



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL

CARLOS EDUARDO VALE REBOUÇAS

**MORFOLOGIA DOS TESTÍCULOS, EPIDÍDIMOS E DUCTOS DEFERENTES DE
EMAS (*Rhea americana* LINNAEUS, 1758) COM IDADES DE TRÊS A DEZOITO
MESES**

MOSSORÓ–RN
2023

CARLOS EDUARDO VALE REBOUÇAS

**MORFOLOGIA DOS TESTÍCULOS, EPIDÍDIMOS E DUCTOS DEFERENTES DE
EMAS (*Rhea americana* LINNAEUS, 1758) COM IDADES DE TRÊS A DEZOITO
MESES**

Tese apresentada ao Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e Biotecnologia Animal

Orientador: Prof. Dr. Moacir Franco de Oliveira - UFERSA

MOSSORÓ–RN
2023

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

R292m REBOUÇAS, CARLOS EDUARDO VALE .
MORFOLOGIA DOS TESTÍCULOS, EPIDÍDIMOS E DUCTOS
DEFERENTES DE EMAS (Rhea americana LINNAEUS,
1758) COM IDADES DE TRÊS A DEZOITO MESES / CARLOS
EDUARDO VALE REBOUÇAS. - 2023.
107 f. : il.

Orientador: MOACIR FRANCO DE OLIVEIRA.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural
do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal, 2023.

1. Macroscopia. 2. Microscopia. 3. Testículos.
4. Espermatogênese. 5. Rhea. I. OLIVEIRA, MOACIR
FRANCO DE , orient. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade
com AACR2 e os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência
Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva
CRB: 15/120

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

CARLOS EDUARDO VALE REBOUÇAS

**MORFOLOGIA DOS TESTÍCULOS, EPIDÍDIMOS E DUCTOS DEFERENTES DE
EMAS (*Rhea americana* LINNAEUS, 1758) COM IDADES DE TRÊS A DEZOITO
MESES**

Tese apresentada ao Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e Biotecnologia Animal

Defendida em: **28/04/2023.**

BANCA EXAMINADORA

Moacir Franco de Oliveira, Prof. Dr. (UFERSA)
Presidente

Ana Rita de Lima (UFRA)
Membro Examinador

Diego Carvalho Viana (UEMA)
Membro Examinador

Emanuel Kennedy Feitosa Lima (UFERSA)
Membro Examinador

Tiago da Silva Teófilo (UFERSA)
Membro Examinador

A **Deus**, que me concedeu durante todo esse período força e perseverança para a conclusão deste trabalho.

À minha mãe, **Maria de Fátima Vale Rebouças**, minha esposa, **Laura Helena Costa Silva Aires**, e meu filho, **Luís Eduardo Aires Rebouças**, por todo apoio, carinho e compreensão, que de alguma forma estiveram e estão próximos de mim, fazendo a minha vida valer a pena.

Ao meu orientador, Dr. **Moacir Franco de Oliveira**, pela amizade, paciência e conselhos transmitidos durante minha formação acadêmica.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a **Deus**, que iluminou o meu caminho durante esta caminhada. Assim, junto a Ti, tudo é mais fácil.

À minha amada esposa, companheira, amiga e confidente **Laura Helena Costa Silva Aires**, pelo seu grande amor, afeto e imenso carinho, estando comigo em todos os momentos, sempre de sorriso aberto, me acalmando nos momentos mais difíceis com seus abraços, beijos e suas palavras amorosas que me serviram de incentivo para continuar lutando. Você é meu tudo e minha vida.

Ao meu amado filho, **Luís Eduardo Aires Rebouças**, por tê-lo ao meu lado, sempre estando presente em todos os momentos da minha vida, sendo compreensivo por tantas vezes durante a minha ausência e me dando forças no decorrer da execução deste trabalho.

À minha amada mãe, **Maria de Fátima Vale Rebouças**, que com suas palavras de carinho e afeto sempre me estimulou a seguir em frente e não mediu esforços para me ajudar. Ao meu pai, **Evônio do Carmo Rebouças** e demais **familiares**, que representam a base sólida da minha existência e me ensinaram a viver com dignidade. A todos, um muito obrigado!

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Moacir Franco de Oliveira**, mais conhecido como Moa. Agradeço a forma tranquila, objetiva e amigável como conduziu tudo até aqui. Mesmo com tantos afazeres, sempre esteve à disposição para me orientar. Tenho uma imensa admiração, respeito e gratidão por ter confiado no meu trabalho e pela oportunidade de crescimento científico. Diante disso, só posso agradecer a sua sincera amizade e retribuir todo o carinho e cuidado que você tem comigo.

A **Silvia Helena da Costa Silva Aires** e **Tertuliano Aires Dias Segundo**, que juntos sempre foram muito mais que sogra e sogro, são amigos, pais e conselheiros, que me mostraram a importância da mudança e a necessidade de recomeçar. Hoje cheguei aqui através dos seus incentivos.

Agradeço imensamente a **Maria Fabiola Vale Andrade**, diretora do Centro de Aprendizagem Moderna (CEAMO), pelo apoio, compreensão, confiança e suporte oferecido, que foram fundamentais para me incentivar a continuar a crescer na minha profissão e a sempre buscar mais conhecimentos. Estendo esse agradecimento a todas as coordenadoras do colégio.

A **Secretaria Municipal de Educação**, da Prefeitura Municipal de Mossoró, que através da Lei complementar Nº 076, de 12 de novembro de 2012, que dispõe sobre o Plano de Capacitação dos profissionais da Educação Municipal, possibilitou a realização desse estudo.

Aos meus amigos de laboratório, **Ana Caroline Freitas Caetano de Sousa**, **Herson da Silva Costa**, **Radan Elvis Matias de Oliveira**, **Igor Renno Guimarães Lopes** e **João Augusto Rodrigues Alves Diniz**. Sem a ajuda e incentivo de vocês, a realização deste trabalho não teria sido possível. Agradeço a amizade, ajuda na conclusão deste trabalho e também por todo esse período de ótima convivência. A todos vocês só posso dizer: “muitíssimo obrigado!”

À **Universidade Federal Rural do Semi-Árido**, que tornou possível a realização do meu estudo.

A todos os **professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**, que contribuíram para a minha formação acadêmica.

Aos **funcionários do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS)**, **Caubi Rocha de Macedo**, **Antônio Almeida dos Santos**, **Robson Rodrigues Freitas Silva** e **Francisco das Chagas Souza**, pela enorme ajuda nas coletas dos materiais.

A **todos** que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, a minha eterna gratidão.

**'A educação é o princípio mais nobre em qualquer geração'.
(Eduardo Vale)**

RESUMO

RESUMO: Pesquisas sobre a morfologia das gônadas de aves silvestres são escassas e, os relatos existentes, são limitados a poucas espécies. A *Rhea americana* é uma ave silvestre que possui importância científica significativa, devido à sua notável adaptabilidade em cativeiro e valor zootécnico para a produção de carne, couro e penas. Estas aves ainda não despertaram a atenção dos órgãos governamentais para viabilizar sua exploração com fins comercial, possivelmente pelo fato de que ainda possam existir vários aspectos de sua biologia, manejo zootécnico e sanitário a serem conhecidos. Objetivou-se por meio desta pesquisa avaliar morfológica e morfometricamente o desenvolvimento dos órgãos genitais masculinos da ema (*Rhea americana*). Para o desenvolvimento do estudo foram utilizadas 18 emas criadas em cativeiro, separadas em grupos por idade, sendo 3, 6, 9, 12, 15 e 18 meses. Após a eutanásia dos animais, os órgãos do aparelho genital masculino foram pesados em balança analítica, mensurados com paquímetro digital os seguintes parâmetros morfométricos: comprimento, largura, volume e processados posteriormente para análise microscópica. Posteriormente, foram elaboradas lâminas para avaliação microscópica do parênquima testicular. Com base nos estudos morfológico, observou-se que os órgãos genitais masculinos de emas são pares e estão localizados simetricamente de cada lado da linha média corporal, no interior da cavidade celomática e são constituídos de dois testículos, dois epidídimos, dois ductos deferentes e um órgão copulador. Os testículos são revestidos por uma túnica albugínea delicada, muitos túbulos seminíferos e escasso tecido intertubular. No epitélio seminífero foram observadas as células de Sertoli, espermatogônias e espermátides, em diferentes etapas de diferenciação testicular. O ducto deferente, tem parede fina e constituída pelas túnicas mucosa, muscular e adventícia e estende-se do epidídimo até a cloaca, onde se abre no urodeo, por meio da papila do ducto deferente. De acordo com as fotomicrografias, os túbulos seminíferos em cortes transversais, apresentavam formas quase circulares em diferentes fases do ciclo do epitélio. Quando analisadas as densidades dos túbulos seminíferos, epitélio intersticial e luz tubular da *Rhea americana*, esta apresentou diferença de acordo com a idade dos animais, demonstrando o aumento dos túbulos seminíferos e luz tubular, seguido da redução do espaço intersticial, com o aumento da idade do animal. Em vista dos resultados obtidos, conclui-se que, ao analisar macro e microscopicamente as medidas morfológicas e morfométricas do sistema reprodutor masculino de *Rhea americana*, em diferentes idades de crescimento, verificamos que, de acordo com a idade, foram observadas alterações morfológicas na estrutura dos testículos. Desta forma, podemos contribuir para a biologia da espécie, favorecendo o conhecimento que propiciem a manutenção da reprodução em cativeiro e perpetuação da espécie no sistema de produção, conseguindo-se assim um aumento na produtividade e na viabilidade da *Rhea americana*.

Palavras-chave: Macroscopia, Microscopia, Testículos, Espermatogênese, Rhea.

ABSTRACT

ABSTRACT: Research on the morphology of wild bird gonads is scarce and the existing reports are limited to a few species. The Rhea americana is a wild bird of significant scientific importance, due to its remarkable adaptability in captivity and zootechnical value for the production of meat, leather and feathers. These birds have not yet attracted the attention of government agencies to enable their exploitation for commercial purposes, possibly due to the fact that there may still be several aspects of their biology, zootechnical and sanitary management to be known. The goal of this research was to evaluate the development of the male greater rhea (*Rhea americana*) genital organs morphologically and morphometrically. For the development of the studies, 18 greater rheas raised in captivity were used, divided into groups by age, been 3, 6, 9, 12, 15 and 18 months old. After the animal's euthanasia, the male genital organs were weighed on an analytical scale, the following morphometric parameters were measured with a digital caliper: length, width, volume and subsequently processed for microscopic analysis. Posteriorly, slides were prepared for microscopic evaluation of the testicular parenchyma. Based on morphological studies, it was noticed that the male greater rhea genital organs are paired and are located symmetrically on each side of the body midline, inside the coelomic cavity and are made up of two testicles, two epididymis, two deferent ducts and one copulatory organ. The testes are covered by a delicate tunica albuginea, many seminiferous tubules, and sparse intertubular tissue. In the seminiferous epithelium Sertoli cells, spermatogonia and spermatids were observed in different stages of testicular differentiation. The vas deferens, has a thin wall and consists of the mucous, muscular and adventitia tunics and extends from the epididymis to the cloaca, where it opens into the urodeum, through the papilla of the vas deferens. According to the photomicrographs, the seminiferous tubules in cross-sections, presented almost circular shapes in different phases of the epithelial cycle. When analyzing the densities of the seminiferous tubules, interstitial epithelium, and tubular lumen of *Rhea americana*, this proved difference according to the animal's age, demonstrating the increase of seminiferous tubules and tubular lumen, followed by the reduction of the interstitial space, with the increasing age of the animal. With the obtained results, it is concluded that, when analyzing macro and microscopically the morphological and morphometric measurements of the male reproductive system of *Rhea americana*, at different ages of growth, we verified that, according to age, morphological alterations were observed in the structure of the testicles. In this way, we can contribute to the biology of the species, amplifying the knowledge that favors the maintenance of reproduction in captivity and perpetuation of the species in the production system, thus achieving an increase in the productivity and viability of *Rhea americana*.

Keywords: Macroscopy, Microscopy, Testicles, Spermatogenesis, Rhea.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa de distribuição e ocorrência da ema (<i>Rhea americana</i>) e subespécies na América do Sul.....	28
Figura 2: Ema (<i>Rhea americana</i> , Linnaeus, 1758).....	29
Figura 3: Representação esquemática dos órgãos do aparelho reprodutor masculina de uma ave ratita (<i>Struthio camelus</i>). Vista ventral.....	32
Figura 4: Representação esquemática da região epididimal das aves Anseriformes e Galiformes, mostrando o rete testis extratesticular, ducto eferente proximal, ducto eferente distal, ducto de conexão e ducto epididimal.	34
Figura 5: Vista lateral da cloaca das aves domésticas.	37
Figura 6: Fotomicrografias da cápsula testicular (túnica serosa, s; albugínea, a; e vascular, v) e tecido peritubular (p) da ave doméstica. b, vaso sanguíneo. Os elementos celulares são orientados longitudinalmente na túnica albugínea.	40
Figura 7 Agregações de células de Sertoli (algumas delas definidas por linhas tracejadas) no embrião de avestruz de 20 dias. Observe as diferenças entre os ductos e os vasos sanguíneos (V). B: Agregações de células de Sertoli entraram em contato e se anastomosaram entre si. Observe o local de anastomose (asteriscos), o epitélio de revestimento testicular (Ep) e seus vasos sanguíneos subjacentes (V). C: As células germinativas primordiais (P) com núcleo grande, pálido e esférico estão localizadas entre as células de Sertoli (Sr). D: As fibras do tecido intersticial foram distintamente coradas pelo Alcian blue (AB), enquanto os núcleos das células germinativas primordiais coraram como flocos escuros. Tecido intersticial (I). Escala 30 µm.	44
Figura 8: Ilustração do procedimento utilizado para análise morfométrica das densidades volumétricas dos componentes testiculares.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Ração para atender às exigências nutricionais de emas com 30 a 90 dias de idade (GADELHA et al., 2020).5757

Tabela 2: Composição nutricional da ração para emas adultas utilizada pela fábrica de ração da UFERSA.....5858

Capítulo 02 - Avaliação Morfométrica e Histológica dos Testículos, Epidídimo e Ducto Deferente de Ema (*Rhea americana*)

Tabela 1 Comprimento e largura dos testículos direito (TD) e esquerdo (TE) de emas. ...10404

Tabela 2 Relação (PREL) entre a massa dos testículos direito (TD) e esquerdo (TE) e massa corpórea das emas.....10404

Tabela 3 Comprimento e largura média dos testículos das emas.10404

Tabela 4 Valores de significância obtidos através do Teste Z.10404

Tabela 5 Comprimento, largura e massa dos epidídimos direito (TD) e esquerdo (TE) de emas.10404

Tabela 6 Comprimento e largura dos ductos deferentes direito (TD) e esquerdo (TE) de emas.10505

Tabela 7 Densidade (%) do espaço intersticial, túbulo seminífero e luz tubular, obtido a partir das fotomicrografias do tecido testicular de *Rhea americana* com 3 meses de idade.....10505

Tabela 8 Densidade (%) do espaço intersticial, túbulo seminífero e luz tubular, obtido a partir das fotomicrografias do tecido testicular de *Rhea americana* com 9 meses de idade.....10505

Tabela 9 Densidade (%) do espaço intersticial, túbulo seminífero e luz tubular, obtido a partir das fotomicrografias do tecido testicular de *Rhea americana* com 12 meses de idade.....10505

Tabela 10 Densidade (%) do espaço intersticial, túbulo seminífero e luz tubular, obtido a partir das fotomicrografias do tecido testicular de *Rhea americana* com 15 meses de idade.....10606

Tabela 11 Densidade (%) do espaço intersticial, túbulo seminífero e luz tubular, obtido a partir das fotomicrografias do tecido testicular de *Rhea americana* com 18 meses de idade.....10606

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-Árido
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
HE	Hematoxilina e Eosina
g	Grama
Kg	Quilograma
mm	Milímetro
cm	Centímetro
Te	Testículo
TD	Testículo direito
TE	Testículo esquerdo
Vc	Veia cava
Ri	Rins
Bf	Base do falo
Cl	Cloaca
Fa	Falo
Dd	Ducto deferente
Ep	Epitélio seminífero
Ae	Espermatogônia A escura
Ac1	Espermatogônia A clara 1

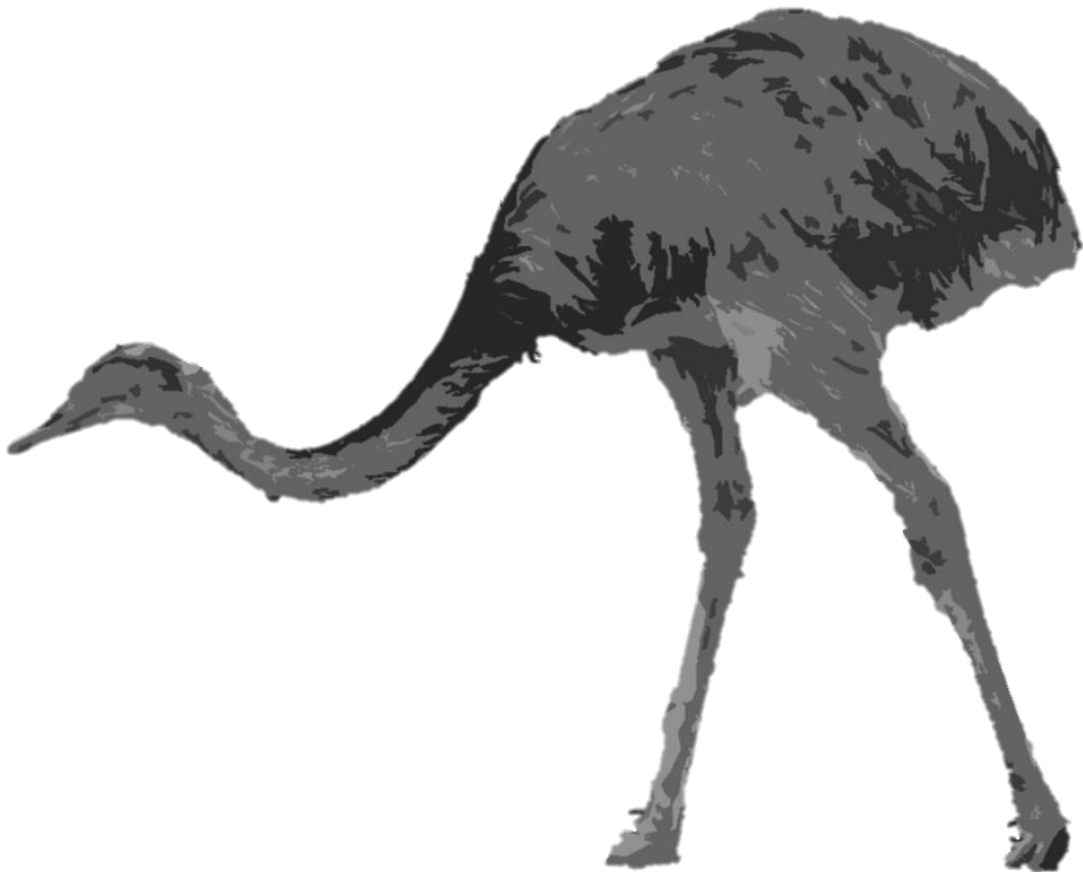
LISTA DE SÍMBOLOS

©	Copyright
®	Marca registrada
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	27
2.1	CARACTERIZAÇÃO DA <i>Rhea americana</i>	27
2.2	REPRODUÇÃO DA <i>Rhea americana</i>	29
2.3	MORFOLOGIA DOS ÓRGÃOS REPRODUTORES MASCULINOS EM AVES	30
2.3.1	Testículos.....	31
2.3.2	Epidídimos.....	34
2.3.3	Ducto deferente.....	35
2.3.4	Falo.....	36
2.4	CÁPSULA TESTICULAR.....	38
2.5	ESPERMATOGÊNESE	41
2.6	CÉLULAS DE SERTOLI.....	43
3	JUSTIFICATIVA	48
4	HIPÓTESES CIENTÍFICAS	51
5	OBJETIVOS	53
5.1	OBJETIVO GERAL	53
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
6	MATERIAL E MÉTODOS	55
6.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	55
6.2	LOCAL DE AMOSTRAGEM	55
6.3	ANIMAIS AMOSTRADOS E CARACTERIZAÇÃO DO AMBIENTE	56
6.4	PROTOCOLO ANESTÉSICO E EUTANASIA	58
6.5	PROCEDIMENTO PARA MACROSCOPIA.....	58
6.6	PROCEDIMENTO PARA MICROSCOPIA	59
6.7	ANÁLISE MORFOMÉTRICA	59
6.7.1	Determinação do peso testicular.....	59
6.7.2	Determinação do volume testicular.....	60
6.7.3	Determinação das densidades de volume dos componentes testiculares.....	60
6.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	61
	REFERÊNCIAS	63
	CAPÍTULO 01 - MORFOLOGIA DOS ÓRGÃOS GENITAIS MASCULINOS DA EMA (<i>Rhea americana</i>)	74
	CAPÍTULO 02 - AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA E HISTOLÓGICA DOS TESTÍCULOS, EPIDÍDIMO E DUCTO DEFERENTE DE EMA (<i>Rhea americana</i>)....	94

Introdução



1 INTRODUÇÃO

A ema pertence a um grupo representativo de aves silvestres, as ratitas, apresentando características anatômicas e fisiológicas que a diferenciam das aves carinatas, entre as quais: ausência de quilha no osso esterno, a perda da capacidade de voo, não possuem glândula uropigiana, e suas fezes e urina estão separadas na cloaca (SICK, 1997). Taxonomicamente pertencem à ordem *Rheiforme*, família *Rheidae*, gênero *Rhea* e espécie *Rhea americana* (MENDES 1997).

A *Rhea americana americana* é uma das três subespécies de *Rhea americana* descritas no Brasil e habita biomas como cerrado e a caatinga. São consideradas, as aves mais primitivas, sob o ponto de vista filogenético e por tanto o grupo mais antigo dentre as aves (PACHECO, 2004). São espécies diurnas gregárias, com os machos sendo territoriais e mantendo estruturas sociais polígamas durante a estação de reprodução, onde o cuidado parental é realizado exclusivamente pelo macho, com as fêmeas restringindo seus investimentos à produção e postura de ovos (COOPER et al., 2009).

A criação comercial de ema está concentrada na produção de carne como fonte de proteína animal, especialmente pelo seu perfil quantitativo de lipídios, já que a carne apresenta menor índice calórico quando comparado com as carnes bovinas, suínas e aviárias (frango), proporcionando baixo teor de colesterol a carne e maciez, configurando como um produto saudável, sendo uma boa opção para o consumo humano (PEREIRA et al., 2006) aspecto importante para justificar a sua criação em sistemas sustentáveis de produção. Além da potencialidade econômica e do fornecimento de matérias-primas que a criação de Ratitas em escala comercial pode produzir, como penas, couro, carne, bem como a criação em cativeiro também pode auxiliar na conservação desse animal uma vez que seus habitats naturais estão cada vez mais devastados (SÁ-FILHO et al., 2018).

Os trabalhos que envolvem a morfofisiologia da ema são importantes do ponto de vista do manejo zootécnico e sanitário, pois fornecem dados que servem de subsídios para a tomada de atitudes que visam à preservação e manutenção dessa espécie criadas em cativeiro (PEREIRA et al., 2006), bem como pode contribuir em procedimentos clínicos-cirúrgicos. Esses estudos possibilitam o desenvolvimento de modelos que podem viabilizar sua criação em habitats artificiais, bem como permitir o desenvolvimento de modelos sustentáveis para exploração comercial, pois propiciam o estabelecimento de planos de manejo zootécnico, sanitário e alimentar (NOGUEIRA FILHO; NOGUEIRA, 2000).

A literatura fornece algumas informações acerca de pesquisas desenvolvidas com o sistema reprodutor de emas, como a descrição do aparelho reprodutor feminino (PARIZZI et al., 2007), da morfologia dos órgãos genitais masculinos (SANTOS et al., 2011) e da espermatogênese (FRENEAU et al., 2016). No entanto, pouco se sabe sobre a cronologia morfológica reprodutiva, tais como o processo espermatogênico entre as idades de três a dezoito meses dessa espécie. Dessa forma, considerando que a ema pode despertar importância econômica e representa um animal de interesse científico e, ainda considerando a alta frequência de lesões traumáticas em indivíduos jovens e adultos criadas fora de seu habitat natural (BELLO et al., 2017) o presente estudo visou ampliar o quantitativo de conhecimentos existente sobre a população de emas, gerando informações que sejam relevantes para o manejo reprodutivo e de modo indireto auxiliando com informações sobre a sua biologia.

Para melhor compreender a morfofisiologia do sistema reprodutor masculino de emas, serão apresentados nesta tese uma caracterização geral da espécie, a morfologia dos órgãos reprodutores masculinos de aves e os aspectos histológicos do testículo, com ênfase na espermatogênese, cronologia espermatogênica, características dos túbulos seminíferos e do volume parenquimático testicular. A partir disto, será possível averiguar o desenvolvimento pós-natal dos testículos de ema e, desta forma, inferir sobre a biologia reprodutiva da espécie.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Os estudos sobre a morfologia e fisiologia da reprodução das aves são relevantes por permitirem que se conheça a dinâmica reprodutiva de espécies domésticas e silvestres. Devido à escassez de trabalhos sobre a morfologia reprodutiva de aves ratitas, é usual a apresentação da morfologia reprodutiva das aves. Portanto, a presente revisão traz uma abordagem referente aos aspectos biológicos, anatômicos, histológicos e fisiológicos do aparelho reprodutor masculino de algumas aves.

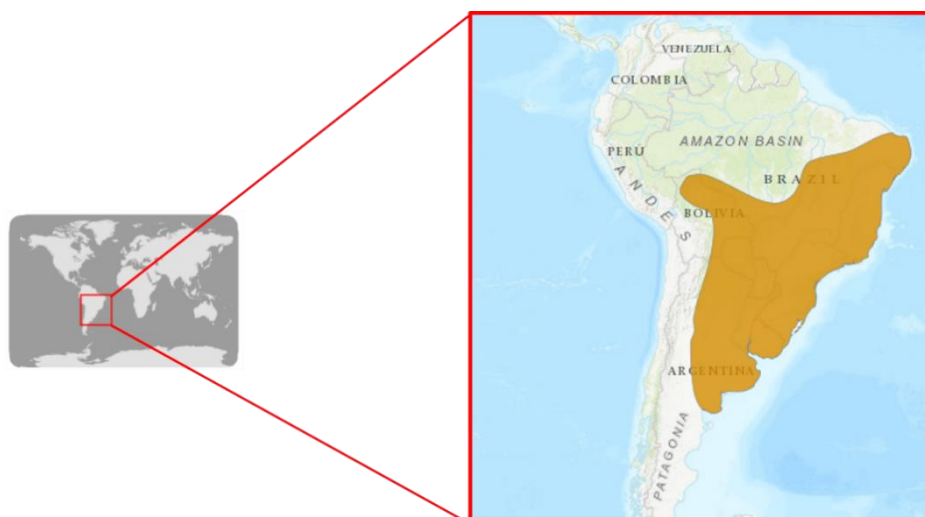
2.1 CARACTERIZAÇÃO DA *Rhea americana*

Muitas formas diferentes de dimorfismo sexual são exibidas entre as aves, e tentativas de explicar padrões complexos de variação filogenética no dimorfismo aviário têm sido objeto de considerável debate desde Darwin (SZEKELY; LISLEVAND; FIGUEROLA, 2007). Juntamente com o dicromatismo da plumagem, a diferença mais óbvia entre machos e fêmeas de muitas espécies de aves é o dimorfismo sexual do tamanho do corpo. Os machos são tipicamente o sexo maior nas aves e, embora o dimorfismo sexual do tamanho do corpo com viés feminino ou o dimorfismo de tamanho sexual “invertido” seja comum em muitos invertebrados e vertebrados pecilotérmicos, ele é exibido apenas em alguns grupos de aves, notavelmente em aves de rapina (Falconiformes e Strigiformes), aves pernaltas (Charadriiformes) e alguns outros taxa principalmente não passeriformes (JEHL; MURRAY, 1986).

A *Rhea americana* é uma espécie primitiva, descendente direta dos dinossauros, pertence ao grupo das ratitas, classificada dentro da ordem Reiforme, família Rheidae (SARASQUETA, 1997). Pertence à superordem dos Paleognatos, apresentando características anatômicas e fisiológicas que a diferenciam das aves carinatas, entre as quais: ausência de quilha no osso esterno, a perda da capacidade de voo, não possuem glândula uropigiana, as fezes e urina estão separadas na cloaca (SICK, 1997) e músculos peitorais pouco desenvolvidos (FOWLER, 1991). Sua altura em pé varia de 134 a 170 cm, pesando em média 34,4 kg os machos e 32 kg as fêmeas de massa corporal, são animais desprovidos inteiramente de cauda e do osso pigóstilo. O macho adulto possui um falo, que é posto para fora da cloaca com certa frequência (NOVAES, 2002).

Essa ave do continente americano de grande porte é encontrada no Brasil, Bolívia, Chile, Argentina, Paraguai e Uruguai (Figura 1). Esse animal pertence à ordem Rheiformes, família Rheidae, na qual o gênero *Rhea* possui uma única espécie, a *Rhea americana*, sendo que no Brasil podem ser encontrados três subespécies: *Rhea americana americana* (Linnaeus, 1758), encontrada do nordeste ao sudeste do país; *Rhea americana intermedia* (ROTHSCHILD; CHUBB, 1914) e a *Rhea americana albescens* (LYNCH; ARRIBÁLZAGA; HOLMBERG, 1878), que habita os estados do centro-oeste, sudeste e sul brasileiro (MELLO, 1987; IUCN, 2019).

Figura 1: Mapa de distribuição e ocorrência da ema (*Rhea americana*) e subespécies na América do Sul.



Fonte: IUCN (2019).

Com a altura variando entre 1,4 e 1,7 m, a ema (Figura 2) é a maior ave da América do Sul, onde o macho e a fêmea podem atingir 35 e 32 kg, respectivamente. Existindo um discreto dimorfismo sexual, o macho adulto, mais robusto, tem a cabeça mais perfilada e o pescoço mais grosso, sendo negros a base do pescoço, o peito e a parte mediana do dorso, na região próxima ao pescoço; o restante da plumagem tem coloração cinza pardacenta, sendo que ambos possuem um corpo ovoide, com a porção posterior cônica (SICK, 1986).

Figura 2: Ema (*Rhea americana*, Linnaeus, 1758).



Fonte: Acervo pessoal.

2.2 REPRODUÇÃO DA *Rhea americana*

O complexo sistema de acasalamento da ema (*Rhea americana*), descrito como uma combinação de poligamia e poliandria sequencial, ou uma promiscuidade produzida por uma mistura de ambos os sistemas mencionados anteriormente e poliandria simultânea, além de defesa do harém, postura de ovos em comunidade e cuidados parentais masculinos (FERNÁNDEZ; REBOREDA, 1998) o torna um modelo aviário interessante para o estudo de padrões sazonais de hormônios sexuais e sua correlação com os seus sistemas de acasalamento.

Esta ratita se reproduz sazonalmente de agosto a janeiro, sendo que o macho tem um papel dominante na reprodução. O período de reprodução começa com brigas entre os machos, exhibições de namoro e cópula (CODENOTTI; ALVAREZ, 2001). Nessa estação, de acordo com Silva (2001), ocorrem mudanças de comportamento nas emas, principalmente nos machos, onde cerca de três meses antes do início da postura, se tornam bastante agressivos, apresentam suas plumas do pescoço arrepiadas, vocalizando frequentemente e exibindo posturas e movimentos característicos. Nesta etapa iniciam-se as lutas pela dominância do grupo. Estas lutas ocorrem apenas entre machos e são muito importantes, pois através delas são geradas

cargas hormonais que influenciam na fertilidade. Famílias onde existe apenas um macho podem ter a fertilidade afetada por falta das brigas.

A vocalização é um som emitido somente pelos machos no período reprodutivo, para atrair as fêmeas e formar um harém. O comportamento executado pelos machos são movimentos giratórios em torno das fêmeas, com asas abertas e voltadas para frente, cabeça abaixada e plumas arrepiadas. Esses movimentos atraem as fêmeas para os machos e estimulam a cópula. Após o acasalamento, eles fazem os ninhos, assumem a incubação total dos ovos e cuidam dos filhotes, os quais permanecem extremamente agressivos durante os primeiros dez a quinze dias após a eclosão, com o objetivo de proteger a prole (HASENCLEVER et al., 2004). Mais tarde, os machos constroem o ninho no chão, assume a incubação completa dos ovos, que eclodem quase de forma síncrona após 5 a 6 semanas. Ele os guia para a alimentação, fornece calor, cobertura e proteção contra predadores (NAVARRO; MARTELLA, 2002).

A taxa de eclosão de ovos de *Rhea americana* é maior em condições de cativeiro, 60%, do que em semi-cativeiro, 45%, e em vida livre, 30% (NAVARRO e MARTELLA, 2002). Sick (1986), afirma que os últimos ovos postos pelas fêmeas (em torno de 30% do total da postura) não são férteis e que a incubação começa, na natureza, cinco a oito dias após as fêmeas terem iniciado a postura, que pode durar de 27 a 41 dias. O autor afirma que o embrião está completamente formado ao 27º dia de incubação, e que o cheiro ativo exalado pelos ovos em eclosão atrai grande número de moscas, que os recém-nascidos caçam em torno de si; além disso comem avidamente as fezes do pai, durante este período.

O sucesso reprodutivo de emas, *Rhea americana*, depende do desempenho de comportamentos de cuidado e qualidade paterna, já que a presença dos machos contribui significativamente para a alimentação dos filhotes. Leite e Codenotti (2005), relatam que os machos forrageiam em busca de cupins, cobras e insetos grandes como besouros, facilitando a ingestão pelos filhotes, conduzindo o grupo a lugares e biótopos que privilegiam a alimentação. A figura paterna fornece segurança, evitando o aparecimento do estresse de abandono, onde esse cuidado parental oferecido aos filhotes aumentará as chances de que se desenvolvam e que se reproduzam.

2.3 MORFOLOGIA DOS ÓRGÃOS REPRODUTORES MASCULINOS EM AVES

Os aspectos anatômicos macroscópicos dos órgãos reprodutivos masculinos nas aves foram inicialmente descritos por Kaupp (1915) e Lake (1957), enquanto aspectos microscópicos foram investigados por Aire (1979, 1980 e 1982). O aparelho reprodutor

masculino aviário é morfologicamente semelhante entre as espécies domésticas e selvagens, apesar de existir uma ampla variedade de hábitos reprodutivos, adaptações comportamentais e morfológicas (JOHNSON, 2006).

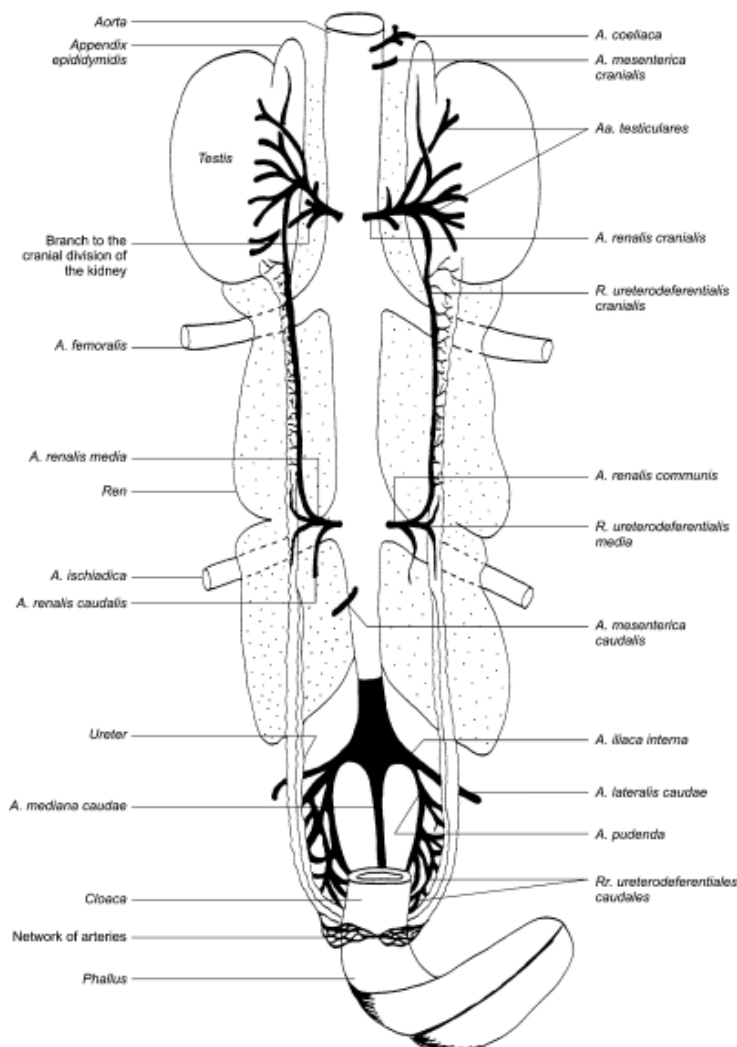
Os trabalhos de Gray (1937) em galo, Bailey (1953) em fringílideos, Das et al. (1965) em patos domésticos, Fitzgerald (1969) em codorna, Pereira et al. (1994) em galinha d'Angola, Maruch et al. (1995) em pombo, Santos et al. (2011) em emas, citam que os órgãos genitais masculinos de aves são constituídos por um par de testículos, dois pequenos epidídimos intracavitários conectados aos ductos deferentes, que se abrem no urodeo, região da cloaca e de um órgão copulatório (Figura 3), ou seja, é um sistema mais simples do que o verificado em mamíferos.

Considerando que estas são as estruturas alvo de nosso estudo, passamos a descrevê-las nos parágrafos que se seguem.

2.3.1 Testículos

Os testículos de aves são estruturas que se localizam no interior do corpo desses animais e não no escroto, como ocorre em grande parte dos mamíferos. De acordo com Nickel et al. (1977), essas estruturas se desenvolvem na cavidade corpórea, junto à coluna vertebral e à superfície ventral dos pulmões, estendendo-se até o lobo cranial dos rins. Marshall (1961), relata que os testículos, nas espécies domésticas, fazem sintopia cranial com os rins e estão aderidos à parede dorsal interna do corpo por uma dobra do peritônio, chamada mesórquio (BACHA; BACHA, 2003). Essa posição dos testículos confere as aves a características de realizarem espermatogênese a uma temperatura corporal interna entre 40 - 42 °C, segundo descrevem Froman e Kirby (2004).

Figura 3: Representação esquemática dos órgãos do aparelho reprodutor masculina de uma ave ratita (*Struthio camelus*). Vista ventral.



Fonte: Elias et al. (2007).

De acordo com Bacha e Bacha (2003), os testículos das aves são proporcionalmente maiores do que os dos mamíferos (em relação ao peso corporal) e ligeiramente assimétricos. Embora tradicionalmente se tenha dito que nesses animais o testículo esquerdo tende a ser maior que o direito durante nos primeiros meses de vida, Vizcarra et al. (2015), relatam que em frangos de corte (*Gallus domesticus*), os dois testículos possuem tamanho semelhantes entre a 2ª e 50ª semanas de idade. O cucal-preto africano (*Centropus grillii*) é uma exceção a esse padrão, pois destaca-se por apresentar o testículo esquerdo vestigial ou ausente (FREY; GOYMANN, 2009).

Externamente, os testículos das aves são envolvidos por uma cápsula de tecido testicular desprovida de septos, através da qual os vasos sanguíneos e nervos entram e saem desse órgão, sendo constituída por três camadas: a mais externa, chamada de túnica serosa, derivada do

peritônio, a camada intermediária e mais espessa, a túnica albugínea, constituída principalmente por colágeno, fibras elásticas e fibroblastos e por último, a camada mais interna e muitas vezes pouco diferenciada, túnica vascular (DAVIS et al. 1970; HODGES, 1974).

Nas aves domésticas, codornas japonesas (*Coturnix japonica*), perus (*Meleagris gallopavo*) e patos (*Anas platyrhynchos domesticus*), Aire e Ozegbe (2007), descrevem uma cápsula testicular delgada, quando comparada com os mamíferos e composta pelas três camadas (túnicas). A primeira, túnica serosa, é a camada mais externa e corresponde ao mesotélio, derivado do revestimento peritoneal das estruturas provenientes da cavidade abdominal; a segunda camada, túnica albugínea, formada por células sobrepostas em forma de fuso, são dispostas circularmente, cujas características são típicas do tecido muscular liso e onde podem ser visualizados grandes vasos sanguíneos e a camada mais interna, conhecida como túnica vascular, constituída pelo tecido conjuntivo frouxo, fibroblastos e pequenos vasos sanguíneos.

A ema (*Rhea americana*) adulta possui um par de testículos alongados, com dois polos (cranial e caudal) e duas margens (medial côncava e lateral convexa), assemelhando-se a forma de um feijão, com valor médio de 7,5 cm de comprimento e 1,3 cm de largura, localizados na cavidade celomática. Estes fazem sintopia ventralmente com os rins, craniomedialmente com as glândulas adrenais e medialmente com a veia cava caudal e são separados um do outro pela alça mesentérica. Microscopicamente, os testículos são envoltos por uma cápsula de túnica albugínea, constituída por fibras colágenas, organizadas paralelamente, que corresponde a tecido conjuntivo denso (SANTOS et al. 2011).

A organização anatômica e histológica do testículo do galo doméstico é semelhante à do pombo e da codorna (BARALDI-ARTONI et al., 1997, BARALDI-ARTONI et al., 1999). O parênquima testicular é composto pelos túbulos seminíferos, rede testicular e ductos eferentes. Cada túbulo seminífero está formado pelo epitélio espermatogenético com dois tipos celulares funcionalmente diferentes, denominados de células germinativas e células de sustentação. As células germinativas estão representadas, da parede dos túbulos em direção à luz, pelas espermatogônias, espermatócitos primários, espermatócitos secundários, espermatídes e espermatozoides (LAKE, 1981). As células de sustentação são denominadas células de Sertoli, responsáveis pela transferência de nutrientes para as células germinativas e sustentação do epitélio germinativo (STURKIE, 1967).

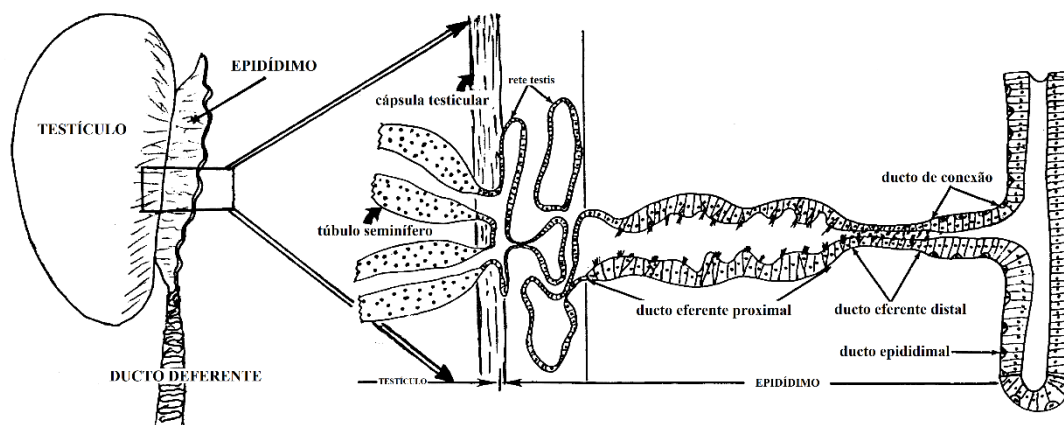
Diferente da disposição em mamíferos, os túbulos seminíferos de aves diferem por apresentarem uma complexa rede de anastomoses entre eles e ausência de septos conjuntivos separando o testículo em lóbulos (AIRE; OZEGBE, 2007). Enquanto o túbulo seminífero é o compartimento onde a espermatogênese ocorrerá nos animais adultos, as células de Leydig do

interstício são responsáveis pela produção de hormônios androgênicos, como a testosterona (UBUKA, BENTLEY, 2011). A espermatogênese em aves envolve uma série de divisões mitóticas de espermatogônias, resultando em espermátócitos primários e secundários, que sofrem meiose para formar as espermatídes. Finalmente, essas últimas passam pelo processo de espermiogênese para se diferenciarem em espermatozoides (MARETTA; MARETTOVA, 2004).

2.3.2 Epidídimos

Em geral, a região do epidídimo das aves (Figura 4) apresenta-se como uma estrutura anatômica pequena, achatada e alongada, intimamente ligado em sua porção ventral à superfície dorsomedial do testículo, envolto pela túnica albugínea testicular, sendo constituído por um sistema de ducto coletor (*rete testis*), pelo ducto eferente proximal e distal, um ducto de conexão curto e o ducto epididimal. Os túbulos seminíferos do testículo se abrem para a *rete testis*, consistindo principalmente de porções intracapsular (cápsula testicular) e intraepididimal. Os ductos eferentes comunicam o *rete testis* aos ductos de conexão e epididimal. (HESS et al., 1976; AIRE, 2000). Todos esses ductos formam o epidídimo ou região epididimária das aves (LAKE, 1957).

Figura 4: Representação esquemática da região epididimal das aves Anseriformes e Galiformes, mostrando o rete testis extratesticular, ducto eferente proximal, ducto eferente distal, ducto de conexão e ducto epididimal.



Fonte: Aire, (2000).

O epitélio de revestimento dos ductos da região epididimária de aves é predominantemente pseudoestratificado, com microvilosidades presentes na borda luminal na maioria dos seus tipos celulares, constituído por células não-ciliadas, ciliadas e angulares (TINGARI, 1971). No pombo (*Columbo livia*), o epitélio de revestimento deste sistema de ductos é cúbico simples no *rete testis* e pseudoestratificado colunar nos outros ductos da região epididimária, apresentando células ciliadas e não-ciliadas presentes principalmente nos ductos eferentes (STEFANINI; ORSI, 1999).

Investigando a histologia e histoquímica no epidídimo de patos (*Cairina moschata*), Abd-Elmaksoud et al. (2009), informam que a região do epidídimo é arquitetonicamente semelhante à já descrita para outras espécies aviárias, elencando uma clara mudança no epitélio de revestimento ao longo dos diferentes componentes da região epididimal, começando com cuboidal simples no *rete testis* mudando abruptamente para colunar pseudoestratificado com células ciliadas e não ciliadas nos ductos eferentes e terminando com células colunares não ciliadas pseudoestratificadas nos ductos de conexão e epididimários, sendo esses epitélios completamente negativo para o Ácido Periódico de Schiff (PAS) e o Azul de Alcian (pH 2,5).

Macroscopicamente, o epidídimo da ema (*Rhea americana*) apresenta-se alongado e fusiforme, inserido na margem dorsomedial do testículo. Sua extremidade cranial possui relação sintópica com a cápsula da glândula adrenal e, dorsalmente, com a veia cava caudal. Na sua porção caudal, emergi o ducto deferente, que seguiu em direção a cloaca. Entre o testículo e o epidídimo, há uma faixa de tecido conjuntivo que envolve os ductos da rede testicular, posicionada extratesticular. Estes ductos apresentam epitélio cúbico simples e forma irregular (SANTOS et al., 2011).

Estudos anatômicos em galos brancos iranianos (IWR) revelam a existência de um grande processo acessório em forma de bolsa, na região frontoventricular dos testículos entre o epidídimo e o ducto deferente, lateralmente aos rins. O epitélio dessa estrutura saculiforme é composto de células cuboides estratificados, apresentando células musculares e uma cápsula fibrosa, com suprimento vascular bem desenvolvido. Esse achado fez com que os autores sugerissem que o papel do processo acessório era como um órgão para fornecer espermatozoides, de forma análoga à cauda do epidídimo em mamíferos (RAZI et al., 2010).

2.3.3 Ducto deferente

A continuação do ducto epididimário é o ducto deferente. Este estende-se do epidídimo até a cloaca, onde se abre latero-ventralmente, na região do urodeo, próximo ao ureter

(MARVAN, 1969). Topograficamente, é um tubo longo com característica serpentiniforme decorrente das ondulações fechadas que o ducto faz sobre si mesmo em seu trajeto celomático. O ducto é contínuo com a extremidade distal da região epididimária, a partir da qual se continua para além da porção caudal do testículo ipsilateral. O ducto deferente posiciona-se ventralmente aos rins, e se dirige caudalmente com trajeto tortuoso em direção à cloaca, onde se abre no urodeo (AIRE et al., 1979). Em galos adultos, o ducto deferente é normalmente túrgido, esbranquiçado e repleto de sêmen, podendo armazenar em aves com 2,5 kg, em ambos os ductos, até 0,89 ml de sêmen, enquanto nas aves inativas sexualmente, o ducto está reduzido, contendo uma secreção aquosa (LAKE, 1981).

Anatomicamente o ducto deferente de codorna (*Coturnix coturnix*) é um órgão tubular e ondulado, constituído por alças estreitas que percorrem a parede abdominal dorsal em todo o seu percurso abdomino-pélvico, realizando sintopia com o ureter do mesmo lado, fazendo ambos os trajetos paralelos entre si em direção à cloaca. As secções histológicas transversais do ducto deferente apresentam-se como túbulos irregulares e paralelos entre si, em consequência das ondulações estreitas que o ducto faz sobre si mesmo, aparecendo grande quantidade de espermatozoides e fluido seminal estocado na luz tubular (ORSI et al., 2007).

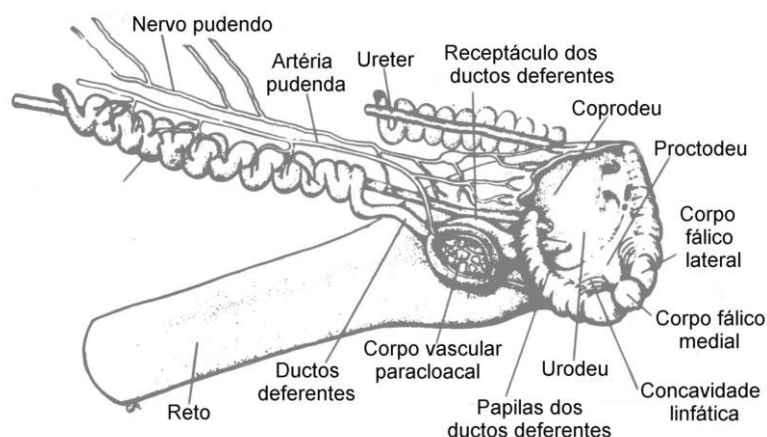
Os pesquisadores Razi et al. (2010) relatam que o trato genital masculino de galos brancos iranianos (IWR) apresenta ductos deferentes moderadamente grandes (altura média de 22 μ m), localizados na linha mediana do corpo, em sintopia com a região dorsomedial dos testículos; histologicamente a parede do ducto deferente sendo composta de tecido conjuntivo frouxo, recoberto por epitélio colunar pseudoestratificado, contínuo com epitélio cuboide simples da porção distal. Além disto, possui uma camada espessa de músculo liso, sugerindo que o ducto deferente desempenha um papel na condução do fluido produzido pelos testículos e pelo epidídimo.

2.3.4 Falo

As aves são os únicos vertebrados terrestres nos quais a inseminação em geral ocorre sem o uso de um órgão intromitente ou penetrador, no entanto o falo (Figura 5) é a estrutura responsável pelo melhor contato com a cloaca da fêmea no momento da cópula (BRISKIE; MONTGOMERIE, 2001). Os pesquisadores Bell e Freeman (1971), mencionam que o órgão copulador nas aves domésticas é pequeno e intromitente e que o falo erétil se aloja no interior do proctodeu, fazendo contato físico com a cloaca da fêmea na hora da cópula. Nickel et al. (1977), citam que há dois tipos de falo nos machos das aves, um intromitente e o outro não

intromitente. No galo ele é rudimentar, ausente nos pinguins e, em ambas as espécies, o proctodeo everte e realiza a transferência do sêmen para a cloaca da fêmea, contrastando com o pato que possui um falo evidente e intromitente.

Figura 5: Vista lateral da cloaca das aves domésticas.



Fonte: Lake (1971).

A anatomia dos falos aviários não intromitentes foi bem descrita nas aves domésticas, sendo que em *Gallus gallus* essa estrutura apresenta quatro componentes principais: os corpos fálcos mediano e lateral, as dobras linfáticas, os seios linfáticos periféricos, que produzem a linfa responsável pelo ingurgitamento dessa estrutura durante a ejaculação e os músculos do falo. O falo não intromitente em peru (*Meleagris gallopavo*) não possui o corpo fálico mediano, enquanto os corpos fálcos laterais são mais desenvolvidos do que os encontrados em *Gallus gallus*. As dobras linfáticas também são maiores e estão localizadas na parte superior e não ao lado dos corpos fálcos laterais, como em *Gallus gallus*. Durante a ereção, o falo do peru tem um ápice duplo, em vez do ápice único evidente no galo, devido à ausência do corpo fálico mediano (KING, 1993).

Já Hafez e Hafez (2004), dividem o aparelho copulatório dos *Gallus gallus domesticus* em pequenas projeções ou papilas do ducto deferente, o corpo vascular paracloacal, presente na parede ventrolateral da cloaca, fornecendo linfa para intumescência durante a excitação sexual e as pregas linfáticas ou tecido linfático tumescente que quando preenchido de linfa, fica evertido e forma o falo não-penetrante.

Em codornas-do-campo (*Nothura maculosa*) o aparelho copulador é intromitente, composto por corpos vasculares do falo, que mostram continuidade morfofuncional com as

estruturas fállicas, formando assim um único sistema envolvido na ereção, onde a porção eversível do falo evagina e emerge da abertura cloacal, como uma estrutura em forma de espiral direcionada para a esquerda (OLIVEIRA; MAHECHA, 2000), enquanto que em codornas domésticas (*Coturnix japonica*), existe uma glândula cloacal, localizada no interior da cloaca, quando estimulada por hormônios andrógenos, produz uma secreção espumosa que é depositada na cloaca da fêmea no momento do acasalamento (MORAIS et al., 2012).

O falo do avestruz (*Struthio camelus*) possui uma porção fixa que se prende ao assoalho do proctodeu e uma porção livre chamado corpo do pênis, que apresenta três componentes principais: um par de corpos fibrosos que começam na porção fixa do pênis, um núcleo de tecido elástico conhecido como corpo vascular elástico e um canal externo (*sulcus spermaticus*) através do qual o esperma é conduzido. O pênis desse animal se curva para a esquerda devido à assimetria no tamanho dos corpos fibrosos, onde o movimento é obtido através da ação dos músculos (*musculus levator phalli* e *musculus retractor phalli*) que levantam e retraem o falo (KING, 1981). A ereção do falo é promovida por ingurgitamento linfático do tecido erétil desse órgão, diferente do que ocorre em mamíferos, nos quais a ereção é sanguínea (OLIVEIRA, MAHECHA, 2000).

Santos et al. (2011) descrevem o falo na emas (*Rhea americana*) como um órgão fibroso linfático, constituído por duas porções: uma proximal, rígida, bifurcada e contorcida, revestido por um epitélio pavimentoso estratificado seguido por uma camada de tecido conjuntivo e vasos sanguíneos e outra porção distal, tubular, espiralada e flexível, localizado na parede ventral, no assoalho da cloaca, na região do proctodeu, ligeiramente à esquerda da linha média, composta por grande quantidade de tecido conjuntivo moderadamente modelado, rico em fibras colágenas, entremeadas por vasos linfáticos. Góes et al. (2010) afirmam que alguns machos têm um falo em forma de saca-rolhas, inflável e eversível, que pode variar muito em comprimento.

2.4 CÁPSULA TESTICULAR

A cápsula testicular e o tecido peritubular em homens e outros mamíferos são amplamente estudados (BANKS et al., 2006), mas pouco se sabe sobre esses tecidos nas aves. O testículo dos vertebrados, geralmente, é ocluso em uma cápsula de tecido testicular, onde os vasos sanguíneos e nervos estão localizados no órgão. Histologicamente, este é formado por três camadas de tecido, sendo a camada mais externa denominada túnica serosa (derivada do peritônio), a camada média e mais espessa denominada túnica albugínea, e a camada mais

interna e, frequentemente pouco diferenciada, denominada como túnica vascular. Nas aves, a túnica albugínea forma o tecido mais espesso da cápsula testicular, composta por colágeno, fibras elásticas e fibroblastos abundantes (HODGES, 1974).

Holstein e Weiss (1967), e Hargrove et al. (1977), demonstraram que alguns mamíferos, apresentam células musculares lisas na cápsula testicular, cuja contração pode auxiliar no transporte de espermatozoides testiculares imóveis para o sistema de ductos excretados. Estudos iniciais indicaram que pode haver células musculares lisas na cápsula testicular e no tecido peritubular da codorna japonesa e da ave doméstica (VAN NASSAUW; HARRISON; CALLEBAUT, 1993). Além disso, é relatada a eventual presença de filamentos intermediários de actina, desmina, vimentina e citoqueratina, detectados por métodos imuno-histoquímicos, na cápsula testicular e no tecido peritubular dessas aves (MARETTA; MARETTOVA, 2004). Verificou-se que a cápsula testicular responde, por contração, a vários estímulos químicos e elétricos (BANKA et al., 2006). Nos mamíferos, os septos testiculares se ramificam da parte interna da cápsula e conduzem vasos sanguíneos e nervos para dentro e fora da substância testicular (DAVIS et al., 1970). Entretanto, os septos testiculares estão ausentes nas aves (LAKE, 1971).

Considerando que o tecido peritubular foi estudado em apenas algumas aves (AIRE, 1997), sabe-se ainda menos das células contráteis e seu conteúdo no citoesqueleto. Existem poucas pesquisas (recentes), sobre a caracterização dos microfilamentos e conteúdo dos filamentos intermediários, de possíveis células mióides ou musculares lisas, na cápsula testicular e no tecido peritubular da codorna (VAN NASSAUW, L.; HARRISON, F.; CALLEBAUT 1993), aves domésticas (MARETTA; MARETTOVA, 2004) e quatro membros do Galloanserae (AIRE; OZEGBE, 2007).

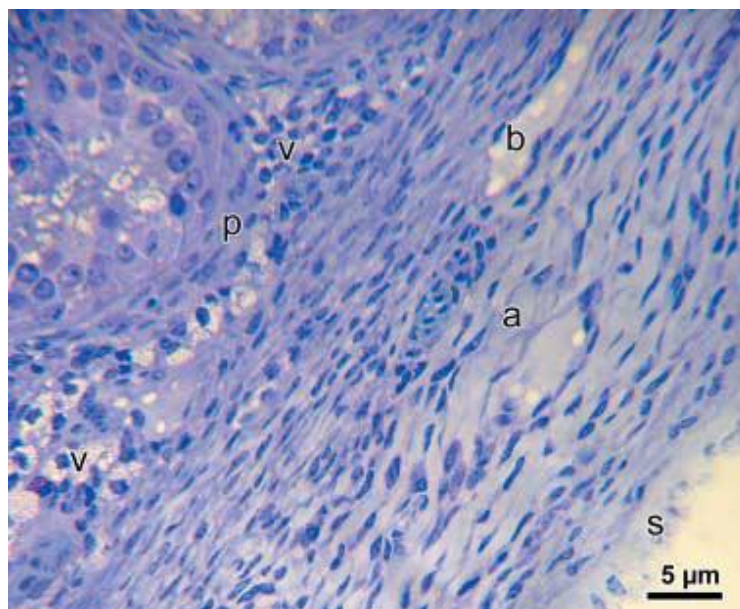
A morfologia da cápsula testicular e peritubular, da ema e do avestruz, apresentam membros com testículos intra-abdominais, que secretam grande quantidade de líquido testicular, cuja espermatogênese e o transporte espermático são rápidos, quando comparados a estrutura testicular, por exemplo, dos mamíferos (AIRE, 2007a, 2007b). A *Rhea americana* reproduz-se em determinados períodos do ano, sendo considerada sazonal. Filogeneticamente, quanto maior for a ema, mais próxima ela estará do avestruz (*Struthio camelus*) e do emu (*Dromaius novahollandiae*), que também são animais com reprodução sazonal (MARTELLA; NAVARRO, 2006).

A morfologia da cápsula testicular e peritubular dos tecidos limítrofes das aves receberam atenção especial por serem pouco descritas na literatura. Especialmente na classe de aves de grande porte, cujos membros têm testículos intra-abdominais, que secretam grande

quantidade de líquido testicular, tornando a espermatogênese e o transporte espermático rápidos, em comparação com as dos mamíferos (AIRE, 2007a, 2007b).

A composição histológica e intracelular da cápsula testicular, de quatro membros da família Galloanserae (codornas japonesas, aves domésticas, perus e patos), apresentaram semelhanças. Identificando as três camadas de tecido, ou seja, a túnica serosa, a túnica albugínea e a túnica vascular (Figura 6). Demonstrando que a túnica serosa é a camada mais externa, que corresponde ao mesotélio, derivado do revestimento peritoneal das estruturas dentro da cavidade abdominal da ave. Histológica e intracelularmente, esta camada de tecido apresenta células achatadas ou escamosas, que ocasionalmente são cuboides, e exibem algumas microvilosidades presas em suas superfícies livres. O núcleo é bastante alongado, de contorno levemente irregular, heterocromático e ocupa a maior parte do denso citoplasma. Apenas algumas organelas são discerníveis no citoplasma. As células mesoteliais repousam sobre uma lâmina basal, separada da camada intermediária, a túnica albugínea (AIRE; OZEGBE, 2007).

Figura 6: Fotomicrografias da cápsula testicular (túnica serosa, s; albugínea, a; e vascular, v) e tecido peritubular (p) da ave doméstica. b, vaso sanguíneo. Os elementos celulares são orientados longitudinalmente na túnica albugínea.



Fonte: Aire e Ozegbe (2007).

2.5 ESPERMATOGÊNESE

O complexo processo de desenvolvimento do esperma que transforma uma célula haploide indiferenciada em um espermatozoide maduro altamente especializado, capaz de fertilizar um óvulo, é denominado espermiogênese ou spermateliose (AIRE, 2007), sendo o estágio final da espermatogênese. Foi estabelecido pela primeira vez que o esperma se desenvolve a partir de células no testículo em 1841 (HOLSTEIN; ROOSEN-RUNGE, 1981), mas foi somente com o advento do microscópio eletrônico e outros instrumentos e técnicas sofisticadas, que os detalhes do desenvolvimento do esperma puderam ser totalmente explorados. Desde então, o processo tem sido extensivamente estudado em vertebrados, especialmente mamíferos (SHARMA; BHARDWAJ; AHLAWAT, 2009). A anatomia do testículo e do sistema reprodutivo das aves e a cinética da espermatogênese são amplamente descritas na literatura (AIRE, 2007). A nomenclatura usada na espermiogênese em mamíferos também foi adotada para o fenômeno em aves. No entanto, apenas alguns relatos detalhando a espermiogênese em aves podem ser encontrados na literatura.

Apesar do fato de existirem mais de 10.000 espécies de aves (DONOGHUE et al., 2003), apenas alguns estudos sobre o desenvolvimento de espermatozoides aviários foram relatados (AIRE, 2007). Por razões óbvias, a maioria das investigações foi realizada em aves de importância econômica, como a galinha (SPRANDO; RUSSELL, 1988), peru (AIRE, 2003), pato (SIMÕES, ORSI; VIEGAS, 2005) e codorniz (LIN; JONES, 1993), embora várias outras espécies de aves também tenham sido estudadas (LOVAS; FILIPPICH; JOHNSTON, 2012). A maioria dessas investigações são fragmentárias e apenas alguns cobrem o processo completo de espermatogênese no nível ultraestrutural (AIRE, 2007).

O epitélio seminífero das aves é constituído por células germinativas em diferentes fases de desenvolvimento, quando sexualmente maduras, e células de Sertoli, que são as únicas células somáticas que não se dividem. As células de Sertoli apresentam diferentes funções, como por exemplo, formar a barreira hemato-testicular, proporcionar suporte físico e nutrição as células germinativas em divisão (DYM e FAWCETT, 1970). À medida que as células germinativas vão se dividindo, estas se movimentam da base do túbulo seminífero em direção ao lúmen. A espermatogênese nas aves divide-se em spermatocitogênese, espermiogênese e espermição como ocorre nos mamíferos (MORRIS et al., 1987).

A espermatogônia é denominada a célula germinativa inicial, dividindo-se em células que eventualmente diferenciam-se em espermatozoides. Estas células realizam a sua divisão através da mitose produzindo spermatócitos. Entretanto, durante esta divisão celular, algumas

células não se dividem para preservar uma base de espermatogônias para as novas divisões (LIN e JONES, 1993). LAKE (1957), identificou no galo doméstico (*Gallus gallus*) espermatogônia primária e secundária, no pato (*Cairina moschata*), Marchandt (1977), identificou apenas um tipo de espermatogônia. Ortavant (1959), indica que as pequenas diferenças entre as gerações de espermatogônias em aves estão relacionadas com as várias associações celulares do ciclo do epitélio seminífero e, por vezes, em apenas um corte existem muitas associações.

De acordo com Lin e Jones (1990), os espermatócitos se dividem em primário e secundário, sendo os primários resultados da última divisão mitótica das espermatogônias, e o secundário o produto da primeira divisão meiótica do espermatócito primário. O espermatócito primário foi descrito na codorna (*Coturnix coturnix japonica*) em oito diferentes fases: pre-leptóteno, leptóteno, zigóteno, paquíteno, diplóteno, diacinese, metáfase e anáfase. O espermatócito secundário, não se encontra facilmente em cortes histológicos, visto que, possui um rápido tempo de divisão reduzindo sua frequência de visualização, mas já foi descrito em patos (CLERMONT, 1958), no galo (ZLONIK, 1947), galinha da Angola (AIRE; OLOWO-OKORUN; AYENI, 1980) e codorna (LIN; JONES, 1990). Cada espermatócito secundário se divide para formar espermátides arredondadas.

As espermátides arredondadas apresentam número haploides de cromossomos, caracterizando-se como pequenas células arredondadas modificadas através do alongamento do núcleo e citoplasma, além de adquirir motilidade. Este processo único de citodiferenciação, é chamado de espermiogênese (AIRE; OLOWO-OKORUN; AYENI, 1980). A espermiogênese representam um complexo processo de diferenciação celular, onde uma célula arredondada perde determinadas organelas e ganham outras, associado a redução de mais de 97% de seu volume (SPRANDO; RUSSELL, 1988).

O estudo do desenvolvimento da espermátide foi sistematizado por Leblond e Clermont (1952), que demonstra o desenvolvimento do acrossomo e subdivide-se em quatro fases: fase de Golgi, formação, desenvolvimento e maturação do acrossomo. Poucos estudos detalham o processo espermiogênico em aves, sendo que a maioria destes explicam parcialmente e, desta forma, não apresentam a totalidade do processo. Apenas as citações que descrevem totalmente este processo foram realizadas no galo doméstico por Nagano (1962), Gunawardana e Scott (1977), que dividiram a espermiogênese em doze fases. O processo de espermiogênese foi relatada apenas em duas aves, no galo (SPRANDO; RUSSEL, 1988) e codorna (LIN; JONES, 1993). Durante este processo, o citoplasma da espermátide é condensado, ao ponto de se tornar mais eletro denso e, desta forma, os corpos residuais coram-se mais fracamente possuindo uma

coloração clara, além de não se observar o complexo tubulolobular (SPRANDO e RUSSEL, 1988).

Nas aves, assim como nos mamíferos, os testículos são responsáveis pela produção de espermatozoides e secreção de andrógenos. Estudos identificaram as células Leydig como o local de produção de andrógenos, em uma variedade de aves, incluindo a ave doméstica, *Gallus domesticus* (ROSENSTRAUCH et al., 1998), o ganso de asas esporas (*Plectropterus gambensis*) (HALSE, 1985), o passarinho de cabeça marrom (*Molothrus ater*) (DUFTY; WINGFIELD, 2009), a codorna japonesa (*Coturnix coturnix japonica*) (NICHOLLS; GRAHAM, 1972) e o pinguim-rei (*Aptenodytes patagonicus*) (MAUGET et al., 1994).

Nas emas os machos atingem a maturidade sexual aos dois anos de idade, e há casos de atingirem a maturidade sexual com um ano (CODENOTTI; ALVAREZ, 1997). Níveis circulatórios de testosterona durante o período de atividade sexual são tidos como cruciais na reprodução das aves. Manipulações dos níveis de testosterona afetam o sucesso da cópula e número de fêmeas copuladas (RAOUF et al., 1994). Resultados de pesquisas sugerem que machos poligínicos com altas concentrações de testosterona estão mais preparados para vencer a competição sexual pelas fêmeas. Também animais com índices altos de testosterona são mais eficientes para proteger seu harém. Com isto, variações no fotoperíodo sensibilizam o hipotálamo, que por sua vez desencadeia o período de atividade sexual produzindo GnRH, induzindo a hipófise na produção de gonadotropinas (VEIGA et al., 2001).

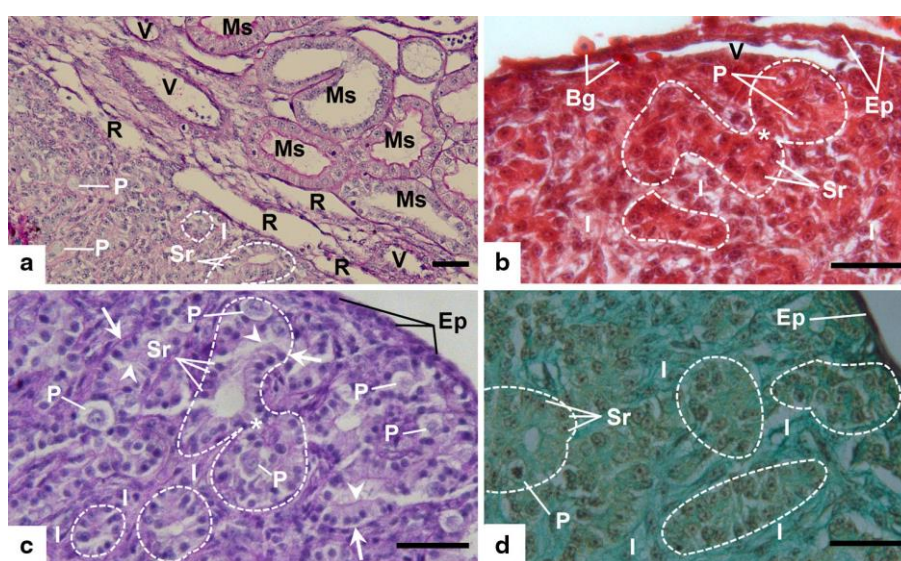
Em *Rhea americana* foram relatados padrão de sazonalidade nos hormônios sexuais (VALDEZ et al. 2014) e morfologia macroscópica dos testículos e epidídimos (CARVALHO et al. 2015). Não há relato sobre espermatogênese nesta ave sul-americana.

2.6 CÉLULAS DE SERTOLI

As células de Sertoli desempenham um papel importante na determinação do tamanho do testículo, número de células germinativas e taxa de produção de espermatozoides na idade adulta (Figura 9). O número de espermatozoides produzidos por dia também depende criticamente do número de células de Sertoli por testículo, porque cada célula de Sertoli pode suportar apenas um número finito de células germinativas (ORTH; GUNSALUS; LAMPERTI, 1988). Em todas as espécies estudadas até agora, as células de Sertoli proliferam durante a vida fetal ou neonatal, bem como no período peripuberal (SHARPE et al., 2003). O período de proliferação das células de Sertoli está bem estabelecido em certos mamíferos. As células germinativas proliferam após

um curto período de quiescência e migram de sua localização central em direção à membrana basal, estágio em que são conhecidas como espermatogônias (MEEHAN et al., 2000).

Figura 7 Agregações de células de Sertoli (algumas delas definidas por linhas tracejadas) no embrião de avestruz de 20 dias. Observe as diferenças entre os ductos e os vasos sanguíneos (V). B: Agregações de células de Sertoli entraram em contato e se anastomosaram entre si. Observe o local de anastomose (asteriscos), o epitélio de revestimento testicular (Ep) e seus vasos sanguíneos subjacentes (V). C: As células germinativas primordiais (P) com núcleo grande, pálido e esférico estão localizadas entre as células de Sertoli (Sr). D: As fibras do tecido intersticial foram distintamente coradas pelo Alcian blue (AB), enquanto os núcleos das células germinativas primordiais coraram como flocos escuros. Tecido intersticial (I). Escala 30 µm.



Fonte: Hassanzadeh et al. (2013).

A pomba (*Spilopelia senegalensis*) é classificada na família Columbidae, sendo encontrada na África do Sul (MADKOUR; MOHAMED, 2019). Estas aves apresentam os testículos formados principalmente por dois componentes, sendo o primeiro o estroma, que forma principalmente a cápsula e o tecido conjuntivo intersticial e, o segundo o parênquima, que forma os túbulos seminíferos e células intersticiais. Os túbulos seminíferos contêm células de Sertoli e células germinativas. A meiose nos machos é observada apenas nos testículos, que têm duas funções principais, exócrina e (produção de esperma) e endócrino (produção de andrógenos) (LAN et al., 2011).

Diferentes células somáticas importantes são observadas nos testículos, dentro dos túbulos seminíferos, como células de Sertoli, e fora dos túbulos seminíferos, como células mioides, células de Leydig e telócitos. As células de Sertoli suportam o desenvolvimento das células germinativas fisicamente e metabolicamente (SHARPE et al., 2003). As células mioides são células semelhantes a músculos lisos que ajudam no transporte de espermatozoides

(KORMANO; HOVATTA, 1972). As células de Leydig estão localizadas no tecido conjuntivo intersticial entre túbulos seminíferos. As células de Leydig são a principal fonte de hormônios sexuais masculinos (LI et al., 2016). Os telócitos são células intersticiais generalizadas observadas nos testículos de humanos (MARINI et al., 2018), coelhos (AWAD; GHANEM, 2018) e tartarugas chinesas de casco mole (YANG et al., 2015), mas nenhum estudo anterior registrou telócitos nos testículos de aves.

Para o desenvolvimento testicular normal, iniciação e progressão da espermatogênese e maturação espermática, é necessária a rede de comunicação célula-célula fornecida pelos canais de junções comunicantes (KIDDER; CYR, 2016). A proteína predominante da junção comunicante testicular (GJP) é a conexina 43 (proteína Cx43; gene GJA1). Ele conecta células de Sertoli adjacentes, bem como células de Sertoli e células germinativas no epitélio do túbulo seminífero. Além disso, acredita-se que o Cx43 desempenhe um papel na formação e dinâmica da barreira hemato-testicular (HOLLENBACH et al., 2018). Recentemente, a presença de Cx43 foi demonstrada nos testículos de codornas japonesas, e seu envolvimento na alternância do transporte intercelular local como parte da regressão gonadal em estágios da reprodução (BANERJEE; CHATURVEDI, 2017).

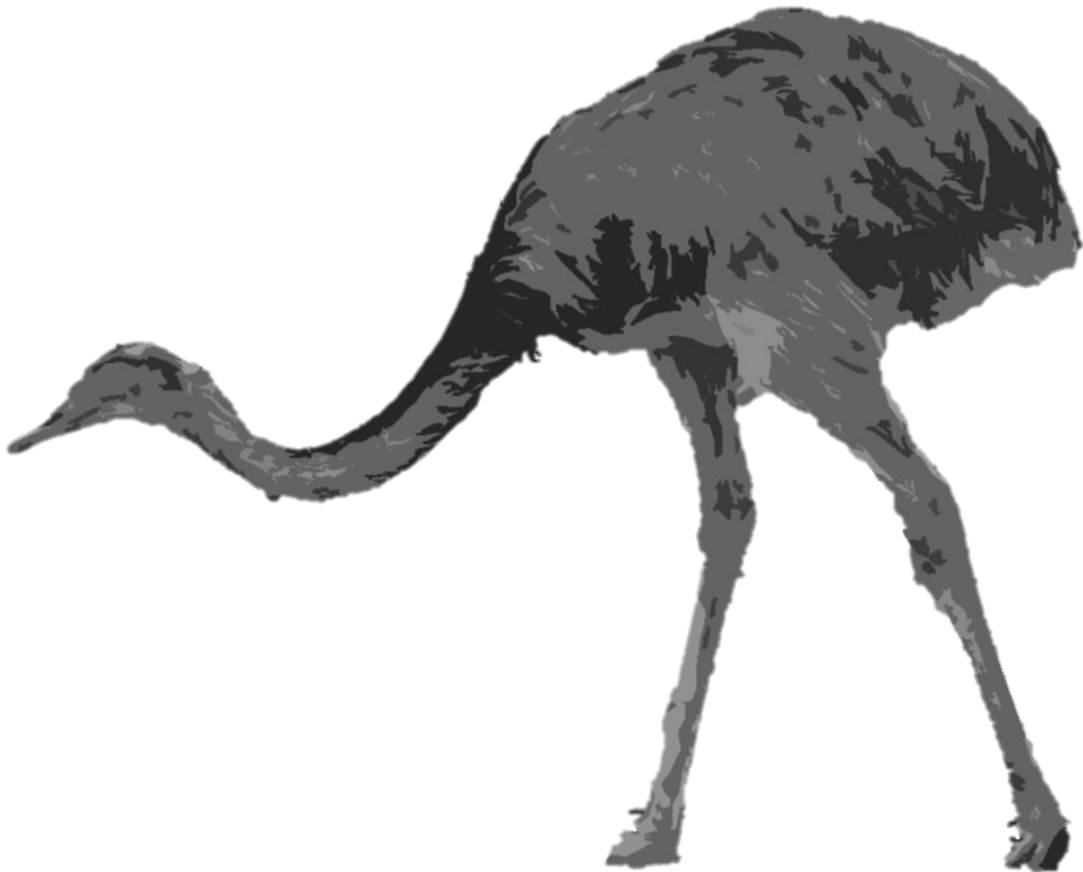
A relação entre as células germinativas e as células de Sertoli é obrigatória no desenvolvimento dos testículos, bem como na espermatogênese. Na formação inicial do testículo embrionário, as células de Sertoli sequestram os gonócitos das células germinativas dentro de túbulos seminíferos recém-formados e inibem a propensão dessas células para entrar em meiose (GRISWOLD, 1998). Os gonócitos não sequestrados destinados ao ovário entram em prófase meiótica logo após a formação do órgão. Este processo de formação de testículo requer a expressão de genes específicos no cromossomo Y. Após a formação do testículo, as células de Sertoli e as células germinativas sofrem rápida proliferação. A puberdade geralmente envolve a cessação da mitose das células de Sertoli, a formação de junções entre as células de Sertoli adjacentes, a progressão das células germinativas por meiose e diferenciação em espermatozoides.

Além do papel na formação dos testículos, as células de Sertoli fornecem fatores críticos necessários para a progressão bem-sucedida das células germinativas em espermatozoides. Esses fatores críticos podem estar na forma de suporte físico, complexos juncionais ou barreiras, ou podem ser estímulos bioquímicos na forma de fatores de crescimento ou nutrientes (KIERSZENBAUM, 1994). Há evidências experimentais de que a persistência dos complexos juncionais e do sistema de dois compartimentos no testículo, é necessária para a espermatogênese. As células de Sertoli produzem produtos específicos que são necessários para

a sobrevivência das células germinativas e esses produtos, se combinam para formar um ambiente único e essencial no compartimento adluminal. Algumas das funções das células de Sertoli podem não ser requisitos absolutos para a espermatogênese, mas podem influenciar a eficiência do processo (JEGOU, 1993).

As células de Sertoli produzem e secretam várias proteínas que formam a base molecular para as interações das células germinativas de Sertoli (GRISWOLD, 1998). As glicoproteínas secretadas pelas células de Sertoli podem ser colocadas em várias categorias com base nas suas propriedades bioquímicas conhecidas. A primeira categoria inclui as proteínas de transporte ou bioprotetoras, que são secretadas em relativa abundância e incluem proteínas de transporte de íons metálicos. A segunda categoria de proteínas secretadas inclui proteases e inibidores de protease, que supostamente são importantes nos processos de remodelação tecidual que ocorrem durante a espermição e movimento de espermátócitos pré-leptótenos para o compartimento adluminal. A terceira categoria de secreções das células de Sertoli, inclui as glicoproteínas que formam a membrana basal entre as células de Sertoli e as células peritubulares. Finalmente, as células de Sertoli secretam uma classe de glicoproteínas reguladoras que podem ser produzidas em abundância muito baixa e ainda assim desempenhar suas funções bioquímicas.

Justificativa



3 JUSTIFICATIVA

Os esforços da comunidade científica e de organizações não governamentais para mitigar as perdas da biodiversidade no mundo tem sido um dos grandes desafios da humanidade, uma vez que essas perdas estão associadas a degradação biótica resultantes de fatores econômicos, culturais, e sociais, em função de atividades antrópicas sobre os ecossistemas, a exemplo de desmatamento, a fragmentação de *habitat*, a caça, a captura e o comércio ilegal de animais.

Dentre as alternativas para mitigar a redução da biodiversidade no Brasil e em alguns países, a comunidade científica tem sugerido o estímulo ao financiamento de projetos que tenham finalidade conservacionista e de proteção a biodiversidade. Estudos com animais silvestres permitem o desenvolvimento de estratégias para a proteção e o uso consciente de recursos desse grupo de animais, contribuindo para o desenvolvimento econômico e perpetuação de espécies de uma região (GAMARRA et al., 2019).

Nora e Franco (2017) citam que a pesquisa científica com animais silvestres fornece apoio tanto para conservação quanto para sua manutenção em cativeiro e sugerem que estudos devem ser implementados abordando aspectos da nutrição, comportamento, fisiologia e reprodução. Nesse sentido, trabalhos que abordem a biologia reprodutiva da espécie se destacam ao considerar aspectos que somados podem potencializar a capacidade de recuperação do *status* reprodutivo de diferentes espécies.

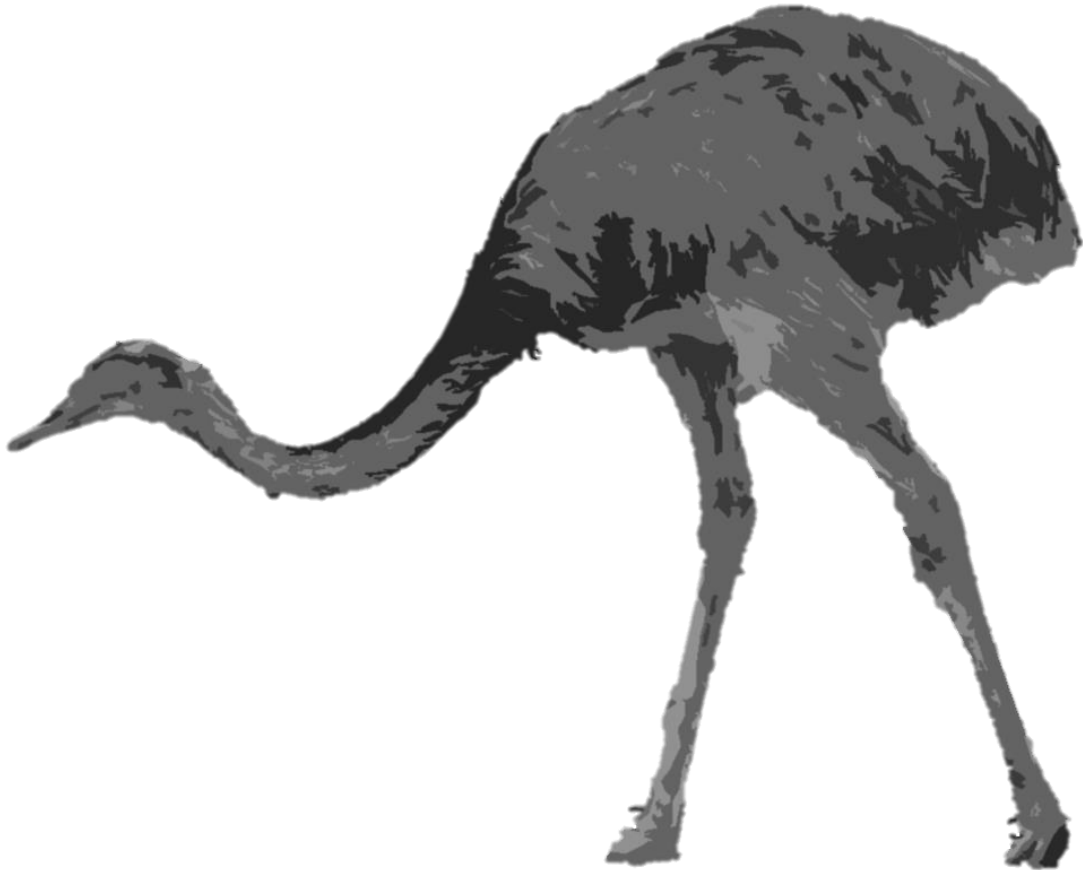
A União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) relatou que, em 2019, aproximadamente, 14% de todas as espécies de aves existentes no mundo corriam o risco de extinção, e estimativas indicam que este número continuará a crescer nos próximos anos (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2013), onde esse declínio populacional moderadamente rápido e contínuo, deve-se principalmente à caça para a pele e carne das espécies, bem como à destruição e fragmentação de seus habitats.

A ema (*Rhea americana*) é uma ave nativa da fauna do continente americano, encontrada no Brasil, Argentina, Paraguai, Uruguai e Bolívia, considerada uma importante fonte de alimento para as comunidades humanas nessas regiões, fornecendo carne e especialmente ovos, contribuindo para o desenvolvimento das sociedades sul-americanas (CAROLINA et al., 2019). Pouco se sabe sobre a morfologia e fisiologia reprodutiva dessa espécie. Dessa forma, o conhecimento básico se faz necessário para que gerem subsídios ao desenvolvimento de biotécnicas visando a conservação da espécie, uma vez que a IUCN, em 2018, classificou o status de conservação dessa ave na categoria quase ameaçada globalmente,

apesar de não constar na lista oficial brasileira de espécies da fauna ameaçadas de extinção (ICMBio, 2018).

É neste sentido que se destacam os estudos sobre a morfofisiologia do aparelho reprodutor destas aves. Pois, podem contribuir com melhorias no manejo reprodutivo, alimentar, sanitário e mesmo em procedimentos clínicos-cirúrgicos, associados a diagnóstico de doenças vinculadas a reprodução.

Hipóteses científicas



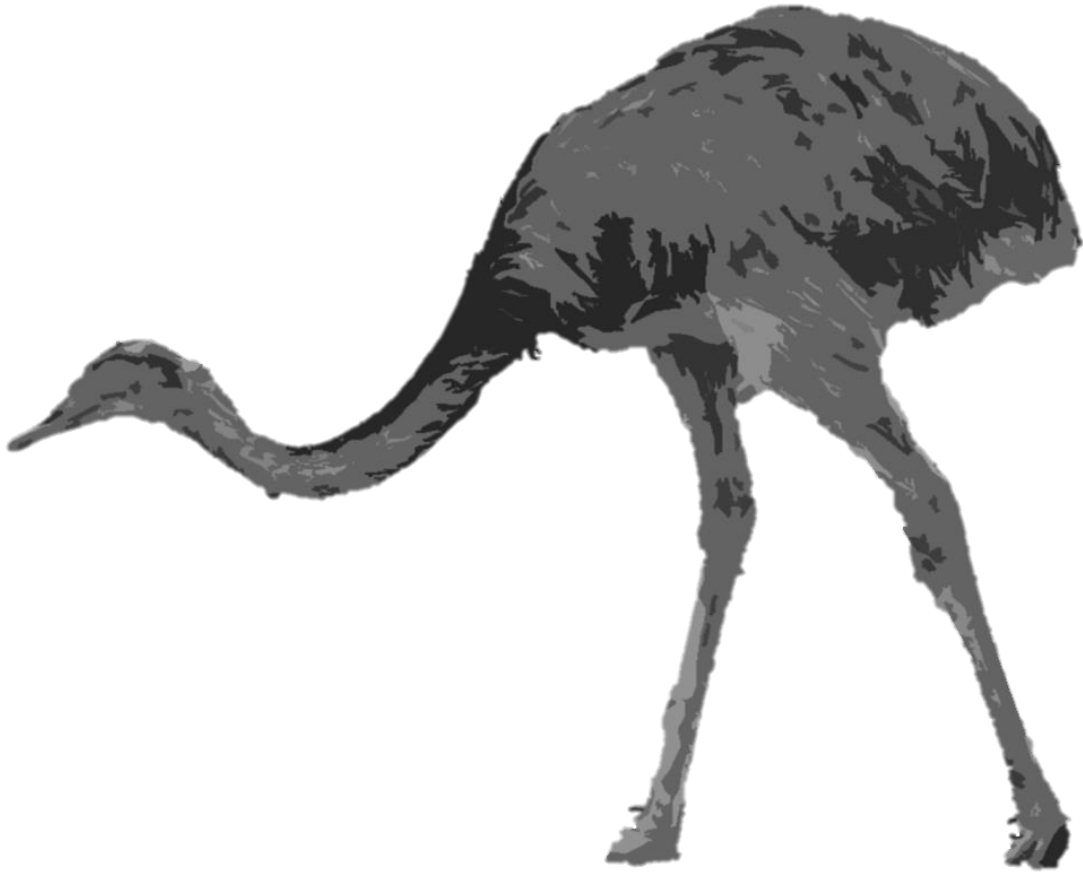
4 HIPÓTESES CIENTÍFICAS

4.1 A arquitetura do testículo de emas segue o mesmo padrão de outras ratitas;

4.2 A morfologia testicular na ema varia nas idades de 03, 06, 09, 12, 15 e 18 meses;

4.3 Existem diferenças morfométricas no sistema reprodutor masculino de *Rhea americana*, de acordo com a variação da idade.

Objetivos



5 OBJETIVOS

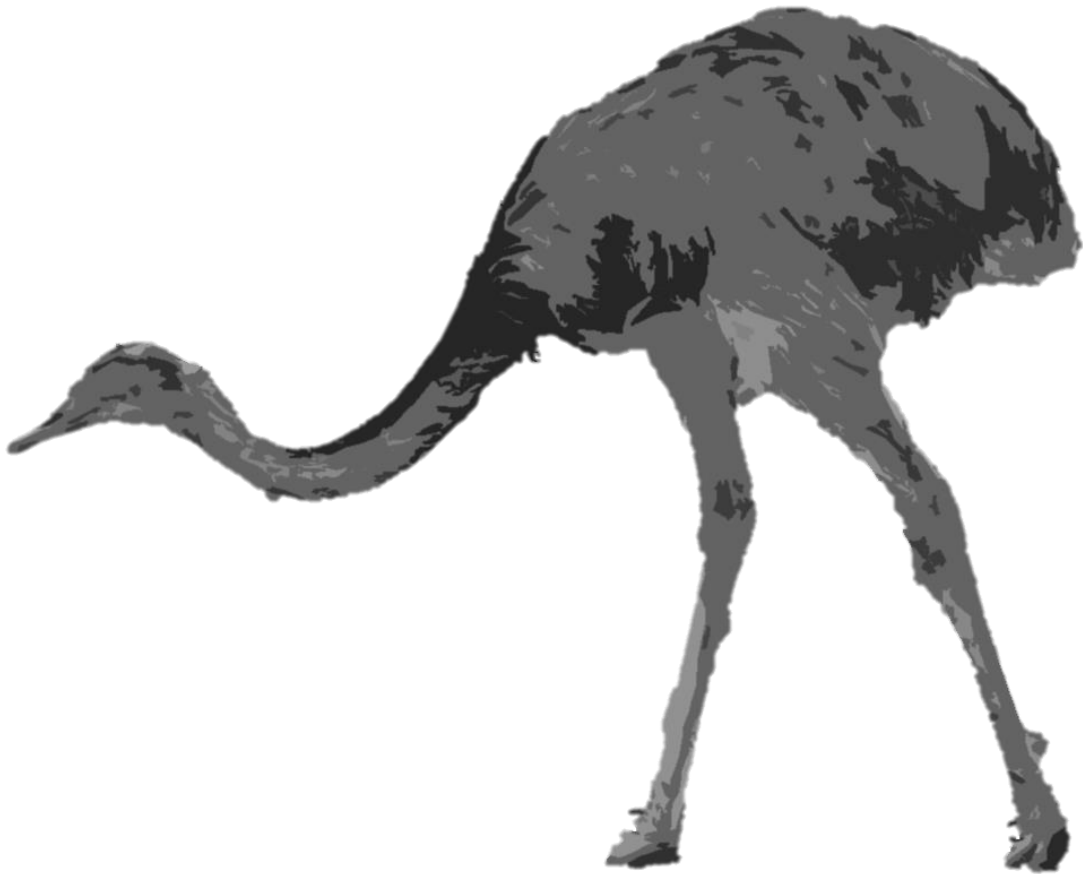
5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a anatomia macroscópica e microscópica dos órgãos reprodutores masculinos da ema (*Rhea americana*).

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Estudar a morfometria e a morfologia macroscópica do testículo, epidídimo e ducto deferente, tais como a sintopia, forma e coloração;
- b) Descrever as características estruturais de testículos, epidídimos e ductos deferentes de emas;
- c) Comparar características testiculares em diferentes fases produtivas;

Material e Métodos



6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Esta pesquisa foi realizada ao longo de todo ano de 2020, 2021 e parte de 2022 para averiguar o desenvolvimento dos órgãos reprodutores masculinos da ema (*Rhea americana*), de modo a inferir sobre sua importância nos eventos fisiológicos que se processam nestas estruturas.

O grupo amostral foi composto inicialmente por 18 espécimes machos de *Rhea americana*, com idades variando de três a dezoito meses, foram processados para análise quanto a macroscopia e microscopia de luz, cujo protocolo experimental foi previamente submetido ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio – nº 73638-1) e Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - parecer 30/2020) da Universidade Federal Rural do Semiárido (UFERSA), para aprovação.

6.2 LOCAL DE AMOSTRAGEM

O material destinado ao estudo da descrição morfológica do aparelho genital masculino de emas (*Rhea americana*), foram mantidos em piquetes telados com dimensão variando entre 20 m², proveniente do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres (CEMAS) localizado no campus leste da UFERSA, no município de Mossoró-RN. Seu objetivo é promover pesquisas voltadas à preservação e manutenção de espécies silvestres em cativeiro. Ocupando uma área de 20 ha, está a uma altitude de aproximadamente 16 metros acima do nível do mar e localiza-se entre as coordenadas geográficas 5° 11' S e 37° 20' W Gr. sendo registrado pelo IBAMA como criadouro científico sob o número 1478912.

Os experimentos desenvolvidos para obtenção dos resultados morfofisiológicos envolvendo macroscopia e microscopia de luz, foram realizadas no Laboratório de Morfofisiologia Animal Aplicada (LABMORFA) do Departamento de Ciências Animais.

6.3 ANIMAIS AMOSTRADOS E CARACTERIZAÇÃO DO AMBIENTE

Para desenvolvimento deste estudo foram utilizados o conjunto de órgãos de 18 animais, com idades variando de três a dezoito meses, os quais foram processados para análise quanto a macroscopia e microscopia de luz. Os animais foram divididos em 6 grupos com 3 animais, separados de acordo com a faixa etária, sendo o grupo 1 (3 meses), grupo 2 (6 meses), grupo 3 (9 meses), grupo 4 (12 meses), grupo 5 (15 meses) e grupo 6 (18 meses). As coletas foram realizadas ao longo dos anos de 2020 a 2022, cujo protocolo experimental foi previamente submetido ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio – nº 73638-1) e Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - parecer 30/2020) para sua aprovação.

Os animais experimentais foram mantidos em um sistema semi-intensivo, na região semiárida do Brasil, num clima seco e muito quente, com temperatura média de 27,5° C e precipitação pluviométrica anual muito irregular, onde o período chuvoso fica compreendida entre os meses de fevereiro a maio. Conforme os dados registrados na Estação Meteorológica Automática (EMA) da UFERSA, a precipitação registrada em 2020 foi no valor de 828,0 milímetros, quando climatologicamente o acumulado esperado para este período seria de 493,2 mm (LABIMC / UFERSA, 2023).

Os recintos na qual os animais foram mantidos inicialmente são de alvenaria, cobertos por telha de cerâmica, com dimensionamento de 3,00 x 6,00 m, piso de concreto com as laterais em telas metálicas perfuradas e uma grande área arenosa retangular com 333 m² de área total. Os piquetes possuíram dimensionamento de 20,00 x 10,00 m, com piso de areia limpos diariamente evitando consumo de corpo estranho. Foi ofertado pelo setor do CEMAS uma ração para as emas filhotes em fase inicial até 6 meses (Tabela 1) e adultas (Tabela 2), confeccionada na fábrica de ração da UFERSA contendo: milho moído, farelo de soja e farelo de trigo, além de frutas, forragem, suplemento vitamínico e água *ad libitum*.

Tabela 1: Ração para atender às exigências nutricionais de emas com 30 a 90 dias de idade (GADELHA et al., 2020).

Ingrediente	Quantidade
Milho Moído	32,00
Farelo de soja	23,30
Farelo de trigo	38,24
Calcário calcítico	2,20
Fosfato Bicálcico	1,85
Sal	0,56
Óleo de Soja	0,05
Inerte	1,64
Premix mineral ave	0,10
Premix vitamínico ave	0,05
Total	100,00
Composição Química	
Proteína bruta (%)	18,33
Energia Metabolizável (kcal/kg)	2235
Fibra Bruta (%)	5,357
Lisina Digestível (%)	0,8
Treonina Digestível (%)	0,64
Cálcio (%)	1,4
Fósforo Disponível (%)	0,6
Sódio (%)	0,24

*Níveis de garantia por kg do produto: vitamina A 10.000.000 UI, vitamina D 2.000.000 UI, vitamina E 30.000 UI, vitamina K 3,0 g, tiamina 2,0 g, riboflavina 2,0 g, piridoxina 6,0 g, cobalamina 1,5 g, ácido pantotênico 12 g, ácido fólico 1,0 g, biotina 1,0 g, niacina 50 g., 20 g, ferro 100 g, selênio 0,25 g, iodo 2,0 g, manganês 160 g, zinco 100 g, veículo q.s.p. **Inerte: Areia lavada.

Tabela 2: Composição nutricional da ração para emas adultas utilizada pela fábrica de ração da UFERSA.

Nutrientes	Porcentagem
Milho moído	62, 4 %
Farelo de soja	27 %
Calcário calcítico	8,12 %
Farelo de trigo	1,72 %
Sal comum	0, 36%
Premix mineral ave	0,2 %
Premix vitamínico ave	0,2 %

Fonte: Autoria própria.

6.4 PROTOCOLO ANESTÉSICO E EUTANÁSIA

Os animais foram eutanasiados com base no protocolo utilizado por Oliveira et al. (2018), adaptando sempre que necessário. No momento da coleta, os animais foram pesados e submetidos ao procedimento anestésico, com associação da medicação pré-anestésica de Cloridrato de Xilazina (Xilazin® 2 % na dose de 1 mg/Kg, fabricante Syntec) e Cloridrato de Cetamina (Quetamina® 10 % na dose de 15 mg/kg, fabricante Vetnil) em associação por via intramuscular. Atingido o estágio de sedação, os animais receberam uma dose anestésica de Tiopental (Tiopental sódico® 1 g na dose de 150 mg/Kg, fabricante Richmond, División Veterinaria S.A.) como fármaco indutor da anestesia. Atingido o plano anestésico, efetuou-se a eutanásia do animal com a administração de Cloreto de Potássio (Cloreto de potássio® 19,1 % na dose de 2,56 mEq/Kg), por via braquial, confirmando o óbito do animal após identificada a parada cardiorrespiratória.

6.5 PROCEDIMENTO PARA MACROSCOPIA

Para dissecações dos animais destinados aos estudos macroscópicos, os espécimes foram colocados em decúbito dorsal e incisados no plano mediano no sentido craniocaudal partindo da extremidade cranial da quilha até a cloaca. Em seguida, foram deslocadas as estruturas do aparelho digestório de modo a expor os órgãos reprodutores, seccionando o reto transversalmente na região de desembocadura da cloaca.

Imediatamente após esses procedimentos, os órgãos reprodutores foram analisados a olho nu (*in situ*) e com auxílio de uma lupa estereomicroscópica (Zeiss, modelo Stemi DV4)

para análise *ex situ*, fotodocumentados (Câmara digital Sony DSC-W570 16.1 MP) e descritos quanto as suas características morfológicas externas. Estes foram analisados a fresco quanto à forma, coloração, posição e sintopia e, em seguida mensurados com auxílio de um paquímetro digital (“Mitutoyo”, modelo 500-147-10) obtendo-se o comprimento (eixo do polo cranial ao caudal) e a largura (eixo da margem lateral à margem medial). Após mensuração, cada estrutura foi pesada com auxílio de uma balança analítica (AL200C, Marte, Brasil).

Ressalta-se que as estruturas macroscópicas identificadas foram nominadas com base em *Handbook Of Avian Anatomy: Nomina Anatomica Avium* (1993) e a *Nomina Anatomica Veterinaria* (2017), sendo os resultados comparados com a literatura referente a estudos com aves domésticas e silvestres.

6.6 PROCEDIMENTO PARA MICROSCOPIA

Para microscopia de luz foram usadas técnicas histológicas preconizadas por Tolosa et al. (2003). Os cortes foram aderidos às lâminas de vidro e deixados em estufa a 60 °C “overnight”, para posterior procedimento de coloração com hematoxilina e eosina (HE). Após montagem e secagem das lâminas, o material foi analisado sendo as imagens mais representativas fotomicrografadas em microscópio de luz (LEICA DM 500 HD) com câmera acoplada (LEICA ICC50W).

6.7 ANÁLISE MORFOMÉTRICA

6.7.1 Determinação do peso testicular

Os testículos, depois de dissecados, foram pesados e considerando que o peso testicular relativo representa o peso do testículo por 100 gramas de peso corpóreo, foi realizado o seguinte cálculo:

$$P_{REL} = \frac{\text{Peso do testículo}}{\text{Peso corpóreo}} \times 100$$

Para mostrar a relação nas diferentes idades de crescimento, entre o peso testicular total e o peso corporal, foi calculada a somatória dos pesos testiculares direito e esquerdo dos animais analisados.

6.7.2 Determinação do volume testicular

O princípio de Arquimedes consiste no estudo do acréscimo do volume de líquidos após imersão de sólidos em seu meio. Experimentalmente, é possível verificar que quando um corpo é imergido em um líquido, o volume do líquido aumenta. Em suma, para quaisquer objetos, a diferença entre o volume final e inicial do líquido (após e antes da imersão, respectivamente), consiste no volume do sólido imerso. Desta forma, para determinação volumétrica dos órgãos genitais da ema, um béquer contendo escala milimetrada, foi preenchido com água. Neste momento, foi registrado o volume inicial (V_1) e, posteriormente, cada órgão foi imerso totalmente no béquer, tomando-se o cuidado para que não tocasse as paredes do recipiente, em seguida, o volume final foi registrado (V_2). Posteriormente, calculou-se o volume pela diferença do volume final (V_2) – volume inicial (V_1) em centímetros cúbicos.

6.7.3 Determinação das densidades de volume dos componentes testiculares

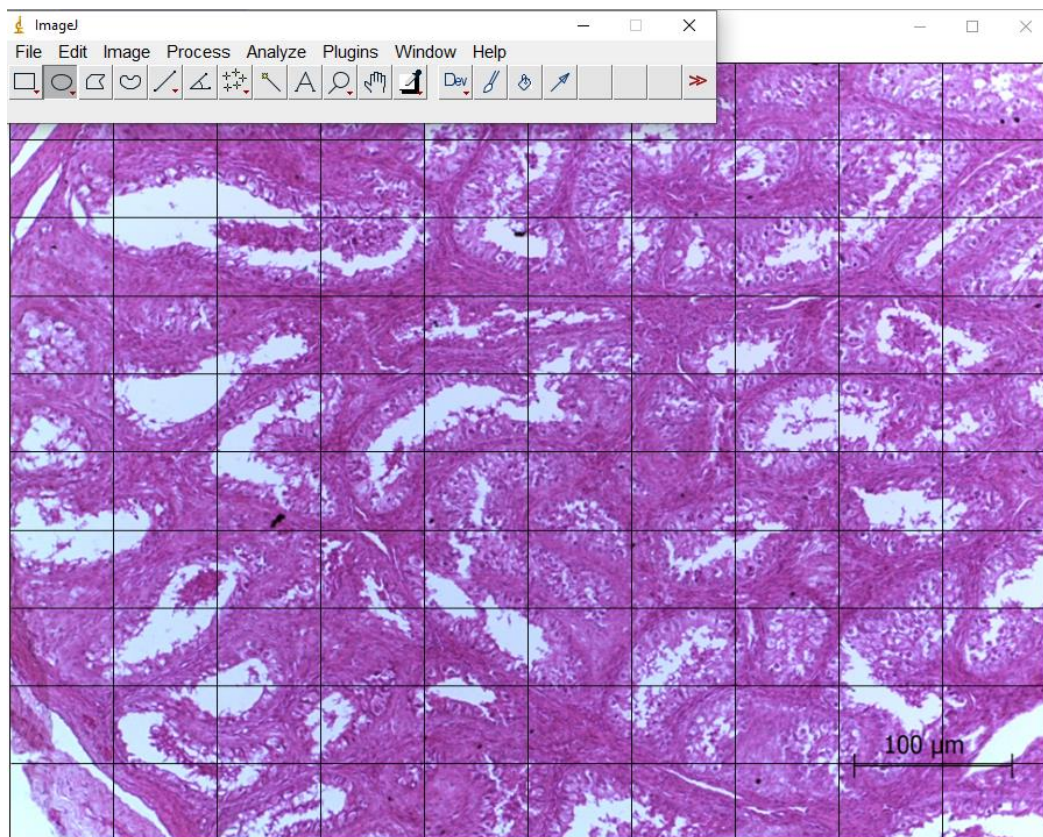
Utilizando o software ImageJ® (bundled with 64-bit Java 1.6.0_24), foram realizadas as análises morfométricas das imagens microscópicas. Neste sentido, foram obtidas as medidas da lâmina basal, epitélio seminífero e túbulos seminíferos. Além disso, foram determinadas as densidades de volume (expressas em percentagem) e medidas dos túbulos seminíferos, da luz tubular e do tecido intersticial testicular (CALIARI, 1997).

Imagens de 30 campos (10 da região caudal, 10 da região medial e 10 da região cranial) dos testículos para relativas às seções histológicas testiculares de cada animal. Cada campo mediu 2048 X 1536 “pixels”. Para a obtenção das percentagens das densidades de volume acima citadas, foi criada uma grade de 100 pontos sobre cada um dos 30 campos (Figura 10). O epitélio dos túbulos seminíferos, a luz tubular e o tecido intersticial foram contados todas as vezes que as imagens destes componentes tocavam um ponto de interseção entre os eixos X e Y dos pontos da grade. Posteriormente, foram calculadas as médias (em percentual) dos 3.000 pontos analisados a partir das seções do testículo de cada animal, referentes a cada um dos elementos estudados (ASSIS-NETO et al. 2003).

Como foram utilizados 18 animais, foram analisados 540 campos de seções testiculares (totalizando a análise de 54.000 pontos), foram obtidos os dados relativos aos valores

individuais médios e às médias do grupo referentes às densidades dos túbulos seminíferos, da luz tubular e do tecido intersticial.

Figura 8: Ilustração do procedimento utilizado para análise morfométrica das densidades volumétricas dos componentes testiculares.



Fonte: autoria própria.

6.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram realizadas análises descritivas de média e desvio padrão para os parâmetros testiculares. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por meio da análise de variância (teste F) ao nível de 0,05, para avaliar a significância dos erros aleatórios. O teste F considera a relação das variâncias (quadrado dos desvios padrões) de duas amostras:

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2}$$

O valor de F bicaudal pode ser menor ou maior que 1,0. A hipótese nula adotada é que as populações de onde as amostras são obtidas são normais, e que as variâncias das populações são iguais. Se o valor calculado de F exceder o valor de $F_{crítico}$ (teórico) então a hipótese nula deve ser rejeitada.

Para análise dos dados morfométricos obtidos, utilizamos o teste Z para comparação de média, descrito por Soares e Siqueira (1999). Neste sentido, consideramos as seguintes hipóteses para serem testadas:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2$$

$$H_1: \mu_1 \neq \mu_2$$

Para realização da inferência sobre a diferença das médias ($\mu_1 - \mu_2$), utiliza-se a informação amostral contida em $\bar{X}_1 - \bar{X}_2$, cuja variância é estimada através da equação $\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}$. A estatística do teste para testar a hipótese de igualdade de médias ($H_0: \mu_1 - \mu_2$) é:

$$Z = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}}$$

Desta forma, se o valor de $|Z|$ for maior que o valor tabelado da estatística Normal (0,1) com $\alpha = 0,05$, rejeita-se a hipótese nula de igualdade entre as médias, ou seja:

Região de Rejeição (para $\alpha = 0,05$)

$$\left| \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \right| > Z_{1-\frac{\alpha}{2}} = \mathbf{1,96} \rightarrow Z_{calculado} > 1,96$$

ou Valor - $p < 0,05$

O valor - p é obtido através do valor do Z na tabela da distribuição $N(0,1)$. Os valores de p , quando significantes, foram marcados com asterisco, nas tabelas e gráficos.

Referências

- ABD-ELMAKSoud, A.; SAYED-AHMED, A.; MOHAMED, S. E.; MOHAMED, K.; MAREI, H. E. Morphological and glycohistochemical studies on the epididymal region of the Sudani duck (*Cairina moschata*). **Research in Veterinary Science**, v. 86, n 1, p. 7-17, 2009.
- AIRE, T. A. Aspects of the functional morphology of the ductus epididymidis in domestic anseriform and galliform birds. **Anatomia, histologia, embryologia**, v. 29, n. 3, p. 179-191, 2000.
- AIRE, T. A. The ductuli efferentes of the epididymal region of birds. **Journal of Anatomy**, v. 130, n.4, p. 707, 1980.
- AIRE, T. A. The rete testis of birds. **Journal of anatomy**, v. 135, n. 1, p. 97, 1982.
- AIRE, T. A.; AYENI, J. S.; OLOWO-OKORUN, M.O. The structure of the excurrente ducts of the testis of the guinea-fowl (*Numida meleagris*). **J. Anat.**, London, v.129, p.633-643, 1979.
- AIRE, T. A.; OZEGBE, P. C. The testicular capsule and peritubular tissue of birds: morphometry, histology, ultrastructure and immunohistochemistry. **Journal of anatomy**, v. 210, n. 6, p. 731-740, 2007.
- AIRE, Tom A. Spermiogenesis in birds. **Spermatogenesis**, v. 4, n. 3, p. e959392, 2014. doi: 10.4161/21565554.2014.959392
- ASSIS-NETO, A. C. D., MELO, M. I. V. D., CARVALHO, M. A. M. D., MIGLINO, M. A., OLIVEIRA, M. F. D. Análise histométrica do desenvolvimento testicular de cutias (*Dasyprocta aguti*) criadas em cativeiros. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 202-208, 2003.
- AWAD, M.; GHANEM, M. E. Localization of telocytes in rabbits testis: histological and immunohistochemical approach. **Microsc Res Tech**, v. 81, p. 1268 – 74. 2018.
- BACHA, W. J.; BACHA, L. M. **Atlas Colorido de Histologia Veterinária**. 2ª ed. Editora Roca, São Paulo. 320p. 2003.
- BAILEY, R. E. Accessory reproductive organs of male fringillid birds: seasonal variations and response to various sex hormones. **The Anatomical Record**, v. 115, n. 1, p. 1-19, 1953.
- BANERJEE, S.; CHATURVEDI, C. M. Apoptotic mechanism behind the testicular atrophy in photorefractory and scotosensitive quail: Involvement of GnIH induced p-53 dependent Bax-Caspase-3 mediated pathway. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 176, p. 124–135, nov. 2017.
- BANKS, F. C. L. et al. Smooth Muscle and Purinergic Contraction of the Human, Rabbit, Rat, and Mouse Testicular Capsule1. **Biology of Reproduction**, v. 74, n. 3, p. 473–480, 1 mar. 2006.

BANKS, F. C., KNIGHT, G. E., CALVERT, R. C., TURMAINE, M., THOMPSON, C. S., MIKHAILIDIS, D. P., BURNSTOCK, G. Smooth muscle and purinergic contraction of the human, rabbit, rat, and mouse testicular capsule. **Biology of reproduction**, v. 74, n. 3, p. 473-480, 2006.

BARALDI-ARTONI, S. M.; ORSI, A. M.; CARVALHO, T.L. L. et al. The annual testicular cycle of the domestic quail (*Coturnix coturnix japonica*). **Anatomia, Histologia y Embryologia**, v.26, n.4, p.337-339, 1997.

BARALDI-ARTONI, S.M.; ORSI, A.M.; CARVALHO, T.L.L. et al. Seasonal morphology of the domestic quail (*Coturnix coturnix japonica*) testis. **Anatomy Histology Embryology**, v.28, n.4, p.217-220, 1999.

BELL, D. J.; FREEMAN, B. M. Physiology and biochemistry of the domestic fowl, **The Male in Reproduction**, v. 3, p. 1412-1443, 1971.

BELLO, A., FREI, S., PETERS, M., BALKEMA-BUSCHMANN, A., BAUMGÄRTNER, W., WOHLSEIN, P. Spontaneous diseases in captive ratites (Struthioniformes) in north western Germany: A retrospective study. **Plos one**, v. 12, n. 4, p. e0173873, 2017.

BIRDLIFE INTERNATIONAL (BIRDLIFE INTERNATIONAL. **IUCN Red List of Threatened Species: *Rhea americana***. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/species/22678073/92754472> . Acesso em: 21 set. 2022.

BRISKIE, J. V.; MONTGOMERIE, R. Efficient copulation and the evolutionary loss of the avian intromittent organ. **Journal of avian biology**, v. 32, n. 2, p. 184-187, 2001.

CALIARI, M.V. – **Princípios de morfometria digital: KS300 para iniciantes**. Belo Horizonte: Editora UFMG, 1997. 149 p.

CAROLINA, A. C., OPHÉLIE, L., JEFF, J., MIGUEL, G., GUSTAVO, N., STEVE, W. Analysis of ancient DNA from South American rhea bones: Implications for zooarchaeology and biogeography. **Journal of Archaeological Science: Reports**, v. 25, p. 624-631, 2019.

CARVALHO, S. F. M.; FRENEAU, B. N.; FRERNEAU, G. E. Aspects of the macroscopic testicular and epididymal morphology in the Greater Rhea, *Rhea Americana* (Linnaeus–1758) birds. **Anatomia, histologia, embryologia**, v. 44, n. 4, p. 255-261, 2015.

CLERMONT, Y. Structure de l'épithélium séminal et mode de renouvellement des spermatogonies chez le canard. **Archives d'Anatomie Microscopique et de Morphologie Experimentale**, v. 47, p. 47-66, 1958.

CODENOTTI, T. L.; ALVAREZ, F. Mating behavior of the male Greater Rhea. **The Wilson Journal of Ornithology**, v. 113, n. 1, p. 85-90, 2001.

COOPER, R. G., MAHROSE, K. M., HORBAŃCZUK, J. O., VILLEGAS-VIZCAÍNO, R., SEBEL, S. K., MOHAMMED, A. F. The wild ostrich (*Struthio camelus*): a review. **Tropical animal health and production**, v. 41, n. 8, p. 1669-1678, 2009.

DAS, L. N.; MISHRA, D. B.; GISWAL, G. - Comparative anatomy of the domestic duck (*Anas boscas*). **Indian Veter. J.**, v. 42, p.320-26, 1965.

DAVIS, J. R.; LANGFORD, G. A.; KIRBY, P. J. The testicular capsule. **The testis**, v. 1, p. 281-337, 1970.

DONOGHUE, A. M.; BLANCO, J. M.; GEE, G. F.; KIRBY, Y. K.; WILDT, D. E. **Reproductive technologies and challenges in avian conservation and management**. In: Holt, W.V., Pickard, A.R., Rodger, J.C. & Wildt, D.E. (eds.). Conservation Biology and Reproductive Science and Integrated Conservation. Zoological Society of London, London, pp. 321-337. 2003.

DUFTY, A. M.; WINGFIELD, J. C. Temporal patterns of circulating LH and steroid hormones in a brood parasite, the Brown-headed cowbird, *Molothrus ater*. **Journal of Zoology**, v. 208, n. 2, p. 191–203, 20 ago. 2009.

DYM, M.; FAWCETT, D. W. The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. **Biology of Reproduction**, v. 3, p. 308 - 326, 1970.

ELIAS, M. Z.; AIRE, T. A.; SOLEY, J. T. Macroscopic features of the arterial supply to the reproductive system of the male ostrich (*Struthio camelus*). **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 36, n. 4, p. 255-262, 2007.

FERNÁNDEZ, G. J.; REBOREDA, J. C. Effects of clutch size and timing of breeding on reproductive success of greater rheas. **The Auk**, v. 115, n. 2, p. 340-348, 1998.

FITZGERALD, T.C. - **The Coturnix quail anatomy and histology**. Ames: The Iowa State University Press, p. 253-60, 1969.

FOWLER, M. E. Comparative clinical anatomy of ratites. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 22, p. 204 - 227, 1991.

FRENEAU, G. E.; CARVALHO, S. F.M.; SABOIA-MORAIS, S. M. T.; FRENEAU, B. N. Aspects of spermatogenesis and microscopic testicular morphology in Greater Rhea, *Rhea americana* (Linnaeus, 1758). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, p. 1045-1052, 2016.

FREY, R.; GOYMANN, W. A single functional testis and long deferent duct papillae: the peculiar male reproductive tract of the classically polyandrous, sex-role reversed Black Coucal (*Centropus grillii*). **Journal of Ornithology**, v. 150, n. 4, p. 827-838, 2009.

FROMAN, D. P., KIRBY, T. D. **Reprodução em aves**, In: HAFEZ E. S. E. (Ed.), Reprodução Animal. 7ª ed. Manole, São Paulo. p. 207 – 242. 2004.

GADELHA, A. I. B. B., ARAÚJO, M. S., OLIVEIRA, M. F., BATISTA, N. V., SILVA, N. L., RICARTE, A. R. F. Climatic and behavioral factors of rheas (*Rhea americana* Linnaeus, 1758) fed different diets Factores climáticos y de comportamiento de emús (*Rhea americana* Linnaeus, 1758). **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, 2020.

GAMARRA, N. C.; CORREIA, R. A.; BRAGAGNOLO, C.; CAMPOS-SILVA, J. V.; JEPSON, P. R.; LADLE, R. J.; MALHADO, A. C. M. Are protected areas undervalued? An asset-based analysis of Brazilian protected area management plans. **Journal of environmental management**, v. 249, p. 109347, 2019.

GÓES, P. A. A.; CAVALCANTE, A. D. S.; NICHI, M.; PEREZ, E. D. A.; BARNABE, R. C.; BARNABE, V. H. Reproductive characteristics of captive greater rhea (*Rhea americana*) males reared in the state of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 12, n. 1, p. 57 - 62, 2010.

GRAY, J. C. The anatomy of the male genital ducts in the fowl. **Journal of Morphology**, v. 60, n. 2, p. 393-405, 1937.

GRISWOLD, M. D. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 9, n. 4, p. 411–6, 1998.

GUNAWARDANA, V. K.; SCOTT, M. G. A. D. Ultrastructural studies on the differentiation of spermatids in the domestic fowl. **Journal of Anatomy**, v. 124, p. 741 - 755, 1977.

HAFEZ, E. S. E; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. Barueri: Manole, 2004. p.237-257.

HALSE, S. A. Gonadal cycles and levels of luteinizing hormone in wild Spur-winged geese, *Plectropterus gambensis*. **Journal of Zoology**, v. 205, n. 3, p. 335–355, mar. 1985.

HARGROVE, J. L.; MACINDOE, J. H.; ELLIS, L. C. Testicular contractile cells and sperm transport. **Fertility and sterility**, v. 28, n. 11, p. 1146-1157, 1977.

HASENCLEVER, L., REIMAN, C., MOURÃO, G. D. M., CAMPOS, Z. D. S. Densidades, tamanho de grupo e reprodução de emas no pantanal sul. Corumbá: **Embrapa Pantanal, Bol. Pesq. Desenvolvimento**, Mato Grosso do Sul. 2004. 17p.

HESS, R. A.; THURSTON, R. J.; BIELLIER, H. V. Morphology of the epididymal region and ductus deferens of the turkey (*Meleagris gallopavo*). **Journal of anatomy**, v. 122, n. Pt 2, p. 241, 1976.

HODGES, R. D. **The histology of the fowl**. London. Academic Press., 1974. 648p.

HOLLENBACH, J., JUNG, K., NOELKE, J., GASSE, H., PFARRER, C., KOY, M., BREHM, R. Loss of connexin43 in murine Sertoli cells and its effect on blood-testis barrier formation and dynamics. **PLOS ONE**, v. 13, n. 6, p. e0198100, 1 jun. 2018.

HOLSTEIN, A. F.; ROOSEN-RUNGE, E. C. **Atlas of human spermatogenesis**. Grosse Verlag, Berlin. 1981.

HOLSTEIN, A.-F.; WEISS, CH. Über die Wirkung der glatten Muskulatur in der Tunica Albuginea im Hoden des Kaninchens; Messungen des interstitiellen Druckes. **Zeitschrift für Die Gesamte Experimentelle Medizin einschließlich experimentelle Chirurgie**, v. 142, n. 4, p. 334–337, mar. 1967.

ICMBio - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. 2018. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume III - Aves. In: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. (Org.). **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**. Brasília: ICMBio. 709p.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON VETERINARY GROSS ANATOMICAL NOMENCLATURE. **Nomina Anatomica Veterinaria**. 6. ed. Knoxville: World Association of Veterinary Anatomists, 2017. 178 p.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE. IUCN 2018.2. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2018.2. <<http://oldredlist.iucnredlist.org/details/22678073/0>> Acesso em: 14/05/2019.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE. IUCN Red list of threatened species. Disponível em: <<https://www.iucnredlist.org/species/22678073/92754472>>. Acesso em: 14/05/2019.

JEGOU, B. The Sertoli germ cell communication network in mammals. **Int Rev Cytol**, v. 147, p. 25 - 96. 1993.

JEHL, J. R. J.; MURRAY, B. G. J. The evolution of normal and reverse sexual dimorphism in shorebirds and other birds. **Curr. Ornithol.** v. 3, p. 1 – 86. 1986.

JOHNSON, P. A. 2006. **Reprodução de Aves**, p. 691-701. In: REECE, W.O. DUKES, Fisiologia dos Animais Domésticos. 12^a ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.

JONES, R.C.; LIN, M. - Spermatogenesis in birds. **Rev. Reprod. Biol.**, 15: 233-63, 1993.

KAUPP, B. F. Male reproductive organs of birds. **Am. J. Vet. Med**, v. 10, p. 461-4, 1915.

KIDDER, G. M.; CYR, D. G. Roles of connexins in testis development and spermatogenesis. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 50, p. 22–30, fev. 2016.

KIERSZENBAUM, A. L. Mammalian spermatogenesis in vivo and in vitro: a partnership of spermatogenic and somatic cell lineages. **Endocrine Reviews**, v. 15, n. 1, p. 116–134, 1 fev. 1994.

KING, A.S. (1981). Phallus. In **Form and function in birds**: 107–148. King, A. S. & McLelland, J. (Eds). New York: Academic Press.

KING, A.S. (1993). Apparatus urogenitalis. In **Handbook of avian anatomy**: 329–397. BAUMEL, J.J. (Ed.). Cambridge, MA: Publications of the Nuttall Ornithological Club.

KORMANO, M.; HOVATTA, O. Contractility and histochemistry of the myoid cell layer of the rat seminiferous tubules during postnatal development. **Z Anat Entwicklungs**, v. 137, p. 239 – 48. 1972.

LABIMC, Laboratório de Instrumentação, Meteorologia e Climatologia. Universidade Federal Rural do Semiárido. 2020. Disponível em: < <http://siemu.ufersa.edu.br/dashboard> > . Acesso em: 01/03/2023.

LAKE, P. E. The male in reproduction. In: _____. **Physiology and biochemistry of the domestic fowl**. London: Academic, 1971. p. 1411-1447.

LAKE, P. E. The male reproductive tract of the fowl. **Journal of Anatomy**, v.91, p.116-29, 1957.

LAKE, P.E. Male Genital Organs. In: KING, A.S.; McLELLAND, J. **Form and function in birds**. London: Academic Press, 1981. V.2, p.2-37.

LAN, W.; PENG, K. M.; LIU, H.; SONG, H.; WANG, Y.; TANG, L. Histological examination of testicular cell development and apoptosis in the ostrich chick. **Turk J Vet Anim Sci**, v. 35, p. 7 – 14. 2011.

LEBLOND, C. P.; CLERMONT, Y. Spermiogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the “Periodic acid-fuchsin sulfurous acid” technique. **American Journal of Anatomy**, v. 90, p. 167-215, 1952.

LEITE, M. A. S.; CODENOTTI, T. L. Comportamento parental de machos da ema *Rhea americana* (Linnaeus, 1758), em ambiente natural, no Rio Grande do Sul. **Revista de Etologia**, v. 7, n. 1, p. 43-47, 2005.

LI, X.; WANG, Z.; JIANG, Z.; GUO, J.; ZHANG, Y.; LI, C.; CHUNG, J.; FOLMER, J.; LIU, J.; LIAN, Q.; GE, R.; BARRY, R. Z.; GE, R. Regulation of seminiferous tubule associated stem Leydig cells in adult rat testes. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 113, p. 2666 – 71. 2016.

LIN, M.; JONES, R. C. Renewal and proliferation of spermatogonia during spermatogenesis in the Japanese quail, *Coturnix coturnix japonica*. **Cell and tissue research**, v. 267, n. 3, p. 591-601, 1992.

LIN, M.; JONES, R. C. Spatial arrangement of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the Japanese quail, *Coturnix coturnix japonica*. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 90, p. 361-367, 1990.

LIN, M.; JONES, R. C. Spermiogenesis and spermiation in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). **Journal of Anatomy**, v. 183, p. 525 - 535. 1993.

LOVAS, E. M.; FILIPPICH, L. J.; JOHNSTON, S. D. Spermiogenesis in the Australian cockatiel *Nymphicus hollandicus*. **Journal of Morphology**, v. 273, n. 11, p. 1291–1305, 21 jul. 2012.

MADKOUR, F. A.; MOHAMED, A. A. Comparative anatomical studies on the glandular stomach of the rock pigeon (*Columba livia targia*) and the Egyptian laughing dove (*Streptopelia senegalensis aegyptiaca*). **Anat Histol Embryol**, v. 48, p. 53 – 63. 2019.

MARETTA, M.; MARETTOVA, E. Immunohistochemical demonstration of myoid cells in the testis and its excurrent ducts in the domestic fowl. **British poultry science**, v. 45, n. 5, p. 585-589, 2004.

MARINI, M., ROSA, I., GUASTI, D., GACCI, M., SGAMBATI, E., IBBA-MANNESCHI, L., MANETTI, M. Reappraising the microscopic anatomy of human testis: identification of

telocyte networks in the peritubular and intertubular stromal space. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2018.

MARSHALL, A. J. **Biology and comparative physiology of birds**. New York Ed. Academic Press, v. 2, p. 178-332. 1961.

MARTELLA, M. B.; NAVARRO, J. L. Proyecto ñandú. **Manejo de Rhea americana y R. pennata en la Argentina**. In 'Manejo de fauna en Argentina: proyectos de uso sustentable'. (Eds ML Bolkovic, DE Ramadori) pp, p. 39-50, 2006.

MARUCH, S. M. G.; TELES, M. E. O.; RIBEIRO, M. G. - Morphological study of testes of dove *Columbia livia* (GMELIN,1879) Columbidae-Columbiformes. **Rev. Bras. Zool.**, v. 12, p.145-50, 1995.

MARVAN, F. R. Postnatal development of the male genital tract of the *Gallus domesticus*. **Anat Anz**, v. 124, n. 4, p. 443-462, 1969.

MAUGET, R. et al. Plasma LH and Steroid Hormones in King Penguin (*Aptenodytes patagonicus*) during the Onset of the Breeding Cycle. **General and Comparative Endocrinology**, v. 93, n. 1, p. 36-43, jan. 1994.

MEEHAN, T., SCHLATT, S., O'BRYAN, M. K., DE KRETZER, D. M., LOVELAND, K. L. Regulation of Germ Cell and Sertoli Cell Development by Activin, Follistatin, and FSH. **Developmental Biology**, v. 220, n. 2, p. 225-237, abr. 2000.

MELLO, N. H. A ficha do Bicho – Ema, **Globo Rural**, n. 5, p. 56 - 60, 1987.

MENDES, B. V. **Alternativas tecnológicas para a agropecuária do semi-árido**. 2. ed. São Paulo: Nobel, v. 1. 171 p., 1985.

MORAIS, M. R. P. T.; VELHO, A. L. M. C. S.; DANTAS, S. E. S.; FONTENELE-NETO, J.D. Morfofisiologia da reprodução das aves: desenvolvimento embrionário, anatomia e histologia do sistema reprodutor. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 6, n. 3, p. 165-176, 2012.

MORRIS, S. A.; HOWARTH JR., B.; CRIM, J. W.; RODRIGUEZ DE CORDOBA, S.; ESPONDA, P.; BEDFORD, J. M. Specificity of sperm-binding Wolffian duct proteins in the rooster and their persistence on spermatozoa in the female host glands. **Journal of Experimental Zoology**, v. 242, p. 189-198, 1987.

NAGANO, T. Observations on the fine structure of developing spermatid in the domestic chicken. **Journal of Cell Biology**, v. 14, p. 193-205, 1962.

NAVARRO, J. L.; MARTELLA, Mónica B. Reproductivity and raising of Greater Rhea (*Rhea americana*) and Lesser Rhea (*Pterocnemia pennata*)-a review. **Archiv fur Geflugelkunde**, v. 66, n. 3, p. 124-132, 2002.

NICHOLLS, T. J.; GRAHAM, G. P. Observations on the Ultrastructure and Differentiation of Leydig Cells in the Testis of the Japanese Quail (*Coturnix japonica*). **Biology of Reproduction**, v. 6, n. 2, p. 179-192, 1 abr. 1972.

NICKEL, R.; SCHUMMER, A.; SEIFERLE, E. **Anatomy of the domestic birds**, 4 ed. Berlin: Verlag Paul Parey, v.1, p 518. 1977.

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**, v. 31, n. 2, p. 188-195, 2000.

NORA, F. P. M; FRANCO, J. L. A. O conceito de conservação: o caso da onça-pintada no Brasil. **Anais SNCMA**, v. 8, n. 1, 2017.

NOVAES, F. C. Aves – Struthioniformes – Rheidae, **Fauna da Amazônia Brasileira**, Belém, v. 20, p. 1 - 3, 2002.

OLIVEIRA, C. A.; MAHECHA, G. A. B. Morphology of the copulatory apparatus of the spotted tinamou *Nothura maculosa* (Aves: Tinamiformes). **Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger**, v. 182, n. 2, p. 161-169, 2000.

OLIVEIRA, M. F. **Placentação em mocós, *Kerodon rupestris* Wied, 1820**. 2004. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

OLIVEIRA, R. E., ARAÚJO JÚNIOR, H. N., CÂMARA, F. V., OLIVEIRA, F. D., COSTA, H. S., BEZERRA, F. V., OLIVEIRA, M. F. Morfologia da bolsa cloacal de emas, *Rhea americana* Linnaeus, 1758. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p. 1696-1704, 2018.

ORSI, A. M., DOMENICONI, R. F., SIMÕES, K., STEFANINI, M. A., BARALDI-ARTONI, S. M. Variabilidade sazonal no ducto epididimário de codorna doméstica: observações morfológicas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, p. 495-500, 2007.

ORTAVANT, R. – Etude des generations spermatogoniales chez le belier. **C. R. Soc. Biol.**, 148:1958-61, 1954.

ORTH, J. M.; GUNSALUS, G. L.; LAMPERTI, A. A. Evidence From Sertoli Cell-Depleted Rats Indicates That Spermatid Number in Adults Depends on Numbers of Sertoli Cells Produced During Perinatal Development*. **Endocrinology**, v. 122, n. 3, p. 787–794, mar. 1988.

PACHECO, J. F. As aves da Caatinga: uma análise histórica do conhecimento. **Biodiversidade da Caatinga: áreas e ações prioritárias para a conservação**, p. 189-250, 2004.

PARIZZI, R. C., MIGLINO, M. A., MAIA, M. O., SOUZA, J. A., SANTOS, J. M., OLIVEIRA, M. F., SANTOS, T. C. Morphology of the ovary in rhea (*Rhea americana*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 3, p. 89-94, 2007.

PEREIRA, A. V.; ROMANELLI, P. F.; SCRIBONI, A. B.; ORLANDINI, F. P. Rendimentos do abate e composição da carne de ema (*Rhea americana*). **Ciência Tecnologia de Alimentos** v. 26, n. 3, p. 632-638, 2006.

PEREIRA, K. S., MARUCH, S. M. G., RIBEIRO, M. G., TELES, M. E. O. Morfologia do testículo de *Numida meleagris* (Linné,1758) Numididae-Galliformes. **Rev. Bios**, 2, p.19-24, 1994.

RAOUF, S. A.; PARKER, P. G.; KETTERSON, E. D.; NOLAN, V.; ZIEGENFUS, C. **Testosterone affects reproductive success by influencing extra-pair fertilizations in male dark-eyed juncos** (Aves: *Junco hyemalis*). In: REAL SOCIETY OF LONDON, B264., 1994, Londres. Proceedings: Real Society of London, 1994. p. 1599-1603.

RAZI, M., HASANZADEH, S., NAJAFI, G., FEIZI, S., MOSHTAGHI, M., JANBAZ, H., AMIN, M. Histological and anatomical study of the White Rooster: testis, epididymis and ductus deferens. **Iranian Journal of Veterinary Medicine**, v. 4, n. 4, 2010.

ROSENSTRAUCH, A. et al. Leydig Cell Functional Structure and Plasma Androgen Level during the Decline in Fertility in Aging Roosters. **General and Comparative Endocrinology**, v. 109, n. 2, p. 251–258, fev. 1998.

SÁ-FILHO, G. F., DANTAS, M. R., SANTOS, M. M., LIMA, S. P., DANTAS, M. R. T., MACEDO COSTA, L. L. Uma perspectiva comportamental da termorregulação de emas (*Rhea americana*). **Multidisciplinary Reviews**, v. 1, p. e2018001-e2018001, 2018.

SANTOS, T. C., SOUSA, J. A., OLIVEIRA, M. F., SANTOS, J. M., PARIZZI, R. C., MIGLINO, M. A. Morfologia dos órgãos genitais masculinos e da cloaca da ema (*Rhea americana*). **Pesq. Vet. Bras**, v. 31, n. 5, p. 430-440, 2011.

SARASQUETA, D.V. **Cría de Ñandúes**. Capítulo 19 en: Cría de Avestruces, Emúes y Ñandúes. 2ª Edición, Real Escuela de Avicultura, Barcelona España. 1997.

SHARMA, R. K.; BHARDWAJ, J. K.; AHLAWAT, N. Ultrastructural developments during spermiogenesis in goat (*Capra hircus*). **Internl J Integr Biol**, v. 6, p. 112 - 14. 2009.

SHARPE, R. M.; MCKINNELL, C.; KIVLIN, C.; FISHER, J. S. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. **Reproduction**, v. 125, p. 769 – 784. 2003.

SICK, H. **Ornitologia Brasileira**, 2ª Ed. Editora: Universidade de Brasília, Brasília, 916 p. 1997.

SICK, H. **Ornitologia brasileira, uma introdução**. 2ª ed. Editora Universidade de Brasília. v. 1. p. 129-132. Brasília, DF. 1986.

SILVA, J. B. **Rheacultura criação de emas: manual prático nutrição, reprodução, manejo e enfermidades**. Guaíba: Agropecuária, 144 p. 2001.

SIMÕES, K.; ORSI, A. M.; VIEGAS, K. A. S. Ultrastructural characteristics of spermiogenesis in the domestic duck (*Anas platyrhynchos*). **Anatomica Histologica Embryologica**, v. 34, p. 307 - 311. 2005.

SOARES, J. F.; SIQUEIRA, A. L.- **Introdução à Estatística Médica**. Belo Horizonte: Editora UFMG, 1999. 300p.

SPRANDO, R. L.; RUSSELL, L. D. Spermiogenesis in the red-ear turtle (*Pseudemys scripta*) and domestic fowl (*Gallus domesticus*): a study of cytoplasmic events including cell volume changes and cytoplasmic elimination. **Journal of Morphology**, v. 198, p. 95 - 118. 1988.

STEFANINI, M. A.; ORSI, A. M. Características morfológicas da região epididimária do pombo doméstico (*Columba livia*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, n. 2, p. 66-71, 1999.

STURKIE, P. D. Reproducción en el macho. In: STURKIE, P. D. **Fisiología Aviar**, Zaragoza: Acribia, v. 1, p. 411-24, 1967.

SZEKELY, T.; LISLEVAND, T.; FIGUEROLA, J. **Sexual size dimorphism in birds**. In **Sex, size and gender roles: evolutionary studies of sexual size dimorphism** (eds DJ Fairbairn, WU Blanckenhorn, T Szekely), p. 27 – 37. Oxford, UK: Oxford University Press. 2007.

TINGARI, M. D. On the structure of the epididymal region and ductus deferens of the domestic fowl (*Gallus domesticus*), **Journal of Anatomy**, v.109, p.423-35, 1971.

TOLOSA, E. M. C.; RODRIGUES, C. J.; BEHEMER, O. A.; FREITAS-NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2003. 241p.

UBUKA, T.; BENTLEY, G. E. Neuroendocrine control of reproduction in birds. In: **Hormones and reproduction of Vertebrates**. Academic Press, 2011. p. 1-25.

VALDEZ, D. J., CORTEZ, M. V., DELLA COSTA, N. S., LÈCHE, A., HANSEN, C., NAVARRO, J. L., MARTELLA, M. B. Seasonal changes in plasma levels of sex hormones in the Greater Rhea (*Rhea americana*), a South American Ratite with a complex mating system. **PloS one**, v. 9, n. 5, p. e97334, 2014.

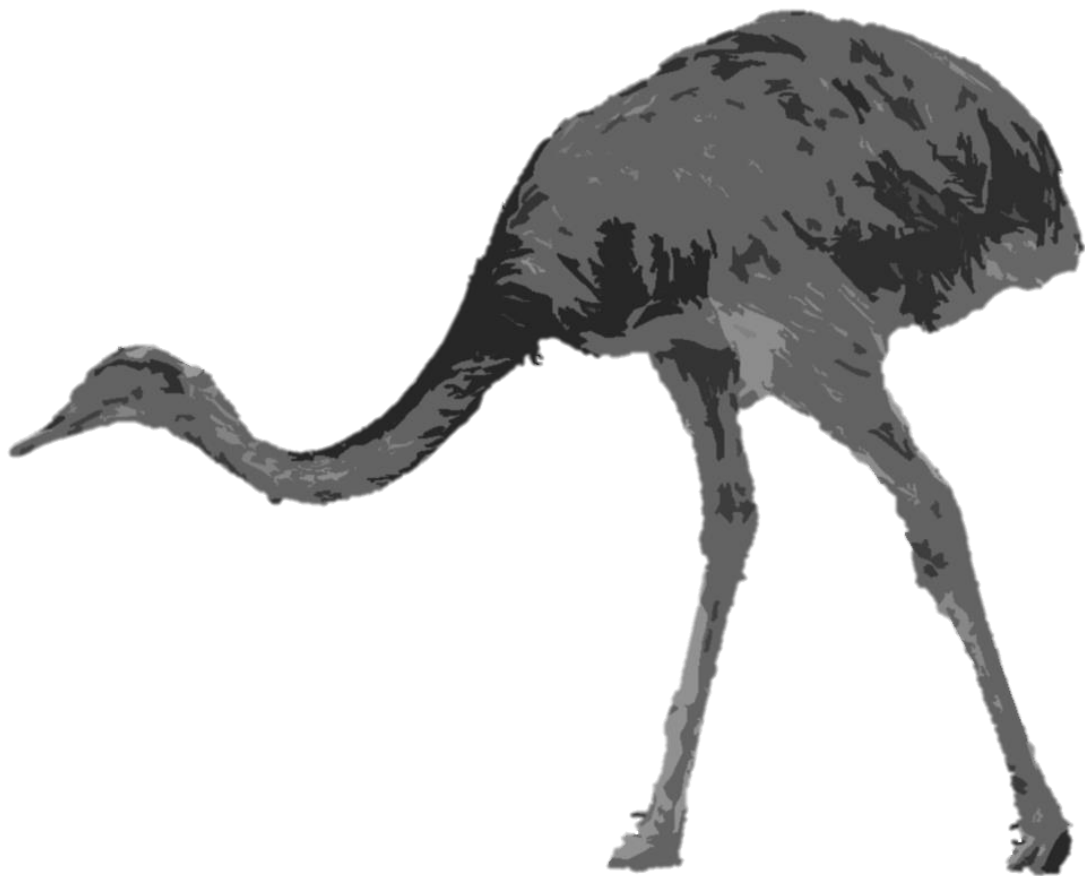
VAN NASSAUW, L.; HARRISON, F.; CALLEBAUT, M. Smooth muscle cells in the peritubular tissue of the quail testis. **Eur J Morph**, v. 31, p. 60 – 64. PMID: 8398561. 1993.

VEIGA, J. P.; CORDERO, J. P.; MINGUEZ, E. Territory size and polygyny in the spotless starling: resource-holding potential or social inertia? **Canadian Journal of Zoology**, v. 79, p. 1951-1956, 2001.

VIZCARRA J, ALAN R, KIRBY J. Reproduction in males. In: SCANES, C.G. **Sturkie's avian physiology**. 6th edition. London: Elsevier, p. 667–693, 2015.

YANG, P., AHMAD, N., HUNAG, Y., ULLAH, S., ZHANG, Q., WAQAS, Y., CHEN, Q. Telocytes: novel interstitial cells present in the testis parenchyma of the Chinese soft-shelled turtle *Pelodiscus sinensis*. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 19, n. 12, p. 2888-2899, 2015.

Capítulo 01 - Morfologia dos Órgãos Genitais Masculinos da Ema (Rhea americana)



Capítulo 01 - Morfologia dos Órgãos Genitais Masculinos da Ema (*Rhea americana*)



Artigo submetido ao periódico **Veterinární Medicína**: ISSN 1805-9392 (On-line)

Qualis quadriênio 2017–2020: **A4**

Manuscript title: Morphology of the male genital organs of the greater rhea (*Rhea americana*)

Abstract: This research aimed to morphologically assess the development of the male genital organs of the *Rhea americana*. Macroscopic dissections and light microscopy analyzes of 18 captive-raised rheas (3, 6, 9, 12, 15, and 18 months old) were performed. The male genital organs of rheas are pairs, symmetrically located on each side of the body midline, inside the celomatic cavity, and consist of two testicles, two epididymides, two vas deferens, and one copulating organ. The testicles are lined with a delicate tunica albuginea, many seminiferous tubules, and scarce intertubular tissue. In the seminiferous epithelium, Sertoli cells, spermatogonia, and spermatids were observed at different stages of testicular differentiation. The vas deferens has a thin wall consisting of the tunica mucosa, tunica muscularis, and tunica adventitia. It extends from the epididymis to the cloaca, where it opens in the urodeo, through the papilla of the vas deferens. In the seminiferous epithelium, Sertoli cells were observed; spermatogonia (A dark, A light 1, A light 2 and B) and spermatids in some stages of differentiation. We conclude that the rheas, even in captivity, in the natural environmental conditions of the caatinga, maintained the development of the reproductive organs, as well as their sexual maturation.

Keywords: Anatomy; Bird; Morphophysiology; Ratites.

INTRODUCTION

The rhea (*Rhea americana*) belongs to the group of ratites, differing from other birds by the absence of keel in the sternum. In Brazil, it inhabits cerrado and caatinga biomes, a kind of daytime and gregarious habit species (Pacheco 2004). In the reproductive season, males present territorialistic and polygamous behavior, also responsible for parenteral care (Cooper

et al. 2009). The commercial creation of rhea is concentrated in meat production. In addition to the economic potential in producing feathers and leather, captive breeding also assists in conserving this animal since its natural habitats are increasingly devastated (Pereira et al. 2006).

Morphological studies help create and maintain wild species in captivity by providing knowledge about sanitary management and contributing clinical-surgical interventions to anatomopathological findings (Oliveira et al. 2018; Pereira et al. 2006). Research involving the reproductive system is fundamental for adopting strategies that optimize reproductive efficiency (Bonato et al. 2015). The literature provides some information about the reproductive system of rheas, such as the description of the female reproductive system (Parizzi et al. 2007), the morphology of the male genital organs (Santos et al. 2011), and spermatogenesis (Freneau et al. 2016). However, little is known about the reproductive morphological chronology, such as the spermatogenic process.

Thus, considering its economic and scientific importance, this study aims to describe the macroscopic and microscopic anatomy of the male reproductive organs of the rhea aged three to eighteen months, which may enable actions for the development of breeders for commercial purposes since this knowledge may provide interest for zootechnical purposes.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Eighteen animals were used in this research, three animals for each age, starting at 03, 06, 09, 12, 15, and 18 months of age, from the Center for the Multiplication of Wild Animals (CEMAS) of the Federal Rural University of the Semi-Arid Region (UFERSA), registered by the Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA) as a scientific breeding site under number 1478912. All animals were submitted to the anesthetic protocol recommended by Oliveira et al. (2018), adapting whenever necessary, and the absence of heartbeat confirmed the death. The experimental protocol was previously submitted to the Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (ICMBio – No. 73638-1) and the Ethics Committee on Animal Use (CEUA - opinion 30/2020) of the Federal Rural University of the Semi-arid Region (UFERSA) for approval.

Macroscopy

In dorsal decubitus, the animals were incised in the median plane in the craniocaudal direction from the caudal end of the keel to the cloaca. After access to the celomatic cavity, the organs of the digestive tract were lateralized to expose the reproductive system. Being analyzed with the naked eye (*in situ*) and with the aid of a stereomicroscopic magnifying glass (Zeiss, DVA model)¹ in the *ex-situ* analyses and were subsequently documented (Sony DSC-W570 16.1 MP digital camera)² and described regarding their external morphological characteristics.

The structures were analyzed for shape, color, position, and syntopy and then measured with the aid of a digital caliper (Mitutoyo, model 500-147-10)³ obtaining the length (axis from the cranial to the caudal pole) and width (axis from the lateral to the medial margin). After measurement, each structure was weighed with an analytical scale (AL200C, Marte, Brazil)⁴.

Notably, the macroscopic structures identified were named based on *Handbook Of Avian Anatomy: Nomina Anatomica Avium* (1993) and *Nomina Anatomica Veterinaria* (2017), and the results were compared with the literature regarding studies with domestic and wild birds.

Microscopy

Fragments were collected, measuring 0.5 cm, and fixed in 10% formaldehyde buffered with 0.1 M PBS, at pH 7.4, for histological analysis. After fixation, the fragments were dehydrated in increasing alcohol concentrations and diaphanized in xylol, for inclusion in paraffin. They were sectioned into 5 µm and impregnated on histological slides, subsequently stained by the hematoxylin and eosin (HE) technique, as described by Tolosa et al. (2003), and analyzed under a light microscope of Leica DM4000⁵.

RESULTS

Macroscopic Aspects

The male genital organs of the rhea (Figure 1) are located next to the median line, inside the celomatic cavity, consisting of two testicles, two epididymides, two vas deferens, and a copulating organ called phallus. The testicles (1B) are elongated, having two poles (cranial and caudal) and two margins (concave medial and convex lateral), giving them the shape of a bean.

Topographically, they are located ventrally to the kidneys, medially to the vena cava, and occupy mid-cranial positions to the adrenal glands and, specifically in cubs, the right testicle is adhered to the wall of the vena cava, more cranial than the left testicle, which in turn is slightly larger than the right testicle (Figure 3B). Regarding the color, *in situ*, in the animals outside the reproductive period, that is, at 3 to 15 months of age, the testicle had a pink or brownish color (Figure 2) and, in the 18-month-old animals in sexual activity, they showed white to slightly pale coloration (Figure 3 and Figure 4).

When analyzing the epididymis of animals at 3, 6, and 9 months, this organ was poorly developed, making it difficult to identify both *in situ* and *ex-situ*. Nevertheless, in animals aged 12, 15, and 18 months, we found that they were elongated and fusiform, smaller than the testicles, and inserted in the medial dorsal margin of these animals. At their cranial end, they made syntopy with the adrenal gland and dorsally with the caudal vena cava. In its caudal portion, the vas deferens emerged, which went towards the cloaca.

The vas deferens originated as a continuation of the epididymal duct, is a rectilinear tube in its initial path, becoming convoluted along its path, presents the cranial, middle, and caudal segments, whose exact anatomical limits, however, cannot be distinguished, although it can be stated that this segmentation is associated with variations in its thickness. Off-white in color, it crosses the ventromedial surface of the kidney and extends craniocaudally and parallel to the midline of the dorsal wall. Initially, the vas deferens occupies a medial position to the ureter, crossing it ventrally at the level of the caudal portion of the kidney, when it then becomes lateral to the ureter and, from there, a sheath of connective tissue surrounds both, traveling together the same path until they enter the cloaca, through different openings.

In the dorsal wall of the cloaca, the vas deferens dilates, forming the receptacle of the vas deferens and opens in the middle cloacal compartment, the urodeo, through a conical papilla, called the papilla of the duct deferens.

Finally, the phallus, a copulatory organ, presents as a lymphatic fibrous organ located in the ventral wall, on the floor of the cloaca, in the region of the proctodeo. This corresponds to a structure with a slightly elongated flaccid aspect at its most apical portion and an enlarged and evidently rigid root at its most basal portion, revealing its intromittent capacity together.

Histological Aspects

The results of the analyses of the cellular structure of the seminiferous tubules demonstrated different phases of the epithelium cycle at 3 months, 6 months, 9 months, 12

months, 15 months and 18 months old through the analysis of the cranial (Figure 5), medial (Figure 6), and caudal sections (Figure 7). Interstitial testicular tissue is observed among the seminiferous tubules, consisting of loose, well-vascularized connective tissue rich in interstitial (or Leydig) cells. They occupy most of the testicle and are anastomosed, forming a branched network. The epithelium of the seminiferous tubules consists of support (Sertoli) cells (Figures 5C, 6C, and 6D). Sertoli cells, whose cytoplasmic projections could not be visualized under light microscopy, exhibit nuclei close to the basement membrane or between the first cell layers of the seminiferous epithelium.

In mature and active birds (18 months), the seminiferous tubule contains a stratified epithelium comprising germ cells in various meiotic division and morphogenesis stages. The second and final meiotic division of the secondary spermatocyte gives rise to haploid germ cells, the round spermatids. Differentiation of spermatids can be observed at various levels within the epithelium, depending on their phase in spermiogenesis. In the seminiferous tubules, the existence of different cell associations in the same section was noticeable, demonstrating that there are many phases of the seminiferous epithelium cycle in a sectorial manner. This characterizes a helical arrangement of the possible stages of the seminiferous epithelium cycle. They appear as a compact network and a structure without the formation of testicular septa in animals from 3 to 15 months, with no round or elongated spermatids or spermatozoa, indicating that the spermatogenesis process had not yet begun.

The epithelium of the seminiferous tubules exhibited several cell types during the visible spermatogenic process (Figure 8), including spermatogonia throughout the basal expansion of the tubules. However, none of these cells found were in the anaphase stage. It is possible to observe the following cells: spermatogonia A dark (Ae), A light 1 (Ac1), A light 2 (Ac2), and B; primary zygote spermatocytes, in addition to spermatids (Figure 8), in differentiation steps, located closer to the tubular light.

Spermatogonia Ae, with a spherical or slightly ovoid nucleus, with loose and uniformly dispersed chromatin, presents a fragmented appearance, which justifies its moderate basophilia. The nucleolus is eccentric and quite evident in most cells (8A). On the other hand, Spermatogonia Ac1 (Figure 8B) presents a spherical nucleus, exhibiting chromatin lumps dispersed in the nucleoplasm and lumps arranged peripherally in a region corresponding to the nuclear envelope. The nucleolus is evident and slightly eccentric. Spermatogonia Ac2 (Figure 8C) has a spherical nucleus, weakly basophilic, with chromatin dispersed in the nucleoplasm and peripheral heterochromatin. In this cell, several nucleoli are observed, small and eccentric, showing the basophilic area between them.

Spermatogonia B (Figure 8D), cells with an oval or spherical nucleus, weakly basophilic, with chromatin in coarse lumps, located mainly in the region of the nuclear envelope. Although scarce, coarse lumps scattered in the nucleoplasm mask the visualization of the nucleolus. Primary spermatocytes (Figure 8E), with cells apparently larger than spermatogonia and reaching different phases, are distinguished by the morphological aspect of the nucleus. It is possible to observe the zygotene, where the chromosomes are more basophilic than those observed in the leptotene phase. Also, at this stage, the chromosomes are arranged in compact masses and displaced to one side of the nucleus, giving a semilunar aspect to the set.

The cells of the spermatogenic lineage are arranged in layers during spermiogenesis, surrounded by a thin layer of interstitial tissue that surrounds the seminiferous tubules, in which elongated myoid cells (9A) are visualized, adhered to the basal lamina, presenting characteristics of smooth muscle cells. According to the literature, 13 stages of spermatid differentiation are described in the process of spermiogenesis based on nuclear morphology and the development of the acrosomal system (preacrosomal granules and acrosomal granules).

The spermatid in step 10 of spermiogenesis (Figure 9B), presented by the elongated nucleus exhibiting slight sinuosity, is apparently larger and thinner than in the previous step. Chromatin, although granular, is more basophilic. From this step, the acrosomic granule is not evident. The spermatid in step 12 of spermiogenesis (Figure 9C) had the most elongated and rectilinear nucleus compared to the previous step, with strongly granular, intensely basophilic chromatin. And in step 13 (Figure 9D), the nucleus is cylindrical, thinner, and intensely basophilic, close to the lumen of the seminiferous epithelium. In this step, the acromionic granule cannot be visualized.

DISCUSSION

When we analyze the fresh color of the testicles, in adult animals, in sexual activity, they present white color. In contrast, in young animals, outside the reproductive period, the testicles present pink or brown coloration. Lake (1957) reports that the color of the testicle can vary according to its sexual phase. During the sexually active period, it is usually whitish, but outside the reproductive season, it reduces its size, and its color is modified to appear light brown. This color change is primarily due to a decrease in the pressure of the spermatic mass on the tubules and, consequently, on the testicular walls. Furthermore, it is also associated with the absence of spermatic mass inside the lumen of the tubules, which is naturally a white mass.

According to the literature, the genitals of birds in general (Bakst, 1993) or, specifically in rooster (Budras and Sauer, 1975), quail (Fitzgerald 1969), fringillidae (Bailey 1953), pigeon (Maruch et al. 1995), columbina (Maruch et al. 1991), and helmeted guineafowl (Pereira et al. 1994), indicate the existence of a pattern of morphological organization in birds, differing in some aspects from the pattern described for mammals. The most striking difference is the location of the genitals, which, in birds, including the *Rhea americana*, are located inside the celomatic cavity, unlike what occurs in mammals, where the testicles and epididymis are located in the scrotum. Another aspect to consider is the absence of a typical penis similar to that of mammals not previously observed in birds. However, they have a corresponding copulating organ called the phallus (Hafez and Hafez 2004) or cloacal penis (Vantyne and Berger, 1976). Also, it can be highlighted as a difference between birds and mammals the fact that the distance to be covered by the spermatic mass from its storage in the epididymis until its elimination is considerably greater given the position of the testicles relative to the cloaca, keeping the proper proportions of size between the different species.

The testicular parenchyma of the rhea is composed of seminiferous tubules that, in cross-sections, have almost circular shapes, different from what is observed in the domestic rooster (Lake 1971) and the quail (Artoni et al. 1999), which have hexagonal shapes, and similar to that of the Australian Emu (*Dromaius novaehollandiae*), which also has circular shapes (Malecki et al. 1998).

In the cranial, medial, and caudal region of the testicle of rhea, within the testicles, between the seminiferous tubules, the interstitial testicular tissue, consisting of loose, well-vascularized connective tissue, rich in interstitial (or Leydig) cells, and the seminiferous tubules occupy most of the testicle and are anastomosed, forming a branched network. Sertoli cells, exhibit nuclei close to the basement membrane or between the first cell layers of the seminiferous epithelium. Its cytoplasm showed faint color that was more noticeable in the nucleus with the nucleolus, as was also mentioned for the Chicken by other researchers (França et al. 1998).

The interstitial tissue of *Rhea americana* is formed by two main components: the thin layer composed of elongated myoid cells surrounding the seminiferous tubules delimiting it. The second consists of collagen fibers between the tubules and forming areas of adjacent angles. In the latter, the presence of blood vessels and Leydig cells of narrow and columnar aspect, fibroblasts, and reticuloendothelial cells are also noted.

Observing histological sections of seminiferous tubules obtained from samples of the testicles of rhea, it was possible to observe the existence of different cell associations in the

same section, demonstrating that there are many phases of the seminiferous epithelium cycle in a sectorial manner, especially in animals aged 15 and 18 months. The report that cellular associations of the seminiferous epithelial cycle were observed in single sections of the seminiferous tubules of *Rhea americana* coincided with what was reported in the domestic rooster (Sick 1997) and the domestic duck (Marchand 1977).

The histological organization of the *Rhea americana* testicle is similar to that described for birds by Maruch et al. (1995). It presents connective tissue capsule, testicular parenchyma rich in seminiferous tubules, and scarce interstitial stroma. The testicular capsule also called tunica albuginea is membranous and thin, of connective nature, such as in rooster (Lake 1971), quail (Fitzgerald 1969), birds in general (Jones and Lin 1993), Columbina (Maruch et al. 1991), helmeted guineafowl (Pereira et al. 1994), and pigeon (Maruch et al. 1995).

The seminiferous tubules of *Rhea americana* have histological aspect similar to that described in other birds (Artoni et al. 1999) and present surrounding peritubular tissue, represented by the tunica propria, connective tissue with myoid cells and seminiferous epithelium formed by germ cells and support (or Sertoli) cells. In photomicrographs, the epithelium exhibited several cell types during the visible spermatogenic process, spermatogonia throughout the basal expansion of the tubules. However, none of these cells found were in the anaphase stage. This stage is known to occur rapidly (Ortavant 1954) in both birds and mammals.

CONCLUSION

From the results of this research, it can be concluded that the male genital organs are made up of paired organs of testicles, epididymis, vas deferens, and a copulating organ, the phallus. The testicles have delicate tunica albuginea, rich in seminiferous tubules and scarce intertubular tissue. In the seminiferous epithelium, Sertoli cells were observed; spermatogonia (A dark, A light 1, A light 2, and B) and spermatids in some stages of differentiation. The morphological differences between the three segments of the vas deferens are practically restricted to the presence of folds in the cranial and caudal segments and to the thickness of the tunica muscularis, which is thicker in the caudal segment. The phallus is intrusive and quite developed. Therefore, we conclude that the specimens studied, even in captivity, in the natural environmental conditions of the caatinga, maintained the development of the reproductive organs, as well as their sexual maturation.

Manufacturers

¹Zeiss. São Paulo, SP, Brazil.

²Sony. São Paulo, SP, Brazil.

³Mitutoyo. Curitiba, PR, Brazil.

⁴Marte Científica. São Paulo, SP, Brazil.

⁵Leica Microsystems. Wetzlar, Germany.

Ethical approval. The research was approved by the Ethics Committee Use of Animals of the Federal Rural University of the Semi-Arid Region (UFERSA) with No. 30/2020, as well as the use of wild animals also requires authorization from the Chico Mendes Institute for Biodiversity (SISBIO-ICMBio) with No. 73638-1.

References

- Artori SB, Orsi AM, Carvalho TLL, Vicentini CA, Stefanini MA. Seasonal morphology of the domestic quail (*Coturnix coturnix japonica*) testis. *Anat Histol Embryol*. 1999;28(4):217-220.
- Bailey RE. Accessory reproductive organs of male fringillid birds: seasonal variations and response to various sex hormones. *Anat Rec*. 1953;115(1):1-19.
- Bakst MR. The anatomy of reproduction in birds, with emphasis on poultry. In: Etchers RJ, Gibbins AMV. Ed. *Manipulation of the avian genome*. Boca Raton: CRC Press; 1993:15-28.
- Bonato DV, Tair AAR, Tironi SMT, Ribeiro IP, Cunha MS, Borges LPB, Schmitt TM, Santos WJD, Sznicer GPP, Vrisman DP, Pereira LF, Teixeira PPM. [Morphometric study of the reproductive system on vacation in the region of Guarapuava-PR]. *Investing*. 2015; 14(1):23-25. Portuguese.
- Budras KD, Sauer T. Morphology of the epididymis of the cock (*Gallus domesticus*) and its effect upon the steroid sex hormone synthesis. I Ontogenesis, morphology and distribution of the epididymis. *Anat Embryol*. 1975;148(2):175-96.
- Cooper RG, Mahrose KM, Horbańczuk JO, Villegas-Vizcaino R, Sebei SK, Mohammed AF. The wild ostrich (*Struthio camelus*): a review. *Trop Anim Health Prod*. 2009; 41(8):1669-1678.
- Fitzgerald TC. *The Coturnix quail anatomy and histology*. Ames: The Iowa State University Press. 1969; 253-60.
- França LR, Ogawa T, Avarbock MR, Brinster RL, Russell LD. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in therat. *Biol Reprod*. 1998;59(6):1371-1377.

Freneau GE, Carvalho SFM, Saboia-Morais SMT, Freneau BN. [Aspects of spermatogenesis and microscopic testicular morphology in Greater Rhea, *Rhea americana* (Linnaeus, 1758)]. Pesq Vet Bras. 2016; 36(10):1045-1052. Portuguese.

Hafez ESE, Hafez B. *Reprodução animal*. 7. ed. Barueri: Manole. 2004. p. 237-257.

International Committee on Veterinary Embryological Nomenclature. Nomina histologica veterinaria. NAV (World Association of Veterinary Anatomists). 2017; 178. Available in: <www.wava-amav.org>

Jones RC, Lin M. Spermatogenesis in birds. Oxf Rev Reprod Biol. 1993;15:233-63.

Lake PE. The male reproductive tract of the fowl. J Anat. 1957; 91(1):116-29.

Lake PE. The male in reproduction. In: Physiology and biochemistry of the domestic fowl. London: Academic. 1971; p. 1411-47.

Malecki IA, Martin GB, O'Malley PJ, Meyer GT, Talbot RT, Sharp PJ. Endocrine and testicular changes in a short-day seasonally breeding bird, the emu (*Dromaius novaehollandiae*), in southwestern Australia. Anim Reprod Sci. 1998;53(1-4):143-155.

Marchand CR. [Ultrastructural study of Muscovy Duck spermatogenesis (*Cairina moschata* L., Oiseau anatidé)]. Cell Tissue Res. 1977;217(29):193-201. French.

Maruch SMG, Teles MEO, Ribeiro MG. [Morphological study of the testis of the turtle dove *Columbina talpacoti* (Temminck, 1811). Columbidae, Columbiforme]. Braz J Morphol Sci. 1991;8:72-76. Portuguese.

Maruch SMG, Teles MEO, Ribeiro MG. [Morphological study of testes of dove *Columbia livia* (Gmelin, 1879) Columbidae-Columbiformes]. Rev Bras Zool. 1995;(12):145-150. Portuguese.

Oliveira REM, Araújo Júnior HN, Câmara FV, Oliveira FD, Costa HS, Bezerra FV, Moura CEB, Oliveira MF. [Morphology of the cloacal bursa of Greater Rhea, *Rhea americana americana* Linnaeus, 1758]. Pesq Vet Bras. 2018;(38):1696-1704. Portuguese.

Ortavant R. [Study of spermatogonia generations in lebelier]. C. R. Seances Soc. Biol. Fil. 1954;148:1958-1961. French.

Pacheco JF. [The birds of the Caatinga: a historical analysis of knowledge]. Biodiversity of the Caatinga: priority areas and actions for conservation. 2004; 189-250. Portuguese.

Parizzi RC, Miglino MA, Maia MO, Souza JA, Santos JM, Oliveira MF, Santos TC. [Morphology of the ovary in Greater Rhea (*Rhea americana*)]. Pesq Vet Bras. 2007;27(3):89-94. Portuguese.

Pereira AV, Romanelli PF, Scriboni AB, Orlandini FP. [Slaughter yields and beef composition in Greater Rhea (*Rhea americana*)]. Ciênc Tecnol Aliment. 2006;6(3): 632-638. Portuguese.

Pereira KS, Maruch SMG, Ribeiro MG, Teles MEO. [Morphology of the testis *Numida meleagris* (Linné, 1758) Numididae-Galliformes]. Rev Bios. 1994; 1(2):19-24. Portuguese.

Santos TC, Sousa JA, Oliveira MF, Santos JM, Parizzi RC, Miglino MA. [Morphology of the male genital organs and the cloaca in Greater Rhea (*Rhea americana americana*)]. Pesq Vet Bras. 2011;31(5):430-440. Portuguese.

Sick H. *Ornitologia Brasileira*, 2ª Ed. Editora: Universidade de Brasília, Brasília, 1997. p.916.

Tolosa EMC., Rodrigues CJ, Behemer AO; Freitas-Neto AG. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. 2. ed. São Paulo: Manole; 2003. p. 241.

Vantyne J, Berger AJ. Fundamentals of ornithology. 2. ed. New York: John Wiley & Sons. 1976. p. 808.

Figures

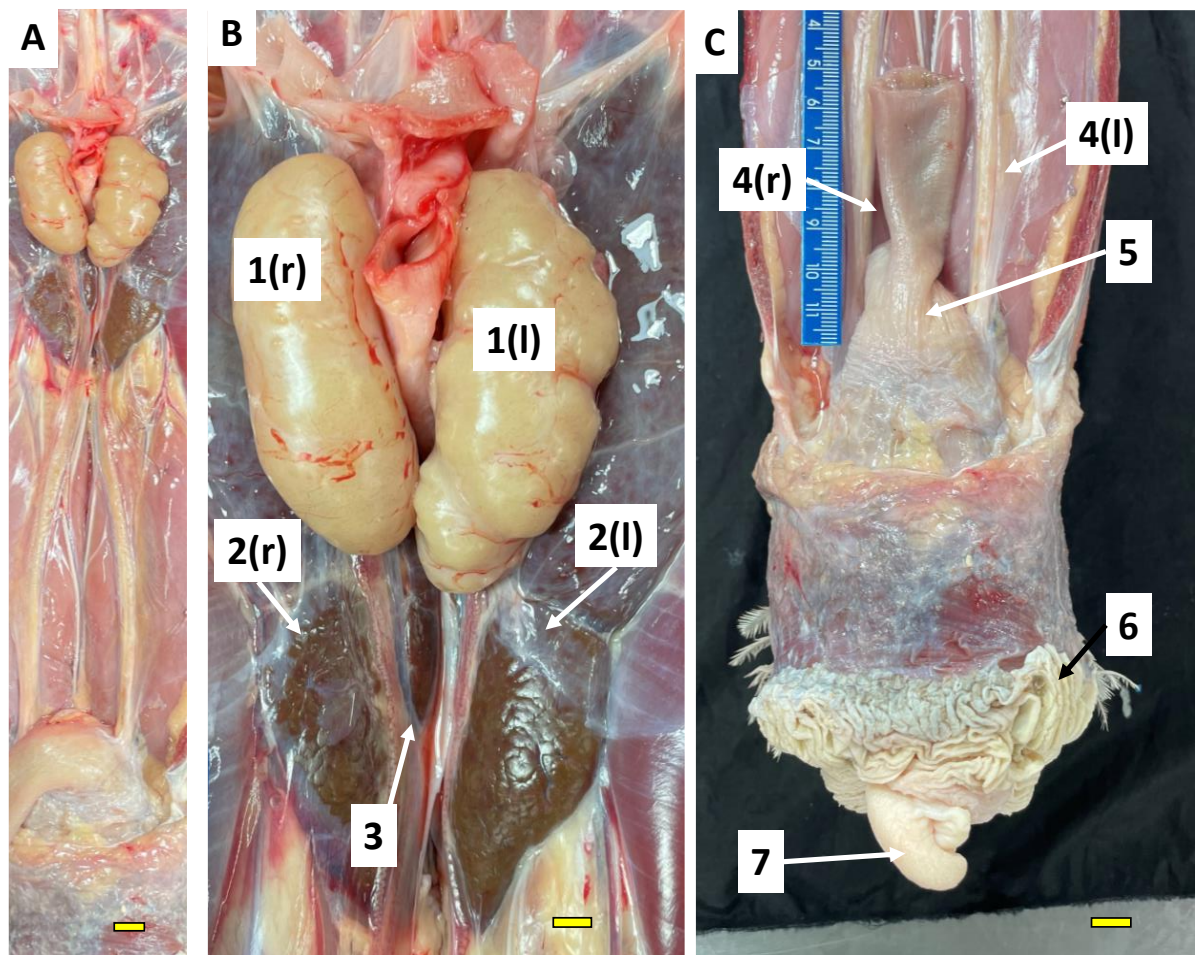


Figure 1. Overview of the male reproductive system of desiccated adult *Rhea americana* (A). B: ventral view of the testicles (1), kidneys (2) and vena cava (3). C: ventral view of the vas deferens (4), base of the phallus (5), cloaca (6) and phallus (7). Scale bar = 1 cm.

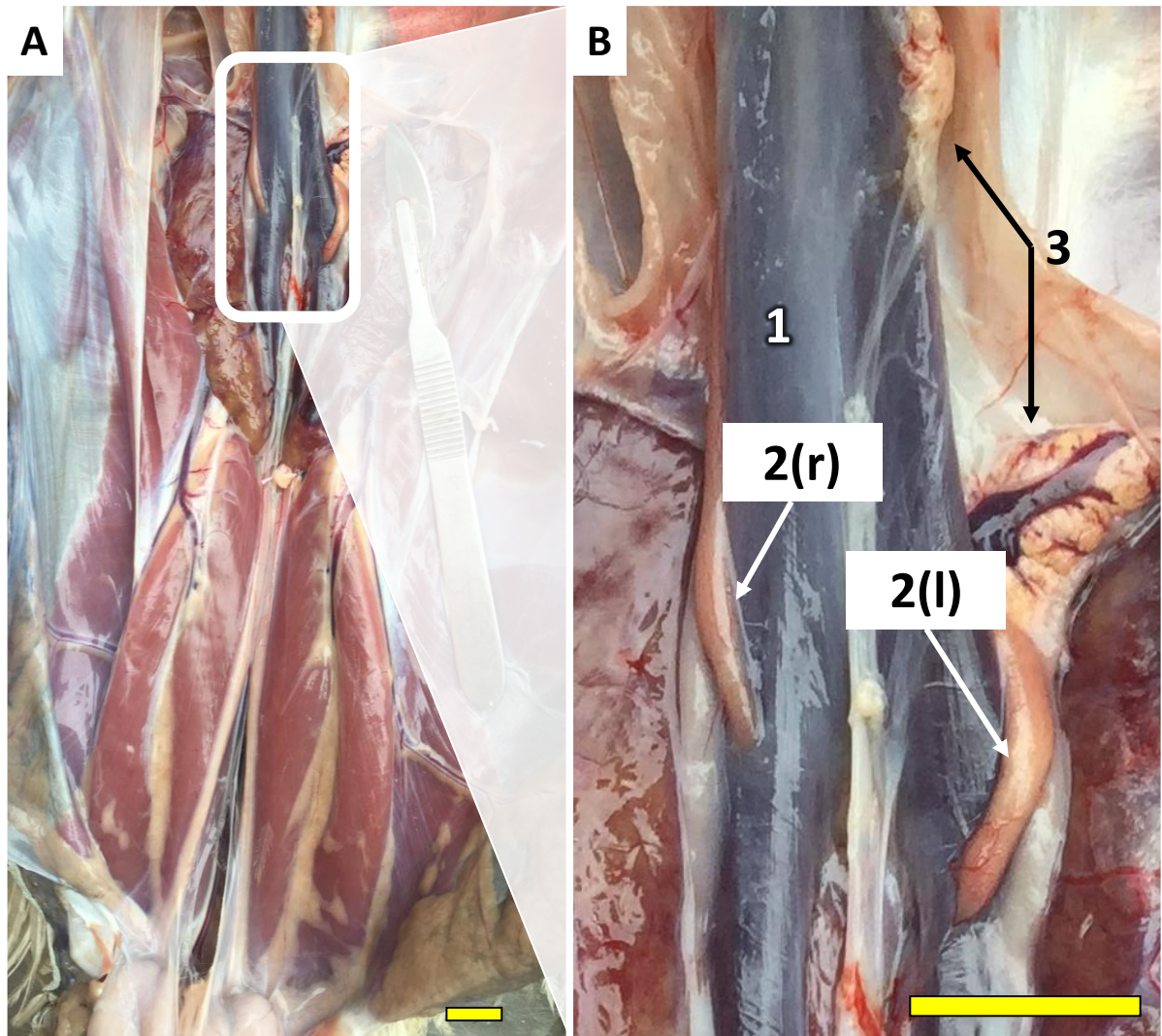


Figure 2. Image of the ventral view of the reproductive organs of young *Rhea americana* (6 months) in the celomatic cavity after dissection. A: general aspect. B: approximate visualization of the vena cava (1), testicles (2) and adrenal glands (3). Scale bar = 1 cm.

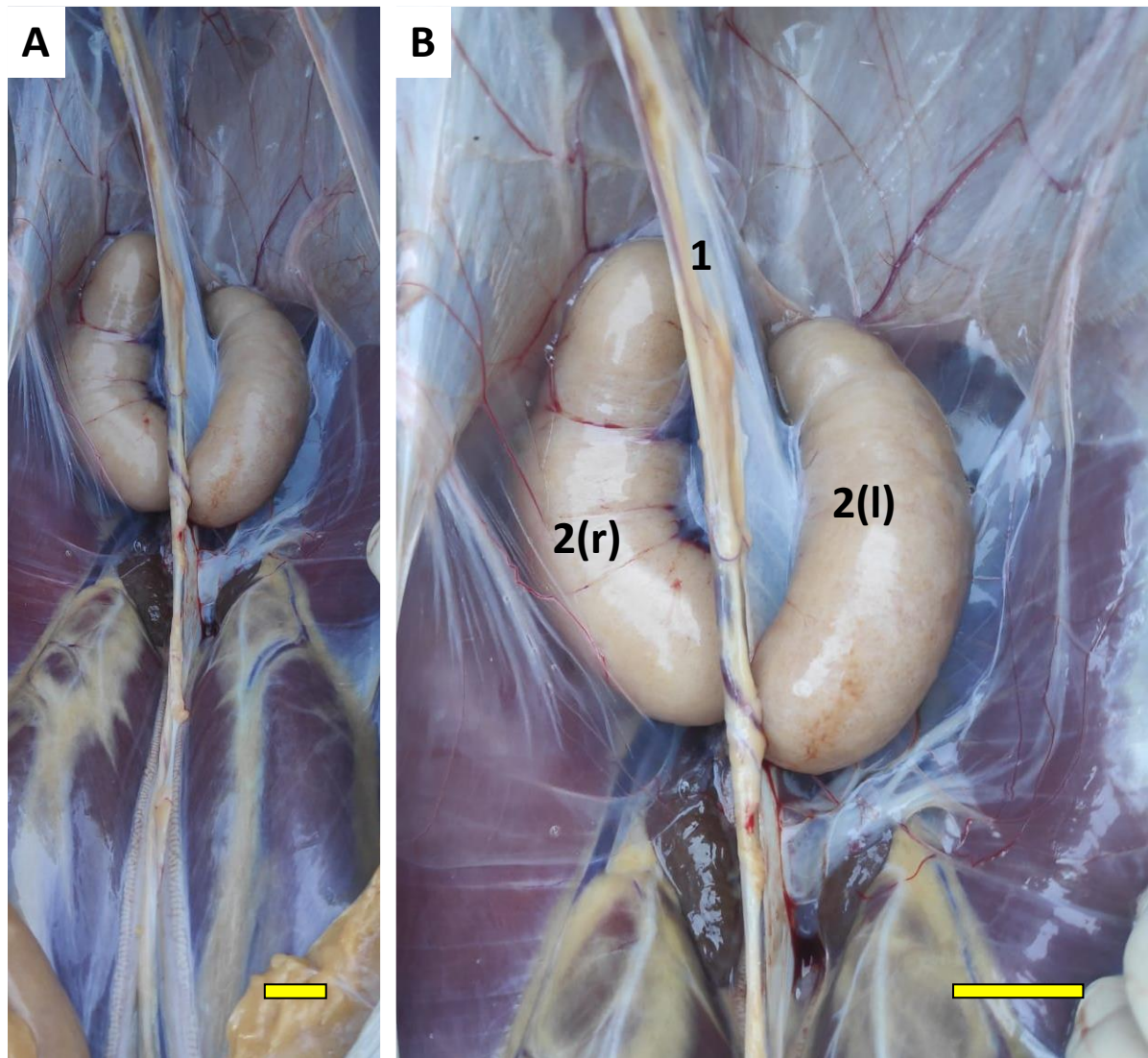


Figure 3. Ventral view of the male reproductive organs of rhea in the celomatic cavity, *in situ*, of the 18-month-old *Rhea americana*. Note the position of the vena cava (1) and its relationship to the testicle (2). A: general aspect. B: approximate visualization of the vena cava (1) and testicles (2). Scale bar = 1 cm.

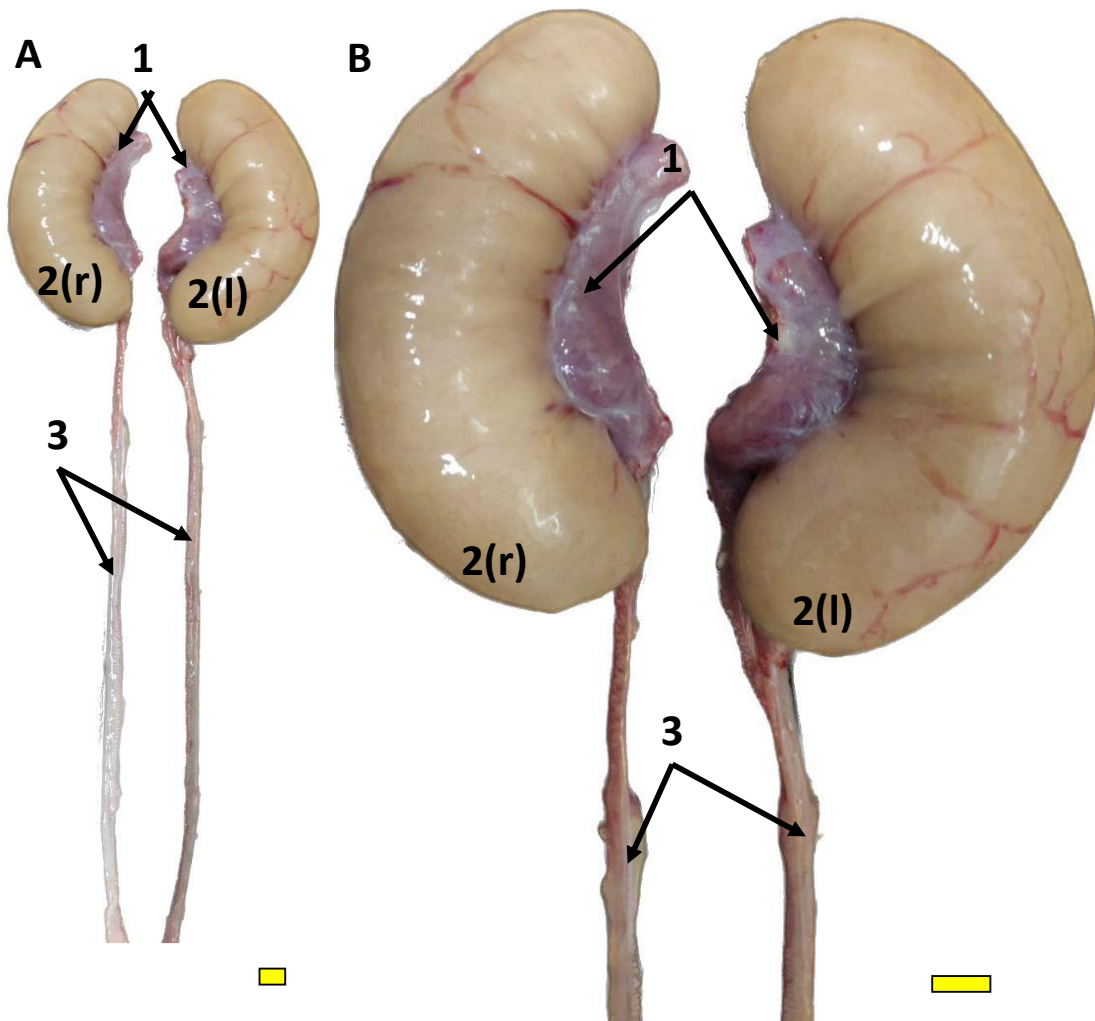


Figure 4. General appearance of *Rhea americana* testicles 18 months after dissection. 1: epididymis; 2: testicles; 3: folded vas deferens. Scale bar = 1 cm.

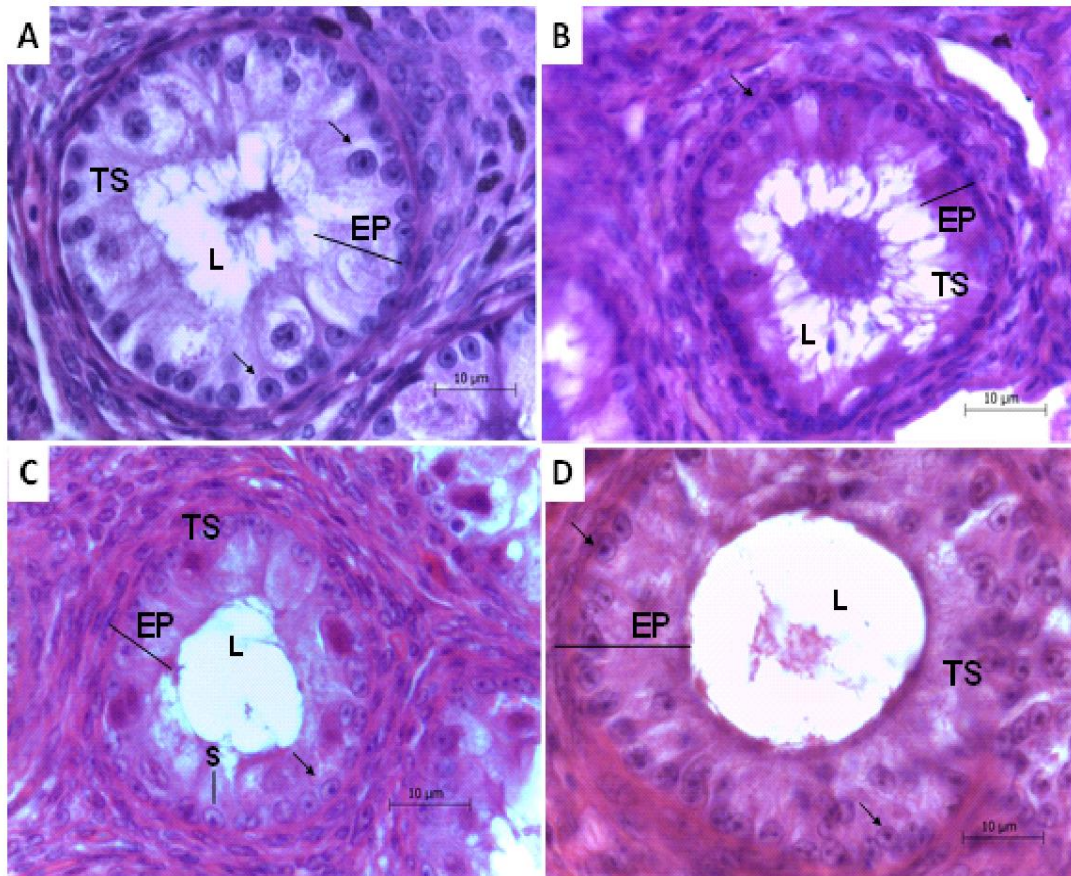


Figure 5. Section photomicrograph of the cranial region of the testicle of *Rhea americana* at 6 (A), 9 (B), 12 (C), and 15 (D) months old. Seminiferous tubules (TS); tubular lumen (L); seminiferous tubules showing the seminiferous epithelium (EP); arrows indicate the germ cells; Sertoli cells (S). Scale bar = 10 μ m.

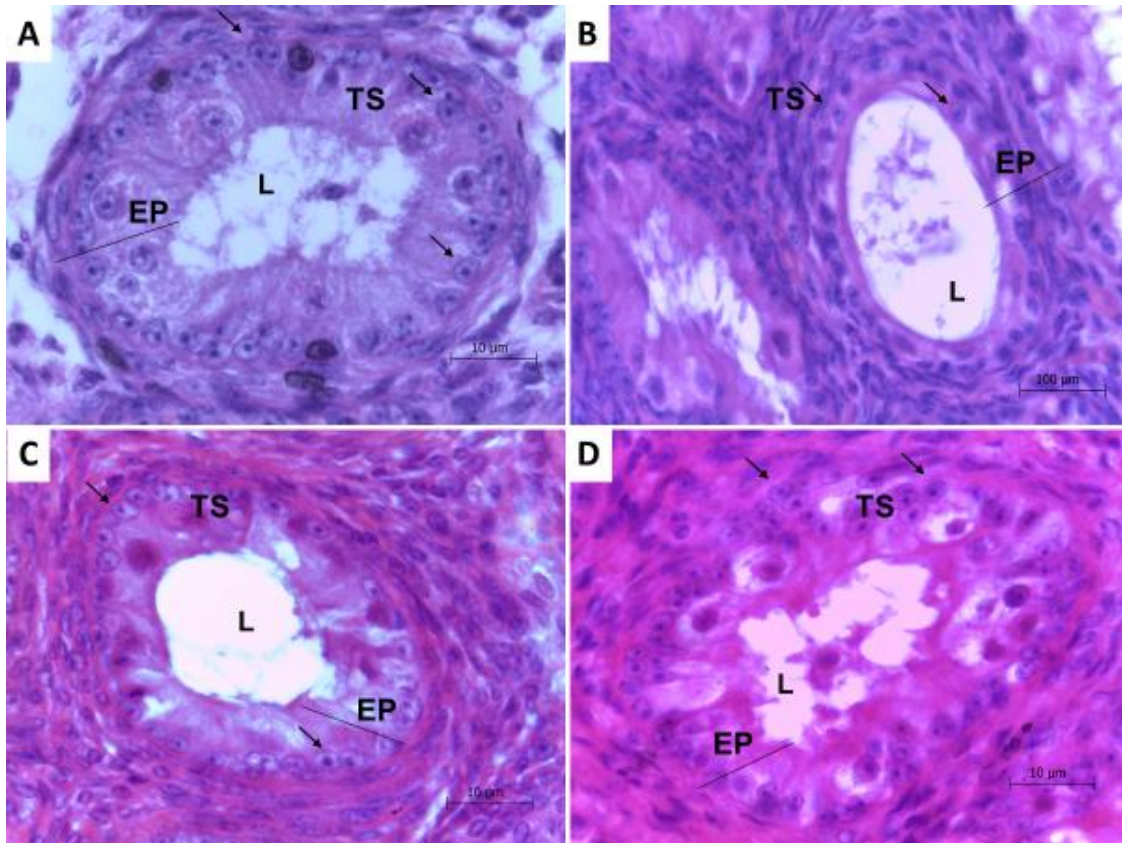


Figure 6. Section photomicrograph of the medial region of the testicle of *Rhea americana* at 6 (A), 9 (B), 12 (C), and 15 (D) months old. Seminiferous tubules (TS); tubular lumen (L); seminiferous tubules showing the seminiferous epithelium (EP); arrows indicate the germ cells. Scale bar = 10 µm.

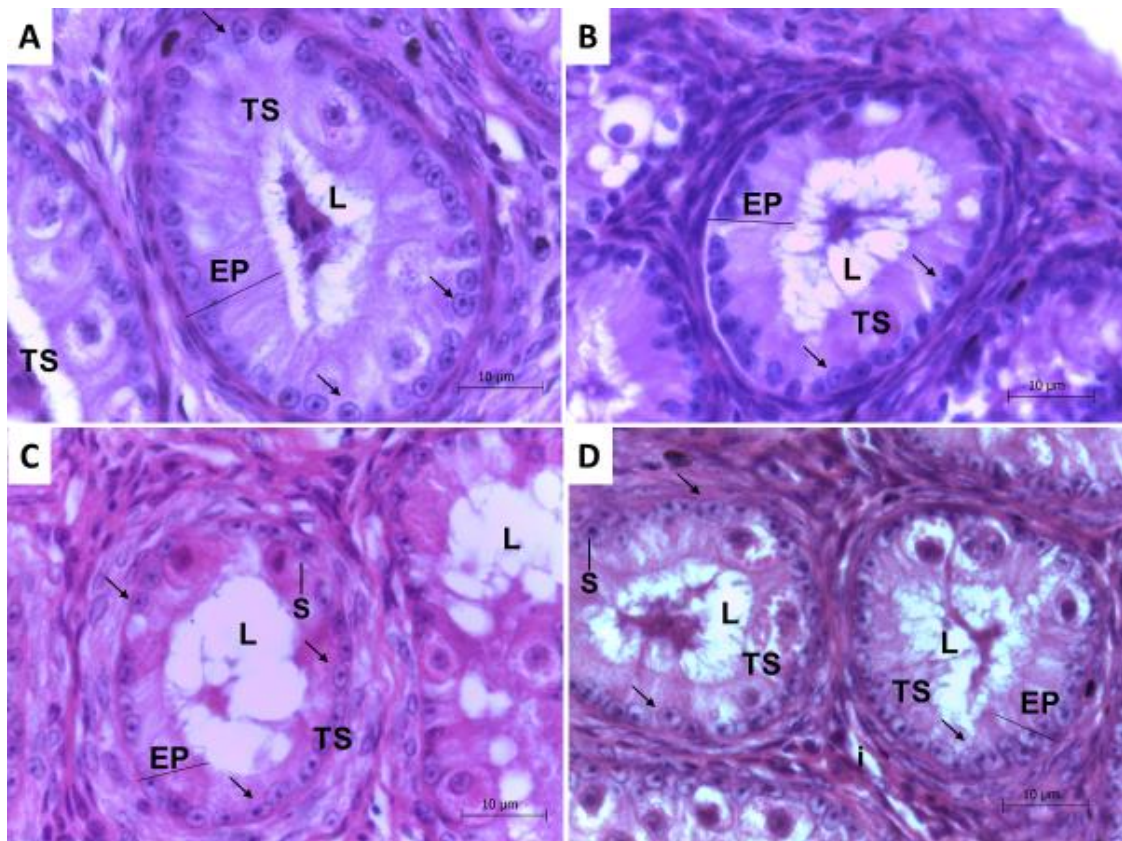


Figure 7. Section photomicrograph of the caudal region of the testicle of *Rhea americana* at 6 (A), 9 (B), 12 (C), and 15 (D) months old. Seminiferous tubules (TS); tubular lumen (L); seminiferous tubules showing the seminiferous epithelium (EP); arrows indicate the germ cells; Sertoli cells (S). Scale bar = 10 μ m.

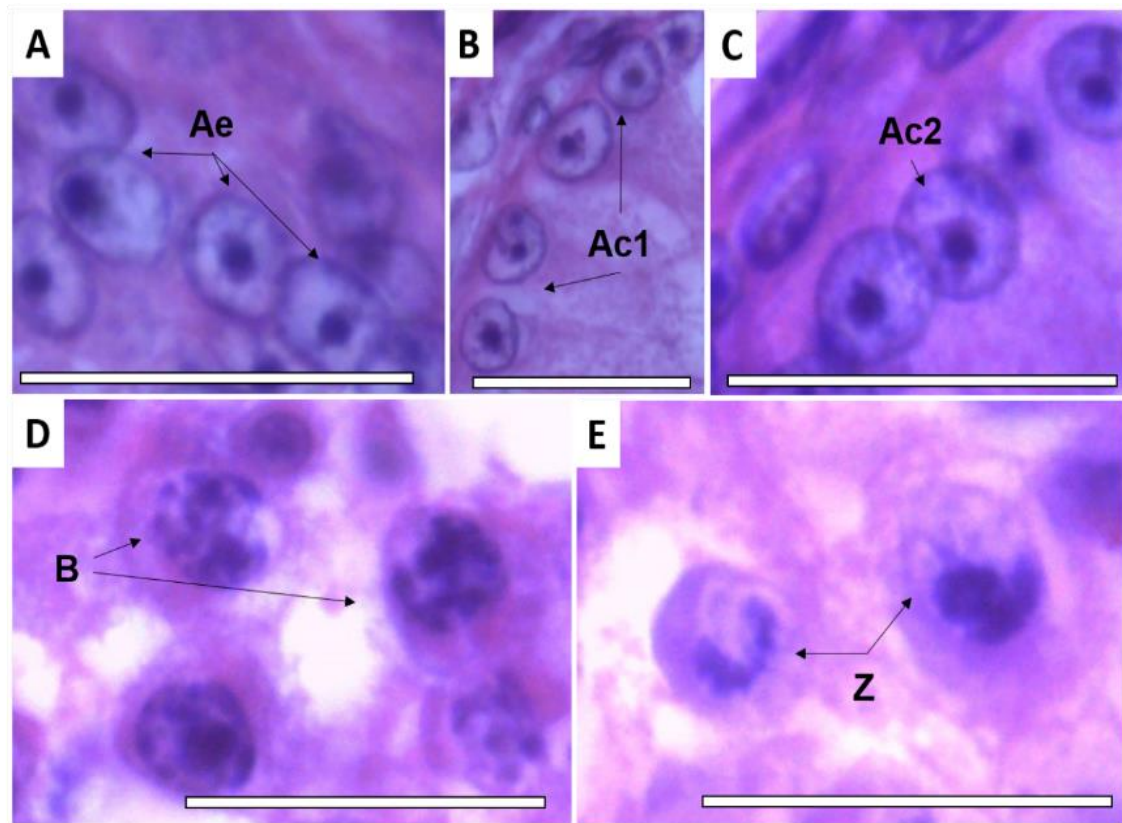


Figure 8. Photomicrographs of the seminiferous epithelium highlighting nuclei of spermatogonia and spermatocytes of *Rhea americana*. A: dark spermatogonia A (Ae); B: light spermatogonia A 1 (Ac1); C: light spermatogonia A 2; D: highlight the spermatogonia nucleus (B); E: zygote nucleus (Z). Scale bar = 10 μ m.

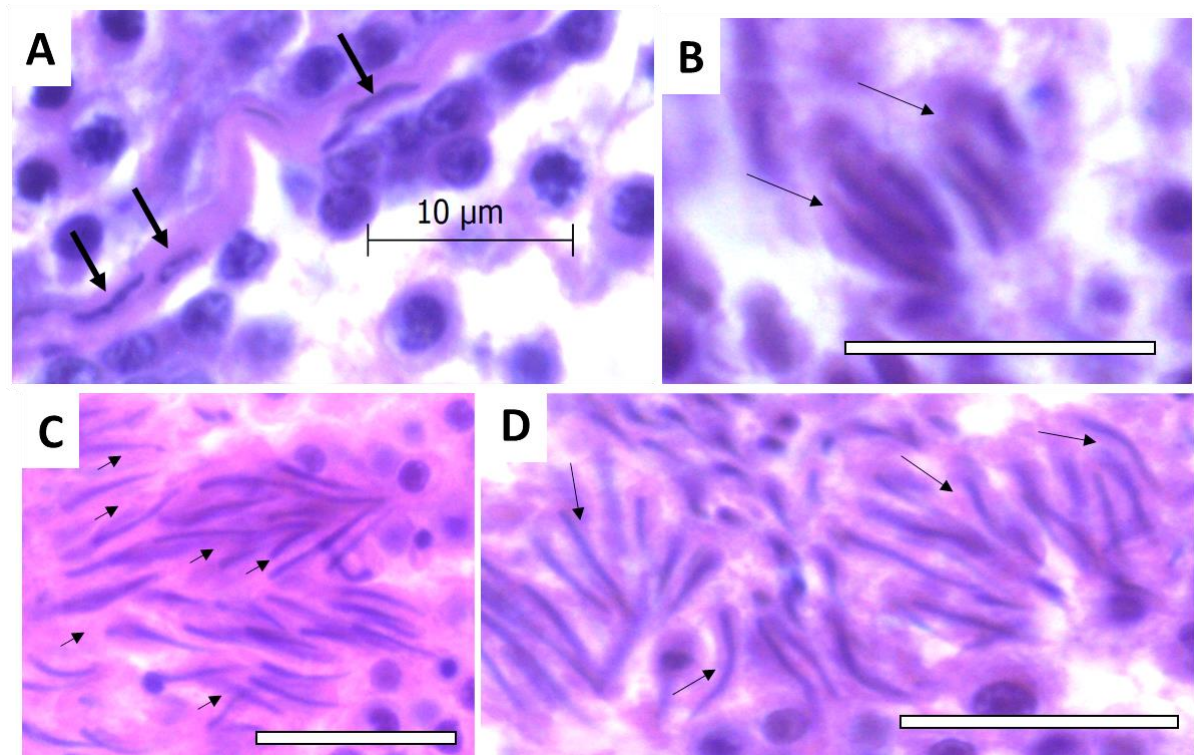


Figure 9. Photomicrographs of the seminiferous epithelium showing, in each figure, a stage of spermatoid differentiation during the spermiogenesis process of adult *Rhea americana* A: Myoid cells (arrows) present in the interstitial tissue; B: spermatoid nucleus in spermiogenesis step 10; C: spermatoid nucleus in spermiogenesis step 12; D: spermatoid nucleus in spermiogenesis step 13; Scale bar = 10 µm.

Comprovante de submissão

Veterinarni medicina - art. no. 44/2023-VETMED: Your manuscript was delivered

Ing. Helena Smolova Ph.D. <vetmed@cazv.cz>

Ter, 18/04/2023 15:48

Para: radan_elvis@hotmail.com <radan_elvis@hotmail.com>

Cc: radan_elvis@hotmail.com <radan_elvis@hotmail.com>; carloseduardomossoro@gmail.com
<carloseduardomossoro@gmail.com>; carolfreitas04@outlook.com
<carolfreitas04@outlook.com>; moacir@ufersa.edu.br <moacir@ufersa.edu.br>

Dear Radan Elvis Matias de Oliveira,

Thank you for your interest in publishing your manuscript in the Veterinární medicína.

The Editorial Board of Veterinární medicína confirms receipt of your manuscript entitled "Morphology of the male genital organs of the greater rhea (Rhea americana)" through the editorial system, registered under ID 44/2023-VETMED.

You will be informed of the review process status of the manuscript in due course. Information will be sent to the email address you entered when signing into the editorial system.

To see the manuscript status «CLICK HERE».

E-mail has been generated by the system automatically. You will be informed on further development.

Veterinární medicína

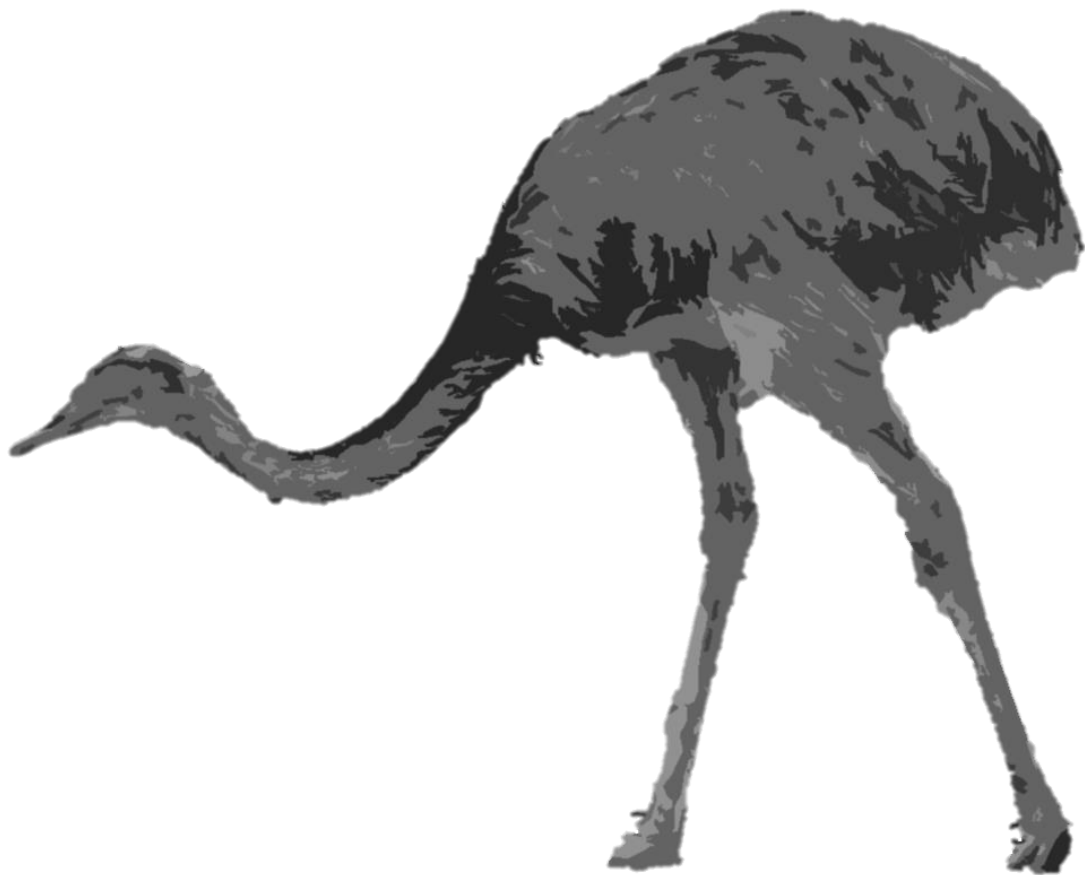
Czech Academy of Agricultural Sciences
Slezská 7
120 00 Prague 2
Czech Republic

<https://vetmed.agriculturejournals.cz>

- Message sent: April 18, 2023 22:48:16
- Deliver to: Radan Elvis Matias de Oliveira

Sent by Actavia system on Veterinarni medicina website.

Capítulo 02 - Avaliação Morfométrica e Histológica dos Testículos, Epidídimo e Ducto Deferente de Ema (Rhea americana)



Capítulo 02 - Avaliação Morfométrica e Histológica dos Testículos, Epidídimo e Ducto Deferente de Ema (*Rhea americana*)

PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA

Brazilian Journal of Veterinary Research

Artigo submetido ao periódico **Pesquisa Veterinária Brasileira**: ISSN 1678-5150 (On-line)
Qualis quadriênio 2017–2020: A4

Avaliação Morfométrica e Histológica dos Testículos, Epidídimo e Ducto Deferente de Ema (*Rhea americana*)¹

Carlos Eduardo Vale Rebouças^{2*}, Ana Caroline Freitas Caetano de Sousa², Radan Elvis Matias de Oliveira², Moacir Franco de Oliveira²

ORCID:

Carlos Eduardo Vale Rebouças - <https://orcid.org/0000-0003-3600-556X>

Ana Caroline Freitas Caetano de Sousa - <https://orcid.org/0000-0001-5883-9704>

Radan Elvis Matias de Oliveira - <https://orcid.org/0000-0002-0370-4447>

Moacir Franco de Oliveira - <https://orcid.org/0000-0002-6269-0823>

ABSTRACT.- Rebouças C.E.V., Sousa A.C.F.C., Oliveira R.E.M., Oliveira M.F. 2023. **Avaliação Morfométrica e Histológica dos Testículos, Epidídimo e Ducto Deferente de Ema (*Rhea americana*)**. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 41:00, 2023. ² Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Av. Francisco Mota, 572 - Bairro Costa e Silva, Mossoró RN | CEP: 59.625-900, +55 84 3317-8200 - CNPJ: 24.529.265/0001-40 *Corresponding author: radan_elvis@hotmail.com

This study considered the identification of morphometric information about structures that make up the male reproductive system of rheas (*Rhea americana*) and aims to provide useful knowledge to improve the reproductive and health management of the species in captivity. Eighteen rheas were used, separated into groups of 18 animals by age, with 3, 6, 9, 12, 15 and 18 months. The testes, epididymis and vas deferens were collected and immediately measured: length, width and volume. Subsequently, slides were prepared for microscopic evaluation of the testicular parenchyma. The morphometric analysis carried out pointed to testicular dimensional variations between periods of rest and proximity to sexual maturity, since the measurements of width, length and volume were significantly smaller in the initial months and larger after 12 months of age. The analysis of photomicrographs, indicated that the seminiferous tubules in transverse sections, present an almost circular shape in different phases of the epithelial cycle. When analyzing the densities of the seminiferous tubules, interstitial epithelium and the lumen of the seminiferous tubules, a significant difference was found as a function of the age of the animals, demonstrating an increase in the seminiferous tubules and tubular lumen, followed by a reduction in the interstitial space, with an increase in animal's age. In view of the results obtained, it is concluded that, when analyzing macro and microscopically the morphological and morphometric measures of the male rhea reproductive system, at different ages of growth, we verified that, according to age and sexual rest, great alterations were observed morphological changes in the structure of the testes.

INDEX TERMS: Morphometry, Testicular parenchyma, Greater Rhea, Rhea.

RESUMO - Este estudo considerou a identificação de informações morfométricas sobre estruturas que compõem o sistema reprodutor masculino de emas (*Rhea americana*) e visa fornecer conhecimentos úteis a melhoria do manejo reprodutivo e sanitário da espécie em cativeiro. Foram utilizadas 18 emas, separadas em grupos de animais por idade, sendo 3, 6, 9, 12, 15 e 18 meses. Os testículos, epidídimos e ductos deferentes foram coletados e imediatamente tiveram mensurados: o comprimento, a largura e o volume. Posteriormente, foram elaboradas lâminas para avaliação microscópica do parênquima testicular. A análise morfométrica realizada apontou para variações dimensionais testiculares entre os períodos de repouso e proximidade da maturidade sexual, visto que as medidas de largura, comprimento e volume eram significativamente menores nos meses iniciais e maiores após os

12 meses de idade. As análises de fotomicrografias, indicaram que os túbulos seminíferos em cortes transversais, apresentam forma quase circular em diferentes fases do ciclo do epitélio. Quando analisadas as densidades dos túbulos seminíferos, epitélio intersticial e a luz dos túbulos seminíferos, constatou-se diferença significativa em função da idade dos animais, demonstrando o aumento dos túbulos seminíferos e luz tubular, seguido da redução do espaço intersticial, com o aumento da idade do animal. Em vista dos resultados obtidos, conclui-se que, ao analisar macro e microscopicamente as medidas morfológicas e morfométricas do sistema reprodutor masculino de ema, em diferentes idades de crescimento, verificamos que, de acordo com a idade e repouso sexual, foram observadas grandes alterações morfológicas na estrutura dos testículos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Morfometria, Parênquima testicular, Ema, Rhea.

INTRODUÇÃO

Pesquisas sobre a morfologia das gônadas de aves silvestres são escassas e, os relatos existentes, são limitados a poucas espécies. A *Rhea americana* é uma ave silvestre que possui importância científica significativa, devido à sua notável adaptabilidade em cativeiro e valor zootécnico para a produção de carne, couro e penas (Costa et al., 2018). Estas aves, embora sejam nativas da América do Sul, possuem grande porte e apresentarem carne de excelente qualidade ainda não despertaram a atenção dos órgãos governamentais para viabilizar sua exploração com fins comercial, possivelmente pelo fato de que ainda possam existir vários aspectos de sua biologia, manejo zootécnico e sanitário a serem conhecidos.

Compreender a morfologia testicular, epididimal e dos ductos deferentes de aves, a exemplo da ema, (*Rhea americana*), pode auxiliar no esclarecimento de questões sobre a reprodução, bem como a formação e maturação dos espermatozoides, processo associado ao mecanismo da espermatogênese. Essas informações fornecem subsídios para o desenvolvimento de técnicas que podem vir a incrementar a eficiência reprodutiva da criação em cativeiro, como a inseminação artificial, bem como a manutenção de bancos de germoplasma (Sharma et al. 2009). Além disso, o conhecimento sobre a vida reprodutiva dessa espécie fornece subsídios técnico-científicos para bases comparativas e expansão reprodutiva destes animais em cativeiro em diferentes condições (Simões et al. 2005). No tocante a emas, percebe-se em consulta a literatura, que informações sobre os elementos constituintes do sistema reprodutor masculino e feminino ainda precisam ser mais bem estudados, quanto aos aspectos anatômicos, sejam eles macro ou microscópicos e ainda quanto a dinâmica dos hormônios reprodutivos.

Neste sentido e, considerando que as emas poderão despertar o interesse pela exploração comercial, infere-se a necessidade do desenvolvimento de estudos com morfologia, a exemplo de avaliação morfométrica, de maneira a produzir dados precisos sobre os sistemas reprodutores desses animais, razão pela qual optou-se por descrever componentes celulares e teciduais do sistema reprodutor masculino, por meio da morfometria e componentes histológicos, objetivando auxiliar na compreensão de mecanismos reprodutivos dessas aves, fornecendo informações fundamentais a melhoria do perfil zootécnico, assim como sobre sua biologia, haja vista que, na literatura estas informações ainda são dotadas de muitas lacunas de informações científicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais. As emas (*Rhea americana*) foram obtidas no Centro de Multiplicação de Animais Silvestres da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). Foram utilizados 18 machos jovens divididos em seis grupos com três animais, separados de acordo com a faixa etária, sendo o grupo 1 (3 meses), grupo 2 (6 meses), grupo 3 (9 meses), grupo 4 (12 meses), grupo 5 (15 meses) e grupo 6 (18 meses). Todos os animais foram submetidos ao protocolo anestésico preconizado por Oliveira et al. (2018), adaptando sempre que necessário e o óbito foi confirmado pela ausência de batimentos cardíacos. Os animais foram pré-medicados com cloridrato de xilazina (1mg/Kg) pela via intramuscular. Atingido o estágio de sedação foram eutanasiados com uma sobredose anestésica de tiopental (150 mg/Kg) e administração de cloreto de potássio (2,56 mEq/Kg), ambos por via intracardiaca. Em seguida, foram dissecados para obtenção das amostras para microscopia de luz.

As coletas foram realizadas ao longo dos anos de 2020 a 2022, cujo protocolo experimental foi previamente submetido ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio – nº 73638-1) e Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - parecer 30/2020) para sua aprovação.

Procedimento para macroscopia. Para dissecação e, posterior realização das análises morfológicas dos conjuntos do aparelho reprodutor masculino da ema (testículos, epidídimos e ductos deferentes e falo), os espécimes foram colocados em decúbito dorsal e submetidos a uma incisão no plano mediano no sentido craniocaudal partindo da extremidade caudal da quilha até a cloaca. Em seguida, foram deslocadas as estruturas do aparelho digestório de modo a expor os órgãos reprodutores, seccionando o reto transversalmente na região de desembocadura da cloaca. Imediatamente após esses procedimentos, os órgãos reprodutores foram analisados a olho nu (*in situ*), fotodocumentados (Câmara digital Sony DSC-W570 16.1 MP) e em seguida mensurados com

auxílio de um paquímetro digital (“Mitutoyo”, modelo 500-147-10), obtendo o comprimento e largura dos testículos, epidídimo e ducto deferente, além do comprimento do falo. Após mensuração, cada estrutura foi pesada com auxílio de uma balança analítica (AL200C, Marte, Brasil).

Ressalta-se que as estruturas macroscópicas identificadas foram nominadas com base em Handbook of Avian Anatomy: Nomina Anatomica Avium (1993) e a *Nomina Anatomica Veterinaria* (2017), sendo os resultados comparados com a literatura referente a estudos com aves domésticas e silvestres.

Os testículos, depois de dissecados, foram pesados e considerando que o peso testicular relativo representa o peso do testículo por 100 gramas de peso corpóreo. Para mostrar a relação nas diferentes idades de crescimento, entre o peso testicular total e o peso corporal, foi calculada a somatória dos pesos testiculares direito e esquerdo dos animais analisados. Para a determinação do volume testicular foi utilizado o princípio de Arquimedes.

Procedimento para microscopia de luz. Para microscopia de luz foram usadas técnicas histológicas preconizadas por Tolosa et al. (2003). Os cortes foram aderidos às lâminas de vidro e deixados em estufa a 60°C “overnight”, para posterior procedimento de coloração com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas foram analisadas em microscópio de luz (Leica-modelo ICC50 HD) e imagens obtidas por meio do programa LAS EZ Ink.

Análise estatística. Foram realizadas análises descritivas de média e desvio padrão para os parâmetros testiculares. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente por meio da análise de variância (teste *F*) ao nível de 0,05, para avaliar a significância dos erros aleatórios.

RESULTADOS

Análise macro e microscópica

Os resultados referem-se a macro e microscopia dos testículos, epidídimos e ductos deferentes da ema. Em relação aos testículos, o comprimento, largura e volume testiculares direito e esquerdo para o conjunto de idades estudadas, estão apresentados na tabela 1.

Na tabela 2, estão apresentadas as massas corporais dos animais e dos testículos esquerdo e direitos para as diferentes idades analisadas, conforme definido na metodologia. A partir destes valores, foi calculada a relação entre a massa dos testículos e a massa corpórea dos animais (P_{REL}).

Avaliando estatisticamente os dados apresentados na tabela 1, não foram observadas diferenças significativas entre a largura e comprimento dos testículos direito e esquerdo ($P > 0,05$). Desta forma, os dados foram agrupados e resultaram em uma média geral para o comprimento e largura dos testículos, nas diferentes idades utilizadas, sendo apresentadas na tabela 3 e figura 1.

A análise comparativa dos parâmetros morfométricos da largura e comprimento dos testículos direito e esquerdo entre os diferentes grupos etários estudados resultou em dados com diferenças significativas, conforme apresentado na tabela 4 ($p > 0,05$), especialmente, quando comparadas as idades dos animais de 12 com 18 meses. De acordo com a tabela 4, houve diferença significativa, em relação ao comprimento dos testículos da ema quando comparamos as idades 12 com 18 meses ($p > 0,05$).

Em relação aos epidídimos, o comprimento, largura e massa do órgão direito e esquerdo para as diferentes idades (3, 6, 9, 12, 15 e 18 meses), encontram-se apresentados na tabela 5.

Analisado as informações constantes na tabela 5, percebe-se que o comprimento do epidídimo progride a medida em que a idade dos animais aumenta. Já quanto a largura dos epidídimos constata-se que varia consideravelmente aos 18 meses de idade, quando os animais se tornam aptos a iniciarem a fase reprodutiva. Os dados que compõem a tabela 5, quando submetidos ao teste estatístico de comparação de média *F*, não apresentaram diferenças significativas quando comparadas as medidas de largura e comprimento dos epidídimos direito e esquerdo ($p > 0,05$). Em função disto, os dados foram analisados de forma agrupada, o que resultou em uma média geral para o comprimento e largura dos epidídimos, nas diferentes idades utilizadas, especificadas na figura 2.

Quanto aos ductos deferentes, as mensurações referentes ao comprimento e a largura do órgão direito e esquerdo em diferentes idades, estão relacionados na tabela 6. Da análise desses dados constatamos que tanto o comprimento quanto a largura dos ductos deferentes, basicamente não variam em função da idade dos animais pesquisados, constando-se a inexistência de relação diretamente proporcional entre as duas variáveis. A avaliação estatística dos dados que compõem a tabela 6, indicam que não há diferenças significativas entre a largura e comprimento dos ductos deferentes direito e esquerdo ($p > 0,05$). Desta forma, os dados foram agrupados e resultaram em uma média geral para o comprimento e largura dos ductos deferentes, nas diferentes idades utilizadas, sendo apresentados na figura 3.

Análise microscópica

Como os testículos da ema possuem forma alongada com polos cranial, caudal e medial, foram realizadas análises microscópicas de cada região testicular separadamente. A Figura 4 ilustra um corte transversal do testículo por meio de fotomicroscopia para demonstrar as estruturas histológicas presentes. Na imagem, podemos observar os túbulos seminíferos, que aparecem como estruturas esféricas ou tubulares, dependendo da sua disposição na secção histológica. Esses túbulos são evidenciados na figura por meio de um círculo amarelo. Cada túbulo seminífero possui um parênquima composto por células germinativas imersas em tecido conjuntivo, e uma região mais central que é desprovida de células e, por isso, apresenta cor clara. Essa região é conhecida como luz tubular (LT). A linha tracejada em amarelo na imagem representa o espaço intersticial, que é o espaço existente entre os túbulos seminíferos do tecido testicular.

Nas tabelas 7 e 8, são apresentadas médias e desvio-padrão da contagem dos pontos nas imagens obtidas de secções histológicas de fragmentos de testículos de animais com três e seis meses de idade, referentes aos túbulos seminíferos, luz tubular e espaço intersticial. Neste sentido, verifica-se na tabela 7, com seis meses de idade, o tecido testicular de ema é representado por aproximadamente 40% do espaço intersticial, 40% de área de túbulos seminíferos e 20% da luz tubular. Estas informações são corroboradas analisando-se a figura 2, onde se observa que o tecido testicular apresenta acentuada área de espaço intersticial entre os túbulos seminíferos e área menos acentuada de luz tubular.

Na tabela 9, são apresentadas médias e desvio-padrão da contagem dos pontos em secções histológicas de tecido testicular de emas aos nove meses de idade. Nesta idade (9 meses) o tecido testicular de *Rhea americana* verifica-se um aumento das densidades dos túbulos seminíferos, bem como da luz tubular e, ainda se percebe a redução do espaço intersticial, quando se compara esses dados aos à aqueles descritos em animais com seis meses de vida.

Na tabela 10, são apresentadas médias e desvio-padrão da contagem dos pontos nas imagens obtidas de cortes histológicos nos animais com nove meses de idade, referentes aos túbulos seminíferos, luz tubular e espaço intersticial das imagens obtidas por microscopia.

Nos animais com nove meses de idade, cujos dados estão descritos na tabela 9, o tecido testicular de *Rhea americana* caracteriza-se por apresentar maior densidade dos túbulos seminíferos e luz tubular e uma redução desta no que corresponde ao espaço intersticial, quando se compara os dados obtidos para os animais com 12 meses de idade.

Na tabela 11, são apresentadas médias e desvio-padrão da contagem dos pontos nas imagens para cada animal com 15 meses de idade, referentes aos túbulos seminíferos, luz tubular e espaço intersticial das imagens obtidas por microscopia.

De acordo com a tabela 10, com 15 meses de idade, o tecido testicular de *Rhea americana* contém as mesmas características quanto à densidade dos túbulos seminíferos, área de luz tubular e espaço intersticial, quando comparado com os dados obtidos em análise do tecido testicular do grupo de ratitas com 12 meses de idade.

Na tabela 12, são apresentadas médias e desvio-padrão da contagem dos pontos nas imagens de emas que compunham o grupo de animais com 18 meses de idade, referentes aos túbulos seminíferos, luz tubular e espaço intersticial das imagens obtidas por microscopia. Aos 18 meses de idade, no tecido testicular dos espécimes utilizados percebe-se o aumento da densidade dos túbulos seminíferos, redução do espaço intersticial e manutenção da luz tubular, quando comparado com os achados descritos para os animais com 15 meses de idade.

Na figura 5 é apresentada uma fotomicroscopia do corte transversal do testículo com 18 meses de idade, das diferentes regiões (caudal, medial e cranial), evidenciando o epitélio seminífero com todas as células da linhagem espermatogênica. Na figura 6, através da redução da ampliação, conseguimos visualizar o túbulo seminífero com todas as células da linhagem espermatogênica, o espaço intersticial e a luz tubular com presença dos espermatozoides.

DISCUSSÃO

Os testículos da *Rhea americana* apresentam forma cilíndrica e extremidades arredondadas e acham-se fixados na região da cavidade celômica, na posição dorsal ao trato gastrointestinal. Carvalho et al. (2014), fazem referência a essa descrição anatômica, mas não fazem referência a relação sintópica dos testículos dessa espécie. Também é importante destacar que existe um grau variável de fixação dos testículos à artéria aorta abdominal. O conjunto de ductos deferentes e epidídimo, associados aos vasos linfáticos e sanguíneos testiculares, formam uma estrutura na borda medial de cada testículo que apresenta uma leve convexidade. O ducto deferente continua a partir do epidídimo e o par de ductos deferentes desce em sintopia com o par de ureteres, em direção à cloaca. Esse conjunto de estrutura acha-se envolvidos em tecido conjuntivo frouxo que lhes conferem fixação ventral a coluna vertebral, estando dispostos cada grupo em um dos antímeros do animal, embora mais caudalmente estejam bem medianos e se abram à medida que se inserem dorsalmente a cloaca.

A análise morfométrica realizada na *Rhea americana*, considerando-se os diferentes grupos de idades estabelecidos apontou para variações dimensionais testiculares entre os períodos de repouso e proximidade da maturidade sexual, visto que as medidas de largura, comprimento e volume mostram-se significativamente menores nos meses iniciais e maiores após os 12 meses de idade. Este padrão também foi relatado por Artoni (1993), ao descrever a morfologia e a histofisiologia do testículo de Codorna (*Coturnix coturnix japonica*). Não resta dúvida que variações estão associadas ao desenvolvimento testicular à medida que a idade dos animais avança, ressalta-se que as diferenças de tamanho se tornam mais significativas nas idades mais próximas da maturidade sexual dos animais, dada a maior influência dos hormônios sexuais. Além disso, de acordo com Lake, 1981, as aves em estágio reprodutivo possuem aumento de tamanho dos testículos devido ao incremento no tamanho dos túbulos seminíferos e do número de células intersticiais e nestes períodos o peso do testículo representa em torno de 1% do peso da ave. Desta forma, devido a relação da massa dos testículos em relação a massa corporal da ema, os espécimes estudados não estavam em estágio reprodutivo.

Marvan (1969), observou em pesquisa sobre o trato genital masculino do *Gallus domesticus*, que os testículos possuem assimetria de tamanho, uma vez que o testículo esquerdo é maior do que o direito. Na ema houve diferença nas dimensões dessas estruturas, mas também no tamanho dos epidídimos e ductos deferentes, conferindo-lhes uma condição assimétrica de tamanho e comprimento, respectivamente, onde as estruturas à direita são maiores que aquelas a esquerda. Assim, o que se percebe, macroscopicamente, é que com o avançar da idade ocorre consideráveis alterações nas dimensões dos testículos, epidídimos e ductos deferentes em emas, considerando os dados dos animais avaliados. Destaca-se, que os epidídimos apresentavam mensurações menores que os testículos, encontravam-se fortemente presos aos testículos e em posição mais mediana em relação aos testículos e correspondia a uma espécie cápsula oca de material fibroso. Os ductos deferentes deixavam os epidídimos aumentando em diâmetro à medida que se aproximava do ureter. Ademais, estas estruturas têm seu comprimento aumentado ao longo da evolução da maturação dos animais.

O epidídimo da ema, mesmo em período de atividade reprodutiva, não supera o comprimento do testículo e nem possui borda livre. Soley (1992), descrevendo a histologia da espermatogênese em avestruz, cita as seguintes medidas do epidídimo de avestruz em período de atividade reprodutiva: 21 a 31 g, 12 a 15,4 cm de comprimento, 3 a 7 cm de largura. Comparando com a ema estas medidas são superiores, porém proporcionais aos pesos corporais, visto que a ema pesa em média 32 kg e o avestruz 100 kg. A cápsula testicular da ema é dividida em região epididimária, com ramificações envolvendo o epidídimo, e região testicular, que recobre o testículo e a rede testicular (Freneau *et al.* 2016). A cápsula testicular em aves geralmente é fina (Lake 1971), dividida pelas regiões epididimal e testicular. Ozegbe *et al.* (2008) e Freneau *et al.* (2016), inferem que, apesar da cápsula testicular não apresentar septos ou lóbulos, estas são encontradas na ema e no avestruz.

A análise das fotomicrografias dos testículos dos animais demonstrou que os túbulos seminíferos em cortes transversais, apresentavam formas circulares, exatamente como descrito por Freneau *et al.* (2016). O parênquima testicular da *Rhea americana* é composto por túbulos seminíferos que, em cortes transversais, apresentam formas quase circulares, diferente do que se presencia no Galo doméstico (Lake 1971) e na Codorna (Artoni *et al.* 1999), que apresentam formas hexagonais, e semelhante ao Emu, que também apresenta formas circulares (Malecki *et al.* 1998).

Filogeneticamente, o avestruz é próximo da ema, e ambas as espécies fazem parte do grupo de aves Ratitas. No entanto, existem algumas diferenças entre as ratitas americanas e africanas (Machado & Malecki 2011). As análises da estrutura celular dos túbulos seminíferos deste trabalho, demonstraram diferentes fases do ciclo do epitélio. Observando os túbulos seminíferos dos cortes retirados das amostras é perceptível a existência de diferentes associações celulares em um mesmo corte, demonstrando que há muitas fases do ciclo do epitélio seminífero de forma setorial. Isso caracteriza uma disposição helicoidal das possíveis etapas do ciclo do epitélio seminífero. O relato de que associações celulares do ciclo do epitélio seminífero foram observadas em seções únicas dos túbulos seminíferos da *Rhea americana* coincide com o que foi relatado no galo doméstico (Sharma *et al.* 1956), no marreco (Clermont 1958) e no pato doméstico (Marchand 1977).

Os túbulos seminíferos aparecem como uma rede compacta e como uma estrutura sem formação de septos testiculares. Além disso, foi observada a presença de atividade sexual, visto que, havia presença de espermátides redondas e alongadas, juntamente com espermatozoides e, portanto, havia espermatogênese neste momento.

Quando analisadas as densidades dos túbulos seminíferos, epitélio intersticial e luz tubular da *Rhea americana*, esta apresentou diferença de acordo com a idade dos animais. Demonstrando o aumento dos túbulos seminíferos e luz tubular, seguido da redução do espaço intersticial, com o aumento da idade do animal. Comparando-se a histologia do parênquima testicular entre as idades dos animais, notam-se mudanças significativas, quanto ao volume dos túbulos seminíferos e diâmetro da luz tubular, sendo que essas mudanças também foram relatadas em codornas e Avestruz (Madekurozwa *et al.* 2002).

O espaço intersticial da *Rhea americana* é constituído por dois componentes principais: o primeiro é uma fina camada com células mioides alongadas que circunda o túbulo seminífero delimitando-o, e o segundo é constituído por fibras colágenas localizadas entre os túbulos e formando áreas de ângulos adjacentes. Artoni *et al.* (2007), estudaram a morfometria dos túbulos seminíferos do tinamou-de-asa-vermelha (*Rynchotus rufescens*) ao

longo do ano, foram relatadas alterações morfológicas nos túbulos, em relação ao diâmetro do epitélio, sendo essas alterações relacionadas às estações do ano, apresentando períodos de atividade sexual e repouso. Durante a primavera, os seguintes valores de diâmetro dos túbulos seminíferos foram relatados no tinamou-de-asa-vermelha: $315,9 \pm 57,7 \mu\text{m}$ durante o verão e $182,7 \pm 54,9 \mu\text{m}$ no inverno. Desta forma, no período da atividade sexual, ocorre a expansão dos túbulos seminíferos e, consequentemente o volume do tecido intersticial é reduzido a um patamar menor do que o observado no período de repouso sexual. Isso ocorre com a *Rhea americana*, visto que, observou-se a redução do tecido intersticial e expansão dos túbulos seminíferos com o aumento da idade dos animais, da mesma forma como relatado no tinamou-de-asa-vermelha por Artoniet *al.* (2007).

De acordo com Freneau *et al.* (2016), durante o repouso sexual, o interstício se apresenta com maior volume e, portanto, espera-se uma correlação entre ele e outros componentes quando comparado ao período de atividade sexual. Nesta pesquisa os animais com idade inferior a 18 meses foram caracterizados em período de repouso sexual e, com isso, apresentou correlação negativa entre o epitélio intersticial e as outras estruturas do parênquima testicular com o aumento da idade dos animais. Apenas os animais com idade superior a 18 meses foram caracterizados em período de atividade sexual. Por fim, não houve dificuldades na fixação e coloração dos cortes histológicos da *Rhea americana*. Alguns autores mencionam dificuldades na fixação de seções dos machos da codorna, do galo e da galinha-d'angola (Freneau *et al.* 2016).

CONCLUSÃO

Os dados apresentados sobre as análises macroscópicas, morfometria e microscópica testicular de *Rhea americana* contribuem para o estudo reprodutivo desta espécie, através das alterações morfológicas apresentadas pela estrutura dos testículos, ducto deferente e epidídimos nas diferentes idades dos animais.

Os resultados demonstram a existência das diferenças morfométricas no sistema reprodutor masculino, de acordo com a variação da idade. Além disso, algumas estruturas microscópicas dos testículos, são semelhantes a outras aves.

Em vista dos resultados obtidos, conclui-se que, ao analisar macro e microscopicamente as medidas morfológicas e morfométricas do sistema reprodutor masculino de *Rhea americana*, em diferentes idades de crescimento, verificamos que, de acordo com a idade e repouso sexual, foram observadas grandes alterações morfológicas na estrutura dos testículos.

Declaração de conflito de interesses - Os autores declaram não haver conflitos de interesses.

REFERENCES

- Artoni S.M.B. 1993. Considerações sobre a morfologia e a histofisiologia do testículo de Codorna (*Coturnix coturnix japonica*). 77 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, Área de concentração Anatomia) – Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Botucatu, Botucatu, São Paulo.
- Artoni S.B., Orsi A.M., Carvalho T.L.L., Vicentini C.A. & Stefanini M.A. 1999. Seasonal morphology of the domestic quail (*Coturnix coturnix japonica*) testis. *Anat. Histol. Embryol.* 28(4): 217-220.
- Artoni S.M.B., Bottino F., Oliveira D., Franzo V.S., Amoroso L., Orsi A.M., Cruz C. Baraldi-Artoni, S. M., Bottino, F., Oliveira, D., Franzo, V. S., Amoroso, L., Orsi, A. M., & Cruz, C. 2007. Morphometric study of *Rynchotus rufescens* testis throughout the year. *Braz. J. Biol.* 67: 363-367.
- Carvalho S.F.M., Freneau B.N., & Freneau G.E. 2014. Aspects of the Macroscopic Testicular and Epididymal Morphology in the Greater Rhea, *Rhea americana* (Linnaeus - 1758) Birds. *Anat. Histol. Embryol.* 4: 255–261.
- Clermont Y. 1958. Structure de l'épithélium seminal et mode de renouvellement des spermatogonies chez le canard. *Arch. anat. microsc. morphol. exp.* 47: 47-66.
- Costa H.S., Araújo Júnior H.N., Bezerra F.V.F., Rebouças C.E.V., Menezes D.J.A., Moura C.E.B. & Oliveira M.F. 2018. Macroscopic Anatomy and Brain Vascularization in the Greater Rhea (*Rhea americana americana*). *Acta Sci. Vet.* 46: 1 - 8.
- Freneau G.E., Carvalho S.F., Saboia-Morais S.M. & Freneau B.N. 2016. Aspects of spermatogenesis and microscopic testicular morphology in Greater Rhea, *Rhea americana* (Linnaeus, 1758). *Pesq. Vet. Bras.* 10: 1045–1052.

- Lake P.E. 1981. Male Genital Organs. In: KING, A.S.; McLELLAND, J. Form and function in birds. London: Academic Press. 2, p. 2-37.
- Lake P.E. 1971. The male in reproduction. In: Physiology and biochemistry of the domestic fowl. London: Academic. 1411-1447.
- Machado T.M.M. & Malecki I.A. 2011. Relationship among the economically important ratites: a clustering approach based on their reproductive biology. *Revta Bras. Zootec.* 40: 60-67.
- Madekurozwa M.C., Chabvepi T.S., Matema S. & Teerds K.J. 2002. Relationship between seasonal changes in spermatogenesis in the juvenile ostrich (*Struthio camelus*) and the presence of the LH receptor and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Reprod.* 5: 735-742.
- Malecki I.A., Martin G.B., O'Malley P.J., Meyer G.T., Talbot R.T. & Sharp P. J. 1998. Endocrine and testicular changes in a short-day seasonally breeding bird, the emu (*Dromaius novaehollandiae*), in southwestern Australia. *Anim. Reprod. Sci.* 53: 143-155.
- Marchand C.R. 1977. Étude ultrastructurale de la spermatogénèse du canard de Barbarie (*Cairina moschata* L., Oiseau Anatidae). *Biol. Cell.* 29: 193-201.
- Marvan F.R. 1969. Post natal development of the male genital tract of the *Gallus domesticus*. *Anatomischer Anzeiger.* 124: 443-462.
- International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature. 2017. *Nomina Anatomica Veterinaria*. 6. ed. Knoxville: World Association of Veterinary Anatomists: 178.
- Oliveira R. E., Araújo Júnior H.N., Câmara F.V., Oliveira F.D., Costa H.S., Bezerra F.V., Moura C.E.B. & Oliveira M.F. 2018. Morfologia da bolsa cloacal de emas, *Rhea americana americana* Linnaeus, 1758. *Pesq. Vet. Bras.* 38:1696-1704.
- Ozegbe P.C., Aire T.A., Madekurozwa M.C. & Soley J.T. 2008. Morphological and immunohistochemical study of testicular capsule and peritubular tissue of emu (*Dromaius novaehollandiae*) and ostrich (*Struthio camelus*). *Cell Tissue Res.* 332: 151-158.
- Sharma G.P., Gupta B.L. & Nayar K.K. 1956. Spermatogenesis of the domestic fowl, *Gallus domesticus*. *Res. Bull. Panjab Univ.* 93: 139-151.
- Sharma R.K., Bhardwaj J.K. & Ahlawat N. 2009. Ultrastructural developments during spermiogenesis in goat (*Capra hircus*). *Internl J Integr Biol*, v. 6, p. 112 - 14.
- Simões K., Orsi A.M. & Viegas K.A.S. 2005. Ultrastructural characteristics of spermiogenesis in the domestic duck (*Anas platyrhynchos*). *Anat. Histol. Embryol.* 34: 307 - 311.
- Soley J. T. 1992. A histological study of spermatogenesis in the ostrich (*Struthio camelus*). 1992. Tese (Doutorado em Morfologia), Universidade de Pretória, Pretória, África do Sul: 187.
- Tolosa E.M.C., Rodrigues C.J., Behmer O.A. & Freitas Neto A.G. 2003. Manual de técnicas para histologia normal e patológica. 2. ed. São Paulo: Manole. 331.

Legendas de Figuras

Fig. 1. Gráfico da média e desvio-padrão do comprimento e largura dos testículos de *Rhea americana* de acordo com a idade (meses).

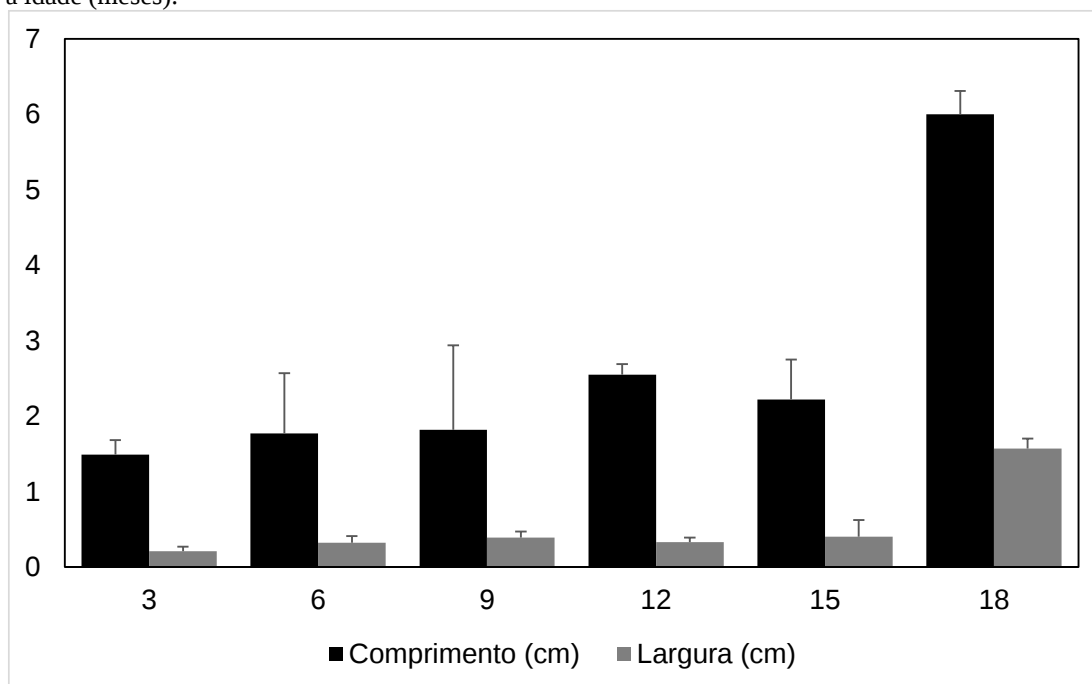


Fig. 2. Gráfico da média e desvio-padrão do comprimento e largura dos epidídimos de *Rhea americana* de acordo com a idade (meses).

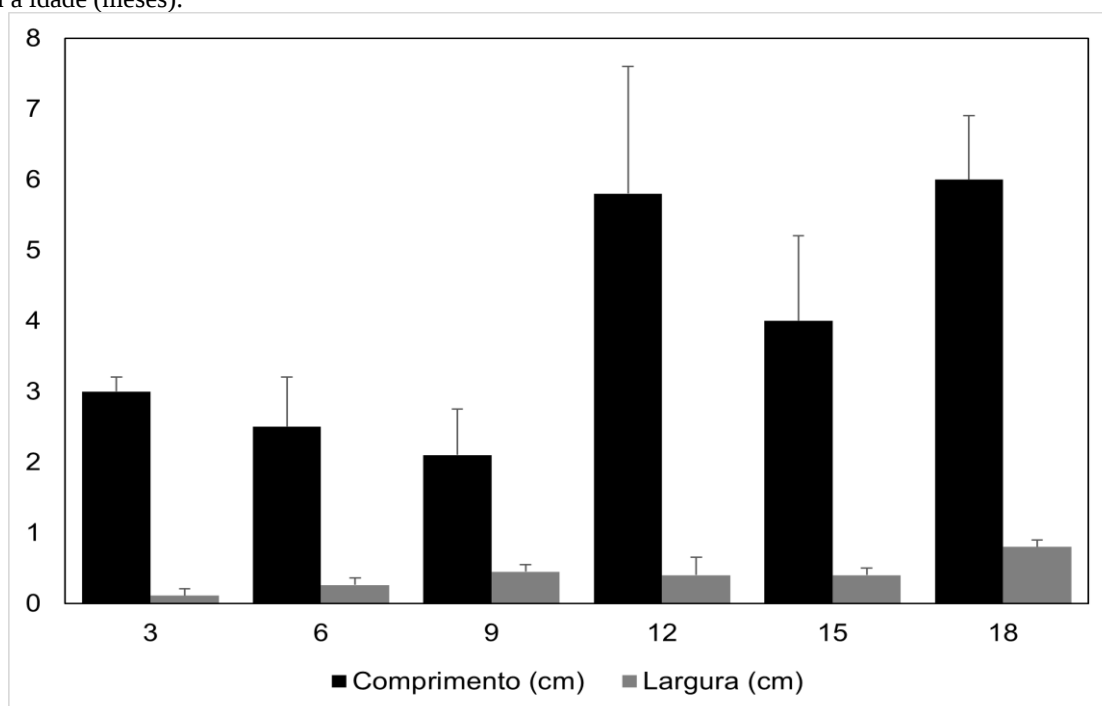


Fig. 3. Gráfico da média e desvio-padrão do comprimento e largura dos ductos deferentes de *Rhea americana* de acordo com a idade (meses).

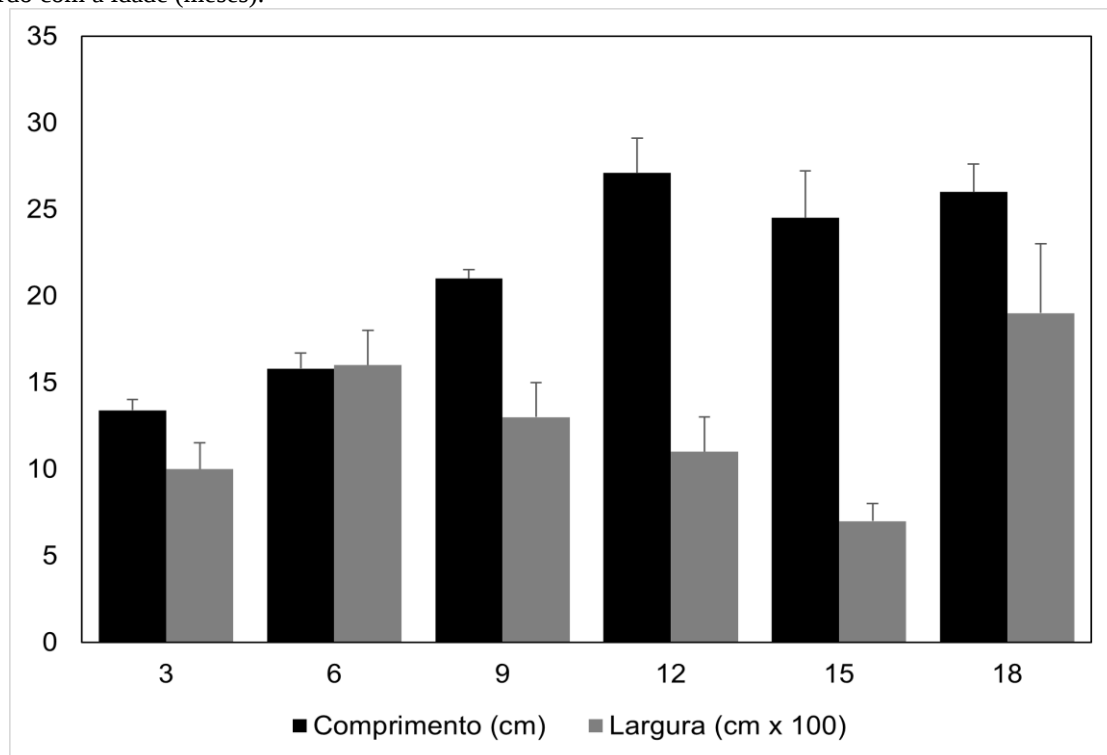


Fig. 4. Fotomicroscopia do tecido testicular de *Rhea americana*, com 18 meses, evidenciando os túbulos seminíferos (círculo amarelo), a luz tubular (LT) e o espaço intersticial (linha tracejada amarela).

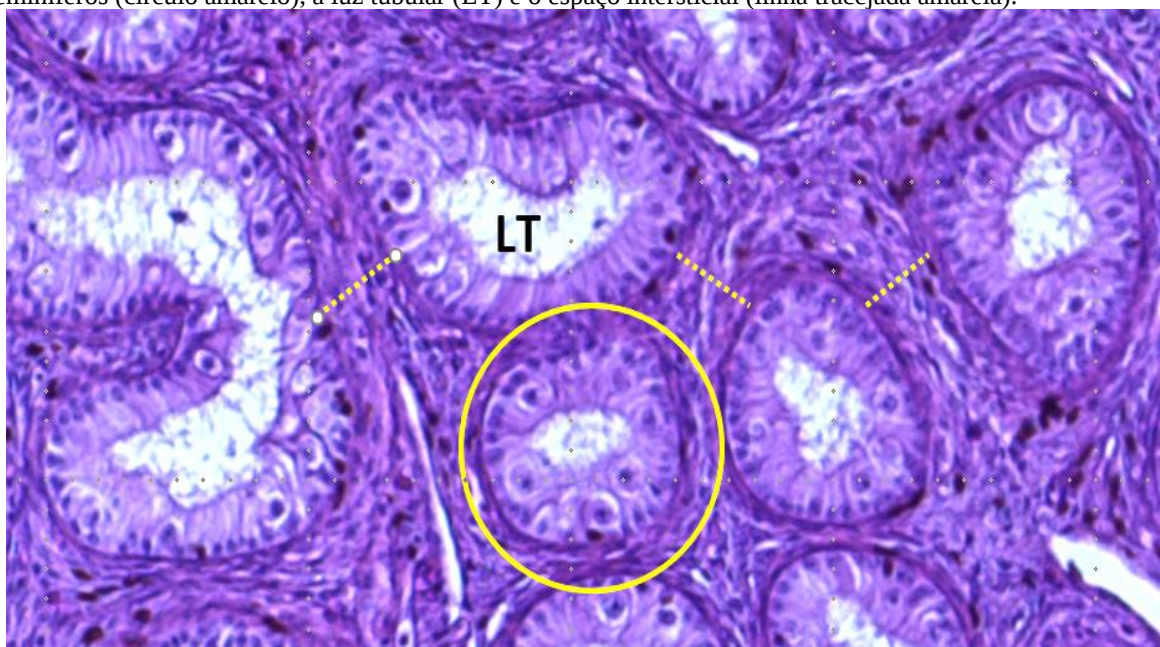


Fig. 5. Fotomicrografias do epitélio seminífero, dos animais com 18 meses de idade, das regiões caudal (A), medial (B) e cranial (C) dos testículos de *Rhea americana*. Espermatogônias tipo I e II (1 – 2); espermatócito (3); espermátide arredondada (4), alongada (5); células de sustentação (6). Barra da escala = 10 μ m.

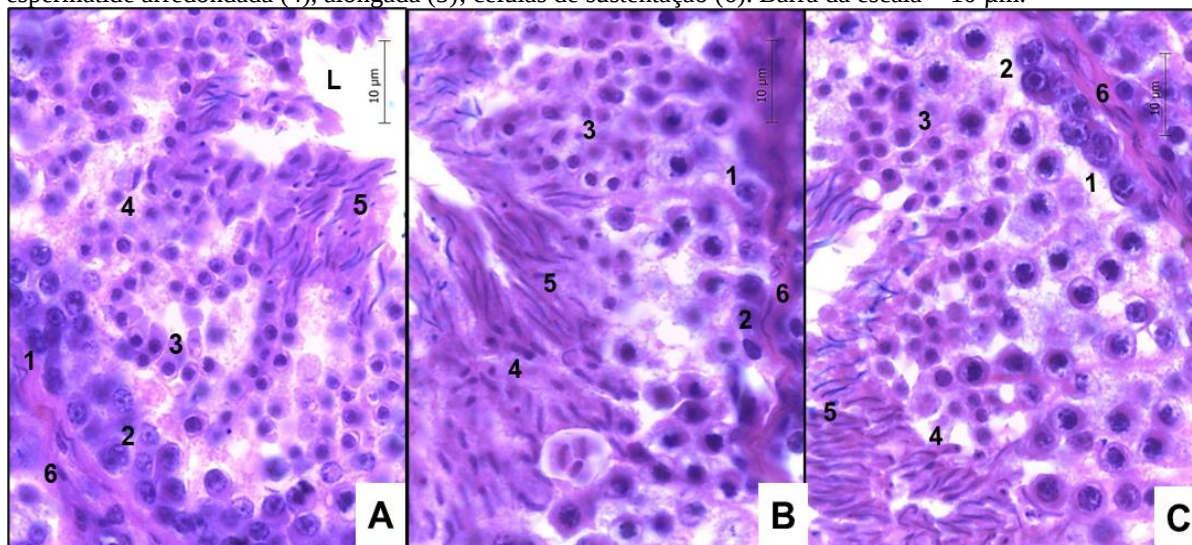


Fig. 6. Fotomicrografias do epitélio seminífero, da *Rhea americana* com 18 meses de idade, demonstrando o tecido intersticial, o túbulo seminífero com as espermatogônias tipo I e II (1 – 2), espermatócito (3), espermátide arredondada (4), alongada (5) e luz tubular com espermatozoides. Barra de escala = 20 μ m.

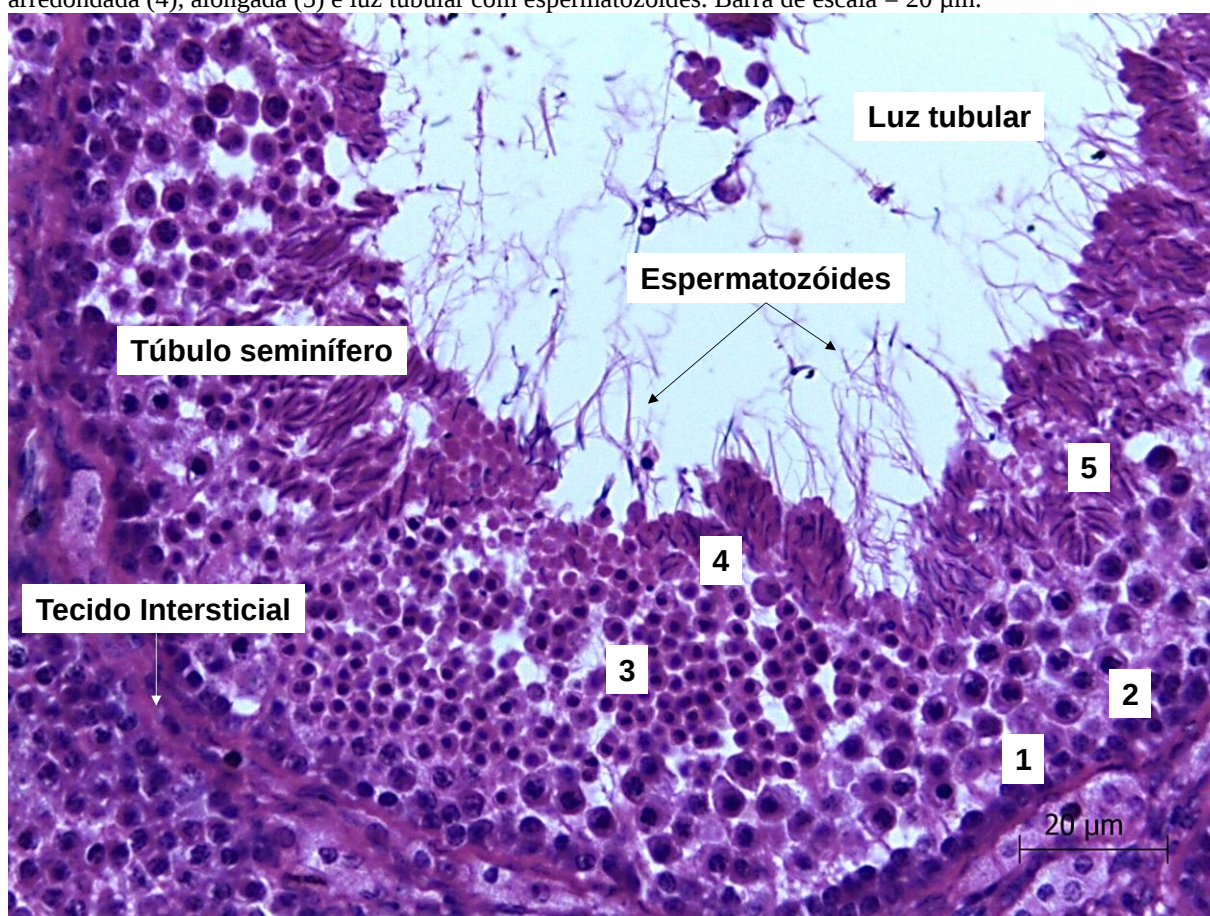


Tabela 1. Comprimento e largura dos testículos direito (TD) e esquerdo (TE) de emas.

Idade (meses)	n	Comprimento média ($\pm \sigma$) cm		Largura média ($\pm \sigma$) cm		Volume média ($\pm \sigma$) ml
		TE	TD	TE	TD	
3	3	1,49 ($\pm 0,08$)	1,48 ($\pm 0,29$)	0,22 ($\pm 0,04$)	0,20 ($\pm 0,09$)	0,1
6	3	1,65 ($\pm 0,55$)	1,88 ($\pm 1,03$)	0,40 ($\pm 0,07$)	0,23 ($\pm 0,11$)	0,16 ($\pm 0,1$)
9	3	1,82 ($\pm 0,89$)	1,83 ($\pm 1,35$)	0,44 ($\pm 0,05$)	0,34 ($\pm 0,12$)	0,22 ($\pm 0,02$)
12	3	2,39 ($\pm 0,21$)	2,74 ($\pm 0,07$)	0,38 ($\pm 0,09$)	0,28 ($\pm 0,03$)	0,38 ($\pm 0,13$)
15	3	2,22 ($\pm 0,58$)	2,21 ($\pm 0,49$)	0,41 ($\pm 0,21$)	0,38 ($\pm 0,24$)	1,38 ($\pm 0,35$)
18	3	6,53 ($\pm 0,31$)	5,45 ($\pm 0,32$)	1,58 ($\pm 0,09$)	1,53 ($\pm 0,18$)	13,0 ($\pm 4,16$)

nº, número de animais; cm, centímetro; ml, mililitro.

Tabela 2. Relação (PREL) entre a massa dos testículos direito (TD) e esquerdo (TE) e massa corpórea das emas.
nº, número de animais; kg, quilograma; %, porcentagem.

Idade (meses)	n	Massa dos animais média ($\pm \sigma$) kg	Massa dos testículos média ($\pm \sigma$) g		PREL (%)
			TE	TD	
3	3	6,2 ($\pm 0,04$)	0,03 ($\pm 0,003$)	0,04 ($\pm 0,004$)	0,0007
6	3	10,98 ($\pm 0,5$)	0,11 ($\pm 0,03$)	0,21 ($\pm 0,179$)	0,002 ($\pm 0,009$)
9	3	13,56 ($\pm 0,5$)	0,12 ($\pm 0,2$)	0,09 ($\pm 0,4$)	0,0007
12	3	20,07 ($\pm 0,9$)	0,39 ($\pm 0,2$)	0,26 ($\pm 0,2$)	0,002 % ($\pm 0,0013$)
15	3	17,28 ($\pm 3,6$)	0,62 ($\pm 0,1$)	0,39 ($\pm 0,3$)	0,003 % ($\pm 0,002$)
18	3	24,10 ($\pm 0,36$)	16,36 ($\pm 2,2$)	11,26 ($\pm 5,0$)	0,07% ($\pm 0,02$)

Tabela 3. Comprimento e largura média dos testículos das emas.

Idade (meses)	n	Comprimento média ($\pm \sigma$) cm	Largura média ($\pm \sigma$) cm
3	3	1,49 ($\pm 0,19$)	0,21 ($\pm 0,06$)
6	3	1,77 ($\pm 0,80$)	0,32 ($\pm 0,09$)
9	3	1,82 ($\pm 1,12$)	0,39 ($\pm 0,08$)
12	3	2,55 ($\pm 0,14$)	0,33 ($\pm 0,06$)
15	3	2,22 ($\pm 0,53$)	0,4 ($\pm 0,22$)
18	3	6,00 ($\pm 0,31$)	1,57 ($\pm 0,13$)

nº, número de animais; cm, centímetro.

Tabela 4. Valores de significância obtidos através do Teste Z.

Idades	Z	
	Comprimento	Largura
12 meses x 18 meses	17,63 *	39,45 *

* valores que apresentaram significativa diferença estatística.

Tabela 5. Comprimento, largura e massa dos epidídimos direito (TD) e esquerdo (TE) de emas.

Idade (meses)	n	Comprimento (cm) média ($\pm \sigma$)		Largura (cm) média ($\pm \sigma$)		Massa (g) média ($\pm \sigma$)	
		TE	TD	TE	TD	TE	TD
3	3	3,4 ($\pm 0,2$)	2,6 ($\pm 0,2$)	0,4 ($\pm 0,1$)	0,18 ($\pm 0,1$)	0,07 ($\pm 0,01$)	0,07 ($\pm 0,01$)
6	3	2,1 ($\pm 0,7$)	2,9 ($\pm 0,7$)	0,3 ($\pm 0,1$)	0,22 ($\pm 0,1$)	0,16 ($\pm 0,03$)	0,14 ($\pm 0,05$)
9	3	2,3 ($\pm 0,8$)	1,9 ($\pm 0,5$)	0,24 ($\pm 0,1$)	0,66 ($\pm 0,1$)	0,14 ($\pm 0,02$)	0,91 ($\pm 0,03$)
12	3	6,6 ($\pm 2,2$)	5,1 ($\pm 1,3$)	0,4 ($\pm 0,3$)	0,4 ($\pm 0,2$)	0,22 ($\pm 0,01$)	0,21 ($\pm 0,02$)
15	3	4,1 ($\pm 1,5$)	3,9 ($\pm 0,9$)	0,3 ($\pm 0,1$)	0,4 ($\pm 0,1$)	0,45 ($\pm 0,05$)	0,25 ($\pm 0,03$)
18	3	6,0 ($\pm 0,9$)	5,9 ($\pm 0,9$)	0,8 ($\pm 0,1$)	0,8 ($\pm 0,1$)	2,31 ($\pm 0,01$)	2,12 ($\pm 0,2$)

Tabela 6. Comprimento e largura dos ductos deferentes direito (TD) e esquerdo (TE) de emas.

Idade (meses)	n	Comprimento (cm) média ($\pm \sigma$)		Largura (cm) média ($\pm \sigma$)	
		TE	TD	TE	TD
3	3	12,4 ($\pm 0,6$)	13,1 ($\pm 0,5$)	0,10 ($\pm 0,01$)	0,11 ($\pm 0,02$)
6	3	15,3 ($\pm 0,4$)	16,3 ($\pm 1,4$)	0,16 ($\pm 0,004$)	0,15 ($\pm 0,04$)
9	3	21 ($\pm 0,5$)	20,9 ($\pm 0,5$)	0,12 ($\pm 0,02$)	0,13 ($\pm 0,01$)
12	3	26,2 ($\pm 1,8$)	27,9 ($\pm 2,3$)	0,10 ($\pm 0,01$)	0,13 ($\pm 0,03$)
15	3	24,4 ($\pm 4,3$)	24,7 ($\pm 1,1$)	0,07 ($\pm 0,01$)	0,07 ($\pm 0,01$)
18	3	25,8 ($\pm 2,1$)	26,2 ($\pm 1,0$)	0,19 ($\pm 0,04$)	0,18 ($\pm 0,04$)

Tabela 7. Densidade (%) do espaço intersticial, túbulo seminífero e luz tubular, obtido a partir das fotomicrografias do tecido testicular de *Rhea americana* com 3 meses de idade.

Região Testicular	Espaço Intersticial média ($\pm \sigma$)	Túbulo Seminífero média ($\pm \sigma$)	Luz Tubular média ($\pm \sigma$)
Caudal	38,45 ($\pm 0,85$)	32,70 ($\pm 0,46$)	10,22 ($\pm 0,40$)
Medial	52,00 ($\pm 1,32$)	31,20 ($\pm 0,72$)	11,00 ($\pm 0,73$)
Cranial	45,00 ($\pm 0,90$)	32,00 ($\pm 0,90$)	11,20 ($\pm 0,32$)
Média	45,15 ($\pm 1,02$)	31,97 ($\pm 0,69$)	10,81 ($\pm 0,48$)

Tabela 8. Densidade (%) do espaço intersticial, túbulo seminífero e luz tubular, obtido a partir das fotomicrografias do tecido testicular de *Rhea americana* com 6 meses de idade.

Região Testicular	Espaço Intersticial média ($\pm \sigma$)	Túbulo Seminífero média ($\pm \sigma$)	Luz Tubular média ($\pm \sigma$)
Caudal	36,20 ($\pm 1,81$)	47,10 ($\pm 2,36$)	8,40 ($\pm 0,40$)
Medial	45,00 ($\pm 2,25$)	33,00 ($\pm 1,65$)	13,00 ($\pm 0,62$)
Cranial	39,00 ($\pm 1,95$)	39,00 ($\pm 1,95$)	14,00 ($\pm 0,67$)
Média	40,07 ($\pm 4,5$)	39,70 ($\pm 7,08$)	11,80 ($\pm 2,99$)

Tabela 9. Densidade (%) do espaço intersticial, túbulo seminífero e luz tubular, obtido a partir das fotomicrografias do tecido testicular de *Rhea americana* com 9 meses de idade.

Região Testicular	Espaço Intersticial média ($\pm \sigma$)	Túbulo Seminífero média ($\pm \sigma$)	Luz Tubular média ($\pm \sigma$)
Caudal	31,10 ($\pm 1,56$)	55,00 ($\pm 2,75$)	12,40 ($\pm 0,58$)
Medial	27,00 ($\pm 1,35$)	60,00 ($\pm 3,00$)	14,00 ($\pm 0,67$)
Cranial	30,00 ($\pm 1,50$)	39,00 ($\pm 1,95$)	11,00 ($\pm 0,53$)
Média	29,37 ($\pm 2,12$)	51,33 ($\pm 10,97$)	12,33 ($\pm 1,53$)

Tabela 10. Densidade (%) do espaço intersticial, túbulo seminífero e luz tubular, obtido a partir das fotomicrografias do tecido testicular de *Rhea americana* com 12 meses de idade.

Região Testicular	Espaço Intersticial média ($\pm \sigma$)	Túbulo Seminífero média ($\pm \sigma$)	Luz Tubular média ($\pm \sigma$)
Caudal	9,00 ($\pm 0,45$)	74,00 ($\pm 3,70$)	24,00 ($\pm 1,15$)
Medial	19,00 ($\pm 0,95$)	61,00 ($\pm 3,05$)	14,00 ($\pm 0,67$)
Cranial	8,00 ($\pm 0,40$)	60,00 ($\pm 3,00$)	16,00 ($\pm 0,77$)
Média	12,00 ($\pm 6,08$)	65,00 ($\pm 7,81$)	18,00 ($\pm 5,3$)

Tabela 11. Densidade (%) do espaço intersticial, túbulo seminífero e luz tubular, obtido a partir das fotomicrografias do tecido testicular de *Rhea americana* com 15 meses de idade.

Região Testicular	Espaço Intersticial média ($\pm \sigma$)	Túbulo Seminífero média ($\pm \sigma$)	Luz Tubular média ($\pm \sigma$)
Caudal	19,00 ($\pm 0,95$)	63,00 ($\pm 3,15$)	7,00 ($\pm 0,34$)
Medial	21,00 ($\pm 1,05$)	60,00 ($\pm 3,05$)	9,00 ($\pm 0,43$)
Cranial	22,00 ($\pm 1,10$)	60,00 ($\pm 3,00$)	11,00 ($\pm 0,53$)
Média	20,67 ($\pm 1,53$)	61,00 ($\pm 1,73$)	9,00 ($\pm 2,3$)

Tabela 12. Densidade (%) do espaço intersticial, túbulo seminífero e luz tubular, obtido a partir das fotomicrografias do tecido testicular de *Rhea americana* com 18 meses de idade.

Região Testicular	Espaço Intersticial média ($\pm \sigma$)	Túbulo Seminífero média ($\pm \sigma$)	Luz Tubular média ($\pm \sigma$)
Caudal	5,00 ($\pm 0,95$)	79,00 ($\pm 3,95$)	9,00 ($\pm 0,54$)
Medial	11,00 ($\pm 1,05$)	71,00 ($\pm 3,55$)	9,00 ($\pm 0,43$)
Cranial	7,00 ($\pm 1,10$)	67,00 ($\pm 3,35$)	14,00 ($\pm 0,67$)
Média	7,67 ($\pm 3,06$)	72,33 ($\pm 6,11$)	10,67 ($\pm 2,9$)

Comprovante de Submissão

Pesquisa Veterinária Brasileira - Manuscript ID PVB-7315

Ricardo Lucena <onbehalf@manuscriptcentral.com>

Qua, 19/04/2023 15:35

Para: radan_elvis@hotmail.com <radan_elvis@hotmail.com>

Cc: carloseduardomossoro@gmail.com

<carloseduardomossoro@gmail.com>; carolfreitasanjo@gmail.com

<carolfreitasanjo@gmail.com>; radan_elvis@hotmail.com

<radan_elvis@hotmail.com>; moacir@ufersa.edu.br <moacir@ufersa.edu.br>

19-Apr-2023

Dear Mr. Matias de Oliveira:

Your manuscript entitled "Avaliação Morfométrica e Histológica dos Testículos, Epidídimo e Ducto Deferente de Ema (Rhea americana)" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the Pesquisa Veterinária Brasileira.

Your manuscript ID is PVB-7315.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc04.manuscriptcentral.com/pvb-scielo> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc04.manuscriptcentral.com/pvb-scielo>.

Thank you for submitting your manuscript to the Pesquisa Veterinária Brasileira.

Sincerely,

Pesquisa Veterinária Brasileira Editorial Office