

AVALIAÇÃO HISTOMÉTRICA DOS TESTÍCULOS DE CÃES NATIMORTOS

(Histometric evaluation of testes testicles from stillborns dogs)

Guilherme Nascimento CUNHA¹; José Octávio JACOMINI²; Marcelo Emilio BELETTI³; Vanessa Martins Fayad MILKEN⁴; Evandro dos Reis MACHADO⁵; Ana Caroline Romão da SILVA^{6*}

¹Centro Universitário de Patos de Minas, Patos de Minas (CUPM), MG; ²Universidade Federal de Uberlândia (UFU); ³Instituto de Ciências Biomédicas (UFU); ⁴Medicina Veterinária da Universidade Federal da Paraíba; ⁵Instituto Mineiro de Agropecuária; ⁶CUPM. E-mail: anacrrs@gmail.com

RESUMO

O testículo desempenha importante papel na determinação sexual secundária dos mamíferos, porém os cães têm sido pouco investigados quanto ao desenvolvimento testicular e suas anormalidades. O objetivo deste estudo foi descrever aspectos morfológicos do testículo de cães natimortos. Foram coletados 20 testículos de 10 cães natimortos, fixados em solução de formol a 10% e avaliados por microscopia óptica. A túnica albugínea apresentou espessura de $96,20 \pm 49,57 \mu\text{m}$. O diâmetro dos cordões testiculares foi de $69,40 \pm 13,67 \mu\text{m}$ e a porcentagem dos cordões por volume testicular foi de 27,20. Os números de células germinativas e sustentação por corte transversal de cordão foram $2,11 \pm 0,70$ e $16,60 \pm 1,99$, respectivamente. O número total de células germinativas por testículo foi de $1.437.680,75 \pm 460.404,90$ e os diâmetros das células germinativas e de seus núcleos foram de $12,97 \pm 2,93 \mu\text{m}$ e $8,79 \pm 1,70 \mu\text{m}$, respectivamente. Os cordões testiculares ocuparam aproximadamente $\frac{1}{4}$ do volume testicular, sendo compostos pelas células de sustentação e as germinativas. Estas últimas se apresentaram pouco numerosas, com citoplasma abundante, pouco corado e núcleo grande.

Palavras-chave: Cão, histologia, morfometria, reprodução.

ABSTRACT

The testis plays an important role in secondary sex determination in mammals, but the dogs have been little investigated for the testicular development and his abnormalities. The objective of this work was to describe morphologic aspects of testes from stillborn dogs. Twelve testes from 10 puppies of stillborn dogs were collected, fixed in formol and evaluated by light microscopy. The tunica albuginea showed a thickness of $96.20 \pm 49.57 \mu\text{m}$. The diameter of the testicular cord was $69.40 \pm 13.76 \mu\text{m}$ and the percent of testicular cords by testicular volume was 27.20%. Numbers of germ and supporting cells by cross section of the cord were 2.11 ± 0.70 and 16.60 ± 1.99 , respectively. The total number of germ cells by testis was $1,437,680.75 \pm 460,404.90$ and diameters of germ cells and their nuclei were $12.97 \pm 2.93 \mu\text{m}$ and $8.79 \pm 1.70 \mu\text{m}$. Testicular cords occupied approximately $\frac{1}{4}$ of the testicular volume, being composed by the supporting and germ cells. The latter showed to be not very numerous, with abundant and not much stained cytoplasm, having a large nucleus.

Key words: Canine, histology, morfometry, reproduction.

*Endereço para correspondência:
anacrrs@gmail.com

INTRODUÇÃO

O testículo desempenha importante papel na determinação sexual secundária dos mamíferos, porém os cães têm sido pouco investigados quanto ao desenvolvimento testicular e suas anormalidades. Dessa forma, a análise quantitativa dos elementos testiculares fornece dados úteis quanto as diferentes etapas de seu desenvolvimento.

No início da vida fetal o diâmetro do cordão testicular aumenta gradativamente e, posteriormente, mantém-se constante. Dentre as células que o compõem, tem-se as células de Sertoli e as células germinativas, sendo que estas últimas darão origem às espermatogônias (BYSKOV, 1986).

O peso dos testículos está relacionado, sobretudo com o comprimento total dos túbulos seminíferos que, conseqüentemente, depende do volume tubular, do diâmetro tubular e da proporção volumétrica dos túbulos seminíferos (AMANN, 1970). A altura do epitélio revela o grau de funcionalidade do túbulo seminífero (COUROT *et al.*, 1970) e seu valor varia entre 60 a 100 µm, para a maioria dos animais domésticos (FRANÇA e RUSSEL, 1998).

Pesquisa voltada a investigação da espermatogênese de cães, nas faixas etárias de um a dois anos e meio, descreveu média do diâmetro dos túbulos seminíferos de 160,6 µm, aumentando em cães aos quatro anos e com diminuição para 155,1 µm em animais acima de 10 anos (PAULA e CARDOSO, 1994).

Segundo França *et al.* (2000), parâmetros biométricos testiculares tais como comprimento total de túbulos seminíferos, população de células de Sertoli e produção espermática diária por testículo possuem correlação elevada e positiva com o peso testicular.

Apesar do fundamental papel que o testículo desempenha para a determinação sexual secundária dos mamíferos, a literatura ainda é bastante escassa quanto a esse assunto. Diversos autores têm investigado cães adultos e buscam avaliar alterações neoplásicas, o que produz poucos dados referentes ao desenvolvimento testicular e suas anormalidades. Dessa forma, a análise quantitativa dos elementos testiculares pode fornecer dados úteis quanto as diferentes etapas de seu desenvolvimento, para que doenças sejam diagnosticadas precocemente e também para a seleção de reprodutores, conforme corrobora Domingos e Salomão (2011).

É importante ressaltar que afecções testiculares são muito comuns em cães, incluindo-se lesões tumorais e não-tumorais. Tanto em humanos quanto nos animais já foram observadas alterações como: microlitíase testicular; cisto simples intratesticular; espermatocele intratesticular; varicocele intratesticular; trauma testicular; infarto testicular; orquite aguda; criptorquidia e ectopias (BICUDO *et al.*, 2007; VITAL *et al.*, 2007; CARDILLI *et al.*, 2009). Sendo importante ressaltar que a familiaridade com as características destas alterações é essencial para um diagnóstico assertivo e precoce, proporcionando um melhor prognóstico ao animal.

Neste contexto o presente estudo teve como objetivo determinar os parâmetros histométricos em testículos de cães natimortos.

MATERIAL E MÉTODOS

Nesta pesquisa, foram utilizados testículos de 10 cães natimortos de diferentes raças, obtidos por cesariana. Ambos os testículos, localizados na cavidade abdominal, foram retirados e fixados em solução de formol a 10%. Posteriormente, foram mensurados (comprimento x largura x espessura) com uso de paquímetro. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Centro Universitário de Patos de Minas - UNIPAM, sob o número de protocolo 38/17.

A seguir, o material foi preparado para microscopia óptica convencional com as seguintes etapas: desidratação em álcool, diafanização por xilol e inclusão em parafina. Os testículos direito e esquerdo de cada animal foram colocados paralelamente em bloco de parafina e cortados transversalmente. Foram feitos cortes seriados (5 μm de espessura) de cada bloco, aproveitando-se um corte a cada 10, no total de seis. Em cada lâmina foram colocados dois cortes que, em seguida, foram desparafinizados e corados com Hematoxilina-Eosina.

Foram avaliados a espessura da túnica albugínea, o diâmetro dos cordões testiculares, área do cordão/área testicular em objetiva de 10x e o diâmetro das células germinativas e de seu núcleo em objetiva de 40x. A quantificação e as mensurações foram feitas por meio do software HL Image, o qual foi utilizado na avaliação de imagens digitalizadas obtidas em microscópio Olympus Triocular BX40 acoplado à câmera Oly-200, ligada a um computador PC através de placa digitalizadora Data Translation 3153.

A contagem de células germinativas foi feita, primeiramente, por área (μm^2), que foi multiplicada por cinco (espessura do corte) para se ter o volume (μm^3) correspondente àquela área. O número de células encontrado foi dividido por este volume, obtendo-se assim, o número de células por μm^3 . A contagem das células germinativas e células de Sertoli foram feitas em cortes transversais de cordão testicular, em microscopia óptica com objetiva de 40x. Para se ter o total parcial de células do testículo, foi multiplicado o número de células por μm^3 pelo volume total do testículo em μm^3 , que foi calculado pela fórmula proposta por Jacomini *et al.* (2007): $V=4/3\pi ABC$, onde: V = volume do testículo em μm^3 ; A = comprimento dividido por 2; B = largura dividido por 2; C = espessura dividido por 2.

Em casos onde a espessura do corte foi menor que o diâmetro das estruturas medidas, dividiu-se o diâmetro das mesmas pela espessura do corte e o número total parcial de células encontrado foi dividido por este valor, tendo como resultado o número final de células da gônada. Evitando-se, assim, a recontagem das estruturas medidas.

A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste “t” de Student para comparar grupos independentes. Também foi realizada análise descritiva dos dados obtidos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação histológica revelou túnica albugínea bem delimitada e vascularizada, emitindo septos espessos de tecido conjuntivo acompanhados de vasos sanguíneos direcionados ao mediastino testicular. Este resultado foi semelhante ao encontrado por Diagne (2009) que trabalhou com gatos domésticos com diferentes idades e observou que

*Endereço para correspondência:
anacrrs@gmail.com

a espessura da túnica albugínea não sofreu alterações significativas em suas medidas, podendo afirmar que os valores não justificam a tendência em aumentar à medida que os gatos crescem. Similares também aos achados de Silva *et al.* (2009) que encontraram túnica albugínea espessa em todos os gatos estudados.

O diâmetro médio da túnica albugínea (Tab. 01 e Fig. 01A) encontrado neste estudo foi de $96,20 \pm 49,57 \mu\text{m}$, inferior ao encontrado por Jacomini *et al.* (2007) que trabalharam com fetos bovinos de final de gestação e observou média de $538,29 \mu\text{m}$. Apesar da diferença de desenvolvimento fetal, onde os cães encontravam-se em fase mais avançada, seus valores mostraram-se consideravelmente inferiores aos destes autores, fato este decorrente do tamanho das espécies analisadas.

Tabela 01: Estruturas testiculares, número de CG e CS por corte transversal do cordão testicular, em cães natimortos.

Estruturas testiculares	Média	Min	Max	DP	CV
Espessura T. Albugínea¹	96,20	33,01	536,00	49,57	51,52
Diâmetro C. Testicular¹	69,40	12,03	111,52	13,76	19,82
CG	02,11	00,40	04,80	00,70	33,17
CS	16,60	11,80	22,00	01,99	11,98

CG = célula germinativa; CS = célula de sustentação; ¹ μm .

O diâmetro médio dos cordões testiculares foi de $69,40 \pm 13,76 \mu\text{m}$ (Tab. 01 e Fig. 01A) sendo semelhante aos encontrados por Kawakami *et al.* (1991) e Moraes *et al.* (2002) em estudo com cães com até 20 semanas e dois meses de idade respectivamente. Também similares aos achados de Jacomini *et a.* (2007). Conforme Kawakami *et al.* (1991), o diâmetro dos túbulos seminíferos foi inferior a $100 \mu\text{m}$, aumentando acentuadamente entre 22 e 28 semanas de idade. Entretanto, neste estudo os resultados mostraram-se inferiores aos resultados médios obtidos por Silva *et al.* (2009), de $121,32 \mu\text{m}$, em gatos com quatro meses de idade. Também inferiores aos de Paula e Cardoso (1994), França e Godinho (2003) e Akosman *et al.* (2013) que estudaram cães, gatos e touros púberes, respectivamente.

Esta diferença provavelmente ocorreu em função das diferenças entre as espécies e faixas etárias, onde tanto nos cães quanto nos touros púberes estudados, os cordões testiculares já estavam sob a influência de fatores endócrinos. Este fato também é corroborado por Mendes (2012) onde trabalhando com equinos adultos relataram que o aumento da concentração de testosterona, decorrente da maturidade sexual revelou correlação positiva com a largura e peso dos testículos. Importante salientar o predomínio de tecido conjuntivo em relação aos cordões testiculares, fato este intimamente relacionado ao não desenvolvimento destes últimos, pois não estão sob influência dos hormônios sexuais neste período de vida.

Importante salientar o predomínio de tecido conjuntivo em relação aos cordões testiculares, fato este intimamente relacionado ao não desenvolvimento destes últimos, pois não estão sob influência dos hormônios sexuais neste período de vida. Somente na puberdade, quando ocorre um aumento na amplitude e, ou, frequência dos pulsos de gonadotropinas, devido a um aumento na liberação pulsátil do hormônio hipotalâmico de liberação de gonadotropinas (GnRH) seguido de outros eventos, que os hormônios sexuais

*Endereço para correspondência:
anacrrs@gmail.com

começam a atuar no organismo desses animais. Isto, porque essa fase precede a maturidade sexual.

Na periferia dos cordões testiculares localizavam-se as células de sustentação (CS) e germinativas (CG) (Fig. 01B). As CG eram grandes e se diferenciavam por seu citoplasma abundante e pouco corado, com núcleo grande. Essas características também foram observadas em estudos com bovinos por Matschke e Erickson (1969) e Jacomini *et al.* (2007). A quantidade das CG por corte transversal dos túbulos seminíferos teve média de $2,11 \pm 0,70$ (Tab. 01). Este resultado foi próximo ao encontrado em trabalhos de Santamarina e Reece (1957), Cardoso (1977), Jacomini *et al.* (2007), Moraes *et al.* (2002) e Silva (2014). Importante destacar que embora a literatura consultada refira-se a outras espécies, não houve diferença entre os resultados.

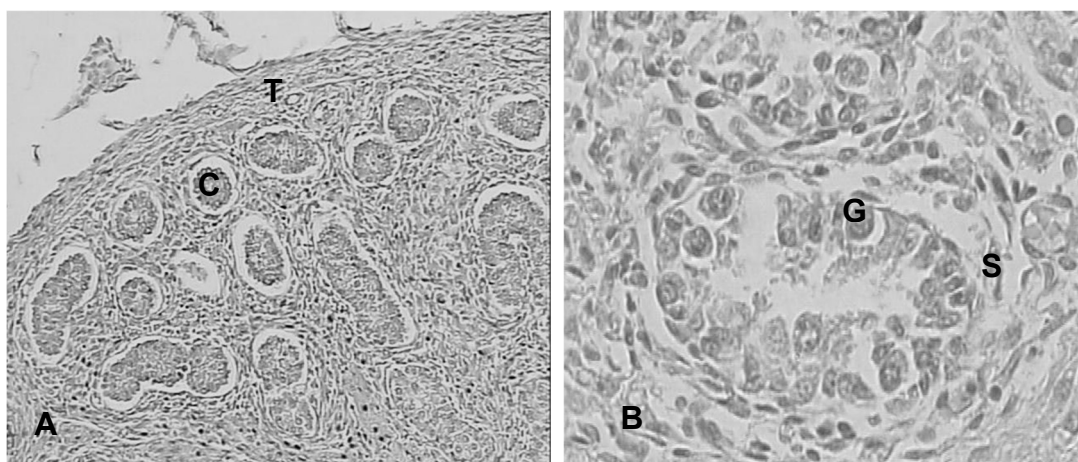


Figura 01: Corte histológico do cordão testicular de cão natimorto, corado com HE.

Obs.: A = Túnica albugínea (T) e o cordão testicular (C) em corte transversal (10x). B = A célula germinativa (G) e a célula de sustentação (S) (40x).

Referente às CS, estas eram pequenas com pouco citoplasma, núcleo pequeno e coravam-se mais intensamente, o que ocorre devido a este núcleo possuir cromatina densa, que se cora mais na presença de Hematoxilina estando de acordo com Mancini *et al.* (1960) que relataram essas características nas CS de humanos. O número de CS por corte transversal do cordão testicular apresentou média de $16,60 \pm 1,99$ (Tab. 1) sendo similar ao encontrado por Santamarina e Reece (1957) em bezerros de um dia de idade, superior a Costa (2004) que encontrou média de $6,05 \pm 0,91$ em estudo com catetos e inferior ao encontrado por Moraes *et al.* (2002) onde a média foi de $31,9 \pm 4,41$. Da mesma forma que as CG, os dados da literatura sobre as CS refere-se às outras espécies, sem, no entanto, haver diferença nos resultados.

O número total das CG/testículo foi de 1.437.680,75 (Tab. 02), mostrando-se conflitante com os resultados encontrados por Matschke e Erickson (1969) e Jacomini *et al.* (2007), que evidenciaram em fetos bovinos no terço final de gestação, 13.385.000 e 18.322.000, respectivamente. Esta diferença se explica provavelmente pelo fato das espécies estudadas serem diferentes, apresentando volume testicular bastante desigual. Deve-se, também, à porcentagem da área do cordão testicular em relação ao volume testicular em cães

*Endereço para correspondência:
anacrrs@gmail.com

encontrada neste estudo ser aproximadamente a metade do valor encontrado por Jacomini *et al.* (2007) em bovinos.

Tabela 02: Número total de CG (TCG), porcentagem da área do cordão por volume testicular (%), diâmetro da CG (\emptyset CG) e do núcleo da CG (\emptyset nCG), média, mínimo (Min), máximo (Max), desvio padrão (Dp) e coeficiente de variação (Cv) em cães natimortos.

Estruturas testiculares	Média	Min	Max	Dp	Cv
TCG	1.437.680,75	679.678,40	2.325.592,40	460404,90	32,02
%	27,20	4,56	45,34	9,34	34,34
\emptyset CG ¹	12,97	7,75	20,47	2,93	22,59
\emptyset nCG ¹	8,79	3,38	13,67	1,70	19,34

CG = célula germinativa; ¹ μ m.

Observou-se que os cordões testiculares ocupavam em média 27,20% do volume testicular (Tab. 02), sendo este resultado inferior ao encontrado por Jacomini *et al.* (2007), provavelmente devido à diferença entre espécies ou, ainda, o crescimento longitudinal dos cordões ser mais tardio em cães. Mostrou-se também inferior à de cães adultos (média de 88,2%) estudados por Paula e Cardoso (1994), por se tratar de animais sexualmente maduros, estando assim sob influência hormonal. No entanto, Kawakami *et al.* (1993) observaram um aumento marcante de cordões testiculares por corte em cães, com o aumento do tamanho testicular após 30 dias de nascimento. Assim, de acordo com o crescimento do animal tem-se um aumento na relação da porcentagem de área do cordão/volume testicular, justificando a diferença encontrada no resultado deste estudo com o de Paula e Cardoso (1994).

A média do diâmetro da CG e de seu núcleo foi $12,97 \pm 2,93 \mu\text{m}$ e $8,79 \pm 1,70 \mu\text{m}$, respectivamente (Tab. 02). Estes resultados mostraram-se similares aos de Jacomini *et al.* (2007). O diâmetro do núcleo da CG nos cães natimortos foi similar ao núcleo dos espermátócitos secundários ($7,3 \mu\text{m}$) de cães púberes encontrados por Foote *et al.* (1972). Esta semelhança se deve ao fato de que as CG estão com seus cromossomos condensados (compactados) decorrente do período de vida (imaturas sexualmente) mesmo sendo eles diploides (2n), o que também ocorre nos espermátócitos II, no cão púbere (maduro sexualmente), onde os cromossomos são haploides (n) e seu núcleo é menor e denso, fato este também corroborado por Moore (2011).

Hoshino *et al.* (2002) estudando testículos de cães e gatos orquiectomizados bilateralmente e divididos em grupos de diversas faixas etárias, observaram que os cães pertencentes ao grupo da faixa etária entre 0 e 1 ano, possuíam maiores valores médios de diâmetro máximo e mínimo, área tubular e altura do epitélio quando comparados com os gatos. Este autor atribuiu estas evidências ao porte heterogêneo dos cães e homogêneo dos gatos independentemente da raça.

O conhecimento acerca da histologia e morfometria das estruturas testiculares de cães natimortos pode trazer grandes avanços para a medicina veterinária. Estabelecer um padrão para a espécie pode auxiliar na identificação de diversas doenças futuramente, melhorando o prognóstico para os animais e facilitando a instauração de tratamentos específicos.

*Endereço para correspondência:
anacrns@gmail.com

CONCLUSÃO

Concluiu-se que o conhecimento acerca da morfometria e da histologia de testículos de cães é extremamente importante, visto que através da criação de um padrão para a espécie, pode se identificar anormalidades e, assim, promover diagnósticos mais precoces e confiáveis, além de um tratamento com maior possibilidade de sucesso.

REFERÊNCIAS

- AKOSMAN, M.S.; LENGGER, O.F.; DEMIREL, H.H. Morphological, stereological and histometrical assessment of the testicular parameters between Holstein and Simmental bulls. *Internacional Journal of Morphology*, v.31, n.3, p.1076-1080, 2013. Disponível em: <<https://scielo.conicyt.cl/pdf/ijmorphol/v31n3/art48.pdf>> Acesso em: 12 mai. 2017.
- AMANN, R.P. Sperm Production Rates. In: JOHNSON, A.D.; GOMES, W.R.; VANDEMARK, N.L. (Ed.) *The Testis*. New York, v.1, cap.7, p.433-482, 1970.
- BYSKOV, A. G. Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Physiological Reviews*, v.66, n.1, p.71-117, 1986. Disponível em: <<https://doi.org/10.1152/physrev.1986.66.1.71>> Acesso em: 10 mai. 2017.
- CARDOSO, F.M. Desenvolvimento dos órgãos genitais masculinos de zebu (*Bos indicus*) da raça Nelore, do período fetal aos 36 meses de idade. 1977. Belo Horizonte, 113p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 1977.
- COUROT, M.; HOCHEREAU-DE RIVIERS, M.T.; ORTAVANT, R. Spermatogenesis. In: JOHNSON, A.D.; GOMES W.R.; VANDEMARK, N.L. (Eds.) *The testis*. 1ª ed., New York and London: Academic Press, v.1, p.339-432, 1970.
- DIAGONE, K.V. Histologia e morfometria dos testículos de gatos domésticos adultos. 2009. Jaboticabal – SP, 44p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista – Campus Jaboticabal. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/101120>> Acesso em: 24 jan. 2016.
- FRANÇA, L.R.; GODINHO, C.L. Testis morphometry, seminiferous epithelium cycle length and daily sperm production in domestic cats (*Felis catus*). *Biology of Reproduction*, v.68, n.5, p.1554-1561, 2003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.010652>> Acesso em: 20 jun. 2017.
- FRANÇA, L.R.; SILVA Jr., V.A.; CHIARINIGARCIA, H.; GARCIA, S.K.; DEBELJUK, L. Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. *Biology of Reproduction*, v.63, p. 1629-1636, 2000. Disponível em: <<https://doi.org/10.1095/biolreprod63.6.1629>> Acesso em: 10 mai. 2017.
- FRANÇA, L.R., RUSSELL; L.D. The testis of domestic mammals. In: MARTINEZ-GARCIA, F. & REGADERA, J. *Male reproduction. A multidisciplinary overview*. Madrid, Churchill Livingstone, p.197–219, 1998.

*Endereço para correspondência:
anacrns@gmail.com

FOOTE, R.H.; SWIERSTRA, E.E.; HUNT, W.L. Spermatogenesis in the dog. The Anatomical Record, v.173, p.341-348, 1972. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/ar.1091730309>> Acesso em 10 fev. 2017.

HOSHINO, P.; NAKAGHI, L.S.O.; PACHECO, M.R.; LUI, J.F.; MALHEIROS, E.B. Morfometria dos túbulos seminíferos e ductos epididimários de cães e gatos provenientes de cirurgia de castração. Biotemas, v.15, n.1, p.97-110, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.5007/%25x>> Acesso em 01 fev. 2017.

JACOMINI, J.O.; ESPER, C.R.; DINIZ, E.G.; VIEIRA, R.C.; BELETTI, M.E. Morfogênese do testículo de embriões e fetos de vacas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science, São Paulo, v.44, n.1, p.33-39, 2007. Disponível em: <<http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/26658>> Acesso em 01 dez. 2016.

KAWAKAMI, E.; TSUTSUI, T.; OGASA, A. Histological observations of the reproductive organs of the male dog from birth to sexual maturity. The Journal of Veterinary Medical Science, v.53, p.241-248, 1991. Disponível em: <<https://doi.org/10.1292/jvms.53.241>> Acesso em: 17 nov 2016.

KAWAKAMI, E.; YAMADA, Y.; TSUTSUI, T.; OGASA, A.; YAMAUCHI, M. Changes in plasma androgen levels and testicular histology with descent of the testis in the dog. The Journal of Veterinary Medical Science, v.55, n 6, p.931-935, 1993. Disponível em: <<https://doi.org/10.1292/jvms.55.931>> Acesso em: 12 mar 2016.

MANCINI, R.E.; NARBAITZ, R.; LAVIERI, J.C. Origin and development of the germinative epithelium and Sertoli cells in the human testis: cytological, cytochemical, and quantitative study. Anatomical Record, v.136, n.4, p.477-489, 1960. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/ar.1091360407>> Acesso em: 22 mar 2017.

MATSCHKE, G.H.; ERICKSON, B.H. Development and radioresponse of the prenatal bovine testis. Biology of Reproduction, v.1, n.2, p.207-215, 1969. Disponível em: <<https://doi.org/10.1095/biolreprod1.2.207>> Acesso em: 12 mar 2017.

MENDES, L.Q. Aspectos biométricos e histológicos de testículos de garanhões da raça crioula. 32p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, 2012.

MOORE, K.; PERSAUD, T.V.N. Embriologia Clínica. 8ª ed., Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2011. 552p.

MORAES, R.C.; PAULA, T.A.R.; FONSECA, C.C.; NEVES, M.T.D.; BENJAMIN, L.A. Avaliação da atividade espermatogonial em cães nascidos de cadelas submetidas ao tratamento com bussulfano. Ciência Animal, v.12, n.1, p.57-65, 2002. Disponível em: <<http://www.uece.br/cienciaanimal/dmdocuments/Artigo6.2002.1.pdf>> Acesso em: 29 abr. 2017.

PAULA, T.A.; CARDOSO, F.M. Alterações etárias na espermatogênese do cão. I. Análise histométrica. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.46, n.1, p.19-30, 1994.

SANTAMARINA, E.; REECE, R.P. Normal development of the germinal epithelium and seminiferous tubules in the bull. American Journal of Veterinary Research, v.18, n.67, p.261-278, 1957.

STOCKARD, C.R. The genetic and endocrinic bases for differences in form and behavior. In: GETTY, R. Anatomia dos Animais Domésticos. Rio de Janeiro, 5^a ed., Editora Interamericana, p.1335-1336, 1981.