



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS TESTÍCULOS E EPIDÍDIMOS DE SAGUIS  
HÍBRIDOS *Callithrix* sp.

MARIAH MILLY YOSHIKAWA

OURO PRETO, MG  
2019

MARIAH MILLY YOSHIKAWA

ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS TESTÍCULOS E EPIDÍDIMOS DE SAGUIS  
HÍBRIDOS *Callithrix* sp.

Monografia apresentada à Universidade Federal de Ouro Preto como requisito da disciplina Seminários de Pesquisa e Monografia II (CBI261) para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Ouro Preto.

Área de concentração: Ciências Biológicas

Orientadora: Dra. Katiane Oliveira Pinto Coelho Nogueira

OURO PRETO, MG  
2019

Y831t Yoshikawa, Mariah Milly.  
Análise morfológica dos testículos e epidídimos de Saguis híbridos *Callithrix*  
sp [manuscrito] / Mariah Milly Yoshikawa. - 2019.

36f.: il.: color; mapas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Katiane Oliveira Pinto Coelho Nogueira.

Monografia (Graduação). Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de  
Ciências Exatas e Biológicas. Departamento de Ciências Biológicas.

1. Saguis híbridos. 2. Espermatogênese em animais. I. Nogueira, Katiane  
Oliveira Pinto Coelho. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 599.821

Universidade Federal de Ouro Preto

Instituto de Ciências Exatas e Biológicas  
Departamento de Ciências Biológicas

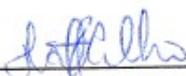


Ata da Banca Examinadora de Defesa de Monografia Intitulada:

"ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS TESTÍCULOS E EPIDÍDIMOS DE SAGUIS  
HÍBRIDOS *Callithrix sp* "

Aos 10 dias do mês de julho de 2019, as 13:30, no sala de seminários do Departamento de Ciências Biológicas do ICEB, reuniu-se a Comissão examinadora da Monografia da aluna Mariah Milly Yoshikawa. A defesa pública de monografia iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e declararam a candidata aprovada, com a nota 10,0.

Membros da Banca Examinadora

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Katiane de Oliveira Pinto Coelho Nogueira  
Orientadora (Dep. Ciências Biológicas-UFOP)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Laser Antônio Machado Oliveira  
Examinador (Dep. Ciências Biológicas-UFOP)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Maria Rita Silvério Pires  
Examinadora (DEBIO/UFOP)

## DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho às mentes curiosas e à Natureza.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais e irmão por me darem apoio e incentivo ao longo dessa jornada.

Aos membros do Laboratório de Biomateriais e Parasitologia Experimental (LBPE), em especial Iara, Laser e Ana por me ajudarem na confecção deste trabalho.

À Katiane pela orientação acadêmica e pelo suporte dentro e fora da sala de aula.

Ao Laboratório de Morfologia Animal da Universidade Federal de Viçosa pela colaboração.

Aos professores do Departamento de Ciências Biológicas (DECBI) e Departamento de Biodiversidade, Evolução e Meio-Ambiente (DEBIO) da UFOP, por me proporcionarem a base acadêmica necessária para essa pesquisa.

Aos funcionários do ICEB e colegas da Biologia pela ajuda ao longo dos anos.

Aos meus amigos de longe e de perto, sem vocês teria sido muito chato!

*“A ciência e a vida cotidiana não podem e não devem ser separadas.”*

*- Rosalind Franklin*

## RESUMO

Os saguis híbridos *Callithrix* sp. se distribuem pela Mata Atlântica, Cerrado e Caatinga brasileiros. O estudo da morfologia de seus túbulos seminíferos e epidídimos proporciona informações para *insights* sobre seus processos reprodutivos. No presente trabalho, foram analisados cortes histológicos das gônadas de três exemplares machos adultos capturados em Viçosa, MG, sendo que dois foram coletados em estação seca e um em estação chuvosa. Os túbulos seminíferos de todos indivíduos apresentaram espermatogênese ativa. Os epidídimos de todos saguis apresentaram espermatozoides armazenados. Os resultados indicam que os saguis machos híbridos *C. penicillata* x *C. geoffroyi* são possivelmente férteis, podendo se reproduzir ao longo de todo o ano.

Palavras-chave: saguis híbridos; espermatogênese; túbulo seminífero; epidídimo; sazonalidade.

## ABSTRACT

The hybrid marmosets *Callithrix* sp. are distributed in the Brazilian Atlantic Forest, Cerrado and Caatinga biomes. The study of the morphology of its seminiferous tubules and epididymis provides information for insights into its reproductive processes. In the present work, histological sections of the gonads of three adult male specimens captured in Viçosa, MG were analyzed, two of which were collected in the dry season and one in the rainy season. The seminiferous tubules of all individuals presented active spermatogenesis. The epididymis of all marmosets showed spermatozoa stored in. The results indicate that the hybrid male marmosets *C. penicillata* x *C. geoffroyi* are possibly fertile and may reproduce throughout the year.

Keywords: hybrid marmosets; spermatogenesis; seminiferous tubule; epididymis; seasonality.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa de distribuição das espécies de <i>Callithrix</i> no leste brasileiro.....	13
Figura 2 - Ilustrações dos saguis do gênero <i>Callithrix</i> .....	14
Figura 3 - Esquema de um túbulo seminífero humano.....	19
Figura 4 - Desenho esquemático de um epidídimo.....	21
Figura 5 - Organização geral do testículo de um sagui híbrido.....	27
Figura 6 - Montagem fotográfica de células germinativas.....	28
Figura 7 - Túbulos seminíferos de saguis coletados em diferentes estações.....	29
Figura 8 - Epidídimos de saguis coletados em diferentes estações.....	30

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
1.1	GÊNERO <i>CALLITHRIX</i> .....	11
1.2	HIBRIDAÇÃO.....	15
1.3	ESPERMATOGÊNESE.....	17
<b>2</b>	<b>HIPÓTESE.....</b>	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
4.1	COLETA E EUTANÁSIA.....	24
4.2	PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS.....	24
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>25</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>31</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>32</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>33</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o país que abriga a maior biodiversidade do planeta (BRASIL, 2019a), com 162.183 espécies descritas atualmente, entre fauna e flora (BRASIL, 2019b). Desse montante, calcula-se uma estimativa de aproximadamente 19 mil espécies endêmicas (BRASIL, 2019b). O Programa Pró-espécies instituído pelo Ministério do Meio-Ambiente, em 2014, tem como objetivos a prevenção, conservação, manejo e gestão da biodiversidade brasileira, usando como principais instrumentos a listagem nacional oficial de espécies ameaçadas de extinção, Planos de Ação Nacionais para Conservação de Espécies Ameaçadas de Extinção (PANs) e a elaboração de bases de dados e sistemas de informação (BRASIL, 2019a), pois somente através do conhecimento obtido sobre a nossa biodiversidade é que medidas efetivas podem ser elaboradas e executadas para sua preservação.

Dentre os animais reconhecidamente endêmicos do nosso país, encontra-se o gênero de primatas *Callithrix* Erxleben, 1777, composto por seis espécies de saguis, descritas mais a frente no texto (CEZAR; PESSOA; BONVICINO, 2017). No entanto, estas espécies vêm sofrendo processos de hibridação entre si, uma das consequências de ações antrópicas sobre o meio-ambiente, com potencial de extinção de suas espécies (SALLES DE CARVALHO et al., 2018).

Com o intuito de compreender os padrões sazonais reprodutivos dos híbridos gerados entre *C. penicillata* e *C. geoffroyi* capturados em fragmentos florestais urbanos em Viçosa, MG, foram analisadas as gônadas de três exemplares machos coletados nas estações seca e chuvosa.

### 1.1 GÊNERO *CALLITHRIX*

Das cerca de 700 espécies e subespécies de primatas catalogadas ao redor do planeta (ESTRADA et al., 2017; RYLANDS; MITTERMEIER, 2009), 152 espécies fazem parte de um grupo conhecido como “Primatas do Novo Mundo” ou “Primatas Neotropicais” (Platyrrhini) (RYLANDS; MITTERMEIER; SILVA, 2012), considerado subordem por Hershkovitz (1972) e infraordem por Rylands & Mittermeier (2009). Os

primatas do Novo Mundo se caracterizam por habitarem a região tropical das Américas Central e do Sul (HERSHKOVITZ, 1972) e, à primeira vista, se diferem anatomicamente dos primatas conhecidos como “do Velho Mundo” pelo focinho curto e achatado para os lados (AURICCHIO, 1995).

A família Callitrichidae Thomas, 1903, uma das cinco famílias representantes dos Primatas Neotropicais, se divide, atualmente, em seis gêneros válidos: *Callithrix* Erxleben, 1777; *Cebuella* Gray, 1866; *Mico* Lesson, 1840; *Leontopithecus* Lesson, 1840; *Saguinus* Hoffmannsegg, 1807 e *Callimico* Miranda Ribeiro, 1912; a validação de *Callibella* Van Roosmalen & Van Roosmalen, 2003 como gênero é discutida entre autores, demonstrando que as relações filogenéticas intra e intergrupos dos platirrinos ainda gera muitas dúvidas e discordâncias (ROOS; ZINNER, 2017; RYLANDS et al., 2016; RYLANDS; MITTERMEIER, 2009; RYLANDS; MITTERMEIER; SILVA, 2012).

Os calitriquídeos são conhecidos vulgarmente como saguis, micos e callimicos, com o peso variando entre 100g e 540g (FORD; PORTER; DAVIS, 2009), são intitulados os “menores primatas antropoides existentes” (HERSHKOVITZ, 1972; RYLANDS; COIMBRA-FILHO; MITTERMEIER, 2009). Cinco características são bem particulares dessa família: a gestação de gêmeos, ausência dos terceiros molares, molares superiores trituberculares, presença de garras ao invés de unhas (em todos dígitos, exceto no hálux) e o pequeno tamanho corporal (FORD, 1980). A grande plasticidade desses animais os torna grandes exploradores de novos habitats e dos mais variados meios de subsistência (SUSSMAN; KINZEY, 1984).

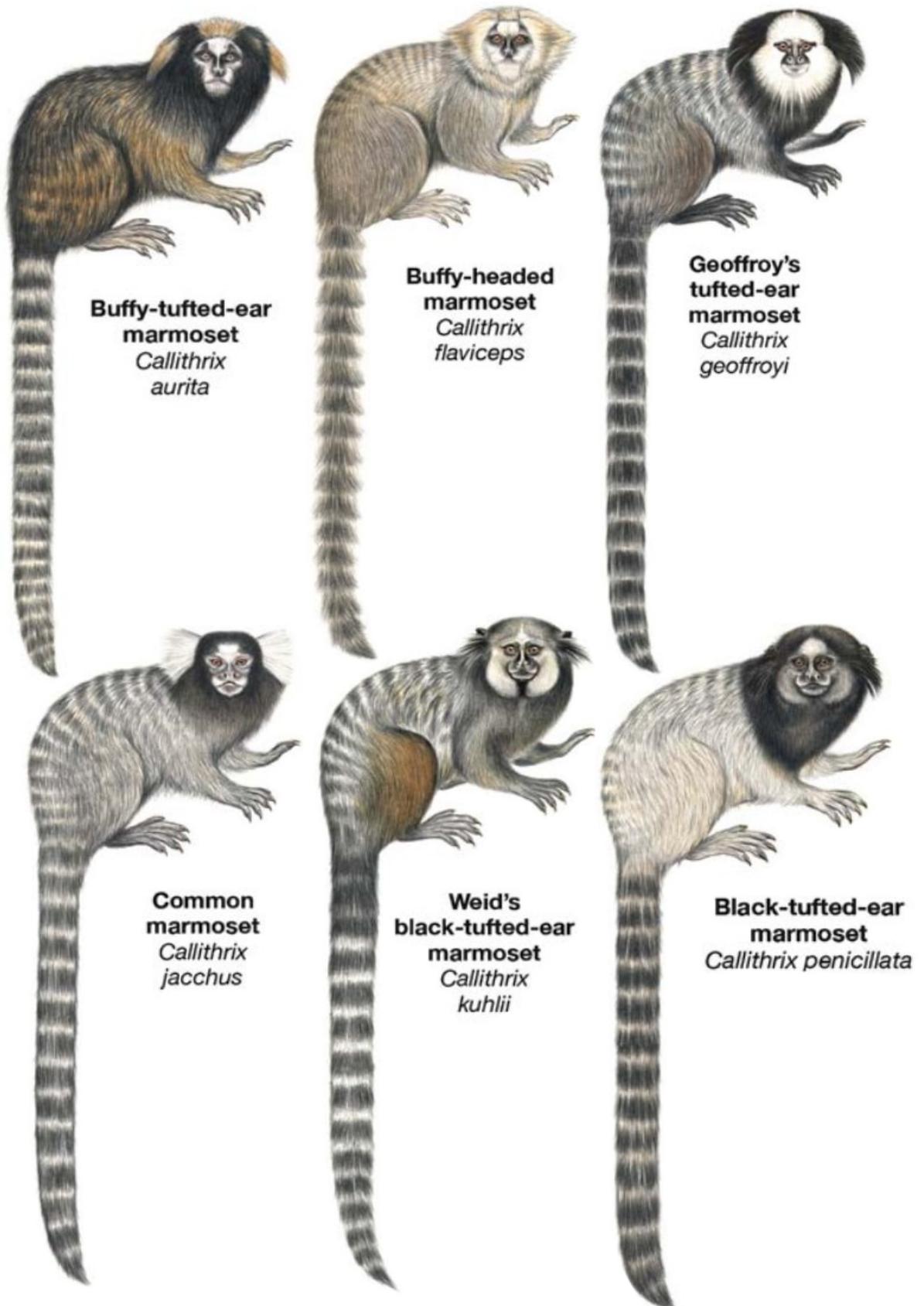
Dentro de Callitrichidae, o gênero *Callithrix* engloba pequenos primatas que se distribuem pelo leste do Brasil, ao longo dos biomas da Mata Atlântica, do Cerrado e da Caatinga (Figura 1) (RYLANDS; MITTERMEIER, 2009). Seis espécies endêmicas compõem esse táxon: *Callithrix jacchus* (Linnaeus, 1758), vulgo “sagui-comum”; *C. aurita* (Geoffroy Saint-Hilaire, 1812), vulgo “sagui-da-serra-escuro” ou “sagui-estrela-preto”; *C. penicillata* (Geoffroy Saint-Hilaire, 1812), vulgo “sagui-de-tufos-pretos” ou “mico-estrela”; *C. geoffroyi* (Humboldt, 1812), vulgo “sagui-de-cara-branca”; *C. kuhlii* (Coimbra-Filho, 1985), vulgo “sagui-de-Wied”; e *C. flaviceps* (Thomas, 1903), vulgo “sagui-da-serra” (AURICCHIO, 1995; RYLANDS; COIMBRA-FILHO; MITTERMEIER, 2009). Seus nomes populares são geralmente relacionados aos tufos auriculares, também chamados de ornamentos pilosos, ao redor das

orelhas, com colorações e arranjos característicos em cada espécie (AURICCHIO, 1995) como apresentado na Figura 2.

Figura 1 - Mapa de distribuição das espécies de *Callithrix* no leste brasileiro.



Fonte: (RYLANDS; COIMBRA-FILHO; MITTERMEIER, 2009).

Figura 2 - Ilustrações dos saguis do gênero *Callithrix*.

Fonte: modificado de FORD, PORTER &amp; DAVIS (2009).

Esses pequenos primatas se nutrem dos mais variados recursos, tanto de matéria vegetal quanto animal (FRANCISCO; SILVA; BOERE, 2015). A dieta principal deles é baseada em insetos; frutos, flores e néctar; e exsudatos (seiva, resina, látex e goma) (SUSSMAN; KINZEY, 1984). Ocasionalmente, consomem folhas, pequenos vertebrados e ovos (SILVA et al., 2018; SUSSMAN; KINZEY, 1984).

As estações do ano afetam a ocorrência e abundância dos recursos, em especial, de insetos, frutos e folhas (SUSSMAN; KINZEY, 1984). Para os *Callithrix*, a insetivoria é maior em estação chuvosa e é grande fonte de carboidratos, proteínas, gordura, minerais e vitaminas (ROTHMAN et al., 2014). Na estação seca, a menor abundância de insetos e frutos, faz com que os animais complementem a dieta com exsudatos, para isso, apresentam dentição especializada em lesionar o tronco de árvores, formando orifícios por onde escorre a goma, alimento que é grande fonte de energia e nutrientes (FRANCISCO; SILVA; BOERE, 2015).

De acordo com a Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN), cujas categorias do estado de ameaça das espécies são: pouco preocupante (LC = *least concern*), quase ameaçada (NT = *near threatened*), vulnerável (VU = *vulnerable*), em perigo (EN = *endangered*), em perigo crítico (CR = *critically endangered*), extinta na natureza (EW = *extinct in the wild*) e extinta (EX = *extinct*), as espécies *C. jacchus*, *C. penicillata* e *C. geoffroyi* se encontram na categoria “pouco preocupante”, *C. kuhlii* é considerada “quase ameaçada”, *C. aurita* está “vulnerável” e *C. flaviceps* se encontra “em perigo” (IUCN, 2019).

## 1.2 HIBRIDAÇÃO

A ocorrência de espécies fora de sua área de distribuição natural e que causa grande impacto ambiental no habitat invadido é um fenômeno chamado de “invasão de espécies” ou “invasão biológica”. Esse tipo de evento pode alcançar distâncias curtas, acontecendo de forma natural por meio da expansão geográfica de uma espécie, ou pode ocorrer a longas distâncias do local de origem da espécie exótica, geralmente, por meio de ações antrópicas, intencionais ou não (DAVIS;

THOMPSON, 2000). A invasão de espécies é um dos maiores causadores de perda de biodiversidade no planeta, junto a modificação de habitats (destruição e fragmentação), exploração madeireira e superexploração de recursos naturais (HOFFMANN et al., 2010; WALKER; WILL, 1997). Atualmente, somam-se as mudanças climáticas ao rol de catalisadores da perda de biodiversidade global (BELLARD et al., 2014).

Os impactos negativos causados por uma invasão de espécies dependem da abundância dos invasores e da vulnerabilidade do habitat invadido, podendo ser os mais variados ao longo do tempo (STRAYER et al., 2006). Esse processo pode extinguir espécies nativas de diversas maneiras, seja pela predação ativa de indivíduos ou pelo mecanismo de hibridação genética (RHYMER; SIMBERLOFF, 1996).

O conceito de “hibridação” é historicamente utilizado entre botânicos, mas a importância desse fenômeno na história evolutiva de espécies animais vem sendo melhor reconhecida entre zoólogos e evolucionistas (ALLENDORF et al., 2001). Rhymer & Simberloff (1996) definem “hibridação” como o “intercruzamento de indivíduos provavelmente provenientes de populações geneticamente diferentes, independentemente da hierarquia taxonômica dessas populações”. Ou seja, o cruzamento de dois indivíduos, que podem ou não ser da mesma espécie, mas que são de populações distintas geneticamente. A hibridação pode ocasionar introgressão genética, quando ocorre fluxo gênico entre as populações dos indivíduos que intercruzaram, através do acasalamento dos híbridos com indivíduos das populações de um ou ambos de seus genitores (RHYMER; SIMBERLOFF, 1996).

Indivíduos híbridos podem apresentar características fenotípicas muito variadas, que dificultam sua identificação, sendo que sua morfologia pode ser parecida com a população de um parental ou um mosaico de mistura, balanceado ou não, de ambos os parentais (ACKERMANN; ROGERS; CHEVERUD, 2006), o que torna a identificação de um híbrido uma bem tarefa complexa. Além disso, a detecção de introgressão só é possível através de análises moleculares, visto que nem toda introgressão gera uma alteração morfológica e nem toda alteração morfológica é resultado de introgressões genéticas (RHYMER; SIMBERLOFF, 1996).

A hibridação entre primatas não-humanos ocorre frequentemente na natureza e faz parte de suas histórias evolutivas, incluindo do *Homo sapiens* (ACKERMANN; ROGERS; CHEVERUD, 2006). No entanto, dentre os primatas Neotropicais, com aproximadamente 132 espécies descritas, existem suposições da ocorrência de hibridação em ambiente selvagem em apenas oito, sendo que esses animais são de tamanho corporal pequeno e de táxons divergidos há pouco tempo (considerando o tempo geológico) (CORTÉS-ORTIZ et al., 2007).

No recente gênero *Callithrix*, a hibridação natural entre espécies ocorre em áreas de transição ecológica, como o exemplo relatado por Ferrari & Mendes (1991) em que híbridos de *C. flaviceps* X *C. geoffroyi* foram detectados em áreas montanhosas de florestas no Espírito Santo (MALUKIEWICZ, 2019). Outro tipo de ambiente onde a hibridação de saguis é comum são os limites de rios, e esses casos sempre envolvem a espécie *C. penicillata* como um dos parentais (MALUKIEWICZ, 2019).

A hibridação antropogênica dos *Callithrix* resulta principalmente do tráfico de animais, que são vendidos como animais domésticos ou “pets” (SALLES DE CARVALHO et al., 2018). Geralmente, são as espécies *C. jacchus* e *C. penicillata* retiradas de seus habitats naturais e levadas para os estados do Rio de Janeiro, São Paulo e Minas Gerais, onde são soltas em florestas por seus “donos” e acabam estabelecendo populações exóticas que competem por recursos ou hibridam com os calitriquídeos nativos (SALLES DE CARVALHO et al., 2018).

### 1.3 ESPERMATOGÊNESE

O aparelho reprodutor masculino é responsável pela contínua produção de gametas masculinos (i.e., espermatozoides) e pelo seu armazenamento temporário, além de sintetizar e secretar hormônios sexuais androgênicos (KIERSZENBAUM, 2008).

Em primatas, Cline *et al.* (2012) descrevem que, usualmente, a anatomia geral externa do aparelho reprodutor masculino é composta por um pênis com glândula, báculo, uma prega cutânea prepucial e os testículos inseridos nas bolsas escrotais. Internamente, no geral, os primatas possuem glândulas sexuais

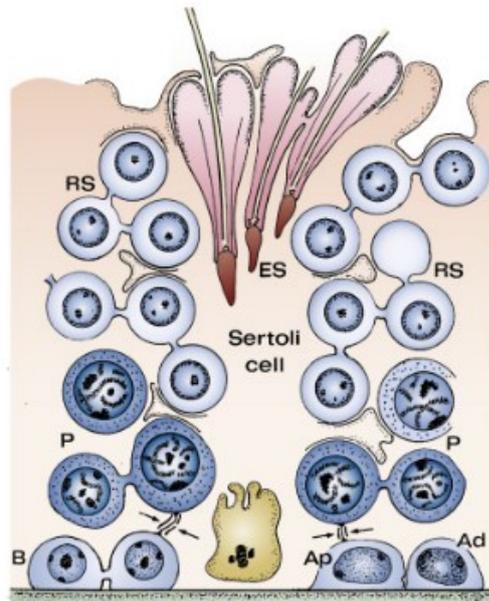
acessórias que consistem em vesículas seminais, próstata e glândulas bulbouretrais, e um conjunto de ductos intra e extratesticulares (CLINE; BRIGNOLO; FORD, 2012).

A espermatogênese é o processo celular de formação dos espermatozoides que acontece dentro dos testículos, mais especificamente, nos túbulos seminíferos (TS) e é altamente afetada pela temperatura (HESS, 1998; GARCIA; FERNÁNDEZ, 2012; MOORE; PERSAUD, 2008). Em mamíferos, esse processo é comumente dividido em três etapas sucessivas: (1) MITÓTICA: multiplicação das espermatogônias por meio de mitoses; (2) MEIÓTICA: duas meioses sucessivas dos espermatócitos, que resultam em células haploides chamadas de espermátides; e (3) ESPERMIOGÊNESE: processo de transformação das espermátides em espermatozoides maduros (CLERMONT, 1972; MOORE; PERSAUD, 2008; WISTUBA et al., 2003).

A partir do parágrafo seguinte até o final deste subcapítulo, as informações obtidas sobre o aparelho reprodutor masculino e a espermatogênese foram baseadas em Kierszenbaum (2008), quando não especificado.

As gônadas de indivíduos do sexo biológico masculino são os testículos, que se dividem parcialmente em lóbulos, os quais alojam os túbulos seminíferos, que além de produzirem os espermatozoides, sintetizam e secretam líquidos para manutenção das células germinativas. O epitélio seminífero dos túbulos é constituído por células de linhagem germinativa e células de Sertoli (SE). Essas últimas, são células somáticas, que se apoiam na lâmina basal dos túbulos e se estendem até o lúmen, funcionando como bases de sustentação e contenção das células germinativas, formando a “barreira hematotesticular”. A estrutura de um túbulo seminífero é vista da Figura 3.

Figura 3 - Esquema de um túbulo seminífero humano. Ocupando a parte central da figura, nota-se uma célula de Sertoli cuja base fica na lâmina basal (parte inferior da figura), se estendendo até a luz do túbulo (parte superior da figura), com o núcleo retangular e amarronzado. As setas indicam junções de oclusão entre células de Sertoli. Espermatogônias tipo A pálidas (Ap), A escuras (Ad) e B são vistas aderidas à lâmina basal, em azul-claro. Espermatócitos primários (P) são vistos logo acima das espermatogônias, são maiores e estão em azul-escuro. Logo acima dos espermatócitos primários, estão as espermatídes arredondadas (RS), em azul-claro. As espermatídes alongadas (ES) são vistas na parte central superior, em rosa com extremidade inferior marrom.



Fonte: (DE KRETZER; LOVELAND; O'BRYAN, 2016).

As espermatogônias são as primeiras células da linhagem germinativa. São pequenas, diploides e se encontram sobre a lâmina basal dos túbulos seminíferos. São células-tronco que se reproduzem periodicamente para recompor a quantidade de espermatogônias que entraram em processo de diferenciação, mantendo a estrutura do epitélio seminífero (CLERMONT, 1969). Em *Callithrix jacchus*, assim como em humanos, existem dois tipos morfológicos de espermatogônias, as tipo A e as tipo B (MILLAR et al., 2000). Após sofrerem divisões mitóticas, elas aumentam seu volume e originam os espermatócitos primários.

Os espermatócitos primários são as maiores células da linhagem espermatogênica (têm o dobro de DNA de uma espermatogônia) e podem ser vistas em diferentes estágios meióticos da prófase (leptóteno, zigóteno, paquíteno, diplóteno e diacinese), sendo de fácil observação ao microscópio por causa do tamanho e quantidade das células e, também, por ser um processo mais demorado (dias). Após a meiose I, as células geradas se tornam espermatócitos secundários,

os quais sofrem a meiose II, resultando em células-filhas, chamadas de espermatídes. Os espermátocitos secundários, no entanto, são de difícil observação, pois a meiose II ocorre em questão de minutos.

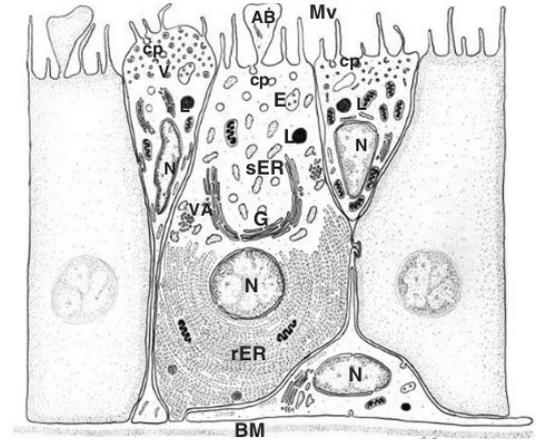
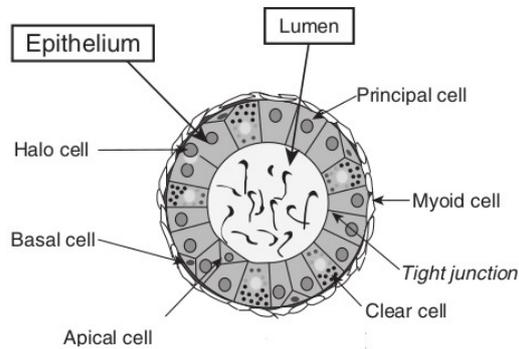
As espermatídes se encontram mais próximas à luz dos TS, partindo de uma forma arredondada (espermatíde inicial) até atingirem um formato alongado (espermatíde final). A espermiogênese é o processo de diferenciação das espermatídes, nela ocorre o desenvolvimento do flagelo, do acrossoma e da manchete e a condensação nuclear. Ao final do processo, as espermatídes são liberadas no lúmen dos TS, através da espermiação realizada pelas SE.

Os espermatozoides maduros são compostos, morfologicamente, por uma cabeça e uma cauda. A cabeça é formada por um núcleo condensado e achatado e uma cobertura chamada acrossoma, que contém enzimas líticas que são liberadas durante a fecundação, facilitando a penetração dos espermatozoides no ovócito. A cauda é responsável por sua mobilidade.

As regiões intertubulares dos testículos são preenchidas por estroma intersticial e pelas células de Leydig, além de comportarem os vasos sanguíneos e linfáticos. As células de Leydig (Le) são produtoras de esteroides, sendo responsáveis por cerca de 95% da testosterona encontrada no soro de um indivíduo.

Os espermatozoides produzidos nos túbulos seminíferos são transportados pelos túbulos retos para a rede testicular e, depois, para o epidídimo, através dos túbulos eferentes. O epidídimo é um tubo enovelado, no qual ocorre a maturação dos espermatozoides, dando a eles a capacidade de motilidade para frente, aspecto essencial para a fecundação bem sucedida. O epitélio dessa estrutura é pseudoestratificado colunar, que se estende da lâmina basal à luz do tubo. A região apical das células epiteliais possui especializações de membrana denominadas de estereocílios. Na lâmina basal, são encontradas células basais, de forma piramidal, que são consideradas precursoras das células principais. Um desenho esquemático de um epidídimo é visto na Figura 4.

Figura 4 - Desenho esquemático de um epidídimo. Do lado esquerdo é apresentado um corte transversal de um tubo de epidídimo, com células principais formando a maior parte do seu epitélio. O lúmen contém espermatozoides. Do lado direito, um corte longitudinal, aumentado, no qual é possível ver os estereocílios na porção apical das células principais.



Fonte: modificado de Robaire et al. (2006).

A espermatogênese é um processo extremamente complexo cujo sucesso depende de diversos fatores. As relações entre os diferentes tipos de célula e a sincronização e precisão dos processos intra e intercelulares são responsáveis pela produção de espermatozoides normais (DE KRETZER, 1979). Fisiologicamente, a regulação da espermatogênese é feita pelo eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, através de retroalimentação negativa (DE KRETZER, 1979; SCHLATT; EHMCKE, 2014). No hipotálamo ocorre a secreção de hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH), que age sobre a hipófise, induzindo a produção e secreção de hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), ambos gonadotrópicos (DE KRETZER, 1979). O LH age sobre as células de Leydig, induzindo a síntese e secreção de testosterona (DE KRETZER, 1979), cujas elevadas concentrações locais dão início ao processo da espermatogênese.

Apesar dos mecanismos de diferenciação celular e regulação espermatogênica não serem ainda completamente compreendidos, a espermatogênese bem sucedida é o passo inicial para a reprodução das espécies.

## 2 HIPÓTESE

Com base na diferença de recursos alimentícios disponíveis nas estações seca e chuvosa, pergunta-se: será que a sazonalidade influencia a espermatogênese de saguis híbridos?

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o efeito da sazonalidade sobre a morfologia dos testículos e epidídimos de saguis híbridos coletados em Viçosa, MG.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se há produção e estocagem de espermatozoides em saguis híbridos *Callithrix penicillata* x *C. geoffroyi*;
- Comparar a morfologia dos testículos e epidídimos entre saguis híbridos *C. penicillata* x *C. geoffroyi* coletados em estação chuvosa e seca;
- Comparar a morfologia dos testículos de saguis híbridos *C. penicillata* x *C. geoffroyi* com dados da literatura sobre *C. jacchus*.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 COLETA E EUTANÁSIA

Foram capturados, com armadilha de gaiola (tipo Tomahawk) e frutas, três exemplares de saguis híbridos machos adultos (*Callithrix penicillata* X *C. geoffroyi*). Os espécimes nomeados S1 e S3 foram coletados em agosto de 2016, em estação seca. O indivíduo S8 foi capturado em dezembro de 2016, em estação chuvosa. As capturas foram feitas em dois fragmentos de mata secundária nos arredores do campus da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais, sob licença nº 53584-1, emitida pelo Sisbio-ICMBio-MMA. A eutanásia dos animais foi feita com injeção intravenosa de pentobarbital 100mg/kg, aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFV (CEUA/UFV) sob o protocolo nº 62/2016.

### 4.2 PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS

As gônadas fixadas foram desidratadas em série crescente de alcoóis (70%, 80%, 90%, 95% e 100%), com troca a cada meia hora. Após a desidratação, foram infiltradas e incluídas em glicol metacrilato (Historesin®, Leica). Os blocos de resina com o material histológico foram seccionados com espessura de 2 µm, em um micrótomo semi-automático (EasyPath) com navalhas de tungstênio. Oito secções foram dispostas em cada lâmina de vidro. Elas foram, então, coradas com azul de toluidina 1% por dois minutos e lavadas em água corrente. Posteriormente, as lâminas foram montadas com Entellan® (Merck). As secções foram analisadas em microscópio Olympus CX31 com câmera digital (AmScope MU300) acoplada. Fotografias das secções dos túbulos seminíferos e epidídimos foram capturadas para a análise dos resultados.

## 5 RESULTADOS

A morfologia geral dos testículos e epidídimos dos saguis híbridos coletados em ambas estações (chuvosa e seca) é semelhante às descritas em saguis-comuns *Callithrix jacchus* e seres humanos. O epitélio dos túbulos seminíferos é composto por células germinativas espermatogênicas e de Sertoli, além de apresentarem processos de mitose e meiose. As regiões intertubulares são formadas por células de Leydig e vasos sanguíneos (Figura 5).

As espermatogônias são as células germinativas primordiais e se encontram na lâmina basal dos túbulos seminíferos, são pequenas, mas de fácil identificação. Elas apresentam três morfologias: as “A escuras” são ovaladas (lembra o formato de um olho) com grânulos de cromatina bem corados e núcleo escuro oval. As espermatogônias “A pálidas” têm formato parecido com as escuras, porém com núcleo pouco corado. As tipo B, são arredondadas, com núcleo levemente corado, bem redondo e nucléolo centralizado. Essas células sofrem mitoses, sendo responsáveis pela renovação epitelial (Figura 5).

Os espermatócitos podem ser primários ou secundários e se encontram no meio do epitélio. Os primários em leptóteno, são pequenas células redondas, com cromossomos parecidos com fios espalhados. Em zigóteno, as células são um pouco maiores que em leptóteno, também redondas e os cromossomos estão pareados, parecendo fios mais espessos. Em paquíteno, são as maiores células germinativas dos túbulos, com cromossomos bem corados, pois estão em espessamento. Células em meiose I ocorrem no meio de espermatócitos primários em paquíteno. Os espermatócitos secundários são redondos e de tamanho mediano com cor opaca, entre eles são observadas células em fases de meiose II (Figura 6).

As espermátides apresentam doze morfologias diferentes, partindo da forma arredondada à alongada com cauda. São bem pequenas e se encontram próximas do lúmen dos túbulos, com núcleos bem densos e corados (Figura 6).

Na Figura 7, são observados os túbulos seminíferos da estação chuvosa e seca. Ambos apresentam mais de um estágio espermatogênico por túbulo, de acordo com a tabela de estágios descrita por Holt & Moore (1984). As células de Sertoli estão presentes em toda extensão dos túbulos, com núcleo basal e projeções citoplasmáticas entremeando as células germinativas. Na Figura 8, os

epidídimos dos saguis híbridos são apresentados. Em ambas estações, há espermatozoides armazenados no lúmen. Nota-se uma diferença visual na quantidade de espermatozoides (o lúmen da figura A está bem cheio em comparação com o lúmen da figura B), no entanto, esta diferença por ter sido ocasionada pela diferença na altura que os cortes histológicos foram feitos – os espermatozoides são armazenados na cauda do epidídimo – ou por questões fisiológicas próprias de cada indivíduo. Os TS das duas estações apresentam células basais e principais similares, com esterocílios e ao redor dos tubos é possível ver a camada circular de músculo liso.

Figura 5 - Organização geral do testículo de um sagui híbrido. Coloração azul de toluidina. (A): aumento 10x. Barra = 50  $\mu\text{m}$ . TS: túbulo seminífero; TA: túnica albugínea; EP: epidídimo. (B): aumento 40x. Barra = 20  $\mu\text{m}$ . Le: células de Leydig; Vs: vaso sanguíneo. (C): aumento 40x. Barra = 20  $\mu\text{m}$ . Mi: mitose; SE: célula de Sertoli; P: espermátócito primário em paquíteno; Ad: espermátogônia A escura; I: região intersticial; rS-eS: espermátides em alongamento.

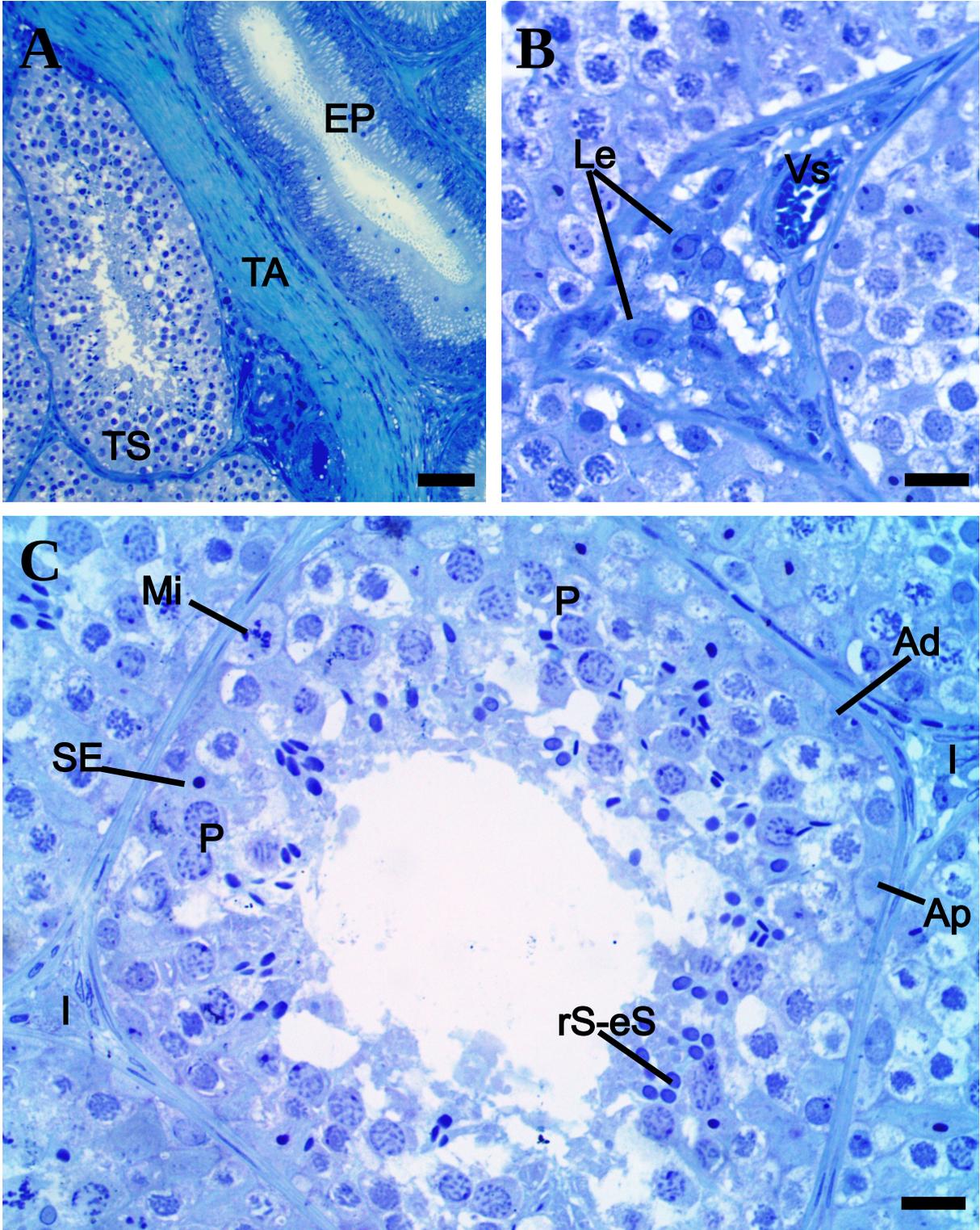


Figura 6 - Montagem fotográfica de células germinativas. Espermatogônias tipo A escura (Ad), em mitose (Mi), tipo A pálida (Ap) e B (b); Espermatócitos primários em fase de leptóteno (L), zigóteno (Z), paquíteno (P) e meiose I (M1); Espermatócito secundário (SII) e meiose II (M2); Espermatídes arredondada (rS) e alongada (eS).

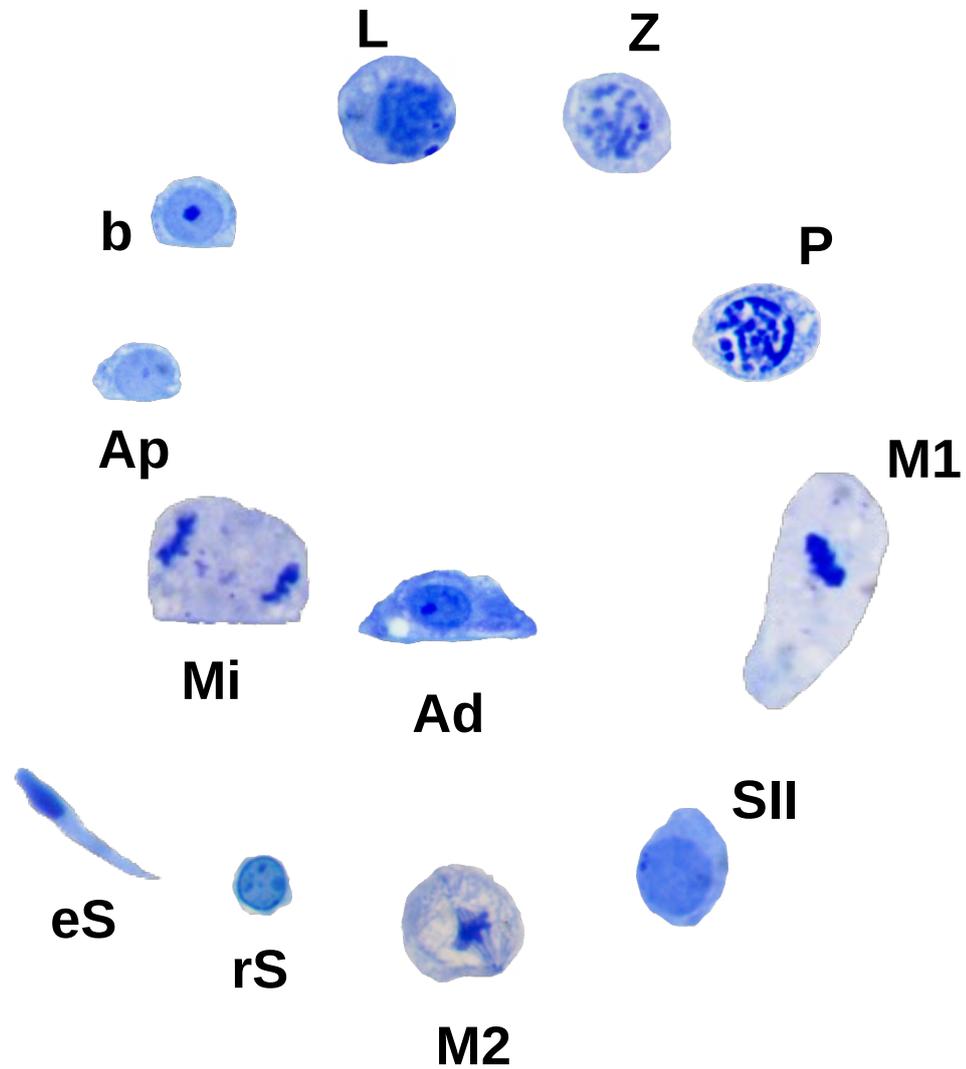


Figura 7 - Túbulos seminíferos de saguis coletados em diferentes estações. Coloração azul de toluidina. Aumento 40x. Barras = 20  $\mu$ m. **(A)**: estação chuvosa. Estágio VI-VII: Me: meiose; b: espermatogônia B; Espermatócitos primários em leptóteno (L), zigóteno (Z) e paquíteno (P). Estágio II: espermatogônia A escura (Ad) e espermatócito primário em paquíteno (P). **(B)**: estação seca. Estágio VIII: espermatogônias A escura (Ad) e B (b); espermatócitos primários em paquíteno (P). Estágio V: espermatogônia A pálida (Ap); Espermatócitos primários em leptóteno (L) e paquíteno (P). As setas indicam as espermátides.

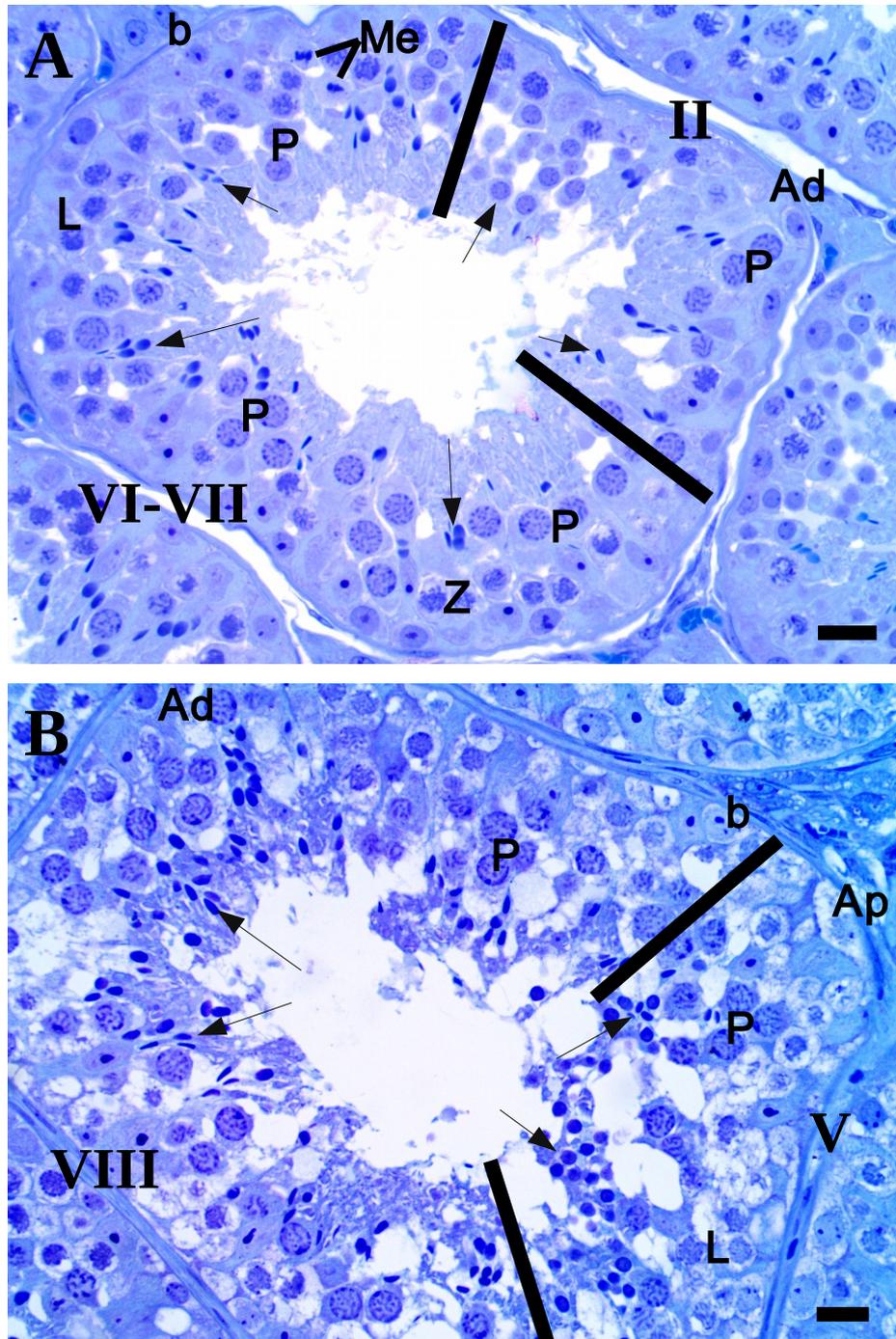
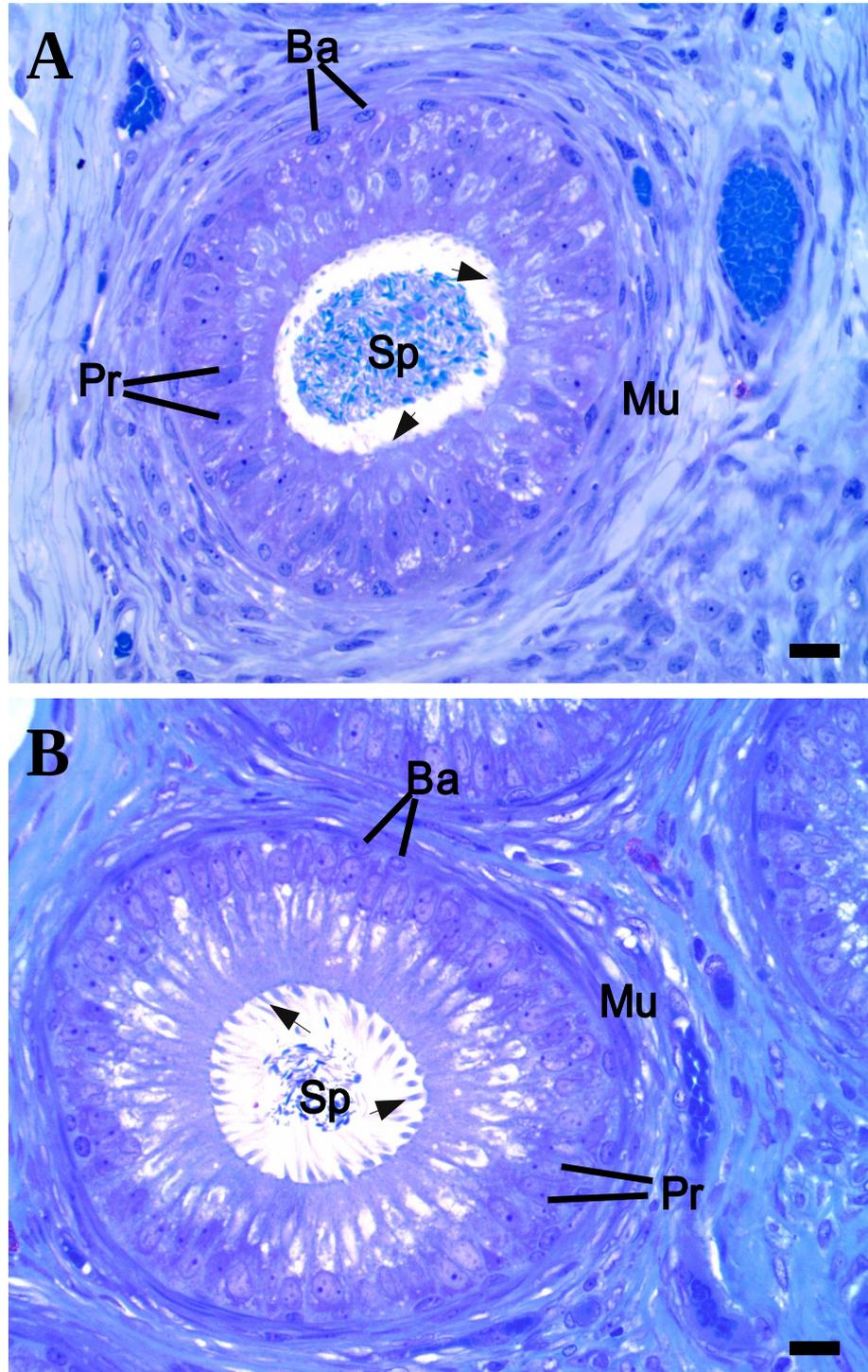


Figura 8 - Epidídimos de saguis coletados em diferentes estações. Coloração azul de toluidina. Aumento 40x. Barras = 20  $\mu$ m. (A): estação chuvosa. (B): estação seca. Ba: células basais; Pr: células principais; Mu: músculo liso; Sp: espermatozoides. As setas apontam os estereocílios.



## 6 DISCUSSÃO

Apesar da diferença na dieta ao longo do ano, os saguis híbridos *Callithrix penicillata* x *C. geoffroyi*, capturados tanto na estação seca quanto chuvosa, apresentam atividade espermatogênica aparentemente normal, como descrita em *C. jacchus* na literatura. Os múltiplos estágios nos túbulos seminíferos corroboram os estudos de Wistuba *et al.* (2003), que classifica os túbulos de primatas Neotropicais como de múltiplos estágios, não apresentando diferença de eficiência espermatogênica com os primatas que apresentam túbulo de estágio único.

Os túbulos seminíferos apresentando mitoses de espermatogônias e meioses de espermatócitos permitem a contínua renovação epitelial e produção de espermatozoides nos híbridos. A produção espermática desses machos possibilita introgressões genéticas nas populações parentais com risco de extinção de espécies, caso inter cruzem com indivíduos puros. No entanto, a produção normal de gametas masculinos não é indicativo concreto de fertilidade, necessitando-se estudos mais aprofundados em relação à eficiência desses espermatozoides.

Além disso, nos *Callithrix*, a produção de espermatozoides de um macho não quer dizer que ele pode se reproduzir, pois nem sempre sua posição social o permite, sendo que a escolha do par da fêmea dominante que ditará a reprodução dentro de um grupo (BAKER; ABBOTT; SALTZMAN, 1999). Portanto, estudos sobre os padrões de reprodução dos saguis híbridos e análises moleculares de suas proles são necessários, para se entender como esses animais se comportam e se ocorre introgressões genéticas nas populações de espécies puras.

## 7 CONCLUSÃO

A espermatogênese normal nos túbulos seminíferos e o armazenamento de espermatozoides nos epidídimos indicam que os exemplares coletados são provavelmente férteis. Portanto, existe a possibilidade de introgressão genética em suas populações parentais, com risco de extinção de espécies. Esses resultados são mais um fator que coloca em perigo a biodiversidade brasileira, sendo de suma importância a divulgação de conhecimento científico sobre as espécies invasoras e melhores métodos de fiscalização no que tange o comércio ilegal de animais no Brasil.

## 8 REFERÊNCIAS

- ACKERMANN, R. R.; ROGERS, J.; CHEVERUD, J. M. **Identifying the morphological signatures of hybridization in primate and human evolution.** *Journal of Human Evolution*, v. 51, n. 6, p. 632–645, 2006.
- ALLENDORF, F. W. *et al.* **The problems with hybrids: setting conservation guidelines.** *Trends in Ecology & Evolution*, v. 16, n. 11, p. 613–622, nov. 2001.
- AURICCHIO, P. **Primatas do Brasil.** São Paulo: Terra Brasilis, 1995.
- BAKER, J. V.; ABBOTT, D. H.; SALTZMAN, W. **Social determinants of reproductive failure in male common marmosets housed with their natal family.** *Animal Behaviour*, v. 58, n. 3, p. 501–513, set. 1999.
- BELLARD, C. *et al.* **Vulnerability of biodiversity hotspots to global change.** *Global Ecology and Biogeography*, v. 23, n. 12, p. 1376–1386, 2014.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <[www.mma.gov.br/biodiversidade](http://www.mma.gov.br/biodiversidade)>. Acesso em: 7 maio 2019a.
- BRASIL. Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira (SiBBr). Disponível em: <<http://www.sibbr.gov.br>>. Acesso em: 7 maio 2019b.
- CEZAR, A. M.; PESSÔA, L. M.; BONVICINO, C. R. **Morphological and genetic diversity in *Callithrix* hybrids in an anthropogenic area in southeastern Brazil (Primates: Cebidae: Callitrichinae).** *Zoologia*, v. 34, p. 1–9, 2017.
- CLERMONT, Y. **Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal.** *Physiological Reviews*, v. 52, n. 1, p. 198–236, jan. 1972.
- CLERMONT, Y. **Two classes of spermatogonial stem cells in the monkey (*Cercopithecus aethiops*).** *American Journal of Anatomy*, v. 126, n. 1, p. 57–71, set. 1969.
- CLINE, J. M.; BRIGNOLO, L.; FORD, E. W. Urogenital System. In: ABEE, C. R. *et al.* (Orgs.). **Nonhuman Primates in Biomedical Research: Diseases.** Second Ed. Academic Press, 2012, v. 2, chapter 10. p. 483–562.
- COIMBRA-FILHO, A. F. *et al.* **The Taxonomic Status of Wied's Black-tufted-ear Marmoset, *Callithrix kuhlii* (Callitrichidae, Primates).** *Primate Conservation*, v. 21, n. 21, p. 1–24, ago. 2006.
- CORTÉS-ORTIZ, L. *et al.* **Hybridization in Large-Bodied New World Primates.** *Genetics*, v. 176, n. 4, p. 2421–2425, ago. 2007.

- DAVIS, M. A.; THOMPSON, K. **Eight Ways to be a Colonizer; Two Ways to be an Invader: A Proposed Nomenclature Scheme for Invasion Ecology**. Bulletin of the Ecological Society of America., n. 81, p. 226–230, 2000.
- DE KRETZER, D. M. **ENDOCRINOLOGY OF MALE INFERTILITY**. British Medical Bulletin, v. 35, n. 2, p. 187–192, may 1979.
- DE KRETZER, D. M.; LOVELAND, K.; O'BRYAN, M. Spermatogenesis. In: JAMESON, J L. *et al.* **Endocrinology: Adult & Pediatric**. Seventh Ed. Philadelphia: Elsevier Inc., 2016, chapter 136. p. 2325–2353.
- ESTRADA, A. *et al.* **Impending extinction crisis of the world's primates: Why primates matter**. Science Advances, v. 3, n. 1, p. 1-16, jan. 2017.
- FERRARI, S. F.; MENDES, S. L. **Buffy-headed marmosets 10 years on**. Oryx, v. 25, n. 2, p. 105–109, abr. 1991.
- FORD, S. M. **Callitrichids as phyletic dwarfs, and the place of the callitrichidae in platyrrhini**. Primates, v. 21, n. 1, p. 31–43, jan. 1980.
- FORD, S. M.; PORTER, L. M.; DAVIS, L. C. Preface. In: FORD, S. M.; PORTER, L. M.; DAVIS, L. C. (Orgs.). **The Smallest Anthropoids**. First Ed. Boston, MA: Springer US, 2009. p. i–xxii.
- FRANCISCO, T. M.; SILVA, I. O.; BOERE, V. **Exsudativoria em saguis do gênero *Callithrix***. Natureza on line, v. 13, n. 5, p. 220–228, 2015.
- GARCIA, S. M. L.; FERNÁNDEZ, C. G. Espermatogênese. In: GARCIA, S. M. L.; FERNÁNDEZ, C. G. (Orgs.). **Embriologia**. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed Editora LTDA, 2012. p. 25–53.
- HERSHKOVITZ, P. **Notes on New World monkeys**. International Zoo Yearbook, v. 12, n. 1, p. 3–12, jan. 1972.
- HOFFMANN, M. *et al.* **The Impact of Conservation on the Status of the World's Vertebrates**. Science, v. 330, n. 6010, p. 1503–1509, dez. 2010.
- HOLT, W. V.; MOORE, H. D. **Ultrastructural aspects of spermatogenesis in the common marmoset (*Callithrix jacchus*)**. Journal of anatomy, v. 138 (Pt 1), p. 175–88, 1984.
- IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em: <<https://www.iucnredlist.org/>>. Acesso em: 1 maio 2019.
- KIERSZENBAUM, A. L. Espermatogênese. In: KIERSZENBAUM, A. L. **Histologia e Biologia Celular: Uma Introdução à Patologia**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 573–600.

- MALUKIEWICZ, J. A. **Review of Experimental, Natural, and Anthropogenic Hybridization in *Callithrix* Marmosets**. *International Journal of Primatology*, v. 40, n. 1, p. 72–98, fev. 2019.
- MILLAR, M. R. *et al.* **Marmoset spermatogenesis: Organizational similarities to the human**. *International Journal of Andrology*, v. 23, n. 5, p. 266–277, 2000.
- MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. Reprodução Humana. In: MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia Básica**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora LTDA., 2008. p. 9–22.
- RHYMER, J. M.; SIMBERLOFF, D. **EXTINCTION BY HYBRIDIZATION AND INTROGRESSION**. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v. 27, n. 1, p. 83–109, nov. 1996.
- ROBAIRE, B.; HINTON, B.; ORGEBIN-CRIST, M. The Epididymis. In: NEILL, J. D. (Org.). **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**. Third Ed. Massachusetts: Elsevier, 2006. p. 1071–1148.
- ROOS, C.; ZINNER, D. Primate Phylogeny. In: FUENTES, A. (Org.). **The International Encyclopedia of Primatology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2017. p. 1–5.
- ROTHMAN, J. M. *et al.* **Nutritional contributions of insects to primate diets: Implications for primate evolution**. *Journal of Human Evolution*, v. 71, p. 59–69, jun. 2014.
- RYLANDS, A. B. *et al.* **Taxonomic review of the New World tamarins (Primates: Callitrichidae)**. *Zoological Journal of the Linnean Society*, v. 177, n. 4, p. 1003–1028, ago. 2016.
- RYLANDS, A. B.; COIMBRA-FILHO, A. F.; MITTERMEIER, R. A. The systematics and distributions of the marmosets (*Callithrix*, *Callibella*, *Cebuella*, and *Mico*) and Callimico (*Callimico*) (Callitrichidae, Primates). In: FORD, S. M.; PORTER, L. M.; DAVIS, L. C. (Orgs.). **The Smallest Anthropoids**. First Ed. Boston, MA: Springer US, 2009. p. 25–61.
- RYLANDS, A. B.; MITTERMEIER, R. A. The diversity of the New World Primates (Platyrrhini): An annotated taxonomy. In: GARBER, P. A. *et al.* (Orgs.). **South American Primates**. First Ed. New York, NY: Springer New York, 2009. p. 23–54.
- RYLANDS, A. B.; MITTERMEIER, R. A.; SILVA, J. S. **Neotropical primates: taxonomy and recently described species and subspecies**. *International Zoo Yearbook*, v. 46, n. 1, p. 11–24, jan. 2012.
- SALLES DE CARVALHO, R. *et al.* ***Callithrix Aurita*: a Marmoset Species on Its Way To Extinction in the Brazilian Atlantic Forest**. *Neotropical Primates*, v. 24, n. 1, p. 1–8, 2018.

- SCHLATT, S.; EHMCKE, J. **Regulation of spermatogenesis: An evolutionary biologist's perspective**. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 29, n. November 2013, p. 2–16, may 2014.
- SILVA, M. A. F. *et al.* **Frugivory and potential seed dispersal by the exotic-invasive marmoset *Callithrix jacchus* (Primates, Callitrichidae) in an urban Atlantic Forest, Rio de Janeiro, Brazil**. *Mammalia*, v. 82, n. 4, p. 343–349, jul. 2018.
- HESS, R. A. **Spermatogenesis, Overview**. In: SKINNER, M.; KNOBIL, E.; NEILL, J. (Orgs.). **Encyclopedia of Reproduction**. First Ed. Academic Press, 1998. p. 539–545.
- STRAYER, D. L.; EVINER, V. T.; JESCHKE, J. M.; PACE, M. L. **Understanding the long-term effects of species invasions**. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 21, n. 11, p. 645–651, nov. 2006.
- SUSSMAN, R. W.; KINZEY, W. G. **The ecological role of the callitrichidae: A review**. *American Journal of Physical Anthropology*, v. 64, n. 4, p. 419–449, ago. 1984.
- WALKER, B.; STEFFEN, W. **An Overview of the Implications of Global Change for Natural and Managed Terrestrial Ecosystems**. *Conservation Ecology*, v. 1, n. 2, pt. 2, 1997.
- WISTUBA, J. *et al.* **Organization of Seminiferous Epithelium in Primates: Relationship to Spermatogenic Efficiency, Phylogeny, and Mating System**. *Biology of Reproduction*, v. 69, n. 2, p. 582–591, 1 ago. 2003.