

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA

**ANÁLISE ESTEREOLÓGICA E FUNCIONAL DO TESTÍCULO DE RÃS-TOURO
(*Lithobates catesbeianus*) SEXUALMENTE MADURAS, COM ÊNFASE NA
CINÉTICA ESPERMATOGONIAL, PROLIFERAÇÃO E NÚMERO DE CÉLULAS DE
SERTOLI POR CISTO ESPERMATOGÊNICO**

MESTRANDO: LUIZ HENRIQUE DE CASTRO ASSIS

ORIENTADOR: LUIZ RENATO DE FRANÇA

CO-ORIENTADORA: TÂNIA MARA SEGATELLI

Belo Horizonte

2011

LUIZ HENRIQUE DE CASTRO ASSIS

**ANÁLISE ESTEREOLÓGICA E FUNCIONAL DO TESTÍCULO DE RÃS-TOURO
(*Lithobates catesbeianus*) SEXUALMENTE MADURAS, COM ÊNFASE NA
CINÉTICA ESPERMATOGONIAL, PROLIFERAÇÃO E NÚMERO DE CÉLULAS DE
SERTOLI POR CISTO ESPERMATOGÊNICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Biologia Celular.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador: Luiz Renato de França

Co-orientadora: Tânia Mara Segatelli

Belo Horizonte

2011

Assis, Luiz Henrique de Castro

Análise estereológica e funcional do testículo de rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*) sexualmente maduras, com ênfase na cinética espermatogonial, proliferação e número de células de Sertoli por cisto espermatogênico. [manuscrito] / Luiz Henrique de Castro Assis. – 2011. 97 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Luiz Renato de França. Co-orientadora: Tânia Mara Segatelli.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Espermatogenese - Teses. 2. Rã touro - Teses. 3. Espermatogônias - Teses. 4. Sertoli, Células de - Teses. 5. Leydig, Células de - Teses. 6. Biologia celular – Teses. 7. Célula peritubular mióide. I. França, Luiz Renato de. II. Segatelli, Tânia Mara. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 597.8-146.32



Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular

**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
MESTRADO DE**

LUIZ HENRIQUE DE CASTRO ASSIS

198/2011/01
entrada
1º/2009
2009692904

Às nove horas do dia 25 de fevereiro de 2011 reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: **“Análise Estereológica e funcional do testículo de rãs-touro (*Lithobates Catesbeianus*) sexualmente maduras, com ênfase na cinética espermatogonial, proliferação e número de células de sertoli por cisto espermatogênico”**, requisito final para obtenção do Grau de Mestre em Biologia Celular, área de concentração: **Biologia Celular**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Luiz Renato França**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Luiz Renato França	UFMG	APROVADO
Dra. Elizete Rizzo	UFMG	APROVADO
Dr. Hugo Pereira Godinho	PUC/MG	APROVADO

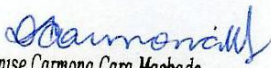
Pelas indicações, o candidato foi considerado: APROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato, pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 25 de fevereiro de 2011.**

Dr. Luiz Renato de França
(Orientador)

Dra. Elizete Rizzo

Dr. Hugo Pereira Godinho


Profa. Denise Carmona Cara Machado
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular, ICBA/UFMG

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Dedico este árduo trabalho àqueles que dedicam a sua vida e o seu amor a mim. Meu querido Pai, Sirlei Assis e a minha querida Mãe, Vera Lúcia.

AGRADEÇO

Ao Professor Luiz Renato de França, pela brilhante orientação, pelos ensinamentos e por todas as oportunidades oferecidas.

À professora Tânia Mara Segatelli, pelo valoroso auxílio, pela simpatia e amizade.

Às professoras Elizete Rizzo e Cleida Aparecida de Oliveira, por me abrirem as portas do Departamento de Morfologia.

À coordenação e professores do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular pelo empenho e dedicação ao programa.

À grande amiga Sibebe, por toda ajuda durante os últimos dois anos, pelo carinho e dedicação aos alunos da pós-graduação.

Aos amigos Sérgio Ricardo Batlouni e Samyra Nassif, pelos valiosos ensinamentos durante o período de iniciação científica.

Aos amigos Guilherme Costa e Gleide Fernandes de Avelar, pela valiosa amizade e pelo empenho contagiante em ajudar sempre ao próximo.

À amiga Sarah Alves Auharek pelos momentos de descontração ao microscópio e à valiosa ajuda nas análises estatísticas.

Ao meu irmão Vinícius, por todos os anos de sincera amizade.

À Hellen Vaz, pela amizade sincera e carinhosa.

Aos amigos Emerson, Graziela, Poliana, Hermano, Idarly, Marco, Antonieta, Priscila, Sâmia e Junior, exemplos de amizade verdadeira.

A todos os companheiros do Laboratório de Biologia Celular, dos tempos de iniciação científica e atuais.

À técnica do Laboratório de Biologia Celular, Mara Livia, pela amizade e pelo excelente apoio.

Aos companheiros de Pós-Graduação Marcos Augusto de Sá, Francisco Arreguy e Fernando de Abreu Mauad pela amizade e companheirismo.

Aos meus sogros Geraldo e Rosely, minha segunda família.

Ao meu grande Amor, Priscila Vargas, pelo companheirismo, pela cumplicidade e pelo amor puro e sincero.

À minha querida avó Célia, cujo carinho me dá forças para superar toda e qualquer adversidade.

Ao meu avô José de Assis, pelo exemplo de caráter e dedicação à família e por todo carinho.

Aos meus pais Sirlei e Vera, e minhas irmãs Maria Lúcia e Marina, que são o meu alicerce.

E a Deus, que hoje me permite agradecer a todos acima por mais este passo tão importante na minha vida.

Esta dissertação foi desenvolvida no Laboratório de Biologia Celular do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, sob orientação do Prof. Dr. Luiz Renato de França e co-orientação da Prof^a. Dr^a. Tânia Mara Segatelli, com o auxílio da seguinte instituição:

- ✓ **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**

*"A ciência serve para nos dar uma idéia de
quão extensa é a nossa ignorância."*

(Félicité Robert de Lamennais)

RESUMO

A espermatogênese é um processo cíclico e complexo que resulta na produção diária de milhões de espermatozoides. Embora existam particularidades entre as diferentes espécies, este processo se apresenta bem conservado entre as diversas classes de vertebrados, e as interações morfofuncionais entre as células somáticas e germinativas (CG) são cruciais para o seu sucesso. A rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) é uma espécie de anuro que foi introduzida no Brasil em torno de 1930, devido a sua substancial importância econômica. Embora seja utilizada como modelo experimental em pesquisas biológicas, incluindo-se a biologia da reprodução, o conhecimento acerca da estrutura e função testiculares desta espécie é ainda escasso. Neste sentido, os objetivos principais da presente investigação foram os de se realizar análises histológicas, morfométricas e funcional do testículo de rãs-touro sexualmente maduras, com ênfase na cinética espermatogonial, bem como na proliferação dos elementos somáticos [Célula de Sertoli (CS); Célula de Leydig (CL); e Célula Peritubular Mióide (CPM)] e número de CG e CS por cisto espermatogênico. Dezesesseis rãs-touro foram utilizadas e, com intuito de se estimarem índices mitóticos, oito delas receberam uma única injeção intracelomática de timidina triciada ($1\mu\text{Ci/g/PC}$) e tiveram os seus testículos coletados 2 a 3 horas após a injeção. Os animais foram anestesiados e tiveram os testículos removidos, seccionados transversal e longitudinalmente, de forma a se obterem fragmentos que representassem seis diferentes regiões previamente definidas deste órgão. Estes fragmentos foram então fixados por imersão em glutaraldeído 4%, rotineiramente incluídos em glicol-metacrilato e processados para análises histomorfométricas e radioautográficas. Os resultados obtidos mostraram que não houve diferença na disposição dos túbulos seminíferos nas diferentes regiões investigadas, bem como na atividade espermatogênica e na proporção dos compartimentos tubular e intertubular, indicando que os elementos constituintes do parênquima testicular em rãs-touros apresentam distribuição homogênea. Ainda, os resultados obtidos mostraram que todas as rãs-touros investigadas encontravam-se em pleno período reprodutivo. Baseado nas contagens e caracterização morfológica das diferentes células espermatogênicas, estimou-se em oito o número de gerações de espermatogônias nesta espécie de anfíbio, sendo uma delas do tipo A e 7 de espermatogônias do tipo B. Conforme ocorre em vertebrados inferiores, os volumes nuclear, citoplasmático e celular das CG decresceram acentuadamente de espermatogônia do tipo A até espermátides, tendo no entanto um pequeno mas substancial aumento em espermátocitos primários em leptóteno/zigóteno. Já o diâmetro e volume nuclear das CS mostraram-se estáveis nos cistos espermatogoniais e espermátocitários (até diplóteno), aumentando marcadamente até espermátide final. Conforme esperado, o número de CG cresceu de forma drástica desde os cistos de espermatogônias do tipo A até os cistos de espermátides iniciais. Por outro lado, o número de CS aumentou gradualmente a partir dos cistos de espermatogônias do tipo B finais, com novo incremento no final da fase espermátocitária, tendendo à estabilização na fase espermiogênica. Aparentemente, a frequência dos cistos espermatogênicos refletiu a duração de cada uma das três fases da espermatogênese, estimada previamente em nosso laboratório, onde a fase espermatogonial foi mais longa do que as outras duas fases. Embora de pequena magnitude, apoptoses parecem ocorrer nas três fases do processo espermatogênico, fazendo com que pouco mais de 50% das

espermátides teoricamente esperadas, baseada nas contagens celulares, fossem produzidas. À semelhança do encontrado para outros parâmetros, os índices de proliferação das células somáticas não mostraram diferenças significativas entre as seis diferentes regiões testiculares avaliadas. Quanto a avaliação abordando a proliferação dos elementos somáticos em relação aos diferentes tipos de cistos espermatogênicos, as CS apresentaram-se preferencialmente associadas à espermatogônias do tipo B, sugerindo uma adequação do número de CS ao aumento marcante do número de CG que ocorre nesta etapa. Já as CL e CPM não apresentaram índices de proliferação que permitissem inferir claramente uma associação preferencial a determinado tipo de cisto. Finalmente, além de ter caracterizado mais detalhadamente a função testicular em rãs-touros e permitir a comparação dos dados obtidos com àqueles de outras espécies de vertebrados, esperamos que os resultados inéditos obtidos no presente estudo possam ser de grande valia em futuras investigações abordando este modelo experimental.

Palavras chave: espermatogênese, rã-touro, *Lithobates catesbeianus*, espermatogônia, célula de Sertoli, célula de Leydig, célula peritubular mióide.

ABSTRACT

Spermatogenesis is a complex and cyclic process that results in the daily production of millions of sperm. Although there are particularities among different species, this process seems to be very well conserved in the different vertebrate classes, and the morphofunctional interactions between somatic cells and germ cells (GC) are crucial to its success. Due to its substantial economic importance, the bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) is an amphibian species that was introduced in Brazil around 1930. Although this species is a useful model in biological research, including studies related to the reproductive biology, the knowledge of its testicular structure and function is still scarce. In this regard, the main objectives of the present study were to perform a careful histological and morphofunctional analysis of sexually mature bullfrog testis, with emphasis on the spermatogonial kinetics as well as in the proliferation rate of testis somatic elements [Sertoli cell (SC); Leydig cell (LC), and peritubular myoid cell (PMC)] and the number of GC and SC per spermatogenic cyst. For this purpose, sixteen bullfrogs were used and, aiming to estimate the proliferation rates, eight of them received a single intracelomic injection of tritiated thymidine ($1\mu\text{Ci/g/BW}$) and their testes were collected 2 to 3 hours after injection. All animals were anesthetized and their testis were removed and transversely and longitudinally sectioned, in order to obtain fragments that represented six different testis regions previously defined. These fragments were then fixed by immersion in 4% glutaraldehyde, routinely embedded in glycol-methacrylate and processed for histomorphometric and radioautography analysis. No evident differences were observed for the arrangement of the seminiferous tubules as well as for the spermatogenic activity and the volume densities (%) of tubular and intertubular compartments in the six different regions investigated. These results indicate that the components of the testicular parenchyma in the bull-frog exhibit a homogeneous distribution. Also, the results showed that all bull-frogs investigated presented full spermatogenic activity. Based on the morphological characterization of the different spermatogenic cells and on the germ cells counts per cyst, eight spermatogonial generations were found for this species - one of type A and seven of type B spermatogonia. As observed for other lower vertebrates species investigated, the GC nuclear, cytoplasmic and cellular volumes decreased strikingly from type A spermatogonia to spermatids. However, a small but significant increase in the leptotene/zygotene primary spermatocytes volume was observed. The SC nuclear diameter and volume were relatively stable in the spermatogonial and meiotic cysts (up to diplotene), increasing markedly thereafter until late spermatid. As expected, the number of GC per cyst increased dramatically from type A spermatogonia to early spermatids. Moreover, the number of SC increased gradually from type A to late type B spermatogonial cysts, with further increase in the late meiotic phase (diplotene) of spermatogenesis, tending to stabilize thereafter. Apparently, the spermatogenic cysts frequencies reflected the duration of each of the three phases of spermatogenesis (previously estimated in our laboratory) where espermatogonial phase was much longer than the two other phases. Although at a small magnitude and based on the GC counts, apoptosis seems to occur in all the three phases of spermatogenesis, resulting in the production of 50% of the spermatids theoretically expected. Similar to the findings related to the other parameters, the somatic cells proliferation ratios showed no significant differences among the six different regions evaluated. However, in relation to

the proliferation rates of somatic cells associated or close to the different types of spermatogenic cysts, SC proliferation was preferentially associated with type B spermatogonia, suggesting an adequacy of the SC number to support the highly increase of GC numbers that occurs in this particular spermatogenic cysts. On the other hand, no clear trend was observed for the LC and PMC. Finally, besides characterizing more accurately the testis structure and function in bullfrogs, allowing comparison of these data with those obtained for other vertebrates species, we expect that the results found in the present study may be very useful in future research addressing the *Lithobates catesbeianus* as an experimental model.

Keywords: Spermatogenesis, bullfrog, *Lithobates catesbeianus*, spermatogonia, Sertoli cell, Leydig cell, peritubular myoid cell.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1.....	64
Figura 2.....	65
Figura 3.....	66
Figura 4.....	68
Figura 5.....	70
Figura 6.....	71
Figura 7.....	72
Figura 8.....	74
Figura 9.....	75
Figura 10.....	76
Figura 11.....	76
Figura 12.....	77
Figura 13.....	78
Figura 14.....	79
Figura 15.....	79
Figura 16.....	80
Figura 17.....	81
Figura 18.....	82
Figura 19.....	83
Tabela 1.....	84
Tabela 2.....	85

SUMÁRIO

1. Introdução e Revisão de Literatura	17
1.1. Os Anfíbios.....	17
1.2. A Rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>).....	17
1.3. Testículos de Anfíbios.....	18
1.3.1. Determinação sexual.....	18
1.3.2. Estrutura do testículo.....	19
1.4. Processo Espermatogênico.....	21
1.4.1. Fase proliferativa ou espermatogonial.....	21
1.4.2. Fase meiótica ou espermatocitária.....	22
1.4.3. Fase espermiogênica.....	23
1.5. Elementos Somáticos do Testículo.....	23
1.5.1. Células peritubulares mióides e células de Leydig.....	24
1.5.2. Células de Sertoli.....	25
1.5.3. Proliferação dos elementos somáticos.....	25
1.6. Apoptose de Células Germinativas.....	26
1.7. Morfometria do Testículo.....	27
2. Justificativa e Objetivos	31
2.1. Justificativa.....	31
2.2. Objetivos.....	32
2.2.1. Objetivo geral.....	32
2.2.2. Objetivos específicos.....	32
3. Materiais e Métodos	35
3.1. Animais Experimentais.....	35
3.2. Coleta, Processamento e Fixação do Material.....	35
3.2.1. Coleta e fixação.....	35
3.2.2. Processamento histológico.....	35
3.2.3. Marcação com timidina triciada.....	36
3.2.4. Processamento rádioautográfico.....	37
3.3. Índice Gonadossomático.....	37
3.4. Análises Histológicas Qualitativas.....	38
3.5. Morfometria do Testículo.....	38
3.5.1. Proporção volumétrica.....	38
3.5.2. Classificação das gerações espermatogoniais.....	38
3.5.3. Cálculo do volume das células germinativas e de Leydig.....	39
3.5.4. Número de células de Sertoli e células germinativas por cisto espermatogênico e volume nuclear das células de Sertoli.....	39
3.6. Frequência dos cistos espermatogênicos e dos cistos contendo células em apoptose.....	40
3.7. Índices de Proliferação dos Elementos Somáticos do Testículo.....	40
3.8. Análises Estatísticas.....	41
4. Resultados	43
4.1. Biometria.....	43
4.2. Análise Histológica do Testículo e Proporção dos Compartimentos Tubular e Intersticial.....	43
4.3. Gerações Espermatogoniais.....	44

4.4. Morfometria das Células Germinativas, Células de Sertoli e de Leydig.....	44
4.5. Frequência dos Cistos Espermatogênicos.....	45
4.6. Proliferação das Células Somáticas do Testículo.....	46
5. Discussão.....	49
5.1. Análise Histológica do Testículo e Proporção dos compartimentos Tubular e Intersticial.....	49
5.2. Gerações Espermatogoniais.....	51
5.3. Morfometria das células Germinativas, Células de Sertoli e de Leydig.....	52
5.3.1. Células germinativas.....	52
5.3.2. Células de Sertoli.....	53
5.3.3. Células de Leydig.....	55
5.4. Frequência dos Cistos Espermatogênicos.....	55
5.5. Proliferação das Células Somáticas do Testículo.....	57
6. Conclusões.....	61
Figuras e Tabelas.....	63
Anexos.....	86
Referências.....	88

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução e Revisão de Literatura

1.1. Os Anfíbios

Os Amphibia ou Lissamphibia representam a classe mais primitiva de vertebrados terrestres na qual, por estratégias reprodutivas, a maioria das espécies na fase adulta necessita retornar a água para a procriação e o subsequente desenvolvimento do estágio larval (Lofts, 1984). Portanto, esses animais possuem duas fases distintas de vida, uma na água de forma similar aos peixes e outra em ambiente terrestre, após sofrerem verdadeira metamorfose em sua anatomia e fisiologia (Pierantoni, 1998). O nome Lissamphibia (do grego *liss* = liso) é proveniente da característica derivada mais destacada entre os anfíbios existentes, o tegumento liso e úmido responsável por parte substancial das trocas gasosas (Pough *et al.*, 2008).

Atualmente, existem mais de 4.800 espécies de anfíbios que estão divididas entre três ordens (Figura 01): Anura (sapos e rãs), a mais numerosa e diversificada; Urodela (salamandras); e Gymnophiona (cecílias ou ápodes) (Pough *et al.*, 2008).

1.2. A Rã-touro (*Lithobates catesbeianus*)

No Brasil, as rãs se destacam por várias espécies de grande porte que pertencem à família Leptodactylidae (rã-manteiga, rã-pimenta e gia) e Ranidae (rã-touro). A rã-touro (*Lithobates catesbeianus*, também conhecida por um segundo nome científico, *Rana catesbeiana*) pertence à família Ranidae por possuir membranas natatórias entre os dedos dos membros posteriores, característica que é exclusiva dessa família (Pauly *et al.*, 2009) (Figura 02). Pode atingir tamanhos de até 20 cm de comprimento do focinho à região sacral e mais 20 cm pelo comprimento dos seus membros. O nome popular “rã-touro” (bullfrog) é derivado do forte cochar dos machos, usado para atrair as fêmeas para o acasalamento, semelhante em suas proporções ao mugido de um touro (Vieira, 1993).

Oriunda da América do Norte, a rã-touro foi introduzida no Brasil na década de 1930 por empreendedores que viram nessa espécie grandes potencialidades comerciais pelas qualidades nutricionais e sabor delicado e agradável de sua carne.

Provavelmente devido a estas características favoráveis, algumas sociedades humanas utilizam a *Lithobates catesbeianus* como principal fonte de proteína na alimentação (Stebbins & Cohen, 1995).

Além dessa destacada importância comercial, devido a sua fácil disponibilidade no mercado, facilidade de manutenção e manejo em condições de laboratório, esta espécie vem se apresentando também como modelo experimental em pesquisas nas áreas biológicas, farmacêuticas, medicina (Lofts, 1984) e em biologia da reprodução, particularmente na avaliação da estrutura testicular (Sprando & Russell, 1988; Pudney, 1993; Sasso-Cerri *et al.*, 2004, 2005, 2006).

1.3. Testículos de Anfíbios

1.3.1. Determinação sexual

Nas espécies de vertebrados até então estudadas a determinação sexual ocorre através de mecanismos genéticos e/ou ambientais (Uller *et al.*, 2007). Normalmente, os diferentes sexos se desenvolvem pela ação de genes da determinação sexual, e a presença de cromossomos sexuais é uma clara indicação da influência genética neste processo (Hayes, 1998). Apesar de muitos anfíbios não apresentarem cromossomos sexuais morfologicamente distinguíveis (Hayes, 1998), estudos têm demonstrado a participação genética efetiva no controle da determinação sexual nesta classe de vertebrados. A descrição do gene DM-W, ligado ao desenvolvimento do ovário em *Xenopus laevis*, é a primeira evidência de um gene de determinação sexual nessa classe de vertebrados (Yoshimoto *et al.*, 2008). Atualmente, o conhecimento a respeito de genes específicos do controle da determinação sexual em anfíbios é ainda muito escasso (Nakamura, 2009).

Os mecanismos ambientais de determinação sexual atuam através de fatores como a temperatura, pH da água, densidade populacional entre outros (Freedberg & Taylor, 2007). Os poucos estudos conduzidos referente a este tópico em anfíbios mostram que a temperatura da água de criação das larvas pode influenciar a proporção macho/fêmea (Dournon *et al.*, 1990; Hayes, 1998; Wallace *et al.*, 1999; Nakamura, 2009). Porém, o desequilíbrio nessa proporção acontece apenas em altas

temperaturas que, normalmente, não são vivenciadas por nenhuma das espécies estudadas, significando que este fator não seria necessariamente um fator crucial na determinação sexual.

Num outro contexto, alguns estudos reportam a ação de hormônios esteróides exógenos na determinação sexual em anfíbios. Trabalhos envolvendo diversas espécies nessa classe de vertebrados demonstraram a ocorrência de reversão sexual provocada pelo tratamento com esteróides exógenos via água ou injeção direta nas larvas (Gallien, 1959; Nakamura, 2009). Em *Rana esculenta*, o tratamento com estrógeno exógeno gerou prole 100% masculina (Padoa, 1936; Nakamura, 2009). Ainda, outros estudos mostram que vários hormônios esteróides, tais como progestinas, corticóides e andrógenos possuem efeitos similares no processo de reversão sexual (Hayes, 1998; Nakamura, 2009). Todos esses esteróides são capazes de produzir prole 100% masculina. No entanto, o mesmo hormônio pode apresentar efeitos paradoxais, produzindo prole 100% masculina ou feminina ou ainda, não produzir efeito dependendo da dose utilizada e da espécie investigada (Hayes, 1998).

1.3.2. Estrutura do testículo

Os testículos dos anfíbios localizam-se na cavidade celomática, próximos aos rins e estão ligados à parede dorsal do abdômen por um curto mesórquio, no qual passa a *vasa efferentia*, conjunto de 10 a 12 ductos que ligam os túbulos seminíferos aos elementos néfricos que desembocam nos ductos mesonéfricos (Lofts, 1984). Em animais adultos estes ductos funcionam para a condução da urina e também para a condução dos espermatozóides em direção à cloaca (Sprando & Russell, 1988; Vieira, 1993; Pierantoni, 1998). A *Lithobates catesbeianus*, a exemplo das demais espécies de anfíbios, apresenta os testículos organizados em dois compartimentos distintos: i) o tubular, formado por túbulos convolutos, os túbulos seminíferos, onde se encontra o epitélio seminífero composto pelas células de Sertoli e as células germinativas em várias fases de desenvolvimento e em cujas paredes localizam-se a membrana basal e as células peritubulares mióides; e ii) o compartimento intertubular ou intersticial, bastante vascularizado e constituído por células esteroideogênicas denominadas de células de Leydig, macrófagos, mastócitos e outros componentes do tecido conjuntivo,

além de um sistema de ductos para a condução de espermatozóides. Portanto, à semelhança dos demais vertebrados, os testículos exercem as funções de produção de gametas (espermatogênica) e endócrina (esteroidogênica) (Pierantoni, 1998; Billard, 1990; Koulisch *et al.*, 2002).

Comparativamente, as células germinativas em répteis, aves e mamíferos estão organizadas em associações celulares bem definidas denominadas de estádios, e o número total de células de Sertoli aparentemente não sofre variações no indivíduo adulto (Russell, *et al.*, 1990a). Já em teleósteos e anfíbios, a espermatogênese é cística, sendo cada cisto composto por células germinativas no mesmo estágio de desenvolvimento (Pudney, 1993; Schulz *et al.*, 2009). Este cisto é formado quando as células de Sertoli envolvem as células germinativas no início do processo espermatogênico, as quais se multiplicam e se desenvolvem de maneira sincrônica, constituindo uma unidade clonal até a formação dos espermatozóides (Grier, 1993; Pudney, 1993; Pudney, 1995; Schulz *et al.*, 2009). No entanto, os cistos espermatogênicos em anúros se desfazem antes do final da espermatogênese, quando as células germinativas (espermátides) então, estabelecem contato direto com a membrana plasmática apical das células de Sertoli (Pudney, 1993).

Baseado na distribuição topográfica das células germinativas, a organização testicular pode ser diferente entre as diversas espécies de anfíbios (Grier, 1993). Em Urodelos, os testículos apresentam-se divididos em lobos com distribuição zonal (restrita) das células germinativas. Em muitas espécies, estes órgãos apresentam número variável de lobos, e cada um deles contém regiões/zonas com células germinativas avançando no processo de maturação, distribuídas no eixo céfalo-caudal. A parte cefálica contém células germinativas em estágios iniciais de desenvolvimento, enquanto as células mais avançadas e os espermatozóides estão presentes na porção caudal. No nosso conhecimento, nenhum trabalho na literatura reporta a localização preferencial das espermatogônias ou qualquer outro tipo de regionalização testicular na rã-touro.

1.4. Processo Espermatogênico

A espermatogênese é um processo cíclico, complexo, altamente organizado e coordenado, que se inicia com a divisão da espermatogônia-tronco dando origem tanto a células comprometidas com a formação do gameta masculino como a células comprometidas com a manutenção de sua própria população (auto-renovação) (Russell *et al.*, 1990a; França & Russell, 1998; Nóbrega *et al.*, 2009). Quando comparada a outros sistemas bem conhecidos de auto-renovação, a espermatogênese é considerada como um dos que apresenta maior número de divisões celulares durante o seu desenvolvimento (Cardoso, 2007).

O processo espermatogênico apresenta-se bastante conservado entre os vertebrados e pode ser dividido em três fases: a) fase proliferativa (espermatogonial) ou mitótica, na qual as espermatogônias passam por sucessivas divisões mitóticas; b) fase meiótica (espermatocitária) onde ocorre a duplicação do DNA e a recombinação gênica; e c) fase espermiogênica ou de diferenciação, na qual as células haplóides derivadas da divisão meiótica se transformam em células altamente especializadas, os espermatozoides, que estão estruturalmente equipadas para alcançar e fertilizar o ovócito (Russell *et al.*, 1990a; Pudney, 1995). Investigações recentes realizadas no Laboratório de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, ICB-UFMG, mostraram que a duração total do processo espermatogênico na rã-touro é de 40 dias, sendo a fase espermatogonial a mais longa (18 dias), seguida pela fase espermatocitária (14 dias) e pela fase espermiogênica (8 dias); (Segatelli *et al.*, 2009).

1.4.1. Fase proliferativa ou espermatogonial

O tamanho do núcleo e a disposição da cromatina nuclear, associados com o número de células germinativas por cisto espermatogênico, são parâmetros utilizados para a distinção dos diferentes tipos de espermatogônias (De Rooij & Russell, 2000; Vilela *et al.*, 2003; Cardoso, 2007; Schulz *et al.*, 2009). Em mamíferos, as espermatogônias são classificadas em indiferenciadas [do tipo A isoladas (A_{is}), pareadas (A_{pr}) e alinhadas (A_{al})], estando as espermatogônias-tronco provavelmente incluídas entre as indiferenciadas do tipo isoladas (A_{is}), e diferenciadas [do tipo A (A),

intermediária (In) e do tipo B (B)] (De Rooij, 1998; De Rooij & Russell, 2000; De Rooij, 2001).

Em espécies de teleósteos já bem estudadas como o zebrafish (*Danio rerio*) e a tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*), que a exemplo dos anfíbios apresentam espermatogênese cística, as espermatogônias são classificadas em tipo A e tipo B, sendo o número de gerações espermatogoniais, espécie – específico (Leal *et al.*, 2009; Schulz *et al.*, 2009). As espermatogônias do tipo A dão origem às espermatogônias do tipo B, caracterizadas pelo seu tamanho reduzido em comparação com as espermatogônias do tipo A e núcleo mais densamente corado (Schulz *et al.*, 2009). As espermatogônias do tipo B sofrem sucessivas divisões mitóticas que resultam em aumento geométrico do seu número (Vilela *et al.*, 2003; Leal *et al.*, 2009). Durante as divisões, essas células permanecem conectadas por pontes citoplasmáticas devido à citocinese incompleta, o que possibilita a troca de moléculas entre as células germinativas e o desenvolvimento sincrônico das mesmas (Schulz *et al.*, 2009).

Na rã-touro, as espermatogônias do tipo A são as maiores células germinativas, cujo núcleo arredondado se apresenta rico em eucromatina (Chavadej *et al.*, 2000). Assim como em teleósteos, essas células dão origem às espermatogônias do tipo B que, após sucessivas divisões mitóticas, dão origem aos espermatócitos primários, células estas que entrarão em processo de meiose que resultará posteriormente na formação dos gametas. No entanto, ainda não existe uma caracterização acurada das gerações espermatogoniais nessa espécie.

1.4.2. Fase meiótica ou espermatocitária

Nesta etapa do processo espermatogênico os espermatócitos primários oriundos da divisão das espermatogônias do tipo B entram em divisão meiótica. A prófase da primeira divisão meiótica é um processo longo subdividido em cinco fases com características morfofuncionais específicas, denominadas de pré-leptóteno, leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno. Da fase de espermatócito primário em pré-leptóteno até a fase seguinte, leptóteno, ocorre síntese e duplicação do DNA, o que provoca um aumento do volume celular culminando com a distribuição homogênea da cromatina no núcleo (Russell *et al.*, 1990a; Cardoso, 2007; Segatelli *et*

al., 2009). Em seguida, nos espermatócitos primários em zigóteno ocorre espessamento cromossômico, início do pareamento dos cromossomos homólogos e formação do complexo sinaptonêmico, sendo este último visível somente sob microscopia eletrônica de transmissão (Billard, 1984; Billard, 1986; Grier & Neidig, 2000). Este complexo persiste até o final do estágio de paquíteno, que é a fase mais longa da prófase meiótica, na qual ocorre a recombinação e a segregação gênica, importante para a diversidade de indivíduos da mesma espécie, com os cromossomos apresentando-se completamente pareados e compactos. Após progredirem para a próxima fase, diplóteno, os espermatócitos primários concluem a primeira divisão meiótica dando origem aos espermatócitos secundários que por sua vez, passam rapidamente pela segunda divisão meiótica que resultará na formação de células haplóides, as espermátides (Russell *et al.*, 1990a).

1.4.3. Fase espermiogênica

Durante a fase espermiogênica ocorre drástica transformação das espermátides recém-formadas pela divisão meiótica e sua posterior liberação no lume dos túbulos seminíferos, processo este conhecido como espermiação (Hess & França, 2007). Esta transformação engloba fenômenos marcantes como a perda substancial de citoplasma, cujo excesso é fagocitado pelas células de Sertoli em forma de corpos residuais, e a compactação do DNA, resultando em notável redução do volume celular, que chega a 90% em ratos (França *et al.*, 1994) e 65% em tilápias (Vilela *et al.*, 2003). Ainda durante a fase espermiogênica ocorre formação da peça intermediária e flagelo, originando os espermatozóides, células estas aptas a fertilizarem os ovócitos (Russell *et al.*, 1990a; Stoumboudi & Abraham, 1996).

1.5. Elementos Somáticos do Testículo

À semelhança de mamíferos, o desenvolvimento e a função do epitélio seminífero nos anfíbios está intimamente relacionado com o desenvolvimento dos elementos somáticos do testículo (Russell *et al.*, 1994; França *et al.*, 2000a). Assim, as células somáticas localizadas no epitélio seminífero (células de Sertoli), na parede dos túbulos (células peritubulares mióides) e as células esteroidogênicas do interstício (células de Leydig) de testículos em teleósteos e anfíbios são funcionais e

morfologicamente homólogas aquelas observadas em mamíferos (Grier, 1975; Billard, 1990; Grier, 1993; Pudney, 1993; Batlouni *et al.*, 2005; Schulz *et al.*, 2005; Nóbrega *et al.*, 2009; Schulz *et al.*, 2009)

1.5.1. Células peritubulares mióides e células de Leydig

As células peritubulares mióides compõem a parede dos túbulos seminíferos, onde participam da regulação parácrina da função testicular e, em associação com as células de Sertoli, sintetizam os componentes da membrana basal (Rossi *et al.*, 2002; Schulz *et al.*, 2005; Welsh *et al.* 2009). Além disto, as células peritubulares mióides secretam várias substâncias componentes da matriz extracelular (fibronectina, colágenos dos tipos I e IV e proteoglicanas) e fatores de crescimento como PmodS (Fator peritubular que modula a função das células de Sertoli), IGF-I (Fator de crescimento semelhante à insulina), activina-A e TGF- β (Fator de crescimento tumoral), capazes de regular a função parácrina das células de Sertoli. As células peritubulares mióides, como células contráteis, expressam marcadores de citoesqueleto (α -isoactina, F-actina e miosina). A atividade desses filamentos é responsável pela contração dos túbulos seminíferos que resulta em movimentação de fluidos e propulsão dos espermatozóides (Rossi *et al.*, 2002).

As células de Leydig na rã-touro apresentam núcleo oval ou esférico com variável grau de condensação da cromatina sendo o nucléolo nem sempre visível, e podem ser encontradas em grupos ou isoladas nas proximidades dos vasos sanguíneos (Pudney, 1996). À semelhança de outros vertebrados, estas células são responsáveis pela produção de andrógenos, os quais são sintetizados a partir de uma molécula base, o colesterol (Bardin, 1996). Estudos têm mostrado em várias espécies de anfíbios que as células de Leydig sofrem diversas mudanças morfológicas sazonais que refletem variações cíclicas em suas funções, e que estas funções são de vital importância na manutenção do epitélio seminífero, indicando a íntima relação existente entre os compartimentos testiculares (tubular e intersticial) (Pudney, 1996; Minucci *et al.*, 2000; Pierantoni *et al.*, 2002; Sasso-Cerri *et al.*, 2005).

1.5.2. Células de Sertoli

A sobrevivência das células germinativas é dependente de sua íntima associação com as células de Sertoli, que são responsáveis pela criação de um microambiente especializado e propício para a espermatogênese (Schulz & Miura, 2002; Nóbrega *et al.*, 2009; Schulz *et al.*, 2009). Neste contexto, nos vertebrados atribuem-se às células de Sertoli as funções de sustentação, nutrição, secreção de fluido, de proteínas e de vários fatores de crescimento, liberação de espermátides maduras (espermição) e fagocitose de células germinativas que sofrem apoptoses e dos corpos residuais que são formados a partir do citoplasma das espermátides maduras, prestes a serem espermiadas (Billard, 1970). Além disso, as células de Sertoli também exercem importante função na intermediação hormonal da espermatogênese, através de receptores para esteróides (andrógenos e estrógenos) e para FSH (Schulz & Miura, 2002; Nóbrega *et al.*, 2009; Schulz *et al.*, 2009).

1.5.3. Proliferação dos elementos somáticos

Diferentemente de mamíferos, nos quais é considerado que as células de Sertoli não proliferam após a puberdade (França & Russell, 1998), a espermatogênese em peixes e anfíbios está associada com a proliferação desse tipo celular (Bouma & Cloud, 2005; Chaves-Pozo *et al.*, 2005; Schulz *et al.*, 2005). Diversas espécies de teleósteos crescem ao longo da vida, o que pode exigir a proliferação das células de Sertoli em animais adultos como base para o crescimento dos testículos (Matta *et al.*, 2002; Schulz *et al.*, 2005; Nóbrega *et al.*, 2009). Em tilápias, demonstrou-se que o número de células de Sertoli aumenta até o estágio de espermatócito e estabiliza durante os estágios pós-meióticos (Vilela *et al.*, 2003; Schulz *et al.*, 2005; Nóbrega *et al.*, 2009). Embora o mecanismo de controle da proliferação das células de Sertoli em peixes seja desconhecido, é sugerido que o FSH estimula a sua proliferação e os hormônios tireoidianos a inibem (Matta *et al.*, 2002; Bouma & Cloud, 2005). Além disso, foi demonstrado que o IGF-I tem ação estimuladora da proliferação de células de Sertoli em *Squalus acanthia* (dogfish) e o receptor de IGF-I foi encontrado em células de Sertoli de trutas arco-íris (Dubois & Callard, 1993; Le Gac *et al.*, 1996).

Ainda em teleósteos, trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Biologia Celular, ICB-UFMG, demonstraram que tanto a proliferação das células somáticas do testículo quanto a duração da espermatogênese são influenciadas pela temperatura (Vilela *et al.*, 2003; Lacerda *et al.*, 2006; Alvarenga & França, 2009). Nestes trabalhos desenvolvidos em tilápias ficou evidenciado que temperaturas mais baixas promovem maior proliferação das células de Sertoli e de Leydig (Alvarenga & França, 2009), enquanto as temperaturas mais elevadas aceleram a duração do processo espermatogênico e induzem a diferenciação das células germinativas (Vilela *et al.*, 2003; Lacerda *et al.*, 2006; Alvarenga & França, 2009). Também no Laboratório de Biologia Celular, ICB-UFMG, as investigações sobre a duração do processo espermatogênico em rãs-touro, através da marcação com timidida triciada, indicou a ocorrência de proliferação de células de Sertoli, bem como de células de Leydig e de células peritubulares mióides em animais adultos desta espécie (Segatelli *et al.*, 2009). No entanto, neste estudo, o grau desta proliferação não foi quantificado.

1.6. Apoptose de Células Germinativas

A apoptose é um processo natural de morte celular que ocorre durante os processos de proliferação e diferenciação celular (Raff, 1998; Cohen 1999; ; Lockshin & Zakeri, 2004; Tripathi *et al.* 2009). Em vertebrados adultos, a apoptose de células germinativas é parte integral da espermatogênese, ocorrendo normalmente em várias fases do desenvolvimento destas células (Roosen-Runge, 1977; Blanco-Rodríguez & Martínez-García, 1996; Blanco-Rodríguez, 2001; Vilela, 2003; Cardoso, 2007, Tripathi *et al.* 2009). Este processo apresenta um papel muito importante na homeostase da espermatogênese, refletindo diretamente na produção espermática característica de cada espécie (Sharpe, 1994; França & Russell, 1998; Sinha-Hikim & Swerdloff, 1999, França *et al.*, 2005; Cardoso, 2007). Além de participar do controle de densidade celular (De Rooij & Russel 2000), fornecendo um balanço adequado do número de células somáticas e células germinativas, a apoptose atua também como um *checkpoint*, eliminando as células germinativas anormais (Baum *et al.*, 2005).

Além de ocorrer normalmente durante o processo espermatogênico, a apoptose pode ser induzida por remoção de suporte hormonal e fatores de

crescimento, ou por estímulos regulatórios não-hormonais tais como estresse ao calor, toxinas testiculares, agentes quimioterápicos e danos cromossômicos (Billard, 1982; Schulz & Miura, 2002; Vera *et al.*, 2005; Sasso-Cerri *et al.*, 2006; Setchell, 2006; Alvarenga & França, 2009; Tripathi *et al.* 2009). Esses sinais de ativação iniciam mecanismos intracelulares de controle e execução, que culminam com a ativação de caspases localizadas no citoplasma das células germinativas (Sinha-Hikim & Swerdloff, 1999; Sinha-Hikim *et al.*, 2003; Vera *et al.*, 2004; Vera *et al.*, 2005; Setchell, 2006; Tripathi *et al.* 2009).

Estudos recentes mostraram que proteínas da família Bcl-2 e a proteína p53 estão envolvidas diretamente na regulação da apoptose que ocorre durante a evolução do processo espermatogênico (Knudson *et al.*, 1995; MacGregor, 2001; Russell *et al.*, 2001, Soverchia *et al.*, 2007; Tripathi *et al.* 2009). Os membros da família Bcl-2 são proteínas constituídas por elementos próapoptóticos (Bax, Bak, Bcl-xS, Bad) e anti-apoptóticos (Bcl-2, Bclw, Bcl-xL, Mcl, A1) (Sinha-Hikim & Swerdloff, 1999; MacGregor, 2001; Hikim *et al.*, 2003; Tripathi *et al.* 2009). Diversos trabalhos têm mostrado que a proteína p53 está envolvida com a apoptose de células espermatogênicas (Almon *et al.*, 1993; Rotter *et al.*, 1993; Sinha-Hikim & Swerdloff, 1999). Esses trabalhos demonstraram que células germinativas portadoras de danos no DNA apresentam grande aumento na quantidade de p53, a qual pode agir interrompendo o ciclo celular para correção do dano cromossômico ou desencadear o processo de apoptose (Bennett, 1999; Richburg, 2000).

Em nosso conhecimento, existem poucos relatos na literatura relacionados com perdas celulares (apoptoses) durante o processo espermatogênico na rã-touro, e o possível mecanismo das mesmas (Chavadej *et al.*, 2000; Sasso-Cerri *et al.*, 2006), conforme já está relativamente bem elucidado acima para mamíferos. A maioria desses relatos trata das mudanças morfológicas sazonais no testículo dessa espécie de anuro.

1.7. Morfometria do Testículo

As análises da evolução do volume celular e ultra-estrutural de todos os componentes (área de superfície e volume) das células germinativas, em diferentes

fases de desenvolvimento, permitem melhor compreensão funcional das mudanças que ocorrem nas células germinativas durante o processo espermatogênico, desde espermatogônia até espermatozóide (França *et al.*, 1995a; Russell & França, 1995; França & Russell, 1998).

Por demandar exaustivas análises e alguns milhares de micrografias eletrônicas, até o presente momento este tipo de análise foi feito somente para o rato (França *et al.*, 1995a), que é a única espécie de vertebrados a ter o testículo reconstruído através de microscopia eletrônica de transmissão (Russell & França, 1995). Além de permitir o conhecimento mais completo da evolução do processo espermatogênico durante o período pós-natal do desenvolvimento testicular (França *et al.*, 2000a) e em animais sexualmente maduros (França & Russell, 1998), a morfometria propicia também investigar como a estrutura testicular se comporta em condições fisiológicas, experimentais e patológicas (França *et al.*, 1993; França *et al.*, 1994; França *et al.*, 1995b; Russell & França, 1995; Rocha *et al.*, 1999; França *et al.*, 2000b, Avelar *et al.*, 2010; Auharek & França, 2010; Cordeiro-Junior *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2010). Assim, o estudo morfométrico do testículo tem sido classicamente realizado em mamíferos, sendo os resultados obtidos muito bons quando se utiliza fragmento de testículo fixado em excelentes fixadores (ex: glutaraldeído) e incluídos em resina plástica (Russell *et al.*, 1990b; Hess *et al.*, 1993; França & Russell, 1998).

Características anatômicas peculiares do testículo e o arranjo cístico da espermatogênese de peixes teleósteos e anfíbios tornam difícil o estudo quantitativo do processo espermatogênico (Billard, 1990), requerendo metodologias morfométricas mais acuradas como, por exemplo, cortes histológicos seriados. Através da análise de cortes histológicos seriados (seqüenciais) é possível visualizar toda a extensão de uma determinada estrutura, permitindo assim obter dados seguros sobre a citoarquitetura testicular. Assim, relativamente poucas investigações quantitativas são encontradas nestas classes de vertebrados (Billard, 1969; Matta *et al.*, 2002; Vilela *et al.*, 2003; Sasso-Cerri *et al.*, 2004; Schulz *et al.*, 2005, Leal *et al.*, 2009). No entanto, os relatos existentes na literatura sugerem que durante a fase espermatogonial o número de células germinativas e o volume do cisto aumentam bastante e rapidamente, levando ao aumento do número de células de Sertoli por cisto, conforme se observa em *guppy*

(*Poecilia reticulata*) (Billard, 1969), tilápias (*Oreochromis niloticus*) (Vilela *et al.*, 2003; Schulz *et al.* 2005) e zebrafish (*Danio rerio*) (Leal *et al.*, 2009). Em contrapartida, os diâmetros nucleares das células germinativas, principalmente nas fases espermatogonial e espermiogênica, reduzem-se drasticamente (Billard, 1969; Koulis *et al.*, 2002; Vilela *et al.*, 2003; Schulz *et al.*, 2005; Leal *et al.*, 2009).

Diversos estudos têm mostrado que o número de células de Sertoli por testículo, determinado em janelas específicas de proliferação, é o principal fator na determinação da produção espermática e do tamanho do testículo (Orth *et al.*, 1988; Hess *et al.*, 1993; França *et al.*, 1995a; Matta *et al.*, 2002). Pelo menos em mamíferos, tal assertiva baseia-se no fato de que a célula de Sertoli tem uma capacidade de suporte de células germinativas relativamente fixa para cada espécie (França & Russell, 1998). Desta forma, o número de células germinativas suportadas por uma única célula de Sertoli é o melhor indicativo de sua eficiência funcional e da produção espermática em determinada espécie (Russell & Peterson, 1984; França & Russell, 1998; França *et al.*, 2002; Matta *et al.*, 2002; França *et al.* 2005; Schulz *et al.*, 2005, Nóbrega *et al.*, 2009).

Particularmente em relação às células de Sertoli, à semelhança de mamíferos, a sua proliferação é considerada o fator primário responsável pelo aumento do testículo e da produção espermática nos teleósteos, bem como o elevado número de gerações espermatogoniais (Billard, 1990; Russell & Griswold, 1993; Hess *et al.*, 1993; Koulis *et al.*, 2002; Sharpe *et al.*, 2003; Schulz *et al.*, 2005; Schulz *et al.*, 2009). No nosso conhecimento, não existem dados pormenorizados a respeito da proliferação de células de Sertoli em rãs-touro adultas e nem a respeito do número de células de Sertoli e células germinativas, incluindo-se o número de gerações espermatogoniais, contidas em cada tipo de cisto espermatogênico ao longo da evolução deste processo.

**2. JUSTIFICATIVA
E
OBJETIVOS**

2. Justificativa e Objetivos

2.1. Justificativa

O processo espermatogênico corresponde a um dos sistemas mais produtivos de auto-renovação do corpo animal, resultando na produção de um número virtualmente ilimitado de espermatozoides durante a vida reprodutiva do animal. As células-tronco espermatogoniais representam a base fundamental desse processo, uma vez que mantêm a capacidade de divisão, auto-renovação e de diferenciação em células que irão se comprometer de modo irreversível com o processo espermatogênico, dando origem aos espermatozoides, células altamente especializadas que são equipadas para alcançar e fertilizar o ovócito. O desenvolvimento e a função do epitélio seminífero estão intimamente relacionados com o desenvolvimento dos elementos somáticos do testículo, de modo que a sobrevivência das células germinativas é dependente de sua íntima associação com as células de Sertoli, que são responsáveis pela criação de um microambiente favorável e propício para a espermatogênese. Ademais, embora não apresentem contato direto com as células germinativas, os outros elementos somáticos tais como as células peritubulares mióides e as células de Leydig são fundamentais para a espermatogênese.

Apesar de a maioria dos trabalhos até o presente momento terem sido realizados em mamíferos, o processo espermatogênico mostra-se bastante conservado entre as diferentes classes de vertebrados. A rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) é uma espécie de anfíbio que apresenta grandes potencialidades comerciais e, devido a sua disponibilidade no mercado, facilidade de manutenção e manejo em condições de laboratório, vem sendo utilizada como importante modelo experimental em pesquisas, inclusive em biologia da reprodução. No entanto, o conhecimento detalhado da estrutura e função testiculares nessa espécie é ainda muito incipiente; particularmente no que se refere às interações morfofuncionais entre as células germinativas e as células de Sertoli, durante a evolução do processo espermatogênico. Assim, justifica-se a necessidade de estudos mais acurados que forneçam as bases necessárias para futuras investigações sobre a reprodução nessa espécie de anfíbio utilizada como

modelo experimental, inclusive aquelas envolvendo o transplante de espermatogônias desta espécie para tilápias nilóticas, conforme estudos em andamento no nosso laboratório, demonstrando que as células germinativas de rãs-touro são capazes de colonizar e se diferenciarem no testículo de tilápias nilóticas. Merece ser destacado neste contexto que, as tilápias e as rãs compartilham interessantes similaridades funcionais e morfológicas do processo espermatogênico, como por exemplo, o arranjo cístico das células germinativas (apesar da morfologia das espermátides ser bastante diferente nestas duas espécies) e reprodução na temperatura de cerca de 25-26°C nestas duas espécies de vertebrados.

2.2. Objetivos

2.2.1. Objetivo geral

Investigar a cinética espermatogonial, bem como a proliferação e número de células germinativas e de Sertoli por cisto espermatogênico através de análises histológicas, morfométricas e funcional do testículo de rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*) sexualmente maduras.

2.2.2. Objetivos específicos

- ✓ Realizar análises qualitativas sobre a arquitetura e distribuição dos componentes do parênquima testicular em seis diferentes regiões do testículo,
- ✓ determinar o percentual (%) de área ocupada pelos compartimentos tubular e intersticial em seis diferentes regiões do testículo,
- ✓ identificar e caracterizar as espermatogônias do tipo A e as espermatogônias do tipo B, baseado em parâmetros morfológicos tais como a quantidade e a localização da cromatina no núcleo, em cortes histológicos de testículos,
- ✓ determinar o número de gerações de espermatogônias a fim de se avaliar o potencial de produção espermática dessa espécie, avaliando-se o número de células germinativas e de Sertoli por cisto espermatogênico,
- ✓ avaliar o volume nuclear, volume celular e volume total dos diferentes tipos de células germinativas e de Leydig,

Justificativa e Objetivos

- ✓ avaliar o volume nuclear das células de Sertoli nos diferentes tipos de cistos espermatogênicos,
- ✓ investigar no compartimento tubular a frequência dos diferentes tipos de cistos espermatogênicos (espermatogoniais, espermatocitários e espermiogênicos) e de cistos contendo células em apoptose,
- ✓ determinar o índice de proliferação das células de Sertoli, Leydig e peritubular mióide marcadas com timidina triciada em seis diferentes regiões do testículo e a possível associação/proximidade das células em mitose com determinados tipos de cistos espermatogênicos (espermatogoniais, espermatocitários e espermiogênicos).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais Experimentais

Foram utilizadas no total 16 rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*) machos, sexualmente maduras, provenientes do Ranário Minas Gerais – RANAMIG, localizado no Município de Betim, MG. Durante o período experimental, os animais foram mantidos em condições laboratoriais controladas com a temperatura a 25-26°C e ciclo de claro/escuro 12:12. Os animais foram alimentados duas vezes ao dia com ração comercial. Este estudo fez parte de um projeto mais amplo que se encontra atualmente em desenvolvimento no Laboratório de Biologia Celular do ICB/UFMG e que já foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação animal – CETEA-UFMG (Protocolo de No 48/2008).

3.2. Coleta, Processamento e Fixação do Material

3.2.1. Coleta e fixação

Para a coleta dos testículos, os animais foram previamente anestesiados com tiopental sódico (Thiopentax – 0,3 ml/100g de animal; Cristália) e sacrificados. Em seguida, os dois testículos foram coletados e fragmentados (um corte sobre o eixo longitudinal e dois cortes transversais, obtendo-se seis fragmentos por testículo, conforme descrito adiante) e fixados durante 12 horas por imersão em glutaraldeído a 4% em tampão fosfato 0,05M-pH 7,2-7,4 a 4°C. Após a fixação, os fragmentos foram armazenados a 4°C no mesmo tampão até serem submetidos ao processamento de rotina para radioautografia e para microscopia de luz convencional.

3.2.2. Processamento histológico

Para análises histológicas e morfométricas 8 animais foram utilizados e o material foi preparado rotineiramente e incluído em glicol-metacrilato (GMA) (Leica Historesin Embedding Kit, Leica Instruments), sendo a primeira pré-infiltração realizada por seis horas e a segunda por aproximadamente 12 horas. A infiltração propriamente dita foi feita em GMA puro durante 24 horas. Em seguida, os fragmentos dos dois testículos foram incluídos na mesma resina acrescida de endurecedor até a

polimerização completa da mesma. Nesta etapa, cada um dos seis fragmentos (2 fragmentos da região medial do testículo, 2 da região cranial e 2 da região caudal para cada um dos testículos) foi posicionado de forma a se obter seis diferentes planos de corte para cada um dos testículos (Figura 3), três deles partindo da região da albugínea em direção ao parênquima testicular e três partindo da região do parênquima testicular em direção à albugínea. Estas seis regiões foram denominadas de acordo com a posição anatômica testicular e a direção do plano de corte, respectivamente em: Região Média – Centro para Túnica albugínea (MED C-A); Região Média – Túnica albugínea para Centro (MED A-C); Extremidade I – Centro para Túnica albugínea (Ext. I C-A); Extremidade I – Túnica albugínea para Centro (Ext. I A-C); Extremidade II – Corte frontal do Centro para a Túnica albugínea (Ext. II C-A); e Extremidade II – Corte frontal da Túnica albugínea para o Centro (Ext. II A-C). Cortes seriados nas espessuras de 5µm, de acordo com análises preliminares dos diâmetros nucleares de células germinativas nas fases espermatogonial (espermatogônias do tipo A e do tipo B inicial e final), espermatocitária (pré-leptóteno, leptóteno/zigóteno, paquíteno, diplóteno e espermatócito secundário) e espermiogênica (espermátides arredondadas), também foram realizados para estudos morfométricos. O material então foi corado em azul de toluidina e posteriormente analisado em Microscópio Olympus BX 41 do Laboratório de Biologia Celular-ICB-UFMG.

3.2.3. Marcação com timidina triciada

A timidina triciada é um radioisótopo que se incorpora ao núcleo das células que estão sintetizando DNA no momento da injeção. No testículo da rã-touro, essas células compreendem eventualmente células somáticas em atividade proliferativa, as espermatogônias e os espermatócitos primários em pré-leptóteno/leptóteno, ocorrendo nesses espermatócitos a última síntese de DNA em células da linhagem espermatogênica (item 1.4.2) (Segatelli *et al.* 2009).

Para esta abordagem, 8 animais foram submetidos a uma injeção intracelomática de timidina-H³ em solução aquosa estéril (Thymidine [6-3H], atividade específica de 3,03 TBq/m mol 82,0 Ci/m mol, Amersham Life Science, England), na concentração de 1mCi/ml, utilizando-se agulha hipodérmica descartável do tipo

insulina ($13 \times 3,8$). Aproximadamente $100\mu\text{Ci}$ (0,1ml) para cada 100g de peso corporal foram injetados intraperitonealmente em dose única para cada animal. A coleta do material para o processamento rádioautográfico foi feita de acordo com o item 3.2.1, sendo os dois testículos dos animais, retirados em intervalos compreendidos entre 2 a 3 horas após a injeção.

3.2.4. Processamento rádioautográfico

Os cortes histológicos destinados a rádioautografia, obtidos para as seis diferentes regiões avaliadas, foram submetidos ao processo de emulsão em câmara escura. Esse processo foi realizado mergulhando-se as lâminas em cuba contendo emulsão rádioautográfica Kodak NTB-2 (Eastman Kodak Co, Rochester, NY, EUA), mantida em banho-maria a 45°C . Os cortes emulsão foram secados por 1 hora em câmara escura em temperatura ambiente e, em seguida, acondicionados em caixa preta à prova de luz, contendo sílica-gel como agente desumidificante. Estes cortes foram armazenados em geladeira por 4 semanas, período suficiente para que o rádio-isótopo sensibilize os grãos de prata da emulsão. Após este período, foi realizada a revelação e fixação dos cortes em câmara escura com solução aquosa (1:1) do revelador Kodak D-19, por 04 minutos, à 15°C . Os cortes foram lavados por alguns minutos em água destilada e fixados em fixador Kodak F5 por 5 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, passaram por lavagem em água destilada e foram secos em temperatura ambiente, sendo então corados com azul de toluidina e posteriormente analisados em Microscópio Olympus BX 41 do Laboratório de Biologia Celular-ICB-UFMG.

3.3. Índice Gonadossomático (IGS)

Baseado no peso corporal e testicular para os 16 animais utilizados, o índice gonadossomático foi calculado utilizando-se a seguinte fórmula:

✓ **$IGS = PG/PC \times 100$ onde:**

- $PG =$ Peso total das gônadas (testículo direito + testículo esquerdo)
- $PC =$ Peso corporal

3.4. Análises Histológicas Qualitativas

As análises histológicas qualitativas foram realizadas com o intuito de se avaliar a arquitetura do testículo das rãs-touro investigadas. Para tanto, utilizou-se aumento de 200, 400 e 1000 vezes em microscopia de luz. Estas análises abrangeram a distribuição e posicionamento dos túbulos seminíferos nos testículos através da avaliação das seis regiões testiculares estabelecidas e já mencionadas, e a identificação morfológica dos principais tipos celulares, como células de Sertoli, de Leydig e diferentes gerações de células germinativas, através de parâmetros já bem estabelecidos na literatura (Russell *et al.*, 1990a; Pudney, 1993; Pudney, 1996; De Rooij & Russell, 2000; Vilela *et al.*, 2003; Leal *et al.* 2009; Schulz *et al.*, 2009).

3.5. Morfometria do Testículo

3.5.1. Proporção volumétrica

A proporção ocupada pelos compartimentos tubular e intersticial também foi estimada. Para tal finalidade, 20 campos aleatórios foram fotografados em aumento de 400x, utilizando-se uma câmera acoplada ao Microscópio Olympus BX 60 do Laboratório de Biologia Celular-ICB-UFMG, para cada uma das seis regiões já mencionadas. Cada campo foi analisado no programa ImageJ através da padronização de um retículo com 475 interseções (pontos), perfazendo um total de 9500 pontos para cada uma das seis regiões.

3.5.2. Classificação das gerações espermatogoniais

A classificação das gerações espermatogoniais foi feita concomitantemente às análises morfométricas e do número de células germinativas por cisto espermatogênico, com base em diferenças de diâmetro nuclear e no número total destas células por cisto. Ainda, foram utilizados critérios morfológicos já bem estabelecidos na literatura (De Rooij & Russell, 2000; Vilela *et al.*, 2003; Leal *et al.* 2009; Schulz *et al.*, 2009) para a identificação das diferentes gerações espermatogoniais, com base na distribuição da heterocromatina e eucromatina.

3.5.3. Cálculo do volume das células germinativas e de Leydig

O cálculo do volume individual das células espermatogênicas e de Leydig, expresso em micrômetros cúbicos (μm^3), foi obtido utilizando-se retículo com 441 interseções (pontos) em aumento de 1000x. Com a finalidade de se determinar a proporção (%) entre núcleo e citoplasma e dependendo do tipo celular investigado, 100 a 1000 pontos sobre o citoplasma e o núcleo dos diferentes tipos de células espermatogênicas e de Leydig foram contados por animal. Ainda nesta etapa obteve-se o diâmetro nuclear médio destas células em aumento de 1000x, o qual também serviu como ponto de referência para as contagens celulares nos cortes seriados de cistos espermatogênicos. Desta forma, 30 núcleos de cada tipo celular tiveram seus diâmetros mensurados por animal. Para as células cilíndricas foram medidos os diâmetros dos eixos maior e menor. A partir dos dados obtidos, foram estimados o volume nuclear, o volume do citoplasma e o volume total de cada tipo celular por animal, conforme segue:

- ✓ **Volume nuclear = $4/3\pi R^3$ onde $R = \text{diâmetro nuclear}/2$**
 - *Células com formato nuclear esférico*
- ✓ **Volume nuclear = Abh onde $Ab = \pi r^2$, $r = \text{diâmetro nuclear menor}/2$; $h = \text{diâmetro nuclear maior}$**
 - *Células com formato nuclear cilíndrico*
- ✓ **Volume citoplasmático = % citoplasma x volume nuclear/% núcleo**
- ✓ **Volume celular = volume nuclear + volume citoplasmático**
- ✓ **Volume do cisto = número total de células espermatogênicas x volume celular**

Assim, os dados obtidos permitiram estimar, dentre outros parâmetros, a evolução dos volumes nuclear, citoplasmático e celular, a proporção entre núcleo e citoplasma e o volume de cada tipo de cisto espermatogênico, excluindo-se a célula de Sertoli.

3.5.4. Número de células de Sertoli e células germinativas por cisto espermatogênico e volume nuclear das células de Sertoli

Com o objetivo de se investigar o número de células de Sertoli e de células germinativas para cada tipo de cisto espermatogênico foram utilizados cortes seriados

com a espessura de 5µm, de acordo com análise preliminar citada no item 3.2.2. Desta forma, o núcleo avaliado foi seccionado pelo menos uma vez. As contagens foram feitas inicialmente nos cistos localizados nas secções intermediárias (eixo maior do cisto) seguindo-se nas secções crescentes e decrescentes até que o cisto em questão não mais fosse observado. Particularmente em relação às células germinativas, esta avaliação permitiu estimar também o número de gerações espermatogoniais. Seis cistos foram avaliados para cada tipo de célula germinativa nos 8 animais avaliados, de acordo com protocolos já estabelecidos em nosso laboratório (Vilela, 2003; Leal *et al.* 2009). Neste tipo de avaliação também foram obtidos os diâmetros nucleares das células de Sertoli para o cálculo do seu volume nuclear, de acordo com os diferentes tipos de cistos espermatogênicos.

3.6. Frequência dos Cistos Espermatogênicos e dos Cistos Contendo Células em Apoptose

A frequência dos cistos espermatogênicos foi determinada de acordo com os diferentes tipos de cistos espermatogênicos encontrados para a rã-touro seguindo, por exemplo, o padrão já determinado em nosso laboratório para tilápias (Alvarenga & França, 2009) conforme segue: espermatogônia do tipo A1; espermatogônia do tipo A2; espermatogônia do tipo B inicial (B1, B2 e B3), intermediária (B4 e B5) e final (B6 e B7); espermatócitos primários em pré-leptóteno (PL), leptóteno/zigóteno (L/Z), paquíteno (P), diplóteno(D); espermatócito secundário (S); espermátides arredondadas (Ear1 e Ear2) e cistos contendo células apoptóticas. Quinhentos cistos foram analisados por animal.

3.7. Índice de Proliferação dos Elementos Somáticos do Testículo

O índice de proliferação dos elementos somáticos (células de Sertoli, peritubular mióide e de Leydig) foi estimado para cada uma das seis regiões testiculares já mencionadas, utilizando-se aumento de 1000x. Esta avaliação foi feita através da contagem do número destas células somáticas marcadas com timidina triciada e aproximadamente 1000 células foram analisadas para cada uma das regiões testiculares investigadas. Também foi analisado o tipo de cisto espermatogênico com o

qual as células de Sertoli em proliferação se encontravam associadas (espermatogônia do tipo A1-2; espermatogônia do tipo B; espermatócitos primários em pré-leptóteno, leptóteno/zigóteno, paquíteno e diplóteno; espermatócitos secundários; espermátides arredondadas e espermátides alongadas). Quanto às outras células somáticas (células de Leydig e peritubulares mióides), que não apresentam associação direta com as células germinativas, foi analisado o tipo de cisto espermatogênico no qual estas células, quando em proliferação, encontravam-se próximas.

3.8. Análises Estatísticas

Os valores médios apresentados no presente trabalho foram expressos como média \pm erro padrão. Quando pertinente, os valores obtidos foram analisados através da análise de variância (ANOVA), utilizando-se o teste Newman-Keuls, além de Teste T, no programa GraphPad Prism 5.0. O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

4. Resultados

4. Resultados

4.1. Biometria

Os valores médios encontrados para o peso corporal e o índice gonadossomático das 16 rãs-touro investigadas foram respectivamente $311g \pm 8$ e $0,094 \pm 0,004$. Os pesos dos testículos direito e esquerdo apresentaram média de $0,13g \pm 0,01$ e $0,17 \pm 0,01$ respectivamente. Portanto o testículo esquerdo apresentou peso médio cerca de 30% maior do que o direito ($p < 0,05$).

4.2. Análise Histológica do Testículo e Proporção dos Compartimentos Tubular e Intersticial

Conforme pode ser observado na Figura 4, os cortes histológicos obtidos das seis diferentes regiões investigadas não mostraram diferença no padrão de disposição dos túbulos seminíferos. Assim, nestes cortes, predominaram as secções transversais dos túbulos seminíferos (compartimento tubular) envoltos pelos componentes do compartimento intersticial ou intertubular, onde estão localizados os vasos sangüíneos e linfáticos, as células de Leydig (Figura 5A, C e D), além de ductos de condução dos espermatozoides que podem eventualmente ser visualizados saindo diretamente dos túbulos seminíferos (Figura 5B). A Figura 5C mostra em maior aumento a presença de vacuolizações (retículo endoplasmático liso) no citoplasma das células de Leydig, cujo núcleo se apresenta na forma esférica ou oval e mais fortemente corado que as demais células do interstício.

Os resultados obtidos para a proporção dos túbulos seminíferos e interstício presentes nas seis diferentes regiões do testículo de rãs-touro investigadas estão ilustrados na Figura 6. Conforme pode ser observado, não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para os valores obtidos, merecendo ser ressaltado que em todas as seis regiões, cerca de 86% do parênquima testicular estava ocupado pelos túbulos seminíferos.

A Figura 7 ilustra a posição e os variados formatos assumidos pelos núcleos das células de Sertoli nos diferentes cistos espermatogênicos, dependendo do plano de secção. Merece ser mencionado que durante a espermiogênese na rã-touro, bem

como nos demais anuros, os cistos espermatogênicos se abrem e as células germinativas (espermátides) estabelecem contato direto com a membrana plasmática apical das células de Sertoli, conforme mostrado na Figura 7B.

4.3. Gerações Espermatogoniais

Além da ilustração do processo espermatogênico, as diferentes gerações espermatogoniais em rãs-touro podem ser visualizadas na Figura 8. A caracterização destas espermatogônias foi obtida inicialmente através de análises morfológicas que levaram em consideração critérios já bem estabelecidos na literatura, tais como a quantidade de heterocromatina e o tamanho celular / nuclear. Posteriormente, o número de gerações espermatogoniais foi obtido a partir do número de células germinativas nos cistos de espermatogônias do tipo A, do tipo B e de espermátocitos primários em pré-leptóteno, associado a mudanças no diâmetro e volume nuclear também avaliados. Assim, foi possível estimar em oito o número de gerações espermatogoniais, sendo 7 delas, de espermatogônias do tipo B. Ainda, dois subtipos de espermatogônias do tipo A foram identificadas de acordo com a morfologia nuclear. Conforme mostrado na Tabela 1 e na Figura 8, as espermatogônias do tipo A2 apresentaram menor diâmetro nuclear e maior número de nucléolos do que o observado para as espermatogônias do tipo A1. Os espermátocitos primários e secundários, bem como as espermátides em diferentes graus de maturação também estão ilustrados na Figura 8. A classificação inicial, mas pouco detalhada dessas células foi feita por Segatelli *et al.*, 2009. O esquema apresentado na Figura 9 mostra de maneira concisa o processo espermatogênico em rãs-touro.

4.4. Morfometria das Células Germinativas, Células de Sertoli e de Leydig

Os resultados obtidos através das análises morfométricas encontram-se nas Tabelas 1 e 2, e ilustrados nas Figuras 10 a 13. Assim, conforme pode ser observado na Tabela 1 e nas Figuras 10 e 11, os volumes nuclear, citoplasmático e celular das células germinativas decresceram acentuadamente de espermatogônia do tipo A até as espermátides. No entanto é importante ressaltar que estes valores apresentaram visível aumento nos espermátocitos em leptóteno/zigóteno. De maneira interessante pode ser mencionado que o núcleo das células germinativas em rãs-touro ocupou

maior parte da célula, ficando o seu percentual no patamar de 50-60% (Tabela 1). Já o volume total dos cistos espermatogênicos, excluindo-se o volume das células de Sertoli, apresentou crescimento acentuado e contínuo até o estágio de leptóteno/zigóteno, decrescendo aproximadamente 75% até o estágio de espermátide inicial (Figura 11).

Por outro lado, o diâmetro e o volume nuclear das células de Sertoli apresentaram alterações de acordo com os diferentes tipos de cistos espermatogênicos (Tabela 1 e Figura 12). Estes valores mostraram tendência à estabilidade desde os cistos de espermatogônias do tipo A até os cistos de diplóteno, ocorrendo a partir daí aumento significativo tanto do diâmetro quanto do volume nuclear destas importantes células somáticas.

Conforme esperado, o número de células germinativas cresceu de forma drástica desde os cistos de espermatogônias do tipo A até os cistos de espermátides iniciais (Tabela 1 e Figura 13), enquanto o número de células de Sertoli apresentou aumento gradual e significativo ($p < 0,05$) particularmente do final da fase espermatogonial até o final da fase espermatocitária. No entanto, de maneira geral os resultados para este último parâmetro mostraram tendência de estabilização nos cistos de espermátócitos primários. É importante ressaltar que o aumento mais evidente aconteceu na transição de espermatogônia do tipo B para espermátócitos primários, onde houve também o maior aumento do número de células germinativas por cisto, em torno de 84% (Tabela 1 e Figura 13).

Os dados morfométricos das células de Leydig encontram-se na Tabela 2. As células de Leydig apresentaram diâmetro nuclear médio de $7,2 \pm 0,03 \mu\text{m}$, enquanto os valores para os volumes nuclear, citoplasmático e celular, foram respectivamente 196 ± 2 ; 321 ± 15 e $517 \pm 15 \mu\text{m}^3$. Estes dados indicam que quase 40% do volume total das células de Leydig em rãs-touro é ocupado pelo núcleo.

4.5. Frequência dos Cistos Espermatogênicos

Os resultados referentes à frequência dos diversos tipos de cistos espermatogênicos estão ilustrados nas Figuras 14 e 15. A frequência de cistos na fase

espermatogonial superou a frequência daqueles na fase espermatocitária, a qual, por sua vez, apresentou frequência bastante superior a dos cistos na fase espermiogênica (Figura 14). Quando analisados separadamente, a frequência de cistos de espermatócitos primários em leptóteno/zigóteno apresentou-se nitidamente superior àquela dos demais cistos espermatogênicos (Figura 15). Dentre os cistos espermatogoniais, aqueles contendo espermatogônias do tipo B intermediária foram os menos frequentes enquanto aqueles contendo espermatogônias do tipo B finais foram os mais frequentes (Figura 15). Os cistos contendo espermatídes arredondadas iniciais (Ear1) apresentaram a maior frequência quando comparados aos cistos de espermatídes arredondadas mais avançadas (Ear2); (Figura 15).

Num outro contexto relevante, os dados morfométricos obtidos a partir de contagens efetuadas em centenas de cistos espermatogênicos para cada animal sugerem que apoptoses de células germinativas não foram muito frequentes em rãstouro sexualmente maduras (Figuras 14 e 15). Quando presentes, as mesmas foram observadas principalmente ao final da fase espermatogonial (Figura 16). No entanto, apesar das apoptoses serem pouco frequentes, as contagens de células germinativas por cisto espermatogênico indicaram perda de cerca de 55% no número total de células esperadas ao final do processo espermatogênico (Tabela 1). Nesta tabela também pode ser observado que, com base no número obtido de células germinativas por cisto espermatogênico e no valor teórico esperado, perdas celulares (percentual entre parênteses na primeira coluna desta tabela) por apoptose ocorrem continuamente a partir do final da fase espermatogonial.

4.6. Proliferação das Células Somáticas do Testículo

A marcação com timidina triciada das células somáticas (células de Sertoli, Leydig e peritubular mióide) está ilustrada na Figura 17. Não houve diferença estatística significativa entre os índices de proliferação das células de Sertoli bem como entre os índices de proliferação das células de Leydig e peritubulares mióides, nas seis regiões testiculares avaliadas (Figura 18). Este índice foi cerca de 10 vezes superior para as células de Sertoli em comparação com os demais elementos somáticos avaliados em todas as seis regiões investigadas (Figura 18).

Proporcionalmente cerca de 70% das células de Sertoli marcadas com timidina triciada encontrava-se em associação com cistos na fase proliferativa (espermatogonial) do processo espermatogênico (Figura 19). Particularmente, os resultados mostram nitidamente tendência das células de Sertoli de proliferarem quando estavam preferencialmente associadas a cistos de espermatogônias do tipo B, onde foram encontradas aproximadamente 55% das células de Sertoli marcadas (Figura 19). Por outro lado, cerca de 27% das células de Sertoli marcadas encontravam-se em associação a cistos espermatocitários, enquanto apenas 3,5% encontravam-se em associação a cistos/células da fase espermiogênica (Figura 19).

Nenhuma tendência nítida foi observada para as células peritubulares mióides e de Leydig marcadas, embora a maioria das células marcadas com timidina triciada se encontravam nas proximidades de células germinativas mais avançadas no processo espermatogênico. Desta forma, cerca de 28% das células peritubulares mióides 24% das células de Leydig marcadas estavam próximas ou em associação direta com “cistos” espermátides alongadas.

5. Discussão

5. Discussão

5.1. Biometria, Análise Histológica do Testículo e Proporção dos Compartimentos Tubular e Intersticial

O peso corporal das rãs investigadas no presente estudo está dentro da faixa observada para os exemplares sexualmente maduros jovens desta espécie (Chavadej *et al.*, 2000; Sasso-Cerri *et al.*, 2004) e o mesmo ocorreu para os valores encontrados para os pesos testiculares (Segatelli *et al.*, 2009). Diferenças de pesos entre testículos direito e esquerdo são amplamente relatadas na literatura para vertebrados. No entanto, diferentemente do presente estudo, no qual o testículo esquerdo apresentou-se significativamente maior, as diferenças encontradas normalmente não são significativas. Comparado com os vertebrados mais investigados como, por exemplo, mamíferos (Kenagy & Trombulak, 1986), o índice gonadossomático das rãs-touro é relativamente baixo, situando-se, no entanto, dentro da faixa observada para esta espécie em estudos realizados durante o período reprodutivo (Chavadej *et al.*, 2000; Sasso-Cerri *et al.*, 2004).

Efeitos da sazonalidade na estrutura testicular em rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*) vêm sendo reportados na última década por alguns pesquisadores (Chavadej, *et al.*, 2000, Sasso-Cerri *et al.*, 2004, 2006). Estes efeitos incluem alterações no peso testicular, bem como na proporção e composição dos compartimentos tubular e intersticial ao longo do ano. Neste contexto, o período reprodutivo desta espécie de anfíbio ocorre nos meses de junho a setembro no hemisfério norte e nos meses de dezembro a março no hemisfério sul, nos quais células mais avançadas no processo espermatogênico (espermátides e espermatozóides) podem ser observadas nos túbulos seminíferos. Regressão dos túbulos seminíferos é observada no período pós-reprodutivo que compreende os dois meses seguintes ao período de reprodução. Já a retomada ou recrudescência do processo espermatogênico acontece nos dois meses que antecedem o período reprodutivo (período pré-reprodutivo) (Chavadel *et al.*, 2000; Sasso-Cerri *et al.*, 2004). No presente estudo, as rãs foram sacrificadas no mês de abril. Portanto, em condições naturais as mesmas estariam fora do período reprodutivo. No entanto, os resultados obtidos na análise da proporção dos

compartimentos tubular e intersticial nas seis diferentes regiões investigadas mostraram ampla predominância de túbulos seminíferos na composição da estrutura testicular (~86% do testículo), indicando também intensa atividade espermatogênica. Esta atividade deveu-se ao fato do ranário do qual as mesmas foram oriundas (RANAMIG) oferecer excelentes condições (tais como temperatura, umidade e alimentação) de reprodução e criação, propiciando que o período reprodutivo destas rãs se estenda ao longo de todo o ano.

No nosso conhecimento, não existe na literatura nenhum relato a respeito da disposição dos túbulos seminíferos no parênquima testicular de rãs-touro. Sugerindo que não existe regionalização evidente deste parênquima quanto à atividade espermatogênica, ou seja, que as estruturas do testículo destas rãs apresentam distribuição homogênea (isotrópica), no presente estudo a análise qualitativa das seis diferentes regiões investigadas do testículo mostrou secções transversais/oblíquas e longitudinais de túbulos seminíferos em plena atividade espermatogênica em todos os cortes histológicos. Assim, à semelhança de mamíferos (Russell et al., 1990a), os túbulos seminíferos provavelmente assumem arranjo convoluto na composição do parênquima testicular. No entanto, diferentemente dos vertebrados superiores, os ductos espermáticos saem diretamente dos túbulos seminíferos, indo desembocar no conjunto de 10 a 12 ductos que compõem a *vasa efferentia* (Lofts, 1984).

As análises histológicas mostraram que o núcleo das células de Sertoli apresenta considerável variação na sua forma. Apesar de no nosso conhecimento não existirem estudos na literatura que abordem pormenorizadamente esta questão em anfíbios ou mesmo outros grupos de vertebrados com espermatogênese em arranjo cístico, acreditamos que os diferentes planos de secção destes núcleos, associado às alterações no volume dos cistos espermatogênicos, seriam os principais fatores responsáveis por esta variação. Além disso, a desestruturação dos cistos espermatogênicos em rãs, ao final da fase espermiogênica, quando as células germinativas prestes a serem espermiadas assumem posição apical no citoplasma das células de Sertoli (Pudney, 1993), pode também ter contribuído para a ocorrência das modificações observadas na morfologia e estrutura dos núcleos das células de Sertoli, bem como no volume nuclear conforme será ainda discutido. Em mamíferos bem

estudados, já é sabido que diferentes formatos para os núcleos das células de Sertoli são observados de acordo com os estádios do ciclo do epitélio seminífero (Russell et al., 1990b; Hess & França, 2005).

5.2. Gerações Espermatogoniais

O número de divisões mitóticas que ocorre durante a fase espermatogonial (gerações espermatogoniais) é um importante parâmetro para se investigar a biologia das espermatogônias, permitindo ainda inferir o potencial de eficiência espermatogênica (produção espermatogênica diária por grama de parênquima testicular) de uma dada espécie (França & Russell, 1998; De Rooij & Russell, 2000). Assim, dependendo da espécie avaliada e mesmo de aspectos filogenéticos, as espermatogônias dão origem aos espermátócitos primários após sofrerem número considerado fixo de divisões mitóticas (De Rooij & Russell, 2000; Nóbrega *et al.*, 2009). As análises morfométricas realizadas em nosso estudo permitiram estabelecer o número de células germinativas por cisto espermatogênico, propiciando ainda estimar com segurança o número de gerações espermatogoniais em rãs-touro. Ou seja, através destas análises, 8 gerações espermatogoniais, uma do tipo A e 7 de do tipo B, foram encontradas. No nosso conhecimento, este é o primeiro resultado acerca do número de gerações espermatogoniais em qualquer espécie de anfíbio. Portanto, não nos foi possível fazer qualquer comparação deste importante parâmetro com o de outras espécies deste grupo de vertebrados. No entanto, pode ser mencionado que estes valores estão próximos daqueles encontrados para a grande maioria das espécies de mamíferos já investigados (De Rooij & Russell, 2000; Hess & França, 2007), e dentro da amplitude observada para teleósteos (6 a 14 gerações)(Le Gac & Loir, 1999; Miura, 1999; Ando *et al.*, 2000; Vilela, 2003; Bizzotto & Godinho, 2007; Leal *et al.*, 2009; Nóbrega et al., 2009; Schulz *et al.*, 2009), os quais, à semelhança dos anfíbios, também apresentam espermatogênese cística. Apesar de aparentemente os números de gerações espermatogoniais não serem tão diferentes em vertebrados, merece ser destacado que, pelo fato das divisões celulares resultarem em aumento exponencial no número de células, poucas gerações a mais ou a menos proporcionariam enormes diferenças na produção espermática.

5.3. Morfometria das Células Germinativas, Células de Sertoli e de Leydig

5.3.1. Células germinativas

No nosso conhecimento, não existem na literatura estudos morfométricos desenvolvidos em anfíbios com ênfase nas células germinativas ao longo do processo espermatogênico, em particular envolvendo os diferentes tipos de espermatogônias. Em comparação com outras espécies de vertebrados que apresentam espermatogênese cística, como os teleósteos *Danio rerio* (zebrafish), *Oreochromis niloticus* (tilápia nilótica) e *Poecilia reticulata* (guppy), nas quais foram aplicadas metodologias semelhantes às utilizadas no presente trabalho (Billard, 1969; Schulz *et al.*, 2005; Leal *et al.*, 2009), as células germinativas em rãs-touro se apresentaram consideravelmente maiores em todas as fases do processo espermatogênico. No entanto, de maneira geral os padrões observados para as curvas de crescimento dos volumes celular, nuclear e citoplasmático das células espermatogênicas nesta espécie de anfíbio foram semelhantes aos observados para as espécies de teleósteos acima mencionadas, particularmente em relação ao guppy no qual, de modo também surpreendente, o maior diâmetro nuclear na prófase meiótica ocorreu na fase de leptóteno/zigóteno (Billard, 1969). Em tilápias e zebrafish, este parâmetro atinge seu maior valor em paquíteno (Vilela, 2003; Schulz *et al.*, 2005, Cardoso, 2007; Leal *et al.*, 2009). Já em mamíferos, conforme seria esperado, o maior volume celular e nuclear encontrado até o presente momento foi para os espermatócitos primários em diplóteno (França & Russel, 1998). Espermatócitos estes que devem ter todo o seu material genético e citoplasmático duplicados para as duas rápidas divisões meióticas que ocorrem até a formação das espermátides (células haplóides) (França & Russell, 1998). Portanto, não temos ainda uma explicação lógica para estes achados acerca do maior tamanho dos espermatócitos primários em leptóteno/zigóteno e paquíteno observados em vertebrados inferiores, tais como teleósteos e as rãs-touro por nós investigadas.

Os cistos de espermatócitos primários em leptóteno/zigóteno foram aqueles que apresentaram maior volume. Tal achado deveu-se ao grande aumento do número de células germinativas por cisto espermatogênico que ocorre após as divisões

mitóticas da última geração de espermatogônias do tipo B (De Rooij & Russell, 2000; Vilela, 2003; Leal *et al.*, 2009; Schulz *et al.*, 2009) e também ao já comentado maior volume celular destes espermátocitos. A queda de volume observada para os cistos espermatogênicos em paquíteno e espermátocitos secundário foi resultante da diminuição do volume individual destas células, aliada as perdas celulares por apoptose que, embora de pequena magnitude, ocorrem continuamente na fase espermatocitária. Já a diminuição acentuada de volume do cisto observada na transição entre espermátocitos secundários e espermátides arredondada inicial coincide com a condensação nuclear e eliminação de citoplasma, que usualmente acontece durante esta etapa da fase espermiogênica em vertebrados (Grier, 1976; Bruslé, 1981; Sprando *et al.*, 1988; França & Russell, 1998; Vilela, 2003; Schulz *et al.*, 2005). Merece ser salientado que, devido a limitações metodológicas, não foi possível estimar de maneira acurada os volumes citoplasmático e celular, bem como o volume do cisto, para as células mais avançadas no processo espermatogênico (espermátides alongadas).

5.3.2. Células de Sertoli

O padrão observado em rãs-touro para o aumento do volume nuclear das células de Sertoli, obtido nos diferentes tipos de cistos espermatogênicos, corrobora dados da literatura que apontam hipertrofia nuclear destas células, presumivelmente devido ao seu grau de amadurecimento, ao longo do processo espermatogênico (Pudney, 1993). Neste raciocínio, os resultados encontrados em rãs-touro sugerem que o amadurecimento das células de Sertoli se inicia após a divisão meiótica, prolongando-se até o final da fase espermiogênica, onde maior volume nuclear foi encontrado para este tipo celular. Outro parâmetro importante que sugere o amadurecimento das células de Sertoli é o estabelecimento da barreira hemato-testicular ou de células de Sertoli (Russell *et al.*, 1989; Pudney, 1993), que em anfíbios parece ocorrer em cistos pós-meióticos (Bergmann *et al.*, 1983). Estudos sobre o estabelecimento da barreira de célula de Sertoli durante o processo espermatogênico em rãs-touro, utilizando-se o traçador elétron-denso lantânio, estão atualmente em desenvolvimento no Laboratório de Biologia Celular ICB-UFMG.

No presente estudo, quantificação do número de células de Sertoli por cisto espermatogênico foi realizada a partir de secções seriadas de fragmentos de testículo. Análises semelhantes já foram realizadas em tilápias e zebrafish, que apresentaram respectivamente aumento de quatro a nove vezes no número de células de Sertoli por cisto durante a fase espermatogonial, com forte tendência de estabilização durante a fase meiótica (Vilela, 2003; Schulz *et al.*, 2005; Cardoso, 2007; Leal *et al.*, 2009). Já em rãs-touro, aumento de aproximadamente 100% no número de células foi observado nesta mesma fase do processo espermatogênico. No entanto, diferentemente do encontrado para tilápias e zebrafish, o número de células de Sertoli voltou a sofrer aumento de quase 100% na transição da fase espermatogonial para a fase espermatocitária, com tendência a estabilização até a transição para a fase espermiogênica, fase esta onde aumento menos acentuado foi observado. Não temos ainda explicação plausível para estas diferenças encontradas entre estes dois grupos de vertebrados. No entanto, já é sabido que o número de células de Sertoli sofre significativo incremento nas fases iniciais do processo espermatogênico (particularmente ao final da fase espermatogonial), visando provavelmente fornecer número adequado de células para suportar o aumento drástico de células germinativas que ocorre nestas fases do processo espermatogênico (Koulish *et al.*, 2002; Matta *et al.*, 2002; Vilela *et al.*, 2003). Embora o padrão geral de proliferação de células de Sertoli possa ser considerado semelhante, quando se compara teleósteos (tilápias e zebrafish) com a rã-touro, observa-se que o número total de células de Sertoli nos cistos mais iniciais é de 2-3 maior nesta última espécie. Este resultado sugere fortemente que a dinâmica de proliferação das células de Sertoli e de espermatogônias parece ser diferente nestas três espécies, como de fato ocorre ao se cotejar, por exemplo, os resultados encontrados neste aspecto para a rã-touro e o zebrafish (Leal *et al.*, 2009).

As células de Sertoli em rãs-touro foram capazes de suportar em média 34 espermátides arredondadas. Esta eficiência, que pode ser considerada alta, foi de 3 a 4 vezes maior do que o valor médio encontrado para diversas espécies de mamíferos já estudadas (Sharpe, 1994; França & Russell, 1998; Hess & França, 2007). No entanto, em comparação com os valores médios obtidos para tilápias e zebrafish (~100

espermátides para cada célula de Sertoli) (Matta *et al.*, 2002, Schulz *et al.*, 2005; Leal *et al.*, 2009), este número pode ser considerado relativamente modesto. No nosso conhecimento, este é o primeiro estudo em anfíbios que aborda a eficiência das células de Sertoli.

5.3.3. Células de Leydig

Dados disponíveis na literatura para mamíferos mostram que o volume individual da célula de Leydig pode variar de $\sim 400 \mu\text{m}^3$ em ovinos e javalis (Lunstra & Schanbacher, 1988; Almeida, 2002) até $\sim 5000 \mu\text{m}^3$ em eqüinos (Johnson & Neaves, 1981), estando o valor observado para a maioria dos mamíferos investigados situado na faixa compreendida entre 1000 e $2000 \mu\text{m}^3$ (Almeida, 2002; Costa, 2009). As células de Leydig não são facilmente observadas no parênquima testicular de rãs-touro e no nosso conhecimento não existem dados acurados acerca do volume individual destas células em anfíbios. Em comparação com outras espécies de vertebrados inferiores, o valor obtido em rãs-touro para este parâmetro ($\sim 520 \mu\text{m}^3$) é de cerca de 20% maior do que o encontrado para tilápias (Matta *et al.* 2002) e cerca de cinco vezes maior do que o observado para zebrafish (Cardoso, 2007; Leal *et al.* 2009). Pelo fato de não ter sido possível estimar o volume líquido do testículo (volume total menos o volume da túnica albugínea), o número total de células de Leydig e também de células de Sertoli, bem como a produção espermática não puderam ser estimadas para este anfíbio.

5.4. Frequência dos Cistos Espermatogênicos

Os valores encontrados para a frequência conjunta dos cistos espermatogoniais, espermatocitários e espermiogênicos provavelmente refletiram a duração de cada uma destas três fases do processo espermatogênico e também o volume dos cistos nestas fases. Particularmente em relação a duração total do processo espermatogênico em rãs-touro, Segatelli e colaboradores (2009) estimaram que este processo leva em torno de 40 dias para ser completado (de espermatogônia inicial até espermatozóide) e as fases espermatogonial, espermatocitária e espermiogênica representam respectivamente 18 (45%), 14 (35%) e 8 (20%) dias desta duração. No entanto, pelo fato das espermátides alongadas não mais apresentarem estrutura que pudesse ser definida individualmente como cística, ou seja, projetam-se

para o lume tubular, o percentual destes “cistos” não pode ser contabilizado. O que obviamente acarretou considerável margem de erro para este tipo de avaliação.

Quando analisados separadamente, os cistos nitidamente mais freqüentes foram aqueles contendo espermátócitos primários em leptóteno/zigóteno, que também apresentaram maior volume. Embora a literatura mostre de forma inequívoca que a etapa de maior duração (usualmente de 10 a 15 dias) durante a primeira prófase meiótica em mamíferos é a fase de paquíteno (Russell *et al.*, 1990a), fase esta na qual ocorre o *crossing-over* ou recombinação gênica, em rãs-touro ao que parece esta posição seria ocupada pelos espermátócitos em leptóteno/zigóteno.

Conforme foi salientado no item de revisão de literatura, a apoptose de células germinativas constitui parte integral do processo espermatogênico. Nas várias espécies de mamíferos já estudadas, somente 2-3 espermatozoides são produzidos para cada 10 espermatozoides teoricamente esperados, a partir da espermatogônia do tipo A diferenciada, denominada classicamente de A1 (França & Russell, 1998; De Rooij & Russell, 2000). Ainda em mamíferos, estudos morfométricos permitiram estabelecer que estas perdas ocorrem principalmente nas fases espermatogonial e meiótica, podendo também ser observadas em menor escala durante a espermiogênese em algumas espécies (França & Russell, 1998). Em vertebrados inferiores, ao que parece não existe uma tendência nítida, podendo as perdas celulares serem observadas predominantemente em qualquer uma das três fases espermatogênicas (ver revisão em Nóbrega *et al.*, 2009). Apesar dos dados morfométricos indicarem baixo número de cistos contendo células germinativas em apoptose nas rãs-touro investigadas no presente trabalho, cerca de 550 espermátides (~55%) das 1024 teoricamente esperadas são formadas. Assim, comparado com mamíferos, o rendimento global da espermatogênese nas rãs-touro foi bem maior e semelhante aos valores encontrados para as espécies de teleósteos já avaliadas neste aspecto (guppies, tilápias e zebrafish) (Billard, 1969; Vilela *et al.*, 2003; Schulz *et al.*, 2005; Leal *et al.*, 2009). Embora no presente estudo as análises histológicas tenham mostrado que apoptoses de células germinativas parecem ocorrer principalmente em cistos da fase espermatogonial final, as contagens de células germinativas por cisto espermatogênico sugerem que estas perdas celulares ocorrem durante as três fases do processo espermatogênico, com

destaque para a transição entre espermatogônias e espermatócitos primários e entre espermatócitos secundários e spermátides. Com o objetivo de melhor caracterizar e quantificar este importante aspecto referente a homeostase do processo espermatogênico em rãs-touro, provavelmente marcadores moleculares de apoptose devem ser utilizados.

5.5. Proliferação das Células Somáticas do Testículo

À semelhança de vários outros parâmetros investigados no presente trabalho, no nosso conhecimento este é o primeiro estudo em anfíbios no qual a proliferação das células de Sertoli, de Leydig e peritubulares mióides foi analisada. Além disso, apesar de estar relativamente bem estabelecido em urodelos (Pudney, 1993), não existe na literatura nenhuma abordagem avaliando parâmetros que envolvam a possível regionalização das estruturas constituintes do testículo em outros grupos de anfíbios. Neste último aspecto em particular, os dados obtidos em rãs-touro mostram que a proliferação das células de Sertoli, Leydig e peritubulares mióides ocorre de maneira uniforme em todo o testículo, reforçando as análises histológicas e morfométricas já comentadas indicando que o parênquima testicular nesta espécie apresenta distribuição homogênea. No entanto, apesar dos índices de proliferação destes três importantes elementos somáticas não apresentarem diferenças significativas entre as seis regiões analisadas, os resultados encontrados mostraram que as células de Sertoli apresentaram atividade proliferativa muito mais intensa do que os outros dois tipos celulares avaliados. Resultado este não observado em tilápias (Alvarenga & França, 2009).

Em peixes e anfíbios, é considerado que novos cistos espermatogênicos são formados quando as células de Sertoli envolvem uma única espermatogônia do tipo A (Koulisch *et al.*, 2002; Pierantoni *et al.*, 2002). Em seguida, para acompanhar o desenvolvimento das células germinativas e o crescimento contínuo do testículo e a formação de novos cistos na idade adulta, é necessário que o número de células de Sertoli total e por cisto sofra considerável aumento, através da manutenção de sua atividade proliferativa (Pudney, 1993; Vilela *et al.*, 2003; Schulz *et al.*, 2005; Alvarenga & França, 2009; Nóbrega *et al.*, 2009), atividade esta que persiste durante a vida adulta

do animal em muitas espécies de vertebrados inferiores (Nóbrega *et al.*, 2009; Schulz *et al.*, 2009). Ainda, como maneira de propiciar o aporte de novas células de Sertoli, merece ser mencionado que, após a espermiacção, as células de Sertoli “livres” em tese podem migrar para outro cisto espermatogênico (Leal *et al.*, 2009).

Em mamíferos, a proliferação pós-natal das células de Sertoli ocorre principalmente quando apenas espermatogônias estão presentes no epitélio seminífero e se encerra quando os espermatócitos primários são formados (Russell *et al.*, 1989; França *et al.*, 2000). Os dados obtidos para rãs-touro no presente trabalho corroboram aqueles encontrados para teleósteos (Vilela, 2003; Schulz *et al.*, 2005, Alvarenga & França, 2009), nos quais células de Sertoli em proliferação podem ser encontradas em cistos espermatogoniais, espermatocitários e espermiogênicos, sugerindo que estas células não estão terminalmente diferenciadas ou, ainda, que as mesmas preservem a sua capacidade proliferativa (Schulz *et al.*, 2005). Além disso, à semelhança das espécies de teleósteos já investigadas, esta proliferação em rãs-touro ocorreu de maneira mais intensa em cistos espermatogoniais. Assim, este resultado reforça que as células de Sertoli proliferam de forma a adequar o seu número ao notável crescimento dos cistos ocorrido durante esta etapa da espermatogênese (Koulisch *et al.*, 2002; Matta *et al.*, 2002; Vilela *et al.*, 2003; Schulz *et al.*, 2005). Ainda, de forma análoga aos mamíferos, a associação das células de Sertoli exclusivamente com espermatogônias seria propícia a proliferação das primeiras. O possível mecanismo desta interação não está ainda elucidado. No entanto, durante o período não reprodutivo em peixes sazonais ou que são experimentalmente colocados em temperaturas mais baixas, ocorre predominância de atividade mitótica das espermatogônias e das células de Sertoli, preparando assim o animal para o próximo ciclo reprodutivo (Nóbrega 2006; Alvarenga & França, 2009).

A proliferação de células de Leydig em teleósteos vem sendo reportada em diversas espécies como a tilápia, o pacu, o mandi e a truta (Vilela, 2003; Chaves-Pozo *et al.*, 2005; Nóbrega, 2006; Alvarenga & França, 2009). Ainda em teleósteos, estudos que abordam a proliferação das células peritubulares mióides são escassos e os dados disponíveis sugerem que a capacidade proliferativa destas células contribui para o crescimento intenso e contínuo que ocorre nos túbulos seminíferos (Vilela, 2003;

Schulz *et al.*, 2005). No entanto, em nenhum destes estudos a proliferação destas células foi correlacionada com os diferentes tipos de cistos espermatogênicos. Neste aspecto em particular, os dados obtidos no presente trabalho não revelaram tendência evidente de associação/proximidade das células de Leydig e peritubulares mióides em divisão com determinado tipo de cisto espermatogênico. No entanto, percentual considerável destes dois tipos celulares marcados com timidina triciada foi encontrado próximo ou em associação a células germinativas mais avançadas no processo espermatogênico. Não temos ainda uma clara explanação para estes achados, embora na literatura seja sugerido que as células de Leydig e peritubulares mióides assumem importante papel na etapa final da espermatogênese. Em particular, as células germinativas mais avançadas requererem maior quantidade de andrógenos (Schulz & Miura, 2002; Vilela, 2003) enquanto as células peritubulares mióides são capazes de formar uma rede contrátil que, após a espermição, facilita a condução dos espermatozoides no lume tubular, rumo aos ductos excurrentes (Grier *et al.*, 1989).

Conclusões

6. Conclusões

De maneira geral, os resultados obtidos nas investigações realizadas no presente estudo permitem concluir que:

1. Não existe regionalização evidente do parênquima testicular em rãs-touro. Além disto, a atividade reprodutiva desta espécie pode ser prolongada ao longo do ano quando mantida em condições ideais de criação, o que a torna um interessante modelo nas pesquisas na área da biologia da reprodução em especial sobre o processo espermatogênico.

2. Existem oito gerações espermatogoniais para a rã-touro, estando este número próximo ao encontrado para mamíferos e teleósteos. Ainda, as células germinativas em rãs-touro são consideravelmente maiores quando comparadas com outras espécies de espermatogênese cística já investigadas.

3. As alterações encontradas no volume nuclear das células de Sertoli é um indicativo de que estas células iniciam processo de amadurecimento após a divisão meiótica. Apesar de modesta quando comparada à espécies de teleósteos, a eficiência das destas células em rãs-touro é alta quando comparada à espécies de mamíferos já investigadas. De maneira semelhante à teleósteos, o número de células de Sertoli por cisto espermatogênico cresce substancialmente até o final do processo espermatogênico, embora número de células de Sertoli nos cistos iniciais em rãs-touro é em torno de 2-3 vezes maior do que o encontrado para teleósteos.

4. O volume individual das células de Leydig em rãs-touro apresentou-se notavelmente superior àqueles encontrados para outras espécies de vertebrados inferiores já investigadas.

5. A freqüência dos cistos espermatogoniais, espermatocitários e espermiogênicos refletiram a duração de cada uma das três fases do processo espermatogênico. Embora de forma controversa aos dados da literatura, a freqüência individual dos cistos espermatogênicos em rãs-touro indicou que a fase de leptóteno/zigóteno seria a de maior duração durante a primeira prófase meiótica nesta espécie.

6. Cistos apresentando células em apoptoses foram pouco freqüentes em rãs-touro, embora o número de espermátides encontrado indique perda de 45% do total esperado. Ainda, as perdas celulares acontecem durante todo o processo espermatogênico, em especial na transição entre as três etapas deste processo.

7. A proliferação das células de Sertoli, Leydig e peritubulares mióides ocorre com a mesma intensidade em todo o testículo em rãs-touro, sendo este mais um indicativo da uniformidade do parênquima testicular nesta espécie. Além disso as células de Sertoli proliferam-se de forma mais intensa que as células de Leydig e peritubulares mióides.

8. As células de Sertoli em rãs-touro proliferam-se especialmente em associação à cistos espermatogoniais, de forma a adequar o seu número ao notável crescimento dos cistos ocorrido durante esta etapa da espermatogênese.

9. Embora percentual considerável das células de Leydig e peritubulares mióides marcados com timidina triciada tenha sido encontrado próximo ou em associação a células germinativas mais avançadas no processo espermatogênico, não foi possível distinguir tendência clara de associação a determinados tipos de cistos espermatogênico.

Figuras e Tabelas

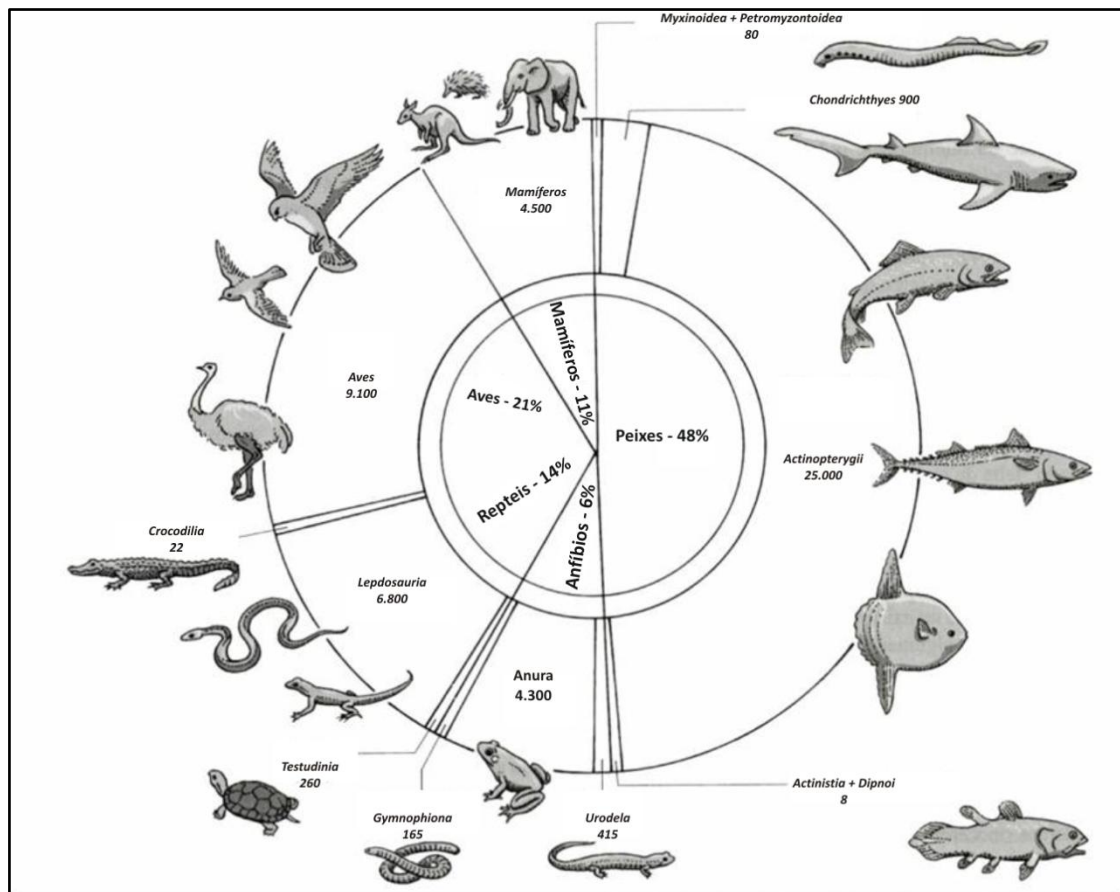


Figura 1 – Diagrama ilustrativo da diversidade dos Vertebrados. As áreas do diagrama correspondem ao número aproximado de espécies em cada grupo. No total, existem cerca de cinquenta mil espécies de vertebrados cujos nomes comuns, bem como o percentual dos mesmos, aparecem no interior do círculo interno, já os nomes formais dos grupos estão nas partes externas do diagrama. Fonte: Pough *et al.*, 2008.



Figura 2 – Exemplar de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) mostrando o aspecto externo desta espécie de anfíbio, onde pode ser evidenciada a membrana interdigital (*) presente entre os dedos dos membros posteriores.

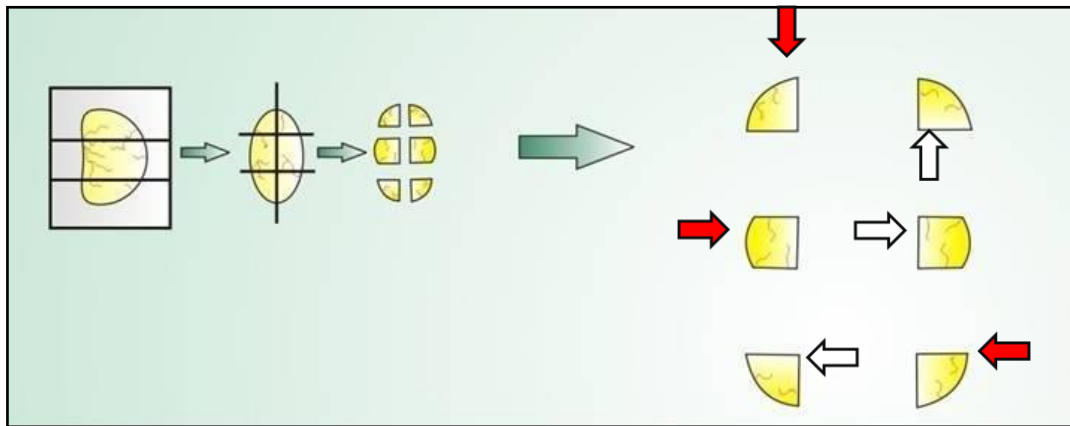


Figura 3 – Esquema ilustrativo da determinação das seis diferentes regiões no testículo de rã-touro. Os testículos foram coletados e fragmentados (um corte sobre o eixo longitudinal e dois cortes transversais, obtendo-se seis fragmentos por testículo). Cada um dos seis fragmentos foi posicionado de forma a se obter seis diferentes planos de corte para cada um dos testículos, três deles partindo da região da albugínea em direção ao parênquima testicular e três partindo da região do parênquima testicular em direção à albugínea.

Figura 4 – Cortes histológicos das seis diferentes regiões do testículo investigadas em rãs-touro. A avaliação destes cortes histológicos não indicou diferença no padrão de disposição dos túbulos seminíferos e nem tampouco da proporção volumétrica (%) dos compartimentos tubular e intertubular. MED C-A = Região medial, partindo do centro para a albugínea; MED A-C = Região medial, partindo da albugínea para o centro; Ext. I C-A = Extremidade I, partindo do centro para albugínea; Ext. I A-C = Extremidade I, partindo da albugínea para o centro; Ext. II C-A = Extremidade II, corte frontal, partindo do centro para a albugínea; Ext. II A-C = Extremidade II, corte frontal, partindo da albugínea para o centro. Aumento 40x

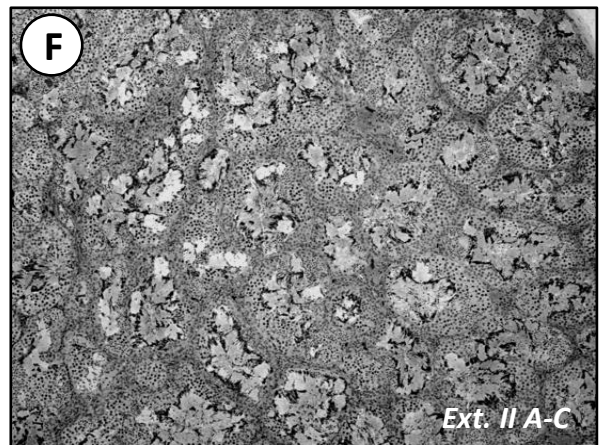
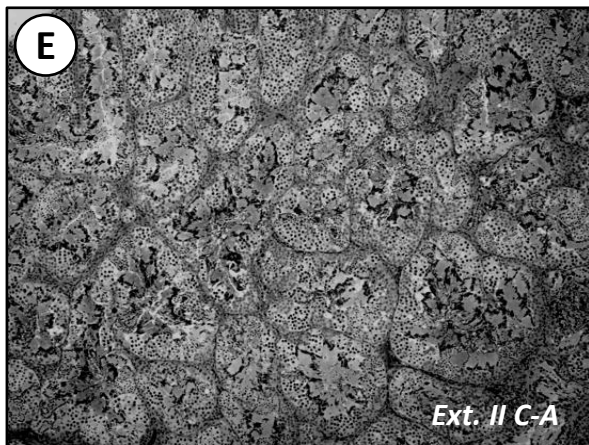
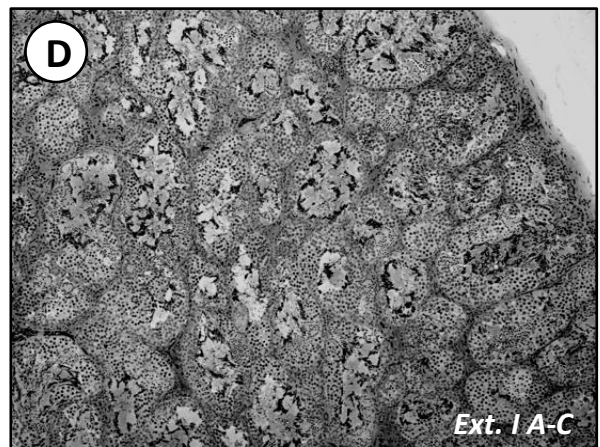
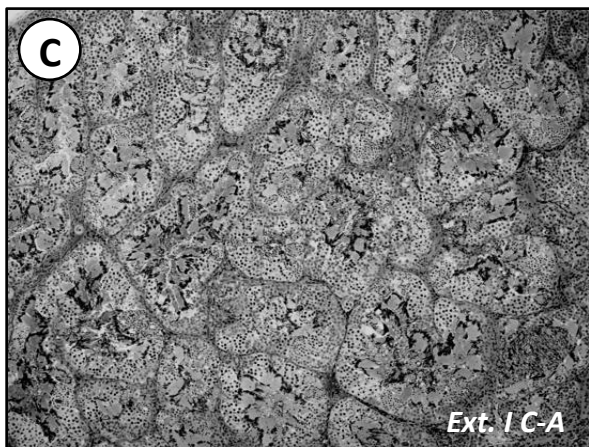
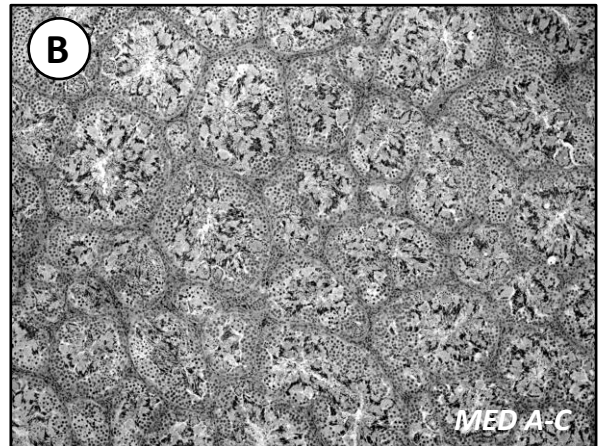
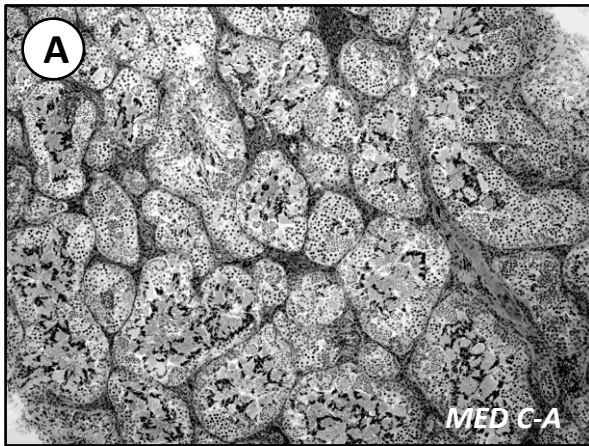
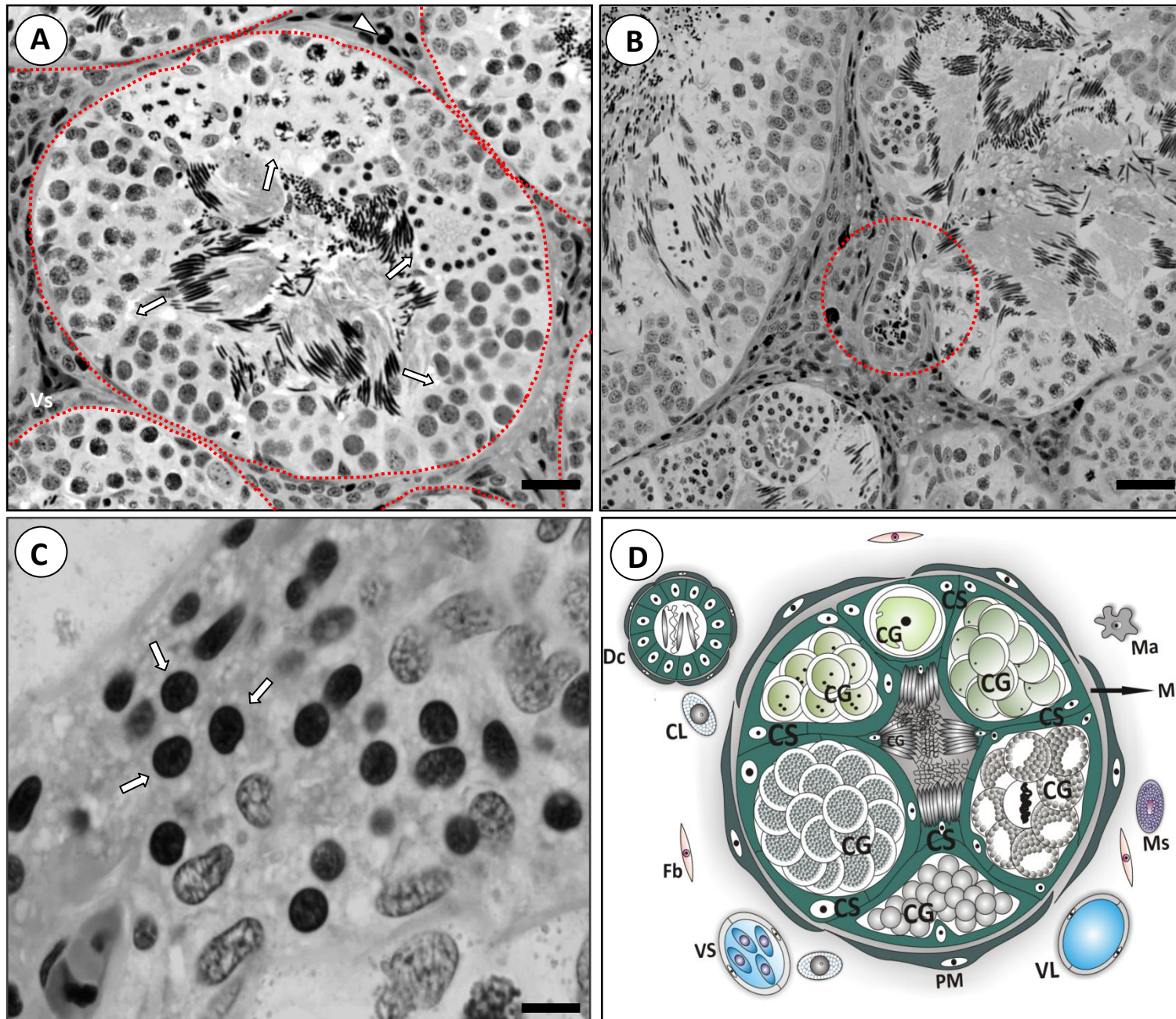


Figura 5 – Estrutura do Testículo da rã-touro (*Lithobates catesbeianus*). A) Compartimento tubular (delimitado pela linha tracejada em vermelho) e intersticial do testículo. No compartimento tubular, as setas indicam os cistos espermatogênicos. No interstício, estão destacadas as células de Leydig (cabeça de seta) e os vasos sanguíneos (Vs). B) Destaque para o ducto de condução de espermatozóide, partindo diretamente do túbulo seminífero (círculo de linha tracejada em vermelho). C) Detalhe nas células de Leydig (setas) presentes no compartimento intersticial. Estas células apresentam núcleo esférico ou oval, mais densamente corado que as demais células no interstício, e citoplasma vacuolizado. D) Neste diagrama está ilustrado o compartimento tubular formado por Células Peritubulares Mióides (PM), pela membrana basal (MB) e pelo epitélio seminífero constituído por cistos espermatogênicos contendo Células Sertoli (CS) e Células Germinativas em um mesmo estágio de desenvolvimento (CG). Já o interstício contém ductos para a condução de espermatozoides (Dc), Vasos Sanguíneos (VS), Vasos Linfáticos (VL), Células de Leydig (CL), Mastócitos (Ms), Macrófagos (Ma) e Fibroblastos (Fb). Barra em A = 40µm, B = 60µm e C = 10µm.



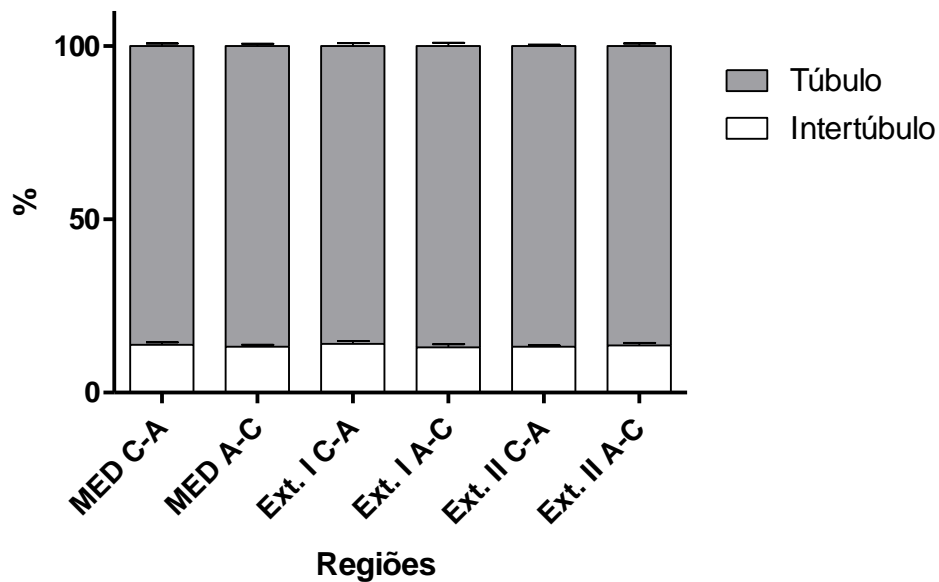


Figura 6 – Proporção volumétrica dos compartimentos tubular e intertubular nas seis diferentes regiões do testículo investigadas em rãs-touro (Média \pm erro padrão). Conforme pode ser observado, a proporção ocupada pelos dois compartimentos é bastante semelhante nas seis regiões. MED C-A = Região medial, partindo do centro para a albugínea; MED A-C = Região medial, partindo da albugínea para o centro; Ext. I C-A = Extremidade I, partindo do centro para albugínea; Ext. I A-C = Extremidade I, partindo da albugínea para o centro; Ext. II C-A = Extremidade II, corte frontal, partindo do centro para a albugínea; Ext. II A-C = Extremidade II, corte frontal, partindo da albugínea para o centro.

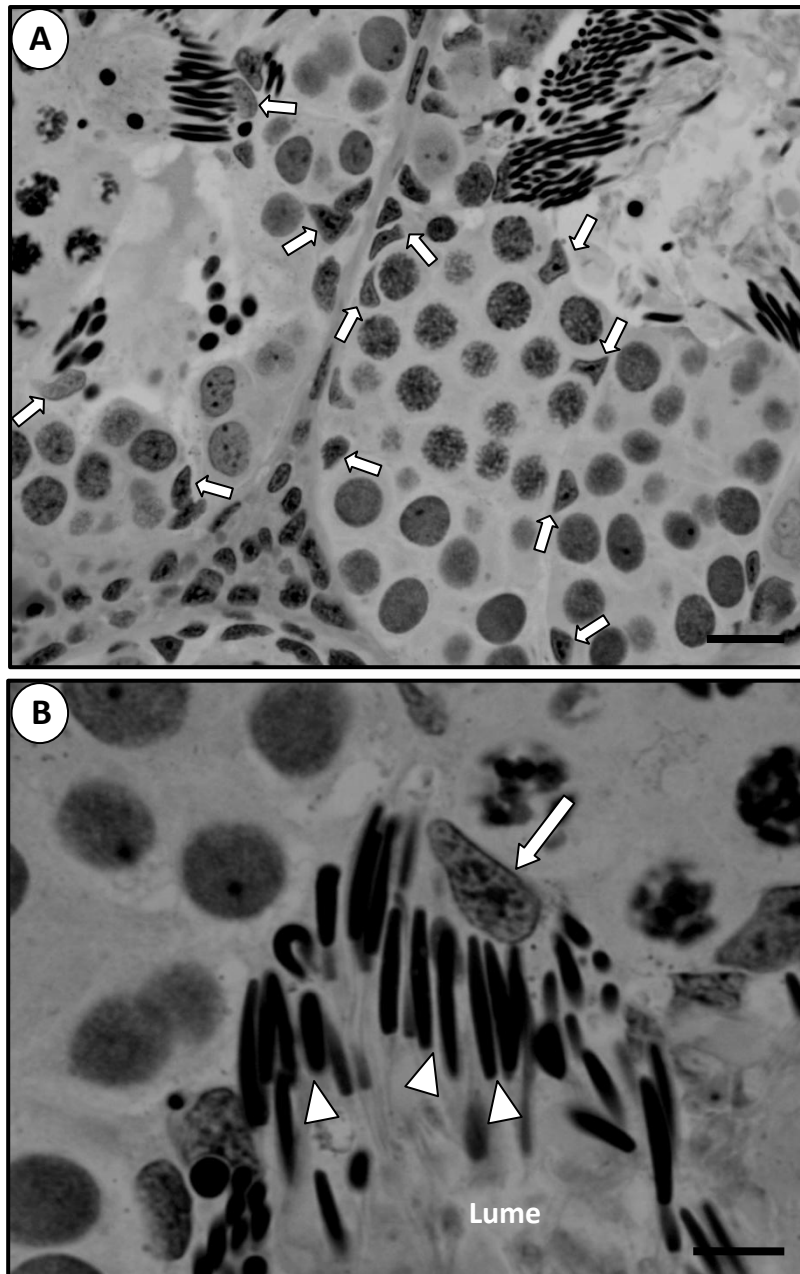
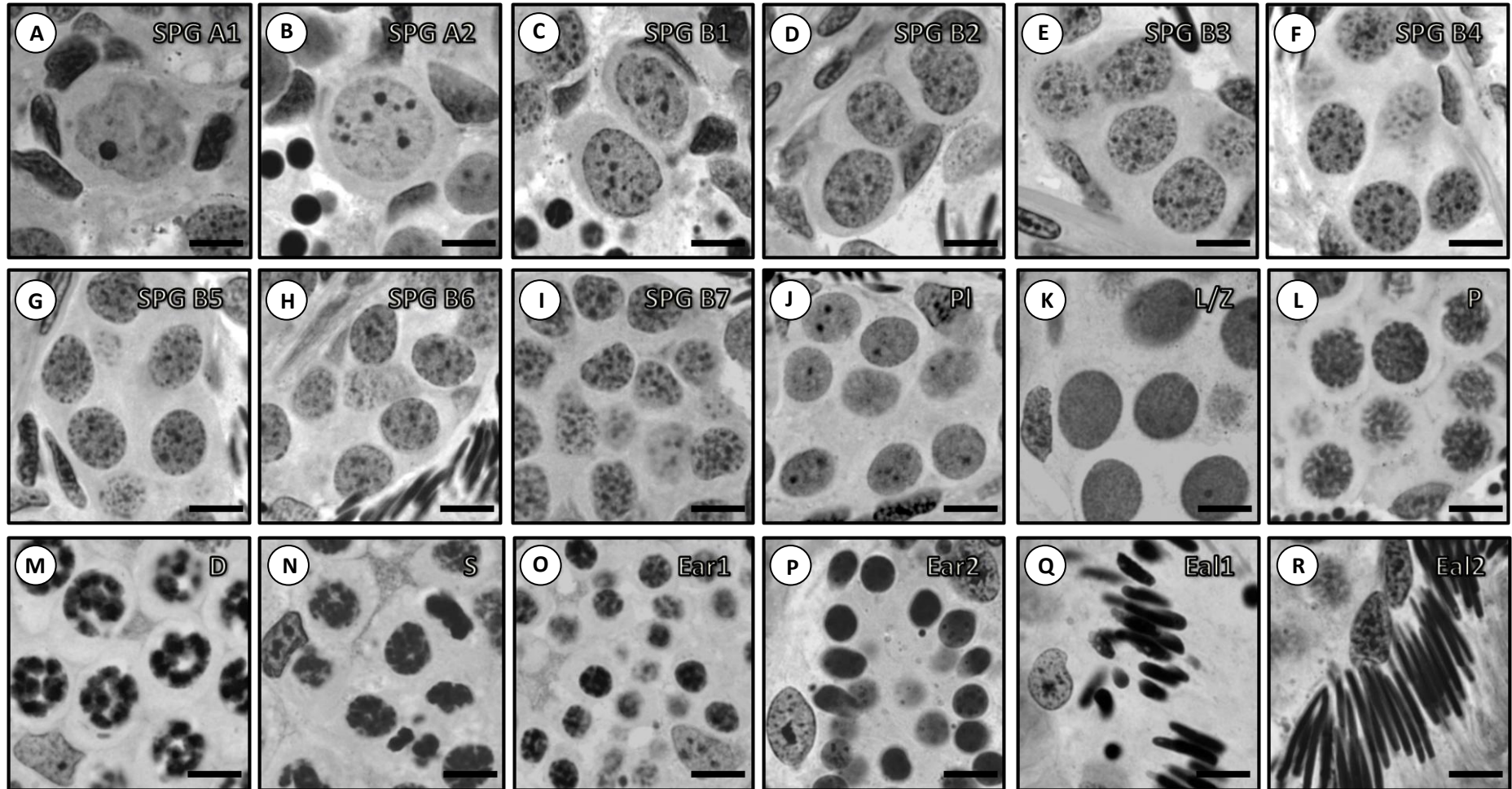


Figura 7 – Células de Sertoli na rã-touro. Na figura A, pode ser observado os variados formatos assumidos pelos núcleos das células de Sertoli (setas), dependendo da secção histológica dos cistos espermatogênicos. Já a figura B ilustra o posicionamento das espermátides (cabeça da seta) em relação a região apical das células de Sertoli (seta) após a abertura do cisto espermatogênico. Barra em A = 20 μm , em B = 10 μm

Figura 8 – Esta figura ilustra os diferentes tipos de células germinativas em rãs-touro durante a evolução do processo espermatogênico: (A-I) Espermatogônias do tipo A (SPG A1-A2) e do tipo B (SPG B1-B7), (J-M) espermatócitos primários em pré-leptóteno (Pl), leptóteno/zigóteno (L/Z), paquíteno (P), diplóteno (D), (N) espermatócitos secundários (S), (O-P) espermátides arredondadas (Ear-1, Ear2) e (Q-R) espermátides alongadas (Eal 1, Eal 2). Barra = 10 μ m.



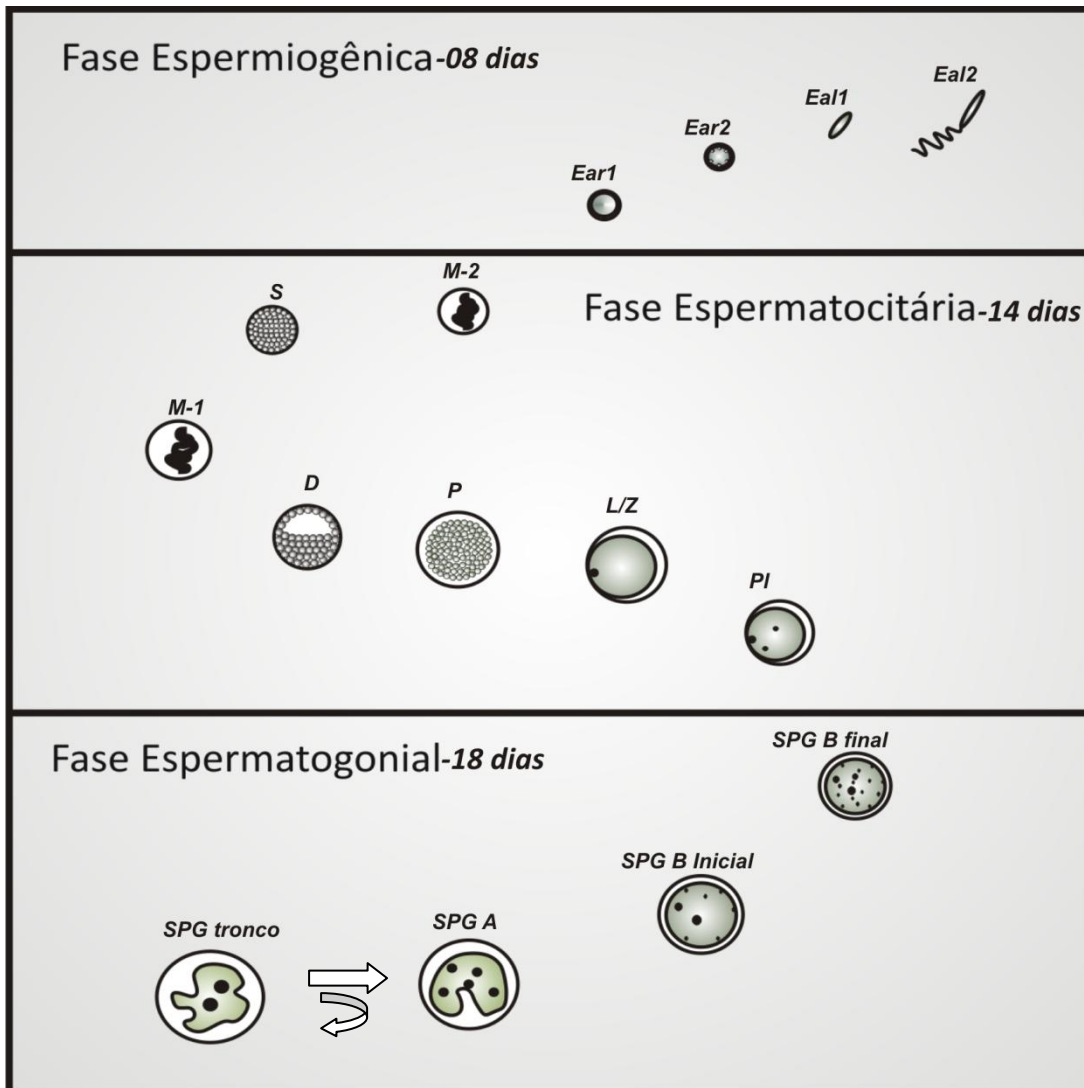


Figura 9 – Processo Espermatogênico em rã-touro investigado no presente estudo. Esquema ilustrativo das três fases do processo espermatogênico (proliferativa ou mitótica, espermatocitária ou meiótica e espermiogênica), cuja duração total é de 40 dias (Segatelli et al., 2009). Na fase espermatogonial (18 dias) ocorre aumento do número de células através de várias divisões mitóticas das espermatogônias, além da auto-renovação das espermatogônias-tronco. Embora não esteja ilustrado, existem várias gerações de espermatogônias do tipo B. A duplicação do DNA ($4n$), a recombinação gênica e a divisão meiótica acontecem na fase espermatocitária (14 dias) produzindo células haplóides, que sofrerão drásticas transformações durante a fase espermiogênica (8 dias) resultando na formação dos espermatozoides. Espermatogônias tronco (*SPG tronco*); espermatogônia do tipo A (*SPG A*) e do tipo B (*SPG B inicial* e *SPG B final*); espermatócitos primários em pré-leptóteno (*PI*), leptóteno/zigóteno (*L/Z*), paquíteno (*P*) e diplóteno (*D*); divisões meióticas I e II (*M-1* e *M-2*); espermatócito secundário (*S*); espermátides arredondadas (*Ear1* e *Ear2*) e espermátides alongadas (*Eal 1* e *Eal2*).

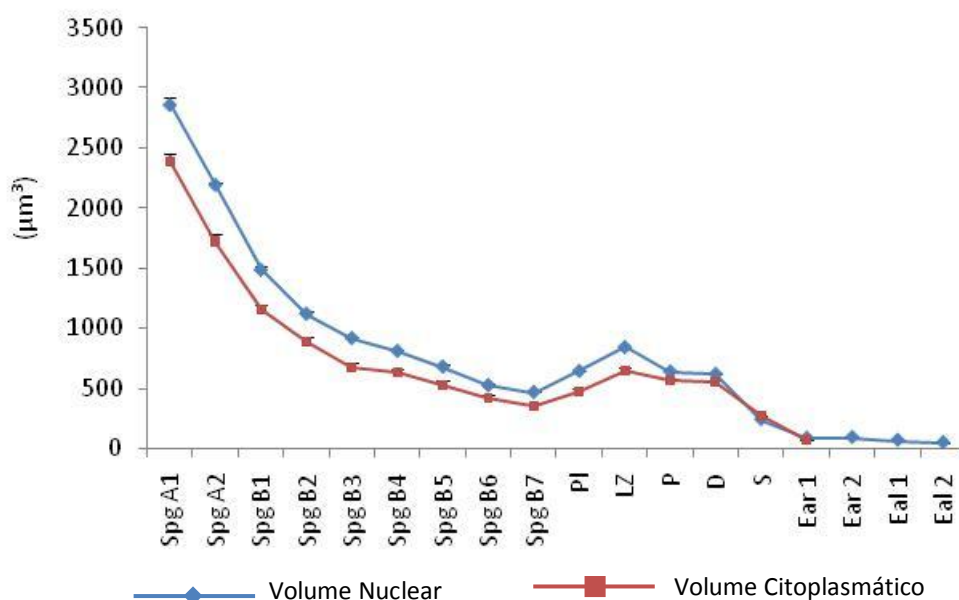


Figura 10 – Volumes nuclear e citoplasmático das células germinativas de rãs-touro (Média ± erro padrão). Espermatogônias do tipo A (SPG A1-A2), espermatogônias do tipo B (SPG B1-B7), espermatócitos primários em pré-leptóteno (PI), leptóteno/zigóteno (L/Z), paquíteno (P), diplóteno (D), espermatócitos secundários (S), espermátides arredondadas (Ear-1, Ear2) e espermátides alongadas (Eal 1, Eal 2).

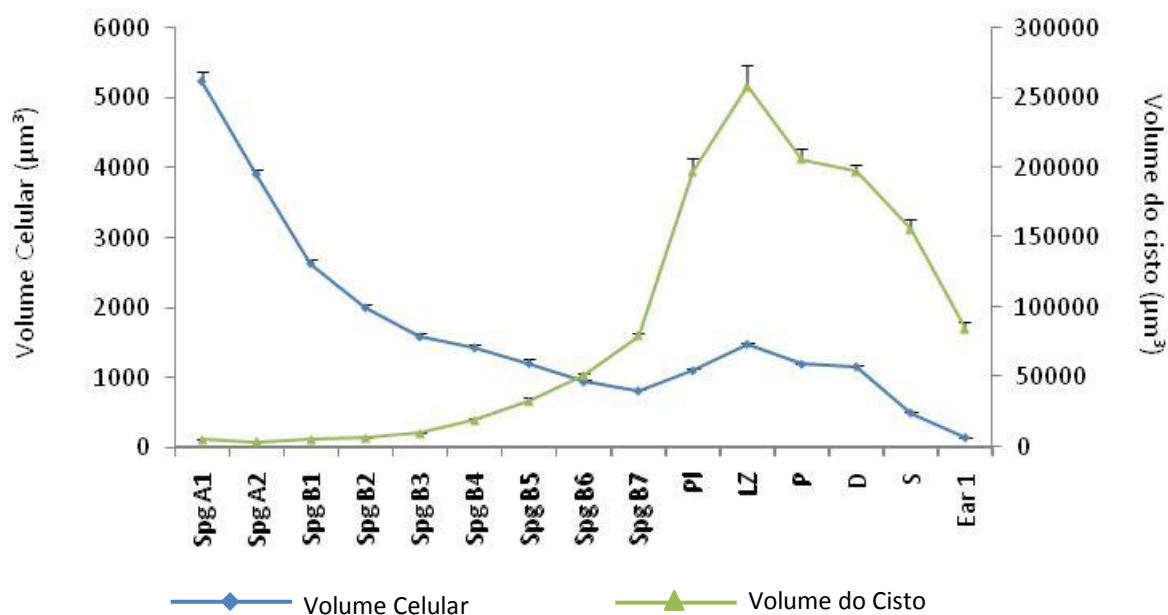


Figura 11 – Volumes das células germinativas e dos cistos espermatogênicos de rãs-touro (Média ± erro padrão). Espermatogônias do tipo A (SPG A1-A2), espermatogônias do tipo B (SPG B1-B7), espermatócitos primários em pré-leptóteno (PI), leptóteno/zigóteno (L/Z), paquíteno (P), diplóteno (D), espermatócitos secundários (S), espermátide arredondada (Ear-1).

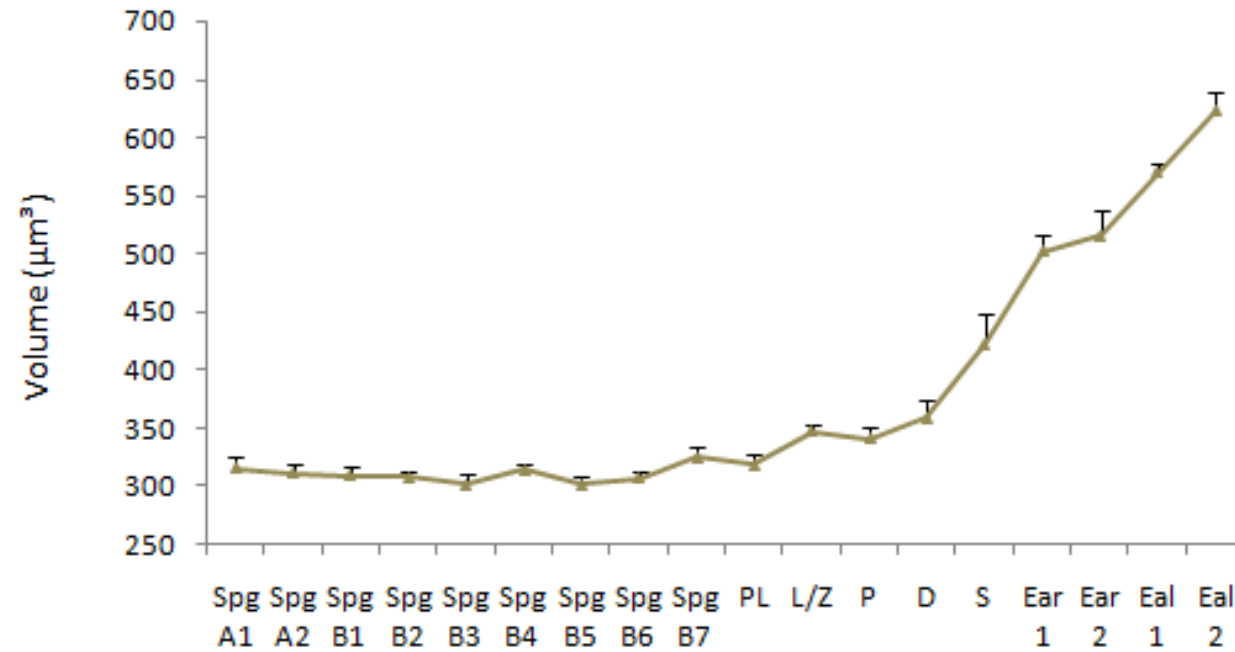
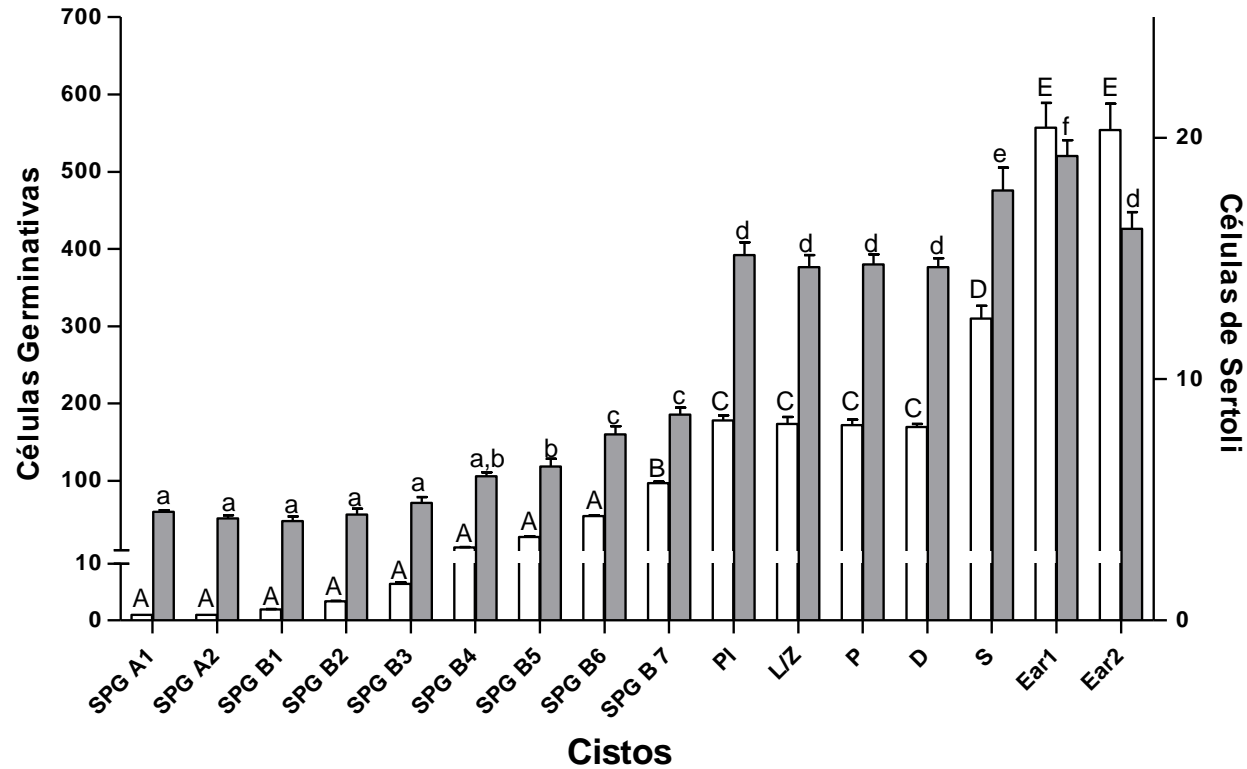


Figura 12 – Volume nuclear das células de Sertoli associadas a diferentes tipos de cistos espermatogênicos (Média ± erro padrão). Espermatogônias do tipo A (SPG A1-A2), espermatogônias do tipo B (SPG B1-B7), espermatócitos primários em pré-leptóteno (PI), leptóteno/zigóteno (L/Z), paquíteno (P), diplóteno (D), espermatócitos secundários (S), espermátides arredondadas (Ear-1, Ear2) e espermátides alongadas (Eal 1, Eal 2). Note que ocorre aumento substancial no volume nuclear a partir de espermatócitos em diplóteno.



Células germinativas
 Células de Sertoli

Figura 13 – Número de células de Sertoli e de células germinativas nos diferentes tipos de cistos espermatogênicos (Média ± erro padrão). Diferentes gerações de espermatogônias do tipo A (SPG A1-A2), do tipo B (SPG B1-B7), espermatócitos primários em pré-leptóteno (PI), leptóteno/zigóteno (L/Z), paquíteno (P), diplóteno (D), espermatócitos secundários (S) e espermátides arredondadas (Ear-1, Ear2). Conforme o esperado, o número de células germinativas nos cistos aumenta significativamente na fase espermatogonial e após a meiose. Já o número de Sertoli aumenta gradualmente na fase espermatogonial, com tendência a estabilização nas duas fases seguintes. Letras diferentes denotam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

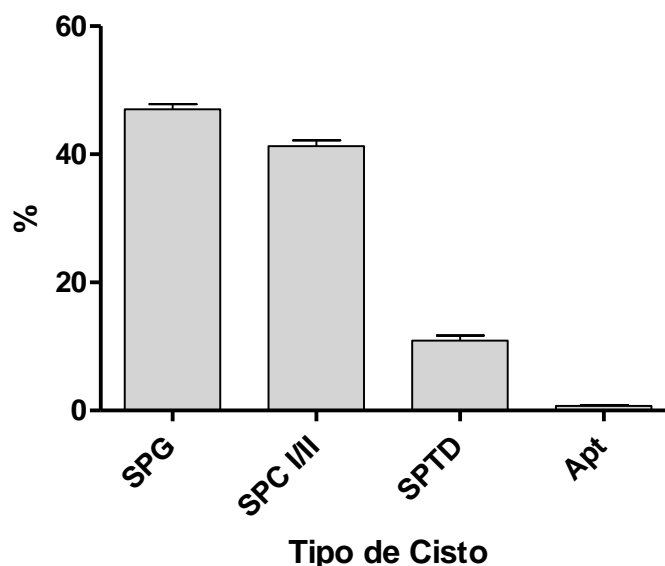


Figura 14 – Frequência dos cistos nas três diferentes fases do processo espermatogênico e de cistos contendo células em apoptose (Média \pm erro padrão). Cistos na fase espermatogonial (SPG), espermatocitária (SPC I/II), espermiogênica (SPTD) e com células em apoptose (Apt).

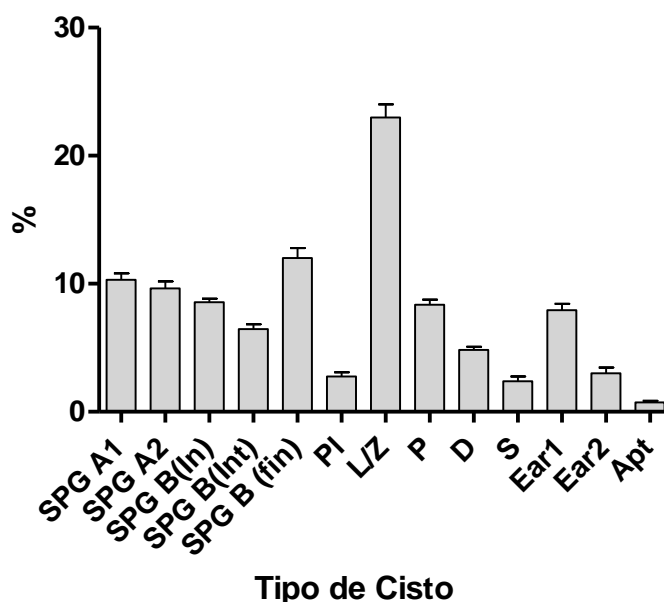


Figura 15 – Frequência dos diferentes cistos espermatogênicos e de cistos contendo células em apoptose (Média \pm erro padrão). Espermatogônias do tipo A (SPG A1-A2); espermatogônias do tipo B inicial [SPG B (In)], intermediária [SPG B(Int)] e final [SPG B(fin)]; espermatócitos primários em pré-leptóteno (PI), leptóteno/zigóteno (L/Z), paquíteno (P), diplóteno(D); espermatócito secundário (S); espermátides arredondadas (Ear1 e Ear2) e cistos contendo células apoptóticas (Apt).

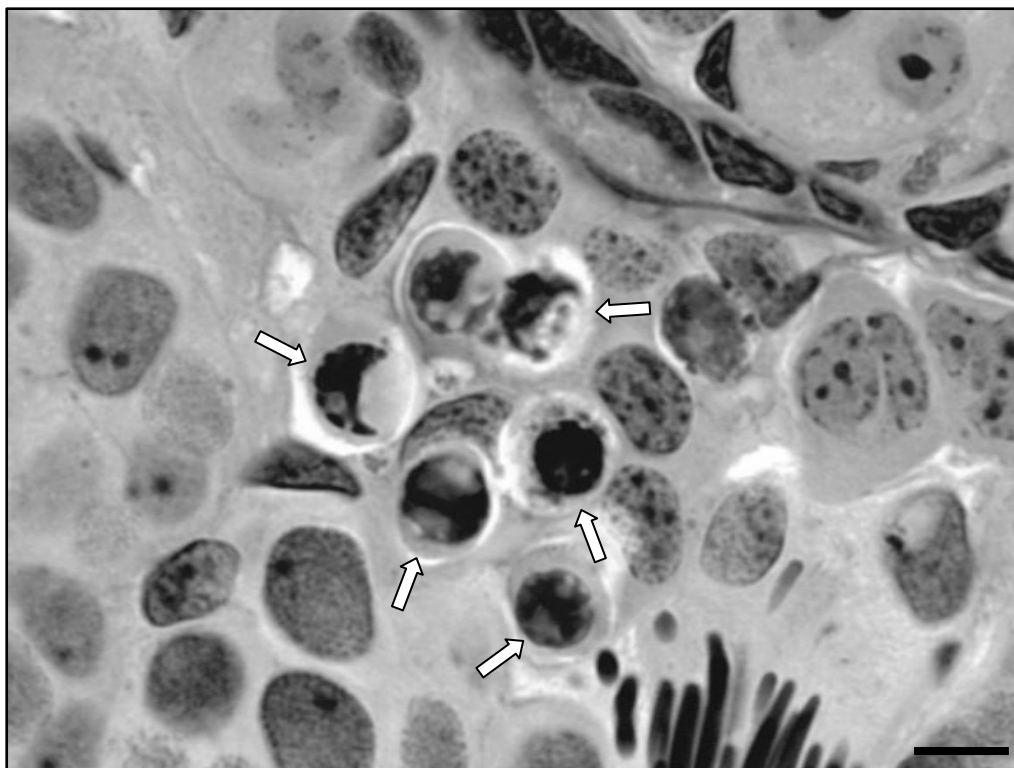


Figura 16 – Características das células germinativas em apoptose em cisto de espermatogônias do tipo B finais, no testículo de rãs-touro. As células apoptóticas (setas) são facilmente distinguíveis através de sua morfologia. Barra = 10 μ m

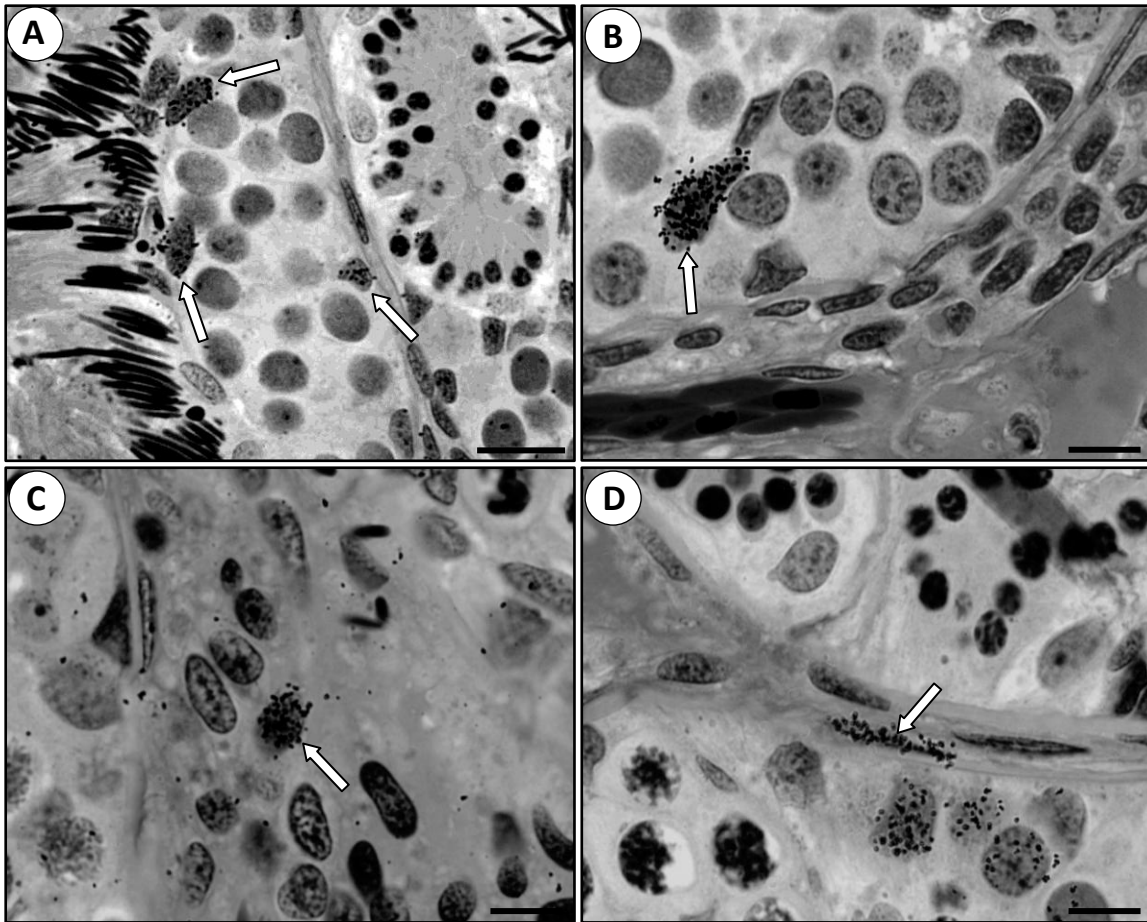


Figura 17 – Proliferação das células somáticas do testículo de rãs-touro sexualmente maduras (setas). A) e B) Células de Sertoli, C) célula de Leydig e D) célula peritubular mióide marcadas com timidina triçada. Barras: em A = 20 μm ; B, C e D = 10 μm .

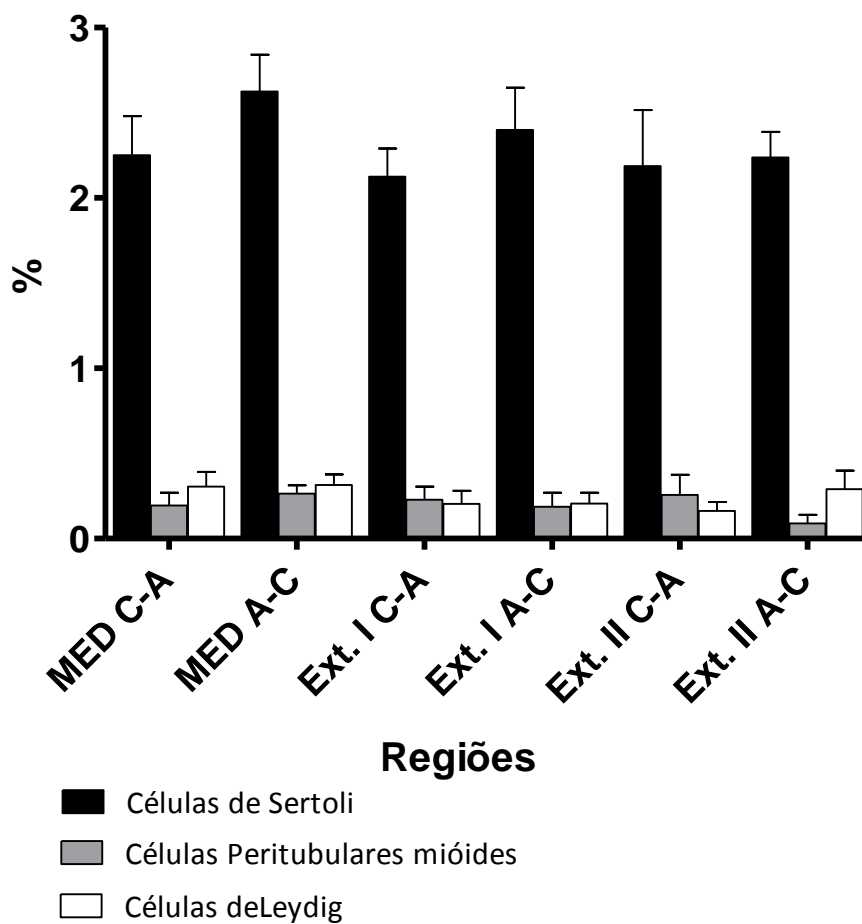


Figura 18 – Índice de proliferação das células de Sertoli, Leydig e peritubular mióide nas seis diferentes regiões testiculares investigadas em rãs-touro (Média \pm erro padrão). Conforme pode ser notado, os valores não apresentaram diferença estatística significativa ($p < 0,05$). MED C-A = Região medial, partindo do centro para a albugínea; MED A-C = Região medial, partindo da albugínea para o centro; Ext. I C-A = Extremidade I, partindo do centro para albugínea; Ext. I A-C = Extremidade I, partindo da albugínea para o centro; Ext. II C-A = Extremidade II, corte frontal, partindo do centro para a albugínea; Ext. II A-C = Extremidade II, corte frontal, partindo da albugínea para o centro.

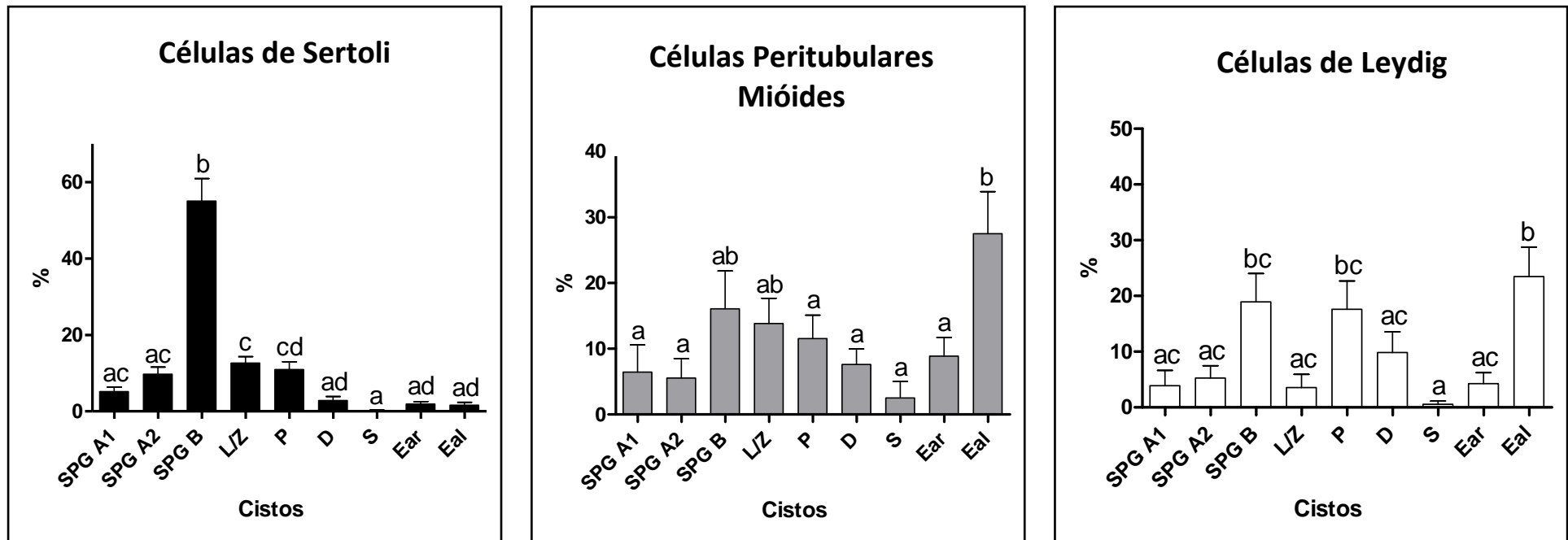


Figura 19 – Proliferação das células de Sertoli, peritubular mióide e de Leydig associadas ou nas proximidades dos diferentes tipos de cistos espermato gênicos (Média \pm erro padrão). Espermatogônias do tipo A (SPG A1-A2); espermatogônias do tipo B (SPG B); espermatócitos em leptóteno/zigóteno (L/Z), paquíteno (P), diplóteno (D); espermatócitos secundários (S); espermátides arredondadas (Ear) e espermátides alongadas (Eal). Letras diferentes entre os cistos demonstram diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$). Conforme pode ser notado, de maneira geral os maiores índices de proliferação foram observados para os cistos de espermatogônias e de espermátides alongadas.

Figuras e tabelas

Tabela 1 - Morfometria dos diferentes tipos de cistos espermatogênicos de rãs-touro (média ± erro padrão).

Tipo de cisto	Células Germinativas						Células de Sertoli			
	Nº de células por cisto	Diâmetro nuclear (µm)	Volume nuclear (µm³)	Volume citoplasmático (µm³)	Volume Celular (µm³)	Volume² do cisto (µm³)	Nº de Células por cisto	Diâmetro nuclear (µm)	Volume nuclear (µm³)	Nº de células germinativas (cisto) por célula de Sertoli
SPG - A1 ¹	1,0 ± 0,0 (0) ³	18 ± 0,1	2862 ± 61 (55) ⁴	2383 ± 74 (45) ⁵	5245 ± 121	5245 ± 121	4,5 ± 0,1	8,4 ± 0,1	315 ± 9	0,2 ± 0,0
SPG - A2	1,0 ± 0,0 (0)	16 ± 0,1	2194 ± 23 (56)	1721 ± 58 (44)	3916 ± 64	3916 ± 64	4,2 ± 0,1	8,4 ± 0,1	311 ± 9	0,2 ± 0,01
SPG - B1	2,0 ± 0,04 (0)	14,1 ± 0,1	1484 ± 28 (56)	1152 ± 41 (44)	2637 ± 63	5140 ± 92	4,1 ± 0,2	8,3 ± 0,1	309 ± 7	0,5 ± 0,02
SPG - B2	3,4 ± 0,1 (15)	12,9 ± 0,1	1117 ± 28 (56)	890 ± 36 (44)	2007 ± 43	6836 ± 208	4,4 ± 0,2	8,3 ± 0,0	308 ± 5	0,8 ± 0,04
SPG - B3	6,5 ± 0,3 (4)	12 ± 0,1	914 ± 14 (58)	676 ± 40 (42)	1590 ± 50	10212 ± 345	4,9 ± 0,2	8,3 ± 0,1	302 ± 10	1,3 ± 0,1
SPG - B4	13,6 ± 0,5 (0)	11,5 ± 0,1	806 ± 13 (56)	628 ± 28 (44)	1434 ± 37	19468 ± 888	6,0 ± 0,2	8,4 ± 0,1	314 ± 6	2,3 ± 0,1
SPG - B5	28 ± 0,7 (0)	10,9 ± 0,2	676 ± 27 (56)	533 ± 31 (44)	1208 ± 54	33290 ± 1815	6,4 ± 0,3	8,3 ± 0,1	302 ± 7	4,4 ± 0,2
SPG - B6	54 ± 1 (6)	10,0 ± 0,1	520 ± 15 (55)	425 ± 17 (45)	946 ± 30	51249 ± 1774	7,7 ± 0,3	8,3 ± 0,1	307 ± 5	7,1 ± 0,4
SPG - B7	97 ± 2 (10)	9,5 ± 0,8	462 ± 10 (57)	355 ± 13 (43)	817 ± 14	79419 ± 2641	8,5 ± 0,3	8,5 ± 0,1	325 ± 8	11,5 ± 0,5
PI	178 ± 6 (8)	10,7 ± 0,03	638 ± 6 (58)	467 ± 23 (42)	1105 ± 22	197523 ± 9414	15 ± 0,5	8,4 ± 0,1	319 ± 10	11,8 ± 0,4
L/Z	174 ± 9 (2)	11,7 ± 0,03	839 ± 5 (57)	645 ± 28 (43)	1484 ± 29	258581 ± 14415	14,7 ± 0,5	8,7 ± 0,1	347 ± 6	11,9 ± 0,5
P	172 ± 7 (3)	10,6 ± 0,1	634 ± 14 (53)	564 ± 10 (47)	1198 ± 14	206179 ± 8067	14,8 ± 0,4	8,6 ± 0,1	341 ± 10	11,7 ± 0,4
D	170 ± 4 (4)	10,5 ± 0,1	614 ± 8 (53)	550 ± 14 (47)	1164 ± 20	197268 ± 5510	14,7 ± 0,4	8,8 ± 0,1	359 ± 16	11,6 ± 0,3
S	310 ± 17 (8)	7,6 ± 0,03	236 ± 3 (47)	268 ± 4 (53)	504 ± 5	155836 ± 7706	18 ± 1	9,2 ± 0,2	422 ± 27	18 ± 0,8
Ear1	557 ± 32 (10)	5,3 ± 0,03	80 ± 2 (53)	72 ± 2 (47)	152 ± 3	84542 ± 4835	19 ± 1	9,8 ± 0,1	502 ± 15	29 ± 1
Ear2	554 ± 34 (1)	5,5 ± 0,1	87 ± 3	***	***	***	16 ± 1	10,0 ± 0,1	516 ± 21	34 ± 2
Eal1	*	**	63 ± 3	***	***	***	*	10,2 ± 0,1	570 ± 9	*
Eal2	*	**	44 ± 1	***	***	***	*	10,6 ± 0,1	623 ± 16	*

* Não foram estimados os números de células germinativas e de Sertoli para estes dois tipos celulares devido a falta de delimitação do cisto nesta fase.

**Não foram obtidos os diâmetros médios destes tipos celulares, devido ao seu formato cilíndrico. Neste caso o volume nuclear foi estimado utilizando-se a fórmula de volume do cilindro.

***Não foram estimados os volumes citoplasmático, celular e dos cistos devido à limitações da microscopia de luz para este tipo de análise.

¹SPG A = espermatogônia do tipo A; SPG B1-7 = diferentes gerações de espermatogônias do tipo B; PI = espermatócito primário em pré-leptóteno; L/Z = espermatócito primário em leptóteno / zigóteno; P = espermatócito primário em paquíteno; D = espermatócito primário em diplóteno; S = espermatócito secundário; Ear1-2 = espermatídes arredondadas; Eal1-2 = espermatídes alongadas.

²Volume do cisto excluindo-se o volume das células de Sertoli.

³ O número entre parênteses representa o percentual de perda celular.

⁴ O número entre parênteses representa percentual de núcleo da célula.

⁵O número entre parênteses representa percentual de citoplasma da célula.

Tabela 2 - Morfometria das células de Leydig em rãs-touro (Média \pm erro padrão)

Parâmetro	
Proporção Nuclear (%)	38 \pm 1
Proporção Citoplasmática (%)	62 \pm 1
Diâmetro Nuclear (μm)	7,2 \pm 0,03
Volume Nuclear (μm^3)	196 \pm 2
Volume Citoplasmático (μm^3)	321 \pm 15
Volume Celular (μm^3)	517 \pm 15

Anexos



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 48/2008**, relativo ao projeto intitulado "**Investigação do processo espermato gênico em rã-touro (Rana catesbeiana) e transplante de espermato gônias dessa espécie para tilápias**", que tem como responsável(is) **Tânia Mara Segatelli**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **9/ 07/2008**.

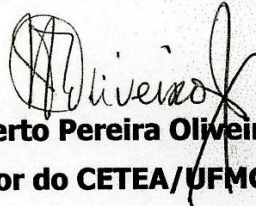
Este certificado expira-se em **9/ 07/ 2013**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 48/2008**, related to the project entitled "**Investigation of spermatogenic process in bullfrog (Rana catesbeiana) and spermatogonial stem cell transplantation of this species to tilapias**", under the supervisors of **Tânia Mara Segatelli**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **July 9, 2008**.

This certificate expires in **July 9, 2013**.

Belo Horizonte, 11 de Julho de 2008.



Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@proq.ufmg.br

Referências

- ALMEIDA FFL. 2002. Estrutura e função testicular em javalis (*Sus scrofa scrofa*) sexualmente maduros. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. p65.
- ALMON E, GOLDFINGER N, KAPON A, SCHWARTZ D, LEVINE AJ, ROTTER V. 1993. Testicular tissue-specific expression of the p53 suppressor gene. *Dev Biol.* 156: 107-116.
- ALVARENGA ER, FRANÇA LR. 2009. Effects of different temperatures on testis structure and function, with emphasis on somatic cells, in sexually mature Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*). *Biol Reprod.* 80: 537-544.
- ANDO N, MIURA T, NADER MR, MIURA C, YAMAUCHI K. 2000. A method for estimating the number of mitotic divisions in fish testes. *Fish Sci.* 66(2): 299-303.
- AUHAREK SA, FRANÇA LR. 2010. Postnatal testis development, Sertoli cell proliferation and number of different spermatogonial types in C57BL/6J mice made transiently hypo- and hyperthyroidic during the neonatal period. *J Anat.* 216(5): 577-588.
- AVELAR GF, OLIVEIRA CF, SOARES JM, SILVA IJ, DOBRINSKI I, HESS RA, FRANÇA, LR. 2010. Postnatal somatic cell proliferation and seminiferous tubule maturation in pigs: a non-random event. *Theriogenology.* 74(1): 11-23.
- BARDIN CW. 1996. Androgens: early attempts to evaluate Leydig cell function in man. In: PAYNE AH, HARDY MP, RUSSELL LD (eds). *The Leydig cell*. Viena, IL: Cache River Press. p31-42.
- BATLOUNI SR, CARREÑO FR, ROMAGOSA E, BORELLA MI. 2005. Cell junctions in the germinal epithelium may play an important role in spermatogenesis of the catfish *P. fasciatus* (Pisces, Siluriformes). *J Mol Hist.* 36: 97-110.
- BAUM JS, GEORGE JPSt, MACCALL K. 2005. Programmed cell death in germline. *Seminars in Cell & Developmental Biology.* 16: 245-259.
- BENNET MR. 1999. Mechanisms of p53-induced apoptosis. *Bioch Pharmacol.* 56: 1089-1095.
- BERGMANN M, GREVEN H, SCHINDELMEISER J. 1983. Observations on the blood-testis barrier in a frog and a salamander. *Cell Tissue Res.* 232: 189-200.
- BILLARD R. 1969. Spermatogenèse de *poecilia reticulata*. I – Estimation du nombre de générations goniales et rendement de la spermatogenèse. *Ann Biol Anim Bich Biophys.* 9: 251-271.
- BILLARD R. 1970. La spermatogenèse de *Poecilia reticulata* III. Ultrastructure des cellules de Sertoli. *Ann Biol Anim Bioch Biophys.* 10(1): 37-50.
- BILLARD R, FOSTIER A, WEIL C, BRETON B. 1982. Endocrine control of spermatogenesis in teleost fish. *Can J Fish Aquat Sci.* 39: 65-79.
- BILLARD R. 1984. Spermatogenesis Ultrastructural changes in the spermatogonia and spermatocytes of *Poecilia reticulata* during spermatogenesis. *Cell Tiss Res.* 237(2): 219-226.

- BILLARD R. 1986. Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reprod Nutr Develop.* 26: 877–920.
- BILLARD R. 1990. Spermatogenesis in teleost fish. In: LAMMING GE. (eds). *Reproduction in the male*. Churchill Livingstone. p183-212.
- BIZZOTTO PM, GODINHO HP. 2007. Morphometric evaluation of the spermatogenesis in trahira *Hoplias malabaricus* (Bloch) (Characiformes, Erythrinidae). *Revista Brasileira de Zoologia.* 24(3): 541-544.
- BLANCO-RODRÍGUEZ J, MARTÍNEZ-GARCÍA C. 1996. Spontaneous germ cell death in the testis of the adult rat takes the form of apoptosis: re-evaluation of cell types that exhibit the ability to die during spermatogenesis. *Cell Prolif.* 29: 13-31.
- BLANCO-RODRÍGUEZ J. 2001. Mitotic/meiotic checkpoints and germ cell apoptosis. In: ROBAIRE B, CHEMES H, MORALES CR. (eds.). *Andrology in the 21st Century*. Montreal: Medimond. p173-184.
- BOUMA J, CLOUD JG. 2005. Sertoli cell biology in fishes and amphibians. In: SKINNER MK, GRISWOLD MD. (eds). *The Sertoli Cell Biology*. Elsevier Academic Press. p71-79,
- BRUSLÉ S. 1981. Ultrastructure of spermiogenesis in *Liza aurata risso*, 1810 (Teleostei, Mugilidae). *Cell Tissue Res.* 217(2): 415-424.
- CARDOSO ER. 2007. Cinética espermatogonial, duração da espermatogênese e eficiência das células de Sertoli em zebrafish (*Danio rerio*) adulto. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, p82.
- CHAVADEJ J, JEROREUNGROTTON A, SRETORUGSA PE, SOBHON P. 2000. Structure and development of the testis of bullfrog, *Rana catesbeiana*, and their changes during seasonal variation. *Science Asia.* 26: 69-80.
- CHAVES-POZO E, MULERO V, MESEGUER J, AYALA AG. 2005. An overview of cell renewal in the testis throughout the reproductive cycle of a seasonal breeding teleost, the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Biol Reprod.* 72: 593-601.
- COHEN JJ. 1999. Apoptosis: mechanism of life and death in the immune system. *J Allergy Clin Immunol.* 103: 584–554.
- CORDEIRO-JUNIOR DA, COSTA GM, TALAMONI AS, FRANÇA LR. 2010. Spermatogenic efficiency in the spiny rat, *Trinomys moojeni* (Rodentia: Echimyidae). *Anim Reprod Sci.* 119(1-2): 97-105.
- COSTA GMJ. 2009. Estudo comparativo da função testicular e eficiência espermatogênica em três diferentes espécies de mamíferos silvestres com potencial interesse econômico. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, p110.

- COSTA GM, LEAL MC, SILVA JV, FERREIRA AC, GUIMARÃES DA, FRANÇA LR. 2010. Spermatogenic cycle length and sperm production in a feral pig species (collared peccary, *Tayassu tajacu*). *J Androl.* 31(2): 221-230.
- DE ROOIJ DG. 1998. Stem cells in the testes. *Int J Exp Path.* 79: 67-80.
- DE ROOIJ DG, RUSSELL LD. 2000. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J Androl.* 2: 776-798.
- DE ROOIJ DG. 2001. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction.* 121: 347-354.
- DOURNON C, HOUILLON C, PIEAU C. 1990. Temperature sex reversal in amphibians and reptiles. *In J Dev Biol.* 34: 81-92.
- DUBOIS W, CALLARD GV. 1993. Culture of intact Sertoli/germ cell units and isolated Sertoli cell from *Squalus* testis. II. Stimulatory effects of insulin and IGF-1 on DNA synthesis in premeiotic stages. *J Exp Zool.* 267: 233-244.
- FRANÇA LR, GHOSH S, YE S-J, RUSSELL LD. 1993. Surface and surface-to-volume relationships of the Sertoli cell during the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Biol Reprod.* 49: 1215-1228.
- FRANÇA LR, BARTKE A, BORG KE, CECIM M, FADDEN CT, YAGI A, RUSSELL LD. 1994. Sertoli cells in testes containing or lacking germ cells: a comparative study of paracrine effects using the W (c-kit) gene mutant mouse model. *Anat Rec.* 240: 225-232.
- FRANÇA LR, YE S-J, YING L, SANDBERG M, RUSSELL LD. 1995a. Morphometry of rat germ cells during spermatogenesis. *Anat Rec.* 241: 181-204.
- FRANÇA LR, HESS RA, COOKE PS, RUSSELL LD. 1995b. Neonatal hypothyroidism causes delayed Sertoli cell maturation in rats treated with propylthiouracil: evidence that the Sertoli cell controls testis growth. *Anat Rec.* 242: p57.
- FRANÇA LR, RUSSELL LD. 1998. The testis of domestic animals. In: MARTÍNEZ-GARCÍA F, REGADERA J. (eds). *Male Reproduction: a multidisciplinary overview*. Madrid: Churchill Communications. p198-219.
- FRANÇA LR, SILVA Jr VA, CHIARINI-GARCIA H, GARCIA SK, DEBELJUK L. 2000a. Cell proliferation and hormonal changes during postnatal development of the testis in the pig. *Biol Reprod.* 63: 1629-1636.
- FRANÇA LR, LEAL MC, SASSO-CERRI E, VASCONCELOS AC, RUSSELL LD. 2000b. Cimetidine (Tagamet) is a reproductive toxicant in male rats affecting peritubular cells. *Biol Reprod.* 63: 1403-1412.
- FRANÇA LR, ROCHA DCM, MIRANDA JR, DEBELJUK L. 2002. Proliferación de células de Sertoli y función testicular. *Bol Inform Soc Arg Androl.* 11: 52-57.

- FRANÇA LR, AVELAR GF, ALMEIDA FFL. 2005. Spermatogenesis and sperm transit through epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology*. 63: 300-318.
- FREEDBERG S, TAYLOR DR. 2007. Sex ratio variance and the maintenance of environmental sex determination. *J Evol Biol*. 20(1): 213-220.
- GALLIEN L. 1959. Analyse des effets des hormones steroids dans la différenciation sexuelle des amphibiens. *Arch Anat Micr Morphol Exp*. 48: 83–100.
- GRIER HJ. 1975. Aspects of germinal cyst and sperm development in *Poecilia latipinna* (Teleostei: Poeciliidae). *J Morphol*. 146 (2): 229-49.
- GRIER HJ. 1976. Sperm development in the teleost *Oryzias latipes*. *Cell Tissue Res*. 168(4): 419-431.
- GRIER HJ, VAN DEN HURK R, BILLARD R. 1989. Cytological identification of cell types in the testes of *Esox lucius* and *E. niger*. *Cell Tissue Res*. 257: 491-496.
- GRIER HJ. 1993. Comparative organization of Sertoli cells including the Sertoli cell barrier. In: *The Sertoli cell*. RUSSELL LD, GRISWOLD MD. (eds). Clearwater: Cache River Press. p703-739.
- GRIER HJ, NEYDIG C. 2000. Gonads and gametes of fishes. In: TIERSCH TR, MAZIK PM. (eds). *Cryopreservation of aquatic species*. Baton Rouge: The World Aquaculture Society. p1-12.
- HAYES TB. 1998. Sex determination and primary sex differentiation in amphibians: genetic and developmental mechanisms. *J Exp Zool*. 281: 373-399.
- HESS RA, COOKE PS, BUNICK D, KIRBY JD. 1993. Adult testicular enlargement induced by neonatal hypothyroidism is accompanied by increased Sertoli cell and germ cell number. *Endocrinology*. 132: 2607-13.
- HESS RA, FRANÇA LR. 2005. Structure of the Sertoli cell. In: SKINNER MK, GRISWOLD MD. (eds). *Sertoli Cell Biology*. San Diego: Elsevier Academic Press. p19-40.
- HESS RA, FRANCA LR. 2007. Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. In: CHENG CY (eds). *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*. N.Y.: Landes Bioscience.
- HIKIM APS, LUE Y, DIAZ-ROMERO M, YEN PH, WANG C, SWERDLOFF RS. 2003. Deciphering the pathways of germ cell apoptosis in the testis. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 85: 175-182.
- JOHNSON L, NEAVES WB. 1981. Age related changes in the Leydig cell population, seminiferous tubules and sperm population in stallions. *Biol Reprod*. 24: 703-712.
- KENAGY GJ, TROMBULAK SC. 1986. Size and function of mammalian testes in relation to body size. *J Mammalian*. 67: 1-22.
- KNUDSON CM, TUNG KSK, TOURTELLOTTE WG, BROWN GAJ, KORSMEYER SJ. 1995. Bax deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Sci*. 270: 96-99.

- KOULISH S, KRAMER CR, GRIER HJ. 2002. Organization of the male gonad in a protogynous fish, *Thalassoma bifasciatum* (Teleostei: Labridae). *J Morphol.* 254: 292-311.
- LACERDA SMSN, BATLOUNI SR, Da SILVA SGB, HOMEM CSP, FRANÇA LR. 2006. Germ cell transplantation in fish: the Nile-tilapia model. *Anim Reprod.* 3: 146-159.
- LE GAC F, LOIR M, LE BAIL PY, OLLITRAULT M. 1996. Insulin-like growth factor (IGF-1) mRNA and IGF-1 receptor in trout testis and in isolated spermatogenic and Sertoli cells. *Mol Reprod Dev.* 44: 23-35.
- LE GAC F, LOIR M. 1999. Male reproductive system, fish. In: KNOBIL E, NEILL JD. (eds.). *Encyclopedia of Reproduction.* San Diego: Academic Press. v. 3, p20-30.
- LEAL MC, CARDOSO ER, NOBREGA RH, BATLOUNI SR, BOGERD J, FRANÇA LR, SCHULZ RW. 2009. Histological and Stereological Evaluation of Zebrafish (*Danio rerio*) Spermatogenesis with an Emphasis on Spermatogonial Generations. *Biol Reprod.* 81: 177-187.
- LOCKSHIN RA, ZAKERI Z. 2004. Apoptosis, autophagy, and more. *Int J Biochem Cell Biol.* 36: 2405-2419.
- LOFTS B. 1984. Amphibians. In: LAMMING GE. *Marshall's physiology of reproduction* 4.ed. Hong kong: Shek Wah Tong Printing Press. v. 1, p127-205.
- LUNSTRA DD, SCHANBACHER BD. 1988. Testicular function and Leydig cell ultrastructure in long-term bilateral cryptorchid rams. *Biol Reprod.* 38(1): 211-220.
- MACGREGOR G. 2001. The function of Bclw in mouse spermatogenesis. In: ROBAIRE B, CHEMES H, MORALES CR. (eds.). *Andrology in the 21st Century.* Montreal: Medimond. p153-171.
- MATTA SLP, VILELA DAR, GODINHO HP, FRANÇA LR. 2002. The goitrogen 6-npropyl-2-thiouracil (PTU) given during testis development increases Sertoli and germ cell numbers per cyst in fish: the tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. *Endocrinol.* 143: 970-978
- MINUCCI S, RIENZO G, DI SENA R, COBELLIS G, MECCARIELLO R, PIERANTONI R, FASANO S. 2000. Effects of multiple injections of ethane 1,2-dimethane sulphonate (eds) on the frog, *Rana esculenta*, testicular activity. *J Exp Zool.* 287: 384-393.
- MIURA T. 1999. Spermatogenic cycle in fish. In: KNOBIL E, NEILL JD. (eds.). *Encyclopedia of Reproduction.* San Diego: Academic Press. v. 4, p571-578.
- NAKAMURA, M. 2009. Sex determination in amphibians. *Seminars in Cell Develop Biology.* 20: 271-282.
- NÓBREGA RH. 2006. Alterações do epitélio germinativo masculino, células endócrinas testiculares e células gonadotrópicas durante o ciclo reprodutivo de *Serresalmus spiropleural* (Kner, 1859) e *Pimelodus maculatus* (Lacépède, 1803). 185p. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Estrutural, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Campinas, Campinas, SP, p185.

- NÓBREGA RH, BATLOUNI SR, FRANÇA LR. 2009. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. *Fish Physiol Biochem.* 35: 197-206.
- ORTH JM, GUNSALUS GL, LAPERTI AA. 1988. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid in adults depends on number of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinol.* 122: 787-794.
- PADOA E. 1936. Effetto paradossale (mascolinizzazione) sulla differenziazione sessuale di girini *Rana esculenta* trattata con ormone follicolare. *Mon Zool Ital.* 47: 285-289.
- PAULY GB, HILLIS DM, CANNATELLA DC. 2009. Taxonomic freedom and the role of official lists of species names. *Herpetologica.* 65(2): 115-128.
- PIERANTONI R. 1998. Male reproductive system, amphibians. In: KNOBIL E, NEILL JD. (eds.). *Encyclopedia of Reproduction.* San Diego: Academic Press. p10-15.
- PIERANTONI R, COBELLIS G, MECCARIELLO R, PALMIERO C, FIENGA G, MINUCCI S, FASANO S. 2002. The amphibian testis as model to study germ cell progression during spermatogenesis. *Comp. Biochem Physiol.* 132: 131-139.
- POUGH FH, JANIS CM, HEISER JB. 2008. A vida dos vertebrados. São Paulo, Atheneu editora, p684.
- PUDNEY J. 1993. Comparative cytology of the non-mammalian vertebrate Sertoli cell. In: RUSSELL LD, GRISWOLD MD. (eds.). *The Sertoli cell.* Clearwater: Cache River Press. p612-657.
- PUDNEY J. 1995. Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. *Microsc Res Tech.* 6: 459-497.
- PUDNEY J. 1996. Comparative Cytology of the Leydig Cell. In: PAYNE AH, HARDY MP, RUSSELL LD. (eds.). *The Leydig Cell.* Vienna, IL: Cache River Press. p98-142.
- RAFF M. 1998. Cell suicide for beginners. *Nature.* 396: 119-122.
- RICHBURG JH. 2000. The relevance of spontaneous and chemically-induced alterations in testicular germ cell apoptosis to toxicology. *Toxicol Lett (Amst.).* 112-113: 79-86.
- ROCHA DCM, DEBELJUK L, FRANÇA LR. 1999. Exposure to constant light during testis development increases daily sperm production in adult Wistar rats. *Tiss Cell.* 31: 372-379.
- ROOSEN-RUNGE EC. 1977. The process of spermatogenesis in mammals. Cambridge: University Press.
- ROSSI F, FERRARESI A, ROMAGNI P, SILVESTRONI L, SANTIEMMA V. 2002. Angiotensin II stimulates contraction and growth of testicular peritubular myoid cells in vitro. *Endocrinology.* 143(8): 3096-3104.

- ROTTER V, SCHWARTZ D, ALMON E, GOLDFINGER N, KAPON A, MESHORER A, DONEHOWER L.S, LEVINE AJ. 1993. Mice with reduced levels of p53 protein exhibit the testicular giant-cell degenerative syndrome. *Proc Natl Acad Sci.* 90: 9075-9079.
- RUSSELL LD, PETERSON RN. 1984. Determination of the elongate spermatide-Sertoli cell ratio in various mammals. *J Reprod Fertil.* 70: 635-641.
- RUSSELL LD, BARTKE A, GOH JC. 1989. Postnatal development of the Sertoli cell barrier, tubular lumen, and cytoskeleton of Sertoli and myoid cells in the rat, and their relations to tubular fluid and flow. *Amer J Anat.* 184: 179-189.
- RUSSELL LD, ETTLIN RA, SINHA-HIKIM AP, CLEGG ED. 1990a. Mammalian spermatogenesis. In: RUSSELL LD, ETTLIN RA, SINHA-HIKIM AP, CLEGG ED. (eds). *Histological and histopathological evaluation of the testis.* Clearwater: Cache River Press. p1-40.
- RUSSELL LD, REN HP, SINHA HI, SCHULZE W, SINHA HA. 1990b. 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. *Am J Anat.* 188: 21-30.
- RUSSELL LD, GRISWOLD MD. 1993. *The Sertoli cell.* Clearwater: Cache River Press. p801.
- RUSSELL LD, SINHA-HIKIM AP, GHOSH S, BARTKE A. 1994. Structure-function relationships in somatic cells of the testis and accessory reproductive glands. In: BARTKE A. (eds). *Function of somatic cells in the testis.* Norwell: Spring-Verlag. p55-83.
- RUSSELL LD, FRANÇA LR. 1995. Building a testis. *Tiss Cell.* 27:129-147.
- RUSSELL LD, WARREN J, DEBELJUK L, RICHARDSON LL, MAHAR PL WAYMIRE KG, AMY SP, ROSS AJ, MACGREGOR GR. 2001. Spermatogenesis in bclw-deficient mice. *Biol Reprod.* 65: 318-33.
- SASSO-CERRI E, De FARIA FP, FREYMULLER E, MIRAGLIA SM. 2004. Testicular Morphological changes during the seasonal reproductive cycle in the bullfrog *Rana catesbeiana*. *J Exp Zool.* 301A: 249-260.
- SASSO-CERRI E, FREYMULLER E, MIRAGLIA SM. 2005. Testosterone-immunopositive primordial germ cells in the testis of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *J Anat.* 206: 519-523.
- SASSO-CERRI E, CERRI OS, FREYMULLER E, MIRAGLIA SM. 2006. Apoptosis during the seasonal spermatogenic cycle of *Rana catesbeiana*. *J Anat.* 209: 21-9.
- SCHULZ RW, MIURA T. 2002. Spermatogenesis and its endocrine regulation. *Fish Physiol Biochem.* 26: 43-56.
- SCHULZ RW, MENTING S, BOGERD J, FRANÇA LR, VILELA DAR, GODINHO H. 2005. Sertoli cell proliferation in the adult testis – evidence from two fish species belonging to different orders. *Biol Reprod.* 73: 891-898.
- SCHULZ RW, FRANÇA LR, LAREYRE JJ, LE GAC F, CHIARINI-GARCIA H, NOBREGA RH, MIURA T. 2009. Spermatogenesis in fish. *Gen Comp Endocrinol.* 165(3): 390-411.

- SEGATELLI TM, BATLOUNIS R, FRANÇA LR. 2009. Duration of spermatogenesis in the bullfrog (*Lithobates catesbeianus*). *Theriogenology*. 20: 1-8.
- SETCHELL BP. 2006. The effects of heat on testis of mammals. *Anim Reprod*. 3(2): 81-91.
- SHARPE RM. 1994. Regulation of Spermatogenesis. In: KNOBIL E, NEILL JD (eds.), *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press. p1363-1434.
- SHARPE RM, MCKINNELL C, KIVLIN C, FISHER JS. 2003. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction*. 125: 769-84.
- SINHA-HIKIM AP, SWERDLOFF RS. 1999. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev reprod*. 4: 38-47.
- SINHA-HIKIM AP, LUE Y, YAMAMOTO CM, VERA Y, RODRIGUEZ S, YEN PH, SOENG K, WANG C, SWERDLOFF RS. 2003. Key apoptosis pathway for heat-induced for programmed cell death in the testis. *Endocrinol*. 144: 3167-3175.
- SOVERCHIA L, CAROTTI M, ANDREU-VIEYRA C, MOSCONI G, CANNELLA N, HABIBI H, POLZONETTI-MAGNI AM. 2007. Role of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in the regulation of gonadal differentiation in the gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Mol Reprod Dev*. 74(1): 57-67.
- SPRANDO RL, HEIDINGER RC, RUSSEL, LD. 1988. Spermiogenesis in the Bluegill (*Lepomis macrochirus*): A study of cytoplasmic events including cell volume changes and cytoplasmic elimination. *J Morph*. 198: 165-177.
- SPRANDO RL, RUSSELL LD. 1988. Spermiogenesis in the bullfrog (*Rana catesbeiana*): A study of cytoplasmic events including cell volume changes and cytoplasmic elimination. *J Morphol*. 198: 303-319.
- STEBBINS RC, COHEN NW. 1995. Contributions of amphibians to human welfare. In: STEBBINS RC, COHEN NW. *A natural history of amphibians* 1.ed. United states of america: Princeton Academic Press. p205-209.
- STOUMBOUDI MT, ABRAHAM M. 1996. The spermatogenic process in *Barbus longiceps*, *Capoeta damascina* and their natural sterile hybrid (Teleostei, Cyprinidae). *J Fish Biol*. 49(3): 458-468.
- TRIPATHI R, MISHRA DP, SHAHA C. 2009. Male germ cell development: turning on the apoptotic pathways. *J Reprod Immunol*. 83(1): 31-35.
- ULLER T, PEN I, WAPSTRA E, BEUKEBOOM LW, KOMDEUR J. 2007. The evolution of sex ratios and sex-determining systems. *Trends Ecol Evol*. 22(6): 292-297.
- VERA Y, DIAZ-ROMERO M, RODRIGUEZ S, CASTANARES M, LUE Y, WANG C, SWERDLOFF RS, SINHA-HIKIM AP. 2004. Mitochondria-dependent pathway is involved in heat-induced male cell death: lessons from mutant mice. *Biol Reprod*. 70: 1534-1540.

Referências

- VERA Y, RODRIGUEZ S, CASTANARES M, LUE Y, ATIENZA V, WANG C, SWERDLOFF RS, SINHA-HIKIM AP. 2005. Functional role of caspases in heat-induced testicular germ cells apoptosis. *Biol Reprod.* 72: 516-522.
- VIEIRA MI. 1993 Rã-touro gigante: características e reprodução. São Paulo, INFOTEC. p 80.
- VILELA DAR. 2003. Duração da espermatogênese e proliferação das células de Sertoli em tilápias-nitlóticas (*Oreochromis niloticus*) mantidas em diferentes temperaturas. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, p55.
- VILELA DAR, SILVA SGB, PEIXOTO MTD, GODINHO HP, FRANÇA LR. 2003. Spermatogenesis in teleost: insights from the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. *Fish Physiol Biochem.* 28: 187-190.
- WALLACE, C, BADAWY GM, WALLACE BM. 1999. Amphibian sex determination and sex reversal. *Cell Mol Life Sci.* 55(6-7): 901-909.
- WELSH M, SAUNDERS PT, ATANASSOVA N, SHARPE RM, SMITH, LB. 2009. Androgen action via testicular peritubular myoid cells is essential for male fertility. *FASEB J.* 23(12): 4218-4230
- YOSHIMOTO S, OKADA E, UMEMOTO H, TAKAMURA K, UNO Y, NISHIDA-HUMEHARA C, MATSUDA Y, TAKAMATSU N, SHIBA T, ITO M. 2008. A W-linked DM-domain gene, DM-W, participates in primary ovary development in *Xenopus laevis*. *PNAS.* 105(7): 2469-2474.