquisados (França & Russell, 1998).

Segundo estes mesmos autores, uma maior alocação e dispendimento energético em massa testicular, são observados em animais de menor porte. Neste sentido, o índice gonadossomático em leões africanos adultos (0,015%), foi menor que os observados em felinos silvestres brasileiros como a onça parda (0,03%) (Guião Leite & Paula, 2003) e a onça pintada (0,034%) (Azevedo *et al.*, 2005) e menor ainda que aqueles observados em pequenos felinos como o gato doméstico (0,07%) (Godinho, 1999) e o gato selagem africano (0,05%) (Kenagy & Troumbulak, 1986).

Segundo Kenagy & Troumbulak (1986), o tamanho relativo dos testículos não se correlaciona com sua localização corporal, porém, é um forte indicador do sistema de acasalamento de uma determinada espécie (Short, 1997). Desta forma, espécies de mamíferos onde uma fêmea cruza com vários machos durante o período fértil do ciclo ovariano, apresentam maiores índices gonadossomáticos em relação às espécies onde um único macho é responsável pela cópula. Isto se deve ao fato de, no primeiro caso, haver necessidade de maior produção espermática, uma vez que a competição pela fertilização ocorre no interior do trato genital feminino. Em leões

africanos, assim como em onças pintadas e ainda, em onças pardas, o IGS reflete seu comportamento reprodutivo, no qual raramente uma fêmea copula com mais de um macho durante o cio (Hemker *et al.*, 1992), não havendo então necessidade de grande investimento em massa testicular e conseqüente produção espermática, visto não haver competição entre espermatozoides de diferentes machos na fertilização de uma mesma fêmea (Kenagy & Troumbulak, 1986).

A albugínea e o mediastino compõem a morfofisiologia testicular, embora não participem diretamente da função espermatogênica ou androgênica. Desta forma, nos estudos fisiológicos, estas estruturas são desconsideradas do peso testicular para a obtenção do cálculo do parênquima testicular (Johnson *et al.*, 1981). Na maioria das espécies domésticas, a proporção volumétrica da albugínea e mediastino testiculares é geralmente em torno de 10% (França & Russell, 1998), porém, dados em carnívoros demonstram serem estas estruturas mais abundantes. Assim, Godinho (1999) observou no gato doméstico valores próximos a 18%, Mascarenhas *et al.* (2005) descrevem valores similares para o cão, assim como Bittencourt *et al.* (2004) em lobo guará e Azevedo *et al.* (2005), em onça pintada. Desta forma, para se estimar a massa do parênquima testicular em leões africanos, foram considerados 18% do peso testicular alocados em albugínea e mediastino.

Embora o termo parênquima testicular não seja totalmente adequado para a referência do testículo desprovido de albugínea e mediastino testiculares, é amplamente mencionado na literatura especializada (Berndtson, 1977; Johnson *et al.*, 1981; Russell *et al.*, 1990a; Johnson *et al.*, 2000). O parênquima testicular pode ser dividido em dois compartimentos: o tubular e o intertubular (Amann, 1970; Fawcett *et al.*, 1973; Amann & Schanbacher, 1983; Russell *et al.*, 1990a). O compartimento tubular é caracterizado como principal componente do testículo na grande maioria

dos mamíferos, exercendo grande influência sobre o peso testicular e, por consequência, sobre a produção espermática (Amann, 1970; França & Russell, 1998; Paula *et al.*, 1999). Com exceção dos baixos valores descritos na marmota e na capivara (Russell *et al.*, 1990b; Costa & Paula, 2003), a maioria dos animais investigados apresenta entre 70 e 90% de túbulos seminíferos no parênquima testicular (Paula & Cardoso, 1994; França & Russell, 1998), incluindo nesta faixa os valores observados em felinos, tais como o gato doméstico, com cerca de 90% (Godinho, 1999), a onça parda, com 78% (Guião-Leite & Paula, 2003), e ainda a onça pintada, com 77,7% (Azevedo *et al.*, 2005). O leão africano apresentou cerca de 75,6 % de túbulo seminífero no parênquima testicular, o que corresponde em média a 17 mililitros alocados em ambos os testículos.

O índice tubulossomático (ITS) é um parâmetro que visa quantificar o investimento em túbulo seminífero em relação à massa corporal do animal. Assim sendo, o leão africano aloca, em média, aproximadamente 0,009% do peso corporal em túbulo seminífero, sendo este valor, menor ao observado na onça pintada (0,022%) (Azevedo *et al.*, 2005) e na onça parda (0,02%) (Guião-Leite & Paula, 2003). O índice tubulossomático do gato doméstico de 0,06% (Godinho, 1999), demonstra um maior investimento corporal desta espécie na produção espermática, reafirmando a tendência descrita por Kenagy & Troumbulak (1986) para animais de menor porte.

A medida do diâmetro tubular é uma abordagem utilizada como indicador da atividade espermatogênica em experimentos que envolvem a função testicular (Godinho & Cardoso, 1979; Sinha-Hikim *et al.*, 1991; Russell *et al.*, 1994; Muñoz *et al.*, 1998; França & Cardoso, 1998; França & Godinho, 2003). Embora o valor encontrado para o diâmetro tubular médio possa chegar a 550  $\mu\text{m}$  em algumas

espécies de marsupiais (Woolley, 1975), o valor tipicamente observado para a maioria dos amniotas varia de 180 a 300  $\mu\text{m}$  (Roosen-Runge, 1977). Os valores encontrados em leões africanos foram, em média, 252,7  $\mu\text{m}$ , apresentando-se muito próximo àqueles observados na onça parda (Guião-Leite & Paula, 2003), na onça pintada (Azevedo *et al.*, 2005) e no gato doméstico (Godinho, 1999), sendo enquadrado dentro da amplitude citada para as demais espécies estudadas.

Segundo Wing & Christensen (1982) a mensuração da espessura do epitélio seminífero é mais efetiva para a avaliação da produção espermática do que o diâmetro tubular. No leão africano, a espessura média do epitélio seminífero foi de 93,2  $\mu\text{m}$ , acima do observado para o gato doméstico (81 $\mu\text{m}$ / Godinho, 1999), onça parda (67 $\mu\text{m}$ / Guião Leite & Paula, 2003) e semelhante à onça pintada (90,3  $\mu\text{m}$ / Azevedo *et al.*, 2005), todavia, dentro da amplitude observada nos animais domésticos, que é de 60 a 100  $\mu\text{m}$  (França & Russell, 1998).

O leão africano apresenta cerca de 12,3 metros de túbulo seminífero por grama de testículo, valor este dentro da faixa de 10 a 15 m/g descrita para a maioria dos animais domésticos (França & Russell, 1998), porém abaixo da descrita para o gato doméstico, 23 m/g (Godinho, 1999), para a onça parda, 18 m/g (Guião Leite & Paula, 2003) e muito semelhante à onça pintada, 12,2m/g (Azevedo *et al.*, 2005). Estes valores decrescentes, respectivamente, do gato doméstico, onça parda e do leão africano e onça pintada, reafirmam o investimento inverso na produção espermática em relação à massa corporal.

O tamanho testicular reflete o comprimento total do túbulo seminífero, uma vez que este é o seu principal componente. Nos leões africanos, grande variação foi observada entre os indivíduos quanto ao comprimento total de túbulo seminífero ( $cv = 44,6$ ), acompanhando a grande variação encontrada para o volume testicular.

Entretanto, esta variação deve ser desconsiderada quando analisada por unidade de peso testicular ( $cv = 3,08$ ), demonstrando mais uma vez a constância do investimento na produção espermática desta espécie.

## 5. Conclusões

Nos leões africanos adultos mantidos em condições de cativeiro, utilizados neste estudo, os índices gonadossomático e túbulossomático foram, respectivamente, 0,015% e 0,009%, sendo a proporção volumétrica de túbulos seminíferos, em média, de 75,6%. O diâmetro tubular médio nestes animais e a altura média do epitélio seminífero foram de 252,7  $\mu\text{m}$  e 93,2  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Leões apresentaram em média 12,3 metros de túbulo seminífero por grama de testículo.

## 6. Referências

- Alden P, Estes R, Schlitter D, McBride B (1998) National Audubon Society Field Guide to African Wildlife. New York, Alfred A. Knopf Incorporation. pp. 112-128.
- Amann RP (1970) Sperm production rates. In: Johnson AD, Gomes WR, Vandemark NL (Eds.) The testis. New York, Academic Press. pp. 433-482.
- Amann RP, Schanbacher BD (1983) Physiology of male reproduction. J Anim Sci Suppl 57: 380-403.
- Attia KA, Zaki AA, Eilts BE, Paccamonti DL (2000) Anti-sperm antibodies and seminal characteristics after testicular biopsy or epididimal aspiration in dogs. Theriogenology 53: 1355-1363.
- Azevedo MHF, Paula TAR, Matta SLP, Fonseca CC (2005) Morfometria testicular e o túbulo seminífero da onça pintada (*Panthera onca*). Revista CERES (no prelo).

- Berndtson WE (1977) Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *J Anim Sci* 44: 818-883.
- Bittencourt VL, Paula TAR, Matta, SLP, Fonseca CC, Neves MTD, Costa MEL, Malta MC, Coelho CM, Bastos JAB (2004) Avaliação da população celular do epitélio seminífero e índices indicativos da população espermática, através de biópsia testicular em lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*, Higer, 1811) adulto. *Rev Bras Rep Anim* 28: 108-113.
- Cat Specialist Group (2003) “*Panthera leo*”. 2003 IUCN Red list of Threatened Species. Disponível em: <http://www.redlist.org/search/details.php?species=15951>. Acesso em: 12 de fevereiro de 2005.
- CITES, Convention on International Trade in Endangered Species. 2005. Disponível em: [http://www.ukcites.gov.uk/intro/cites\\_species.htm](http://www.ukcites.gov.uk/intro/cites_species.htm). Acesso em: 29 outubro 2005.
- Costa DS, Paula TAR (2003) Coleta e avaliação do sêmen de catetos (*Tayassu tajacu*). *Scientia* 4: 44-53.
- Estes R (1993) *The Safari Companion: A Guide to Watching African Mammals*. Vermont, Chelsea Green Publishing Company. pp. 89-103.
- Fawcett DW, Neaves WB, Flores MN (1973) Comparative observations on intertubular lymphatic and organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biol Reprod* 9: 500-532.
- França LR, Cardoso FM (1998) Duration of spermatogenesis and sperm transit time through the epididymis in the piau boar. *Tissue Cell* 30: 573-582.

- França LR, Russell LD (1998) The testis of domestic mammals. In: Regadera J, Martinez-Garcia F (Eds.) Male reproduction: a multidisciplinary overview. Madrid, Churchill Livingstone. pp. 197-219.
- França LR, Godinho CC (2003) Testis morphometry seminiferous epithelium cycle length and daily sperm production in domestic cats. Biol Reprod 68: 1554-1561.
- Godinho HP, Cardoso FM (1979) Desenvolvimento sexual de porcos Yorkshire. II. Estabelecimento e evolução da espermatogênese. Arq Esc Vet UFMG 31: 351-361.
- Godinho CL. 1999. Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*) sexualmente maduros. Tese de Mestrado. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais. 123p.
- Guião Leite FL, Paula TAR (2003) Rendimento intrínseco da espermatogênese, o índice de células de Sertoli e a produção espermática diária da onça-parda (*Puma concolor*). Rev Bras Reprod Anim 27: 21-26.
- Guião Leite FL, Paula TAR, Matta SLP, Fonseca CC, Neves MTD, Barros JBG (2006) Cycle and duration of the seminiferous epithelium in puma (*Puma concolor*). Anim Reprod Sci 90: 307-316.
- Hemker TP, Lindzey FG, Ackerman BB (1992) Population Characteristics and Movement Patterns of Cougars in Southern Utah. Journal of Wildlife Management 48: 1275-1284.
- IUCN, The World Conservation Union, "*Panthera leo*". 2004. Disponível em: <http://lynx.uio.no/catfolk/lion>. Acesso em: 12 fevereiro 2005.
- Johnson L, Petty CS, Neves WB (1981) A new approach to qualification of spermatogenesis and its application to germinal cell attrition during human spermatogenesis. Biol Reprod 25: 217-226.

- Johnson L, Varner DD, Roberts ME, Smith TL, Keillor GE, Scrutchfield WL (2000) Efficiency of spermatogenesis: A comparative approach. *Anim Reprod Sci* 60: 171-180.
- Kenagy GJ, Trombulak SC (1986) Size And Function Of Mammalian Testes In relation to body size. *J Mamm* 67: 1-22.
- Lopate C, Threlfall WR, Rosol TJ (1989) Histopatologic and gross effects of testicular biopsy in the dog. *Theriogenology* 32: 585-602.
- Mascarenhas RM, Paula TAR, Carretta Júnior M, Ribeiro ECS, Borboleta LR, Matta SLP (2005) Efeitos da biópsia incisional testicular sobre o rendimento intrínseco da espermatogênese e índices de células de sertoli em cães. *Revista CERES* (no prelo).
- Moreira JR. 1995. The reproduction, demography and management of capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) on Marajó Island- Brazil. Oxford, England: University of Oxford. Thesis.
- Muñoz EM, Fogal T, Dominguez S, Scardapane L, Guzman J, Cavicchia JC, Piezzi RS (1998) Stages of the cycle of the seminiferous epithelium of the viscacha (*Lagostomus maximul maximus*). *Anat Rec* 252: 8-16.
- Munson L, Brown JL, Bush M, Packer C, Janssen D, Reiziss SM, Wildt DE (1996) Genetic diversity affects testicular morphology in free-ranging lions (*Panthera leo*) of the Serengeti Plains and Ngorongoro Crater. *J Reprod Fert* 108:11-15.
- Olar TT, Amann RP, Pickett BW (1983) Relationships among testicular size, daily production and output of spermatozoa and extragonadal spermatozoa reserves of the dog. *Biol Reprod* 29: 1114 - 1120.

- Paula, TAR, Cardoso, FM (1994) Alterações etárias na espermatogênese do cão.I. Análise histométrica. Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia 46: 19-30.
- Paula TAR. 1999. Avaliação Histológica e Funcional do Testículo de Capivaras Adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Tese de Doutorado. Belo Horizonte, Universidade Federal de Minas Gerais. 84p.
- Paula TAR, França LR, Garcia HC (1999) Seminiferous epithelium cycle and its duration in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Tissue & Cell 31: 327-334.
- Roosen-Runge EC (1977) The process of spermatogenesis in animals. Cambridge, University Press. pp. 32-78.
- Russell LD, Ettlín RA, Sinha-Hikim EP, Clegg ED (1990a) Histological and histopathological evaluation of the testis. New York, Cache River Press. pp. 196-254.
- Russell LD, Ren HP, Sinha-Hikin I, Schulze W, Sinha-Hikin AP (1990b) A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell. Am J Anat 188: 21-30.
- Russell LD, Chandrashekar V, Bartke A, Sinha-Hikim AP (1994) The hamster Sertoli cell in early testicular regression and early recrudescence: a stereological and endocrine study. Int J Androl 17: 93-106.
- Saeg, 2001. Sistema para análise estatística e genética. Viçosa: Editora UFV.
- Short RV (1997) The testis: the witness of the mating system, the site of mutation and the engine of desire. Acta Paediatr Suppl 422: 3-7.
- Sinha-Hikim AP, Sinha-Hikim IS, Amador AG, Bartke A, Woolf A, Russell LD (1991) Reinitiation of spermatogenesis by exogenous gonadotropins in a seasonal

- breeder, the woodchuck (*Marmota monax*), during gonadal inactivity. *Am. J Anat* 192: 194-213.
- Threlfall WR, Lopate C (1993) Testicular biopsy. In: Mc Kinnon AO, Voss JL. (Eds.) *Equine Reproduction*. Lea & Febiger: Philadelphia, London. pp. 943-949.
- Urban M, West P (2002) "Lion Research Center". Disponível em: <http://animaldiversity.ummz.umich.edu/local/redirect.php/http://www.lionresearch.org/>. Acesso em: 15 de abril de 2005.
- Wildt ED, Bush M, Goodrowe KL, Packer C, Pusey AE, Brown JL, Joslin P, O'Brien SJ (1987) Reproductive and genetic consequences of founding isolated lion populations. *Nature* 329: 328-331.
- Wing TY, Christensen AK (1982) Morphometric studies on rat seminiferous tubule. *Am J Anat* 165: 13-25.
- Woolley P (1975) The seminiferous tubules in dasyurid marsupials. *J Reprod Fert* 45: 255-261.

Tabela 1. Peso corporal (PC), peso do testículo direito (PTD), peso do testículo esquerdo (PTE), peso de ambos testículos (PAT), volume total do parênquima testicular (VTPT) e índice gonadosomático (IGS) de leões africanos adultos, mantidos em cativeiro

Animal	PC (g)	PTD (g)	PTE (g)	PAT (g)	VTPT (ml)	IGS (%)
1	188700	11,03	8,96	19,99	16,39	0,010
2	220000	27,63	20,78	48,41	39,69	0,022
3	150000	8,48	5,93	14,41	21,77	0,010
4	180000	14,45	13,50	27,95	22,92	0,016
5	180000	11,56	15,96	27,52	22,57	0,015
Média ± d.p.	183740 ± 25028,7	14,6 ± 7,6	13,0 ± 5,8	27,6 ± 12,9	24,6 ± 8,8	0,015 ± 0,005
CV (%)	13,6	51,9	44,6	46,6	35,6	33,3

Tabela 2. Proporção volumétrica de túbulo seminífero (PVTS) e espaço intertubular (PVEIT), volume total de túbulo seminífero (VTTS) e índice tubulossomático de leões africanos adultos, mantidos em cativeiro

Animal	PVTS (%)	PVEIT (%)	VTTS (ml)	ITS (%)
1	74,3	25,7	12,2	0,006
2	72,4	27,6	28,7	0,013
3	79,9	20,1	9,4	0,006
4	75,9	24,1	17,4	0,010
5	75,6	24,4	17,1	0,009
Média ± d.p.	75,6 ± 2,7	24,3 ± 2,7	16,9 ± 7,4	0,009 ± 0,003
CV (%)	3,5	11,1	43,8	33,33

Tabela 3. Diâmetro do túbulo seminífero (DTS), espessura do epitélio seminífero (EES), comprimento do túbulo seminífero por grama de testículo (CTS/gT) e comprimento total do túbulo seminífero por testículo (CTTS/T) de leões africanos adultos, mantidos em cativeiro

Animal	DTS ( $\mu\text{m}$ )	EES ( $\mu\text{m}$ )	CTS/gT (m/g)	CTTS/T (m)
1	253,25	94,56	12,10	108,37
2	248,25	93,19	12,26	254,78
3	255,12	85,44	12,81	76,09
4	257,75	96,31	11,92	161,08
5	249,25	96,75	12,70	202,84
Média $\pm$ d.p.	252,72 $\pm$ 3,9	93,25 $\pm$ 4,6	12,36 $\pm$ 0,38	160,63 $\pm$ 71,63
CV (%)	1,54	4,93	3,08	44,60

### **População do epitélio seminífero, índices indicativos do rendimento da espermatogênese e a reserva espermática testicular em leões africanos (*Panthera leo*, Linnaeus, 1758) adultos, mantidos em cativeiro**

#### **Resumo**

O rendimento intrínseco da espermatogênese e os índices de capacidade suporte das células de Sertoli são, efetivamente, os melhores indicadores da capacidade de produção espermática em uma dada espécie. Extensiva perda celular é observada durante o processo espermatogênico e apenas de 15 a 50% dos espermatozoides teoricamente esperados são produzidos, nos mamíferos até hoje investigados. A quantificação da reserva espermática testicular é um parâmetro bastante útil em experimentações envolvendo a produção espermática, visto que, o tempo requerido para produção dos espermatozoides é constante para membros da mesma espécie. No epitélio seminífero de leões africanos 10,3 espermatócitos primários em pré-leptóteno são produzidos por espermatogônias do tipo A. Durante as divisões meióticas apenas 2,7 espermátides foram produzidas a partir de espermatócitos primários. O rendimento geral da espermatogênese de leões africanos foi de aproximadamente 22,1 células, e cada célula de Sertoli foi capaz de sustentar e manter aproximadamente 14,9 células da linhagem germinativa, das quais 7,9 são espermátides arredondadas. A cada ciclo do epitélio seminífero, 103 milhões de espermatozoides são produzidos por grama de testículo.

*Palavras chave:* Rendimento intrínseco da espermatogênese, reserva espermática testicular, *Panthera leo*

#### **Summary**

The intrinsic spermatogenesis production and the supporting indexes of the Sertoli cells are really the best indicators for the spermatogenic production capacity in a species. An extensive cellular loss is observed during the spermatogenesis process and only from 15 to 50% of the theoretically expected spermatozooids are produced in the mammals under investigation until now. The quantification of the testis spermatogenic reserve is an useful parameter in experimentation involving the spermatogenic production, since the time required for the production of spermatozooids is constant in members of

the same species. In the seminiferous epithelium of the African lions, 10.3 primary spermatocytes at pre-leptotene phase are produced by the type-A spermatogonia. During meiotic divisions, only 2.7 spermatids were produced from the primary spermatocytes. The general spermatogenesis production in the African lions was approximately 22.1 cells, and each Sertoli cell was able to sustain and maintain approximately 14.9 cells of the germinative line, from which 7.9 are round spermatids. A total of 103 spermatozooids are produced by each testis gram at each cycle of the seminiferous epithelium.

*Keywords:* Intrinsic spermatogenesis production, testis spermatic reserve, *Panthera leo*

## **1. Introdução**

O leão (*Panthera leo*) é o segundo maior felino do mundo, sendo menor apenas que o tigre (*Panthera tigris*), atingindo até 230 kg. Esses grandes felinos vivem em bandos de 5 a 30 indivíduos, sendo os únicos felinos de hábitos gregários. Em um bando há divisão de tarefas: as fêmeas são encarregadas da caça e do cuidado dos filhotes, enquanto o macho é responsável pela defesa do território (Wikipedia, 2005). Leões africanos vivem em planícies ou savanas, onde constituem o segundo maior grupo predador depois das hienas manchadas (*Crocuta crocuta*). Podem ainda viver em áreas arborizadas, montanhosas e em habitats semi-desérticos (Estes, 1993). Esse felino possui pelame curto e cauda longa com um topete preto ao final. São sexualmente dimórficos, visto que somente os machos possuem jубas, além de maior altura e maior peso que as fêmeas (Estes, 1993; Alden et al., 1998).

Os leões ainda podem ser encontrados por todo o continente africano, mas populações significativas só existem em parques nacionais na Tanzânia e África do Sul (Alden et al., 1998; Cat Specialist Group, 2003; Wikipedia, 2005). Segundo os critérios adotados pela IUCN (The World Conservation Union), o leão encontra-se na categoria de espécie vulnerável, uma vez que houve redução de 30 a 50% em sua população selvagem nas últimas três gerações (IUCN Red List, 2004). Devido a perda de habitat e conseqüente redução dos territórios naturais, grupos familiares vem sendo isolados em áreas fragmentadas o que vem diminuindo a substituição natural dos machos dominantes gerando considerável redução na variabilidade genética (Wildt et al., 1987; Trivedi, 2002).

A perda da variabilidade genética, em populações de felinos selvagens, vem sendo associada ao aumento na incidência de espermatozóides estruturalmente anormais, tanto em populações de vida livre como em cativeiro (Wildt et al, 1987). Munson et al. (1996), trabalhando com duas populações distintas de leões em vida livre, observaram por meio da histologia testicular em fragmentos obtidos por biópsia incisional, que animais com reduzida variabilidade genética apresentaram diminuição na população de espermátides por secção transversal de túbulos seminíferos. Experimentos vêm sendo conduzidos em parques nacionais africanos visando introduzir, através de inseminação artificial, novos genótipos em populações de vida livre (Trivedi, 2002).

O procedimento de biópsia testicular vem sendo amplamente utilizado em estudos da fisiologia e patologia reprodutivas, em animais domésticos e selvagens, por ser um método conservativo da capacidade reprodutiva dos animais, não apresentando efeitos deletérios na produção espermática a longo prazo e fornecendo material suficiente para análise histológica (Lopate et al., 1989; Threlfall e Lopate, 1993; Munson et al., 1996; Attia et al., 2000; Bittencourt et al., 2004; Azevedo et al., 2004; Mascarenhas et al., 2005 Guião Leite et al., 2006).

Apesar do tamanho testicular apresentar relacionamento direto com a produção espermática (Amann, 1970; Olar et al., 1983; França e Russell, 1998), o rendimento intrínseco da espermatogênese e os índices de capacidade suporte da célula de Sertoli são, efetivamente, os melhores indicadores da capacidade de produção espermática em uma dada espécie (Berndtson et al., 1983; Russell e Peterson, 1984; Sinha-Hikim et al., 1988; Queiroz e Cardoso, 1989; França e Russell, 1998; França & Godinho, 2003). Extensiva perda celular é observada durante o processo espermatogênico sendo que, apenas 25 a 35 % do número teórico de espermátócitos são produzidos durante a fase espermatogonial (França e Russell, 1998; Santos, 1999). Embora na fase espermiogênica as perdas celulares sejam consideradas pequenas e não significativas (Amann, 1970; Berndtson, 1977; Russell e Peterson, 1984; Johnson et al., 2000), durante a fase meiótica, nas diferentes espécies animais estudadas, perdas entre 20 e 48% são observadas (Godinho e Cardoso, 1979; Jones e Berndtson, 1986; Bilaspuri e Guraya, 1984; Paula et al., 1999; Bittencourt, 2003). Em todos os mamíferos pesquisados, somente cerca de 15 a 50% dos espermatozóides teoricamente esperados são produzidos (Huckins, 1978; Castro et al., 1997; França e Russell, 1998; Swerdloff et al., 1998). Em suma, as

perdas celulares retratam um componente integrante do processo espermatogênico, apresentando variação espécie-específica.

A célula de Sertoli é a principal responsável pela regulação do processo espermatogênico por propiciar o micro ambiente adequado para o seu pleno funcionamento (Russell e Griswold, 1993). O número de células germinativas suportado por uma única célula de Sertoli fornece o melhor indicativo da sua eficiência funcional, refletindo diretamente a produção espermática por unidade de área do túbulo seminífero (Weber et al., 1983; Russell e Peterson, 1984; Sinha-Hikim et al., 1988).

A reserva espermática testicular quantifica o número potencial de espermatozoides em produção no testículo, ou por grama de testículo, a cada ciclo do epitélio seminífero de uma dada espécie (Amann e Lambiase, 1969; Berndtson, 1977), constituindo um parâmetro útil em experimentações envolvendo a produção espermática, visto que o tempo requerido para produção dos espermatozoides é constante para membros da mesma espécie (Berndtson, 1977).

Estudos quantitativos das relações populacionais do epitélio seminífero e do índice de células de Sertoli em animais selvagens, podem ser valiosos para o estabelecimento de padrões fisiológicos com os quais pode-se estabelecer protocolos em reprodução assistida. Assim sendo, o objetivo deste estudo foi quantificar o rendimento intrínseco do processo espermatogênico, bem como o índice de células de Sertoli e reserva espermática testicular, através da avaliação histológica de fragmentos obtidos por biópsia testicular, de leões africanos adultos mantidos em cativeiro.

## **2. Material e métodos**

Foram utilizados fragmentos testiculares de cinco leões africanos adultos, provenientes de parques zoológicos nos estados de São Paulo e Minas Gerais. Estes animais foram contidos e mantidos em anestesia geral utilizando-se a associação tiletamina/zolazepan na dose de 10 mg/Kg. Ambos os testículos foram mensurados quanto à largura, espessura e comprimento, com paquímetro digital e a determinação do volume testicular foi realizada utilizando-se a fórmula  $\frac{4}{3}\pi ABC$ , onde A= metade da largura, B= metade da espessura e C metade do comprimento (Moreira, 1995). Como as mensurações foram realizadas percutaneamente, a espessura da pele escrotal foi também mensurada e descontada das dimensões testiculares. O volume

testicular foi diretamente convertido em gramas, visto que a densidade volumétrica do testículo de mamíferos é muito próxima de 1 (Johnson et al., 1981; Paula, 1999). A albugínea e o mediastino testiculares foram estimados em 18% da massa testicular (Godinho, 1999; Bittencourt et al., 2004; Mascarenhas et al., 2005; Azevedo et al., 2005; Guião Leite et al., 2006). Assim, para o cálculo do peso do parênquima testicular este valor foi descontado do volume total dos testículos.

Após tricotomia e anti-sepsia local, a pele do escroto foi incisada e, com o uso de um bisturi circular de 4 mm de diâmetro, foi obtido um fragmento da região média do testículo direito ou esquerdo. Este fragmento foi imediatamente fixado em solução de aldeído glutárico (Merck®) 4% em tampão fosfato 0,1mol L<sup>-1</sup> pH 7,4 à temperatura ambiente, por no mínimo duas horas, sendo posteriormente armazenado sob refrigeração no mesmo tampão. A lesão foi suturada em planos distintos com fio sintético absorvível, sendo na pele utilizada sutura intradérmica com extremidades embutidas. Cada animal recebeu agentes antibióticos e antiflogísticos como terapia preventiva e foi clinicamente acompanhado até o seu pleno restabelecimento.

Os procedimentos adotados na metodologia deste estudo, no que se refere ao bem estar dos animais envolvidos, estão de acordo com Processo N° 27/2005, aprovado pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa em 01/04/2005.

Para estudos em microscopia de luz, os fragmentos foram desidratados em séries de concentrações crescentes de álcoois (70°, 80°, 90° e 100° GL) e incluídos em resina plástica à base de glicol metacrilato. Foram obtidos tantos cortes histológicos quanto possível, de modo seqüencial, por meio de micrótomo rotativo dotado de navalha de vidro, com quatro µm de espessura, os quais foram corados com solução de azul de toluidina / borato de sódio 1%.

Em dez secções transversais de túbulos seminíferos no estágio um do ciclo do epitélio seminífero, segundo o método da morfologia tubular (Berndtson, 1977), foram quantificadas as populações de: espermatogônias do tipo A (SPTG A), espermatócitos primários em pré-leptóteno (PL), espermatócitos primários em paquíteno (PQ), espermatídes arredondas (AR) e células de Sertoli (S). Devido a variações no tamanho dos vários tipos de células, as populações celulares obtidas foram corrigidas numericamente. Para tal considerou-se a espessura do corte e o diâmetro nuclear ou nucleolar (no caso das células de Sertoli) utilizando-se para isto, a fórmula de Abercrombie (1946), modificada por Amann (1970). A partir destas

populações determinou-se: o coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais (PQ/SPTG A); o rendimento meiótico da espermatogênese (AR/PQ); o rendimento geral da espermatogênese (AR/SPTG A); o índice de células de Sertoli por total de células espermatogênicas ((SPTG A + PL + PQ + AR)/ S ); o índice de célula de Sertoli por espermatíde arredondada (AR/S).

Assumindo-se que a perda na espermiogênese não é significativa (Johnson et al., 2000), a reserva espermática do testículo (RET) foi calculada com base na população de espermatídes arredondadas, adaptando-se a fórmula descrita por Amann (1970) e Berndtson (1977), na qual  $RET = (AR \times \% \text{ túbulo seminífero} \times \text{volume total do parênquima testicular}) / (\text{área da secção transversal do túbulo seminífero} \times \text{espessura do corte} \times 100)$ . Para o cálculo da área da secção transversal do túbulo utilizou-se a fórmula  $\pi r^2$  onde r representa o raio do túbulo obtido a partir da mensuração do diâmetro médio dos túbulos, calculado por meio de ocular micrométrica em 20 secções transversais de túbulos seminíferos, os mais circulares possíveis, em cada animal. O volume do túbulo seminífero no parênquima testicular foi determinado com auxílio de ocular integradora dotada de 100 pontos em aumento de 400 vezes. Para isto foi feita a contagem dos túbulos seminíferos correspondentes aos pontos em dez campos, aleatoriamente distribuídos para cada animal.

Os dados foram analisados estatisticamente quanto a média, desvio padrão e, em alguns casos, quanto ao coeficiente de variação, utilizando-se para isto o programa SAEG (Sistema para Análise Estatística e Genética, 2001).

### **3. Resultados**

Em cada secção transversal do túbulo seminífero de leões africanos no estágio I, foram observadas em média 1,51 espermatogônias do tipo A, 15,6 espermatócitos primários em pré-leptóteno, 12,4 espermatócitos primários em paquíteno, 33,5 espermatídes arredondadas e 4,3 células de Sertoli (Tabela 1). Através de inferências nestas populações, foi observado que, em média, 10,3 espermatócitos primários em pré-leptóteno são produzidos por espermatogônias do tipo A. Durante a prófase meiótica, foi observada perda de 20,5 % visto a redução populacional dos espermatócitos em paquíteno em relação à população de espermatócitos primários em pré-leptóteno. Apenas 2,7 espermatídes foram computadas em relação ao número de espermatócitos primários em paquíteno, gerando perda média de 33 % no rendimento meiótico. O rendimento geral da espermatogênese foi de 22,1 células,

significando que 22,1 espermatídes arredondadas foram produzidas a partir de cada espermatogônia A (Tabela 2).

Cada célula de Sertoli foi capaz de sustentar e manter 14,9 células da linhagem germinativa, das quais 7,9 eram espermatídes arredondadas. Leões africanos apresentaram reserva espermática média de  $1.341,66 \times 10^6$  espermatídes arredondadas em ambos os testículos, a cada ciclo do epitélio seminífero, o que correspondeu à média de  $103,8 \times 10^6$  células por grama de testículo (Tabela 3).

#### **4. Discussão**

Em estudos relativos à fisiologia testicular, os volumes da albugínea e do mediastino são desconsiderados da massa gonadal para a confecção do cálculo do parênquima testicular, uma vez que não participam diretamente da função espermátogênica ou androgênica (Johnson et al., 1981). Na maioria das espécies domésticas, a proporção volumétrica da albugínea e mediastino testiculares é em torno de 10% (França e Russell, 1998). No entanto, dados em carnívoros demonstraram serem estas estruturas mais abundantes. Assim sendo, Godinho (1999) observou no gato doméstico valores próximos a 18%, Mascarenhas et al. (2005) descrevem valores similares para o cão, assim como Bittencourt et al. (2004) em lobos guarás e Azevedo et al. (2005) em onças pintadas. Desta forma, para a estimativa da massa do parênquima testicular em leões africanos, foram considerados 18% do peso testicular alocados em albugínea e mediastino.

A fase proliferativa da espermatogênese é determinante para o número de espermatócitos primários disponibilizados à prófase meiótica. Durante esta fase, um número variado e espécie específico de gerações de espermatogônias é observado. O rendimento destas mitoses espermatogoniais é variável, observando-se grande perda celular (65 a 75%) (França e Russell, 1998). A capacidade suporte da célula de Sertoli em cada espécie é o fator decisório para a população inicial de espermatócitos primários (Sharpe, 1994). Em leões africanos, cerca de 10,3 espermatócitos primários em pré-leptóteno são produzidos a cada espermatogônia do tipo A, valor este, abaixo da faixa observada para a maioria dos animais domésticos que é de 14,6 a 24,8 (França e Russell, 1998), sendo porém superior ao observado para a onça parda (7,7/ Guião Leite & Paula, 2003), onça pintada (9,2/ Azevedo et al., 2005) e para o gato doméstico (8,4/ Godinho, 1999).

Na fase meiótica da espermatogênese ocorre a recombinação do material genético, que é dividido em cada célula durante as duas divisões meióticas. Caracteristicamente observa-se uma longa prófase meiótica, seguida por duas rápidas divisões, resultando na produção de quatro espermátides haplóides (Russell et al., 1990). Nenhuma perda significativa é observada durante a prófase meiótica nos mamíferos domésticos (França e Russell, 1998), mas, em leões africanos foi observada perda de aproximadamente 20,5% entre as populações de espermátocitos primários em pré-leptóteno e em paquíteno. Normalmente, é durante as duas divisões meióticas que ocorrem numericamente as maiores perdas celulares na maioria dos mamíferos (Roosen-Runge, 1973, França e Russell, 1998; França et al., 1999). A maior parte dos pesquisadores cita que as apoptoses que ocorrem na meiose fazem parte do mecanismo de eliminação de células com cromossomos anormais (Roosen-Runge, 1973; Sharpe, 1994). De forma geral nos mamíferos, esta perda é em torno de 25%, ou seja, de cada quatro espermátides arredondadas esperadas, três são formadas (França e Russell, 1998). Em leões africanos 2,7 espermátides são produzidas no processo meiótico, computando assim uma perda aproximada de 33% no número teoricamente esperado, próxima à observada no gato doméstico (30%, Godinho, 1999) e superior à onça parda (25%, Guião Leite & Paula, 2003) e à onça pintada (20%, Azevedo et al., 2005).

O rendimento geral da espermatogênese é a mensuração da eficiência do processo espermatogênico como um todo, sua confiabilidade, como índice de avaliação da produção de espermatozóides, é embasada no fato de que as perdas durante o processo espermiogênico são consideradas pequenas e não significativas (Amann, 1970; Berndtson, 1977; Russell e Peterson, 1984; Johnson et al., 2000). Nos leões africanos adultos estudados, cerca de 22 espermátides são produzidas durante o processo espermatogênico, rendimento este, muito próximo ao observado na onça parda (22,7/ Guião Leite et al., 2006) e onça pintada (23,4/ Azevedo et al., 2005), estando acima do observado para o gato doméstico (16,3/ Godinho, 1999), porém muito abaixo em relação à maioria dos animais domésticos (37,4 a 74,2/ França e Russell, 1998).

As interações entre a célula de Sertoli e as células germinativas são de fundamental importância para a manutenção da produção espermática normal (Griswold, 1995). A célula de Sertoli desempenha funções primordiais na morfofisiologia da espermatogênese, desde a sustentação física das células

germinativas, até a produção de inúmeros fatores parácrinos/autócrinos que cadenciam a produção espermiática. Desta forma, o número de células de Sertoli por testículo é o principal fator na determinação da produção espermiática e no tamanho do testículo (França et al., 1995). A célula de Sertoli possui capacidade de suporte de células germinativas relativamente fixa em cada espécie e, como a sua população não aumenta após a puberdade e ao longo dos diferentes estádios do ciclo do epitélio seminífero, serve como parâmetro para se quantificar e avaliar funcionalmente o processo espermatogênico de uma dada espécie (Steinberger e Steinberger, 1971; Orth, 1982; Russell e Peterson, 1984; Orth et al., 1988; França e Russell, 1998; França et al., 1999).

Em leões africanos, cada célula de Sertoli suporta, em média, 14,9 células espermatogênicas, valor este acima dos observados para onça parda (12,5/ Guião Leite & Paula, 2003) e gato doméstico (9,8/ Godinho, 1999), mas inferior àquele descrito para a onça pintada (19,2/ Azevedo et al., 2005). Quanto à capacidade das células de Sertoli em suportar especificamente espermatídes arredondadas, o leão africano adulto é capaz de manter cerca de 7,9 células, valor próximo à média descrita para as espécies domésticas (França e Russell, 1998), sendo superior ao descrito para a onça parda (7,3/ Guião Leite & Paula, 2003) e principalmente para o gato doméstico (5,1/ Godinho, 1999), mas inferior ao registrado em onças pintadas (11/ Azevedo et al., 2005). Em todos os mamíferos investigados, somente 15 a 50% dos espermatozoides teoricamente esperados são produzidos (Huckins, 1978; Castro et al., 1997; França & Russell, 1998; Swerdloff et al., 1998). Isto provavelmente é decorrente da degeneração densidade-dependente, na qual apoptose é o mecanismo homeostático utilizado para limitar as células germinativas em um número que possa ser suportado pelas células de Sertoli disponíveis, sendo as perdas celulares um componente integrante do processo espermatogênico (Huckins, 1978; De Rooij e Janssen, 1987; De Rooij e Lok, 1987; Sharpe, 1994; De Rooij, 1998; Santos, 1999).

A reserva espermiática testicular quantifica o número potencial de espermatozoides em produção no testículo ou por grama de testículo, a cada ciclo do epitélio seminífero de uma dada espécie (Amann e Lambiase, 1969; Berndtson, 1977). Em leões africanos adultos de cativeiro, observou-se expressiva variação quanto à reserva espermiática total ( $cv = 43,1$ ) (Tabela 3), refletindo a amplitude também observada para o volume total dos testículos e respectivos parênquimas testiculares. Já a reserva espermiática por grama de testículo, apresentou

comportamento bastante homogêneo entre os animais estudados ( $cv = 5,3$ ) (Tabela 3). O valor médio observado neste parâmetro para o leão africano ( $103,8 \times 10^6$ ) é inferior ao encontrado para onça parda ( $268,0 \times 10^6$ / Guião Leite & Paula, 2003), onça pintada ( $165,9 \times 10^6$ / Azevedo et al., 2005) e gato doméstico ( $157 \times 10^6$ / Godinho, 1999) estando porém, abaixo da amplitude observada nos animais domésticos de  $120$  a  $260 \times 10^6$  (França e Russell, 1998). Embora comparações quanto à reserva espermática testicular por grama de testículo sejam extremamente válidas em avaliações interespecíficas, é necessário ter em mente que este parâmetro é relativo à duração de um ciclo do epitélio seminífero, que por sua vez, é uma constante biológica espécie-específica (Ortavant et al., 1977; Amann e Schanbacher, 1983).

## 5. Conclusões

Em leões africanos adultos mantidos em condições de cativeiro e utilizados neste estudo, o rendimento meiótico correspondeu em média a 2,7 células; o rendimento geral da espermatogênese foi de 22,1 células. Cada célula de Sertoli em leões foi capaz manter 14,9 células da linhagem germinativa, das quais 7,9 são espermátides arredondadas. A reserva espermática por grama de testículo, nestes animais, foi em média, de 103 milhões de espermatozóides.

## 6. Referências

- Abercrombie, M., 1946. Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat. Rec.*, 94: 239-247.
- Alden, P., Estes, R., Schlitter, D., McBride, B., 1998. National Audubon Society Field Guide to African Wildlife. Alfred A. Knopf Incorporation, New York.
- Amann, R.P., Almquist, J.O., 1961. Reproductive capacity of dairy bulls. I. Technique for direct measurement of gonadal and extra-gonadal sperm reserves. *J. Dairy Sci.*, 44: 1537-1543.
- Amann, R.P., Lambiase, J.T., 1969. The male rabbit III: Determination of daily sperm production by means of testicular homogenates. *J. Anim. Sci.*, 28: 369-374.
- Amann, R.P., 1970. Sperm production rates. In: Johnson, A.D., Gomes, W.R., Vandemark, N.L. (eds.). *The testis*. Academic Press, New York, pp. 433-482.

- Amann, R.P., Schanbacher, B.D., 1983. Physiology of male reproduction. J. Anim. Sci. Suppl., 57: 380-403.
- Attia, K.A., Zaki, A.A., Eilts, B.E., Paccamonti, D.L., 2000. Anti-sperm antibodies and seminal characteristics after testicular biopsy or epididimal aspiration in dogs. Theriogenology, 53: 1355-1363.
- Azevedo, M.H.F., Paula, T.A.R., Matta, S.L.P., Fonseca, C.C., 2005. Morfometria testicular e o túbulo seminífero da onça pintada (*Panthera onca*). Revista CERES (no prelo).
- Berndtson, W.E., Squires, E.L., Thompson, D.L.Jr., 1983. Spermatogenesis, testicular composition and the concentration of testosterone in the equine testis as influenced by season. Theriogenology, 20: 449-457.
- Berndtson, W.E., 1977. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. J. Anim. Sci., 44: 818-883.
- Bilaspuri, G.S., Gurahya, S.S., 1984. The seminiferous epithelial cycle and spermatogenesis in goats. (*Capra hircus*). J. Agr. Sci., 103: 359-368.
- Bittencourt, V.L., Paula, T.A.R., Matta, S.L.P., Fonseca, C.C., Neves, M.T.D., Costa, M.E.L., Malta, M.C., Coelho, C.M., Bastos, J.A.B., 2004. Avaliação da população celular do epitélio seminífero e índices indicativos da população espermática, através de biópsia testicular em lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1811) adulto. Rev. Bras. Rep. Anim., 28: 108-113.
- Castro, A.C.S., Berndtson, W.E., Cardoso, F.M., 1997. Cinética e quantificação da espermatogênese: bases morfológicas e suas aplicações em estudos da reprodução de mamíferos. Rev. Bras. Reprod. Anim., 21: 25-34.
- Cat Specialist Group, 2003. "*Panthera leo*". 2003 IUCN Red list of Threatened Species. Disponível em: <http://www.redlist.org/search/details.php?species=15951>. Acesso em: 12 fevereiro 2005.
- De Rooij, D.G., Lok, D., 1987. Regulation of the density of spermatogonia in the seminiferous epithelium of the chinese hamster: II. Differentiating spermatogonia. Anat. Rec., 217: 131-136.
- De Rooij, D.G., Janssen, J.M., 1987. Regulation of the density spermatogonia in the seminiferous epithelium of the chinese hamster: I. Undifferentiated spermatogonia. Anat. Rec., 217: 124-130.
- De Rooij, D.G., 1998. Stem cells in the testis. Int. J. Exp. Path., 79: 67-80.

- Estes, R., 1993. The Safari Companion: A Guide to Watching African Mammals. Chelsea Green Publishing Company, Vermont.
- França, L.R., Ye, S.J., Ying, L., Sandberg, M., Russell, L.D., 1995. Morphometry of rat germ cells during spermatogenesis. *Anat. Rec.*, 241: 181-204.
- França, L.R., Russell, L.D., 1998. The testis of domestic animals. In: Regadera, J., Martinez-Garcia, C. (Eds.), Male reproduction: a multidisciplinary overview. Churchill Livingstone, Madrid, pp.197-219.
- França, L.R., Becker-Silva, S.C., Chiarini-Garcia, H., 1999. The length of the cycle of seminiferous epithelium in goats (*Capra hircus*). *Tissue & Cell*, 31: 274-280.
- França, L.R., Godinho, C.C., 2003. Testis morphometry seminiferous epithelium cycle length and daily sperm production in domestic cats. *Biol. Reprod.*, 68: 1554-1561.
- Godinho, H.P., Cardoso, F.M., 1979. Desenvolvimento sexual de porcos Yorkshire. II. Estabelecimento e evolução da espermatogênese. *Arq. Esc. Vet. UFMG.*, 31: 351-361.
- Godinho, C.C., 1999. Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*) sexualmente maduros. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, 123p.
- Griswold, M.D., 1995. Interaction between germ cells and Sertoli cells in the testis. *Biol. Reprod.*, 52: 211-216.
- Guião Leite, F.L., Paula, T.A.R., 2003. Rendimento intrínseco da espermatogênese, o índice de células de Sertoli e a produção espermática diária da onça-parda (*Puma concolor*). *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 27: 21-26.
- Guião Leite, F.L., Paula, T.A.R., Matta, S.L.P., Fonseca, C.C., Neves, M.T.D., Barros, J.B.G., 2006. Cycle and duration of the seminiferous epithelium in puma (*Puma concolor*). *Anim. Reprod. Sci.*, 90: 307-316.
- Huckins, C., 1978. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. *Anat. Rec.*, 190: 905-926.
- IUCN Red List, 2004. IUCN Red list of Threatened Species. Disponível em: [http://www.iucnredlist.org/info/categories\\_criteria2001.html](http://www.iucnredlist.org/info/categories_criteria2001.html). Acesso em: 12 novembro de 2005.

- Johnson, L., Petty, C.S., Neves, W.B., 1981. A new approach to qualification of spermatogenesis and its application to germinal cell attrition during human spermatogenesis. *Biol. Reprod.*, 25: 217-226.
- Johnson, L., Varner, D.D., Roberts, M.E., Smith, T.L., Keillor, G.E., Scrutchfield, W.L., 2000. Efficiency of spermatogenesis: A comparative approach. *Anim. Reprod. Sci.*, 60: 471-480.
- 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.
- Lopate, C., Threlfall, W.R., Rosol, T.J., 1989. Histopatologic and gross effects of testicular biopsy in the dog. *Theriogenology*, 32: 585-602.
- Mascarenhas, R.M., Paula, T.A.R., Carretta Júnior, M., Ribeiro, E.C.S., Borboleta, L.R., Matta, S.L.P., 2005. Efeitos da biópsia incisional testicular sobre o rendimento intrínseco da espermatogênese e índices de células de sertoli em cães. *Revista CERES (no prelo)*.
- Moreira, J.R., 1995. The reproduction, demography and management of capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) on Marajó Island- Brazil. Doctorate Thesis, University of Oxford, England.
- Munson, L., Brown, J.L., Bush, M., Packer, C., Janssen, D., Reiziss, S.M., Wildt, D.E., 1996. Genetic diversity affects testicular morphology in free-ranging lions (*Panthera leo*) of the Serengeti Plains and Ngorongoro Crater. *J. Reprod. Fert.*, 108:11-15.
- Olar, T.T., Amann, R.P., Pickett, B.W., 1983. Relationships among testicular size, daily production and output of spermatozoa and extragonadal spermatozoa reserves of the dog. *Biol. Reprod.*, 29: 1114-1120.
- Ortavant, R., Courot, M., Hochereau-De-Reviere, M.T., 1977. Spermatogenesis in domestic mammals. In: Cole, H.H., Cupps, P.T. (Eds.), *Reproduction in domestic animals*. Academic Press, New York, pp.203-227.
- Orth, J.M., 1982. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. *Anat. Rec.*, 203: 485-492.
- Orth, J.M., Gunsalus, G.L., Lamperti, A.A., 1988. Evidentce from Setoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal desenvolvimento. *Endocrinology*, 122: 787-794.

- Paula, T.A.R., 1999. Avaliação Histológica e Funcional do Testículo de Capivaras Adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, 84p.
- Paula, T.A.R., França, L.R., Garcia, H.C., 1999. Seminiferous epithelium cycle and its duration in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). *Tissue & Cell*, 31: 327-334.
- Queiroz, G.F., Cardoso, F.M., 1989. Histological evaluation of the spermatogenesis yield in adult hairy rams. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 13: 99-108.
- Roosen-Runge, E.C., 1973. Germinal-cell loss in normal metazoan spermatogenesis. *J. Reprod. Fertil.*, 35: 339-348.
- Russell, L.D., Peterson, R.N., 1984. Determination of the alongate spermatid-Sertoli cell ratio in various mammals. *J. Reprod. Fert.*, 70: 635-641.
- Russell, L.D., Griswold, M.D., 1993. The Sertoli cell. Cache River Press, Clearwater, Florida.
- Russell, L.D., Ettlin, R.A., Sinha-Hikim, E.P., Clegg, E.D., 1990. Histological and histopathological evaluation of the testis. Cache River Press, New York.
- Saeg, 2001. Sistema para análise estatística e genética. Viçosa: Editora UFV.
- Santos, R.L., 1999. Morte celular por apoptose no testículo. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 23: 486-499.
- Sharpe, R.M., 1994. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil, E., Neil, J.D. (Eds.), *The physiology of reproduction*. Raven Press, New York, pp.1363-1434.
- Sinha-Hikim, A.P., Bartke, A., Russell, L.D., 1988. Morphometric studies on hamster testes in gonadally active and inactive states: light microscope findings. *Biol. Reprod.*, 39: 1225-1237.
- Steinberger, A., Steinberger, E., 1971. Replication pattern of Sertoli cells in maturing rat testis in vivo and in organ culture. *Biol. Reprod.*, 4: 84-87.
- Swerdloff, R.S., Lue, Y., Wang, C., Rajavashisth, T., Sinha-Hikin, A., 1998. Hormonal regulation of germ cell apoptosis. In: Zirkin, B.R. (ed.), *Germ cell development, division, disruption and death*. Springer-Verlag, New York.
- Threlfall, W.R., Lopate, C., 1993. Testicular biopsy. In: Mc Kinnon, A.O., Voss, J.L. (Eds.), *Equine Reproduction*. Lea & Febiger, Philadelphia, pp. 943-949.
- Trivedi, B.P., 2002. To Boost Gene Pool, Lions Artificially Inseminated. Disponível em:

[http://news.nationalgeographic.com/news/2002/06/0612\\_020612\\_TVlion.html](http://news.nationalgeographic.com/news/2002/06/0612_020612_TVlion.html).

Acesso em: 12 de novembro de 2005.

Weber, J.E., Russell, L.D., Wong, V., Pegterson, R.N., 1983. Three-dimensional reconstruction of a rat stage V Sertoli cell: II. Morphometry of Sertoli-Sertoli and Sertoli- Germ-Cell relationships. *Am. J. Anat.*, 167: 163-179.

Wikipedia, 2005. “*Panthera leo*”. Disponível em: <http://pt.wikipedia.org/wiki/Le%C3o>. Acesso em: 12 de novembro de 2005.

Wildt, E.D., Bush, M., Goodrowe, K.L., Packer, C., Pusey, A.E., Brown, J.L., Joslin, P., O’Brien, S.J., 1987. Reproductive and genetic consequences of founding isolated lion populations. *Nature*, 329: 328-331.

Tabela 1. População celular corrigida, por secção transversal de túbulo no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero de leões africanos adultos mantidos em cativeiro. Espermatogônia do tipo A (SPTA), espermatócito primário em pré-leptóteno (PL), espermatócito primário em paquíteno (PQ), espermatíde arredondada (AR) e célula de Sertoli (S).

Animal	SPTG A	PL	PQ	AR	S
1	1,59	15,03	11,84	34,77	3,81
2	1,43	12,59	10,89	32,27	3,57
3	1,51	13,80	11,36	33,52	3,69
4	1,62	17,82	13,53	32,58	5,54
5	1,43	19,17	14,80	34,72	5,13
Média ± d.p.	1,51 ± 0,09	15,68 ± 2,75	12,48 ± 1,63	33,57 ± 1,16	4,35 ± 0,91
CV (%)	5,96	17,54	13,06	3,45	20,92

Tabela 2. Rendimento intrínseco da espermatogênese e índice de células de Sertoli de leões africanos adultos mantidos em cativeiro. Coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais (CEME), rendimento meiótico (RM), rendimento geral da espermatogênese (RGE), índice de célula de Sertoli por total de células espermatogênicas (ICS/Total) e índice de célula de Sertoli por espermátides arredondadas (ICS/AR)

Animal	CEME	RM	RGE	ICS/ Total	ICS/ AR
1	9,42	2,93	21,85	16,56	9,11
2	8,77	2,96	22,48	16,02	9,04
3	9,09	2,94	22,16	16,29	9,07
4	10,94	2,40	20,02	11,82	5,87
5	13,40	2,34	24,27	13,65	6,76
Média ± d.p.	10,32 ± 1,91	2,71 ± 0,31	22,16 ± 1,52	14,86 ± 2,06	7,97 ± 1,54
CV (%)	18,50	11,44	6,86	13,86	19,32

Tabela 3. Área da secção transversal do túbulo seminífero (ASTTS), proporção volumétrica do túbulo seminífero (PVTS), volume total de ambos os testículos (VTAT), volume do parênquima testicular (VPT), reserva espermática testicular total por ciclo do epitélio seminífero (RETT) e reserva espermática testicular por ciclo do epitélio seminífero por grama de testículo (RET/g) em leões africanos adultos mantidos em cativeiro

Animal	ASTTS (cm <sup>2</sup> ) (x10 <sup>-4</sup> )	PVTS (%)	VTAT (g)	VPT (ml)	RETT (AR) (10 <sup>6</sup> )	RET/g (AR/g) (10 <sup>6</sup> )
1	2,53	74,3	19,99	16,38	942,15	105,15
2	2,48	72,4	48,41	39,68	2055,56	98,95
3	2,55	79,9	14,41	21,77	637,63	107,45
4	2,57	75,9	27,95	22,92	1312,3	97,17
5	2,49	75,6	27,52	22,57	1760,7	110,28
Média ± d.p.	2,52 ± 0,03	75,62 ± 2,76	27,66 ± 12,90	24,66 ± 8,80	1341,66 ± 579,08	103,80 ± 5,5
CV (%)	1,19	3,65	46,60	35,68	43,10	5,30

**Organização e quantificação dos elementos do espaço intertubular do testículo de leões africanos (*Panthera leo*, Linnaeus, 1758) adultos, mantidos em cativeiro**

**RESUMO**

*As células de Leydig, representando a porção endócrina produtora de testosterona do testículo dos mamíferos, juntamente com células do tecido conjuntivo, os leucócitos, os vasos sanguíneos e linfáticos, formam o espaço intertubular ou tecido intersticial testicular. O arranjo e abundância destes componentes formam mecanismos que mantêm o nível de testosterona, principal produto das células de Leydig, maior no fluido intersticial que nos vasos sanguíneos testiculares e sangue periférico. A testosterona é importante nos aspectos comportamentais da reprodução, sendo que dentre as espécies felinas, o leão apresenta marcante comportamento social frente ao processo reprodutivo. Diferenças marcantes são observadas entre as espécies animais no que diz respeito à abundância de células de Leydig, tecido conjuntivo frouxo, localização dos vasos intersticiais e suas relações topográficas com os túbulos seminíferos. No leão africano cerca de 16% do parênquima testicular é ocupado por células de Leydig, 7,1% por tecido conjuntivo e 0,7 % por vasos sanguíneos. O volume médio das células de Leydig e o seu diâmetro nuclear médio, encontrados no leão africano foram, respectivamente, 2.578  $\mu\text{m}^3$  e 7,1  $\mu\text{m}$ . As células de Leydig ocupam em média 0,0019% do peso corporal e seu número médio por grama de testículo apresentou-se superior ao encontrado para a maioria dos mamíferos, ultrapassando os 50 milhões.*

**Palavras chaves:** células de Leydig, intertúbulo, leão africano, *Panthera leo*

**SUMMARY**

*The Leydig cells representing the endocrine portion that produces the testosterone of the mammals' testis, together with cells of the conjunctive tissue – the leukocytes, the blood and lymphatic vessels - form the intertubular space or interstitial testis tissue. Both the arrangement and abundance of these components form mechanisms maintaining a higher level of testosterone, that is the main product of the Leydig cells, in the interstitial fluid than in the testis blood vessels and peripheral blood. Testosterone is an important hormone in the behavioral reproduction aspects; however, among the feline species, the lion presents an outstanding social behavior in the reproductive process. Remarkable differences are observed among animal species, relative to the abundance of Leydig cells, feeble conjunctive tissue, location of the interstitial vases and their topographical relationships with the seminiferous tubules. In the African lion, approximately 16% of the testis parenchyma is occupied by Leydig cells, 7.1% by conjunctive tissue, and 0.7% by blood vessels. The average volume of the Leydig cells and their average nucleus diameter in the African lion were 2.578  $\mu\text{m}^3$  and 7.1  $\mu\text{m}$ , respectively. The Leydig cells occupy about 0.0019% of the body weight, and their average number by each testis gram was superior to that found for most mammals, as surpassing 50 million.*

**Keywords:** Leydig cells, intertubule, African lion, *Panthera leo*

**1. INTRODUÇÃO**

O leão (*Panthera leo*) é o segundo maior felino do mundo, podendo atingir até 230 kg, sendo menor apenas que o tigre (*Panthera tigris*). Diferente da maioria dos gatos, o leão

possui hábitos gregários formando grupos de até 30 animais. As fêmeas são encarregadas da alimentação e cuidados da prole, enquanto um ou dois machos dominantes se responsabilizam pela proteção do grupo. Esse felino possui pelame curto e cauda longa com um topete preto ao final. São sexualmente dimórficos, visto que somente os machos possuem jubas, além de maior altura e maior peso que as fêmeas (Estes, 1993; Alden *et al.*, 1998).

Os leões africanos foram exterminados em alguns países, permanecendo hoje nesse continente somente em parques nacionais (Alden *et al.*, 1998; Cat Specialist Group, 2003). Segundo taxonomistas, existem pelo menos cinco subespécies diferentes de leões africanos, sendo cada uma delas identificada pela região geográfica em que ocorre, fato este muito contestado (Urban & West, 2002). Leões africanos vivem em planícies ou savanas, onde constituem o segundo maior grupo predador depois das hienas manchadas (*Crocuta crocuta*). Podem ainda viver em áreas arborizadas, montanhosas e em habitats semi-desérticos, necessitando de uma área de 20 a 400 km<sup>2</sup> para caça (Estes, 1993). Segundo a lista vermelha, editada pela IUCN (The World Conservation Union), o leão apresenta-se na categoria de espécie vulnerável, estando algumas subespécies praticamente extintas (IUCN Red List, 2004). Das mais de 4809 espécies mamíferas não domésticas conhecidas atualmente (Nowak, 1999), pouco se conhece sobre os aspectos básicos de sua biologia reprodutiva, incluindo função e características testiculares. Estas informações são importantes não somente na adição de conhecimento, mas principalmente devido ao fato de 25% destas espécies (IUCN Red List, 2004) estarem ameaçadas de extinção, devido à ação humana. Pesquisas combinadas de espermatologia simultaneamente com estudos em endocrinologia, embriologia e criopreservação, podem ser aplicadas com sucesso na reprodução assistida (Wildt *et al.*, 1995).

O testículo dos mamíferos pode ser dividido funcionalmente em dois compartimentos básicos: o tubular ou espermatogênico e o intertubular ou androgênico. A proporção entre estes compartimentos é bastante variável nas diversas espécies animais, sendo um dos principais fatores responsáveis pela diferença observada para a eficiência na produção espermática (Russell *et al.*, 1990; França & Russell, 1998; Paula *et al.*, 1999).

Representando a porção endócrina produtora de testosterona do testículo dos mamíferos, as células de Leydig, juntamente com células conjuntivas, vasos sanguíneos e linfáticos, compõem o espaço intertubular ou tecido intertubular testicular. O arranjo e a proporção destes componentes variam nas diferentes espécies mamíferas, respondendo pela manutenção do nível de testosterona duas a três vezes maior no fluido intersticial do que nos vasos sanguíneos testiculares e, de 40 a 250 vezes maior nestes em relação ao sangue periférico (Sharpe, 1994; Hales, 2002). Além da função também moduladora dos caracteres sexuais secundários, a testosterona atua diretamente na produção espermática. Estudos correlacionando estrutura e função das células de Leydig em várias espécies de mamíferos demonstraram que, variações na secreção de testosterona resultam mais da capacidade individual desta célula em secretar testosterona, do que de diferenças do volume total das mesmas no testículo (Ewing *et al.*, 1979). Esta capacidade está altamente associada com a quantidade de retículo endoplasmático liso presente na célula de Leydig (Zirkin *et al.*, 1980). Dentre os fatores que podem influenciar na quantidade de células de Leydig por animal estão: a quantidade de LH disponível, o número de receptores de LH por célula, a quantidade de testosterona que a célula de Leydig é capaz de secretar em um dado tempo e a velocidade pela qual a testosterona deixa o testículo (Russell *et al.*, 1990). Visto estes aspectos, diferenças marcantes são observadas entre as espécies animais quanto à abundância de células de Leydig, tecido conjuntivo frouxo, localização dos vasos intersticiais e suas relações topográficas com os túbulos seminíferos (Fawcett *et al.*, 1973).

O leão africano apresenta características andrógeno dependentes bem distintas aos demais felinos, tais como: dimorfismo sexual acentuado e aspectos comportamentais únicos. O presente trabalho teve como objetivos a caracterização do intertúbulo, o arranjo dos componentes intersticiais do testículo dos animais mantidos em condições de cativeiro, assim como a quantificação volumétrica dos diferentes constituintes do espaço intertubular e a determinação da população de células de Leydig, por unidade de massa testicular, relacionando seu volume com a massa corporal.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados fragmentos testiculares obtidos de cinco leões africanos adultos, provenientes de parques zoológicos nos estados de São Paulo e Minas Gerais. Estes animais foram contidos e mantidos em anestesia geral utilizando-se a associação tiletamina/zolazepan na dose de 10 mg/Kg. Ambos os testículos foram mensurados quanto à largura, espessura e comprimento, com paquímetro digital e a determinação do volume testicular foi realizada utilizando-se a fórmula  $4/3\pi ABC$ , onde A= metade da largura, B= metade da espessura e C metade do comprimento (Moreira, 1995). Como as mensurações foram realizadas percutaneamente, a espessura da pele foi também mensurada e descontada das dimensões testiculares. O volume testicular foi diretamente convertido em gramas, visto que a densidade volumétrica do testículo de mamíferos é muito próxima de 1 (Johnson *et al.*, 1981; Paula *et al.*, 1999). A albugínea e o mediastino testiculares foram estimados em 18% da massa testicular (Godinho, 1999; Bittencourt *et al.*, 2004; Mascarenhas *et al.*, 2005; Azevedo *et al.*, 2005; Guião Leite *et al.*, 2006). Assim, para o cálculo do peso do parênquima testicular este valor foi descontado do volume total dos testículos.

Após tricotomia e anti-sepsia local, a pele do escroto foi incisada e, com o uso de um bisturi circular de 4 mm de diâmetro, foi obtido um fragmento da região média do testículo direito ou esquerdo, imediatamente fixado em solução de aldeído glutárico (Merck) 4% em tampão cacodilato  $0,1\text{mol L}^{-1}$  pH 7,4 à temperatura ambiente, por um mínimo de duas horas, sendo posteriormente armazenado sob refrigeração no mesmo tampão. A lesão foi suturada em planos distintos com fio sintético absorvível, sendo na pele utilizada sutura intradérmica com extremidades embutidas. Cada animal recebeu agentes antibióticos e antiflogísticos como terapia preventiva e foi clinicamente acompanhado até o seu pleno restabelecimento. Os procedimentos adotados na metodologia deste estudo, no que se refere ao bem estar dos animais envolvidos, estão de acordo com Processo N° 27/2005, aprovado pela Comissão de Ética do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa em 01/04/2005.

Para estudos em microscopia de luz, os fragmentos foram desidratados em séries de concentrações crescentes de álcoois (70°, 80°, 90° e 100° GL) e incluídos em resina plástica à base de glicol metacrilato. Foram obtidos tantos cortes histológicos quanto possível, de modo seqüencial, por meio de micrótomo rotativo dotado de navalha de vidro, com quatro  $\mu\text{m}$  de espessura, os quais foram corados com solução de azul de toluidina / borato de sódio 1%. Ao microscópio de luz, os componentes do espaço intertubular foram analisados quanto à sua morfologia individual e relações topográficas com o túbulo seminífero. Com o auxílio de ocular integradora dotada de 100 pontos em aumento de 400 vezes, foi avaliada a proporção volumétrica dos constituintes do espaço intertubular (núcleo de células de Leydig, citoplasma de células de Leydig, vasos intersticiais e tecido conjuntivo) e túbulo seminífero no parênquima testicular, através da contagem destes elementos correspondentes aos pontos em dez campos, aleatoriamente distribuídos para cada animal. Inferindo-se a estas proporções o volume total do parênquima testicular, foram obtidos os volumes totais de cada componente testicular em todos animais.

O diâmetro médio do núcleo das células de Leydig foi mensurado para o cálculo do seu volume, através da fórmula  $4/3\pi r^3$ , onde  $r$  foi o raio nuclear médio encontrado. Para isto, 20 secções transversais de células de Leydig, com os maiores contornos nucleares, foram medidas em cada animal, utilizando-se de ocular micrométrica. Conhecido o volume do núcleo e sua proporção no volume total da célula de Leydig, calculou-se o volume de uma célula. Inferindo-se este valor ao volume total de células de Leydig por testículo, obteve-se seu número por testículo e conseqüentemente por grama de testículo.

## 3. RESULTADOS

Nos leões, cerca de 16% do parênquima testicular é ocupado por células de Leydig (Tabela 1). A proporção volumétrica média de tecido conjuntivo do espaço intertubular nestes felinos foi de 7,1% do parênquima testicular (Tabela 1). Quanto à volumetria

proporcional de vasos sanguíneos no parênquima testicular, observou-se no leão africano valor médio de 0,7% (Tabela 1).

Tabela 1. Proporções volumétricas do espaço intertubular de leões africanos adultos, mantidos em cativeiro.

Animal	Núcleo de células de Leydig (%)	Citoplasma de Células de Leydig (%)	Total de células de Leydig (%)	Tecido conjuntivo (%)	Vasos sanguíneos (%)
1	0,9	17,7	18,6	6,8	0,3
2	1,2	17,1	18,3	8,3	1,0
3	1,3	10,6	11,9	7,1	1,1
4	0,7	16,9	17,6	6,2	0,3
5	0,9	15,4	16,3	7,4	0,7
Média ± d.p.	1,0 ± 0,2	15,5 ± 2,8	16,5 ± 2,7	7,1 ± 0,7	0,7 ± 0,3
CV (%)	24,0	18,6	16,6	10,8	52,8

O volume médio da célula de Leydig foi de 2578  $\mu\text{m}^3$  (Tabela 2), sendo que esta célula apresentou-se em alguns casos binucleada (Figura 1). O diâmetro nuclear médio da célula de Leydig do leão foi de 7,1 $\mu\text{m}$  (Tabela 2). O volume nuclear médio da célula de Leydig foi de 144,8  $\mu\text{m}^3$  (Tabela 2). O núcleo da célula de Leydig, em leões africanos, correspondeu, em média, a 6,4% do volume total da célula de Leydig (Tabela 2).

Tabela 2. Diâmetro, volume e percentual celular do núcleo de células de Leydig e volume médio total da célula de Leydig de leões africanos adultos, mantidos em cativeiro.

Parâmetro	N	Média ± desvio padrão
Diâmetro nuclear ( $\mu\text{m}$ )	5	7,1 ± 0,15
Volume nuclear ( $\mu\text{m}^3$ )	5	144,8 ± 92,1
Proporção nuclear (% da célula)	5	6,4 ± 2,7
Volume celular ( $\mu\text{m}^3$ )	5	2578,0 ± 980,5

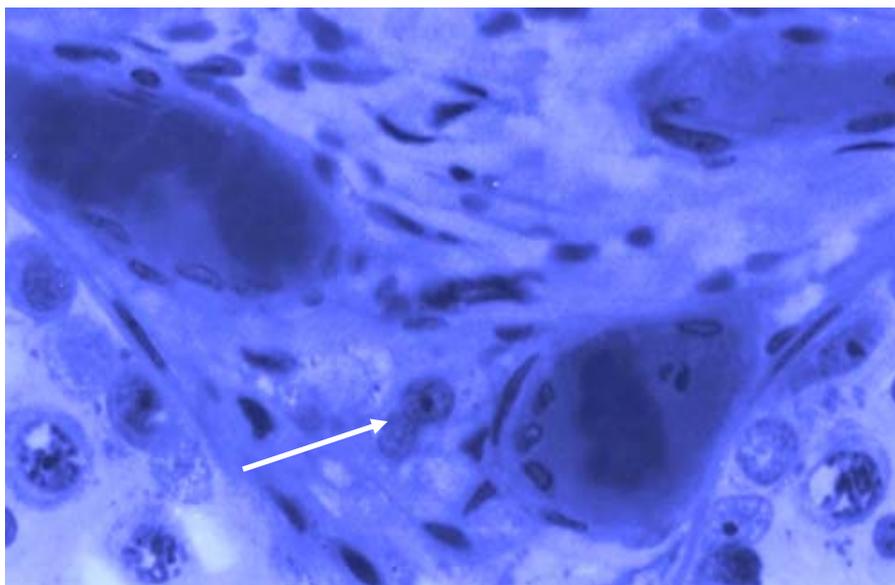


Figura 1 - Célula de Leydig no intertúbulo de leão africano adulto. Azul de toluidina (3.120x).

O volume médio total de células de Leydig em ambos os testículos de leões africanos, foi de 1,8 ml. Nestes felinos, foram observadas a proporção volumétrica de células de Leydig por testículo, onde a amplitude foi de 11,9 a 18,6% (Tabela 1), com  $cv = 16,6$ . No intuito de se avaliar a variação individual destas células nos animais pesquisados, inferiu-se à massa corporal a proporção volumétrica de células de Leydig, obtendo-se o índice leydigossomático, que representa o percentual da massa corporal alocada em células de Leydig. Assim, as células de Leydig ocuparam em média 0,0019% do peso corporal, com uma amplitude de 0,000772 a 0,002834% (Tabela 3). Entretanto, apesar da grande variação no número total de células de Leydig em ambos os testículos, o número médio por grama de testículo no leão africano (Tabela 3), apresentou-se mais homogêneo, ultrapassando os 50 milhões.

Tabela 3. Massa corporal (MC), massa testicular (MT), volume total de células de Leydig em ambos os testículos (VTCL), número de células de Leydig em ambos os testículos (NCL), número de células de Leydig por grama de testículo (NCL/g) e índice leydigossomático (ILS), em leões africanos adultos.

Animal	MC (Kg)	MT (g)	VTCL (ml)	NCL (10 <sup>6</sup> )	NCL/g (10 <sup>6</sup> )	ILS (%)
1	188,70	19,99	1,36	490,9	54,7	0,001448
2	220,00	48,41	3,11	1.439,0	69,2	0,002834
3	150,00	14,41	0,58	455,1	76,6	0,000772
4	180,00	27,95	1,95	492,1	36,4	0,002166
5	180,00	27,52	2,14	787,3	49,3	0,002371
Média ± d.p.	183,74 ± 25,03	27,66 ± 12,89	1,82 ± 0,94	732,9 ± 416,9	57,2 ± 15,9	0,0019 ± 0,0008
CV (%)	13,6	46,6	51,6	56,8	27,8	42,1

#### 4. DISCUSSÃO

Em estudos relativos à fisiologia testicular, os volumes da albugínea e do mediastino testiculares são desconsiderados da massa do testículo para o cálculo do parênquima

testicular, uma vez que não participam diretamente da função espermatogênica ou androgênica (Johnson *et al.*, 1981). Na maioria das espécies domésticas, a proporção volumétrica da albugínea e mediastino testiculares é geralmente em torno de 10% (França & Russell, 1998). No entanto, Godinho (1999) observou no gato doméstico valores próximos a 18% e Mascarenhas *et al.* (2005) descreveram valores similares para o cão, assim como Bittencourt *et al.* (2004) para o lobo guará (*Chrysocyon brachyurus*) e Azevedo *et al.* (2005) para onça pintada (*Panthera onca*). Estes dados apontam que estas estruturas são mais abundantes em carnívoros. Assim, para a estimativa da massa do parênquima testicular em leões africanos, foram considerados 18% do peso testicular alocados em albugínea e mediastino.

De acordo com Russell *et al.* (1990), o epitélio seminífero compõe-se por gerações de células germinativas suportadas por células de Sertoli com funções na condução e manutenção do processo espermatogênico. Os efeitos endócrinos na espermatogênese são, em sua maioria, através de ações indiretas nas células de Sertoli (Parks *et al.*, 2003). O perfeito funcionamento da célula de Sertoli depende de inúmeras interações, endócrinas, parácrinas e de relações celulares, dentre elas as interações físicas e parácrinas com as células germinativas (Ye *et al.*, 1993; Boujrad *et al.*, 1995; Cavicchia *et al.*, 1998), células peritubulares (Dhym, 1994; Parks *et al.*, 2003), destacando-se as células de Leydig (Lejeune *et al.*, 1998; Mendis-Handagama & Ariyaratne, 2001). Os diferentes arranjos e relações quantitativas entre os componentes do espaço intertubular, influenciam diretamente na espermatogênese, bem como na liberação da testosterona, na corrente sangüínea (Russell, 1996).

Segundo Fawcett *et al.* (1973), a drenagem linfática, aliada à quantidade de células de Leydig e tecido conjuntivo frouxo no espaço intertubular nas diferentes espécies de mamíferos segue, em geral, três padrões distintos: I) espécies nas quais as células de Leydig e o tecido conjuntivo ocupam uma área muito pequena no compartimento intertubular, contrastando com extensos sinusóides e espaços linfáticos interpostos aos túbulos seminíferos; II) espécies que apresentam grupos de células de Leydig espalhados em abundante tecido conjuntivo frouxo edemaciado, o qual é drenado por um vaso linfático localizado central ou excentricamente no espaço intertubular; e III) espécies nas quais abundantes grupamentos de células de Leydig ocupam praticamente todo o compartimento intertubular, apresentando pouco tecido conjuntivo e vasos linfáticos. Apesar do pouco conhecimento a respeito das implicações fisiológicas desta variação, Fawcett *et al.*, (1973) especularam que a mesma está provavelmente relacionada com a habilidade dos vasos linfáticos de mover, para fora dos testículos, materiais vascularmente secretados e manter as concentrações adequadas de andrógenos no testículo e vasos sangüíneos.

Leões africanos apresentaram agrupamento de células de Leydig distribuídas em tecido conjuntivo frouxo edemaciado, o qual apresentou vaso linfático central no espaço intertubular (Figura 2), em semelhança ao observado no gato doméstico (Godinho, 1999), na onça parda (Guião Leite & Paula, 2003) e na onça pintada (Azevedo *et al.*, 2005), os quais apresentaram o padrão do tipo II na classificação de Fawcett *et al.* (1973), embora variações na proporção volumétrica dos componentes do espaço intertubular tenham sido observadas em relação aos demais felinos pesquisados. No leão cerca de 16% do parênquima testicular foi ocupado por células de Leydig. Já na onça pintada este valor está em torno de 13% (Azevedo *et al.*, 2005), na onça parda, próximo de 8% (Guião Leite & Paula, 2003) e no gato doméstico 6% (Godinho, 1999). A maior proporção de células de Leydig observadas no Leão, pode estar relacionada com uma maior dependência androgênica para aspectos comportamentais e fisiológicos. Quanto à proporção volumétrica média de tecido conjuntivo do espaço intertubular, o leão apresenta 7,1% do parênquima testicular, enquanto a onça pintada apresenta 8,3% (Azevedo *et al.*, 2005), a onça parda 9,5% (Guião Leite & Paula, 2003) e o gato doméstico apenas 2,9% (Godinho, 1999). Quanto à volumetria proporcional de vasos sangüíneos no parênquima testicular, todos os felinos estudados apresentaram valores entre 1,2 e 2,8 % (Godinho, 1999; Guião Leite & Paula, 2003; Azevedo *et al.*, 2005), observando-se em leões africanos um valor médio de 0,7% (Tabela 1).

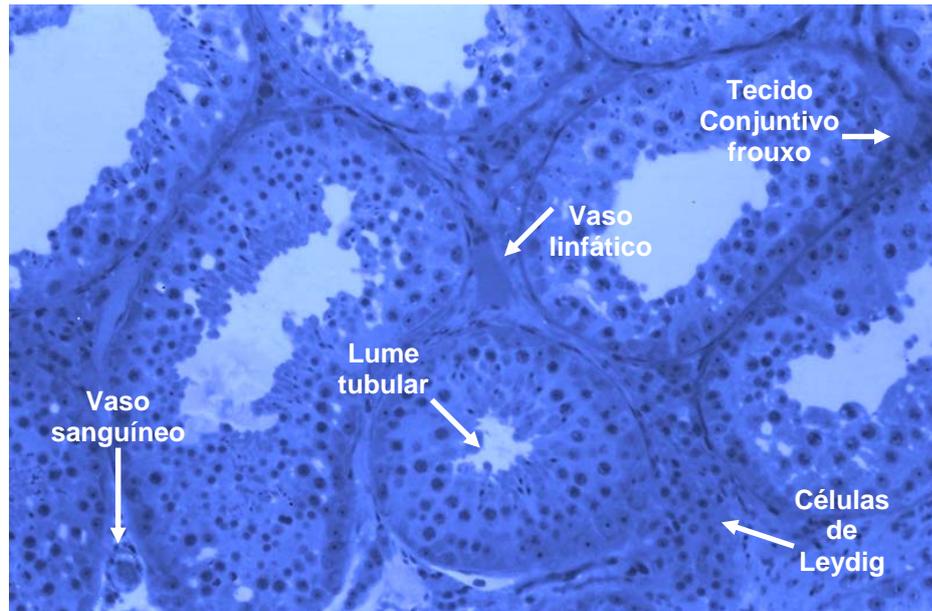


Figura 2 – Espaço intertubular de leão africano adulto. Azul de toluidina (200x).

As células de Leydig observadas no testículo de animais adultos são principalmente originárias de células tronco, que se diferenciam sucessivamente em células progenitoras, células de Leydig imaturas e por fim, células de Leydig adultas (Ge *et al.*, 1996). No leão africano, o volume médio da célula de Leydig foi de  $2578 \mu\text{m}^3$ , sendo maior que o relatado para a onça pintada ( $2386\mu\text{m}^3$ / Azevedo *et al.*, 2005) e gato doméstico ( $2044\mu\text{m}^3$ / Godinho, 1999). A célula de Leydig do leão africano apresentou-se binucleada assim como reportado em humanos e marmotas (Sinha & Seal, 1969; Sinha-Hikim *et al.*, 1991), no entanto, na maioria das espécies domésticas, estas apresentam-se uninucleadas (Sinha & Seal, 1969; Russell, 1996). O diâmetro nuclear médio da célula de Leydig do leão foi de  $7,1 \mu\text{m}$ , sendo próximo ao observado para a onça pintada ( $7,7\mu\text{m}$ / Azevedo *et al.*, 2005) e gato doméstico ( $7,9\mu\text{m}$ / Godinho, 1999). O volume nuclear médio da célula de Leydig do leão africano foi de  $144,8 \mu\text{m}^3$ , abaixo da amplitude observada em roedores de laboratório, carneiros e humanos (Russell, 1996), distante da onça pintada ( $240\mu\text{m}^3$ / Azevedo *et al.*, 2005) e gato doméstico ( $261\mu\text{m}^3$ / Godinho, 1999). Na maioria dos animais estudados, o núcleo da célula de Leydig corresponde de 10 a 19% do volume total da célula de Leydig. No leão, este parâmetro foi em média 6,4%.

A necessidade de testosterona para a produção espermática e para manter os níveis periféricos de andrógenos pode estar relacionada com o tamanho do compartimento de células de Leydig. Contudo, de acordo com alguns pesquisadores (Fawcett *et al.*, 1973; Russell, 1996), a maior quantidade de células de Leydig em algumas espécies, pode estar relacionada com a síntese de outros tipos de esteróides que não testosterona e feromônios, ou substâncias com algumas outras funções ainda não definidas. Vale a pena ressaltar que inúmeros fatores podem interferir na quantidade necessária de células de Leydig por animal, dentre os quais destacam-se: a quantidade de LH disponível; o número de receptores de LH por célula; a quantidade de testosterona que a célula de Leydig é capaz de secretar em um dado tempo; a velocidade pela qual a testosterona deixa o testículo via vasos linfáticos, vasos sanguíneos e fluido seminal; o volume sanguíneo do animal e, finalmente, a taxa de metabolismo da testosterona (Russell *et al.*, 1994; Russell, 1996).

O volume médio total de células de Leydig em ambos os testículos de leões foi de aproximadamente 1,8 ml. Este parâmetro, como esperado, é altamente variado entre os indivíduos (cv = 51,6), visto a variação individual na massa testicular (cv = 46,6). Grandes

variações individuais na proporção volumétrica de células de Leydig, também são relatadas em várias espécies domésticas e selvagens (Paula *et al.*, 1999; Godinho, 1999; Guião Leite & Paula, 2003; Bittencourt *et al.*, 2004; Azevedo *et al.*, 2005). No intuito de se avaliar a variação individual destas células, inferiu-se à massa corporal a proporção volumétrica de células de Leydig, obtendo-se o índice Leydigossomático, que representa o percentual da massa corporal alocada em células de Leydig. Nos leões, as células de Leydig ocupam em média 0,0019% do peso corporal (Tabela 3), valor este próximo ao relatado para a onça parda (0,002; Guião Leite & Paula, 2003) e menor ao descrito para a onça pintada (0,0036; Azevedo *et al.*, 2005). Apesar da grande variação no número total de células de Leydig em ambos os testículos, o número médio por grama de testículo no leão africano (Tabela 3), apresentou-se mais homogêneo, sendo superior aos 20 a 40 milhões descritos para a maioria dos mamíferos, ultrapassando os 50 milhões. (Russell, 1996).

## 5. CONCLUSÕES

Nos leões africanos adultos mantidos em condições de cativeiro, utilizados neste estudo, cerca de 16% do parênquima testicular é ocupado pelas células de Leydig, 7,1% por tecido conjuntivo e 0,7% por vasos sanguíneos. O volume médio e o diâmetro nuclear dessas células foram, respectivamente, 2578  $\mu\text{m}^3$  e 7,1  $\mu\text{m}$ . O índice leydigossomático nestes animais foi de 0,0019% e o número médio de células de Leydig por grama de testículo correspondeu, em média a 57 milhões.

## 6. REFERÊNCIAS

- Alden, P., Estes, R., Schlitter, D., McBride, B. (1998), National Audubon Society Field Guide to African Wildlife. Alfred A. Knopf Incorporation, New York
- Azevedo, M.H.F., Paula, T.A.R., Matta, S.L.P., Fonseca, C.C. (2005), Morfometria testicular e o túbulo seminífero da onça pintada (*Panthera onca*). *Revista CERES* (no prelo)
- Bittencourt, V.L., Paula, T.A.R., Matta, S.L.P., Fonseca, C.C., Neves, M.T.D., Costa, M.E.L., Malta, M.C., Coelho, C.M., Bastos, J.A.B. (2004), Avaliação da população celular do epitélio seminífero e índices indicativos da população espermática, através de biópsia testicular em lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*, Iliger, 1811) adulto. *Rev. Bras. Rep. Anim.*, 28, 108-113
- Boujrad, N., Hochereau-de-Riviers, M.T., Carreau, S. (1995), Evidence for germ cell control of Sertoli cell function in three models of germ cell depletion in adult rat. *Biol. Reprod.*, 53, 1345-1352
- Cat Specialist Group (2003) "*Panthera leo*". 2003 IUCN Red list of Threatened Species. Disponível em: <http://www.redlist.org/search/details.php?species=15951>. Acesso em: 12 fevereiro 2005
- Cavicchia, J.C., Sacerdote, A., Zhu, B.C. (1998), Sertoli cell nuclear pore number changes in some stages of spermatogenic cycle of the rat seminiferous epithelium. *Tissue and cell*, 30, 268-273
- Dhym, M. (1994). Basement membrane regulation of Sertoli cells. *Endocrine Reviews.*, 15, 1, 102-115
- Estes, R. (1993), The Safari Companion: A Guide to Watching African Mammals. Chelsea Green Publishing Company, Vermont
- Ewing, L.L., Zirkin, B.B., Cochran, R.C., Kromann, N. (1979), Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog, and hamster testes perfused *in vitro*: correlation with Leydig cell mass. *Endocrinology*, 105, 1135-1142
- Fawcett, D.W., Neaves, W.B., Flores, M.N. (1973), Comparative observations on intertubular lymphatic and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. *Biol. Reprod.*, 9, 500-532
- França, L.R., Russell, L.D. (1998), The testis of domestic animals. In- Male reproduction: A multidisciplinary overview, eds. J. Regadera, L. Martinez-Garcia. Churchill Livingstone, Madrid, pp. 197-219
- Ge, R.S., Shan, L.X., Hardy, M.P. (1996), Pubertal development of Leydig cells. In- The Leydig cell, eds. A.H. Payne, M.P. Hardy, L.D. Russell. Cache River Press, Florida
- Godinho, C.L. (1999), Análise histométrica do testículo e duração da espermatogênese em gatos (*Felis domestica*) sexualmente maduros. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil

- Guião Leite, F.L., Paula, T.A.R. (2003), Rendimento intrínseco da espermatogênese, o índice de células de Sertoli e a produção espermática diária da onça parda (*Puma concolor*). *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 27, 21-26
- Guião Leite, F.L., Paula, T.A.R., Matta, S.L.P., Fonseca, C.C., Neves, M.T.D., Barros, J.B.G. (2006), Cycle and duration of the seminiferous epithelium in puma (*Puma concolor*). *Anim. Reprod. Sci.*, 90, 4, 307-316
- Hales, D.B. (2002), Testicular Macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. *J. Reprod. Immun.*, 57, 3-18
- IUCN Red List, (2004). IUCN Red list of Threatened Species. Disponível em: [http://www.iucnredlist.org/info/categories\\_criteria2001.html](http://www.iucnredlist.org/info/categories_criteria2001.html). Acesso em: 12 novembro de 2005.
- Johnson, L., Petty, C.S., Neves, W.B. (1981), A new approach to qualification of spermatogenesis and its application to germinal cell attrition during human spermatogenesis. *Biol. Reprod.*, 25, 217-226
- Lejeune, H., Habert, R., Saez, J.M. (1998), Origin, proliferation and differentiation of Leydig cells. *J. Mol. Endocrinol.*, 20, 1-25
- Mascarenhas, R.M., Paula, T.A.R., Carretta Júnior, M., Ribeiro, E.C.S., Borboleta, L.R., Matta, S.L.P. (2005). Efeitos da biópsia incisional testicular sobre o rendimento intrínseco da espermatogênese e índices de células de sertoli em cães. *Revista CERES* (no prelo)
- Mendis-Handagama, S.M.L.C., Ariyaratne, H.B.S. (2001), Differentiation of the adult Leydig cell population in postnatal testis. *Biol. Reprod.*, 65, 660-671
- Moreira, J.R. (1995), The reproduction, demography and management of capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) on Marajó Island- Brazil. Doctorate Thesis, University of Oxford, England.
- Nowak, R.M. (1999), Walker's mammals of the World – Sixth Edition. Vols. I and II. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press. 1936 p.
- Parks, J.E., Lee, D.R., Huang, S., Kaproth, M.T. (2003), Prospects for spermatogenesis in vitro. *Theriogenology*, 59, 73-86
- Paula, T.A.R. (1999), Avaliação Histológica e Funcional do Testículo de Capivaras Adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Tese de Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil.
- Paula, T.A.R., França, L.R., Garcia, H.C. (1999), Seminiferous epithelium cycle and its duration in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). *Tissue & Cell*, 31, 327-334
- Russell, L.D., Ettlin, R.A., Sinha-Hikim, E.P., Clegg, E.D. (1990), Histological and histopathological evaluation of the testis. Cache River Press, Florida
- Russell, L.D., Chandrashekar, V., Bartke, A., Sinha-Hikim, A.P. (1994), The hamstes Sertoli cell in early testicular regression and early recrudescence: a stereological and endocrine study. *J. Androl.*, 17, 93-106
- Russell, L.D. (1996), Mammalian Leydig cell structure. In- The Leydig cell, eds. A.H. Payne, M.P. Hardy, L.D. Russell. Cache River Press, Florida
- Sharpe, R.M. (1994), Regulation of spermatogenesis. In- The physiology of reproduction, eds. E. Knobil, J.D. Neil. Raven Press, New York, pp. 1363-1434
- Sinha, A.A., Seal, U.S. (1969), The testicular interstitial cells of a lion a three-toed sloth. *Anat. Rec.*, 164, 35-46
- Sinha-Hikim, A.P., Sinha-Hikim, I.S., Amador, A.G., Bartke, A., Woolf, A., Russell, L.D. (1991), Reinitiation of spermatogenesis by exogenous gonadotropins in a seasonal breeder, the woodchuck (*Marmota monax*), during gonadal inactivity. *Am. J. Anat.*, 192, 194-213.
- Urban, M., West, P. (2002) "Lion Research Center". Disponível em: <http://animaldiversity.ummz.umich.edu/local/redirect.php/http://www.lionresearch.org/>. Acesso em: 15 abril 2005.
- Wildt, D.E., Pukazhenth, b., Brown, J., Monfort, S., Howard, J.G., Roth, T.I. (1995), Spermatology for understanding managing and conserving rare species. *Rep. Fert. And Develop.*, 7, 812-824
- Ye, S.J., Ying, L., Sushmita, G., França, L.R., Russell, L.D. (1993), Sertoli cell cycle: a re-examination of the structural changes during the cycle of the seminiferous epithelium of the rat. *Anat. Rec.*, 237, 187-198
- Zirkin, B.R., Ewing, L.L., Kromann, N., Cochran, R.C. (1980), Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog, and hamster testes *in vitro*: correlation with Leydig cells ultrastructure. *Endocrinology*, 107, 1867-1874

## CONCLUSÕES GERAIS

Com base nos dados obtidos é possível concluir que para o leão africano adulto, mantido em cativeiro:

1. O índice gonadossomático é 0,015%.
2. O volume médio de túbulos seminíferos por testículo foi de 16,9 ml, o que representou 75,6% do parênquima testicular.
3. Em relação à massa corporal, 0,009% desta é alocada em túbulos seminíferos, ou seja, o índice tubulossomático.
4. Os animais estudados apresentaram 12,4 metros de túbulos seminíferos por grama de testículo, dentro da média de 10 a 15 metros observados para a maioria dos animais domésticos.
5. As células de Leydig isoladamente correspondem a 16% do parênquima testicular, sendo o índice leydigossomático 0,0019%.
6. O número de células de Leydig por grama de testículo, foi superior ao de outros grandes felinos já estudados.
7. O espaço intertubular foi caracterizado como sendo do tipo II.
8. O diâmetro tubular e a altura do epitélio seminífero foram em média 252,7  $\mu\text{m}$  e 93,2  $\mu\text{m}$ , respectivamente.
9. O rendimento meiótico foi de 2,7 células, o que equivale a perda de 33% no processo meiótico; 10,3 espermatócitos primários são produzidos a partir de uma espermatogônia do tipo A e o rendimento geral da espermatogênese foi de 22,1 células.
10. Cada célula de Sertoli é capaz de sustentar 14,9 células germinativas, das quais 7,9 são espermátides arredondadas.
11. A reserva espermática testicular por grama de testículo foi de cerca de 103 milhões de espermatozoides.