

# EFEITOS DA BIÓPSIA INCISIONAL TESTICULAR SOBRE O RENDIMENTO INTRÍNSECO DA ESPERMATOGÊNESE E ÍNDICES DE CÉLULAS DE SERTOLI EM CÃES

Rebeca Marques Mascarenhas<sup>1</sup>  
Tarcízio Antônio Rego de Paula<sup>2</sup>  
Moacir Carreta Júnior<sup>1</sup>  
Elisa Cristina Silva Ribeiro<sup>1</sup>  
Luana Rodrigues Borboleta<sup>1</sup>  
Sérgio Luís Pinto da Matta<sup>3</sup>

## RESUMO

Foram utilizados testículos de seis cães adultos, entre 3 e 7 anos de idade, sem raça definida, mantidos no canil experimental do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa-MG. Os animais foram submetidos à biópsia unilateral testicular e castrados 60 dias depois. Não foram observadas alterações, no testículo biopsiado ou no testículo contralateral, na população celular no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero, assim como no rendimento intrínseco da espermatogênese e nas relações quantitativas entre células de Sertoli e células da linhagem espermatogênica.

Palavras chave: biópsia testicular, cães, espermatogênese.

## ABSTRACT

### EFFECTS OF TESTICULAR INCISIONAL BIOPSY ON THE INTRINSIC YIELD OF SPERMATOGENESIS AND SERTOLI CELLS INDEX IN DOGS

Testicles of six adult dogs between 3 and 7 years of age were used, from animals without defined race which were kept at the experimental kennel of the Department of Veterinary Medicine of the Federal University of Viçosa, MG. The animals were submitted to a unilateral testicular biopsy and were castrated 60 days later. No alterations were observed, either in the testicle subjected to the biopsy or in the lateral testicle, on the cell population at the stage 1 of the seminiferous epithelium cycle, as well as on the intrinsic yield of spermatogenesis and on the quantitative relationships between Sertoli cells and germ cells.

Key words: testicular biopsy, dogs, spermatogenesis

<sup>1</sup>Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, MG. 36570-000 Viçosa, MG. (Bolsista CNPq).

<sup>2</sup>Professor/Pesquisador, Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, MG. E-mail: tarcizio@ufv.br.

<sup>3</sup>Professor/Pesquisador, Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa, MG.

## INTRODUÇÃO

A biópsia incisional testicular é uma técnica extremamente útil na verificação do processo espermatogênico em animais e humanos com distúrbios da fertilidade, determinando seguramente alterações como aplasia das células germinais, hipoespermatogênese, hipogonadotropismo, inflamações e neoplasias (Lopate *et al*, 1989; Threlfall & Lopate, 1993; Attia *et al*, 2000). O estudo qualitativo do epitélio seminífero e o quantitativo das relações entre as diferentes gerações celulares que o compõem são imprescindíveis para o diagnóstico final, auxiliando na prescrição de um protocolo de tratamento e no prognóstico (França *et al*, 1995; Threlfall & Lopate, 1993; Russell *et al*, 1993; Wing & Christensen, 1982). Fragmentos testiculares obtidos por biópsia incisional fornecem amostragem significativa de parênquima testicular (Hunt & Foote, 1997), provendo informações que são representativas para ambos os testículos quando estes apresentam tamanhos comparáveis (Lopate *et al*, 1989). Assim, a biópsia testicular pode também ser usada na descrição histológica quantitativa e qualitativa do parênquima testicular em espécies silvestres, sem a necessidade de castração (Bittencourt, 2003; Guião Leite, 2002).

A biópsia testicular é utilizada com receio devido à possibilidade do ato cirúrgico ocasionar lesões no parênquima testicular e afetar a qualidade espermática e a fertilidade (Attia *et al*, 2000; Threlfall & Lopate, 1993), por invadir a barreira hemato-testicular (Attia *et al*, 2000). Algumas lesões podem ser observadas pelo ato cirúrgico, como aderência e fibrose local, porém sem interferir com a função testicular no testículo biopsiado ou no testículo contralateral (Lopate *et al*, 1989). Hunt e Foote (1997), observaram em cães um pequeno decréscimo no número de espermatozoides ejaculados e no tamanho testicular, sem alteração na frequência relativa dos estádios do ciclo do epitélio seminífero à longo prazo. Attia *et al* (2000) relatam a formação de anticorpos antiespermatozoides após biópsia testicular, mas não o suficiente para interferir na produção e na motilidade destes de forma negativa.

O testículo é constituído por dois compartimentos: o tubular e o intertubular. No primeiro, localizam-se as células germinativas e as células de Sertoli e, no segundo, está todo o aporte de vasos sanguíneos e linfáticos,

células de Leydig, fibroblastos, macrófagos e mastócitos. As células direta ou indiretamente envolvidas na produção dos gametas masculinos: (células de Sertoli, células germinativas, células de Leydig, células mióides peritubulares, leucócitos, etc.) mantêm um sistema parácrino/autócrino, que modula uma intrincada rede de interação celular, fundamental para o perfeito funcionamento do testículo (Schlatt *et al*, 1997).

Transversalmente ao epitélio do túbulo seminífero, são arrançadas cerca de quatro gerações de células da linhagem espermatogênica em diferentes fases de desenvolvimento. As gerações mais imaturas estão dispostas junto à base e as gerações mais avançadas, próximo à luz do túbulo. Cada geração apresenta um desenvolvimento progressivo e rigorosamente sincronizado com as demais, formando um fluxo em direção à luz do túbulo, onde serão liberadas como espermatozoides. Pode-se observar uma cíclica sucessão de oito arranjos distintos entre as diferentes gerações, denotando os estádios do ciclo do epitélio seminífero, segundo o método da morfologia tubular (Berndtson, 1977). A duração do processo espermatogênico no cão é de aproximadamente 60 dias, ou seja, é o tempo necessário para uma espermatogônia ser liberada na luz do túbulo seminífero sob a forma de espermatozoides. Assim, findo este prazo, nenhuma geração destas células estaria sob efeito direto de determinada alteração testicular, por exemplo, uma biópsia.

As razões entre as populações das diferentes gerações de células germinativas em secções transversais de túbulos, no estádio I do ciclo do epitélio seminífero, constituem o rendimento intrínseco da espermatogênese, sendo uma maneira bastante acurada de se analisar a eficiência do processo espermatogênico.

Esta abordagem, na realidade, permite comparações entre diferentes espécies, servindo ainda como fator de correção para as contagens obtidas através de diferentes metodologias e com cortes histológicos de espessuras variadas (Paula, 1999). Classicamente, três índices são utilizados para avaliação das diferentes fases da espermatogênese: a) o coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais, o qual quantifica o grau de perdas celulares na fase espermatogonial ou proliferativa; b) o rendimento meiótico, que avalia a

eficiência das duas divisões meióticas; c) e o rendimento geral da espermatogênese, no qual a eficiência do processo espermatogênico como um todo é investigada.

Neste sentido, este estudo objetivou a avaliação do efeito da biópsia unilateral testicular, 60 dias após a cirurgia, em ambos os testículos, sobre a população celular no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero, assim como o rendimento intrínseco da espermatogênese e as relações quantitativas entre células de Sertoli e células da linhagem espermatogênica.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados testículos de seis cães adultos, entre 3 e 7 anos de idade, sem raça definida, mantidos no canil experimental do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, MG. Os cães foram submetidos à biópsia unilateral testicular e castrados 60 dias depois. O fragmento obtido por biópsia foi utilizado como controle, enquanto ambos os testículos foram avaliados quanto aos efeitos da cirurgia sobre o processo espermatogênico.

Para a de biópsia testicular, o animal foi mantido sob anestesia geral, pela associação quetamina e xilazina na dose 10 mg/kg e 1 mg/kg, respectivamente. A pele do escroto e a túnica fibrosa foram incisionadas, expondo a albugínea testicular. Um fragmento cilíndrico de quatro milímetros de diâmetro e cinco milímetros de comprimento foi retirado com auxílio de um bisturi circular e imediatamente imerso em solução de glutaraldeído a 4% em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,4. A albugínea testicular, a túnica fibrosa e a pele foram suturadas, separadamente, com pontos simples com fio poliglactina 910 (Vicril®, 3-0 – Ethicon). Para a castração, foi utilizada técnica convencional. Nenhum dos animais foi sacrificado após a experimentação.

Os testículos castrados foram seccionados sagitalmente e imediatamente imersos em solução fixadora de glutaraldeído a 4% em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,4. Após a fixação, coletou-se de cada testículo um fragmento, em sua região média, para montagem de lâmina histológica. Para estudo ao microscópio de luz, tanto os fragmentos obtidos por biópsia como os fragmentos testiculares obtidos por castração foram desidratados em série crescentes de álcoois e incluídos em resina plástica à base de glicol

metacrilato. Com micrótomo rotativo dotado de navalha de vidro foram feitos cortes histológicos de quatro µm de espessura, os quais foram corados com azul de toluidina-borato de sódio.

Foram computadas as populações de espermatogônias do tipo A, espermátocitos primários, espermátides arredondadas e células de Sertoli, em dez secções transversais circulares de túbulos seminíferos, em cada animal. Através destas, foram calculados os rendimentos intrínsecos da espermatogênese, os quais correspondem ao coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais (população de espermátocitos primários/população de espermatogônias), rendimento meiótico (população de espermátides/população de espermátocitos primários), e rendimento geral da espermatogênese (população de espermátides arredondadas/população de espermatogônias). Os índices indicativos da capacidade suporte das células de Sertoli também foram calculados (total de células germinativas ou população de espermátides / população de células de Sertoli).

Todas as populações foram computadas no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero, segundo o método da morfologia tubular (Berndtson, 1977). As populações celulares obtidas foram corrigidas, tendo por base a fórmula de Abercrombie (1946) modificada por Amann (1962), que considera o diâmetro de seus núcleos e a espessura do corte histológico.

Foram realizados cálculos da média, desvio-padrão, coeficiente de variação e teste de diferença de médias populacionais (teste t de Student).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, as populações encontradas nos fragmentos obtidos por biópsia testicular, foram utilizados como controle para os efeitos do procedimento cirúrgico por refletirem os reais parâmetros quantitativos do processo espermatogênico. As populações das diferentes gerações celulares por secção transversal de túbulo, no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero, não apresentaram variações (p>0,05) (Tabela 1), entre os diferentes fragmentos de biópsia, testículo biopsiado e contralateral, sendo observados de 1,2 a 1,5 espermatogônia, 20 a 20,9 espermátocitos primários em leptóteno, 24,5 a 26,2 espermátocitos primários em

paquíteros, 71,2 a 72,3 espermátides arredondadas e 7,2 a 8,9 células de Sertoli. Estes valores foram semelhantes aos observados por Paula (1992), trabalhando com cães na mesma faixa etária. Assim, a biópsia testicular não afetou a população das diferentes gerações de células germinativas 60 dias depois.

Perdas celulares durante as divisões espermatogoniais podem ser consideravelmente altas, visto que o número de células entrando na fase meiótica deve ser ajustado para o número que a célula de Sertoli pode suportar (Roosen-Runge, 1973; Sharpe, 1994). No epitélio seminífero, a apoptose de células germinativas ocorre normalmente de forma espontânea ou em resposta a vários fatores, como quimioterapia, temperatura elevada, distúrbios hormonais e diminuição de fatores de crescimento (Blanco-Rodriguez & Martinez-Garcia, 1998; Henriksen & Parvinen, 1998; Sinha-Hikim & Swerdloff, 1999). O modo de degeneração das células germinativas é espécie-específico, mas, em geral, ocorre durante as divisões mitóticas e meióticas (Roosen-Runge, 1973), refletindo-se nos rendimentos intrínsecos da espermatogênese. Neste experimento, os índices do rendimento intrínseco da espermatogênese não foram afetados pela biópsia testicular, não revelando assim alterações significativas quando comparados os dados obtidos do fragmento de biópsia e dos testículos removidos 60 dias após a cirurgia (Tabela 2). Cerca de 15,8 a 16,4 espermátócitos primários foram formados a partir de uma espermatogônia do tipo A nos três fragmentos. Entre 2,7 e 3,0 espermátides foram produzidas a partir de um espermátócito primário. Como teoricamente cada espermátócito produziria 4 espermátides, houve uma perda estimada de 25 a 32,5 % durante o processo

meiótico nos três fragmentos, permanecendo dentro do esperado nesta espécie (França & Russell, 1998; Paula, 1992). Como não são significativas as perdas observadas durante a espermiogênese (Russell & Clermont, 1977), o número de espermátides arredondadas computadas no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero é considerado como a população de espermatozóides. Assim, o rendimento geral da espermatogênese observado no momento da biópsia e 60 dias depois, em ambos os testículos, permaneceu entre 51 e 65 espermatozóides originados de cada espermatogônia A, também de acordo com o observado em cães SRD na mesma faixa etária (Paula, 1992).

As células de Sertoli desempenham papel fundamental na regulação do processo espermatogênico (Russell & Griswold, 1993). Dentre as muitas funções desempenhadas por esta célula, incluem-se o suporte e a nutrição das células germinativas em desenvolvimento, a compartimentalização do epitélio seminífero, a liberação de espermatozóides no lume tubular, a secreção de fluidos e proteínas, a fagocitose de células germinativas em degeneração e do excesso de citoplasma das espermátides em espermição, etc. (França & Russell, 1998). Entre as células de Sertoli, há junções altamente especializadas, conhecidas como zônulas de oclusão ou "tight junctions". Estas junções formam a barreira de células de Sertoli (também conhecida como barreira hemato-testicular), a qual, além de controlar o fluxo de substâncias no epitélio seminífero, delimita dois compartimentos, o basal e o adluminal (Russell *et al*, 1990). Intervenções cirúrgicas testiculares que ocasionem lesões no parênquima testicular poderiam afetar a qualidade espermática e a fertilidade (Attia *et al*, 2000; Threlfall & Lopate, 1993), por invadir a barreira

**Tabela 1** - População celular por secção transversal de túbulo seminífero no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero dos fragmentos provenientes de biópsia e de ambos os testículos castrados após 60 dias \*.

	População celular				
	Espermatogônia Tipo A	Espermátócito Primário Pré-Leptóteno/Leptóteno	Espermátócito Primário Paquíteno	Espermátide Arredondada	Célula de Sertoli
Biópsia	1,3±0,4 (30,8)	20,3±5,3 (26,1)	25,7±5,2 (20,2)	71,3±17,8 (25,0)	8,9±1,8 (20,2)
Castração contralateral	1,2±0,3 (25,0)	20,0±2,2 (11,0)	24,5±3,1 (12,6)	72,3±9,3 (12,9)	7,2±1,4 (19,4)
Castração biopsiado	1,5±0,5 (33,3)	20,9±2,3 (11,0)	26,2±3,8 (14,5)	71,2±14,6 (20,5)	8,2±1,8 (21,9)

\*Dados apresentados em média ± desvio-padrão (coeficiente de variação).

**Tabela 2** - Índices de célula de Sertoli e rendimentos intrínsecos da espermatogênese por secção transversal de túbulo seminífero do fragmento de biópsia e de ambos testículos de animais castrados após 60 dias\*.

Tratamento	Índices de célula de Sertoli		Rendimento intrínseco da espermatogênese		
	Total de células espermatogênicas	Espermátides arredondadas	CEME	IM	RGE
Biópsia	13,3±1,9 (14,3)	8,0±1,3 (16,25)	16,4±4,6 (28,0)	2,8±0,3 (10,7)	55,9±10,1 (18,1)
Castração contralateral	16,9±3,5 (20,7)	10,4±3,0 (28,8)	18,3±5,2 (28,4)	3,0±0,6 (20,0)	65,3±15,5 (23,7)
Castração biopsiado	15,0±3,7 (24,7)	8,9±2,3 (25,8)	15,8±6,3 (39,9)	2,7±0,4 (14,8)	51,0±12,0 (23,5)

\*Dados apresentados em média mais ou menos desvio-padrão (coeficiente de variação).

Coeficiente de eficiência de mitoses espermatogoniais (CEME); Índice meiótico (IM); rendimento geral da espermatogênese (RGE)

hemato-testicular, expondo o conteúdo celular haplóide do compartimento adluminal (Attia *et al*, 2000).

A população de células de Sertoli no epitélio seminífero é constante ao longo de toda a vida do animal (França & Russell, 1998; Sharpe, 1994; França, 1991; Patil & Saidapur, 1991; Wing & Christensen, 1982). Em cães adultos, a população deste tipo celular permaneceu constante em animais de 1 a mais de 10 anos de idade (Paula, 1992). Em cada espécie, a célula de Sertoli suporta um número limitado de células germinativas (França *et al*, 1999; França & Russell, 1998; Orth *et al*, 1988), conhecido como índice de célula de Sertoli. Devido a esta característica, esta célula é utilizada como uma referência para analisar e quantificar a espermatogênese (Paula, 1999). Neste experimento, embora a população de células de Sertoli tenha apresentado médias inferiores em ambos os testículos, 60 dias após a biópsia, estas não diferiram estatisticamente em relação à população observada no momento da biópsia testicular (Tabela 1),

permanecendo dentro da amplitude observada por Paula (1992) em 40 animais.

Os índices de células de Sertoli por espermátide arredondada e pelo número total de células espermatogênicas, no estágio 1 do ciclo do epitélio seminífero, não foram alterados significativamente nos três fragmentos estudados (Tabela 2), denotando que o processo de biópsia testicular não afeta a capacidade de suporte das células de Sertoli, que permaneceram entre 8 e 10,4 espermátides arredondadas e entre 13,3 e 16,9 células espermatogênicas totais (Tabela 2), dentro do limite observado por Paula (1992) em cães na mesma faixa etária.

## CONCLUSÕES

A biópsia testicular incisional unilateral em cães SRD não revelou quaisquer alterações sobre a população celular, o rendimento intrínseco do processo espermatogênico e os índices de células de Sertoli, seja no testículo biopsiado, seja no testículo contralateral, após um período de 60 dias.

## REFERÊNCIAS

- ABERCROMBIE, M. Estimation of nuclear populations from microtome sections. *Anatomical Record* 94: 238-248, 1946.
- AMANN, R.P. Reproductive capacity of dairy bulls. III. The effect of ejaculation frequency, unilateral vasectomy and age on spermatogenesis. *American Journal of Anatomy* 110, (1): 49-67, 1962.
- ATTIA, K.A., ZAKI, A.A., EILTS, B.E., PACCAMONT, D.L., HOSGOOD, G., DIETRICH, M.A., HOROHOV, D.W., BLOWIN, D.C. Anti-sperm antibodies and seminal characteristics after testicular biopsy or epididymal aspiration in dogs. *Theriogenology* 53: 1355-1363, 2000.
- BERNDTSON, W.E. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. *Journal of Animal Science* 44, (5): 818-83, 1977.
- BITTENCOURT, V.L. Avaliação morfofuncional do testículo e do processo espermatogênico do lobo guará (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1811), adulto. Viçosa: Departamento de veterinária, Centro de Ciências Biológicas da UFV, 2003. 65p. Dissertação (Dissertação de mestrado).
- BLANCO-RODRIGUEZ, J., MARTÍNEZ-GARCIA, C. Apoptosis pattern elicited by several apoptogenic agents on the seminiferous epithelium of the adult rat testis. *Journal of Andrology* 19 (4): 487-497, 1998.

- GUIÃO LEITE, F.L. Análise morfofuncional do testículo e do processo espermatogênico da onça parda (*Puma concolor*) adulta, Viçosa: Departamento de veterinária, Centro de Ciências Biológicas da UFV, 2002. 65p. (Dissertação de mestrado).
- FRANÇA, L.R. Análise morfofuncional da espermatogênese de suínos adultos da raça Piau. 1991. 185p. Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais. (Tese de doutorado).
- FRANÇA, L.R., YE, S.-J., YING, L., SANDBERG, M., RUSSELL, L.D. Morphometry of rat germ cells during spermatogenesis. *Anat. Rec.* 241:181-204, 1995.
- FRANÇA, L.R. & RUSSELL, L.D. The testis of domestic animals. In: Regadera, J. & Martinez-Garcia (eds.). *Male reproduction. A multidisciplinary overview.* Churchill Livingstone, Madrid, 1998. p.197-219.
- FRANÇA, L.R., BECKER-SILVA, S. C., CHIARINI-GARCIA, H. Spermatogenic cycle length in goats. *Tissue & Cell* 31:3, 1999.
- HENRIKSEN, K. & PARVINEN, M. Stage-specific apoptosis of male germ cells in the rat: mechanisms of cell death studied by supravital squash preparations. *Tissue & Cell* 30 (6): 692-701, 1998.
- HUNT W.L. & FOOTE R.H. Effect of repeated testicular biopsy on testis function and semen quality in dogs. *Journal of Andrology* 18(6):740-744, 1997.
- LOPATE, C., THRELFALL, W.R., ROSOL, T.J. Histopatologic and gross effects of testicular biopsy in the dog. *Theriogenology* 32(4):585-602, 1989.
- 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* 122:787-794, 1988.
- PATIL, S.B. & SAIDAPUR, S.K. Kinetics of spermatogenesis in the wild squirrel *Funambulus palmarum* (Linnaeus). *Acta Anatomica (Basel)* 141(4):352-363, 1991.
- PAULA, T.A.R. Estudo histológico quantitativo da atividade espermatogênica de cães s.r.d. em diferentes faixas etárias após a puberdade. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais. UFMG, 1992. 62p. (Dissertação de mestrado).
- PAULA, T.A.R. Avaliação Histológica e Funcional do Testículo de Capivaras Adultas (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 1999. 84p. (Tese de doutorado).
- ROOSEN-RUNGE, E.C. Germinal-cell loss in normal metazoan spermatogenesis. *Journal of Reproduction and Fertility* 35: 339-348, 1973.
- RUSSELL, L.D., CLERMONT, Y. Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats. *Anatomical Record* 187:347-366, 1977.
- RUSSELL, L.D., REN, H.P., SINHA-HIKIN, I., SCHULZE, W., SINHA-HIKIN, A.P. A comparative study in twelve mammalian species of volume densities, volumes and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to the Sertoli cell. *American Journal of Anatomy* 188 (1): 21-30, 1990.
- RUSSELL, L.D., CORBIN, T.J. BORG, K.E., FRANÇA, L.R., GRASSO, P., BARTKE, A. Recombinant human follicle-stimulating hormone is capable of exerting a biological effect in the adult hypophysectomized rat by reducing the numbers of degenerating germ cells. *Endocrinology* 133 (6): 2062-2070, 1993.
- RUSSELL, L. D. & GRISWOLD, M. D. *The Sertoli cell.* (ed.) Cache River Press, Clearwater, Florida. 1993. 801p.
- SCHLATT, S., MEINHARDT, A. AND NIESCHLAG, E., Paracrine regulation of cellular interactions in the testis: factors in search of a function. *European Journal of Endocrinology* 137:107-117, 1997.
- SHARPE, R.M.. Regulation of spermatogenesis. In. Knobil, E. & Neil, J. D. (eds.) *The physiology of reproduction*, 2ed. Raven Press, New York 1994, p.1363-1434.
- SINHA-HIKIM, A.P. & SWERDLOFF, R. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Reviews of Reproduction* 4:38-47, 1999.
- THRELFALL, W.R. & LOPATE, C. Testicular biopsy. In. MCKINNON, A.O., VOSS, J.L. (eds), *Equine Reproduction.* London: Lea & Febiger, 1993, p. 943-949.
- WING, T.Y. & CHRISTENSEN, A.K. Morphometric studies on rat seminiferous tubule. *American Journal of Anatomy* 165:13-25, 1982.