MARIA ANGÉLICA MACHADO ARROYO

**Ultraestrutura e expressão das enzimas: citocromo P450
aromatase e citocromo P450c17 (17- α -hidroxilase/17,20-
liase) nas diferentes fases do desenvolvimento da via
espermática e espermatogênese em cutia (*Dasyprocta sp.*)
criada em cativeiro**

São Paulo

2013

MARIA ANGÉLICA MACHADO ARROYO

**Ultraestrutura e expressão das enzimas: citocromo P450
aromatase e citocromo P450c17 (17- α -hidroxilase/17,20-
liase) nas diferentes fases do desenvolvimento da via
espermática e espermatogênese em cutia (*Dasypsecta sp.*)
criada em cativeiro**

São Paulo
2013

MARIA ANGÉLICA MACHADO ARROYO

**Ultraestrutura e expressão das enzimas: citocromo P450
aromatase e citocromo P450c17 (17- α -hidroxilase/17,20-
liase) nas diferentes fases do desenvolvimento da via
espermática e espermatogênese em cutia (*Dasyprocta sp.*)
criada em cativeiro**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Anatomia dos
Animais Domésticos e Silvestres da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Departamento:
Cirurgia

Área de Concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e
Silvestres

Orientador:
Prof. Dr. Antônio Chaves de Assis Neto

São Paulo
2013

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA

5/6/13

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2805
FMVZ

Arroyo, Maria Angélica Machado

Ultraestrutura e expressão das enzimas: citocromo P450 aromatase e citocromo P450c17 (17- α -hidroxilase/17,20-liase) nas diferentes fases do desenvolvimento da via espermática e espermatogênese em cutia (*Dasyprocta sp.*) criada em cativeiro / Maria Angélica Machado Arroyo. -- 2013.

117 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Chaves de Assis Neto.

1. *Dasyprocta*. 2. Ultraestrutura. 3. Citocromo. 4. Esteroidogênese. 5. Andrógenos. I. Título.

ERRATA

ARROYO, M. A. M. . Ultraestrutura e expressão das enzimas: citocromo P450 aromatase e citocromo P450c17 (17- α -hidroxilase/17,20-liase) nas diferentes fases do desenvolvimento da via espermática e espermatogênese em cutia (*Dasyprocta sp.*) criada em cativeiro. 2013. 116f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Página	Parágrafo	Onde se lê	Leia-se
Ficha catalográfica	3º	117 f.	116 f.
Resumo	1º	117 f.	116 f.
Abstract	1º	117 f.	116 f.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Ultra-estrutura e expressão das enzimas: citocromo p450 aromatase e citocromo p450c17 (17- α -hidroxilase/17, 20-liase) nas diferentes fases do desenvolvimento da via espermática e espermatogênese em cutia (*Dasyprocta* sp.) criada em cativeiro", protocolado sob o nº 2371/2011, utilizando 28 (vinte e oito) cutias, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Antonio Chaves de Assis Neto, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 17/8/2011.

We certify that the Research "Ultra-structure and expression of enzymes: cytochrome p450 aromatase and cytochrome p450c17 (17- α -hidroxilase/17, 20-lyase) in a different stages of development in spermatogenesis and sperm via in agouti (*Dasyprocta* sp.) kept in captivity ", protocol number 2371/2011, utilizing 28 (twenty-eight) agoutis, under the responsibility Prof. Dr. Antonio Chaves de Assis Neto, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 8/17/2011.

São Paulo, 18 de agosto de 2011.

Profª. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ARROYO, Maria Angélica Machado

Título: Ultraestrutura e expressão das enzimas: citocromo P450 aromatase e citocromo P450c17 (17- α -hidroxilase/17,20-liase) nas diferentes fases do desenvolvimento da via espermática e espermatogênese em cutia (*Dasyprocta sp.*) criada em cativeiro.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Cutia, *Dasyprocta* sp.

Fonte: vivaterra.org.br/mamiferos [modificado]

Dedico...

À Adriana, Lucas e Pedro.
À toda a minha família.

Agradecimentos

À Deus, por cada dia que me fez chegar a este momento, pela Força e Sabedoria.

À minha mãe, Adriana Cecilia Machado, exemplo de Amor, Fé, Luta e Força. Aos meus irmãos, Lucas Machado Arroyo e Pedro Machado Arroyo. A vocês três, obrigada por me ensinarem a preservar o verdadeiro significado da Simplicidade e da Honestidade. Amo vocês.

À vó, Inês Cardenas Machado, e ao vô, Joaquim Gomes Machado (*in memoriam*). À toda a minha família. Obrigada por acreditarem em mim e por sempre me apoiarem. Obrigada por todo o Amor concedido.

Ao sr. Marcos Antônio Momo, meu amigo, por, também, ter acreditado em minha conduta e ser um dos alicerces, junto à minha família.

Ao meu orientador, Antônio Chaves de Assis Neto, pela confiança, paciência e amizade.

À Professora Maria Angélica Miglino, pela oportunidade e exemplo de disciplina.

Ao Professor Moacir Franco de Oliveira, sem o qual essa ideia não teria saído do papel. Obrigada pela confiança e colaboração.

Ao Professor Alan James Conley (UC Davis – California, USA), pela ímpar contribuição a este e a outros trabalhos.

À Professora Flávia Thomaz Verechia Pereira, por ter me recebido de braços abertos em sua casa e pela ajuda na recuperação do material.

Aos “Assisetes”, meus irmãos de coração, Paulo Ramos da Silva Santos (Rubis), Franceliusa Delys de Oliveira (Natal), Daniela Moraes de Oliveira (Bragança), Bruno Machado Bertassoli (Peludo), Amilton Cesar dos Santos, (Capitão) Maria Vitória Piemonte Constantino (Vics), Diego Carvalho Viana (Maranhão), Patrícia Aparecida Luz (Paty) e Miguel Lobo. Com vocês, o segundo passo foi inevitável e certo. Agradeço a amizade e o carinho.

Aos agregados e amigos, Thais Borges Lessa (Tata), Marcos Vinícius Mendes Sousa (Marcão), Dilayla Kelly de Abreu, Valdir Pavanello Jr., Sílvia Lima

(Silveti), Jodonai Barbosa da Silva, Any Kelly Gomes de Lima e Cezar Zarza, pelo respaldo a todo esse trabalho.

Aos “LP Forevis”, Letícia Biral de Faria, Caroline Grazielle Barreto, Fabio Martin Rocha, Ana Flavia Blanco, Carla Chiari, Livian Dias, Maíta Vaz, Beatriz Lorenzetti, Aiesca Cecilia Rezende e Livia Elena Perez Araujo, à eterna e fiel amizade.

Às amigas sinceras conquistadas pela estrada, Mayara Maia, Klíssia Lorena Oliveira Santos, Andrea Alvisi de Paula, Carmen Ceres, Quézia Borges, Ludmila Calvo, Lizzie Milléo e Cristina Camargo (kismoça).

Aos alunos de Iniciação Científica, Felype Fanti e Carolina Ramos, agradeço ao apoio e dedicação.

Ao sr. Gaspar, agradeço a insistência na MET.

À todos os funcionários do Departamento de Cirurgia, Setor de Anatomia da FMVZ/USP, especialmente ao Edinaldo Ribas Farias (Índio), Jaqueline Martins de Santana, Maicon Barbosa da Silva, Ronaldo Agostinho da Silva, Rose Ely Grassi Rici e André Luis Franciulli.

Aos professores que contribuíram para a integridade deste trabalho, bem como àqueles os quais convivi durante as disciplinas oferecidas pela Pós-graduação.

Ao diretor da FMVZ/USP, Enrico Lippi Ortolani.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Ao CEMAS, Centro de Multiplicação de Animais Silvestres da Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró – RN, pela parceria.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Capes, pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que estiveram comigo, de maneira sincera, nessa caminhada.

Obrigada.

**“Se o conhecimento pode criar problemas,
não é através da ignorância que podemos solucioná-los.”**

Isaac Asimov

RESUMO

ARROYO, M. A. M. **Ultraestrutura e expressão das enzimas: citocromo P450 aromatase e citocromo P450c17 (17- α -hidroxilase/17,20-liase) nas diferentes fases do desenvolvimento da via espermática e espermatogênese em cutia (*Dasyprocta sp.*) criada em cativeiro.** [Ultrastructure and expression of enzymes: cytochrome P450 aromatase and cytochrome P450c17 (17- α -hydroxylase/17,20-lyase) in different developmental stages of spermatogenesis and excurrent canals in agouti (*Dasyprocta sp.*) kept in captivity]. 2013. 117 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Espécies silvestres com grande potencial zootécnico devem ser exploradas de forma racional a fim de se evitar a extinção das mesmas. Assim se dá a importância de pesquisas voltadas à reprodução daquelas criadas em cativeiro, como a cutia (*Dasyprocta sp.*). Este animal é um mamífero e roedor vivente, em sua maioria, na Caatinga brasileira. A ultraestrutura é a base para determinar os estágios celulares e, assim, facilitar as comparações dos processos entre cutias e roedores silvestres ou outros mamíferos. As enzimas P450 aromatase e P450c17 são responsáveis pela regulação da produção de estrógenos e andrógenos, respectivamente. Considerando a hipótese de que o comportamento de expressão das enzimas do complexo citocromo P540 permanece o mesmo no testículo e na via espermática de cutias durante as fases de desenvolvimento sexual, objetivou-se observar a atuação das enzimas P450 aromatase e P450c17 (17- α -hidroxilase/17,20-liase) nas diferentes fases do desenvolvimento sexual, detalhar a ultraestrutura dos componentes desta via e constatar o desenvolvimento do processo espermatogênico. Segmentos do ducto deferente, epidídimo e testículo de 28 cutias machos em diferentes idades (um dia, 2-14 meses) foram fixados em paraformaldeído e glutaraldeído. O material foi coletado no Centro de Multiplicação da Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró, RN (Autorização IBAMA nº 2028236/2008). Foram feitos: histologia, seguindo o protocolo padrão para hematoxilina e eosina; processamento para corte semifino (azul de toluidina); microscopia eletrônica de transmissão e varredura; e imunohistoquímica. Este trabalho foi pioneiro ao observar que o epidídimo de cutias é composto por células basais, células principais, células haloides e, quando impúbere, por células “limpas”,

e por células apicais, quando a partir da puberdade. O ducto deferente de cutias antes da puberdade era caracterizado por duas camadas musculares, possivelmente devido à falta de trânsito espermático. No epitélio germinativo foram encontradas, em sua maioria, células em prófase I, principalmente em paquíteno. A espermiogênese é completa quando na pré-puberdade, entretanto, a espermiação ocorre a partir dos 9 meses de idade. A expressão da enzima P450 aromatase variou ao longo do desenvolvimento sexual, sendo na puberdade seu pico de atividade. A P450c17 não mostrou nenhuma ação em qualquer fase sexual. Pode-se concluir que o epitélio germinativo testicular e intersticial, bem como o epitélio pseudoestratificado estereociliado do epidídimo e do ducto deferente de cutias criadas em cativeiro sofrem mudanças morfológicas e funcionais ao longo do desenvolvimento sexual. As atividades androgênicas preponderantes em cutias criadas em cativeiro ocorrem no período da puberdade.

Palavras-chave: *Dasyprocta*. Ultraestrutura. Citocromo. Esteroidogênese. Andrógenos.

ABSTRACT

ARROYO, M. A. M. **Ultrastructure and expression of enzymes: cytochrome P450 aromatase and cytochrome P450c17 (17- α -hydroxylase/17,20-lyase) in different developmental stages of spermatogenesis and excurrent canals in agouti (*Dasyprocta sp.*) kept in captivity** [Ultraestrutura e expressão das enzimas: citocromo P450 aromatase e citocromo P450c17 (17- α -hidroxilase/17,20-liase) nas diferentes fases do desenvolvimento da via espermática e espermatogênese em cutia (*Dasyprocta sp.*) criada em cativeiro]. 2013. 117 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Wild species with great potential livestock should be explored rationally in order to prevent the extinction of the same. Thus is the importance of research aimed at reproducing those bred in captivity, such as agouti (*Dasyprocta sp.*). This animal is a mammal and rodent living mostly in the Brazilian Caatinga. The ultrastructure is the basis for determining the stages and thus facilitates comparisons of cases between agouti and wild rodents or other mammals. The enzymes P450 aromatase and P450c17 are responsible for regulating the production of estrogens and androgens, respectively. On the assumption that the behavior of expression of the enzymes of complex cytochrome P540 remains the same in the testis and excurrent canals of the agouti during the stages of sexual development, aimed to observe the activity of the enzymes P450 aromatase and P450c17 (17- α -hidroxilase/17,20-lyase) in different stages of sexual development, detail the ultrastructure of the components of this pathway and observe the development of spermatogenesis. Segments of the vas deferens, epididymis and testis of 28 agouti males at different ages (1 day, 2-14 months) were fixed in glutaraldehyde and paraformoldehyde. The material was collected on Center of Multiplication of Federal Rural University of the Semi-arid, Natal, RN (IBAMA Authorization No. 2028236/2008). Were made: histology following the standard protocol for hematoxylin and eosin; processing to semithin (blue toluidine), electron microscopy of transmission and scanning; and immunohistochemistry. This work was pioneered by observing that the epididymis is composed by basal cells, principal cells, haloids cells; and for clean cells when impubertal and apical cells after puberty in agoutis. The vas deferens before puberty was characterized by two muscle layers, possibly due to the lack of sperm transit. In

the germinal epithelium were found mostly cells in prophase I, mainly in pachytene. Spermiogenesis is complete when prepubertal phase; however, spermiation takes place from 9 months of age. The expression of enzymes of the cytochrome complex varied over sexual development and peak activity of P450 aromatase was at puberty. The P450c17 showed no action at any stage of sexual development. It can be concluded that the testicular germinal epithelium and interstitial epithelium as well as the pseudostratified estereociliated epithelium of the epididymis and vas deferens undergo morphological and functional changes during the sexual development. Androgenic activities prevalent in agoutis kept in captivity occur during puberty.

Key words: *Dasyprocta*. Ultrastructure. Cytochrome. Steroidogenesis. Androgens.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 FORMAÇÃO DO APARELHO REPRODUTOR MASCULINO E A ESTEROIDOGENESE	21
2.2 COMPLEXO CITOCROMO: P450 AROMATASE E P450C17 (17- α -HIDROXILASE/17,20-LIASE)	23
2.3 MORFOLOGIA DOS ÓRGÃOS GENITAIS MASCULINOS	27
2.4 ESPERMATOGÊNESE	27
2.5 PUBERDADE	30
2.6. ULTRAESTRUTURA E TIPOS CELULARES DA ESPERMATOGÊNESE E VIA ESPERMÁTICA	31
2.6.1 Parênquima testicular	30
2.6.2 Epidídimo	37
2.6.3 Ducto deferente	39
3 JUSTIFICATIVA	40
4 HIPÓTESE E OBJETIVOS	42
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
5 MATERIAL E MÉTODOS	44
5.1. ANIMAIS	45
5.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS	45
5.3 MICROSCOPIA DE LUZ – HEMATOXILINA E EOSINA	45
5.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO – MET	45
5.4.1 Processamento para cortes semifinos	47
5.4.2 Processamento para cortes ultrafinos	47
5.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA – MEV	47
5.6 TESTE IMUNOHISTOQUÍMICO PARA CITOCROMO P450 AROMATASE, CITOCROMO P450C17	48
6 RESULTADOS	49
6.1 ULTRAESTRUTURA	50
6.1.1 Parênquima testicular	50
6.1.2 Caracterização da linhagem espermatogênica	56
6.1.3 Tipos espermatogoniais	61
6.1.4 Célula de Sertoli	63
6.1.5 Célula de Leydig	64
6.1.6 Espermiação e espermiogênese	65

6.1.7 Epidídimo	70
6.1.8 Ducto deferente	78
6.2 EXPRESSÃO ENZIMÁTICA.....	84
6.2.1 Citocromo P450 aromatase	84
6.2.1.1 Testículo.....	84
6.2.1.2 Epidídimo	84
6.2.1.3 Ducto deferente.....	85
6.2.2 Citocromo P50c17	89
6.2.2.1 Testículo.....	89
6.2.2.2 Epidídimo	89
6.2.2.3 Ducto deferente.....	89
7 DISCUSSÃO	93
7.1 PUBERDADE	94
7.2 CARACTERIZAÇÃO EPITELIAL: TESTÍCULO, EPIDÍDIMO E DUCTO DEFERENTE	95
7.3 ULTRAESTRUTURA CELULAR	96
7.3.1 Parênquima testicular	96
7.3.1.1 Epitélio germinativo	97
7.3.1.2 Célula de Sertoli	99
7.3.1.3 Célula de Leydig.....	99
7.3.2 Epidídimo	100
7.3.3 Ducto deferente	102
7.4 EXPRESSÃO ENZIMÁTICA.....	103
7.4.1 Citocromo P450 aromatase e citocromo P450c17.....	103
8 CONCLUSÕES	106
REFERÊNCIAS.....	108

1 INTRODUÇÃO

A busca por alimentos através de meios alternativos, que possam suprir as necessidades da população devido ao acelerado crescimento mundial e produtivo, justifica a procura por recursos naturais existentes. Entretanto, a fauna deve ser explorada visando sua preservação, a fim de se evitar a extinção das espécies. Neste âmbito, correntes conservacionistas atuais estimulam a criação de animais silvestres em cativeiro, os quais poderiam ser explorados racionalmente através de um plano de manejo que favorecesse a sobrevivência em seu *habitat* natural e que produzissem excedentes a serem utilizados pelo homem (NOGUEIRA FILHO; NOGUEIRA, 2000).

No País, a criação comercial de animais que não foram domesticados é indicada como alternativa para diversificação de produção e de renda nas regiões Sul e Sudeste da Bahia (adaptado de NOGUEIRA FILHO; NOGUEIRA, 2000), além de outras regiões do Norte e Nordeste, onde a predação de cutias é acentuada para serem utilizadas como fonte opcional de proteína animal (ASSIS NETO et al., 2003a; RODRIGUES, 2005). Assim, devido à facilidade de reprodução em cativeiro e ao potencial para criação zootécnica, diversos processos evolutivos foram desenvolvidos em cutias (*Dasyprocta* sp.). Atualmente, esta espécie apresenta-se em listas de criações comercial, científica e conservacionista, autorizadas pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA.

Sua distribuição geográfica vai desde o sul do México, passando pela América Central, até a Argentina, Uruguai, Paraguai e todo território brasileiro (DEUTSCH; PUGLIA, 1988), com exceção do extremo sul do País. Sua criação apresenta vantagens como o baixo custo de implantação e baixo custo operacional, devido ao manejo facilitado. Sobretudo, a carcaça possui rendimento de aproximadamente 70% e a carne é apreciada pelo baixo teor calórico, rica em cálcio e fósforo, tanto quanto a carne de paca (PARAÍBA, 2007), a mais procurada no mercado entre os tipos exóticos (HOSKEN, 2010).

Segundo a classificação taxonômica de Moojen (1952), a cutia é um mamífero e roedor, pertencente à subordem *Hystricomorpha*, família *Dasiproctidae* e gênero *Dasyprocta*; as espécies *Dasyprocta agouti*, *Dasyprocta prymnolopha* e *Dasyprocta punctata* estão entre as sete que habitam o País, encontradas principalmente no

Nordeste brasileiro. É um animal de tamanho intermediário, entre 49 e 64 cm, e peso variável entre 3,0 e 5,9 kg. Possui os membros longos e finos, sendo os membros torácicos menores que os pélvicos. A cauda é rudimentar e costuma ficar escondida entre os pelos. A cabeça é estreita, com o focinho levemente achatado, os olhos são grandes e as orelhas, médias e largas. Sua pelagem é curta e áspera, de coloração variável. A cutia é um animal herbívoro e possui um importante papel ecológico devido ao hábito natural de dispersar sementes após comer os frutos (adaptado de SMYTHE, 1978).

Atualmente muitos estudos com animais silvestres vêm sendo desenvolvidos. No entanto, poucos tratam dos aspectos relativos à biologia reprodutiva do macho (ASSIS NETO, 2002; SANTOS et al., 2012). Assume relevância, no caso dos machos, o estudo de diversas etapas do desenvolvimento testicular, especialmente daquelas associadas à puberdade e a maturidade sexual, uma vez que a entrada em atividade sexual depende da cronologia desses eventos (FRANÇA, 1988), bem como o estudo da ultraestrutura da via espermática e das enzimas esteroidogênicas relacionadas à reprodução, como a citocromo P450 aromatase e citocromo P450c17 (17- α -hidroxilase, 17,20-liase), importantes no que tange aos aspectos de produção e manutenção da espécie criada em cativeiro. Entretanto, no que se referem aos aspectos reprodutivos de cutias, as informações em literatura são escassas e, algumas vezes, divergentes (MENEZES, 2010).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FORMAÇÃO DO APARELHO REPRODUTOR MASCULINO E A ESTEROIDOGENÊSE

Antes da formação do testículo ou do ovário propriamente, as gônadas passam por um período de indiferenciação sexual, o qual não possuem características masculinas ou femininas durante o período embrionário (NORMAN; LITWACK, 1997; HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2012). De maneira simplificada, as gônadas se originam da crista gonadal (COUROT; HOCHEREAU-DE-REVIERS; ORTAVANT, 1970), um espessamento da região média do mesonefro, ou seja, um primórdio renal embrionário (HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2012).

A crista gonadal é povoada pelas células germinativas primordiais (fonte de células germinativas nas gônadas adultas), as quais migram do endoderma do saco vitelino e formam, assim, os cordões gonadais (COUROT; HOCHEREAU-DE-REVIERS; ORTAVANT, 1970). Estes são chamados de cordões corticais e cordões medulares nas fêmeas e nos machos, respectivamente. Além das células germinativas primordiais, também migram para a crista gonadal as células mesenquimais e as células germinativas epiteliais. Estas últimas darão origem a novos tipos celulares no macho ou na fêmea (GILBERT, 2003; HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2012).

Ambos os cordões sexuais (corticais e medulares) ficam conectados à crista gonadal. Nos machos, continuam a se proliferar, fundindo-se e formando uma rede de cordões sexuais internos (medulares) e, em seu terminal mais distal, a rede testicular (*rete testis*), mais fina (HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2012). Os cordões perdem a adesão com o epitélio superficial e dele ficam separados pela grossa matriz extracelular, chamada túnica albugínea. As células germinativas, que formarão os espermatozoides, são encontradas nos cordões, dentro dos testículos, permanecendo sólidos até a puberdade, período no qual começa o processo de luminação, formando os túbulos seminíferos (HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2012; SANTOS, 2012).

As células germinativas começam uma série de transformações equacionais e reducionais até a formação dos espermatozoides. Estes são transportados do interior dos testículos através da rede testicular, intimamente relacionada com os ductos eferentes. Tais ductos são os remanescentes do rim mesonéfrico embrionário, e ligam os testículos ao ducto de Wolff (GILBERT, 2003; HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2012).

O ducto Wolffiano era o tubo coletor do rim mesonéfrico embrionário. Em machos, se diferencia em vasos deferentes através do qual o espermatozoide passa para uretra e são expelidos para fora do corpo (GILBERT, 2003; HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2012).

Durante o desenvolvimento fetal, as células mesenquimais intersticiais dos testículos se diferenciam em células de Leydig, que produzem a testosterona. As células indiferenciadas de suporte ou sustentação dos cordões testiculares se diferenciam em células de Sertoli, que auxiliam o desenvolvimento do espermatozoide e secretam o hormônio anti-Mülleriano (GILBERT, 2003; HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2012).

Nos fetos, a produção de andrógenos, principalmente a testosterona (ANTONIO-RUBIO et al., 2011), e a interação com seus respectivos receptores nos testículos (MERLET et al., 2007) é a responsável pela masculinização da genitália externa dos machos. A falta da ação do hormônio anti-Mülleriano e a ausência da produção de testosterona no início da vida fetal, resultam na formação das tubas uterinas, útero e vagina, que caracteriza o animal fêmea. Assim, com a regressão dos testículos ocorre a formação dos ovários e a produção dos hormônios femininos pela formação dos folículos primordiais nas fêmeas de mamíferos (HAFEZ, 1995; CONLEY; HINSHELWOOD, 2001; GRUNERT; BIRGEL; VALE, 2005; REY, 2005; GLICKMAN et al., 2006). Os principais órgãos produtores de andrógenos são os testículos (nas células de Leydig) e as glândulas suprarrenais (zona *reticularis*). O andrógeno liga-se ao seu receptor e desencadeia uma série de eventos que resultam na síntese de proteínas específicas e na proliferação celular (adaptado de MOREIRA, 2008).

Assim, os hormônios participantes das funções reprodutivas são os esteroides, ou seja, substâncias derivadas do colesterol. Em mamíferos, os principais tecidos produtores de colesterol são a pele, fígado, e mucosa intestinal; a atividade biosintética mensurável também é encontrada no pulmão, rim, adrenal,

gônadas, músculos, cérebro e tecido adiposo (NORMAN; LITWACK, 1997). A estrutura de cada hormônio é dependente da glândula onde são formados e da função a ser exercida no organismo. Os andrógenos (19 carbonos), estrógenos (18 carbonos) e progestágenos (21 carbonos) compõem a classe de hormônios sexuais, os quais são transportados pelo sangue até o órgão alvo. Assim, o colesterol sofre clivagem e se transforma em pregnenolona; este, por sua vez, através da ação da enzima 3 β -HSD (hidroxiesteroide-desidrogenase), se transforma em progesterona. Ambos, pela ação da enzima 17 α -hidroxilase, são convertidos em 17- α -hidroxipregnenolona e 17- α -hidroxiprogesterona, respectivamente. Tais hormônios são os primeiros da classe de progestágenos. Ainda, na mesma segmentação, pela clivagem da 17,20-liase, originam-se a dehidroepi-androsterona (DHEA) e a androstenediona, da classe dos andrógenos. O primeiro é convertido a androstenediol, já o segundo, em testosterona, pela ação enzimática da 17 β -HSD. Dando início à classe de estrógenos, a androstenediona e a testosterona são reduzidas à estrona e estradiol, respectivamente, pela ação da aromatase (NORMAN; LITWACK, 1997; CONLEY; HINSHELWOOD, 2001; GARCIA-SEGURA, 2008; GUYTON; HALL, 2011), como ilustrado na figura 1.

Figura 1 – Esquema simplificado da cadeia dos hormônios esteroides, destacando as três principais classes: progestágenos, andrógenos e estrógenos. Notar a ação das enzimas 17- α -hidroxilase, 17,20-liase e P450 aromatase

Fonte: ARROYO, M. A. M. (2013)

2.2 COMPLEXO CITOCROMO: P450 AROMATASE E P450C17 (17- α -HIDROXILASE/17,20-LIASE)

A compreensão dos complexos enzimáticos P450 em mamíferos é essencial para o desenvolvimento reprodutivo e da fertilidade. O desenvolvimento reprodutivo normal nos mamíferos é extremamente dependente do adequado regulamento da biossíntese de esteroides sexuais (CONLEY; HINSHELWOOD, 2001). Os complexos enzimáticos citocromo P450 aromatase e P450c17, associados à enzima redutora NADPH-citocromo P450 redutase, são os responsáveis pela síntese dos estrógenos a partir dos andrógenos, e dos hormônios progestágenos e andrógenos a partir da progesterona, respectivamente (KAMINSKI; CORBIN; CONLEY, 1999; SUMITANI et al., 2000; CONLEY; HINSHELWOOD, 2001; ZANATTA et al., 2011).

Os citocromos P450 são uma família de enzimas pertencentes ao grupo das heme-proteínas e residem no ambiente microssomal do retículo endoplasmático (CONLEY; HINSHELWOOD, 2001; CONLEY et al., 2007, 2009). Segundo Omura e Sato (1964), os quais caracterizaram tais enzimas em microssomas de fígado de coelho, quando na presença de ditionito de sódio, estas tem a capacidade de absorção de comprimentos de onda de 450 nm, quando a molécula de ferro é transformada em monóxido de carbono; este feito deu o nome a essas proteínas (NORMAN; LITWACK, 1997). Tipicamente, os citocromos P450 incorporam moléculas de oxigênio nos substratos por reações que são dependentes da eficiência da transferência de elétrons dos doadores de moléculas, feitas pela molécula de ferro presente na estrutura da enzima. De modo simplificado, o principal processo catalítico para a aromatização de andrógenos requer uma transferência sequencial de três pares de elétrons, o consumo de 3 moles de oxigênio e 3 moles de NADPH redutase para a síntese de um mol de estrógeno (CONLEY; HINSHELWOOD, 2001).

As enzimas citocromo P450 aromatase se expressam nas gônadas, cérebro e sistema nervoso de todos os vertebrados e até mesmo do protocordado anfioxo, regulando a produção de estrógenos e funções reprodutivas. Nos testículos, a atividade da aromatase é encontrada nas células de Sertoli antes da puberdade, e nas células de Leydig de roedores machos adultos (ABNEY, 1999). A atividade da aromatase e a transcrição também foram observadas em células germinativas

testiculares de várias espécies, incluindo espermatócitos em paquíteno, espermatídes arredondadas e alongadas, e espermatozoides do epidídimo (JANULIS et al., 1996). Portanto, a síntese das células germinativas de machos, juntamente com as células de Sertoli e de Leydig, pode ser outra fonte importante de estrógeno no trato reprodutivo masculino (CONLEY; HINSHELWOOD, 2001).

De acordo com os mesmos autores supracitados, ao nascimento há uma queda na expressão da aromatase, ainda maior após a puberdade. Nos ratos, a atividade da aromatase é um pouco mais acentuada em machos que em fêmeas (CONLEY; HINSHELWOOD, 2001).

Alguns estudos tratam da expressão e importância da citocromo P450 aromatase na via espermática, especialmente no epidídimo e ducto deferente. Em ratos machos expostos a inibidores de androgênios no epidídimo, houve uma diminuição da qualidade do espermatozoide e da fertilidade nas fases pré-puberes para puberdade, indicando um comprometimento da função dessa estrutura na reprodução (PEROBELLI et al., 2011). Existem trabalhos que mostram a correlação da presença da P450 aromatase nas células germinativas testiculares com a atividade espermática epididimária em ratos (JANULIS et al.; NITTA et al., 1993), entretanto, a ação enzimática é reduzida quando no epidídimo (JANULIS et al., 1993). Em macacos, além do testículo, o epidídimo também pode aromatizar andrógenos (PEREYRA-MARTINEZ et al., 2001). Espermatozoides isolados da cabeça do epidídimo apresentaram alta atividade da P450 aromatase, sendo no corpo e cauda significativamente reduzida, enquanto amadurecem durante o trânsito pelo epidídimo (JANULIS et al., 1998). Entretanto, nenhuma atividade dessa enzima foi relatada nas células epiteliais (SCHLEICHER; DREWS; STUMPF, 1989). Quanto ao ducto deferente, não há expressão da P450 aromatase (KWON et al., 1995; JANULIS et al., 1996).

Em relação ao citocromo P450c17, esta é uma enzima multifuncional associada à membrana do retículo endoplasmático com a dupla atividade de 17 α -hidroxilase e c17,20-liase, sendo que a primeira converte a pregnenolona e a progesterona em derivados 17- α -hidroxilados; e a c17,20-liase faz a clivagem de suas cadeias laterais para originar a dehidroepiandrosterona (DHEA) e a androstenediona (AD), respectivamente (MILLER, 2012). Esta enzima já foi purificada a partir de órgãos esteroideogênicos como os testículos, glândulas suprarrenais e ovários de vários animais (adaptado de MOREIRA, 2008).

Conley et al. (1994) analisaram que a P450c17 se expressa durante o desenvolvimento dos testículos em suínos, nas células de Leydig de recém-nascidos (CONLEY et al., 1996). Bem como Kaminski et al.¹. (1999 apud SASANO; MASON; SASANO, 1989) relataram que a mesma enzima também se expressa nas células de Leydig de javalis que já atingiram a maturidade sexual.

Liu et al. (2005) fizeram a deleção do gene CYP17 em camundongos, responsável pela expressão da enzima P450c17, para avaliar sua função no organismo e constataram que, além de sua função na biossíntese dos hormônios esteroidogênicos, esta enzima está presente nas células germinativas, da mesma forma que as concentrações de testosterona no plasma sanguíneo e testículo estavam reduzidas. Posteriormente, o mesmo autor e colaboradores (2007) examinaram o efeito deste gene na morfologia espermática, bem como a função da testosterona sobre a enzima P450c17. Para tanto, analisaram a morfologia das células de Leydig, a ultraestrutura e a morfologia espermática, e concluíram que os camundongos que sofreram a deleção do gene CYP17 apresentaram algum defeito na morfologia espermática, contudo, este gene atuou de maneira independente à testosterona. A expressão da P450c17, bem como da P450 aromatase e 3 β HSD (hidroxiesteroide-desidrogenase) foram testadas durante o desenvolvimento sexual de equinos, seja na pré-puberdade, pós-puberdade e adultos, no testículo (ALMEIDA et al., 2011). Quanto à imunohistoquímica, a expressão da P450c17 foi observada em pequenos grupos de células de Leydig imaturas, na pré-puberdade, aumentando depois da puberdade. O mesmo foi visto para a P450 aromatase. Já a atividade da enzima 3 β HSD foi registrada dentro dos túbulos seminíferos quando na pré-puberdade, diminuindo depois da puberdade (ALMEIDA et al., 2011).

Entretanto, trabalhos mais aprofundados com animais silvestres, bem como a evolução dos demais processos da espermatogênese da cutia macho criada em cativeiro associados com a expressão de enzimas importantes para a biossíntese de esteroides sexuais, como a P450 aromatase e P450c17, requerem estudos mais específicos.

¹KAMINSKI, M. A.; CORBIN, C. J.; CONLEY, A. J. Development and differentiation of the interstitial and tubular compartments of fetal porcine testes. **Biology of Reproduction**. v. 60. p. 119–127. 1999

2.3 MORFOLOGIA DOS ÓRGÃOS GENITAIS MASCULINOS

Segundo Menezes (2001), o qual relatou a morfologia dos órgãos genitais externos da cutia macho (*Dasyprocta agouti*), o sistema reprodutor está representado por um par de testículos ovalados, alongados craniocaudalmente, localizados em posição intra-abdominal, algumas vezes no ângulo inguinal ou no escroto. Durante a reprodução, os testículos descem pelo canal inguinal e logo após a cópula retornam para a cavidade abdominal. Ainda, o pênis apresenta-se de forma cilíndrico, com flexura em forma de “U”, localizado ventral à sínfise púbica e dirige-se caudalmente, abrindo-se ventral ao ânus, apresentando um osso peniano dorsal na glândula, com presença de espículas (MENEZES et al., 2003).

Os machos têm como componentes da via espermática, nos testículos, responsáveis pela formação e condução dos gametas masculinos: os túbulos seminíferos, túbulos retos e rede testicular. Os ductos eferentes, epidídimo (cabeça, corpo e cauda), ducto deferente e uretra ainda compõem este sistema, porém, fora do complexo testicular.

2.4 ESPERMATOGÊNESE

A espermatogênese é um processo sincrônico e regular de diferenciação celular, que ocorre nos túbulos seminíferos e envolve as diferentes classes de células germinativas pelo qual uma espermatogônia-tronco é gradativamente diferenciada em uma célula haploide altamente especializada, o espermatozoide (adaptado de COSTA; HENRY; PAULA, 2004).

Nos adultos, a espermatogênese é um processo contínuo, caracterizada por mudanças morfológicas e bioquímicas dos componentes do citoplasma e núcleo celular (COURROT; HOCHEREAU-DE-REVIERS; ORTAVANT, 1970), que pode ser dividida em três fases distintas: a mitótica, no qual as espermatogônias multiplicam-se e aumentam de volume, originando os espermatócitos I. A meiótica, dividida em duas fases, sendo a primeira: prófase I, caracterizada pela espiralização total dos cromossomos; metáfase I, os cromossomos homólogos ficam paralelos,

pareados; anáfase I, os cromossomos migram para os polos, possibilitando a separação dos homólogos; e telófase I, caracterizada pela organização de novas organelas. No processo final da fase I há a formação de espermátócitos II, onde ocorrerá a fase II: prófase II, determinada pela espiralização dos cromossomos, duplicação e formação das cromátides-irmãs; metáfase II, os cromossomos posicionam-se paralelamente no centro da célula para que cada um alcance seu respectivo polo; anáfase II, separação das cromátides para os polos; telófase II, similar à telófase I. E, finalmente, a espermiogênese, ou seja, a formação dos espermatozoides (COUROT; HOCHEREAU-DE-REVIERS; ORTAVANT, 1970; GURAYA, 1987).

Estudos acurados sobre a cinética da espermatogênese devem incluir não só a classificação dos estágios do ciclo do epitélio seminífero (MACHADO JÚNIOR et al., 2012), mas também a enumeração dos tipos celulares presentes, de modo que se possa acompanhar, em termos quantitativos, a evolução de cada tipo ao longo do ciclo (ASSIS NETO et al., 2003c).

Vieira et al. (2009) descreveram as associações celulares e suas respectivas frequências relativas em oito estádios do ciclo do epitélio seminífero na cutia macho criada em cativeiro, de 12 a 24 meses de vida, para avaliar a espermatogênese utilizando a técnica da morfologia tubular. Cada estágio foi caracterizado com base nas modificações ocorridas na forma e posição do núcleo das espermátides e na presença de figuras de divisão meiótica no epitélio seminífero. Os resultados mostraram que no estágio 1 haviam camadas evidentes de espermátides arredondadas próximas ao lúmen tubular, e espermatogônias tipo “A” próximas a lamina basal, juntamente às células de Sertoli com seus núcleos bem evidentes; numa porção medial do epitélio seminífero, a presença de espermátócitos primários em paquíteno e pré-leptóteno/leptóteno. O estágio 2 foi caracterizado pelo processo de alongamento das espermátides próximas ao lúmen tubular; os espermátócitos em paquítenos, seguidos dos mesmos em pré-leptóteno/leptóteno, foram encontrados distribuídos logo abaixo da camada descrita anteriormente; na base do túbulo seminífero visualizaram as células de Sertoli pouco diferenciadas do estágio 1, e espermatogônias tipo A. Estágio 3: o alongamento das espermátides já estava evidente e iniciou-se a formação de feixes, espermátócitos em zigóteno e em diplóteno próximos ao lume tubular; na camada celular basal foram vistas as células de Sertoli e espermatogônias do tipo A. O estágio 4 foi marcado pela presença de

figuras de meiose, formando placas metafásicas entremeadas aos espermatócitos em diplóteno; foram evidenciados os feixes de espermátides alongadas, e espermatogônias e espermatócito primário em zigóteno. Feixes de espermátides nitidamente direcionadas para o núcleo das células de Sertoli formando colunas bem evidentes foram descritos no estágio 5; além disso, entremeadas às colunas, observaram uma população de espermatogônias arredondadas, e próximo à membrana basal, células de Sertoli, espermatócitos primários em zigóteno e paquíteno. No estágio 6, observaram o início da dissociação e do afastamento dos feixes de espermátides alongadas das células de Sertoli, camadas de espermátides arredondadas e espermatócitos primários em paquíteno, semelhantes ao estágio anterior. A autora também evidenciou a dissociação dos feixes de espermátides, diferentemente do observado entre os estádios 3 a 6, com formação de camadas junto à borda do lúmen tubular, onde alguns corpos residuais já puderam ser observados; a presença de espermatócitos primários em paquíteno próximos à membrana basal, além de espermátides arredondadas, espermatogônias do tipo “A” e células de Sertoli, também caracterizaram o estágio 7. Por fim, no estágio 8, a espermiogênese completa: espermátides alongadas diferenciadas em espermatozoides e regularmente distribuídas pelo lúmen tubular; observaram corpos residuais dispostos perifericamente aos núcleos das espermátides, além de espermatogônias, espermatócitos primários em paquíteno e células de Sertoli.

Alguns fatores hormonais estimulam a espermatogênese: o hormônio luteinizante (LH), secretado pela hipófise anterior, estimula as células de Leydig a secretar testosterona. Esta, por sua vez, é essencial para o crescimento e divisão das células germinativas testiculares, que constituem o primeiro estágio na formação do esperma. O hormônio folículo-estimulante (FSH), também secretado pela hipófise anterior, estimula as células de Sertoli; sem essa estimulação, a espermiogênese não ocorreria. Os estrógenos, formados a partir da testosterona pelas células de Sertoli, quando estas são estimuladas pelo FSH, são também, provavelmente, essenciais para a espermiogênese. O hormônio do crescimento (GH) é necessário para controlar as funções metabólicas basais dos testículos; especificamente, promove a divisão precoce da espermatogônia; na sua ausência, a espermatogênese é severamente deficiente ou ausente, causando, assim, infertilidade (GUYTON; HALL, 2011).

2.5 PUBERDADE

Alguns autores afirmam que a cutia é considerada púbere aos seis meses de idade (DEUTSCH; PUGLIA, 1988). Contudo, Assis Neto (2002) e Assis Neto et al. (2003a, b) caracterizaram o desenvolvimento da espermatogênese da espécie criada em cativeiro de acordo com as diferentes fases de desenvolvimento sexual: impúbere, pré-púbere, púbere, pós-púbere e maturidade sexual (COUROT; HOCHEREAU-DE-REVIERS; OUTARVANT, 1970), relatando que estes animais atingem a puberdade apenas aos nove meses de vida. Para tal, utilizaram animais de 0 a 14 meses de idade, onde avaliaram o processo de luminação dos túbulos seminíferos; presença ou não de espermatócitos primários; presença ou não de espermátides arredondadas, alongada ou pronta para espermição; e início de formação ou caracterizações dos primeiros estágios do ciclo do epitélio seminífero de acordo com o método da morfologia tubular. Em animais com até 5 meses de idade predominou a presença de gonócitos e a ausência de lúmen tubular nos cordões testiculares, caracterizando a fase impúbere. Animais de 6 a 8 meses de idade apresentaram avançado processo de luminação, coincidindo com o aparecimento dos primeiros espermatócitos primário e espermátides arredondadas, no qual o autor considerou como fase pré-púbere. Entre os 9 e 10 meses de vida, houve proliferação de células espermatogênicas e presença de espermatozoides no lúmen tubular, caracterizando o estabelecimento da fase de puberdade. Após estas idades, considerou-se o período de pós-puberdade, devido à diminuição das células espermatogênicas no lúmen dos túbulos seminíferos.

Ferreira (2002) determinou o período de puberdade da mesma espécie criada em cativeiro através do mesmo processo de quantificação das células espermatogênicas em animais de 4 a 17 meses de idade. Entretanto, a autora ainda definiu a fase pós-púbere com os animais a partir dos 10 meses até os 15 meses, complementando que a partir dessa fase inicia-se uma tentativa de estabilização das células espermatogênicas, o qual é acompanhado por uma tendência a estabilização do crescimento testicular, caracterizando a fase adulta, animais com idade de 16 e 17 meses.

Não existem na literatura descrições da via espermática, principalmente do epidídimo e ducto deferente, que mostrem o comportamento dessas estruturas

durante o desenvolvimento sexual de cutias. Entretanto, Santos (2012) caracterizou o epidídimo de preás em diversas idades. O autor definiu o epitélio sendo pseudo-estratificado esterociliado, entremeado por tecido conjuntivo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). A luminação ocorreu do nascimento aos quinze dias de idade. Entretanto, nas fases púberes e pós-púberes os espermatozoides foram identificados no lúmen tubular. Quanto ao ducto deferente, do nascimento aos 150 dias de idade em preás, o epitélio mostrou-se do tipo pseudo-estratificado colunar esterociliado (SANTOS, 2012).

2.6 ULTRAESTRUTURA E TIPOS CELULARES DA ESPERMATOGÊNESE E VIA ESPERMÁTICA

A ultraestrutura é a base para determinar os estágios celulares e facilitar as comparações dos processos (BEGUELINI et al., 2011) entre cutias e roedores silvestres ou outros mamíferos. Embora já existam estudos que caracterizam os diferentes tipos celulares de acordo com as diferentes fases do desenvolvimento sexual de cutias criadas em cativeiro, contudo, ainda não foram realizados estudos da caracterização ultraestrutural das células do epitélio seminífero e, muito menos, dos componentes da via espermática desses mesmos animais associados com as fases de desenvolvimento sexual da espécie.

2.6.1 Parênquima testicular

Antes da luminação dos cordões testiculares, nestes pode-se encontrar basicamente dois tipos de células: os gonócitos, em menor número; e as células somáticas (indiferenciadas de suporte ou sustentação). As primeiras originam as espermatogônias após o processo mitótico, o qual cada célula se subdivide em dois tipos celulares, as “espermatogônias-tronco” (tipo “A”) e as células germinativas (tipo “B”). Estas últimas formam células diploides, os espermatócitos primários, que sofrem meiose, originando os espermatócitos secundários (HYTTEL; SINOWATZ;

VEJLSTED, 2012). Quanto às células indiferenciadas de suporte, estão envolvidas nas relações das células germinativas com o ambiente interno (ASSIS NETO, 2002), denominadas células de Sertoli quando na puberdade. Entre os túbulos, no espaço intersticial, a célula de Leydig é encontrada em abundância e desempenha papel fundamental, pois sintetiza os hormônios esteroides (CONLEY et al., 2007, 2009).

Em cutias criadas em cativeiro foram estudados os diferentes tipos celulares de acordo com as diferentes fases do desenvolvimento sexual. Na fase considerada impúbere, Assis Neto et al. (2003b) evidenciaram nos cordões testiculares, ao nascimento, os gonócitos e as células indiferenciadas de suporte, ambas localizadas próximas à membrana basal dos cordões. No espaço intercordonal do parênquima testicular predominavam células intersticiais de Leydig, tecido conjuntivo, células mesenquimais e vasos. Até os três meses de idade as mesmas condições celulares foram encontradas, porém, nesta idade, algumas células estavam com o núcleo bastante evidente, - consideradas como pré-espermatogônias –, além de células com indícios de degenerações e em fase de metáfase. Pela primeira vez nos animais com cinco meses de idade os autores visualizaram discretas formações de pequenos espaçamentos nos cordões testiculares, e a presença de pré-espermatogônia e/ou espermatogônias. Alguns tipos celulares permaneceram posicionados lado a lado e logo abaixo da membrana basal, formando a primeira camada do epitélio seminífero, e as células de suporte já formavam uma camada de células intermediárias; entre estas duas camadas, encontraram células em degeneração e placa metafásica.

No grupo pré-púbere, aos sete meses de idade, foi observado um desenvolvimento assincrônico devido a algumas cutias apresentarem fase de luminação e/ou outros, ainda, fase cordonal. Foram observados espermátócitos primários em diferentes etapas da prófase meiótica, inclusive células em degenerações e espermátides arredondadas. Aos oito meses não foram evidenciadas maiores transformações morfológicas, comparado ao grupo anterior, apenas observaram maior luminação nos túbulos seminíferos (ASSIS NETO et al., 2003b).

Ainda, os mesmos autores supracitados viram, aos nove meses, todos os tipos celulares se encontravam presentes na maioria das cutias, inclusive com túbulos seminíferos no estágio 8 do ciclo do epitélio seminífero, e espermatozoides liberados no lúmen tubular. Nas cutias de dez meses de idade os oito estágios do

ciclo do epitélio seminífero já se achavam presentes no parênquima testicular da maioria dos animais; a característica redonda-ovalada, quase alongada, das espermatogônias pareciam mais nítidas, localizadas próximo à lâmina basal dos túbulos seminíferos. As células de suporte apresentavam características de células maduras já diferenciadas. Nas idades subsequentes o autor não observou alterações de grande relevância no que tange às características histológicas (ASSIS NETO et al., 2003).

Santos (2012) definiu a ultraestrutura dos compartimentos intertubulares e tubulares nas diferentes fases do desenvolvimento testicular e dos componentes da via espermática de preás (*Galea spixii*), de um dia de nascido a até 150 dias de idade. Na fase púbere visualizou nos testículos os diferentes tipos de espermatogônias, sendo que a do tipo A “escura” estava muito próxima à lâmina basal, enquanto a tipo A “pálida” encontrava-se em um grau intermediário de adesão da mesma. Foram vistas as espermatogônias do tipo B, mais distantes da lâmina basal, descritas ainda, com a presença de aglomerados de cromatina condensada no núcleo. Hess e Franca (2008) ainda classificaram as espermatogônias em diferentes classes: tipo A indiferenciada (A sozinha; A pareada; A alinhada); tipo A diferenciada (A₁; A₂; A₃; A₄); espermatogônia intermediária; e espermatogônia tipo B.

Santos (2012) também relatou células em diversas fases da meiose, como espermatócitos em pré-leptóteno, leptóteno, zigóteno, em paquíteno, diplóteno, diacinese, e em metáfase. O autor ainda visualizou o aumento no grau de condensação da cromatina em torno dos complexos sinaptonêmicos, além de uma desorganização do nucléolo da fase de leptóteno para diplóteno, com certas partes associadas a uma única região cromossômica em diacinese; e a quebra do envelope nuclear na metáfase com os centríolos posicionados em polo oposto da célula.

Além disso, as espermátides foram classificadas em XII estágios diferentes: no estágio I, com núcleos esféricos, o corpo cromatóide e o complexo de Golgi estavam estreitamente relacionados, os centríolos foram vistos na proximidade da membrana plasmática e mitocôndrias estavam espalhadas por todo o citoplasma. Nas espermátides no estágio II, o desenvolvimento do complexo de Golgi e a formação de vesículas pró-acrossomal, onde mitocôndrias estavam associadas a este complexo, além do deslocamento dos centríolos para a vizinhança do complexo de Golgi. Já nas espermátides III, os centríolos estavam deslocados para o polo oposto a formação do acrossomo para o desenvolvimento do axonema. Vacúolos

pro-acrossomais, com forma redonda e compacta, juntaram-se ao envelope nuclear nas espermatídes IV, com o corpo cromatóide muito próximo à região da formação acrossoma. Este último estava em íntima associação com o envelope nuclear nas espermatídes em estágio V. Em seguida, espermatídes VI tinham o acrossoma em condensação e expansão, formando uma tampa de matriz granular densa que cobria uma grande superfície do núcleo. Espermatídes VII tinham migração do núcleo para a membrana plasmática, entretanto, este estava em início de desorganização; ainda, nesta fase celular, havia uma elevação em desenvolvimento na região distal do acrossoma que se associava com os microtúbulos. Nas espermatídes IX ocorreu o alongamento nuclear e o acrossoma assumiu forma de seta. O anel nuclear completou o seu deslocamento para a região posterior do núcleo nas espermatídes X. Espermatídes na fase XI tinham na cabeça um *perfuratorium* proeminente. E, por fim, as espermatídes XII alcançaram o formato completo de um espermatozoide, com a bainha da peça intermediária mitocondrial e da bainha fibrosa (HESS; FRANCA, 2008; SANTOS, 2012).

No espaço intercordonal de preás impúberes (SANTOS, 2012), haviam células intersticiais de Leydig e vasos sanguíneos. A membrana basal dos cordões testiculares sólidos apresentaram células mioides. Gonócitos e células indiferenciadas de suporte foram vistos no interior dos cordões testiculares. O autor ainda descreveu as células de Sertoli em diferentes fases do desenvolvimento sexual: com núcleo de formato irregular e citoplasma com poucas organelas eram as células indiferenciadas de suporte, de animais impúberes. Na fase púbere, observou o formato triangular do núcleo, o nucléolo com cromatina condensada e a presença de muitas mitocôndrias no compartimento citoplasmático (PUDNEY, 1986), além da aderência à lâmina basal e uma maior área citoplasmática. Em relação às células de Leydig, ao nascimento, tinham o núcleo com formato irregular e muitas inclusões lipídicas. Em preás com 45 dias de idade havia abundância de mitocôndrias, vesículas e retículo endoplasmático desenvolvido. Aos 90 e 120 dias, as células de Leydig também tinham várias mitocôndrias associadas ao retículo endoplasmático, porém, com poucas gotículas lipídicas (PUDNEY, 1986).

Já em morcegos sexualmente maduros da espécie *Platyrrhinus lineatus*, a ultraestrutura foi descrita de acordo com a morfologia dos tipos celulares em diferentes fases do ciclo (BEGUELINI et al., 2011). As espermatogônias do tipo “escuras” estavam muito aderidas à lâmina basal, circundadas pelas células de

Sertoli; o núcleo tinha formato ovalado, com cromatina elétron-densa e corada intensamente; no citoplasma, poucas organelas: algumas mitocôndrias, poucas extensões do retículo endoplasmático e poucos grânulos citoplasmáticos (ribossomos e/ou glicogênio). As espermatogônias do tipo “pálida” tinham um formato mais alongado, menos aderidas à lâmina basal quando comparadas às anteriores, porém, também circundadas pelas células de Sertoli e com núcleo ovalado; entretanto, a cromatina tinha coloração menos intensa; o citoplasma era amplo, com mitocôndrias, poucas extensões do retículo endoplasmático, complexo de Golgi, centríolo, ribossomos e/ou glicogênio. O último tipo espermatogonial descrito, o “B”, era menor, lateralmente circundada pelas células de Sertoli, com o topo em contato com células do compartimento adluminal (espermátocitos); o núcleo era arredondado, com nucléolo único, largo, mais compacto e centralmente localizado; as organelas citoplasmáticas eram semelhantes às encontradas nas espermatogônias do tipo “pálidas”. Seguindo o ciclo celular, os autores puderam observar espermátocitos em pré-leptóteno. Estes eram menos aderidos à lâmina basal, mais localizados em direção ao lúmen; tinham formato circular, bem como o núcleo, com cromatina homogênea, porém, o citoplasma era menor, com poucas organelas. A condensação da cromatina começou em espermátocitos em leptóteno. Notaram que na transição de pré-leptóteno para leptóteno, as células moveram-se da lâmina basal para o compartimento luminal; o núcleo era maior e a cromatina começou a condensar em direção à periferia do complexo sinaptonêmico. Entretanto, o núcleo dos espermátocitos em leptóteno ainda tinha a aparência de não condensado, e as organelas citoplasmáticas eram poucas. Do zigóteno à diacinese, a condensação da cromatina ocorreu gradualmente, principalmente na periferia do complexo sinaptonêmico, formando blocos distintos: os cromossomos homólogos. Ainda, os autores notaram o nucléolo organizado em leptóteno, e, perto do zigóteno, estava centralmente localizado. Em zigóteno propriamente, o nucléolo começou a ruptura, de aspecto fragmentado. Células em diplóteno tinham fragmentos nucleolares vistos perto dos cromossomos. Porém, estes fragmentos diminuíram gradualmente em diacinese. Seguindo o ciclo meiótico, na metáfase as cromatinas atingiram o pico de condensação, o envelope nuclear não era mais visto, os centríolos estavam em polos opostos e o complexo sinaptonêmico não era mais visto. Em anáfase, as fibras do fuso estavam encurtadas e o envelope nuclear

começou a se recompor. Os espermatócitos II, os quais passavam pela fase II da meiose, não puderam ser descritos, uma vez que sofreram rápida divisão.

Beguelini et al. (2011) ainda dividiram as espermátides em 12 fases, de acordo com as mudanças morfológicas, sendo: 1-3 a fase de Golgi; 4-5, fase “capuz”; 6-9 a fase acrossomal; e, de 10-12, a fase de maturação. No passo 1, as espermátides eram recém-formadas, com pouca diferenciação; o núcleo dessas células eram esféricos, com pontos de cromatina condensada; no citoplasma, o retículo endoplasmático granular e mitocôndrias foram vistos, bem como os centríolos, perto da membrana plasmática; o complexo de Golgi era pouco desenvolvido, associado com pequenas vesículas; ainda, notaram pontes intercelulares que conectavam espermátides adjacentes (sincício). Já no passo 2, o núcleo da espermátide permaneceu esférico, com pontos de cromatina condensada, e tinha nucléolo; os autores ainda observaram o complexo de Golgi, com alto nível de desenvolvimento, maior tamanho e aumento no número de cisternas; viram que as vesículas começaram a se fundir com as outras e a formar amplas vesículas pró-acrossômicas; o corpo cromatóide e conjuntos de mitocôndrias estavam associados com o complexo de Golgi; também, os centríolos estavam deslocados para as vizinhanças deste complexo; porém, as demais organelas eram semelhantes às do passo 1. As espermátides em nível 3 eram muito semelhantes às anteriores, entretanto, os centríolos estavam deslocados ao polo oposto à formação do acrossomo, sendo que o distal começou a se desenvolver para formar o axonema; o complexo de Golgi, corpo cromatóide e mitocôndrias estavam intimamente associados. No início de uma nova fase, o complexo de Golgi das células produziram vesículas pró-acrossômicas elétron-densas e elétron-lucidas; ambos formaram vacúolos pró-acrossômicos e aderiram ao envelope nuclear, formando a concavidade do núcleo; a forma nuclear ainda era esférica, com cromatina condensada; o corpo cromatóide estava se formando, junto à região de formação do acrossomo. No passo 5, o acrossomo estava mais intimamente associado com o envelope nuclear, começando a cobrir o núcleo; a produção e fusão das vesículas pró-acrossômicas ao acrossomo pelo complexo de Golgi continuava. Na terceira fase, o acrossomo começou a condensar, formando um capuz que cobriu grande superfície do núcleo; nisso, o complexo de Golgi estava pouco desenvolvido, começando a regredir; o axonema se expandiu; e ainda, os autores observaram a presença do corpo cromatóide, conectado ao anel e associado com o

desenvolvimento do flagelo. No nível 7, o núcleo da espermatíde migrou em direção à membrana plasmática; o citoplasma também migrou, mas para a região caudal da célula; ainda, os acrossomos cobriam uma grande superfície nuclear; notaram o desenvolvimento de uma elevação, associada com microtúbulos, além da desorganização nucleolar. No próximo passo, o citoplasma estava deslocado para o polo posterior da célula e o núcleo atribuiu à membrana plasmática; os acrossomos apresentaram forma compacta, envolvendo toda a região anterior do núcleo; neste nível, notaram a formação de “manquetes”, atribuídos à elevação do acrossomo, auxiliares da elongação nuclear, além dos microtúbulos. No final da fase acrossomal, já era nítida a elongação nuclear e o anel associado ao núcleo; no passo 9 ocorreram as principais mudanças nucleolares, onde o nucléolo não pode ser observado. No nível 10, o anel nucleolar completou seu deslocamento para a região posterior do núcleo, e começou sua migração caudal; a peça intermediária estava bem organizada, com mitocôndrias em associação com o filamento axial, e a formação do *perfuratorium* na região rostral do núcleo. Em 11, a cabeça da espermatíde estava alongada e compacta, com o *perfuratorium* proeminente; a cauda também estava formada e as mitocôndrias em alinhamento com a peça intermediária. Por fim, as espermatídes tinham a forma de um espermatozoide, com bainha mitocondrial, da peça intermediária, e bainha fibrosa, da peça principal; e o citoplasma estava completamente fora das células (HESS; FRANCA, 2008; BEGUELINI et al., 2011).

2.6.2 Epidídimo

O epidídimo é um tubo único enovelado, formado por epitélio colunar pseudoestratificado, composto por células basais arredondadas e células colunares principais estereociliadas (KERR, 2000; BACHA; BACHA, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Externamente, o ducto epididimário é envolto por células mioídes, cujas contrações peristálticas ajudam a mover o fluido ao longo do tubo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Além desses tipos celulares, células apicais, células “limpas” (COOPER, 1986; ROBAIRE; HINTON; ORGEBIN-CRIST, 2006) e células halóides também podem compor o epitélio (SCHIMMING et al., 2012). As

tight junctions são vistas com frequência entre as células do epidídimo (SCHIMMING et al., 2012).

As células colunares principais são caracterizadas pelo seu alto poder secretório (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008), endocitótico e seus núcleos basais e alinhados (ROBAIRE; HINTON; ORGEBIN-CRIST, 2006). Esse tipo celular sintetiza grande quantidade de proteínas, as quais ficam retidas nas células, ou são ativamente secretadas para o compartimento adluminal (COOPER, 1986; HERMO; OKO; MORALES, 1994; ROBAIRE; HINTON; ORGEBIN-CRIST, 2006; ORSI et al., 2009b). Já as células basais sempre são encontradas aderidas à lâmina basal (BACHA; BACHA, 2003), funcionalmente designadas, principalmente, à “proteção epitelial” (COOPER, 1986; ROBAIRE; HINTON; ORGEBIN-CRIST, 2006). As células halóides, muitas vezes vistas como linfócitos (COOPER, 1986) tem a finalidade imune e são localizadas em todo o epitélio do epidídimo, na base do mesmo (ROBAIRE; HINTON; ORGEBIN-CRIST, 2006). As células apicais não tem contato com a lâmina basal e possuem o núcleo esférico (ROBAIRE; HINTON; ORGEBIN-CRIST, 2006). Por sua vez, as células “limpas” são definidas por conter em sua região apical numerosas depressões, vesículas, endossomos, corpos multivesiculares e lisossomos, além do núcleo, na região basal e gotículas lipídicas (ROBAIRE; HINTON; ORGEBIN-CRIST, 2006), atribuídas a acidificação luminal.

O epidídimo de preás (*Galea spixii*) nas fases impúbere e púbere era composto pelas células basais e principais. O retículo endoplasmático granular e mitocôndrias estavam em evidência nas regiões citoplasmáticas (SANTOS, 2012). Já em *Agouti paca*, Orsi et al. (2009b) encontraram, basicamente em todas as porções do epidídimo, retículo endoplasmático granular em abundância nas células principais, no citoplasma supranuclear, bem como complexo de Golgi desenvolvido; vesículas com formas e conteúdo variados, e lisossomos também foram observados. Ainda, notaram cavéolas formadas na membrana citoplasmática apical, sendo que algumas delas se invaginavam para o citoplasma, formando vesículas pálidas, características do processo de endocitose. Células principais, basais, apicais e “limpas” compunham o epitélio epididimal de cães sem raça definida (SCHIMMING et al., 2012). Os autores notaram que as células basais eram pobres em organelas; entretanto, as células principais e apicais continham muitos endossomos, vesículas e mitocôndrias adjacentes a corpos multivesiculares, além do complexo de Golgi. As células “limpas” continham muitos elementos vesiculares e vacúolos, diversas

mitocôndrias, retículo endoplasmático (na região infranuclear) e complexo de Golgi (região supranuclear) (SHIMMING et al., 2012).

2.6.3 Ducto deferente

O ducto deferente é definido por ser um tubo oco (KERR, 2000), constituído por uma envoltória e grossa camada de músculo liso e por uma mucosa, caracterizada por epitélio pseudoestratificado estereociliado (KERR, 2000; BACHA; BACHA, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Aderidas à mucosa, há uma camada de células basais, muitas vezes não identificadas (KERR, 2000), além da lâmina própria. A função do epitélio é desconhecida, embora tenham sido descritas atividades secretoras e de absorção (KERR, 2000).

Em preás de diferentes idades, foram vistas as células basais e principais estereociliadas. Evidenciou-se o complexo de Golgi, mitocôndrias, retículo endoplasmático granular e liso, bem como o núcleo (SANTOS, 2012).

Nos ductos deferentes de pacas (*Agouti paca*) adultas, foram vistos o aparelho de Golgi, retículo endoplasmático, lisossomos, corpos multivesiculares, mitocôndrias e filamentos intermediários, além de uma grande quantidade de vesículas variáveis no citoplasma e um endossoma. No citoplasma supranuclear das células principais dos vasos deferentes, havia retículo endoplasmático rugoso, filamentos intermediários, lisossomos, vesículas revestidas de dupla membrana; eram notáveis vesículas com tamanhos variáveis, formas e conteúdos, principalmente perto do retículo endoplasmático. Também, no citoplasma apical das células principais destacaram-se as cisternas e lamelas do retículo endoplasmático rugoso, polissomos, estruturas tubulares, os complexos “junctions”, corpos multivesiculares, as mitocôndrias e lisossomos, bem como grande quantidade de vesículas apicais com diversos tamanhos, formas e conteúdo. Nas células basais havia escassez de organelas citoplasmáticas. Nas expansões citoplasmáticas apicais das células principais, foram vistas microvilosidades, projetadas na luz tubular. No citoplasma dessas células viu-se o retículo endoplasmático com um grânulo denso; ainda, corpos multivesiculares e lisossomos. Nos cortes seccionados puderam-se ver espermatozoides intraluminal (ORSI et al., 2009a).

JUSTIFICATIVA

3 JUSTIFICATIVA

A fim de aprofundar os conhecimentos sobre a espermatogênese e via espermiática de cutia (*Dasyprocta sp.*) criada em cativeiro, associando estes processos à expressão das enzimas do complexo citocromo P450: P450 aromatase e P450c17 (17- α -hidroxilase/17,20-liase), importantes para a biossíntese de hormônios ligados à reprodução, este trabalho ressalva a importância da reprodução da espécie silvestre em cativeiro para sua preservação e criação racional. A análise do comportamento da ultraestrutura do epitélio seminífero durante o desenvolvimento da espermatogênese irá contribuir e melhor a abranger a função testicular e a fisiologia reprodutiva da espécie em estudo.

Ressalta-se ainda que esta pesquisa dar-se-á a oportunidade para estudarmos as enzimas necessárias para a síntese de andrógenos em animais silvestres. Na literatura não há descrições das enzimas citocromo associadas às fases do desenvolvimento sexual de cutias criadas em cativeiro. Sendo assim, pretendemos ampliar nossa linha de pesquisa em relação à espermatogênese da cutia criada em cativeiro e investigar as expressões de enzimas importantes para o desencadeamento deste mecanismo como, por exemplo, a P450c17, enzima diretamente responsável pela síntese de andrógeno e pouco estudada em gônadas de espécies domésticas silvestres (ASSIS NETO et al., 2010).

4 HIPÓTESE E OBJETIVOS

Considerando a hipótese de que o comportamento de expressão das enzimas do complexo citocromo P540 permanece o mesmo no testículo e na via espermática de cutias durante as fases de desenvolvimento sexual, o objetivo geral deste trabalho é detalhar a ultraestrutura dos componentes desta via, constatar o desenvolvimento do processo espermatogênico e a atuação das enzimas citocromo P450: P450 aromatase e P450c17 (17- α -hidroxilase/17,20-liase) nas diferentes fases do desenvolvimento sexual (impúbere, pré-púbere, púbere e pós-púbere), previamente definidas por Assis Neto et al. (2003b).

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Definir ultraestruturalmente o epidídimo e o ducto deferente de cutias, bem como o testículo e seus componentes nas diferentes fases do desenvolvimento sexual.

Imunolocalizar a expressão no parênquima testicular, epidídimo e ducto deferente das enzimas citocromo P450 aromatase e 17- α -hidroxilase/17,20-liase, relacionando-as com as diferentes fases do desenvolvimento sexual.

5 MATERIAL E MÉTODOS

O material e os procedimentos utilizados apresentam-se em tópicos, a seguir:

5.1. ANIMAIS

Foram utilizados 28 cutias (*Dasypsecta sp.*), provenientes do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres – CEMAS – da Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró, Rio Grande do Norte (Autorização IBAMA nº 2028236/2008).

5.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Coletaram-se os testículos e os segmentos da via espermática (epidídimo e ducto deferente) de animais de diferentes idades, agrupados de acordo com as fases do desenvolvimento sexual, estabelecidas por Assis Neto et al. (2003b) para cutias criadas em cativeiro, sendo cada grupo composto por dois animais de cada idade, como definido a seguir:

- Grupo 1 - impúbere: animais de um dia de nascido; 1, 2, 3 e 4 meses de idade;
- Grupo 2 - pré-púbere: animais de 5, 6, 7 e 8 meses de idade;
- Grupo 3 - púbere: animais de 9, 10 e 11 meses de idade;
- Grupo 4 – maturidade sexual: animais de 12 e 14 meses de idade.

5.3 MICROSCOPIA DE LUZ – HEMATOXILINA E EOSINA

Para o estudo histológico foram realizadas secções transversais seriadas para obtenção de fragmentos dos testículos, epidídimo e ducto deferente,

previamente fixados em solução de paraformaldeído a 4%, por um período de 24 horas. Em seguida, foi feita a remoção do fixador com soluções de PBS (tampão sódio fosfato). Após a lavagem, os fragmentos foram desidratados em uma série de etanóis em concentrações crescentes (de 70 a 100%) e diafanizados em duas baterias de xilol, por 1 hora em cada seção, seguidos de inclusão em parafina Histosec® (adaptado de TOLOSA et al., 2003). Os blocos de parafina e suas diferentes porções foram cortados em micrótomo LEICA® em espessura de 5 µm e, posteriormente, corados seguindo as técnicas de Hematoxilina e Eosina (HE).

5.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO – MET

Foram realizadas secções transversais seriadas para obtenção de fragmentos dos testículos, epidídimo e ducto deferente, previamente fixados em glutaraldeído 2,5%¹. O material foi lavado em tampão de sódio fosfato (PBS) a 0,1M pH 7,4, em três séries durante 10 minutos, e pós-fixado em tetróxido de ósmio 1%², por 1 hora. Após novas lavagens em tampão fosfato, os fragmentos foram desidratados em álcool etílico a 50%, 70%, 90% e 100%, e lavados em óxido de propileno³. Por 12 a 16 horas, os fragmentos permaneceram sob-rotação a 1:1 de óxido de propileno e resina³. Na sequência, essa mistura foi substituída por resina pura, por 4 a 5 horas. Após este período, foram incluídos em moldes com resina pura, em estufa a 69°C, por 72 horas, para consolidar a polimerização da mesma (FERNANDEZ et al., 2013).

Posteriormente, foram realizados os procedimentos para os cortes semifino e ultrafino.

¹Glutaraldehyde grade I: 70% aqueous solution (Sigma chemical Co., USA)

²Osmium tetroxide 4% w/w solution in water (polyscience, Inc., USA)

³Spurr Spurr's kit-Electron Microscopy Sciences, Co. USA

5.4.1 Processamento para cortes semifinos

Com o intuito de localizar e caracterizar as áreas de interesse, os blocos de resina foram cortados em ultra micrótomo LEICA®. Cortes semifinos de 1µm de espessura foram obtidos, corando-se o quente com solução de borato de sódio a 1% em água destilada, contendo 0,25% de azul de toluidina para observação ao microscópio de luz.

5.4.2 Processamento para cortes ultrafinos

Os cortes ultrafinos, de cerca de 60 nm de espessura, foram colhidos em telas de cobre e contrastados pelo acetato de uranila 2% em água destilada, por 5 minutos e, pelo citrato de chumbo 0,5% em água destilada, durante 10 minutos. As observações e eletromicrografias sub-celulares foram realizadas no microscópio eletrônico da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – FMVZ – USP (FERNANDEZ et al., 2013).

5.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA – MEV

Para o processamento destinado à microscopia eletrônica de varredura, os fragmentos dos testículos e via espermática foram fixados em paraformaldeído a 4%, seguidos de lavagem em tampão fosfato a 0,1M, pH 7,4 e pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1%. Seguiram desidratações em álcool etílico de concentrações crescentes (50% a 100%) e secagem em ponto crítico (Balzers CPD 020). Posteriormente, fez-se a montagem em suportes metálicos (“stubs”) e revestiu-os com ouro (“sputtering” Emitech K 550) (FERNANDEZ et al., 2013). A microscopia de varredura foi realizada em um Microscópio Eletrônico Leo 435 VP, na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – FMVZ – USP.

5.6 TESTE IMUNOHISTOQUÍMICO PARA CITOCROMO P450 AROMATASE, CITOCROMO P450C17

Segmentos distintos dos testículos, em cada uma das fases do desenvolvimento testicular, sofreram o mesmo processamento de inclusão em parafina Histosec® que àqueles para microscopia de luz. Posteriormente, foram obtidos cortes de 5µm de espessura em micrótomo Leica RM 2155, seguidos de desparafinização em estufa a 37°C.

Todos os cortes foram imersos em tampão citrato e aquecidos em micro-ondas por 15 minutos, a fim de que os antígenos que antes estavam em parafina ficassem exteriorizados para posterior ligação com os anticorpos a que seriam expostos. Após o resfriamento à temperatura ambiente, fez-se a lavagem com água destilada sob agitação, seguido de lavagem com tampão fosfato (PBS).

O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com Peroxidase Block® (Dako® 0679 concentração 3%), por 10 minutos à temperatura ambiente e em câmara úmida. Posteriormente, lavaram-se novamente os cortes com PBS e fez-se o bloqueio com Protein Block® (Dako® 0679) por 10 minutos à temperatura ambiente e em câmara úmida. Em seguida, aplicou-se o anticorpo primário (P450 aromatase [1:100]⁴; P450c17 [1:100]⁵), e nos controles negativos, PBS. Os cortes foram incubados “overnight” à 4°C em câmara úmida.

O protocolo⁶ foi seguido lavando os cortes com tampão fosfato e incubando-os com anticorpo secundário (Dako® 0679), por 15 minutos à temperatura ambiente e em câmara úmida. Lavou-se cada corte com PBS com posterior incubação com solução amplificadora (Dako® 0679), por 15 minutos à temperatura ambiente e em câmara úmida. Sob agitação, os cortes foram lavados com tampão fosfato e incubados com diaminobenzidina (DAB Dako®) por 5 minutos. Lavaram-se os cortes com água destilada sob agitação, e foram contracolorados com hematoxilina por 15 segundos. Por fim, as lâminas foram montadas e analisadas.

⁴Abcam® - Rb pAb to aromatase 50 µg; ab18995

⁵Abcam® - Rb pAb to cytochrome P450 17A1 10 µg; ab80206

⁶Protocolo adaptado do LEME – Laboratório para Estudos Morfofuncionais e Endocrinologia, Departamento de Cirurgia, FMVZ/USP – São Paulo, SP

6 RESULTADOS

Os resultados foram descritos nos tópicos a seguir:

6.1 ULTRAESTRUTURA

As descrições ultraestruturais foram feitas de acordo com o segmento analisado. No testículo, ainda, realizou-se a caracterização da linhagem espermatogênica e seus tipos celulares.

6.1.1 Parênquima testicular

O testículo (figura 5) de animais impúberes era constituído pelos cordões testiculares, uma vez que estes não tinham o lúmen formado e os espermatozoides eram ausentes. Entretanto, por volta dos 4 meses de idade, os cordões começaram a sofrer o processo de luminação (figura 2). Neste período, foi possível observar as células de Leydig no espaço intercordonal, bastante evidentes e de núcleo de formato irregular, próximas a vasos sanguíneos, e ambos em tecido conjuntivo. Já os cordões testiculares eram compostos mais externamente pelas células mioides. Estas tinham o núcleo fortemente corado, achatado longitudinalmente. Próximas à lâmina basal, diferentes tipos espermatogoniais foram vistos: tipo “B” e as chamadas espermatogônias tipo “A” escuras. Os espermatócitos primários foram observados distantes da lâmina basal e mais próximos ao centro do cordão testicular. Muitas células de suporte ou sustentação encontravam-se na região média do cordão testicular, sendo estas com o núcleo ovoide. Em alguns cortes viram-se poucas células em degeneração.

Distinto era o testículo de animais pré-púberes quando comparados ao grupo anterior (figura 3). Notoriamente observou-se o completo processo de luminação dos túbulos seminíferos e a disposição do epitélio germinativo em diferenciação. As

células de Sertoli, derivadas das células indiferenciadas de suporte ou sustentação, também foram vistas, e suas extensões citoplasmáticas envolviam as células da linhagem espermatogênica, principalmente os espermátócitos. Puderam-se identificar espermatogônias do tipo “B” entre as células de Sertoli. Ainda, observaram-se, mais distantes da lâmina basal, os espermátócitos primários em diferentes estágios da meiose, principalmente em paquíteno. Espermátides arredondadas nas distintas fases morfológicas foram identificadas na porção média do túbulo seminífero e próximas ao lúmen. Ainda, em estágio mais avançado estavam as espermátides alongadas, muitas delas já com peça intermediária e com núcleo em forma de flecha. Foi possível observar corpos residuais próximos ao lúmen. As células mioides circundavam os túbulos, bem como tecido conjuntivo. As células de Leydig tinham seus núcleos de formato indefinido e grandes; o citoplasma era repleto de vesículas de secreção.

No grupo de animais púberes (figura 4), os testículos eram semelhantes ao grupo anterior, com células em diferentes estágios de desenvolvimento. As espermatogônias do tipo “A” foram identificadas, bem como as espermatogônias intermediárias. Espermatogônias do tipo “B” também estavam presentes, um pouco mais distantes da lâmina basal. Entre os diferentes tipos espermatogoniais puderam ser observadas as células de Sertoli, que tinham extensões citoplasmáticas entremeando a linhagem espermatogênica. Espermátócitos em pré-leptóteno, paquíteno e diplóteno foram identificados em maior frequência. Raras às vezes em que se pode evidenciar espermátócitos secundários, e quando notados, eram menores que as células anteriores. As espermátides arredondadas estavam presentes, próximas ao lúmen, bem como os corpos vesiculares. Ainda, presenciaram-se as espermátides alongadas, as quais tinham alcançado o máximo desenvolvimento espermiogênico e muitas já estavam em nível de espermição. Portanto, foi possível visualizar espermatozoides no lúmen. As células mioides foram identificadas ao redor dos túbulos, assim como as células de Leydig, no espaço intersticial. Estas últimas tinham formato indefinido, bem como seu núcleo; muitas vesículas secretoras puderam ser observadas no seu citoplasma.

O mesmo foi observado nos animais em idades mais avançadas (figura 4).

Figura 2 - Testículo de cutia (*Dasyprocta sp.*), impúbere. No espaço intercordonal: Ly: célula de Leydig; vv.: vasos sanguíneos; ponta da seta tracejada: tecido conjuntivo. No cordão testicular: ponta da seta fechada: célula mioide; B: espermatogônia tipo "B"; Ae: espermatogônia "escura"; el: espermatócito primário; s: células indiferenciadas de suporte/sustentação; d: célula em degeneração; (*): cordão testicular em processo de luminação. Aumento 100x, coloração azul de toluidina, corte semifino

Fonte: ARROYO, M. A. M. (2013)

Figura 3 – Testículo de cutia (*Dasyprocta sp.*), pré-púbere. Ponta da seta fechada: célula mioide; ponta da seta tracejada: túnica albugínea; S: célula de Sertoli; A: espermatogônia tipo “A”; B: espermatogônia tipo “B”; Pq: espermatócito em paquíteno; ell: espermatócito secundário; Ar: espermátides arredondadas; Al: espermátides alongadas; (*): lúmen com resíduos espermáticos; cabeça da seta: vesícula acrossômica; ponta da seta aberta: peça intermediária do espermatozoide. Aumento 100x, coloração azul de toluidina, corte semifino

Fonte: ARROYO, M. A. M. (2013)

Figura 4 – Testículo de cutia (*Dasypsecta sp.*), púbere e maturidade sexual. **(A)**: Ly: célula de Leydig; ponta da seta: célula mioide; Ap: espermatogônia tipo “A” pálida; Ae: espermatogônia tipo “A” escura; B: espermatogônia tipo “B”; S: célula de Sertoli; P/L: espermatócito em pré-leptóteno; Pq: espermatócito em paquíteno; ell: espermatócito secundário; Ar: espermatíde arredondada. **(B)**: ponta da seta fechada: célula mioide; ponta da seta tracejada: tecido conjuntivo; Ap: espermatogônia tipo “A” pálida; Ae: espermatogônia tipo “A” escura; I: espermatogônia intermediária; B: espermatogônia tipo “B”; S: célula de Sertoli; Pq: espermatócito em paquíteno; Ar: espermatíde arredondada; Al: espermatíde alongada; cabeça da seta: acrossomo em formação; R: corpos residuais. **(C)**: Pq: espermatócito em paquíteno; Ar: espermatíde arredondada; Al: espermatíde alongada; R: corpos residuais; sptz: espermatozoides. Aumento 100x, coloração azul de toluidina, corte semifino

Fonte: ARROYO, M. A. M. (2013)

Figura 5 – Testículo de cutia (*Dasyprocta sp.*). **(A)**: disposição enovelada dos cordões testiculares ou túbulos seminíferos. **(B)**: cordão testicular, pré-púbere; notar o processo de luminação. **(C)**: túbulo seminífero, maturidade sexual; sptz: espermatozoides. Eletromicrografia, método MEV

Fonte: ARROYO, M. A. M. (2013)

6.1.2 Caracterização da linhagem espermatogênica

Mais próximas à lâmina basal, foram vistas diversos tipos espermatogônias (figura 10). Na pré-puberdade, as do tipo “A” ainda eram abundantes, porém, com o avançar dos grupos etários, a predominância era das espermatogônias do tipo “B”. Convizinhas a essas células eram os espermátócitos. A partir da puberdade, puderam-se observar células em diplóteno e/ou em paquíteno muito rentes à lâmina basal e entremeadas a elas, viram-se as células de Sertoli. Em direção ao lúmen destacaram-se as espermátides arredondadas. Ainda, a partir do grupo pré-púbere, próximas ao lúmen, foram possíveis observar espermátides alongadas em diferentes níveis da espermiogênese (figuras 3 e 4).

O epitélio seminífero testicular era típico por conter células em diversas fases da meiose (figuras 6-8). A partir da pré-puberdade, em idades mais avançadas, pode-se observar nitidamente os diferentes estágios celulares. Após os 5 meses de idade, notaram-se, em sua maioria, células em prófase, seguidas das diversas subdivisões meióticas, em destaque para os espermátócitos em paquíteno (figura 9).

Os espermátócitos em leptóteno foram identificados por terem a carioteca bem definida e indícios de condensação da cromatina; poucas vezes foi possível observar o nucléolo nessas células; seu citoplasma era extenso e mais claro que o núcleo, e muitas mitocôndrias eram presentes (figuras 6B; 7C). Em zigóteno, a cromatina estava mais condensada e aglomerada em um dos polos do núcleo, dando o aspecto de “meia-lua” ao mesmo; assim como na fase anterior, o citoplasma era volumoso (figuras 6A, B; 7B; 8A). Na fase de paquíteno, era evidente a condensação da cromatina; pode-se notar a formação do complexo sinaptonêmico, bem como a desorganização nucleolar e sua migração para a extremidade do núcleo; mais restrito era o citoplasma quando comparado às fases anteriores (figuras 6D, E; 7B, C; 9). Já em diplóteno, o núcleo destacou-se pela presença de cromatinas mais condensadas e o nucléolo em contato com o envelope nuclear (figuras 6; 7C; 8D). Não foi possível observar espermátócitos em diacinese.

Não foi possível observar o epitélio de testículos em microscopia eletrônica de transmissão de animais impúberes devido à fragilidade do material.

Figura 6 – Células da linhagem espermatogênica em cutia (*Dasypsecta* sp.), a partir da pré-puberidade. **(A)**: m: célula mioide; A: espermatogônia tipo “A”; Zg: espermatócito em zigóteno; Dp: espermatócito em diplóteno. **(B)**: m: célula mioide; A: espermatogônia tipo “A”; Se: célula de Sertoli; Dp: espermatócito em diplóteno; Zg: espermatócito em zigóteno; Lp: espermatócito em leptóteno. **(C)**: m: célula mioide; B: espermatogônia tipo “B”; Dp: espermatócito em diplóteno. **(D)**: m: célula mioide; Pq: espermatócito em paquíteno; Se: célula de Sertoli; Dp: espermatócito em diplóteno. **(E)**: m: célula mioide; B: espermatogônia tipo “B”; Dp: espermatócito em diplóteno; Pq: espermatócito em paquíteno; Se: célula de Sertoli. **(F)**: Lb: lâmina basal; Dp: espermatócito em paquíteno. Eletromicrografia, método MET

Fonte: ARROYO, M. A. M. (2013)

Figura 7 – Células da linhagem espermatogênica em cutia (*Dasyprocta sp*), a partir da pré-puberdade. **(A)**: espermatogônia tipo “B”; notar o núcleo com dois nucléolos; ponta da seta: cromatina condensando. **(B)**: In: espermatogônia intermediária; Pq: espermatócito em paquíteno; Se: célula de Sertoli. **(C)**: Se: célula de Sertoli; Pq: espermatócito em paquíteno; Lp: espermatócito em leptóteno; Dp: espermatócito em diplóteno. **(D)**: Lp: espermatócito em leptóteno; Zg: espermatócito em zigóteno; Se: célula de Sertoli. Eletromicrografia, método MET

Fonte: ARROYO, M. A. M. (2013)

Figura 8 – Células da linhagem espermatogênica em cutia (*Dasypsecta sp.*), a partir da pré-puberdade. **(A)**: ear: espermátide arredondada; Zg: espermátócito em zigóteno. **(B)**: Dp: espermátócito em diplóteno; eal: espermátide alongada. **(C)**: ear: espermátide arredondada; sptz: espermatozoide. Eletromicrografia, método MET

Fonte: ARROYO, M. A. M. (2013)

Figura 9 – Diferentes fases dos espermatócitos em paquíteno de cutia (*Dasyprocta sp.*). **(A)**: ponta da seta: formação do complexo sinaptonêmico. **(B-D)**: notar a desorganização do nucléolo e sua migração para a extremidade nuclear, bem como a condensação da cromatina. Eletromicrografia, método MET

Fonte: ARROYO, M. A. M. (2013)

6.1.3 Tipos espermatogoniais

No epitélio germinativo dos cordões/túbulos seminíferos foram encontrados diversos tipos espermatogoniais: espermatogônias do tipo “A” pálidas, “A” escuras, tipo “B” e algumas em estágio intermediário (figura 10).

Maiores e em evidência eram as do tipo “A” pálidas (figuras 10A, B). Essas células tinham o núcleo grande e de formato oval, seu nucléolo não era proeminente e no citoplasma puderam-se observar mitocôndrias. Eram encontradas muito próximas à lâmina basal e, geralmente, estavam rodeadas pelas células de Sertoli. Em idades avançadas eram próximas à espermatócitos.

Já as espermatogônias classificadas como “A” escura tinham núcleo redondo/ovalado e o nucléolo era evidente, sempre muito próximo ao envelope nuclear, em alguma extremidade do mesmo. No citoplasma dessas células foram vistas diversas mitocôndrias. Pode-se observar que algumas estavam mais distantes da lâmina basal (figuras 10C, D).

Outro tipo espermatogonial, classificada como intermediária, tinha características próximas às do tipo “A” escura, entretanto, no núcleo foi possível notar a condensação da cromatina e o nucléolo não estava mais aderido ao envelope nuclear, se aproximando da região central do núcleo (figura 10E).

Assim como as espermatogônias do tipo “A” pálidas, as do tipo “B” foram vistas ao redor de espermatócitos em diferentes fases de diferenciação. Seu núcleo tinha formato ovoide irregular e grande, e o nucléolo destacou-se em posição centralizada no núcleo. A cromatina foi observada e estava em processo de condensação. Ainda, esse tipo celular estava menos aderido à lâmina basal (figura 10F).

Figura 10 – Diferentes tipos de espermatogônias em cutia (*Dasyprocta sp.*). **(A)**: espermatogônia tipo “A” pálida. **(B)**: espermatogônia tipo “A” pálida e espermatócito em paquíteno. **(C e D)**: espermatogônias tipo “A” escura. **(E)**: espermatogônia intermediária. **(F)**: espermatogônia tipo “B” e espermatócito em paquíteno. (A-F): N: núcleo; No: nucléolo; Lb: lâmina basal; Mi: mitocôndria. (B e F): Pq: espermatócito em paquíteno. (E e F): ponta da seta: cromatina condensando. (F): m: célula mioide. Eletromicrografia, método MET

Fonte: ARROYO, M. A. M. (2013)

6.1.4 Célula de Sertoli

As células de Sertoli ou de sustentação, foram vistas em todos os grupos etários (figura 11). A partir da pré-puberdade, pode-se notar que o núcleo tinha formato indefinido e sempre entremeado às demais células da linhagem espermatogênica, principalmente com suas extensões citoplasmáticas. Neste grupo etário, as células de sustentação eram mais próximas à lâmina basal (figura 11A). Entretanto, nos demais grupos etários, os núcleos das células de Sertoli também estavam mais próximos ao lúmen do túbulo seminífero.

Puderam-se observar diversos estágios das células de Sertoli, em algumas o nucléolo estava em evidência, em outras, a cromatina condensando. Ainda, *tight junctions* puderam ser vistas (figura 11B).

Figura 11 – Célula de Sertoli em cutia (*Dasyprocta sp.*), pré-puberdade e puberdade. **(A)**: m: célula mioide; Lb: lâmina basal; Pl: espermatócito em pré-leptóteno; Pq: espermatócito em paquíteno; N: núcleo; No: nucléolo; ponta da seta: cromatina condensando. **(B)**: Zg: espermatócito em zigóteno; N: núcleo; ponta da seta: nucléolo condensando; cabeça da seta: *tight junctions*. Eletromicrografia, método MET

Fonte: ARROYO, M. A. M. (2013)

6.1.5 Célula de Leydig

As células de Leydig foram vistas em todos os grupos etários no espaço intersticial. Porém, eram abundantes em animais púberes e pós-púberes.

Seu núcleo tinha, em sua maioria, formato ovoide e centralizado. O citoplasma era repleto de grânulos lipídicos. Também foram vistos o complexo de Golgi, mitocôndrias e retículo endoplasmático agranular. As células de Leydig geralmente encontravam-se próximas a vasos sanguíneos (figura 12).

Figura 12 – Célula de Leydig de cutia (*Dasyprocta sp.*). **(A e B)**: N: núcleo; cG: complexo de Golgi; gl: grânulo lipídico. (A): ponta da seta aberta: mitocôndria. (B): ponta da seta fechada: retículo endoplasmático agranular. Eletromiografia, método MET

Fonte: ARROYO, M. A. M. (2013)

6.1.6 Espermiogênese e espermição

As espermatídes, já definidas, começaram a se diferenciar morfológicamente a fim de formarem os espermatozoides. A partir dos animais pré-púberes, a espermiogênese era notável (figuras 13-15).

Na fase de formação do acrossoma, o núcleo das espermatídes era redondo e evidente (figura 13). O complexo de Golgi destacava-se, bem como a formação de vesículas pró-acrossômicas. Essas vesículas fundiram-se e formaram o vacúolo pró-acrossômico, que aderiu cada vez mais à membrana do núcleo. Nesta região, ainda, foram vistas diversas mitocôndrias, que, aos poucos, iam migrando para o polo oposto da célula. Pode-se observar uma camada elétron-densa na região da vesícula pró-acrossômica aderida ao núcleo.

Com o desenvolvimento da espermiogênese, o núcleo tornou-se ovalado, menor, e o citoplasma começou a se desprender do mesmo (figura 14). Nesta fase, deu-se início à formação da manchete (figura 14A), uma região formada por microtúbulos, que alongou a espermatíde. Ainda, pode-se observar a formação dos centríolos proximal e distal (figuras 14A, A'), bem como o início de formação do flagelo (figura 14B). As mitocôndrias começaram a se organizar para dar origem à peça intermediária (figura 15). O acrossoma tornou-se proeminente na extremidade nuclear. Também, o núcleo da espermatíde definiu-se em forma de “flecha” (figura 15).

Por fim, a espermição foi caracterizada pela formação completa do flagelo, sua maturação e expulsão do espermatozoide para o lúmen tubular (figuras 16B, C).

Figura 13 – Espermiogênese em cutia (*Dasyprocta* sp.), fases iniciais, a partir da pré-puberdade. Formação do acrosso e organização celular. **(A)**: ponta da seta: região pró-acrossômica. **(B)**: ponta da seta tracejada: região elétron-densa de adesão entre o vacúolo pró-acrossomal e o envelope nuclear. **(C)**: ponta da seta: região acrossomal. **(D)**: ponta da seta cheia: região acrossomal; ponta da seta tracejada: região de adesão entre o acrossomo e o envelope nuclear. **(E)**: ponta da seta: região acrossomal. A-E: (*) : complexo de Golgi; Mi: mitocôndrias; vp: vesícula pró-acrossômica; N: núcleo. Eletromicrografia, método MET

Fonte: ARROYO, M. A. M. (2013)

Figura 14 – Espermiogênese em cutia (*Dasyprocta sp.*), a partir da pré-puberdade. **(A)**: N: núcleo; cabeça da seta: organização dos microtúbulos para formação e desenvolvimento da manchete; ponta da seta tracejada: organização dos centríolos. **(A')**: cabeça da seta: região acrossômica; ponta da seta cheia: manchete; ponta da seta tracejada branca: centríolo proximal; ponta da seta tracejada preta: centríolo distal; f: flagelo; Mi: mitocôndrias; N: núcleo. **(B)**: ac: acrossomo; N: núcleo; cabeça da seta: manchete; ponta da seta tracejada: centríolos; ponta da seta cheia: flagelo; ci: citoplasma. Eletromicrografia, método MET

Fonte: ARROYO, M. A. M. (2013)

Figura 15 – Estrutura do espermatozoide de cutia (*Dasyprocta sp.*), a partir da pré-puberdade. **(A)**: cabeça da seta: organização mitocondrial. **(B e C)**: PI: peça intermediária; cabeça da seta: flagelo; espermição. A-C: N: núcleo. Eletromicrografia, método MET

Fonte: ARROYO, M. A. M. (2013)

Figura 16 – Espermatozoides no lúmen tubular de cutia (*Dasyprocta* sp.), puberdade e maturidade sexual. **(A)**: cabeça da seta: disposição das mitocôndrias na peça intermediária; ponta da seta: citoplasma. Eletromicrografia, método MET

Fonte: ARROYO, M. A. M. (2013)

6.1.7 Epidídimo

Foi possível observar que o epidídimo (figura 22) era um conjunto de ductos/túbulos (figura 17A) envoltos em tecido conjuntivo denso e vasos sanguíneos. Cada ducto/túbulo era formado por epitélio pseudoestratificado colunar estereociliado, constituído, principalmente, por células basais, haloides e principais (figuras 17 e 18).

Circundando o ducto/túbulo, as células mioides tinham o núcleo achatado, dispostas em diversas camadas musculares lisas (figuras 17-19; 21A).

As células basais tinham formato piramidal ou ovoide, indefinido quanto ao formato do núcleo, e estavam sempre aderidas à lâmina basal (figuras 19; 21B).

As células haloides foram vistas mais distantes da lâmina basal quando comparadas às anteriores, dispostas entre as células basais e as células principais. Esse tipo celular tinha o núcleo ovalado, grande e citoplasma menos eletrondenso; era evidente o retículo endoplasmático granuloso em posição supranuclear, tendo como referencia a lâmina basal (figuras 19; 21B).

Já as células principais, muitas vezes estavam aderidas à lâmina basal, mas não por via de regra, e atravessavam o epitélio (figuras 19; 20; 21C). Seu núcleo, em posição central, era ovoide e grande; o retículo endoplasmático granuloso foi observado em posição supranuclear; diversas vesículas lipídicas ou corpúsculos de secreção e lisossomos foram vistos; ainda, em posição infranuclear estava o complexo de Golgi; a posição apical da célula estava repleta de estereocílios, voltados para o lúmen. Também foram relatados, expelidos para o lúmen, vesículas em forma de “copo” e bolhas vesiculares (figura 20B).

Vistas com mais facilidade antes da puberdade, as células “limpas” estavam entremeadas entre as células principais, aparentemente aderidas à lâmina basal. Eram evidentes organelas justapostas em todo o citoplasma, mas não foi possível identificar quais os tipos; o núcleo não era notável (figura 19).

A partir da puberdade, as células apicais estavam presentes, muito próximas ao lúmen. Apresentaram *tight junctions* com as células principais, sempre em posição apical (figuras 20; 21D). Esse tipo celular não possuía estereocílios.

O ducto epididimário, quando animais impúberes e pré-púberes, ainda não possuía o lúmen aberto ou estavam em processo de luminação, respectivamente

(figura 17). Entretanto, notaram-se espermatozoides nos túbulos epididimários em idades mais avançadas, ou seja, na puberdade e maturidade sexual. Ainda, nessas idades, a camada de células mioides ao redor do túbulo epididimário era mais espessa (figura 18).

Figura 17 – Epidídimo de cutia (*Dasyprocta sp.*), impúbere e pré-púbere. **(A)**: Epidídimo com ductos fechados. **(B-D)**: I: epitélio pseudoestratificado colunar; tc: tecido conjuntivo; vv.: vasos sanguíneos; cabeça da seta: célula mioide; cb: célula basal; ch: célula haloide; cp: célula principal; cc: célula “limpa”; ponta da seta: estereocílios. Em B: (*) : lúmen fechado, impúbere; Em C-D: (*) : processo de luminação, pré-púbere. (A): aumento 20x, coloração HE; (B e D): aumento 100x; (C): aumento 40x. Coloração azul de toluidina, corte semifino

Fonte: ARROYO, M. A. M. (2013)

Figura 18 – Epidídimo da cutia (*Dasyprocta sp.*), puberdade e maturidade sexual. **(A)**: Epidídimo com espermatozoides. **(B-D)**: I: epitélio pseudoestratificado colunar estereociliado; cabeça da seta: células mióides; vv.: vasos sanguíneos; tc: tecido conjuntivo; (*): lúmen com espermatozoides. **(D)**: cb: célula basal; ch: célula haloide; cp: célula principal; ca: célula apical; ponta da seta: estereocílios. (A): aumento 40x, coloração HE; (B): aumento 40x, puberdade; (C): aumento 40x, maturidade sexual; (D): aumento 100x, maturidade sexual. Coloração azul de toluidina, corte semifino

Fonte: ARROYO, M. A. M. (2013)

Figura 19 – Epidídimo de cutia (*Dasyprocta sp.*), impúbere e pré-púbere. **(A e B)**: m: célula mioide; cb: célula basal; ch: célula haloide; cc: célula “limpa”; cp: célula principal. **(B)**: estrela: processo de luminação. Eletromicrografia, método MET

Fonte: ARROYO, M. A. M. (2013)

Figura 20 – Epidídimo de cutia (*Dasyprocta sp.*), puberdade. **(A e B)**: ca: célula apical; cp: célula principal; L: lisossomo; v: vesícula lipídica; cabeça da seta: *tight junctions*; ponta da seta: estereocílios. **(A)**: cG: complexo de Golgi. **(B)**: b: bolha apical; ponta da seta aberta: corte transversal de um espermatozoide. Eletromicrografia, método MET

Fonte: ARROYO, M. A. M. (2013)

Figura 21 – Epidídimo de cutia (*Dasyprocta sp.*), maturidade sexual. **(A)**: m: células mioides. **(B)**: m: células mioides; cb: célula basal; ch: célula haloide; cp: célula principal; REG: retículo endoplasmático granular. **(C)**: células principais; ponta da seta: cromatina; L: lisossomos; (*): corpúsculo de secreção; REG: retículo endoplasmático granular. **(D)**: cp: célula principal; ca: célula apical; v: vesícula lipídica; (*): estereocílios; cabeça da seta: *tight junctions*; b: bolha apical; vc: vesícula em forma de copo. Eletromicrografia, método MET

Fonte: ARROYO, M. A. M. (2013)

Figura 22 – Epidídimo de cutia (*Dasyprocta* sp.). (A-C): sptz: espermatozoides. Eletromicrografia, método MEV

Fonte: ARROYO, M. A. M. (2013)

6.1.8 Ducto deferente

O ducto deferente (figura 28) era constituído perifericamente por tecido conjuntivo e vasos sanguíneos. Era definido por uma espessa camada muscular. Nesta, foi possível notar as fibras musculares em corte transversal, circundadas pelo endomísio, bem como núcleos de diversos tamanhos. Por sua vez, envoltos pelo perimísio, visualizaram-se os feixes musculares (figuras 24B, C; 26B, C; 27A).

Em seguida, sem uma delimitação precisa, havia uma segunda camada muscular, qualificada como circular. Suas células eram achatadas e alongadas, dispostas indefinidamente (figuras 23; 24B, C; 27B, C).

Ainda, foi possível observar o tecido conjuntivo e fibras elásticas fazendo a adesão entre a camada muscular circular e o epitélio pseudoestratificado estereociliado, em direção ao lúmen. Este epitélio, por sua vez, era constituído por células de diferentes tamanhos e formas (figura 27D), sendo que as células mais apicais eram estereociliadas (Figura 27E). Todo este conjunto definiu a mucosa (figuras 23B, C, F; 24D, E; 26D).

Nas idades impúberes e pré-púberes o lúmen do ducto deferente estava fechado, porém o epitélio era alto assim como os estereocílios. Também, as camadas musculares eram bem definidas (figuras 23; 24).

A partir da puberdade, diferentemente dos grupos anteriores, foi possível visualizar uma terceira camada muscular, semelhante à primeira, localizada entre a camada muscular circular e o tecido conjuntivo com fibras elásticas; entretanto, a camada era menor e de transição. Nessas idades, ainda, o epitélio pseudoestratificado era curto, bem como os estereocílios. Além disso, notaram-se a presença de espermatozoides no lúmen de alguns cortes seriados (figuras 25; 26).

Figura 23 – Ducto deferente de cutia (*Dasyprocta sp.*), impúbere. **(A)**: ducto deferente. **(B-F)**: cabeça da seta: tecido conjuntivo; I: tecido muscular; II: tecido muscular circular; III: mucosa e epitélio pseudoestratificado; ponta da seta cheia: tecido conjuntivo e fibras elásticas; ponta da seta tracejada: estereocílios; (*): lúmen fechado. (A): aumento 4x, coloração HE; (B): aumento 10x; (C-D): aumento 20x; (E-F): aumento 40x. Coloração azul de toluidina, corte semifino

Fonte: ARROYO, M. A. M. (2013)

Figura 24 – Ducto deferente de cutia (*Dasyprocta sp.*), pré-púbere. **(A)**: ducto deferente. **(B)**: I: tecido muscular; tc: tecido conjuntivo; vv.: vasos sanguíneos; ponta da seta fechada: perimísio; ponta da seta aberta: endomísio. **(C)**: I: tecido muscular; II: tecido muscular circular; ponta da seta fechada: tecido conjuntivo. **(D)**: II: tecido muscular circular; III: epitélio pseudoestratificado; tc: tecido conjuntivo; cabeça da seta: fibra elástica. **(E)**: III: epitélio pseudoestratificado; tc: tecido conjuntivo; cabeça da seta: fibra elástica; ponta da seta tracejada: estereocílios; (*): lúmen fechado. (A): aumento 10x, coloração HE; (B-E): aumento 100x, coloração azul de toluidina, corte semifino

Fonte: ARROYO, M. A. M. (2013)

Figura 25 – Ducto deferente de cutia (*Dasyprocta sp.*), puberdade. **(A)**: ducto deferente. **(B-D)**: I: tecido muscular; II: tecido muscular circular; III: tecido muscular; ponta da seta fechada: tecido conjuntivo; ponta da seta tracejada: epitélio pseudoestratificado; (*): lúmen com espermatozoides. (A): aumento 40x, coloração HE; (B): aumento 10x; (C): aumento 20x; (D): aumento 40x. Coloração azul de toluidina, corte semifino

Fonte: ARROYO, M. A. M. (2013)

Figura 26 – Ducto deferente de cutia (*Dasyprocta sp.*), maturidade sexual. **(A)**: ducto deferente. **(B-D)**: I: camada muscular; cabeça da seta: tecido conjuntivo, perimísio; II: camada muscular circular; III: camada muscular; ponta da seta fechada: tecido conjuntivo com fibras elásticas; ponta da seta tracejada: epitélio pseudoestratificado com estereocílios; (*): lúmen com espermatozoides. (A): aumento 40x, coloração HE. (B-D): aumento 100x, coloração azul de toluidina, corte semifino

Fonte: ARROYO, M. A. M. (2013)

Figura 27 – Ducto deferente de cutia (*Dasyprocta sp.*), impúbere e maturidade sexual. **(A)**: camada muscular; (*): tecido conjuntivo, perímio. **(B e C)**: camada muscular circular. **(D)**: detalhe da célula componente do epitélio pseudoestratificado esterociliado. **(E)**: detalhe dos esterocílios. Eletromicrografia, método MET

Fonte: ARROYO, M. A. M. (2013)

Figura 28 – Ducto deferente de cutia (*Dasyprocta sp.*). Eletromicrografia, método MEV

Fonte: ARROYO, M. A. M. (2013)

6.2 EXPRESSÃO ENZIMÁTICA

As atividades das enzimas citocromo P450 aromatase e P450c17 foram elencadas, a seguir:

6.2.1 Citocromo P450 aromatase

A possível presença da P450 aromatase foi verificada no testículo, epidídimo e ducto deferente.

6.2.1.1 *Testículo*

Os níveis de expressão da aromatase variaram no testículo de cutias, nas diferentes fases do desenvolvimento sexual (figura 29). No grupo de animais impúberes (figuras 29A, B) e pré-púberes (Figuras 29C, D) nenhuma atividade enzimática foi relatada. Entretanto, na puberdade foi possível observar uma intensa marcação nos espermatozoides dentro do lúmen testicular (figuras 29E, F). Porém, nenhum nível de expressão foi visto quando em animais adultos (figuras 29G, H).

6.2.1.2 *Epidídimo*

O epidídimo de cutias não apresentou nenhuma atividade da P450 aromatase quando em animais impúberes (figuras 30A, B). Contudo, o citoplasma do epitélio pseudoestratificado mostrou-se fracamente marcado na pré-puberdade (figuras 30C, D) e mais intenso na fase seguinte, quando púberes, bem como os espermatozoides e vasos sanguíneos (figuras 30E, F). Em animais adultos, não foi observado nenhuma expressão enzimática (figuras 30G, H).

6.2.1.3 *Ducto deferente*

No ducto deferente de cutia a aromatase expressou-se de forma gradual, sendo o pico de atividade no grupo de animais púberes (figura 31).

Nos animais impúberes, nenhum sinal de expressão foi observado (figuras 31A, B), ao contrário do grupo pré-púbere, uma vez que nas diferentes camadas musculares uma marcação pouco intensa era notável (figuras 31C, D). Entretanto, na puberdade notou-se que este sinal era intenso, mas não houve expressão no tecido conjuntivo intramuscular. Ainda, foi possível observar que algumas células do epitélio pseudoestratificado estereociliado estavam marcadas, bem como os espermatozoides no lúmen (figuras 31E, F). Já nos animais adultos, era notável que a atividade da aromatase foi reduzida, apenas nos espermatozoides ela podia ser vista (figuras 31G, H).

Figura 29 – Expressão da P450 aromatase em testículo de cutia (*Dasyprocta sp.*) nas diferentes fases do desenvolvimento sexual. **(A)**: impúbere. **(B)**: controle negativo, impúbere. **(C)**: pré-púbere. **(D)**: controle negativo, pré-púbere. **(E)**: puberdade. **(F)**: controle negativo, puberdade. **(G)**: maturidade sexual. **(H)**: controle negativo, maturidade sexual. (A-B): aumento 20x; (C-H): aumento 100x. Método: imunohistoquímica

Fonte: ARROYO, M. A. M. (2013)

Figura 30 – Expressão da P450 aromatase no epidídimo de cutia (*Dasypsecta sp.*) nas diferentes fases do desenvolvimento sexual. **(A)**: impúbere. **(B)**: controle negativo, impúbere. **(C)**: pré-púbere. **(D)**: controle negativo, pré-púbere. **(E)**: puberdade. **(F)**: controle negativo, puberdade. **(G)**: pós-puberdade. **(H)**: controle negativo, pós-puberdade. (A-C): aumento 10x; (D-H): aumento 40x. Método: imunohistoquímica

Fonte: ARROYO, M. A. M. (2013)

Figura 31 – Expressão da P450 aromatase no ducto deferente de cutia (*Dasyprocta sp.*) nas diferentes fases do desenvolvimento sexual. **(A)**: impúbere. **(B)**: controle negativo, impúbere. **(C)**: pré-púbere. **(D)**: controle negativo, pré-púbere. **(E)**: puberdade. **(F)**: controle negativo, puberdade. **(G)**: pós-puberdade. **(H)**: controle negativo, pós-puberdade. (A-H): aumento 40x. Método: imunohistoquímica

Fonte: ARROYO, M. A. M. (2013)

6.2.2 Citocromo P50c17

Assim como a P450 aromatase, a possível presença da P450c17 foi verificada no testículo, epidídimo e ducto deferente.

6.2.2.1 *Testículo*

Durante o desenvolvimento sexual de cutia, nenhuma atividade significativa da citocromo P450c17 foi observada no epitélio germinativo testicular, bem como no interstício (figura 32).

6.2.2.2 *Epidídimo*

No epidídimo, a P450c17 não se expressou em nenhum grupo etário ao longo do desenvolvimento sexual (figura 33).

6.2.2.3 *Ducto deferente*

Quanto à expressão da P450c17 no ducto deferente de cutias criadas em cativeiro, nenhuma atividade enzimática foi observada durante as distintas fases do desenvolvimento sexual (figura 34).

Figura 32 - Expressão da P450c17 no testículo de cutia (*Dasyprocta sp.*) nas diferentes fases do desenvolvimento sexual. **(A)**: impúbere. **(B)**: controle negativo, impúbere. **(C)**: pré-púbere. **(D)**: controle negativo, pré-púbere. **(E)**: puberdade. **(F)**: controle negativo, puberdade. **(G)**: pós-puberdade. **(H)**: controle negativo, pós-puberdade. (A-H): aumento 40x. Método: imunohistoquímica

Fonte: ARROYO, M. A. M. (2013)

Figura 33 - Expressão da P450c17 no epidídimo de cutia (*Dasyprocta* sp.) nas diferentes fases do desenvolvimento sexual. **(A)**: impúbere. **(B)**: controle negativo, impúbere. **(C)**: pré-púbere. **(D)**: controle negativo, pré-púbere. **(E)**: puberdade. **(F)**: controle negativo, puberdade. **(G)**: pós-puberdade. **(H)**: controle negativo, pós-puberdade. (A-B; E-F): aumento 20x; (C-D; G-H) aumento 40x. Método: imunohistoquímica

Fonte: ARROYO, M. A. M. (2013)

Figura 34 – Expressão da P450c17 no ducto deferente de cutia (*Dasyprocta sp.*) nas diferentes fases do desenvolvimento sexual. **(A)**: impúbere. **(B)**: controle negativo, impúbere. **(C)**: pré-púbere. **(D)**: controle negativo, pré-púbere. **(E)**: puberdade. **(F)**: controle negativo, puberdade. **(G)**: pós-puberdade. **(H)**: controle negativo, pós-puberdade. (A-H): aumento 40x. Método: imunohistoquímica

Fonte: ARROYO, M. A. M. (2013)

7 DISCUSSÃO

Este trabalho é pioneiro ao tentar descrever a ultraestrutura dos testículos e via espermática de cutias criadas em cativeiro. Complementa-se por não haver na literatura a descrição do epidídimo e ducto deferente dessa espécie. Ainda, viu-se a expressão enzimática de enzimas esteroidogênicas nas diferentes fases do desenvolvimento sexual, desde um dia de nascidos até os 14 meses de idade.

7.1 PUBERDADE

A espermição ocorreu a partir dos 9 meses de idade, caracterizando o animal púbere (ASSIS NETO, 2002; FERREIRA, 2002; ASSIS NETO et al., 2003a; 2003b), discordando de Deutsch e Puglia (1988), o qual relataram a puberdade em cutia aos 6 meses de idade. Indícios do processo de luminação dos túbulos seminíferos e da maturação dos tipos celulares nos testículos começaram aos 5 meses de vida (ASSIS NETO, 2002; FERREIRA, 2002; ASSIS NETO et al., 2003a; b). As espermátides em fases mais avançadas, como as alongadas, apareceram aos 7 meses de idade, porém, a estabilização desse estágio veio a partir dos 8 meses. Assis Neto (2002) e Assis Neto et al. (2003a, b) relataram esse tipo celular a partir dos 9 meses de idade. Entretanto, no presente trabalho, como não haviam espermatozoides no lúmen tubular nesta fase, esses animais ainda foram considerados pré-púberes. Em idades mais avançadas, a partir dos 10 meses, notou-se uma uniformidade do epitélio testicular (ASSIS NETO, 2002; FERREIRA, 2002; ASSIS NETO et al., 2003a; b).

Este trabalho foi o pioneiro ao descrever a via espermática de cutias nas diferentes fases do desenvolvimento sexual, especialmente o epidídimo e o ducto deferente. O epidídimo estava completamente fechado quando impúbere, porém, o processo de luminação já era avançado quando na pré-puberdade, ainda sem a presença de espermatozoides. A partir dos 9 meses de idade, era notório o preenchimento do lúmen tubular com espermatozoides. O mesmo foi observado no

ducto deferente. Santos (2012) observou semelhantes características em preás de diferentes idades, abrangendo as relativas fases do desenvolvimento sexual.

7.2 CARACTERIZAÇÃO EPITELIAL: TESTÍCULO, EPIDÍDIMO E DUCTO DEFERENTE

As três fases distintas da espermatogênese foram vistas (mitótica, meiose I e espermiogênese) (GURAYA, 1987; KERR, 2000; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Entretanto, a fase II da meiose foi pouco relatada. Muitas vezes não é possível observar a diferenciação dessas células, uma vez que o processo acontece rapidamente (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Nos animais impúberes, os diferentes tipos espermatogoniais foram vistos (tipos “A” – escura e pálida – e “B”), bem como espermatócitos primários (HYTTEL; SINOWATZ; VEJLSTED, 2012), células de suporte e células em degeneração. Essas características também foram notadas por Assis Neto et al. (2003b). Já nos animais a partir dos 6 meses até os 8 meses de idade, os túbulos seminíferos estavam com o lúmen completamente formado. No epitélio tubular foram observadas células de Sertoli e espermatogônias do tipo “B”, bem como os espermatócitos em diferentes estágios da meiose, com abundância daquelas em paquíteno, espermatídes arredondadas (ASSIS NETO et al., 2003b) e alongadas, estas últimas em estágio mais avançado, com a peça intermediária já formada e cabeça de “flecha”. Diferentemente de Assis Neto et al. (2003b), o grupo estava com o epitélio bem definido e em estágios bastante avançados. Animais púberes e pós-púberes tinham o epitélio tubular composto por espermatogônias do tipo “A” e “B”, células de Sertoli, espermatócitos em pré-leptóteno, paquíteno e diplóteno foram vistas com maior frequência. Entretanto, alguns espermatócitos secundários foram observados, bem como espermatídes arredondadas e alongadas, bem adiantados em seu desenvolvimento; o processo de espermição era evidente, corroborando com Assis Neto et al. (2003b). Ainda, corpos residuais foram identificados, sendo estes o excesso de citoplasma liberados pelas espermatídes alongadas (KERR, 2000). Em todos os grupos etários, cada cordão testicular ou túbulo seminífero era delimitado por tecido conjuntivo e células mioides (BACHA; BACHA, 2003; JUNQUEIRA;

CARNEIRO, 2008). No interstício, células de Leydig (CONLEY et al., 2007, 2009) e vasos sanguíneos eram característicos (ASSIS NETO et al., 2003b).

Pela primeira vez, descreveram-se os tipos celulares componentes da via espermática, especialmente do epidídimo e ducto deferente, de cutias nas diferentes fases do desenvolvimento sexual. O epitélio do epidídimo em todos os grupos etários foi definido como pseudoestratificado colunar estereociliado (KERR, 2000; BACHA; BACHA, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Entretanto, além das células basais e principais, as células haloides constituíam o epitélio. Células “limpas” foram vistas em animais antes da puberdade, enquanto células apicais faziam-se presentes em idades mais avançadas (COOPER, 1986; ROBAIRE; HINTON; ORGEBIN-CRIST, 2006; SCHIMMING et al., 2012). Santos (2012) observou apenas as células principais e basais em preás de diversas idades.

Nos grupos impúbere e pré-púbere, diferente do que é comumente descrito em literatura para ducto deferente, foram vistas apenas duas camadas musculares, sendo a mais próxima do lúmen caracterizada como circular. Nos grupos etários mais avançados, a partir dos 9 meses de idade, uma terceira camada muscular foi vista, mais próxima ao lúmen e do epitélio pseudoestratificado estereociliado (BACHA; BACHA, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; SANTOS, 2012).

7.3 ULTRAESTRUTURA CELULAR

A discussão da ultraestrutura foi dividida de acordo com a localização dos diferentes tipos celulares: parênquima testicular; epidídimo; e ducto deferente.

7.3.1 Parênquima testicular

Os distintos componentes do parênquima testicular foram discutidos em tópicos, como segue:

7.3.1.1 Epitélio germinativo

A espermatogênese é um processo sincrônico e regular de diferenciação celular que ocorre nos túbulos seminíferos e envolve as diferentes classes de células germinativas, pelo qual uma espermatogônia-tronco é gradativamente diferenciada em uma célula haploide altamente especializada, o espermatozoide (adaptado de COSTA; HENRY; PAULA, 2004).

Diversos tipos espermatogoniais foram descritos em literatura (GURAYA; 1987; HESS; FRANCA, 2008; BEGUELINI et al, 2011; SANTOS, 2012). Porém, no presente trabalho, foi possível identificar basicamente três tipos: “A” pálida; “A” escura; e “B”. Em alguns cortes, espermatogônias intermediárias foram relatadas (GURAYA, 1987; HESS; FRANCA, 2008).

As espermatogônias do tipo “A” escuras tinham o núcleo de formato redondo/ovalado, com o nucléolo bastante evidente, próximos ao envelope nuclear. Havia mitocôndrias em grande quantidade no citoplasma (BEGUELINI et al., 2011). Entretanto, esse tipo celular estava mais distante da lâmina basal, discordando dos mesmos autores supracitados, quando descritas em morcegos sexualmente maduros. Esse tipo celular é tido como “reserva”, uma vez que se divide se houver dano ou disfunção do epitélio (adaptado de KERR, 2000). Espermatogônias do tipo “A” pálidas tinham o núcleo grande, oval (BEGUELINI et al., 2011; SANTOS, 2012), e estavam muito próximas à lâmina basal, diferentemente daquelas descritas por Beguelini et al. (2011). Seu nucléolo não era evidente e, geralmente, podiam-se ver células de Sertoli circunvizinhas. Beguelini et al. (2011) relataram diversas mitocôndrias no citoplasma. As espermatogônias do tipo “A” pálidas dão origem àquelas do tipo “B” (KERR, 2000). Estas, por sua vez, possuíam núcleo ovoide e irregular, grande, com o nucléolo bem destacado, em posição central no núcleo (BEGUELINI et al., 2011), assim como a cromatina em processo de condensação. Eram menos aderidas à lâmina basal. Descrições semelhantes foram feitas para *Galea spixii* com um dia de nascido até os 150 dias de idade (SANTOS, 2012). Esse tipo celular dará origem aos espermátócitos primários, que iniciarão a fase reducional. Ainda, as espermatogônias intermediárias foram caracterizadas, principalmente, pela condensação da cromatina e deslocamento do nucléolo para a região central do núcleo. Não foi possível

categorizar esse tipo espermatogonial como feito por Hess e Franca (2008) para camundongos, ratos e suínos. Por estarem presentes em todas as faixas etárias, exalta-se a importância das espermatogônias para a manutenção e continuidade da espermatogênese (COUROT; HOCHEREAU-DE-REVIERS; ORTAVANT, 1970; GURAYA, 1987; BEGUELINI et al., 2011).

Seguindo a linhagem espermatogênica, os espermatócitos darão início à fase meiótica testicular. Portanto, o enfoque ultraestrutural se dá em nível nuclear. As mudanças principais apontam a condensação da cromatina e disposição do nucléolo (BEGUELINI et al., 2011). Quando em prófase I, as células tem seu núcleo aumentado em tamanho e inicia-se a condensação da cromatina, além da migração do nucléolo para um dos polos nuclear (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008; BEGUELINI et al., 2011; SANTOS, 2012).

Os diferentes tipos de espermatócitos foram identificados a partir da pré-puberdade. Predominaram células em prófase I, seguidas das diversas subdivisões meióticas, em destaque para os espermatócitos em paquíteno. Santos (2012) ainda conseguiu visualizar células em metáfase I. Geralmente, a prófase I é a fase meiótica de maior duração (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008), o que justifica a sua predominância nos cortes. Espermatócitos secundários são difíceis de observar em cortes de testículo porque estas células permanecem um tempo muito curto em interfase e logo entram na segunda divisão meiótica, que também é rápida (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Beguelini et al. (2011) também não observaram espermatócitos secundários.

As divisões de cada espermatócito, seguidas de sua respectiva maturação, resultam em quatro células haploides, as espermátides (GURAYA, 1987). Essas células podem ser distinguidas pelo seu pequeno tamanho e por núcleos com porções variadas de cromatina condensada (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). A partir da pré-puberdade era notável a presença desse tipo celular, sejam espermátides arredondadas ou alongadas. Sobretudo, mudanças morfológicas diferenciaram essas células em espermatozoides, também chamada de espermiogênese. Este processo é subdividido em três fases distintas: fase de Golgi, fase de formação do acrossomo e fase de maturação (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Em cutias, no presente trabalho, essas três fases mostraram-se nítidas. Em preás, as espermátides foram classificadas em XII estágios morfológicos diferentes (SANTOS, 2012), bem como em morcegos (BEGUELINI et al., 2012). Os

espermatozoides foram considerados, de acordo com a sua morfologia, como “cabeça de flecha”. Por fim, os espermatozoides, quando prontos, entraram na fase de espermição, sendo expelidos para o lúmen, definindo o animal púbere (ASSIS NETO, 2002; ASSIS NETO et al. 2003a, b, c).

7.3.1.2 Célula de Sertoli

As células de Sertoli, por sua vez, tinham o núcleo de formato indefinido. Santos (2012) caracterizou o núcleo dessas células como triangulares em pré-adoscentes. Estavam localizadas sempre entre as demais células da linhagem espermatogênica, sendo este contato uma forma de interação, possibilitando o suporte funcional e físico para a espermatogênese (KERR, 2000). Entretanto, estavam mais distantes da lâmina basal à medida que os grupos etários iam se desenvolvendo, discordando de Santos (2012). A aproximação das células de Sertoli ao compartimento luminal remete à função de fagocitar o excesso de citoplasma das espermatídes alongadas (adaptado de KERR, 2000), quando nos grupos etários mais avançados. Além disso, Pudney (1986) relatou mitocôndrias no compartimento citoplasmático em *Citellus lateralis*. Foram vistas *tight junctions* entre células de Sertoli. Essas interações são descritas como necessárias para formar uma barreira hematotesticular, dividindo o epitélio germinativo em compartimento adluminal (maioria das células germinativas) e basal (espermatogônias e espermatozoides imaturos) (BYERS; PELLETIER; SUÁREZ-QUIAN, 1993; NORMAN; LITWACK, 1997; KERR, 2000). Ainda, essa barreira evitaria o retorno da difusão dos antígenos do interior dos túbulos seminíferos para a corrente sanguínea (BYERS; PELLETIER; SUÁREZ-QUIAN, 1993).

7.3.1.3 Célula de Leydig

No espaço intersticial, as células de Leydig estavam próximas a vasos sanguíneos. Foram identificadas, principalmente, pelo citoplasma repleto de

gotículas lipídicas, corroborando com Santos (2012). A quantidade dessas gotas pode variar devido ao momento metabólico em que essas células se encontram (ALVARENGA, 1992). A ultraestrutura das células de Leydig evidencia sua atividade esteroidogênica pela presença de retículo endoplasmático agranular bem desenvolvido e mitocôndrias com cristas tubulares (RUSSELL et al., 1996). No presente trabalho essas estruturas foram vistas próximas ao núcleo, principalmente. Nas mitocôndrias, o colesterol é convertido em pregnenolona, e a grande superfície do retículo endoplasmático agranular contém enzimas necessárias para a formação da testosterona (KERR, 2000).

7.3.2 Epidídimo

O ducto/túbulo epididimário de cutia era formado por epitélio pseudoestratificado colunar estereociliado (KERR, 2000; BACHA; BACHA, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). As células constituintes de todos os grupos etários foram as células basais, principais e haloides, mas as células “limpas” foram evidenciadas apenas antes da puberdade, e, a partir desta idade, as células apicais também eram constituintes do epitélio. Santos (2012) visualizou apenas dois tipos celulares, as células principais e basais, em preás ao longo do desenvolvimento sexual. As células principais, basais, apicais e “limpas” compunham o epitélio epididimal de cães sem raça definida (SHIMMING et al., 2012).

As células basais, que tinham formato piramidal ou ovoide e indefinido quanto ao núcleo, estavam sempre aderidas à lâmina basal (BACHA; BACHA, 2003). Shimming et al. (2012) notaram que essas células em cães sem raça definida eram pobres em organelas. As células principais, na maioria das vezes, estavam aderidas à lâmina basal (ROBAIRE; HINTON; ORGEBIN-CRIST, 2006), e atravessavam o epitélio (SANTOS, 2012). Tinham o núcleo grande e de formato oval (ROBAIRE; HINTON; ORGEBIN-CRIST, 2006). O retículo endoplasmático granular (SANTOS, 2012) estava em posição supranuclear, e diversas vesículas lipídicas ou corpúsculos de secreção e lisossomos foram vistos na posição apical da célula (SHIMMING et al., 2012), bem como o complexo de Golgi, corroborando com a ultraestrutura do mesmo tipo celular em pacas (ORSI et al., 2009b). Ainda, endossomos e

mitocôndrias foram observadas por Shimming et al. (2012). As células principais continham estereocílios em sua porção apical, voltados para o lúmen. As células haloides tinham núcleo ovalado, grande, e citoplasma menos eletrondenso; era evidente o retículo endoplasmático granuloso em posição supranuclear. Estavam mais distantes da lâmina basal quando comparadas às células basais, observadas intermediárias entre estas últimas e as células principais. A presença desse tipo celular em todo o epitélio do epidídimo e em todas as fases etárias condiz com a ideia de Robaire, Hinton, Orgebin-Crist (2006). As células “limpas” não foram vistas em todos os grupos etários, apenas antes da puberdade, e estavam entremeadas entre as células principais, aparentemente aderidas à lâmina basal. Eram evidentes organelas justapostas em todo o citoplasma, mas não foi possível identificar quais os tipos; o núcleo não era notável. Robaire, Hinton, Orgebin-Crist (2006) descreveram regiões apicais com numerosas depressões, vesículas, endossomos, corpos multivesiculares e lisossomos na região basal, além do núcleo e gotículas lipídicas. Entretanto, muitos elementos vesiculares e vacúolos, diversas mitocôndrias, retículo endoplasmático (na região infranuclear) e complexo de Golgi (região supranuclear) foram descritos por Shimming et al. (2012). Por fim, as células apicais estavam presentes apenas a partir da puberdade, muito próximas ao lúmen (ROBAIRE; HINTON; ORGEBIN-CRIST, 2006). Ainda, essas células não possuíam estereocílios, e *tight junctions* foram vistas, sempre na porção apical. Shimming et al. (2012) afirmaram que esse tipo de comunicação celular acontece com frequência entre os tipos celulares do epidídimo, porém, neste trabalho foram vistas apenas entre as células apicais e principais. Circundando os ductos/túbulos epididimários estavam as células mioides, achatadas, dispostas em diversas camadas musculares, em maior número quando a partir da puberdade.

A configuração ultraestrutural das células principais revela sua importância para o epidídimo. A evidência do retículo endoplasmático granuloso justifica a funcionalidade dessas células sintetizarem proteínas em abundância, bem como a presença do complexo de Golgi, seja para estoque ou secreção no compartimento adluminal (COOPER, 1986; HERMO; OKO; MORALES, 1994; ROBAIRE; HINTON; ORGEBIN-CRIST, 2006; ORSI et al., 2009b), visto pela diversidade de vesículas ou corpúsculos de secreção no citoplasma. Seu alto poder secretório era distinto pela presença de bolhas vesiculares ou vesículas em forma de “copo” expelidas no lúmen. Talvez por sua posição e por serem pobres em organelas, as células basais

tenham justificadas a sua função de proteção às células epididimais (COOPER, 1986; ROBAIRE; HINTON; ORGEBIN-CRIST, 2006).

As células haloides, apicais e “limpas” foram descritas pela primeira vez em animais silvestres. Chama atenção a presença das células haloides em todas as faixas etárias e entre as células basais e principais. Provavelmente este achado possa justificar a sua atividade imune (ROBAIRE; HINTON; ORGEBIN-CRIST, 2006), mas ultraestruturalmente não foram encontradas evidências para este feito. A importância da presença das células apicais apenas a partir da puberdade, e o destaque das *tight junctions*, possa dar subsídio para uma possível função auxiliar destas células às células principais, apesar de serem pobres em organelas (SHIMMING et al., 2012), uma vez que as proteínas secretadas pelas células principais contribuem para a maturação do espermatozoide, assistidas pelas junções íntimas que compõem a barreira hemotesticular (KERR, 2000). Por fim, as células “limpas” foram vistas nos períodos impúbere e pré-púbere. Seu papel acidificador epididimário está correlacionado a processos como a endocitose, secreção, absorção e o processo de transporte ativo das células do epitélio tubular (DOMENICONI et al., 2006). Sendo assim, acredita-se na importância da presença das células “limpas” em todas as fases etárias.

As células mioides, por sua vez, tinham formato achatado e estavam dispostas em camadas. A partir da puberdade notou-se um aumento na quantidade desse tipo celular, possivelmente para facilitar o movimento do fluido aumentado ao longo do epidídimo, através das contrações peristálticas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

A distinção entre ducto e túbulo se dá pela luz do lúmen. Quando fechado ou em processo de luminação, em animais impúberes e pré-púberes, são chamados de ductos; assim, em animais a partir da puberdade, quando o lúmen está formado, denomina-se túbulo (SANTOS, 2012).

7.3.3 Ducto deferente

O ducto deferente era constituído, basicamente, por camada muscular e mucosa. Esta era composta pelo epitélio pseudoestratificado, com células de

diferentes tamanhos e formas, sendo as células apicais estereociliadas (KERR, 2000; BACHA; BACHA, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Não foi possível observar a camada de células basais descritas por Kerr (2000). Entretanto, a lâmina basal era evidente, a qual separava o epitélio pseudoestratificado estereociliado das camadas musculares. Diferentemente dos achados em literatura (KERR, 2000; BACHA; BACHA, 2003; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008), os grupos etários, impúbere e pré-púbere não tinham três camadas musculares. Isso pode ser devido à falta de trânsito espermático no ducto deferente. O ducto transporta lentamente o esperma para a ampola, dessa forma cria a capacidade limitada de armazenamento, sendo as contrações durante a ejaculação feitas pela inervação simpática (KERR, 2000).

Assim como no epidídimo, o ducto deferente tinha o lúmen fechado quando impúbere, e em processo de luminação na pré-puberdade. A partir da puberdade, no lúmen já era possível notar a presença de espermatozoides. Santos (2012) também observou este comportamento em preás, desde o nascimento até a puberdade.

Não foi possível observar detalhadamente a ultraestrutura do ducto deferente nos distintos grupos etários devido à fragilidade do material. Em maior aumento no microscópio eletrônico de transmissão havia retração das telas, impossibilitando a leitura.

7.4 EXPRESSÃO ENZIMÁTICA

A discussão da atividade das enzimas citocromo nos diferentes segmentos da via espermática foi feita em único tópico:

7.4.1 Citocromo P450 aromatase e citocromo P450c17

Os complexos enzimáticos citocromo P450 aromatase e P450c17, associados à enzima redutora NADPH-citocromo P450 redutase, são os responsáveis pela síntese dos estrógenos a partir dos andrógenos, e dos hormônios progestágenos e

andrógenos a partir da progesterona, respectivamente (KAMINSKI; CORBIN; CONLEY, 1999; SUMITANI et al., 2000; CONLEY; HINSHELWOOD, 2001; ZANATTA et al., 2011).

Nos testículos de cutias impúberes não foi constatada a expressão da P450 aromatase em nenhum nível celular. Estes achados contradizem àqueles observados por Abney (1999), uma vez que a atividade dessa enzima foi encontrada nas células de Sertoli de roedores antes da puberdade. Entretanto, na pré-puberdade era evidente a presença da aromatase em espermatídes alongadas (JANULIS et al., 1996) e espermatozoides, bem como em células de Leydig (ABNEY, 1999; CONLEY; HINSHELWOOD, 2001) e vasos sanguíneos. O mesmo foi observado para animais púberes, embora a expressão fosse mais acentuada. Porém, era notória a queda na intensidade da marcação em animais adultos (CONLEY; HINSHELWOOD, 2001; CARREAU et al., 2003; ALMEIDA et al., 2011). Diferentemente de Janulis et al. (1996), não foi possível observar com clareza a expressão da P450 aromatase em espermatócitos em paquíteno e espermatídes arredondadas.

Quanto à presença dessa enzima na via espermática, especialmente no epidídimo, esta foi encontrada em todos os grupos etários, sendo gritante quando na puberdade, principalmente nos espermatozoides. Estes achados corroboram com Schleicher, Drews e Stumpf (1989) e Janulis et al. (1993, 1998). Já no ducto deferente, a expressão da aromatase foi presenciada a partir da puberdade. Kwon et al. (1995) e Janulis et al. (1996) não observaram a atividade dessa enzima neste segmento da via espermática.

A citocromo P450c17 não apresentou qualquer nível de expressão seja no epitélio germinativo e interstício testicular, ou epidídimo e ducto deferente. Esses achados contradizem àqueles observados por Conley et al. (1994; 1996) em suínos, e Kaminski et al.¹. (1999 apud SASANO; MASON; SASANO, 1989) em javalis adultos. Talvez a concentração de 1:100 ainda não seja suficiente para a observância de alguma atividade da P450c17.

¹KAMINSKI, M. A.; CORBIN, C. J.; CONLEY, A. J. Development and differentiation of the interstitial and tubular compartments of fetal porcine testes. **Biology of Reproduction**. v. 60. p. 119–127. 1999.

Algumas dificuldades foram encontradas para o processamento imunohistoquímico, como obter a estabilidade do material, em especial nos grupos mais jovens, além de achar a concentração ideal dos anticorpos para estes animais. A fim de obter segurança nos resultados, a técnica foi repetida seis vezes, começando com a concentração de 1:400 para ambas as enzimas, sendo reduzida para 1:300, 1:200 e 1:100. Esta última foi refeita duas vezes.

O testículo tem dupla função: gametogênese e produção de hormônios esteroides, principalmente a testosterona (HAFEZ, 1995; NORMAN; LITWACK, 1997). A confirmação da expressão da P450 aromatase no testículo sugere um pico de presença de andrógenos em cutias quando a partir da puberdade, que podem estar relacionados às características sexuais secundárias, funcionalmente ocasionadas pelos hormônios sexuais (NORMAN; LITWACK, 1997). A atividade enzimática nos espermatozoides talvez se deva ao fato destes carregarem antígenos em sua superfície, podendo estimular uma resposta ao anticorpo (NORMAN; LITWACK, 1997). Entretanto, não é possível afirmar apenas pela presença da aromatase que há, necessariamente, a produção de estrógenos pós-puberdade. A expressão quando em animais mais novos pode estar relacionada à diferenciação, crescimento e manutenção dos testículos e via espermática (HAFEZ, 1995; NORMAN; LITWACK, 1997; CONLEY, HINSHELWOOD, 2001).

Por ser o primeiro estudo em animal silvestre que investiga o comportamento de algumas enzimas ligadas à reprodução, este fato deixa em aberto um leque para estudos complementares que possam dar subsídio à presença e importância de enzimas e hormônios esteroideogênicos em nível testicular, bem como a funcionalidade destes para animais silvestres, como a cutia, e outros mamíferos.

8 CONCLUSÕES

Com o material ora examinado e as metodologias propostas, permitem-se fazer as seguintes conclusões abaixo articuladas:

Pela primeira vez pode-se constatar, através da ultraestrutura, que o epitélio germinativo testicular e intersticial, bem como o epitélio pseudoestratificado estereociliado do epidídimo e do ducto deferente de cutias criadas em cativeiro sofrem mudanças morfológicas e funcionais ao longo do desenvolvimento sexual.

As principais alterações no testículo ocorrem entre o período impúbere e pré-púbere. No epidídimo, as diversificações sobrevivem ao longo do desenvolvimento sexual, com particularidades quando impúberes e adultos. No ducto deferente, a principal alteração ocorreu a partir da puberdade.

A espermiacção aconteceu aos 9 meses de idade, confirmando o início da puberdade nesses animais.

As atividades androgênicas preponderantes em cutias criadas em cativeiro ocorrem no período da puberdade.

REFERÊNCIAS

ABNEY, T. The potential roles of estrogen in regulating Leydig cell development and function: a review. **Steroids**, v. 64. p. 610–617, 1999.

ALMEIDA, J.; CONLEY, A. J.; MATHEWSON, L.; BALL, B. A. Expression of steroidogenic enzymes during equine testicular development. **Reproduction**, v. 141, p. 841-848, 2011.

ALVARENGA, F. C. L. Diferenças ultra estruturais entre as células de Leydig de cavalo, jumento e seu híbrido. **Brazilian Journal Veterinarian Research Animal Science**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 173-80, 1992.

ANTONIO-RUBIO, N. R.; GUERRERO-ESTÉVEZ, S. M.; LIRA-ROMERO, E.; MORENO-MENDOZA, N. Expression of 3- β -HSD1 and P450 aromatase enzymes during mouse gonad differentiation. **Journal of Molecular Histology**, v. 42, p. 535–543, 2011.

ASSIS NETO, A. C. **Desenvolvimento testicular em cutias criadas em cativeiro (*Dasyprocta agouti* Linnaeus, 1766)**. 2002. 136f. Dissertação (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, 2002.

ASSIS NETO, A. C.; BALL, B. A.; BROWNE, P.; CONLEY, A. J. Cellular localization of androgen synthesis in Equine Granulosa-theca cell tumors: immunohistochemical expression of 17 alpha-hydroxylase/17,20-lyase cytochrome P450. **Theriogenology**, v. 74, n. 3, p. 393-401, 2010.

ASSIS NETO, A. C.; CARVALHO, M. A. M.; MELO, M. I. V.; MIGLINO, M. A.; OLIVEIRA, M. F.; MARIANA, A. N. B. Fases do desenvolvimento e diferenciação testicular em cutias (*Dasyprocta agouti*) criadas em cativeiros. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 40, p. 71-79, 2003b. Suplemento, 1.

ASSIS NETO, A. C.; MELO, M. I. V.; CARVALHO, M. A. M.; MIGLINO, M. A.; OLIVEIRA, M. F.; AMBRÓSIO, C. E.; SILVA, S. M. M. S.; BLASQUEZ, F. X. H.; PAPA, P. C.; KFOURY JR., J. R. Quantificação de células dos túbulos seminíferos e rendimento da espermatogênese em cutias (*Dasyprocta agouti*) criadas em cativeiro. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 40, p. 175 – 179, 2003c. Suplemento, 3.

ASSIS NETO, A. C.; MELO, M. I. V.; CARVALHO, M. A. M.; MIGLINO, M. A.; OLIVEIRA, M. F.; MENEZES, D. J. A. Análise qualitativa do estabelecimento da espermatogênese em cutias (*Dasyprocta agouti*) criadas em cativeiros. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 40, p. 180-184, 2003a.

BACHA JR., W. J.; BACHA, L. M. Sistema reprodutor masculino. In: BACHA JR., W. J.; BACHA, L. M. **Atlas colorido de histologia veterinária**. São Paulo: Roca, 2003. Cap. 17, p. 335-353.

BEGUELINI, R. M.; PUGA, C. C. I.; TABOGA, S. R.; MORIELLE-VERSUTE, E. Ultrastructure of spermatogenesis in the white-lined broad-nosed bat, *Platyrrhinus lineatus* (Chiroptera: Phyllostomidae). **Micron**, n. 42, p. 586–599, 2011.

BYERS, S.; PELLETIER, R-M.; SUÁREZ-QUIAN, C. Sertoli cell junctions and the seminiferous epithelium barrier. In: RUSSEL, L. D.; GRISWOLD, M. D. **The Sertoli cell**. Casher River Press, 1993. Cap. 18, p. 431-446.

CARREAU, S.; LAMBARD, S.; DELALAND, C.; DENIS-GALERAUD, I.; BILINSKA, B.; BOURGUIBA, S. Aromatase expression and role of estrogens in male gonad: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 35, 2003.

CONLEY, A. J.; RAINEY, W. E.; MASON, J. I. Ontogeny of steroidogenic enzyme expression in the porcine conceptus. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 12, p. 155-165, 1994.

CONLEY, A. J.; CORBIN, C. J.; HINSHELWOOD, M. M.; LIU, Z.; SIMPSON, E. R.; FORD, J. J.; HARADA, N. Functional aromatase expression in porcine adrenal gland and testis. **Biology Reproduction**, v. 54, p. 497–505, 1996.

CONLEY, A.; HINSHELWOOD, M. Mammalian aromatases. **Reproduction**, v. 121, p. 685–695, 2001.

CONLEY, A. J.; CORBIN, C. J.; BROWNE, P.; MAPES, S. M.; PLACE, N. J.; HUGHES, A. L.; GLICKMAN, S. E. Placental expression and molecular characterization of aromatase cytochrome P450 in the spotted hyena (*Crocuta crocuta*). **Placenta**, v. 28, n. 7, p. 668-675, 2007.

CONLEY, A. J.; CORBIN, C. J.; HUGHES, A. L. Adaptive evolution of mammalian aromatases: lesson from suiformes. **Journal of Experimental Zoology**, v. 311, n. 1, p. 346-357, 2009.

COOPER, T. G. **The epididymis, sperm maturation and fertilization**. New York: Springer-Verlag, 1986.

COSTA, D. S.; HENRY, M.; PAULA, T. A. R. Espermatogênese de catetos (*Tayassu tajacu*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 1, p. 46-51, 2004.

COUROT, M.; HOCHEREAU-DE-REVIERS, M. T.; ORTAVANT, R. Spermatogenesis. In: JOHNSON, A. D.; GOMES, W. R.; VANDEMARK, N. L. (Eds.). **The testis: development, anatomy, and physiology**. New York: Academic Press, 1970. v.1, cap.6, p.339-432.

DEUTSCH, L. A.; PUGLIA, L. R. R. Os animais silvestres: proteção, doenças e manejo. Brasil: **Globo**, v. __, n. __, p. 11–60. 1988.

DOMENICONI, R. F.; ORSI, A. M.; SILVA, M. D. P.; BEU, C. C. L.; VIEGAS, K. S. A. Localização histoquímica de algumas hidroxilases no epidídimo do gerbilo. **Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 107-116, 2006.

FERNANDEZ, S.; RODRIGUES, R. F.; RICI, R. E. G.; FAVARON, P. O.; MELO, A. P. F. Ultrastructure of the bullfrog (*Lithobates catesbeianus*-Shaw, 1802) oviduct in different seasons. **Microscopy Research and Technique**, v. 76, p. 523-532, 2013.

FERREIRA, A. C. S. **Determinação de puberdade em cutias (Rodentia: Dasyproctidae) criadas em cativeiro, através da quantificação das células espermatozoides**. 2002. 77f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, 2002.

FRANÇA, L. R.; CASTRO, A. C. S.; CARDOSO, F. M.; BARBOSA, A. S. Desenvolvimento testicular de suíno. I. Aspectos Biométricos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 40, n. 3, p. 165–180, 1988.

GARCIA-SEGURA, L. M. Aromatase in the brain: not just for reproduction anymore. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 20, n. 6, p. 705-712, 2008.

GILBERT, S. F. **Biologia do desenvolvimento**. 5. ed. Ribeirão Preto, SP: FUNPEC Editora, 2003, 994 p.

GLICKMAN, S. E.; CUNHA, G. R.; DREA, C. M.; CONLEY, A. J.; PLACE, N. J.

Mammalian sexual differentiation: lesson from the spotted hyena. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 17, n. 1, p. 349-356, 2006.

GRUNERT, E.; BIRGEL, E. H.; VALE, W. G. **Patologia e clínica da reprodução dos animais mamíferos domésticos**. São Paulo: Livraria Varela, 2005. 541p.

GURAYA, S. S. **Biology of spermatogenesis and spermatozoa in mammals**. London: Springer-Verlag, 1987. 430 p.

GUYTON, C. A.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011. p. 998-999. 2011.

HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 6. ed. São Paulo: Manole, 1995. 582p.

HERMO, L.; OKO, R.; MORALES, C. R. Secretion and endocytosis in the male reproductive tract: a role in sperm maturation. **International Review of Cytology**, v. 154, p. 106–189, 1994.

HESS, R. A.; FRANCA, L. R. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. **Molecular Mechanisms in Spermatogenesis**, v. 636, p. 1-15, 2008.

HOSKEN, F. M. **Cutia é animal de criação vantajosa e carne rica em nutrientes**. 2010. Disponível em: <<http://www.cpt.com.br/noticias/cutia-e-animal-de-criacao-vantajosa-e-carne-rica-em-nutrientes>>. Acesso em: 06 jun. 2011.

HYTTEL, P. M.; SINOWATZ, F.; VEJLSTED, M. **Essentials of domestic animal embryology**. London: Saunders Elsevier, 2012. 455 p.

JANULIS, L.; NITTA, H.; HESS, R. A.; OSAWA, Y.; BUNICK, D. Mouse germ cells decrease in P450 aromatase activity as they pass through the epididymis. In: ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR THE STUDY OF REPRODUCTION, 26., 1993, Fort Collins. **Anais...**, Fort Collins, 1993.

JANULIS, L.; HESS, R. A.; BUNICK, D.; NITTA, H.; JANSSEN, S.; OSAWA, Y.; BAHR, J. M. Mouse epididymal sperm contain active P450 aromatase which decreases as sperm traverse the epididymis. **Journal of Andrology**, v. 17, p. 111–116, 1996.

JANULIS, L.; BAHR, J. M.; HESS, R. A.; JANSSEN, S.; OSAWA, Y.; BUNICK, D. Rat testicular germ cells and epididymal sperm contain active P450 aromatase. **Journal of Andrology**, v. 19, n. 1, p. 65-71, 1998.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Aparelho reprodutor masculino. In: JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. Cap. 21, p. 414-430.

KAMINSKI, M. A.; CORBIN, C. J.; CONLEY, A. J. Development and differentiation of the interstitial and tubular compartments of fetal porcine testes. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 119–127, 1999.

KERR, J. B. Male reproduction system. In: KERR, J. B. **Atlas of functional histology**, New York: Mosby International Limited, 2000. Cap. 18, p. 339-358.

KWON, S.; HESS, R. A.; BUNICK, D.; NITTA, H.; JANULIS, L.; OSAWA, Y.; BAHR, J. M. Rooster testicular germ cells and epididymal sperm contain P450 aromatase. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 1259-1264, 1995.

LIU, Y.; DETTIN, L. E.; FOLMER, J.; ZIRKIN, B. R.; PAPADOPOULOS, V. Abnormal morphology of spermatozoa in cytochrome P450 17- α -hydroxylase/17, 20-lyase (CYP17) deficient mice. **Journal of Andrology**, v. 28, n. 3, p. 453-460, 2007.

LIU, Y.; YAO, Z.; PAPADOPOULOS, V. Cytochrome P450 17- α -hydroxylase/17,20 lyase (CYP17) function in cholesterol biosynthesis: identification of squalene monooxygenase (epoxidase) activity associated with CYP17 in Leydig cells. **Molecular Endocrinology**, v. 19, p. 1918–1931, 2005.

MACHADO JÚNIOR, A. A. N.; OLIVEIRA, L. S.; ASSIS NETO, A. C.; ALVES, F. R.; MIGLINO, M. A.; CARVALHO, M. A. Spermatogenesis in goats with and without scrotum bipartition. **Animal Reproduction Science**, v. 130, n. 1-2, p.42-50, 2012.

MERLET, J.; RACINE, C.; MOREAU, E.; MORENO, S. G.; HABERT, R. Male fetal germ cells are targets for androgens that physiologically inhibit their proliferation. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. v. 104, p. 3615– 3620, 2007.

MENEZES, D. J. A. **Caracterização do ciclo reprodutivo anual de cutia macho (Rodentia: Dasyproctidae) criado em cativeiro: dinâmica testicular e avaliação hormonal**. 2010. 78 f. Tese (Doutorado em Sanidade e Reprodução Animal) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, 2010.

MENEZES, D. J. A. **Morfologia dos órgãos genitais masculinos da cutia (*Dasyprocta agouti*, Linnaeus, 1766).** 2001. 169 f. Dissertação (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, 2001.

MENEZES, D. J. A.; CARVALHO, M. A. M.; ASSIS NETO, A. C.; OLIVEIRA, M. F.; FARIAS, E. C.; MIGLINO, M. A.; MEDEIROS, G. X. Morfologia dos órgãos genitais externos do macho de cutia (*Dasyprocta agouti*, Linnaeus, 1766). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 40, p. 148-153, 2003. Suplemento, 2.

MILLER, W. L. The syndrome of 17,20-lyase deficiency. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 97, n. 1, p. 59–67, 2012.

MOOJEN, J. **Os roedores do Brasil**. Rio de Janeiro: Biblioteca Científica Brasileira, 1952. 214 p.

MOREIRA, V. M. A. **Novos esteroides inibidores da biossíntese de androgênios**. 2008. 278 f. Tese (Doutorado em Química Farmacêutica) – Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, Portugal, 2008.

NITTA, H.; BUNICK, D.; HESS, R. A.; JANULIS, L.; NEWTON, S. C.; MILLETTE, C. F.; OSAWA, Y.; SHIZUTA, Y.; TODA, K.; BAHR, J. M. Germ cells of the mouse testis express P450 aromatase. **Endocrinology**, v.132, p. 1396-1401, 1993.

NOGUEIRA FILHO, S. L. G.; NOGUEIRA, S. S. C. Criação comercial de animais silvestres: produção e comercialização da carne e de subprodutos na região sudeste do Brasil. **Revista Econômica do Nordeste**, Fortaleza, v. 31, n. 2 p. 188-195, abr-jun. 2000.

NORMAN, A. W.; LITWACK, G. **Hormones**. 2. ed., London: Academic Press, 1997.

OMURA, T.; SATO, R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes: evidence for its hemoprotein nature. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 239, n. 7, p. 2370-2378, 1964.

ORSI, A. M.; SIMÕES, K.; DOMENICONI, R. F.; DA CRUZ, C.; MACHADO, M. R. F.; FILHO, J. G. Vas deferens surface epithelium of *Agouti paca*: fine structural features. **International Journal of Morphology**, v. 27, n. 1, p. 89-96, 2009a.

ORSI, A. M.; SIMÕES, K.; MACHADO, M. R. F.; DOMENICONI, R. F. Características regionais sobre a ultraestrutura das células principais do epitélio do ducto epididimário de *Agouti paca*. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, v. 46, n. 6, p. 455-464, 2009b.

PARAÍBA. **Prefeitura Municipal de Santa Luzia. Ibama autoriza comercialização de preá**. 2007. Disponível em: <<http://www.santaluzia.pb.gov.br/index.php?pg=noticias&id=794>>. Acesso em: 06 jun. 2011.

PEREYRA-MARTINEZ, A. C.; ROSELLI, C. E.; STADELMAN, H. L.; RESKO, J. A. Cytochrome P450 aromatase in testis and epididymis of male rhesus monkeys. **Endocrine**, v. 16, n. 1, p. 15-19, 2001.

PEROBELLI, J. E.; ALVES, T. R.; TOLEDO, F. C.; FERNANDEZ, C. D. B.; ANSELMO-FRANCI, J. A.; KLINEFELTER, G. R.; KEMPINAS, W. D. G. Impairment on sperm quality and fertility of adult rats after antiandrogen exposure during prepuberty. **Reproductive Toxicology**, v. 33, n. 3, p. 308–315, 2012.

PUDNEY, J. Fine structural changes in Sertoli and Leydig cells during the reproductive cycle of ground squirrel, *Citellus lateralis*. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 77, p. 37-49, 1986.

REY, R. Anti-Müllerian hormone in disorders of sex determination and differentiation. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo**, v. 49, n. 1, p. 26-36, 2005.

ROBAIRE, B.; HINTON, B. T.; ORGEBIN-CRIST, M.-C. The epididymis. In: ROBAIRE, B.; HINTON, B. T.; ORGEBIN-CRIST, M.-C. **Knobil and Neill's physiology of reproduction**. 3. ed. New York: Elsevier, 2006. Cap. 22, p. 1071-1148.

RODRIGUES, R. F. **Caracterização morfológica da subplacenta em cutia (*Dasyprocta leporina*)**. 2005. 112 f. Tese (Doutorado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, 2005.

RUSSELL, L. D.; FRANÇA, L. R.; BRINSTER, R. L. Ultrastructural observations of spermatogenesis in mice resulting from transplantation of mouse spermatogonia. **Journal of Andrology**, v. 17, n. 6, p. 603-614, 1996.

SANTOS, P. R. S. **Estudo ultraestrutural do desenvolvimento da espermatogênese e da via espermática de preás (*Galea spixii*; Wagler, 1831) criados em cativeiro**. 2012. 149 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

SANTOS, P. R. S.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R.; ASSIS NETO, A. C. Development of spermatogenesis in captive-bred Spix's yellow-toothed cavy (*Galea spixii*). **Reproduction, Fertility and Development**, v. 6, n. 24, p. 877-85, 2012.

SASANO, H.; MASON, J. I.; SASANO, N. Immunocytochemical analysis of cytochrome P-450 17 α -hydroxylase in pig adrenal cortex, testis and ovary. **Molecular Cell Endocrinology**, v. 62, p.197–202, 1989.

SCHLEICHER, G.; DREWS, U.; STUMPF, W. E. No evidence for aromatization of [3H]testosterone in oestrogen receptor containing cells of the epididymis. **Journal of Steroid Biochemical**, v. 32, p. 299–302, 1989.

SHIMMING, B. C.; PINHEIRO, P. F. F.; VICENTINI, C. A.; DOMENICONI, R. F. Ultrastructure of the epithelium lining of cauda epididymis in mongrel dogs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 32, n. 1, p. 32-36, 2012.

SMYTHE, N. The natural history of the Central American agouti (*Dasyprocta punctata*). **Smithsonian Contributions to Zoology**, v. 257, p. 1–52, 1978.

SUMITANI, H.; SHOZU, M.; SEGAWA, T.; MURAKAMI, K.; YANG, H. J.; SHIMADA, K.; INOUE, M. *In situ* estrogen synthesized by aromatase P450 in uterine leiomyoma cells promotes cell growth probably via an autocrine/intracrine mechanism. **Endocrinology**, v. 141, n. 10, p. 3852-3861, 2000.

TOLOSA, E. M. C.; RODRIGUES, C. J.; BEHMER, O. A.; FREITAS NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2. ed. Barueri: Manole, 2003. 331 p.

VIEIRA, F. A. S.; ASSIS NETO, A. C.; MENEZES, D. J. A.; PEREIRA, F. T. V. **Influência do foto período na espermatogênese de cutias adultas: frequência e caracterização dos estádios do ciclo do epitélio seminífero de cutias segundo a dinâmica sexual anual**. Dracena: __, 2009. p. 1380–1383.

ZANATTA, L.; BOURAÏMA-LELONG, H.; DELALANDE, C.; SILVA, F. R.; CARREAU, S. Regulation of aromatase expression by 1- α ,25(OH)₂ vitamin D₃ in rat testicular cells. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, p. 725–735, 2011.