

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Laboratório de Biologia Celular

Camila Mariangela Pacheco

**RESPOSTAS MORFOFUNCIONAIS ADAPTATIVAS DAS CÉLULAS DE  
SERTOLI E LEYDIG ASSOCIADAS À SAZONALIDADE REPRODUTIVA EM  
*CROTALUS DURISSUS* (LINNAEUS, 1758)**

BELO HORIZONTE, MG

2021

Camila Mariangela Pacheco

**RESPOSTAS MORFOFUNCIONAIS ADAPTATIVAS DAS CÉLULAS DE  
SERTOLI E LEYDIG ASSOCIADAS À SAZONALIDADE REPRODUTIVA EM  
*CROTALUS DURISSUS* (LINNAEUS, 1758)**

Tese apresentada ao Programa de pós-graduação em Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular

Orientadora: Gleide Fernandes de Avelar

BELO HORIZONTE, MG

2021

043

Pacheco, Camila Mariangela.

Respostas morfofuncionais adaptativas das células de Sertoli e Leydig associadas à sazonalidade reprodutiva em *Crotalus durissus* (Linnaeus, 1758) [manuscrito] / Camila Mariangela Pacheco. - 2021.

87 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Gleide Fernandes de Avelar.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular.

1. Biologia Celular. 2. Entose. 3. Plasticidade Celular. 4. Comportamento Sexual Animal. I. Avelar, Gleide Fernandes de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
 INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

## ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE CAMILA MARIANGELA PACHECO

**244/2021 \_ ENTRADA 1º/2017 \_ 2017674219**

Às **quatorze horas** do dia **28 de dezembro de 2021**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "**RESPOSTAS MORFOFUNCIONAIS ADAPTATIVAS DAS CÉLULAS DE SERTOLI E LEYDIG ASSOCIADAS À SAZONALIDADE REPRODUTIVA EM CROTALUS DURISSUS LINNAEUS, 1758**", requisito final para obtenção do grau de Doutora em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Gleide Fernandes de Avelar**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Gleide Fernandes de Avelar	UFMG	APROVADA
Dra. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida	UFMG	APROVADA
Dra. Mariana Machado Neves	UFV	APROVADA
Dra. Selma Maria Almeida-Santos	Instituto Butantan	APROVADA
Dr. Sérgio Luís Pinto da Matta	UFV	APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 28 de dezembro de 2021.**

Dr<sup>a</sup>. Gleide Fernandes de Avelar (Orientadora)

Dr<sup>a</sup>. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida

Dr<sup>a</sup>. Mariana Machado Neves

Dr<sup>a</sup>. Selma Maria Almeida-Santos

Dr. Sérgio Luís Pinto da Matta

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



Documento assinado eletronicamente por **Gleide Fernandes de Avelar, Professora do Magistério Superior**, em 30/12/2021, às 17:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida, Coordenador(a)**, em 03/01/2022, às 11:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mariana Machado Neves, Usuário Externo**, em 03/01/2022, às 12:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Selma Maria de Almeida Santos, Usuária Externa**, em 03/01/2022, às 13:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sérgio Luis Pinto da Matta, Usuário Externo**, em 03/01/2022, às 18:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodolfo Cordeiro Giunchetti, Professor do Magistério Superior**, em 19/01/2022, às 20:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1173644** e o código CRC **8B4F6466**.

## **Maria, Maria**

(M. Nascimento / F. Brant)

“Mas é preciso ter força  
É preciso ter raça  
É preciso ter gana sempre  
Quem traz no corpo a marca  
Maria, Maria  
Mistura a dor e a alegria

Mas é preciso ter manha  
É preciso ter graça  
É preciso ter sonho sempre  
Quem traz na pele essa marca  
Possui a estranha mania  
De ter fé na vida.”

Dedico esse trabalho àquelas que se repartem em muitas sem se quebrar na busca de atender desde as obrigações profissionais até imensa demanda das tarefas invisíveis. Àquelas que buscam se concentrar para a escrita de um parágrafo na melodia de um choro, de uma risada ou do silêncio inexplicável. Àquelas que buscam a compreensão dos dados no barulho da mente ocupada com o cuidado. Àquelas que ultrapassam limites que desconhecia. Àquelas que querem aprender, mas também querem ensinar. Dedico esse trabalho a todas as mães, mas, principalmente, às mães pesquisadoras e mães pós-graduandas.

Dedico ainda esse trabalho àqueles responsáveis pelo meu ser: minha família de origem e nuclear.

## AGRADECIMENTOS

Apesar de algumas coisas não acontecer da forma como eu desejei e esperava, sou imensa e verdadeiramente grata por tudo que aconteceu comigo nos últimos anos. Então inicio agradecendo a Deus por sempre me abençoar, por me dar força quando pensei que não podia mais me sustentar e me conceder cada flor e cada pedra que encontrei no caminho. Obrigada Deus por sempre me mimar!

Agradeço:

Àqueles que contribuem para caracterização do meu ser.

Aos meus pais, Hildon (in memorian) e Irma, que me ensinaram a não ter limites para sonhar, a viver com honestidade e humildade, a ser forte e perseverante.

Ao meu irmão, Willian, e minha irmã, Marina, os quais sou ligada pelo sangue, sobrenome e amor.

Ao meu marido, Samuel, que tem incentivado e lutado para que os sonhos fossem reais, que por meio do nosso “laço me deu a segurança de um nó”.

Ao meu filho Pedro, motivo da minha gargalhada mais escandalosa, do meu medo inexplicável e minha força até antes desconhecida. Tenho a absoluta certeza que o mundo ficou muito melhor desde que você chegou!

Agradeço por sempre e incondicionalmente acreditarem em mim. À vocês, agradeço pelo amor! Vocês são condição para eu seguir a diante com o sorriso no rosto. Obrigada por me abraçar e sentir que estava no mulher lugar. Amo cada um de vocês.

Aos que promovem a emancipação dos homens: os professores.

À minha orientadora Gleide Fernandes de Avelar, por todo conhecimento transmitido, pela paciência e pela persistência. A você Gleide, agradeço por insistir em dar certo. Se nos três primeiros anos do processo eu encontrei dificuldade em desenvolver, no último ano estive convencida que não

conseguiria (kkkk). Conciliar maternar, isolamento social devido a pandemia de COVID-19 e perdas inesperadas e repentinas de pessoas amadas (meu pai e meu sogro) me paralisaram profissionalmente e foi você, Gleide, que me amparou academicamente.

Aos professores que constituem o Laboratório de Biologia celular, Gleide Fernandes de Avelar, Guilherme Costa e Samyra Lacerda. Levo vocês como exemplos positivos de professores e pesquisadores.

Aos professores do programa pelos ensinamentos durante as disciplinas.

Àqueles que contribuíram com a execução do projeto.

À técnica do laboratório, Mara, que sempre nos dá suporte nos reagentes, análises, coletas e todo o processo emocional que estiver envolvido em cada uma dessas etapas. Mara você é uma importante e verdadeira engrenagem no laboratório que dá leveza laboral e psicológica na realização das nossas funções.

Aos colegas do laboratório. É muito bom ver uma equipe forte dessa forma! Parabéns!

À Flavia Resende por tanto ensinamento e contribuição no desenvolvimento do projeto. Tenho certeza que sem você tudo isso seria mais difícil.

Aos funcionários e estagiários da Fundação Ezequiel Dias pelo fornecimento das serpentes, organização e ajuda durante as eutanásias. Agradeço especialmente aqueles que ajudaram diretamente nas atividades relacionadas a este trabalho: Flávia Resende, Leonardo Carvalho, Layane Cristina Martins dos Santos, Leonardo Noronha e Rafael Batista.

Ao programa de Biologia Celular da UFMG, assim como a coordenação, secretários e funcionários pelo suporte durante todo o processo.

À CAPES pela bolsa de estudos

À Universidade Federal de Minas Gerais pela oportunidade de realização do curso proporcionando crescimento profissional e pessoal.



Às amigas que mesmo distantes se fizeram tão presentes: Gilda, Graziela, Natália, Talitha Tatiana e Thaís! Amo muito vocês!

Àqueles que estiveram na torcida por essa conquista: Ângela, Nelson (*in memoriam*), Sarah Mângia, Diego Santana, Victor e tantas outras pessoas que algum momento me motivaram.

À equipe do curso de Ciências Biológicas da Universidade do Estado de Minas Gerais pela torcida para a conclusão desse processo.

## RESUMO

A habilidade reprodutiva dos machos sexualmente maduros está relacionada a capacidade dos testículos em produzir elevado número de espermatozoides viáveis e andrógeno em concentração adequada para maturação dos órgãos reprodutivos e comportamento envolvido nesse processo. Para tais funções, as células de Sertoli e células de Leydig orquestram diretamente as respectivas etapas. Apesar da grande diversidade de serpentes no Brasil e no mundo, pouco se sabe sobre como essas células somáticas respondem frente a sazonalidade reprodutiva, principalmente sobre machos das regiões tropicais. Diante disso, o presente trabalho avaliou as modificações morfofuncionais das células de Leydig e Sertoli desenvolvidas como resposta de adaptação sazonal às diferentes fases de atividade testicular (regressão, recrudescência e espermatogênese completa) na cascavel. Constatou-se que para alcançar a homeostase perante as condições inibitórias e estimulatórias, *Crotalus durissus* apresenta alterações na morfologia e composição da organização da célula de Sertoli (CS) e células de Leydig (CL), assim como em suas populações. Durante a regressão foi encontrado a eliminação de células germinativas através de entose, além do conhecido processo de apoptose. Para a rápida remoção de células germinativas durante a regressão, essas foram fagocitadas pela CS e seus subprodutos lipídicos foram armazenados em corpos lipídicos, para garantir a nutrição do compartimento tubular de acordo com a demanda sazonal. A CL também apresentou plasticidades morfológicas e funcional diante das demandas sazonais, sugerindo que a testosterona é necessária tanto para o processo espermatogênico quanto para o comportamento reprodutivo masculino em serpentes.

**Palavras-chave:** Entose; Plasticidade celular; Proliferação e morte de células somáticas testiculares.

## ABSTRACT

The reproductive ability of sexually mature males is related to the capacity of the testes to produce a high number of viable sperm and an adequate concentration of androgens for the maturation of the reproductive organs and the behavior involved in this process as well. For such functions, Sertoli cells and Leydig cells directly orchestrate the respective processes. Despite the great diversity of snakes in Brazil and abroad, little is known about how these somatic cells respond to reproductive seasonality, especially on males from tropical regions. Therefore, the present study evaluated the morphofunctional changes of Leydig and Sertoli cells developed as a response of seasonal adaptation to the different phases of testicular activity (regression, recrudescence and complete spermatogenesis) in the rattlesnake. However, it was found that to achieve homeostasis in the face of seasonal changes, *Crotalus durissus* undergoes changes in the morphology and composition of Sertoli cell (SC) and Leydig cells (LC), as well as in their populations. During regression, the elimination of germ cells through entosis was found, in addition to the known process of apoptosis. For rapid removal of germ cells during regression, they were digested by SC and their lipid products were stored in lipid bodies, to ensure the nutrition of the tubular compartment according to seasonal demand. LC also showed morphological and functional plasticity in face of seasonal demands, suggesting that testosterone is necessary both for the spermatogenic process and for the male reproductive behavior in snakes.

**Key-words:** entosis; Cell plasticity; Proliferation and death of testicular somatic cells.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Caracterização do fenótipo testicular em *C. durissus* e definição do n amostral utilizado nas diferentes abordagens realizadas no presente estudo e no tratamento estatístico .....**42**

**Tabela 2:** Caracterização do fenótipo testicular em *C. durissus* e definição do n amostral utilizado nas diferentes abordagens realizadas no presente estudo. **42**

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Características fenotípicas de <i>Crotalus durissus</i> .....	<b>20</b>
<b>Figura 2:</b> Diagrama que demonstra a estimulação sequencial para ocorrência do processo reprodutivo, o qual descreve a dependência do estado energético e condições ambientais para iniciar o processo reprodutivo ..	<b>23</b>
<b>Figura 3:</b> Representação esquemática do sistema genital dos machos de <i>Crotalus durissus</i> .....	<b>26</b>
<b>Figura 1:</b> Mapa com a indicação da localização de origem dos espécimes utilizados nas análises da célula de Sertoli durante a (A) recrudescência, (B) atividade e (C) regressão testicular.....	<b>33</b>
<b>Figura 5:</b> Diferentes condições de atividade do parênquima testicular da cascavel <i>Crotalus durissus</i> .....	<b>41</b>
<b>Figura 6:</b> Fotomicrografia do parênquima testicular em diferentes condições de atividade do epitélio seminífero da cascavel, <i>Crotalus durissus</i> , com destaque às células de Sertoli e seu volume nuclear. ....	<b>44</b>
<b>Figura 7:</b> Eletromicroscopia de transmissão do parênquima testicular da cascavel <i>Crotalus durissus</i> .....	<b>45</b>
<b>Figura 8:</b> Eletromicroscopia de transmissão do parênquima testicular da cascavel <i>Crotalus durissus</i> .....	<b>47</b>
<b>Figura 9:</b> Parênquima testicular da cascavel <i>Crotalus durissus</i> com células de Sertoli positivas para BrdU, PCNA e caspase-3, nas fases as quais essas marcações foram mais evidentes. ....	<b>49</b>
<b>Figura 10:</b> Percentual de interstício e células de Leydig no parênquima testicular.....	<b>50</b>
<b>Figura 11:</b> Alterações sazonais das células de Leydig ao longo do ciclo reprodutivo da cascavel <i>Crotalus durissus</i> . ....	<b>51</b>
<b>Figura 12:</b> Alterações sazonais da população da célula de Leydig e das suas características fenotípicas na cascavel, <i>Crotalus durissus</i> .....	<b>53</b>

**Figura 13:** Eletromicrografia de transmissão do compartimento intertubular da cascavel *Crotalus durissus*. ..... **54**

**Figura 14:** Parênquima testicular da cascavel *Crotalus durissus* com células de Leydig positivas para BrdU, PCNA e caspase-3 e suas respectivas proporções. .... **56**

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>18</b>
<b>2.1.</b>	<b>Serpentes</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2.</b>	<b>Biologia reprodutiva</b> .....	<b>20</b>
2.2.1.	Fisiologia reprodutiva .....	22
2.2.2.	Anatomia reprodutiva .....	25
2.2.3.	Célula de Sertoli .....	27
2.2.4.	Células de Leydig .....	29
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
3.1.	Objetivos específicos .....	31
3.2.	Objetivos específicos .....	31
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
<b>4.1.</b>	<b>Animais (<i>Crotalus durissus</i>)</b> .....	<b>31</b>
<b>4.2.</b>	<b>Injeções de bromodeoxiuridina</b> .....	<b>34</b>
<b>4.3.</b>	<b>Coleta de sangue e análises hormonais</b> .....	<b>34</b>
<b>4.4.</b>	<b>Processamento histológico</b> .....	<b>34</b>
4.4.1.	Microscopia de luz .....	34
4.4.2.	Microscopia eletrônica de transmissão .....	35
<b>4.5.</b>	<b>Avaliações histomorfométricas</b> .....	<b>35</b>
4.5.1.	Classificação histológica da atividade testicular .....	35
4.5.2.	Densidade volumétrica dos componentes do parênquima testicular .....	36
4.5.3.	Morfometria e estereologia da célula de Sertoli e célula de Leydig .....	36
4.5.4.	Avaliação da proliferação e morte celular .....	39
<b>4.6.</b>	<b>Análise Estatística</b> .....	<b>39</b>
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>40</b>
<b>5.1.</b>	<b>Avaliação histológica e caracterização dos padrões de atividade testicular observados durante o ciclo anual em <i>C. durissus</i></b> .....	<b>40</b>
<b>5.2.</b>	<b>Biometria e estereologia testicular</b> .....	<b>43</b>
<b>5.3.</b>	<b>Célula de Sertoli</b> .....	<b>43</b>
<b>5.4.</b>	<b>Compatimento intertubular e células de Leydig</b> .....	<b>50</b>
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>57</b>
<b>6.1.</b>	<b>Célula de Sertoli</b> .....	<b>57</b>
6.1.1.	Aspectos morfológicos .....	57

6.1.2.	Proliferação e morte das células de Sertoli .....	61
<b>6.2.</b>	<b>Célula de Leydig</b> .....	<b>64</b>
6.2.1.	Aspectos morfológicos .....	64
6.2.2.	Proliferação e morte de células de Leydig .....	67
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>69</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIA</b> .....	<b>70</b>



## 1. INTRODUÇÃO

O processo reprodutivo representa um evento crítico na vida dos indivíduos ao demandar substancial investimento energético, principalmente para animais ectotérmicos (Vitt e Caldwell, 2013). Assim, muitas espécies desenvolveram estratégias sazonais que permitem adequar os custos energéticos de seus esforços reprodutivos diante de mudanças anuais do ambiente (Nakane e Yoshimura, 2014; Nishiwaki-Ohkawa e Yoshimura, 2016).

O testículo adulto tem importante papel na fisiologia reprodutiva ao exercer função esteroidogênica e gametogênica (Muñoz et al., 1997; Kumar et al., 2018). Dentre os esteroides sexuais produzidos nos testículos, a testosterona recebe especial destaque, uma vez que controla o aparecimento de caracteres sexuais secundários, orchestra o comportamento reprodutivo, além de realizar a manutenção quantitativa da espermatogênese (Saez, 1994; Sharpe, 2010; Sinclair et al., 2015). Exceto em camundongos durante a fase fetal do desenvolvimento (Shima et al., 2013), todos os andrógenos testiculares são formados e secretados pelas células de Leydig que residem no tecido conjuntivo entre os túbulos seminíferos (Saez, 1994; O'Donnell et al., 2001).

As células de Sertoli correspondem ao elemento somático do epitélio seminífero e são as células que fornecem suporte físico e nutricional para as células germinativas. São responsáveis por orquestrar todo o processo espermatogênico e sua eficiência e número estão altamente correlacionados com a produção espermática (Russell, 1979; 1980; Ritzen et al., 1981; França et al., 2016). Além disso, essas células são essenciais para a expressão do fenótipo masculino ainda na fase embrionária do desenvolvimento (Mackay, 2000; Johnson et al., 2008).

Apesar de diversos estudos demonstrar as alterações no parênquima testicular de acordo com a oscilação de fatores estimulatórios e inibitórios (Blottner et al., 1995; Young e Nelson, 2001; Muñoz et al., 2001; Brown e Shine, 2006; Morales et al. 2007; Gribbins et al., 2011) trabalhos sobre as respostas das células somática de répteis neotropicais diante dessas flutuações ainda são incipientes. Diante disso, o objetivo deste estudo foi verificar variações

morfológicas e funcionais na população de células de Leydig e células de Sertoli durante o ciclo reprodutivo de machos de *Crotalus durissus*, relacionando-as com a atividade do epitélio germinativo e nível da testosterona sérica.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Serpentes

As serpentes representam a subordem Ophidia, pertencente a ordem Squamata da classe Reptilia. Em todo o mundo, há cerca de 3956 espécies de serpentes distribuídas em 29 famílias (Uetz e Hošek, 2021). No Brasil, este táxon é bastante diversificado, sendo que 848 espécies de répteis, 422 são serpentes e destas, 32 pertencem a família Viperidae (Uetz e Hošek, 2021). Esta família apresenta o aparelho inoculador de veneno do tipo solenóglifo, cuja característica é a presença de canálculos nos dentes inoculadores, o que possibilita injetar o veneno com eficiência em suas presas (Greene, 1997; Melgarejo, 2003).

No Brasil, os viperídeos são representados pela subfamília Crotalinae, com representantes nos gêneros *Crotalus*, *Bothrops*, *Bothrocophias* e *Lachesis* (Uetz e Hošek, 2021). Sob o prisma epidemiológico, o gênero *Crotalus* é de grande relevância, não pelo número de acidentes, que é considerado baixo em relação à *Bothrops*, mas pela gravidade nos casos que o envolvem, atingindo alta taxa de letalidade na ausência de soroterapia (Brasil, 2008; Bochner et al., 2014). Dentre os acidentes ofídicos, aproximadamente 7% envolvem o gênero *Crotalus*, enquanto que 70% dos casos são realizados pelo gênero *Bothrops* (Bochner et al., 2014). Entretanto, a letalidade dos acidentes crotálicos e botrópicos apresenta índice de 1,8 % e 0,3%, respectivamente (Araújo et al., 2003). De acordo com Bochner et al. (2014), o quadro clínico severo é cerca de três vezes mais frequentes para acidentes crotálicos quando comparado com botrópico, demonstrando que mesmo apresentando uma baixa taxa de acidentes causados por *Crotalus*, esse apresenta maior letalidade.

*Crotalus durissus* (Linnaeus, 1758) é a única cascavel encontrada na América do Sul (Wüster et al., 2005). Ela é comumente registrada em campos de áreas abertas de regiões secas e semi-áridas das Américas (Campbell e Lamar, 1989; Melgarejo, 2003; Campbell e Lamar, 2004). Porém, recentemente foi encontrada em habitats florestais e sombreados (Tozetti e Martins, 2008; Benício, 2018). Sabe-se, ainda, que a distribuição de *Crotalus durissus* tem sido

ampliada devido a sua adaptação impulsionada pelo desmatamento de florestas tropicais e aumento de áreas para agropecuária (Marques e Sazima, 2003; Duarte e Menezes, 2013). Curiosamente, foi descoberto que essas serpentes possuem a capacidade de nadar (Ferrante et al., 2015) e utilizar hábitat arbóreo (Benício, 2016), comportamentos até então desconhecidos. Essa cascavel possui coloração em tonalidades variadas de castanho, apresenta fileira dorsal de sucessivos losângos marrons escuros contornados por escamas brancas ou amarelas, um chocalho na extremidade distal da cauda e comprimento rostro-cloacal de até 160 centímetros (Fig. 1). Assim como outras espécies de serpentes, *Crotalus durissus* apresenta dimorfismo sexual baseado em aspectos de folidose, dimensões corporais e morfologia interna (Shine, 1978; 1994). No entanto, suas diferenças mais notórias são maior dimensão da cabeça e corpo mais largos nas fêmeas, enquanto os machos apresentam maior extensão das listras paravertebrais e da cauda (Argaez, 2012).

Apesar da percepção negativa que muitas pessoas possuem sobre esses répteis, as serpentes são de fundamental importância para o funcionamento do ecossistema ao atuar em diferentes níveis da cadeia trófica (Greene, 1997; Martins e Oliveira, 1998, Bernarde e Abe, 2010). Além do aspecto ecológico, *Crotalus durissus* tem sido amplamente estudada para aplicação dos componentes de seu veneno na formulação de diversos compostos terapêuticos, como analgésicos (Mancin et al., 1998), anti-inflamatório (Sartim et al., 2019), antimicrobiano (Dietz et al., 2018), mitigadores de tumores (Marinovic et al., 2018), anticoagulante sanguíneo (Pinheiro-Junior, 2021) e tratamentos de parasitoses (Dal Mas et al., 2016; Maluf et al., 2016; Campeiro et al., 2018). Portanto, a conservação da cascavel, assim como outras serpentes, promove, tanto o equilíbrio do ecossistema quanto a preservação de um valioso recurso para o desenvolvimento de novas terapias (Martins e Molina, 2008), com promissor impacto socioeconômico positivo. Dessa maneira, torna-se relevante compreender os aspectos reprodutivos dessa espécie, a fim de garantir a sua preservação e perpetuação.



Figura 1: Características fenotípicas de *Crotalus durissus*. A) A presença de um chocalho na porção final da cauda e a C) fileira de sucessivos losângos no dorso do indivíduo são características peculiares da espécie. Essas formas geométricas são limitadas por escamas esbranquiçadas que se encontram em íntimo contato com escamas escuras. B) A espécie apresenta dimorfismo sexual na qual a característica mais distintiva é a diminuição da extensão da cauda da fêmea, com estreitamento abrupto entre o corpo e a cauda. Fotos: A e B) Repite-database; C) Embrapa.

## 2.2. Biologia reprodutiva

A interpretação da biologia reprodutiva dos vertebrados é de grande relevância por fornecer dados essenciais para compreensão da história de vida

e preservação da espécie (Duvall et al., 1992). *Crotalus durissus* está entre as espécies de serpentes neotropicais mais bem estudadas sob o contexto da história natural (Almeida-Santos e Salomão, 1997; Almeida-Santos et al., 1999; Barros et al., 2012). Embora, o conhecimento sobre biologia reprodutiva desta espécie ainda está limitado.

Para que o processo reprodutivo aconteça, atividades espermatogênicas distintas ocorrem anualmente. Em *Crotalus durissus*, durante o outono e inverno os testículos estão em regressão, época em que o túbulo seminífero é composto basicamente de espermatogônias e células de Sertoli e os espermatozoides são encontrados em grande quantidade no ducto deferente (Belluomini et al., 1996; Salomão e Almeida-Santos, 2002). Na recrudescência testicular durante a primavera, há retomada do processo espermatogênico com multiplicação de células germinativas, porém, os espermatozoides ainda estão ausentes no compartimento tubular. Enquanto que no verão ocorre a fase ativa da espermatogênese, momento no qual ocorre a produção máxima de células germinativas e presença de espermatozoides no lúmen. Devido à presença de espermatozoides nos ductos deferentes, os machos estariam aptos para atividade reprodutiva em qualquer época do ano, contudo, fêmeas vitelogênicas e, portanto, receptivas, são observadas durante o outono (Salomão e Almeida-Santos, 2002).

Após a cópula, as fêmeas mantêm os espermatozoides em regiões do útero, especializadas na estocagem dos gametas (Almeida-Santos e Salomão, 1997; Siegel e Sever, 2006) até que a fertilização ocorra na primavera. Assim, a gametogênese, tanto masculina quanto feminina, é dissociada da cópula, fazendo com que a estocagem dos espermatozoides, em ambos os sexos, seja um mecanismo essencial para o sucesso reprodutivo da espécie (Almeida-Santos e Salomão, 2002). O parto ocorre no final da primavera e no verão (Almeida-Santos e Salomão, 2002). É importante ressaltar que a dissociação entre gametogênese e cópula poderia ser justificada pela necessidade desses animais, assim como ocorre em algumas espécies ectotérmicas, armazenarem energia suficiente para custear a gametogênese e os comportamentos reprodutivos com demandas energéticas distintas, e assim, acumular

temporalmente as funções relativas à aquisição das reservas necessárias para a manutenção da atividade reprodutiva *per se* (Bonnet et al., 1998).

A variação na produção de espermatozoides estimulou a classificação desse processo em pré-nupcial e pós-nupcial (Saint Girons, 1982). Quando a produção do gameta masculino é concluída logo antes do período de acasalamento é denominado pré-nupcial. De modo diferente, quando o espermatozoide é produzido e armazenado no ducto deferente do macho ou no oviduto da fêmea durante um período até a fertilização, classifica-se o processo como pós-nupcial (Saint Girons, 1982). Diante disso, o ciclo reprodutivo masculino de *Crotalus durissus* da região sudeste do Brasil é classificado como pós-nupcial devido a presença de espermatogênese ativa durante a primavera e verão, acasalamento durante o outono e armazenamento entre esses dois momentos (Salomão e Almeida-Santos, 2002).

#### 2.2.1. Fisiologia reprodutiva

O ciclo reprodutivo dos répteis é orquestrado por fatores endógenos (hormônios e metabolismo) e exógenos (temperatura, fotoperíodo e disponibilidade de alimentos) (Fitch, 1970; Seigel et al., 1987). No lagarto, *Tiliqua rugosa* (Bourne et al., 1986), e na tartatuga, *Trachemys scripta* (Licht et al., 1989), foi observado que a produção de andrógeno, necessária para recrudescência testicular, é dependente de temperatura. Nos lagartos, *Xantusia vigilis* (Bartholomew, 1953) e *Anolis carolinensis* (Underwood e Hall, 1982; Ferrell, 1984), o aumento do fotoperíodo também está relacionado com a recrudescência testicular e ativação da espermatogênese. Porém, em *Crotalus viridis viridis* a espermatogênese não foi influenciada pelo fotoperíodo (Aldridge, 1975). De modo geral, a temperatura ambiental influencia o metabolismo das serpentes, que favorece o desenvolvimento e a diferenciação do epitélio germinativo após um período de quiescência (Vinegar, 1974; Aldridge, 1975; Duvall et al., 1992). Sabe-se ainda que em serpentes, a disponibilidade de alimento é imprescindível para garantir grandes depósitos de gordura visceral que irá subsidiar a energia necessária para o início e manutenção da gametogênese, o comportamento de combate, de corte e cópula (Duvall et al.,

1992; Andelkovic et al., 2021). Assim, os fatores ambientais influenciam a liberação de hormônios hipotalâmicos, particularmente o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) que, por sua vez, estimula a secreção de gonadotrofinas (GTHs) e, conseqüentemente, regula as funções testiculares (Lind e Beaupre, 2014) (Fig. 2).

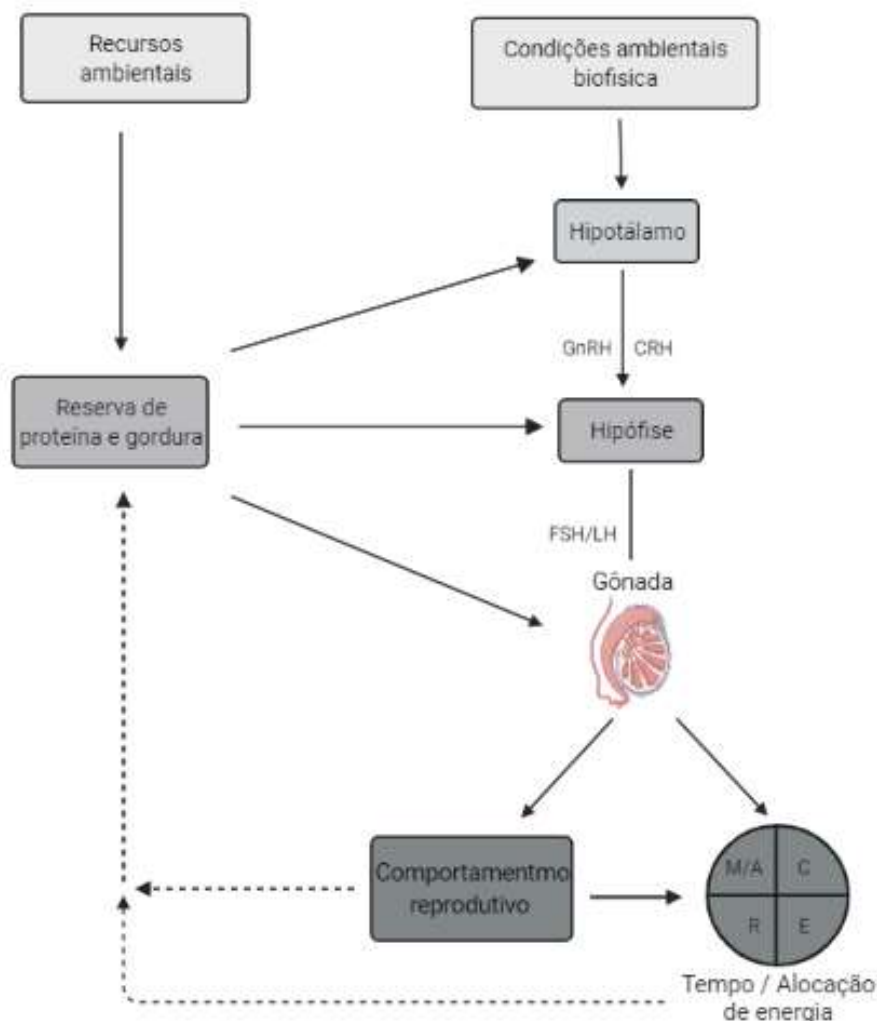


Figura 2: Diagrama que demonstra a estimulação sequencial para ocorrência do processo reprodutivo, o qual descreve a dependência do estado energético e condições ambientais para iniciar o processo reprodutivo. Fatores biofísicos como fotoperíodo, temperatura e umidade, associados a condições energéticas dos indivíduos dado pelos recursos ambientais, influenciam o eixo hipotálamo – hipófise – gonadal. As linhas tracejadas representam uma ligação hipotética entre o status energético e do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. Linhas sólidas indicam ligações hipotéticas entre os produtos a jusante do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal e que determinam o comportamento reprodutivo (R), crescimento (C), armazenamento de energia (E) e



manutenção para atividade (M/A) diárias do indivíduo. Imagem adaptada de Dunham et al. 1989).

Enquanto o hormônio folículo estimulante (FSH) promove o desenvolvimento da espermatogênese, com aumento do diâmetro tubular e altura do epitélio seminífero, o hormônio luteinizante (LH) induz a produção de andrógenos, tais como testosterona e diidrotestosterona (Krohmer, 1986), os quais estão envolvidos na estimulação de comportamentos e processos fisiológicos reprodutivos em répteis machos (Moore e Lindzey, 1992; Lind et al., 2010). Estudos mostram que a concentração de testosterona tem relação positiva com a capacidade de armazenamento de energia em forma de depósito de gordura em três famílias distintas de serpentes: Viperidae (Bonnet et al., 2002; Lind e Beauore., 2015), Colubridae (King e Bowden, 2013) e Boidae (Holding et al., 2014). Nesse sentido, em *Vipera aspis*, machos com reduzida quantidade de tecido adiposo parecem renunciar ao investimento reprodutivo (Aubret et al., 2002). Cabe ainda ressaltar que a relação entre armazenamento energético e reprodução parece ser compartilhado com outros animais ectotérmicos, já que em estudos de suplementação alimentar em rãs e lagartos foi estabelecida a relação direta entre a ingestão de energia e produção de testosterona (Marler e Ryan, 1996; Cox et al., 2008; Ruiz et al., 2010). Desse modo, os fatores ambientais conduzem o eixo hipotálamo-hipófise-gônada na coordenação da aptidão, ou não, para o investimento reprodutivo (Lind et al., 2010). Cabe mencionar que estudos discutem a relação entre o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal e a reprodução em vertebrados, porém ainda apresentam resultados ambíguos (Romero 2002; Moore e Jessop 2003; Wingfield e Sapolsky 2003). Lind e Beauore (2015) não encontraram interferência direta entre o nível de corticosteroides com testosterona em *Crotalus horridus*.

Como mencionado, em espécies sazonais a espermatogênese é interrompida ou, subdividida dentro de uma série de fases distintas baseadas em condições ambientais que são traduzidas em sinais hormonais estimulatórios ou inibitórios (Lincoln, 1989). Logo, mudanças de temperatura, fotoperíodo, disponibilidade de alimento e padrão de chuva são responsáveis pelas alterações nos processos fisiológicos e padrões de atividade dos répteis

(Bennett e Dawson, 1976; Southwood et al., 2006; Williard e Harden, 2011; Oliveira et al., 2018; 2021). Porém, cabe destacar que devido a variabilidade de fatores que regem o investimento na reprodução, as estratégias reprodutivas desenvolvidas pelas serpentes são diversificadas e plásticas (Shine, 2003), resultando na variação interespecífica e intraespecífica. Entre espécies de serpentes há variação quanto ao modo de desenvolvimento (oviparidade e viviparidade) e táticas de acasalamento (procura ativa por parceiro, luta e bolas de acasalamento) (Seigel et al, 1987; Duvall et al., 1992). Enquanto que entre indivíduos de uma mesma espécie é reconhecido que os ciclos reprodutivos não progridem em estreita sincronia, embora uma tendência seja observada quanto a concentração em determinada época do ano.

### 2.2.2. Anatomia reprodutiva

*Crotalus durissus* possuem dois testículos alongados encontrados em disposição intracelomática, estando o direito em posição mais cranial que o esquerdo (Fig. 3). Em épocas de atividade espermatogênica máxima, as gônadas podem dobrar de tamanho (Gribbins e Rheubert, 2011). O testículo é envolvido por uma camada de tecido conjuntivo rico em fibras colágenas, conhecida como albugínea e em seu parênquima podem ser distinguidos dois compartimentos: o tubular e intertubular. O primeiro é constituído pelos túbulos seminíferos, representado pelo epitélio seminífero que possui as células germinativas em diversas fases de desenvolvimento e as células de Sertoli. Limitando externamente os túbulos seminíferos estão as células peritubulares mioídes, que juntamente com as células de Sertoli, secretam a membrana basal, formando a túnica própria. A porção central dos túbulos seminíferos está preenchida pelo fluido tubular e corresponde ao lúmen, o qual é fundamental para o trânsito dos espermatozoides até a rede testicular. O compartimento intertubular, também chamado de intersticial, é formado por células de Leydig, fibras e células do tecido conjuntivo, como macrófagos e mastócitos, vasos sanguíneos e linfáticos. O testículo possui funções gametogênica e esteroidogênica, ou seja, de produção de gametas e hormônios (Pierantoni, 1998; Koulis et al., 2002; Li et al., 2012).

Nos répteis, como em todos os amniotas, o epitélio seminífero é composto por gerações de células germinativas associadas às células de Sertoli (Gribbins et al., 2005; Gribbins, 2011; Gribbins e Rheubert, 2011). De modo geral, as associações celulares no epitélio seminífero seguem uma sequência lógica de progressão do desenvolvimento das células germinativas (Hermo et al., 2010). Embora o padrão que define a organização da espermatogênese em répteis seja ainda tema de discussões, a disposição multiestádio, cuja característica é a ocorrência de várias associações celulares em uma única secção transversal do túbulo seminífero, foi descrita em representantes de duas ordens, Testudines e Squamata, respectivamente na tartaruga de água doce *Kinosternon scorpioides* (Sousa et al., 2014) e para a cascavel *Crotalus durissus* (Resende, 2019).

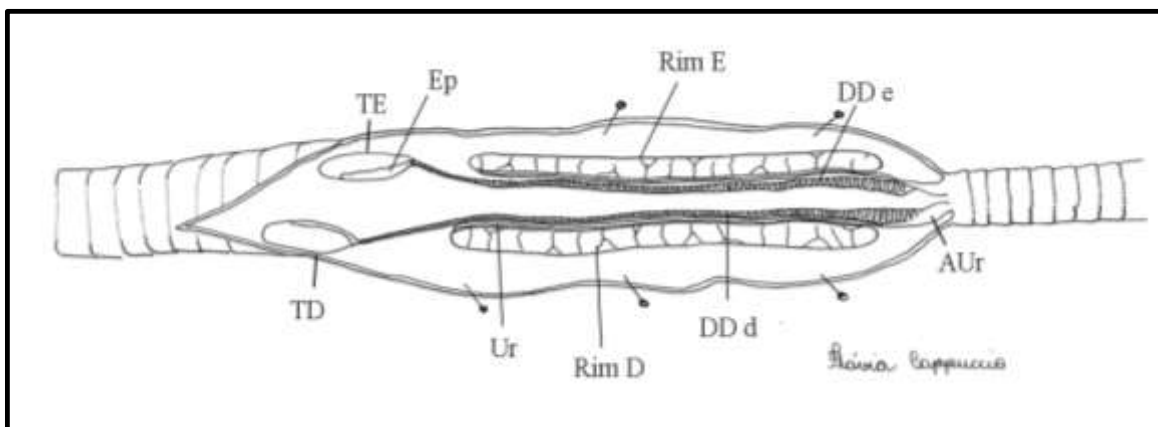


Figura 3: Representação esquemática do sistema genital dos machos de *Crotalus durissus*. Vista ventral. AUr: ampola do ureter; DD d: ducto deferente direito; DD e: ducto deferente esquerdo; Ep: epidídimo; Rim d: rim direito; Rim e: rim esquerdo; TD: testículo direito; TE: testículo esquerdo; Ur: ureter. Fonte: Resende FC, 2019.

De acordo com estudos desenvolvidos até o momento, o processo espermatogênico em *Crotalus durissus* segue um padrão sazonal típico (Salomão e Almeida-Santos, 2002). Assim, durante o período de quiescência, que compreende os meses do outono e inverno, o túbulo seminífero é constituído predominantemente por espermatogônias e células de Sertoli, enquanto no lúmen são observadas células que se destacaram do epitélio seminífero e seguem em processo de degeneração (espermátocitos e espermátides). A proliferação espermatogonial reinicia na primavera, caracterizando a fase de recrudescência, ampliando assim a população de células comprometidas com

espermatogênese. Estas células evoluem ao longo do processo de diferenciação, de modo que no verão todas as células da linhagem germinativa são observadas, incluindo espermatozoides livres no lumen tubular. Estes eventos culminam com o período de maior produção espermática. Em seguida, ocorre ligeira redução da altura do epitélio seminífero, progredindo com a perda de células germinativas e degradação do epitélio, sinalizando o término do período de produção de gametas (Salomão e Almeida-Santos, 2002).

Diante do exposto, é perceptível que as espécies com estratégias sazonais representam um caso especial na espermatogênese, por estarem sujeitos a ciclos anuais de crescimento e regressão testicular, assim como alteração da função e morfologia das células somáticas. Apesar desse preceito existir, ainda são escassos estudos que demonstram as adaptações morfológicas e funcionais das células somáticas dos testículos das serpentes em resposta a sazonalidade (Almeida-Santos, 2002; Pizzato e Marques, 2006), sobretudo de regiões tropicais. Por reconhecer que as células de Leydig e de Sertoli orquestram todo o processo esteroidogênico e gametogênico, torna-se de grande relevância compreender as modelações que elas sofrem em repostas as modificações testiculares durante as variações ambientais sazonais. Particularmente em relação à *C. durissus*, estudos em desenvolvimento no Laboratório de Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade do Estado de Minas Gerais, têm revelado que apesar de estarem distribuídos consistentemente em regiões nas quais as temperaturas não sofrem grandes variações ao longo do ano, machos de cascavéis apresentam significativa influência sazonal na composição do parênquima testicular (Resende e Avelar, 2021).

### 2.2.3. Célula de Sertoli

As células de Sertoli são colunares e estão orientadas radialmente dentro dos túbulos seminíferos, se estendendo desde a membrana basal até a parte central do túbulo seminífero onde, juntamente com as células germinativas, delimitam o lúmen tubular (Russell, 1993). O núcleo das células de Sertoli é geralmente ovoide ou piramidal, porém pode apresentar diversas formas dependendo da fase de maturação e estágio do ciclo espermatogênico. A célula

diferenciada contém endentações no envoltório nuclear, resultando no aumento da área de interação com o citoplasma. Além disso, a presença do nucléolo tripartido típico, associado à sua posição central, basofilia e refringência, possibilita a identificação das células de Sertoli nos túbulos seminíferos (Schulz e Holstein, 1993; Krzanowska e Bilinska, 2000).

O citoplasma da célula de Sertoli apresenta recessos laterais e apicais, onde estão alojadas as células germinativas em diferentes fases de desenvolvimento. Além de constituírem um suporte físico para a progressão da espermatogênese, as células de Sertoli estabelecem entre si junções de oclusão, desenvolvendo uma barreira que proporciona a organização do epitélio seminífero em compartimentos, criando um ambiente bioquímico, hormonal e imunologicamente propício para o desenvolvimento das células germinativas até o fim do processo espermatogênico. Adicionalmente, as células de Sertoli possuem um papel ativo na liberação das espermátides no momento da espermição, além de serem responsáveis por fagocitar o excesso de citoplasma proveniente da espermiogênese e células germinativas apoptóticas (Griswold, 1998; França e Russell, 1998; Lara et al., 2018). Sendo assim, a célula de Sertoli é essencial para organização testicular e desenvolvimento da espermatogênese, sendo necessária para a progressão de célula germinativa até espermatozoide via contato direto e controle do ambiente dentro do túbulo seminífero (Russell et al., 1993; França et al., 1994; Jiménez et al., 2015). Para vertebrados, o fator mais importante para a proliferação da célula de Sertoli é o FSH (Orth, 1993), enquanto os hormônios tireoidianos são responsáveis pela sua maturação (Cooke et al., 1994).

Nos testículos adultos as células de Sertoli são convencionalmente consideradas como população estável e de alta resistência a estímulos que induzem a morte outros tipos celulares (Steinberger e Steinberger, 1977; Nandi et al., 1999). Porém essa premissa tem sido discutida devido a trabalhos que mostraram a proliferação da célula de Sertoli na região de transição dos túbulos seminíferos com a rede testicular de ratos adultos (Figueiredo et al., 2016) e em animais responsivos as alterações sazonais, a exemplo dos equinos e hamsters, nos quais foram verificadas redução no número de células de Sertoli durante o

período de repouso, seguida da recuperação desta população, concomitantemente ao restabelecimento da espermatogênese (Johnson et al., 2008; Martínez-Hernández et al., 2020). No entanto, o conhecimento quanto aos padrões apresentados pelas células de Sertoli em viperídeos neotropicais, especialmente nas diferentes fases do ciclo de atividade testicular, é escasso.

#### 2.2.4. Células de Leydig

As células de Leydig, em mamíferos, são mononucleadas, possuindo núcleo esférico com um a três nucléolos (Setchell, 1991). Podem ser encontradas em grupos ou isoladas em regiões perivasculares e peritubulares (Haider, 2004; Almeida-Santos, 2005). Estas células são bastante conhecidas por sua marcante produção de andrógenos (Almeida-Santos, 2005), estimuladas por meio do hormônio luteinizante (LH). Dentre os andrógenos sintetizados pelas células de Leydig estão a testosterona e a diidrotestosterona, os quais são responsáveis pela diferenciação do trato genital masculino e a genitália externa na fase fetal (Jiménez-Reina et al., 2016). Além disso, elas são responsáveis pelo aparecimento de caracteres sexuais secundários e manutenção quantitativa da espermatogênese durante a puberdade (Sharpe, 1994). A diidrotestosterona é responsável pela sustentação funcional das glândulas sexuais acessórias e do epidídimo (Luke e Coffey, 1994; Fan e Robaire, 1998; Goyal et al., 1999).

De maneira geral, nos mamíferos, existem duas populações de CL: as fetais e adultas. As primeiras são produtoras de andrógeno e fator semelhante a insulina 3 (INSL3), responsáveis pela masculinização fetal e descenso testicular, enquanto as células de Leydig do tipo adulta são produtoras dos esteroides sexuais (Kerr e Knell, 1988; Haider, 2004; Wu et al., 2007). A proliferação e diferenciação da célula de Leydig fetal é regulada pelos esteroides sexuais, hormônios tireoidianos e fator de transcrição GATA (Wu et al., 2007), enquanto as células de Leydig adulta e suas progenitoras são reguladas por diversos hormônios e fatores de transcrição, como LH, IGF1, TGF  $\alpha$  e  $\beta$ , FSH, gonadotrofina coriônica humana, hormônios tireoidianos, hormônio antimulleriano, estrógeno e andrógeno (Mendis-Hadagama e Ariyame, 2001; Wu et al., 2007). Contudo, essas distintas populações de células de Leydig ainda não foram descritas para serpente.

As alterações morfológicas e funcionais das células somáticas devido as influências sazonais têm sido descritas em aves (Young et al., 2005); répteis (Al-Amri et al., 2013) e mamíferos (Jiménez et al., 2015; Amer et al., 2018). Em reprodutores sazonais observou-se redução do número de células de Leydig durante o período não reprodutivo, embora nenhum estudo tenha relatado a morte ou proliferação desse tipo celular (Strben et al., 2003; Hombach-Klonisch et al., 2004; Dadhich et al., 2010). Alterações estruturais no epitélio seminífero têm sido relacionadas à variação na atividade das células de Leydig e à mudança nos padrões reprodutivos (Colli e Pinho, 1997; Vieira et al., 2001).

Diante do mencionado, foi avaliado se as células de Sertoli e as células de Leydig adaptam sua morfologia e funcionamento de acordo com as diferentes atividades espermatogênicas (regressão, recrudescência e ativo).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivos específicos**

Investigar as modificações morfofuncionais das células de Leydig e Sertoli desenvolvidas como resposta às diferentes fases de atividade espermatogênica (regressão, recrudescência e ativo).

#### **3.2. Objetivos específicos**

- I. Descrever a organização histológica e ultraestrutural das células de Sertoli e de Leydig encontradas nas diferentes atividades espermatogênicas: regressão, recrudescência e ativo;
- II. Determinar o percentual e o volume de células de Sertoli e Leydig no parênquima testicular de cascavéis;
- III. Determinar o número de células de Sertoli e Leydig nos testículos em recrudescência, ativos e em regressão;
- IV. Determinar o índice de proliferação (injeção de BrDU e PCNA) bem como de apoptose (caspase 3) das células de Sertoli e de Leydig nas diferentes fases de atividade gametogênica em resposta a adequação das condições ambientais;
- V. Avaliar a concentração sistêmica da testosterona e relacioná-la com eventos sazonais observados nas células somáticas.

### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **4.1. Animais (*Crotalus durissus*)**

Para o presente estudo foram utilizados 39 exemplares de *Crotalus durissus*, amostrados durante o intervalo de um ano (Fig. 4). Estes indivíduos foram coletados pela população de cidades localizadas dentro de um perímetro aproximado de 400 km no território do estado de Minas Gerais e direcionados para o Serviço de Animais Peçonhentos da Fundação Ezequiel Dias (SAP/Funed; Licença nº 48897-1 do Instituto Chico Mendes de Biodiversidade). Os protocolos para manipulação e experimentação animal foram previamente



aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA-UFMG nº130/2015) e pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Fundação Ezequiel Dias (CETEA/FUNED nº09/2018).

A fim de facilitar a compreensão do número de indivíduos alocados nos grupos, definidos a partir da classificação histológica da atividade testicular, e utilizados nas diferentes avaliações realizadas no presente estudo, apresentamos a distribuição do número amostral na tabela 1.

O procedimento de eutanásia consistiu em 1º) dessensibilização prévia dos animais por meio da exposição ao dióxido de carbono, para realização de coleta de sangue na veia caudal e 2º) pesagem dos animais seguida de injeção intracardíaca de tiopental sódico na dose letal de 100mg/kg. Uma vez confirmada a perda dos sinais vitais, realizou-se a coleta dos testículos por meio de acesso ventral na linha mediana, sendo estes pesados e fixados de acordo com os protocolos experimentais descritos a seguir. As carcaças de todos os espécimes foram fixadas em formalina 10% e mantidas na Coleção Científica de Serpentes da Fundação Ezequiel Dias, Minas Gerais, Brasil. O índice gonadossomático  $[(\text{massa total dos testículos}/\text{massa do animal}) \times 100]$  foi calculado para cada serpente.

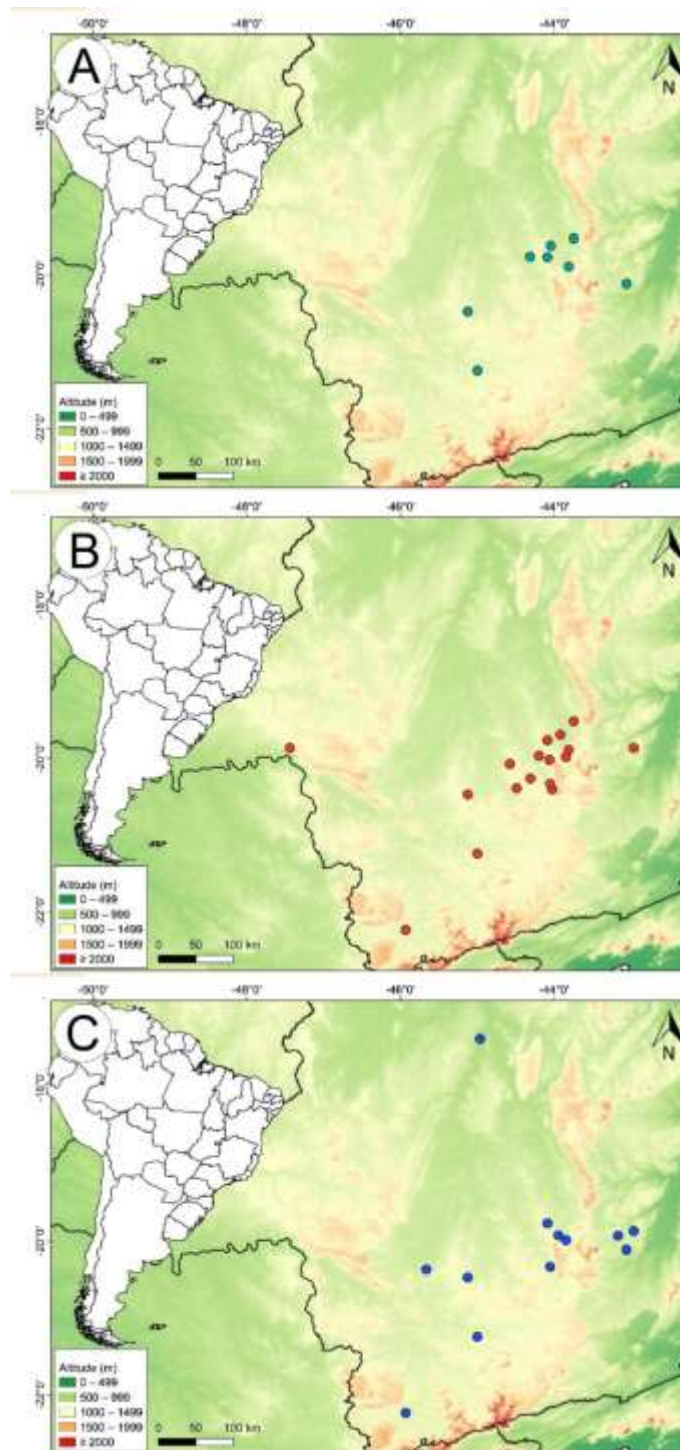


Figura 4: Mapa com a indicação da localização de origem dos espécimes utilizados nas análises da célula de Sertoli durante a (A) recrudescência, (B) atividade e (C) regressão testicular. Em alguns locais foram coletados mais de um indivíduo, gerando pontos coincidentes, logo, menor número de pontos do que espécimes coletados.

## **4.2. Injeções de bromodeoxiuridina**

Para estimar a proliferação das células de Sertoli e células de Leydig, o traçador celular 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU, 150 mg/kg de massa corporal) (Sigma, lote #HMBG3845V) foi diluído em solução salina e dimetilsulfóxido (DMSO) (1:1) e injetado pela via intracelomática em 20 indivíduos. As serpentes foram eutanasiadas após um intervalo mínimo de quatro horas pós-injeção de BrdU. Os testículos foram coletados, pesados e fixados em solução de paraformaldeído 4%, por um período de 24 horas. Posteriormente, seguiram-se os procedimentos histológicos de rotina.

## **4.3. Coleta de sangue e análises hormonais**

Para a coleta de sangue foram utilizadas seringas contendo heparina. Após centrifugação (10 minutos; 2000rpm), as alíquotas de plasma sanguíneo foram processadas na plataforma automatizada Cobas 8000 (Roche Diagnostics Inc., Indianápolis, IN, EUA) e o ensaio de quimiluminescência foi realizado para a avaliação direta da testosterona. O menor nível de quantificação foi de 10 ng/dL (coeficiente de variação intra-ensaio entre 1,7% e 4,6%). Estes procedimentos foram realizados no Laboratório Tecsa (Tecnologia em Sanidade Animal) em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

## **4.4. Processamento histológico**

### **4.4.1. Microscopia de luz**

Para as análises realizadas sob microscopia de luz convencional, fragmentos testiculares foram fixados em glutaraldeído a 4% em tampão fosfato 0,05M ou em paraformaldeído (PFA), ambos por 24 horas. Após esse período, as amostras fixadas em glutaraldeído foram transferidas para tampão fosfato 0,05M (pH 7,3) e as fixadas em PFA foram armazenadas em álcool 70%. Após a desidratação em sequência crescente de álcoois e diafanização (percurso PFA), os tecidos foram incluídos em glicol metacrilato (GM) (glutaraldeído) e Paraplast® (PFA). Os tecidos incluídos em GM e Paraplast® foram seccionados a 4 µm e 5 µm de espessura, respectivamente, em micrótomo rotativo Leica RM 2165. As lâminas destinadas aos estudos histomorfométricos foram coradas com

azul de toluidina + 1% borato de sódio. Todas as lâminas foram montadas com Entellan® (Merck). As lâminas preparadas com o material incluído em Paraplast® foram destinadas aos ensaios de imunomarcação, conforme será descrito a diante.

#### 4.4.2. Microscopia eletrônica de transmissão

As amostras preparadas para microscopia eletrônica de transmissão foram inicialmente fixadas em glutaraldeído 5% em tampão fosfato (0,05M e pH 7,4) por um período de 24 horas à 4°C. Posteriormente, os fragmentos foram pós-fixados com ósmio reduzido (tetróxido de ósmio a 1% + ferrocianeto de potássio a 1,5%, em tampão fosfato 0,05M, pH 7,4) por 90 minutos e acetato de uranila a 3% por 24 horas. Após desidratação em álcoois e acetona, os fragmentos foram incluídos em resina araldite. Cortes semifinos foram obtidos em micrótomo rotativo Leica RM 2165, corados com azul de toluidina e borato de sódio a 1%. A partir da seleção das áreas de interesse, cortes ultrafinos foram obtidos em ultramicrótomo Sorvall MT-2B da Dupont, coletados em tela de cobre e contrastados com acetato de uranila a 3% e citrato de chumbo. Este material foi analisado e fotografado no Centro de Microscopia Eletrônica da UFMG. As imagens foram avaliadas qualitativamente quanto as características nucleares e citoplasmáticas das células somáticas testiculares (Sertoli e Leydig).

### 4.5. Avaliações histomorfométricas

#### 4.5.1. Classificação histológica da atividade testicular

Todos os animais tiveram seus testículos avaliados histologicamente a fim de determinar o estado da espermatogênese, definido de acordo com a citoarquitetura predominante nos túbulos seminíferos. Assim, foram considerados em recrudescência os indivíduos que apresentaram células germinativas até a fase de espermatíde alongada, sem evidências de espermição. Aqueles espécimes com atividade espermatogênica completa, isto é, com presença de espermatozoides no lúmen tubular, foram classificados como ativos. A regressão foi caracterizada pela presença de túbulos contendo

células de Sertoli e células germinativas iniciais (espermatogônias e espermatócitos primários) na constituição do epitélio seminífero.

#### 4.5.2. Densidade volumétrica dos componentes do parênquima testicular

O percentual ocupado por cada componente do parênquima testicular foi estimado a partir do total de 16200 intersecções por animal, projetadas sobre imagem obtida em objetiva de 40x e fotografadas com câmera digital Olympus DP25 acoplada ao microscópio óptico Olympus BX40. Para isso, foi realizada a contagem de 30 campos aleatórios por animal, utilizando-se retículo de 540 intersecções no programa Image J (Abramoff et al., 2004). Foram contabilizadas as intersecções que incidiram sobre elementos do compartimento intertubular (células de Leydig, tecido conjuntivo, vasos sanguíneos e linfáticos) e compartimento tubular (túnica própria, epitélio germinativo, células de Sertoli, lúmen tubular).

Para o cálculo do volume (em ml) de cada componente avaliado, foi estimado o volume líquido do testículo, que corresponde a massa total do testículo da qual é subtraído o valor relativo à massa da túnica albugínea. Em serpentes, o percentual de túnica albugínea corresponde a 0,054% do total da massa do testículo (Resende e Avelar, 2021). Como a densidade do testículo é muito próxima de 1 (1,03 a 1,04; França, 1991), o volume líquido (em ml) do testículo foi considerado igual a sua massa líquida (em gramas). Assim, a partir do percentual dos diferentes componentes e do volume testicular (VT), o volume de cada um dos componentes foi calculado de acordo com a fórmula:

$$V_x = \frac{V_T \times X}{100}$$

onde:  $V_x$  = volume de um determinado componente do parênquima

$V_T$  = volume total testículo (ml)

$X$  = percentual do componente do parênquima

#### 4.5.3. Morfometria e estereologia da célula de Sertoli e célula de Leydig

Os volumes nucleares das células de Sertoli e das células de Leydig foram calculados a partir do diâmetro nuclear. Para isso, 30 núcleos de cada tipo celular

foram avaliados por animal. As imagens foram obtidas com a objetiva de 100x e câmera digital Olympus DP25 acoplada ao microscópio óptico Olympus BX40. Considerando o perfil irregular do núcleo da célula de Sertoli, foram medidos os diâmetros maior e menor, através do programa Image J e, assim, foi calculado o diâmetro médio por animal. Para a célula de Leydig foram mensurados os núcleos com perfil mais esférico possível e nucléolo evidente. Nestes, foram medidos os diâmetros maior e menor em ângulo perpendicular de 90° e, assim, foi calculado o diâmetro médio por animal.

O volume nuclear foi expresso em micrômetros cúbicos ( $\mu\text{m}^3$ ) e obtido através da fórmula:

$$V_{nuclear} = \frac{4}{3} \pi R^3$$

onde,  $V_{nuclear}$  = volume nuclear ( $\mu\text{m}^3$ )

R = raio nuclear (diâmetro nuclear/2;  $\mu\text{m}$ )

$\pi = 3,1416$

O cálculo do volume individual das células de Leydig foi realizado empregando-se retículo com 441 intersecções (pontos), em aumento de 1000x (10x ocular X 100x objetiva). Mil pontos sobre o citoplasma e o núcleo das células de Leydig foram contados por animal, com a finalidade de se determinar a proporção (%) entre núcleo e citoplasma.

Assim, foi possível calcular o volume citoplasmático e o volume individual celular:

$$V_{cit} = \frac{\%cit. \times V_n}{\%nuc}$$

onde,  $V_{cit}$  = volume citoplasmático ( $\mu\text{m}^3$ )

$\%cit$  = porcentagem de citoplasma

$V_n$  = volume nuclear ( $\mu\text{m}^3$ )

$\%nuc$  = porcentagem de núcleo

$$V_{cel} = V_n + V_{cit}$$

onde,  $V_{cel}$  = volume celular ( $\mu\text{m}^3$ )

$V_n$  = volume nuclear ( $\mu\text{m}^3$ )

$V_{cit}$  = volume citoplasmático ( $\mu\text{m}^3$ )

De posse do volume ( $\mu\text{m}^3$ ) das células de Leydig, da proporção volumétrica (%) das mesmas no testículo, e do volume total (ml) ocupado por estas células no testículo, foi calculado o número de células de Leydig por testículo e por grama de testículo, em cada animal.

O índice leydigossomático (ILS), usado para mensurar o equivalente em células de Leydig relativo à massa corporal do indivíduo, foi calculada de acordo com a fórmula (Morais et al., 2014):

$$ILS = (VCL \times MC) / 100$$

onde,  $VCL$  = volume total de célula de Leydig no parênquima testicular (gramas)

$MC$  = massa corporal (gramas)

Para o cálculo do número de células de Sertoli por testículo foi considerado o volume total de núcleos no parênquima testicular dividido pelo volume nuclear individual, conforme demonstrado a seguir:

$$N^{\circ}CS(t) = \frac{V_{tNCS}}{V_{nuclear}}$$

onde,  $N^{\circ}CS(t)$  = número de célula de Sertoli por testículo

$V_{tNCS}$  = volume total de núcleo de célula de Sertoli no parênquima testicular

$V_{nuclear}$  = volume nuclear

#### 4.5.4. Avaliação da proliferação e morte celular

Para investigar a ocorrência de proliferação e morte de células de Sertoli e de Leydig, as secções testiculares destinadas à imunohistoquímica foram desparafinizadas e reidratadas. A recuperação antigênica em tampão citrato (pH 6.0) foi realizada em banho-maria à 80° C por 40 minutos. Para a supressão da atividade da peroxidase endógena do tecido, as lâminas foram tratadas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% em PBS por 30 minutos. Ligações inespecíficas foram bloqueadas com soro normal a 10% diluído em PBS. As lâminas foram mantidas em câmara úmida a 4°C “*overnight*” com os seguintes anticorpos específicos: anticaspase-3 (Imuny, IM-0035, lote 16041) na diluição de 1:100; anti-PCNA (Imuny, IM-0301, lote 13176) na diluição 1:50; anti-BrdU (Santa Cruz, SC-32323, lote H0516) na diluição 1:100. Após esta etapa, as secções foram incubadas com anticorpo secundário biotilado à temperatura ambiente por 60 minutos.

A detecção de sinal foi obtida pela reação da peroxidase utilizando-se 3,3'diaminobenzidina (DAB) (Abcam, ab103723, lote GR3194769-1). Posteriormente, as secções foram contra coradas com hematoxilina, seguida por desidratação, e montagem das lâminas com lamínulas e Entellan® (Merck). Para verificar a especificidade de cada anticorpo, foram feitas secções de controle negativo, nas quais o anticorpo primário foi substituído pela solução de diluição. Para determinar as taxas de proliferação e morte, 1000 células de Leydig foram contadas para cada anticorpo (no total de marcações positivas e negativas).

#### 4.6. Análise Estatística

Os dados foram avaliados quanto à normalidade e homocedacidade. Quando apresentaram distribuição normal foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo pós-teste de Tukey (multicomparações) ou teste t, quando apenas duas médias eram consideradas. Os dados não paramétricos foram avaliados por meio do teste Kruskal-Wallis e a diferença entre as médias foi determinada pelo pós-teste de Dunn. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa GraphPadPrism 5 (GraphPad Software, Inc). Os resultados obtidos foram expressos como média ± Dp (desvio padrão da média) e o nível de significância considerado foi de  $p < 0,05$ .



Para verificar a interação entre os diversos parâmetros de células de Leydig e os níveis plasmáticos de testosterona, foram utilizados os coeficientes de correlação de Pearson ou Spearman, com nível de significância 5%, por meio do programa GraphPadPrism 6 (GraphPad Software, Inc).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Avaliação histológica e caracterização dos padrões de atividade testicular observados durante o ciclo anual em *C. durissus*.

A avaliação dos testículos dos 39 indivíduos selecionados para a realização deste estudo revelou que 23%, 36% e 41% dos espécimes estavam, respectivamente, em recrudescência, ativo e regressão, classificados de acordo com a composição do epitélio seminífero (Tab. 1 e Fig. 5). O restabelecimento do epitélio seminífero, denominado como recrudescência testicular, período no qual são encontradas células germinativas em diferentes estágios de desenvolvimento, com exceção do espermatozoide (Fig. 5A), foi observado a partir do final do inverno, sendo o padrão de, aproximadamente, 30% dos indivíduos coletados nesta estação (Fig. 5D). Esta característica persistiu até o terço inicial da primavera, e representou cerca de 40% (Fig. 5D) dos animais coletados neste período. Com o avanço na fase espermiogênica, espermatozoides no lúmen tubular são observados e a presença destes caracteriza a espermatogênese completa (Fig. 5B). Portanto, espermatogênese ativa foi o fenótipo que predominou em 100% dos animais coletados durante o verão. No entanto, alguns dos indivíduos coletados na primavera (60% do grupo) já exibiam esse mesmo padrão, assim como houve aqueles que retiveram este fenótipo testicular até o outono (10% do grupo). De fato, no outono tem início a regressão do testículo, fenótipo marcado pela desintegração e descontinuidade do epitélio seminífero e células em processo de apoptose e vacuolizações (Fig. C). Estas características foram observadas em 90% e 70% (Fig. 5D) dos indivíduos coletados no outono e inverno, respectivamente.

Uma vez estabelecida a distribuição dos espécimes, fundamentada no fenótipo testicular, procederam-se as avaliações morfométricas e análises estatísticas. O índice gonadossomático (IGS) foi significativamente maior nos

animais ativos ( $0,61 \pm 0,12\%$ ) e representou um aumento de aproximadamente 1,89x e 2,75x em relação aos valores obtidos para os grupos em recrudescência ( $0,32 \pm 0,14\%$ ) e regressão ( $0,22 \pm 0,04\%$ ), respectivamente (Tab. 2).

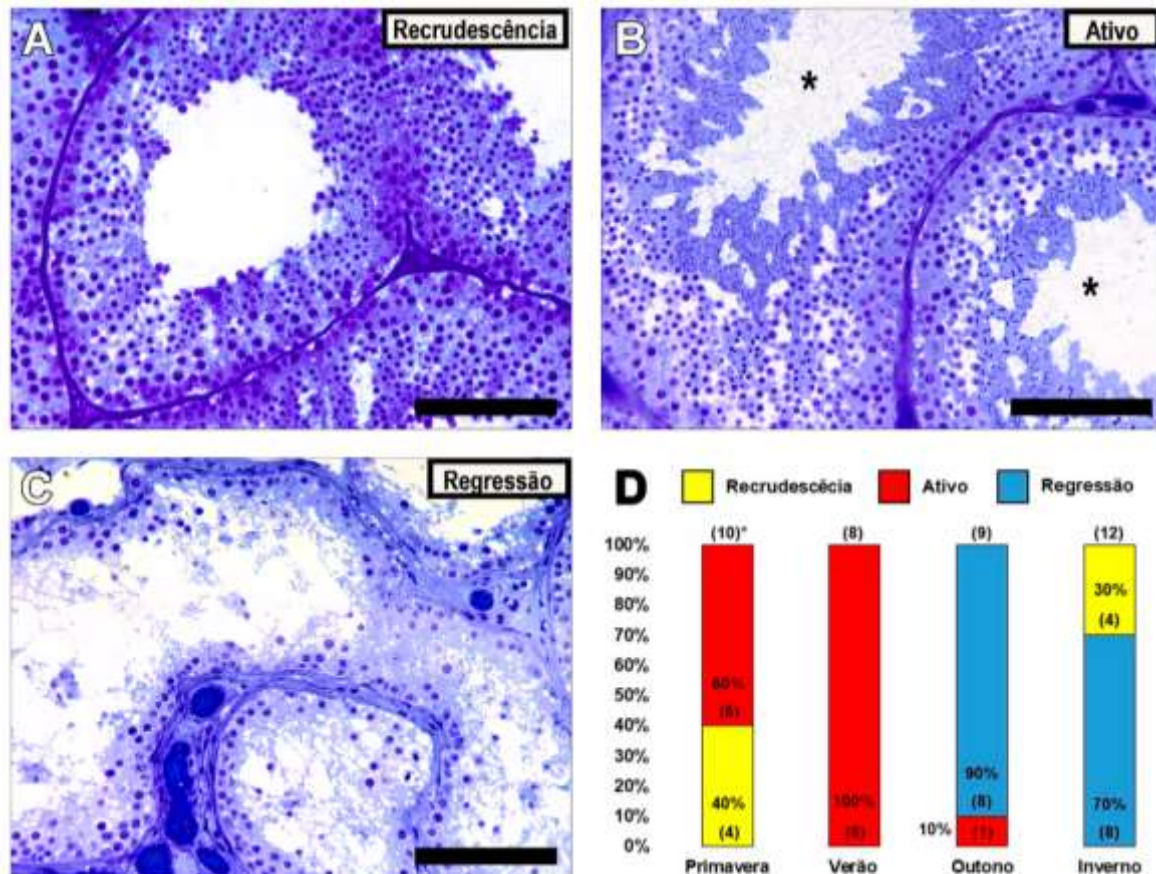


Figura 5: Diferentes condições de atividade do parênquima testicular da cascavel *Crotalus durissus*. A), na recrudescência testicular é possível identificar no epitélio seminífero células germinativas em diferentes fases de desenvolvimento, porém, espermatozoides não estão presentes. B) no pico do desenvolvimento do epitélio seminífero observa-se espermátides alongadas arranjadas na borda adluminal, indicando espermição iminente e espermatozoides no lúmen (\*). C) na regressão testicular o epitélio seminífero apresenta severa redução do seu componente germinativo, sendo observadas vacuolização e apoptose. D) Distribuição de frequência dos três fenótipos (recrudescência, ativo e regressão) observados nos túbulos seminíferos de *C. durissus* coletados nas diferentes estações do ano. \* número entre parenteses representa o número amostral (absoluto) para cada estação. Barra = 100  $\mu$ m.

Tabela 1 - Caracterização do fenótipo testicular em *C. durissus* e definição do n amostral utilizado nas diferentes abordagens realizadas no presente estudo e no tratamento estatístico.

<b>Parâmetros</b>	<b>Recrudescência</b>	<b>Ativo</b>	<b>Regressão</b>	<b>N total</b>
	<b>9</b>	<b>14</b>	<b>16</b>	<b>39</b>
Massa corporal	8	14	16	38
Massa testicular	8	14	16	38
IGS*	8	14	16	38
Histomorfometria	8	14	16	38
Células de Leydig	8	14	16	38
Testosterona	9	13	11	33
PCNA e Caspase-3	9	9	8	26
BrdU**	8	9	1	18
MET***	4	5	7	16

IGS\*, índice gonadossomático; BrdU\*\*, bromodeoxiuridina; MET\*\*\*, microscopia eletrônica de transmissão.

Tabela 2 – Dados biométricos e estereologia testicular em *C. durissus*.

<b>Parâmetro</b>	<b>Recrudescência</b>	<b>Ativo</b>	<b>Regressão</b>
Massa corporal (g)	706,3 ± 508,5	699,6 ± 207,1	605,1 ± 195,9
Massa testicular média (g) <sup>@</sup>	1,24 ± 0,49 <sup>b1</sup>	2,13 ± 0,19 <sup>a</sup>	0,65 ± 0,05 <sup>b</sup>
PLT (g)/VLT (ml) <sup>@</sup>	1,18 ± 0,46 <sup>ab</sup>	2,02 ± 0,18 <sup>a</sup>	0,62 ± 0,04 <sup>b</sup>
IGS	0,32 ± 0,14 <sup>a</sup>	0,61 ± 0,12 <sup>b</sup>	0,22 ± 0,04 <sup>a</sup>
Interstício (ml)**	0,176 ± 0,03	0,172 ± 0,03	0,127 ± 0,001
Túbulo seminífero (ml)**	1,04 ± 1,2 <sup>ab</sup>	1,84 ± 0,6 <sup>a</sup>	0,49 ± 0,04 <sup>b</sup>
Túnica própria (ml)**	0,054 ± 0,03 <sup>ab</sup>	0,074 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,048 ± 0,01 <sup>b</sup>
Epitélio germinativo (ml)***	0,56 ± 0,52	1,12 ± 0,39 <sup>a</sup>	0,19 ± 0,07 <sup>b</sup>
	0,026 ± 0,01	0,029 ± 0,01	0,026 ± 0,008
Célula de Sertoli (ml)**	(4,41%) <sup>#</sup>	(2,54%)	(11,82%)
Epitélio seminífero (ml)***	0,59 ± 0,53	1,14 ± 0,39 <sup>a</sup>	0,22 ± 0,08 <sup>b</sup>
Lúmen (ml)***	0,388 ± 0,69	0,626 ± 0,24 <sup>a</sup>	0,229 ± 0,08 <sup>b</sup>
Tubulo seminífero (%)	82,86 ± 10,52 <sup>a</sup>	91,44 ± 3,48 <sup>b</sup>	78,69 ± 6,58 <sup>a</sup>
Célula de Sertoli (%)	2,99 ± 1,89 <sup>a</sup>	1,493 ± 0,38 <sup>b</sup>	4,329 ± 1,11 <sup>c</sup>

<sup>1</sup> Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas significativas (p < 0,05).

<sup>@</sup> Dados expressos como média ± erro padrão.

# Valores entre parênteses correspondem ao percentual de células de Sertoli relativo ao total de epitélio seminífero.

\*\* ANOVA

\*\*\* teste t Ativo X Regressão

## 5.2. Biometria e estereologia testicular.

A massa corporal dos indivíduos em regressão correspondeu a aproximadamente 83% e 86,5% dos valores obtidos, respectivamente, na recrudescência e no ativo (Tab. 2). De maneira semelhante, a massa testicular média foi menor ( $p < 0,05$ ) na fase de regressão frente o ativo (redução 70%). Contudo, os testículos atingiram o maior volume na fase ativa, sendo observado aumento significativo do compartimento tubular, quando comparado às demais fases (Tab. 2). O volume ocupado pelo epitélio germinativo durante a regressão reduziu a cerca de 20% - 30% ( $0,19 \pm 0,07$  ml) do valor obtido para o mesmo parâmetro nos grupos ativo ( $1,12 \pm 0,4$  ml) e recrudescência ( $0,056 \pm 0,5$  ml; Tab. 2). Não obstante a significativa resposta observada no compartimento tubular, o volume de interstício não variou e foi semelhante entre os grupos (Tab. 2).

## 5.3. Célula de Sertoli

O percentual das células de Sertoli, relativo ao total de túbulos seminíferos, foi significativamente maior nos animais em regressão (Tab. 3), apesar do volume ocupado manter-se constante ( $0,03 \pm 0,01$  ml), ao longo do ciclo anual (Tab. 3). À microscopia de luz, a morfologia nuclear da célula de Sertoli não modificou frente ao estado de atividade testicular, conservando as características típicas observadas nas células maduras, quais sejam: nucléolo tripartido, perfil triangular do núcleo bem como a localização deste junto à membrana basal (Fig. 6 A-C). As invaginações da membrana nuclear foram mais evidentes durante o período de atividade e regressão (Fig. 6B e 6C). Ademais, o volume nuclear médio obtido foi similar entre os grupos investigados (Fig. 6D).

Núcleos de células de Sertoli apresentando cromatina frouxa, tipicamente eucromáticos, foram observados nos testículos em recrudescência, ativos e em regressão (Fig. 6A, 6B e 6C; 7). Além disso, corroborando com os

achados obtidos através da microscopia de luz, as invaginações da membrana nuclear estavam particularmente evidentes durante a fase de espermatogênese ativa (Fig. 6B; 7) e regressão (Fig. 6C; 7).

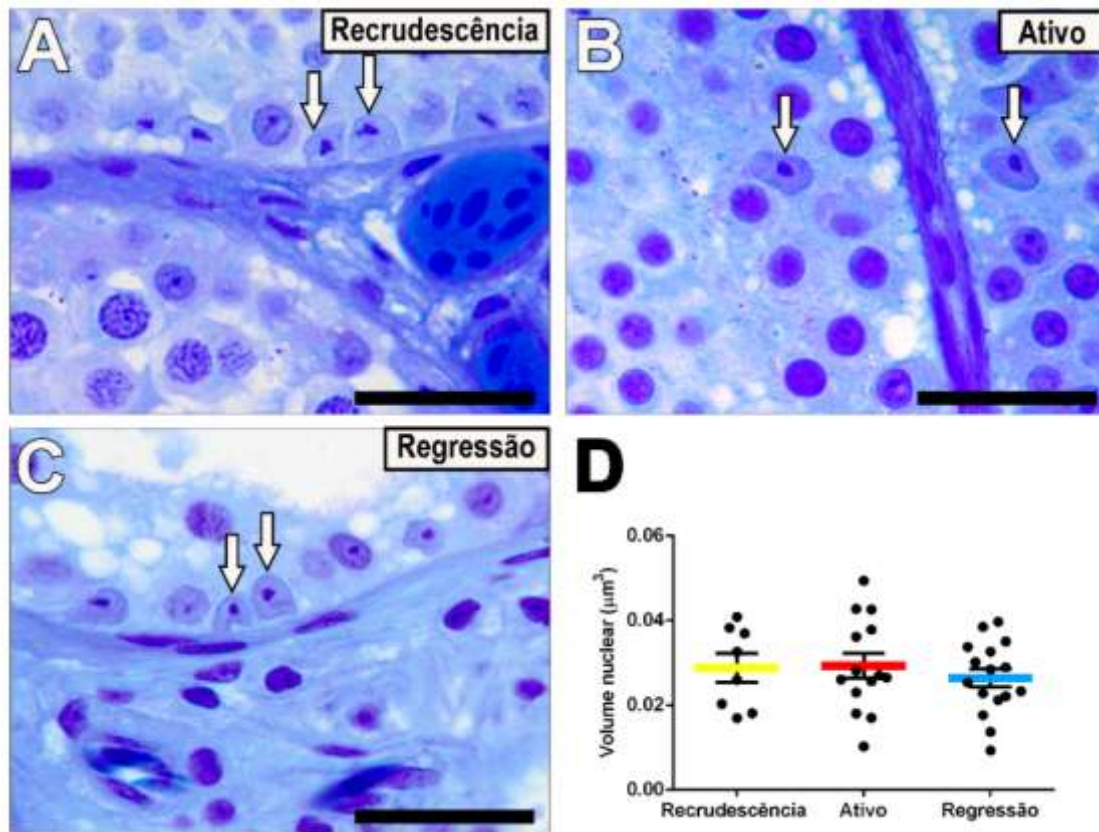


Figura 6: Fotomicrografia do parênquima testicular em diferentes condições de atividade do epitélio seminífero da cascavel, *Crotalus durissus*, com destaque às células de Sertoli e seu volume nuclear. Em todas as fases investigadas (A) recrudescência, (B) ativa e (C) regressão, os núcleos das células de Sertoli (seta branca) encontravam-se, predominantemente, próximo a membrana basal e com o nucléolo evidente. Além dos aspectos morfológicos, o volume nuclear (D) também se manteve semelhante entre os grupos investigados. Barra = 25µm. Coloração: azul de toluidina – borato de sódio.

Entre os componentes do compartimento citoplasmático da célula de Sertoli, mitocôndrias típicas, retículo endoplasmático liso e aparelho de Golgi estavam presentes constitutivamente, sendo observados em todas as fases de atividade testicular (Fig. 7).



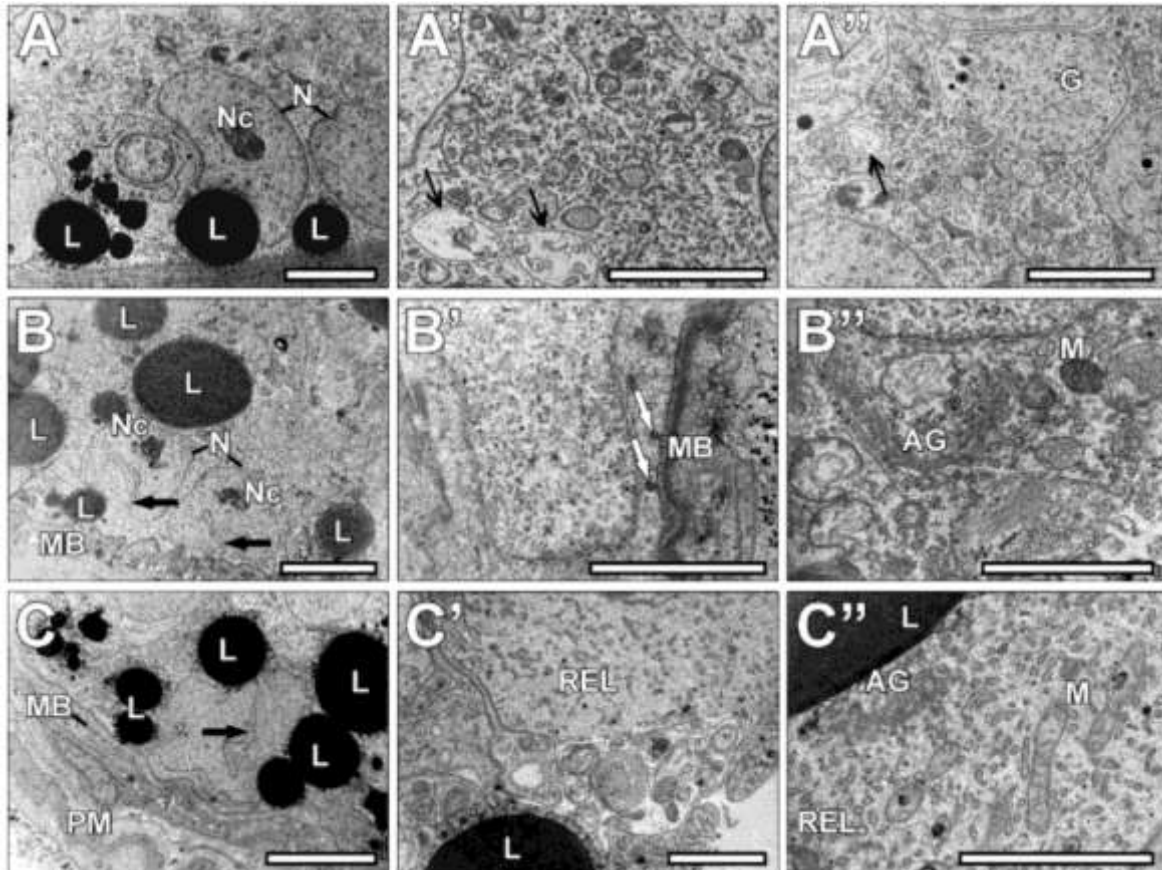


Figura 7: Eletromicroscopia de transmissão do parênquima testicular da cascavel *Crotalus durissus*. (A - A'') durante a recrudescência testicular (A) a célula de Sertoli apresentou gotas lipídicas, (A' e A'') retículo endoplasmático liso e diversos corpos lamelares de diferentes tamanhos. (A'') resíduo do citoplasma de célula germinativa (G) estavam envolvidos pela membrana da célula de Sertoli possivelmente para realizar a digestão celular. (B - B'') no pico da atividade espermatogênica (B) a célula de Sertoli também apresentou gotas lipídicas, (B'') retículo endoplasmático liso, aparelho de Golgi e corpos lamelares. (B') vesículas endocíticas foram observadas a partir da membrana basal para o túbulo seminífero (seta branca). (C - C'') durante a regressão testicular foram observadas as gotas lipídicas, (C', C'') retículo endoplasmático liso, aparelho de Golgi e mitocôndrias foram identificados, (C') assim como nas demais fases do processo reprodutivo, os corpos lamelares, sugestivo de vacúolos digestivos, estiveram presentes, porém, durante a regressão, essas estruturas eram mais frequentes e desenvolvidas, formando enovelado de membrana. (A, B, C) em todas as fases foi possível notar o núcleo eucromático da célula de Sertoli e a localização preferencial, próximo à membrana basal. A invaginação do envoltório nuclear, típica da célula de Sertoli, encontravam-se mais profundas durante o período de atividade e regressão testicular (seta espessa preta). Núcleo das células de Sertoli (N), nucléolo das células de Sertoli (Nc), gotas lipídicas (L), retículo endoplasmático liso (REL), corpos lamelares (setas estreita preta), membrana basal (MB), mitocôndrias (M), aparelho de Golgi (AG), membrana basal (MB), resíduo de célula germinativa (G), vesículas endocíticas (seta branca), peritubular mioide (PM). Barras: A, A', A'', B, C = 5  $\mu\text{m}$ ; B', B'', C'' = 1,5  $\mu\text{m}$ ; C' = 3  $\mu\text{m}$ .

Ainda no citoplasma das células de Sertoli, vesículas com resíduos celulares, corpos lamelares e gotas lipídicas foram encontrados e, apesar de ocorrerem ao longo de todo o ciclo anual, estavam mais evidentes e desenvolvidos durante a regressão da espermatogênese. Neste contexto, a atividade fagocítica da célula de Sertoli foi evidenciada pela presença de prolongamentos de sua membrana, envolvendo células germinativas, apoptóticas ou não, e em diferentes fases de maturação (Fig. 8). Além disso, observou-se que os corpos lamelares apresentavam graus variados de condensação. Assim, estruturas recém-constituídas eram menos eletrondensas, de modo que as camadas sobrepostas eram facilmente individualizadas, lembrando o arranjo típico das folhas escamiformes (Fig. 8). Durante a transição para o estado de maior densidade da gota lipídica foram observados corpos lamelares mistos, nos quais porções mais e menos densas estavam presentes na mesma estrutura (Fig. 8).

Quanto ao envoltório celular, na região correspondente ao polo basal da célula e que se apoia sobre a membrana basal, foram observadas invaginações durante o pico de atividade espermatogênica (Fig. 7B').

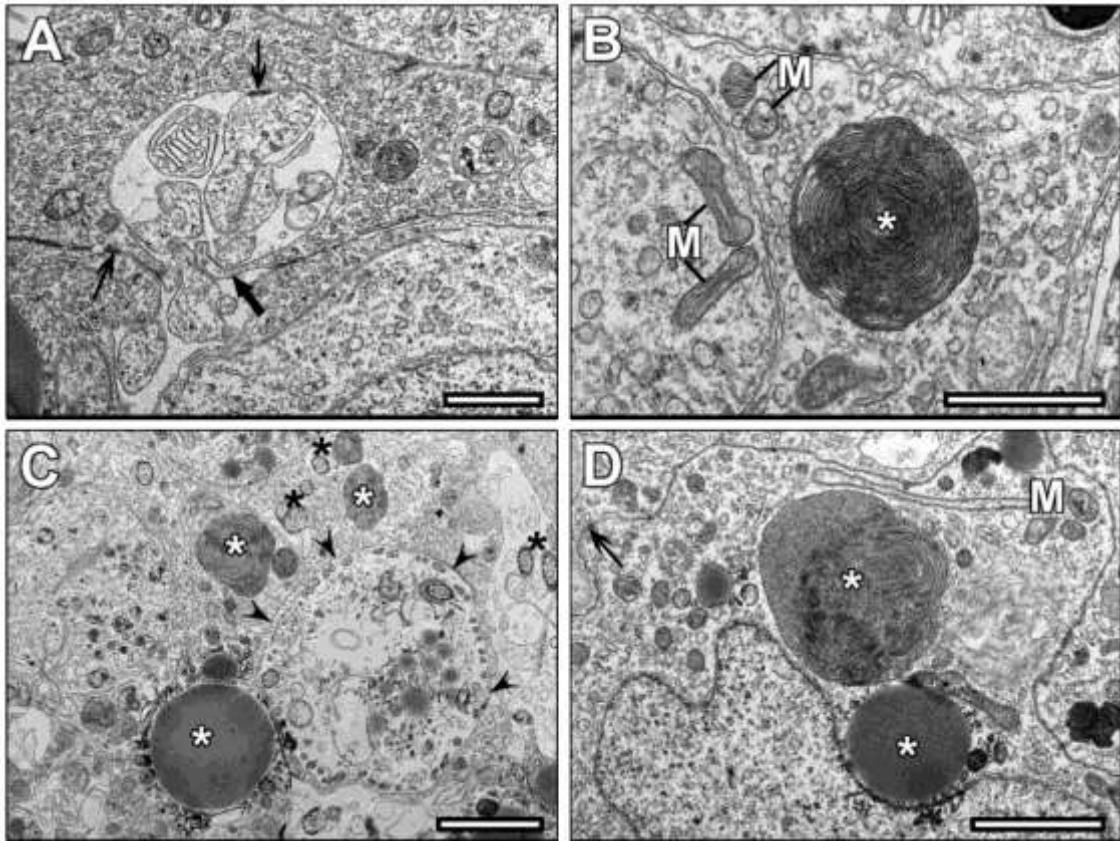


Figura 8: Eletromicroscopia de transmissão do túbulo seminífero em regressão da cascavel *Crotalus durissus*. (A) durante o início da regressão foi observada volumosa fagocitose com conteúdo heterogêneo. Observe a disposição das dobras citoplasmáticas (seta preta espessa) que sugerem uma conversão para fusão da membrana e formação de uma grande vesícula endocítica. Estruturas juncionais estavam presentes tanto entre as membranas das células de Sertoli adjacentes, quanto entre a membrana da célula de Sertoli fagocítica e a membrana da célula fagocitada (seta preta delgada). (B, C e D) a diversidade de tamanho e densidade dos corpos lamelares (asteriscos brancos) foi notória, assim como seu (D) dinamismo fisiológico ao visualizar uma vesícula parte com aspecto homogêneo, parte com aspecto lamelar. A amplitude da dimensão e composição das vesículas de endocitose também se fez notar. (C) dentre as várias vesículas endocíticas apresentadas acima, destacamos uma com grande dimensão, a qual seu limite está indicado pela ponta da seta. A presença de axonemas íntegros (asterisco preto) dentro de vesículas fagocíticas sugere a realização de entose pela célula de Sertoli. Barra: A = 1,5  $\mu\text{m}$ ; B e D = 1  $\mu\text{m}$ , C = 3  $\mu\text{m}$ .

A dinâmica populacional das células de Sertoli, determinada pelo balanço entre proliferação e morte celular, foi investigada por meio da avaliação do índice de células marcadas para Bromodeoxiuridina (BrdU) (Fig. 9A), PCNA (Fig. 9B) e caspase-3 clivada (Fig. 9C). A identificação das células positivas, baseada na morfologia nuclear, revelou marcação para os fatores de proliferação nos períodos de recrudescência e espermatogênese ativa. Assim, na



recrudescência, cerca de  $4,05 \pm 4,8\%$  e  $2,7 \pm 1,28\%$  apresentaram marcação para BrdU e PCNA, respectivamente. No grupo de animais com espermatogênese ativa foram observadas células positivas apenas para PCNA ( $2,06 \pm 1,49\%$ ). Durante as fases de regressão e recrudescência a frequência de células positivas para caspase-3 correspondeu a  $34,7\% \pm 34,11$  e  $30,9\% \pm 28,2$ , respectivamente, enquanto na fase ativa  $2,7\% \pm 3,0$  das células foram positivas para este marcador.

Embora o padrão de marcação dos fatores de proliferação e apoptose tenha variado entre os grupos, o número de células de Sertoli por testículo (Fig. 9D) não apresentou diferença significativa. Assim, os valores obtidos na recrudescência, espermatogênese ativa e regressão foram, respectivamente,  $1,04 \times 10^8 \pm 5,02 \times 10^7$ ;  $1,33 \times 10^8 \pm 7,51 \times 10^7$  e  $1,21 \times 10^8 \pm 4,13 \times 10^7$  células por testículo.

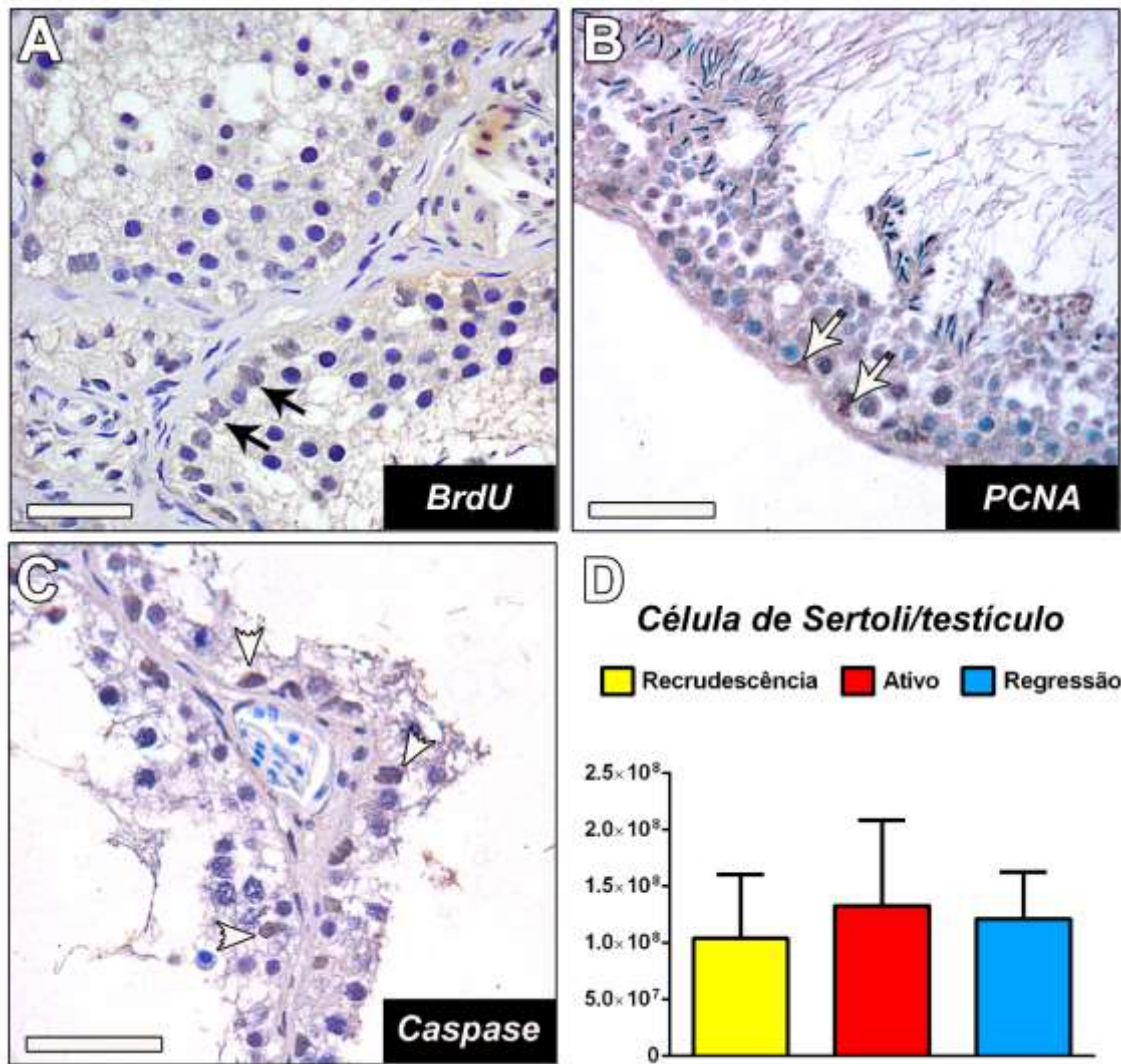


Figura 9: 6Parênquima testicular da cascavel *Crotalus durissus* com células de Sertoli positivas para (A) BrdU (seta preta), (B) PCNA (seta branca) e (C) caspase-3 (cabeça de seta branca), nas fases as quais essas marcações foram mais evidentes. BrdU e PCNA foram utilizados para demonstrar células em proliferação, enquanto que a caspase-3 foi empregada para indicar as células que estavam em processo de apoptose. (D) Apesar da reação positivas para os respectivos marcadores, o número da célula de Sertoli por grama de testículo não variou entre as diferentes fases de atividade testicular. Barra = 50  $\mu$ m

#### 5.4. Compartimento intertubular e células de Leydig

A proporção do compartimento tubular atingiu o maior valor nos animais com espermatogênese ativa ( $91,5 \pm 3,5\%$ ,  $p < 0,05$ ), permanecendo em torno de 80% nos animais em recrudescência ( $82,9 \pm 10,5\%$ ) e regressão ( $78,7 \pm 6,6\%$ ). Diante disso, a diminuição relativa do compartimento intertubular foi significativa nos animais ativos em relação aos demais grupos (Fig. 10A). Apesar deste mesmo comportamento ter sido observado para o percentual de células de Leydig (Fig. 10B), o índice leydigossomático (ILS) apresentou tendência a maior valor no grupo ativo ( $0,16 \pm 0,17\%$ ;  $p = 0,08$ ) frente aos valores obtidos nas fases de recrudescência ( $0,09 \pm 0,11\%$ ) e regressão ( $0,07 \pm 0,05\%$ ).

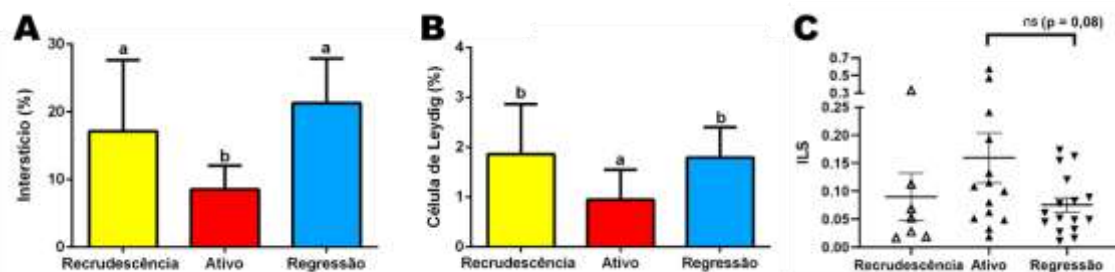


Figura 10: Percentual de interstício (A) e células de Leydig (B) no parênquima testicular. Observe que ambos os parâmetros reduziram significativamente na fase ativa da espermatogênese, como consequência do aumento relativo do compartimento tubular nesta fase. C) ILS, índice leydigossomático indica tendência de maior massa relativa de células de Leydig nos indivíduos com espermatogênese ativa.

O maior diâmetro nuclear da célula de Leydig foi observado no grupo dos animais ativos ( $7,0 \pm 0,09 \mu\text{m}$ ) (Fig. 11 A), sendo observada uma redução gradativa nesse valor na fase de regressão ( $6,7 \pm 0,6 \mu\text{m}$ ) até atingir o menor valor na recrudescência ( $6,2 \pm 0,2 \mu\text{m}$ ). Este mesmo padrão foi observado para o volume nuclear, citoplasmático e individual da célula de Leydig (Fig. 11B). As características morfológicas das células de Leydig, à microscopia de luz foram compatíveis com os dados morfométricos. Assim, o núcleo das células esteroidogênicas apresentaram um perfil arredondado, com nucléolo evidente e nucleoplasma corando sutilmente pelo azul de toluidina. Esta baixa afinidade pelo corante sugere um núcleo eucromático, compatível com células desempenhando alta atividade nuclear (Fig. 11D). Aumento da condensação nuclear e redução global das células de Leydig caracterizaram o fenótipo da

regressão testicular (Fig. 11E). Na recrudescência, as células de Leydig apresentaram área citoplasmática menor associada a morfologia nuclear retornando ao padrão eucromático (Fig. 11C).

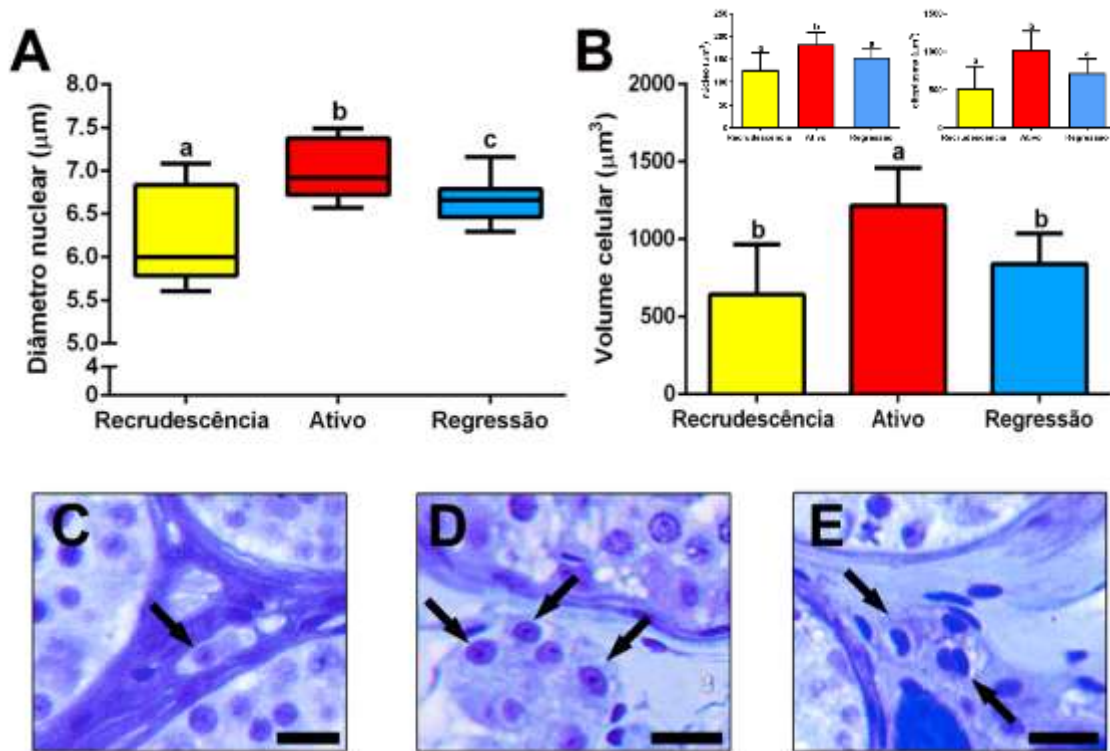


Figura 11: Alterações sazonais das células de Leydig ao longo do ciclo reprodutivo da cascavel *Crotalus durissus*. **A**) diâmetro nuclear encontra-se com valores máximo no período ativo, em seguida as médias reduziram progressivamente até a recrudescência. Padrão semelhante foi observado para **B**) volume celular, nuclear e citoplasmático da célula de Leydig. **C**) durante a recrudescência testicular, a célula de Leydig encontra-se com padrão eucromático, caracterizando função intermediária entre **D**) alta atividade nuclear durante o período ativo e **E**) reduzida atividade nuclear durante a regressão, momento esse que o núcleo se encontra com o perfil heterocromático. Setas pretas indicam o núcleo da célula de Leydig. Os valores apresentados representam a média  $\pm$  desvio padrão. Valores com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). As mesmas letras acima dos valores indicam ausência de diferenças. Foi realizado o teste de comparação múltipla de Tukey. Barra = 15  $\mu\text{m}$ .

Os números de células de Leydig por testículo e por grama de testículo revelaram um aumento da população celular no período da recrudescência (Fig. 11D e E), frente aos valores obtidos para as fases de regressão e ativo, sendo que neste último os valores foram significativamente menores.

A avaliação ultraestrutural demonstrou que durante a recrudescência, o citoplasma da célula de Leydig apresenta quantidade moderada de retículo endoplasmático liso (REL) e mitocôndrias, além de estruturas eletrondensas as quais, de acordo com a característica morfológica, foram identificadas como gotas lipídicas (Figs. 12A, 13A e 13D). Adicionalmente, pontos eletrondensos dispersos no citoplasma foram observados (Fig. 13D). Durante a fase ativa observou-se que o REL estava amplamente distribuído no compartimento citoplasmático, sugerindo maior densidade desta organela associado a uma baixa ocorrência de gotas lipídicas (Fig. 12B, 13B e 13E). Durante a regressão da espermatogênese, as células de Leydig apresentaram em seu citoplasma grandes e frequentes vacúolos (Fig. 12C, 13C e 13F). Nestes, era possível observar resíduos eletrondensos, semelhante àqueles inicialmente identificados nas gotas lipídicas (Fig. 13C).

A função esteroidogênica das células de Leydig durante o ciclo reprodutivo foi preservada, embora a concentração média de testosterona tenha variado significativamente entre os grupos ( $p = 0,0013$ ; Fig. 12F). Assim, os níveis de testosterona começaram a aumentar durante a fase de recrudescência, atingindo o maior valor na fase de espermatogênese ativa, reduzindo significativamente na regressão testicular (Fig. 12F).

A análise de correlação entre parâmetros mensurados da célula de Leydig e os níveis plasmáticos de testosterona revelou um padrão no qual a eficiência quanto à atividade esteroidogênica está mais relacionada à capacidade individual das células de Leydig que com o seu número. Assim, observamos que o volume nuclear e o número de células de Leydig apresentam interação negativa e significativa ( $r = -0,502$ ;  $p = 0,017$ ), sendo também negativa e significativa a correlação entre o percentual de interstício e os níveis plasmáticos de testosterona ( $r = -0,387$ ;  $p = 0,024$ ). Foi identificada forte tendência de relação inversa do volume nuclear ( $r = -0,357$ ;  $p = 0,053$ ) e níveis de testosterona, porém direta entre andrógeno e volume citoplasmático ( $r = 0,335$ ;  $p = 0,061$ ) da célula de Leydig.



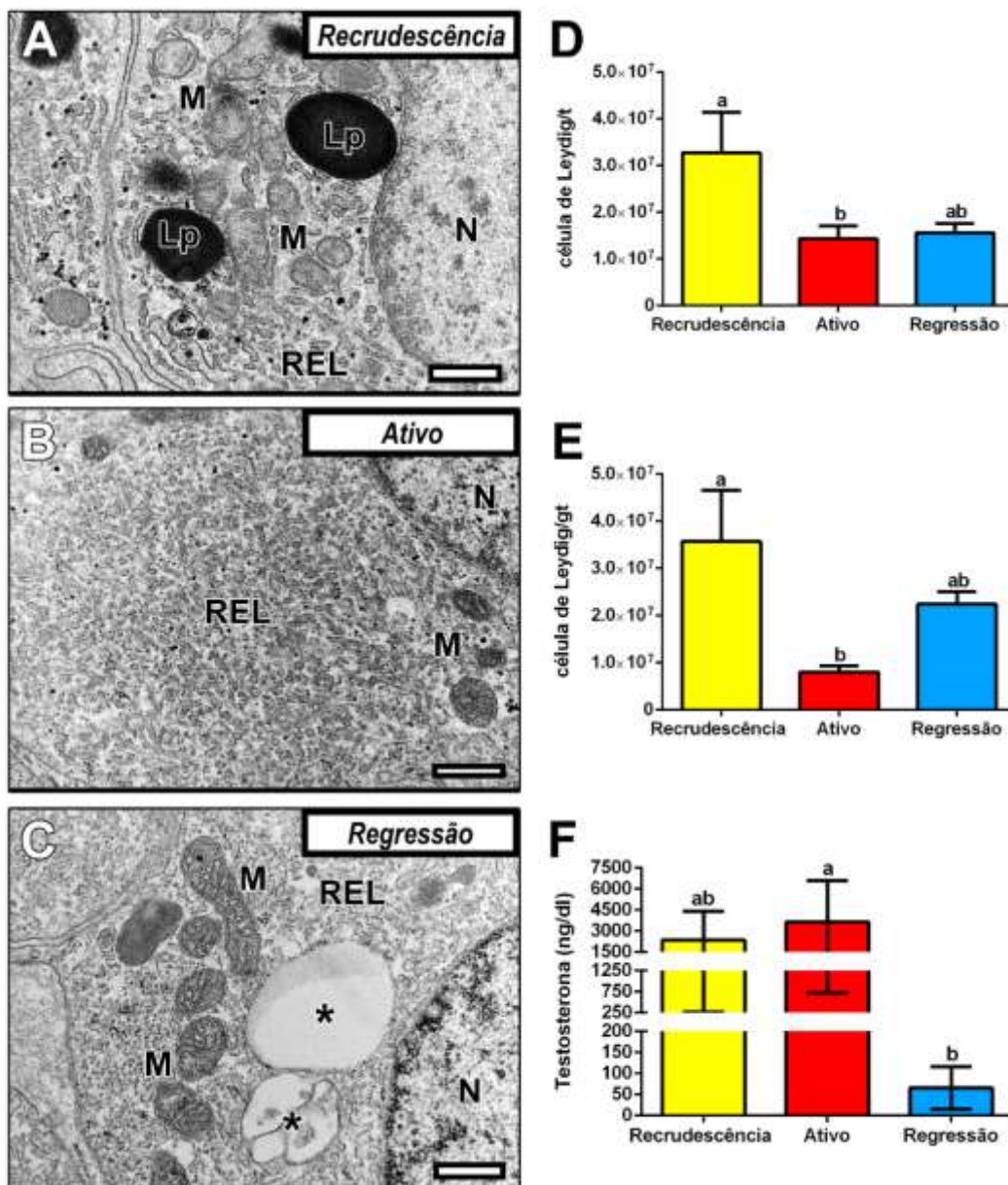


Figura 12: Alterações sazonais da população da célula de Leydig e das suas características fenotípicas na cascavel, *Crotalus durissus*. A microscopia eletrônica de transmissão proporcionou a observação detalhada do citoplasma da célula de Leydig durante o período de **A)** recrudescência, **B)** ativo e **C)** regressão testicular. A) durante a recrudescência a célula apresenta núcleo eucromático, citoplasma contendo retículo endoplasmático liso, mitocôndria e gotas lipídicas. B) durante o período ativo os mesmos elementos citados na fase anterior são encontrados, porém há abundante presença de retículo endoplasmático liso e menor aparência das gotas lipídicas. C) enquanto que no período de regressão a presença de vacúolos no citoplasma chama a atenção (asterisco). Nessa mesma fase o compartimento citoplasmático contém resíduos eletrondensos. **D)** O número de célula de Leydig por testículo e **E)** grama de testículo variou entre as fases testiculares, os quais foram encontrados em maior quantidade durante a recrudescência e menor valor durante o período ativo. **F)** os níveis de testosterona tiveram aumento na recrudescência e atingiu valor máximo na espermatogênese ativa, em seguida, houve redução da concentração plasmática média desse andrógeno durante a regressão da atividade

testicular. Núcleo (N), gotas lipídicas (Lp), mitocôndria (M), retículo endoplasmático liso (REL) e vacúolos citoplasmáticos (asterisco). Os valores apresentados representam a média  $\pm$  desvio padrão. Valores com letras diferentes são significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). As mesmas letras acima dos valores indicam ausência de diferenças. Foi realizado o teste de comparação múltipla de Tukey. Barra = 500 nm

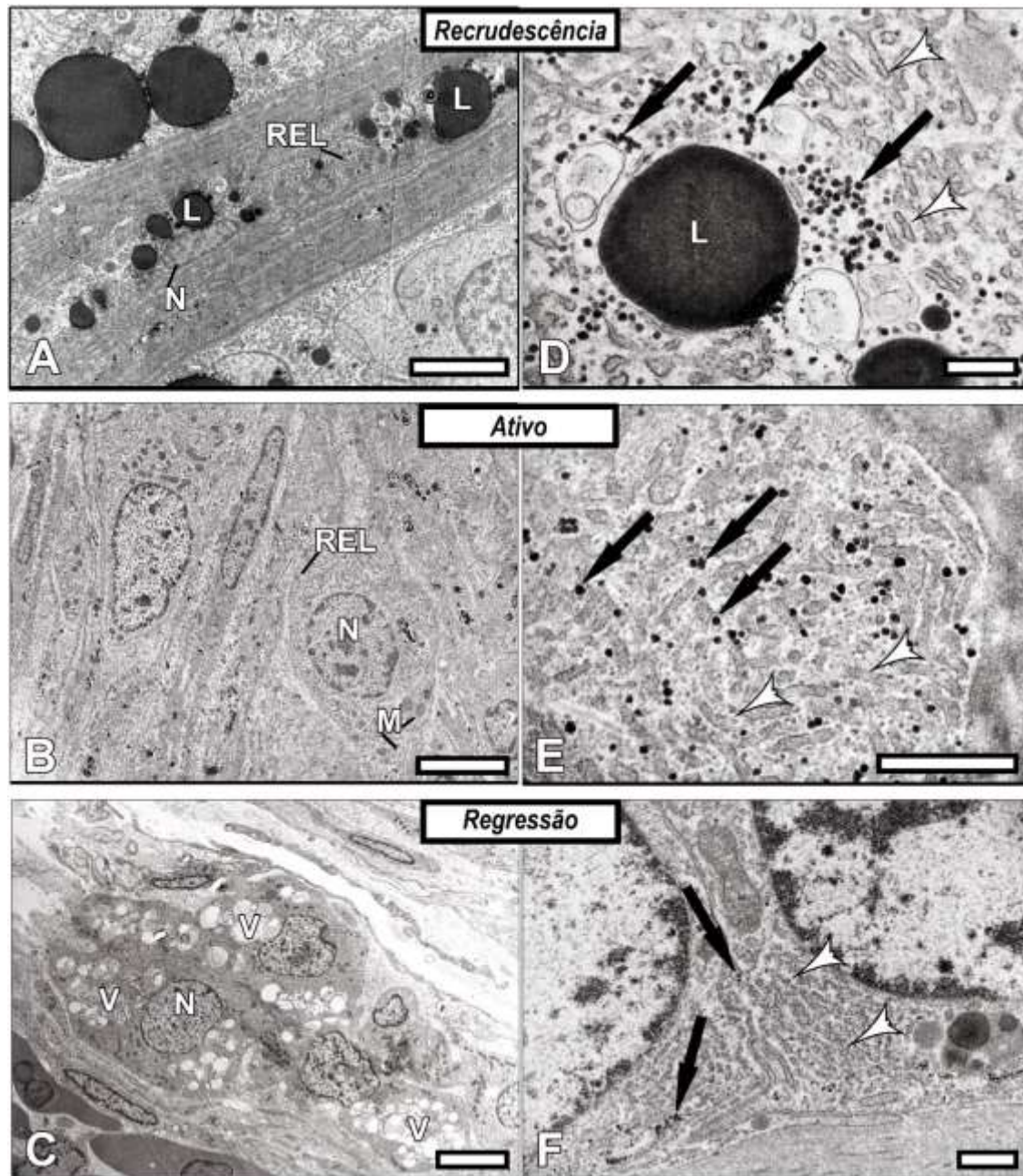


Figura 13: Eletromicrografia de transmissão do compartimento intertubular da cascavel *Crotalus durissus*. **A e D)**, células de Leydig de animais em recrudescência testicular apresentam retículo endoplasmático liso (ponta da seta branca), volumosas gotas lipídicas (L), além de acumulem grânulos eletrondensos (seta preta). **B e E)** em atividade plena as células de Leydig apresentavam o citoplasma preenchido predominantemente por retículo endoplasmático liso, há ainda bastante pontos

eletrondensos. **C** e **F**, durante a regressão testicular observa-se que o retículo endoplasmático liso ainda é predominante no citoplasma, porém nessa fase, os pontos eletrondensos são menos frequentes quando comparado as demais fases. Durante a regressão nota-se grande quantidade de vacúolos citoplasmáticos. Retículo endoplasmático liso, cabeça de seta branca ou REL; seta preta, pontos eletrondensos; gotas lipídicas, L; núcleo, N; mitocôndria, M; vacúolo citoplasmático, V. Barra: A, B, C = 5  $\mu$ m; D e E = 250 nm; F = 500 nm.

Mudanças na população das células de Leydig foram avaliadas através da detecção da atividade proliferativa, por meio de Bromodeoxiuridina (BrdU) e PCNA, ou de morte celular (apoptose, caspase-3). Tanto no período de recrudescência quanto na fase de espermatogênese ativa foram observadas células de Leydig positivas para BrdU e PCNA. Porém, como esperado, a recuperação da espermatogênese traz consigo o aumento da demanda esteroidogênica; logo, durante a recrudescência houve maior número de células de Leydig positivas para os marcadores de proliferação utilizados, BrdU e PCNA. Por outro lado, a morte celular foi observada nas três fases, porém com maior frequência durante a regressão (Fig. 14).



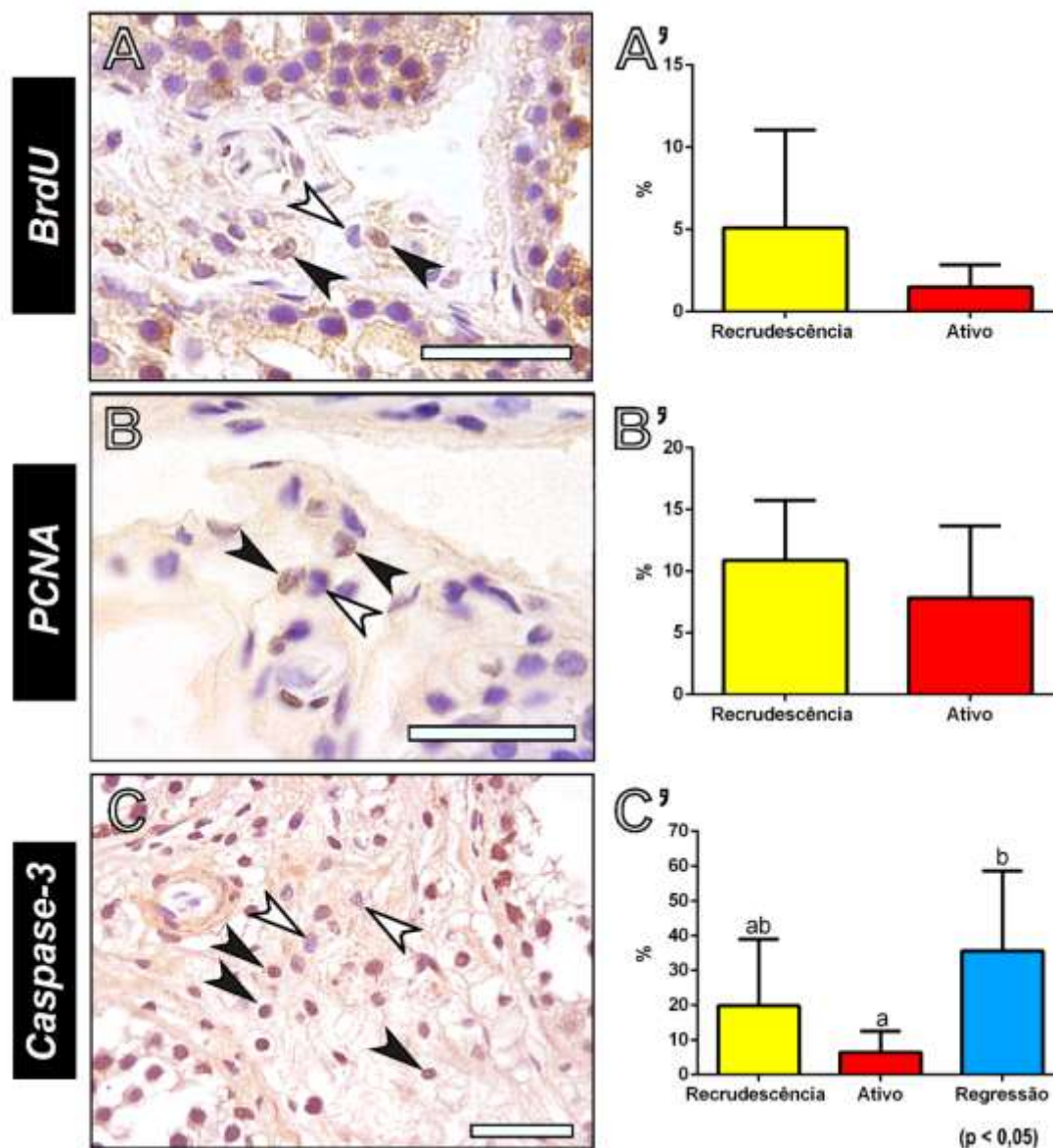


Figura 14: Parênquima testicular da cascavel *Crotalus durissus* com células de Leydig positivas (ponta da seta preta) para (A) BrdU, (B) PCNA e (C) caspase-3, nas fases as quais essas marcações foram mais evidentes, (') e suas respectivas proporções. BrdU e PCNA foram utilizados para demonstrar células em proliferação, enquanto que a caspase-3 foi empregada para indicar as células que estavam em processo de apoptose. Ponta da seta preta células de Leydig positiva para os respectivos marcadores; Ponta da seta branca células de Leydig negativa para os respectivos marcadores. Letras diferentes na mesma linha indicam que houve diferença estatística significativa pelo teste comparação múltipla de Tukey ( $p < 0,05$ ). Dados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Nenhum dos animais que foram tratados com BrdU estava com o testículo totalmente regredido. Barra = 50  $\mu$ m

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Célula de Sertoli

#### 6.1.1. Aspectos morfológicos

Como animais ectotérmicos, os répteis sofrem profundas alterações nos processos fisiológicos e padrões de atividade, particularmente em relação ao ciclo reprodutivo, como resultado da mudança de temperatura, disponibilidade de alimento e fotoperíodo (Santos et al., 2005; Southwood et al., 2006; Williard e Harden, 2011; Carbajal-Márquez et al., 2020). Diante disso, observamos que os indivíduos apresentaram plasticidade fenotípica, no qual os ciclos reprodutivos individuais não progrediram em estreita sincronia, embora tendessem a coincidir em determinados períodos (Pontes, 2007). Dessa forma, no presente estudo, os animais foram agrupados de acordo com a atividade testicular e não por estação do ano, uma vez que no mesmo período foram encontrados espécimes com atividade testicular distintas. Assim, conforme já mencionado anteriormente neste trabalho, de acordo com a organização microscópica do túbulo seminífero de *Crotalus durissus* foi possível definir três fases principais típicas de reprodução sazonal: recrudescência, espermatogênese ativa e regressão. Cada uma das fases condiz com o desenvolvimento do processo reprodutivo já bem descrito na literatura (Almeida-Santos e Salomão, 2002; Resende e Avelar, 2021).

Nas espécies sazonais, as variações na estrutura e densidade volumétrica do túbulo seminífero apontam distintos níveis de trofismo epitelial. Assim, corroborando com nossos achados, o aumento da proporção ocupada pelos túbulos seminíferos durante a fase de produção espermática foi também observado em outras espécies sazonais como hamster (Hikim et al., 1988 a, b), morcego (Costa, 2016), cervo (Hombach-Klonisch et al., 2004), tartaruga (Zhang et al., 2008), serpentes (Gribbins et al., 2008; Matayoshi et al., 2018) e aves (Young et al., 2001) e se deve a massiva renovação e desenvolvimento das células germinativas durante a fase de maior atividade espermatogênica, bem como ao aumento do lúmen tubular. A diminuição relativa da ocupação de célula

de Sertoli no parênquima testicular, assim como no epitélio seminífero, reflete também o aumento da população de células germinativas.

Como já mencionado, a célula de Sertoli suporta, física e fisiologicamente, o desenvolvimento das células germinativas (Russell, 1979; 1980; 1993) e seriam esperadas mudanças na estrutura desta célula somática, determinadas pela adaptação delas às modificações sazonais, principalmente no epitélio seminífero (Dubois et al., 1988; Ueno e Mori, 1990). No entanto, e conforme observado para lagartos (Baccetti et al., 1983; Silveira, 2009), as células de Sertoli de *Crotalus durissus* apresentaram adaptações morfológicas sutis, dentre essas estavam associadas a ocorrência da endentação típica da membrana nuclear. Como observado no presente estudo, a posição do núcleo no polo basal da célula, portanto próximo à membrana basal, é uma característica presente em várias espécies de mamíferos (Russell, 1993), assim como em diversos répteis (Baccetti et al., 1983; 1998; Röhl e Von-During, 2008). Porém, na serpente *Eryx jayakarki* o núcleo pode ser encontrado próximo ao polo apical da célula de Sertoli (Al-Dokhi et al., 2004).

Dobramentos na membrana nuclear, nucléolo evidente e predominância de eucromatina caracterizaram os núcleos da célula de Sertoli. Durante a regressão, núcleos irregulares com profundas invaginações na membrana podem estar associados ao aumento da demanda de transporte entre o núcleo e o citoplasma dada a intensa atividade fagocítica das células de Sertoli. Característica semelhante é observada durante a espermatogênese ativa, porém justificada pela diversidade de demanda para atender as diferentes células germinativas em proliferação e diferenciação. Por outro lado, durante a recrudescência o núcleo, geralmente com ausência de invaginações, pode ser um indicativo de desdiferenciação celular ou baixa demanda metabólica, haja vista a menor diversidade de células germinativas nesse período. Padrão semelhante foi descrito para a tartaruga pintada, *Chrysemys picta* (Dubois et al., 1988). Apesar das funções pouco esclarecidas das invaginações da membrana nuclear, o surgimento destas corresponde a um marcador morfofuncional de maturação das células de Sertoli (Dym, 1973), estando ausentes nas células imaturas, antes do estabelecimento da puberdade; após a destruição das células

germinativas e, em pacientes com fertilidade comprometida (Schulze et al., 1976; Mora, 1998; Nistal et al., 1998; Hess e França, 2005 ).

A avaliação ultraestrutural do compartimento citoplasmático mostrou que retículo endoplasmático liso, mitocôndrias, aparelho de Golgi e corpos lamelares, possivelmente corpúsculos digestivos, estavam presentes em todas as fases. Entretanto, no período de regressão do epitélio seminífero, estas estruturas lamelares eram frequentes e desenvolvidas, com conteúdo heterogêneo remanescente de corpos residuais fagocitados pelas células de Sertoli. Assim, a presença de grandes corpos digestivos durante esse período de regressão é frequentemente observada em animais sazonais (Callard et al., 1976; Dubois et al., 1988; Brun et al., 2001; Pelletier, 2011).

Como já referenciado, dentre as múltiplas funções desempenhadas pela célula de Sertoli está o suporte nutricional para garantir o sucesso da espermatogênese (Griswold, 1998; Shi et al., 2018). Para tanto, a demanda energética da célula de Sertoli é cinco vezes maior que as células intersticiais (Xiong et al., 2009) e a capacidade de produção de colesterol é insuficiente para manter o processo germinativo (Nakanishi e Shiratshuchi, 2004). É reconhecido ainda que a célula Sertoli de *Crotalus durissus* possui suprimento energético flutuante entre escassez e excesso, porém, ela possui a grande vantagem funcional de armazenar energia em corpos lipídicos (Nakanishi e Shiratshuchi, 2004). Estrutura essa que também desempenha vários papéis, incluindo tráfego de membrana, reciclagem de fosfolipídeos, metabolismo de proteína intracelular, sinalização e proteção celular, ao sequestrar compostos tóxicos inerentes do metabolismo lipídico (Wältermann et al., 2005; Murphy et al., 2008; Farese e Walther, 2009; Olofsson, 2009; Rowan-Carvall et al., 2013; Henne et al., 2018; De Carvalho e Caramujo, 2018). A formação de corpos lipídicos pode ser por meio do retículo endoplasmático ou através de fonte exógena por processos de endocitose e autofagia (Farese e Walther, 2009; Thiam et al., 2013). Dessa forma, as células inviáveis ou cuja viabilidade estará comprometida, mediante redução de fatores extrínsecos, são usadas como fonte de energia, o que lhes conferem o significado de a maioria das células espermatogênicas sofrer apoptose durante a espermatogênese (Xiong et al., 2009).

Assim, devido à alta demanda energética para manutenção da gametogênese masculina, as células de Sertoli obtêm muitos fatores necessários para espermatogênese, principalmente os lipídios, por meio da fagocitose e reciclagem de célula germinativa apoptótica (Nakanishi e Shiratshuchi, 2004) e entótica, armazenadas em gotículas lipídicas até a requisição de demanda energética (Pelletier, 2011). Dessa forma, a célula de Sertoli obtém e armazena lipídios necessários para suportar a espermatogênese de acordo com a oportunidade sazonal. Tal afirmativa foi notada através do registro sequencial da predominância do processo fagocítico, corpos lamelares e gotas lipídicas, respectivamente. A presença de volumosas estruturas endocitadas e corpos lamelares durante a regressão; assim como gotas lipídicas na recrudescência e espermatogênese ativa, sugere que a reciclagem de resíduos das células germinativas, o armazenamento e utilização dos conteúdos das vesículas lipídicas são processos sucessivos. O dinamismo entre regressão testicular, processos entóticos e formação de corpos lipídicos foi notado por Xiong e colaboradores (2009).

Ainda sobre o processo de internalização realizado pela célula de Sertoli, dois aspectos chamaram atenção: 1) a organização multilamelar dos vacúolos e, 2) presença de espermátides alongadas ainda com o axonema do flagelo visivelmente íntegro dentro de uma grande vesícula endocítica. O primeiro claramente se assemelhava ao que poderia tratar-se da endocitose gradual das células germinativas e corpos residuais. O segundo, sugere um mecanismo de morte celular programada, independente de caspase e não autofágica (Martins et al., 2017), que consiste na internalização de células ainda viáveis, mas que devido à ausência de um microambiente favorável, são destinadas à morte celular. Portanto, este mecanismo conhecido como entose e que ocorre em condições patológicas e fisiológicas (Florey et al., 2010; Krajcovic et al., 2011; Ahmed et al., 2017), foi registrado em nosso estudo. Corroborando nossa hipótese, foi demonstrado que espermatozoides de *Pelodiscus sinensis* são eficientemente removidos pelas células de Sertoli por meio desse mecanismo de morte celular (Ahmed et al., 2017; Chen et al., 2020). Assim, tomando como referência os protocolos desenvolvidos por Ahmed e colaboradores, estudos em andamento possibilitarão melhor caracterizar este evento em *Crotalus durissus*.

### 6.1.2. Proliferação e morte das células de Sertoli

Convencionalmente, a população de células de Sertoli adultas é considerada estável e resistente a estímulos capazes de induzir a morte em outros tipos de células testiculares (Steinberger e Steinberger, 1977; Tanaka e Yasuda, 1980; De Kretser e Kerr, 1994; Pudney, 1995; Sharpe et al., 2003). Nesse contexto, em espécies não-sazonais, a atividade proliferativa das células de Sertoli predomina em duas fases distintas do desenvolvimento testicular, sendo a primeira relacionada ao período perinatal (pré e pós-natal) e mais tarde, antes do estabelecimento da puberdade (Sharpe et al., 2003). Concomitante ao estabelecimento da puberdade, as células de Sertoli passam por mudanças morfofuncionais que, em detrimento de sua proliferação, as adaptam para a manutenção das células germinativas em diferenciação, durante a espermatogênese. No entanto, em condições experimentais *in vitro*, foi demonstrado que células de Sertoli maduras são capazes de retornar ao seu estado proliferativo (Hayrabedian et al., 2012), desafiando o conceito de “célula terminalmente diferenciada” até então utilizado para definir estas células somáticas. Reforçando estes achados, estudos *in vivo* identificaram células de Sertoli em proliferação na região de transição dos túbulos seminíferos com a rede testicular de ratos sexualmente maduros (Figueiredo et al., 2016).

Para as espécies de amniotas sazonais, os questionamentos envolvendo o comportamento das células de Sertoli frente às fases de recrudescência, atividade espermatogênica e regressão obtiveram repostas variadas ao longo dos últimos anos. Nesse contexto, alguns trabalhos indicaram que o número de células de Sertoli permanece conservado nas diferentes fases de atividade testicular, não havendo perdas quantitativas ao longo do ciclo sazonal (Dadhich et al., 2010). Outros autores, entretanto, mostraram a ocorrência de apoptose e proliferação das células de Sertoli em diferentes fases da regressão e recrudescência. Portanto, aspecto importante e que atrai a atenção é o fato de não haver um padrão único associado às espécies sazonais. Variações significativas no número de células de Sertoli foram relatadas em espécies de aves sazonais (Young e Nelson, 2001; Islam et al., 2012), em

equinos (Johnson et al., 2008), hamster djungarian (Tarulli et al., 2006) e mais recentemente, no hamster sírio (Martínez-Hernandez et al. 2020).

No presente estudo identificamos células com marcação positiva para os fatores de proliferação e apoptose, e de acordo com a caracterização morfológica, estas foram classificadas como células de Sertoli. Contudo, o percentual de aproximadamente 30% de células positivas para a caspase-3 nas fases de recrudescência e regressão chamou-nos a atenção, uma vez que o número de células de Sertoli, apesar da sutil redução durante estas mesmas fases, não refletiu perdas significativas ao longo do ciclo anual. Nesse contexto, a seguinte hipótese foi criada: a ausência de estreita sincronia das atividades testiculares entre os indivíduos contribuiu para o grande desvio da média quanto ao número da célula de Sertoli em cada fase testicular. Essa afirmativa é corroborada pela tendência de correspondência entre as análises quanto ao número de células positivas para caspase-3 e número de células no testículo, na qual a intensa marcação para apoptose durante a regressão testicular, levou ao menor número de células na fase seguinte, recrudescência, momento esse coincidente para proliferação da célula de Sertoli para suportar a espermatogênese.

Outro importante questionamento que permanece é sobre a dinâmica envolvida no processo de morte celular. Assim, nos trabalhos nos quais houve diminuição do número de células de Sertoli, não está claro se os mecanismos que medeiam esses eventos estariam atuando diretamente na célula de Sertoli ou ainda, de modo indireto, uma vez que as interações entre células germinativas e células de Sertoli bem como destas com as células de Leydig são fundamentais para a manutenção da homeostase testicular. Nesse sentido podemos sugerir que a apoptose de células de Sertoli durante a regressão testicular seria uma estratégia desenvolvida para uma perda massiva de células germinativas, sendo mais eficiente que a apoptose direcionada exclusivamente para estas células (Young e Nelson, 2001), uma vez considerada a importância das células somáticas para a sobrevivência das germinativas. Em um outro aspecto, a morte da célula de Sertoli durante a recrudescência poderia refletir uma possível competição entre as próprias células somáticas por um suprimento limitado de sinais de sobrevivência (Jenkins et al., 2007). Adicionalmente, foi observada

ausência de multiplicação compensatória à apoptose. A baixa porcentagem de células de Sertoli positivas para os marcadores de proliferação leva a conjecturar sobre a existência de um breve momento, uma “janela de proliferação” dessa célula, na qual, poucos indivíduos coletados encontravam-se nela. Ainda, a detecção de proliferação por meio do BrdU baseia-se na característica dessa molécula de se incorporar ao DNA da célula durante a fase de síntese do ciclo celular. Para a detecção de BrdU é necessária uma exposição prévia de pelo menos uma hora antes coleta das amostras. Diante disso, no presente estudo foi observado um intervalo mínimo de quatro horas entre a injeção e eutanásia. Apesar de termos considerado os terços inicial e médio do inverno para o estudo com BrdU, por se tratar da estação onde normalmente se concentram os indivíduos em regressão testicular, nenhum dos animais encontrava-se com o testículo totalmente regredido. Estes indivíduos foram classificados em recrudescência, mediante avaliação da histologia testicular. A ausência de marcação pelo BrdU nas células de Sertoli durante a espermatogênese ativa está associada ao fato que nesta fase a célula está comprometida com a manutenção da espermatogênese. Por outro lado, PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) atua como fator regulador da enzima DNA polimerase  $\delta$ , sendo também associado com outros processos vitais para a função celular, tais como remodelação da cromatina, reparo de DNA e controle do ciclo celular (Maga e Hubscher, 2003; González-Magaña e Blanco, 2020). Portanto, PCNA está presente de maneira constitutiva no núcleo das células, e diferentemente do BrdU, não depende de vias extrínsecas. Assim, células de Sertoli positivas para PCNA, igualmente distribuídas nas fases de recrudescência e espermatogênese ativa podem sugerir a participação desta proteína modulando a atividade nuclear embora não diretamente associada à proliferação destas células somáticas (González-Magaña e Blanco, 2020).

Nesse contexto, é importante ressaltar que a identificação da célula de Sertoli por meio da expressão de marcadores específicos, tais como vimentina, receptor de andrógeno, GATA4, SOX-9, AMH e conexina, em associação às características morfológicas clássicas, foi exaustivamente testada no presente estudo. Nosso objetivo era desenvolver duplas marcações para caracterizar as células de Sertoli em proliferação ou em apoptose. Entretanto, atribuímos à



possível baixa homologia entre as sequências dos anticorpos utilizados (produzidos em espécies de mamíferos) e a proteínas de *C. durissus*, a ausência de marcação. Apesar de não haver registro nos bancos de dados quanto às sequências proteicas de *C. durissus* que sejam de nosso interesse, ainda é nosso objetivo realizar essa abordagem, buscando testar anticorpos de origens diversas.

Em répteis, tem-se assumido que a população de células de Sertoli é permanente e estável ao longo do ciclo anual (Pudney, 1995; Hernández-Franyutti e Uribe, 2012). Contudo, até o presente, não há registros de estudos detalhados que possibilitem confirmar ou negar essa afirmativa. Portanto, nossos resultados, embora ainda preliminares, indicam que as células de Sertoli *Crotalus durissus* sofrem influência sazonal, registrada através das sutis alterações em sua morfologia, mas sobretudo por meio da díade morte/proliferação, conforme demonstrado no presente trabalho. Diante deste novo cenário, e à luz dos nossos achados, o conceito de estabilidade, utilizado até o momento para caracterizar a população da célula de Sertoli em cascavéis, deve ser reavaliado.

## **6.2. Célula de Leydig**

### **6.2.1. Aspectos morfológicos**

Em nosso trabalho, os machos apresentavam sinais de sazonalidade reprodutiva, com aumento gradativo do índice gonadossomático (IGS) na recrudescência e valor máximo observado na espermatogênese ativa. Seguido pela redução do IGS durante a regressão da atividade espermatogênica. Essas observações assemelham-se a estudos anteriores sobre *Crotalus durissus* (Almeida-Santos et al., 2004; Marinho, 2007; Resende e Avelar, 2021). Devido o IGS estar associado a atividade testicular, quanto maior a produção espermática, maior o IGS, sendo o contrário também verdadeiro. A relação direta entre atividade testicular e IGS é frequentemente registrada em outros animais sazonais, inclusive representantes da ordem Squamata, como serpentes (Gribbins e Rheubert, 2011; Rojas et al., 2013; Safdarian et al., 2016; Bisneto e Kaefer, 2019) e lagarto (Al-Amri et al., 2013). Assim, os valores IGS ajudam a

inferir sobre as possíveis variações nas condições fisiológicas das espécies ao longo do ciclo reprodutivo e até mesmo ao longo da vida (Kreiner et al., 2001; Braga, 2005), porém deve-se utilizar de outras ferramentas para confirmar a atividade testicular. Corroborando com estes achados, encontramos correlação de média complexidade, porém, positiva e significativa da concentração de testosterona ( $r = 0,379$ ;  $p = 0,039$ ), e negativa e significativa do percentual de CL-caspase positiva ( $r = - 0,445$ ;  $p = 0,034$ ) com IGS para cascavéis.

Em muitos vertebrados, o nível plasmático de andrógeno reflete as demandas das estruturas sexuais acessórias e atividade gonadal (Bishop, 1959; Crews, 1984; Licht, 1984). Assim, as mudanças sazonais dessas estruturas reprodutivas acontecem em resposta aos andrógenos circulantes, que por sua vez, são estimulados por condições ambientais. Em nosso estudo, a concentração periférica de andrógeno é menor durante a regressão testicular, mas aumenta progressivamente durante a recrudescência testicular, até atingir os níveis mais elevados concomitante ao ápice da atividade espermatogênica. Embora os níveis periféricos de andrógenos sejam excelentes indicativos dos níveis intratesticulares, em ratos a espermatogênese ainda acontece após severa redução da testosterona local (Zirkin et al., 1989), no entanto, a dependência aos andrógenos durante a fase espermiogênica e nos estádios da espermição é determinada pelo aumento da expressão de seus receptores pelas células de Sertoli (Lance, 1984; Sharpe, 1994).

Dessa forma, nossos resultados sugerem que nas cascavéis, assim como ocorre em outros viperídeos, a concentração de testosterona é um fator limitante para o sucesso espermatogênico (Wingfield et al., 1990; Schuett et al., 1997; Almeida-Santos e Salomão, 2002; Graham et al., 2008; Lind et al., 2010). Em nosso estudo, a relação entre testosterona e produção espermática é percebida pela concomitância temporal entre os maiores valores desse andrógeno e a recomposição completa do epitélio seminífero. Paradoxalmente, no outono, período em que foi coletado parte dos animais em regressão, são relatados os comportamentos que definem a época de acasalamento, tais como corte, defesa de território, busca pela fêmea e cópula (Almeida-Santos et al., 1990; 1999). A associação da testosterona com o comportamento de acasalamento figurado pelos machos está relacionada aos níveis ainda altos desse hormônio, exibidos

por alguns animais e conforme foi demonstrado em outros estudos (Almeida-Santos et al., 1990; 1999). De fato, a ampla variação individual para o parâmetro testosterona durante a fase de regressão, observada no presente estudo, corrobora o comportamento social relacionado ao acasalamento classicamente descrito para espécie.

A redução da atividade da célula de Leydig é um dos fatores que causam a regressão gonadal, principalmente revelado pela redução do peso testicular, em consequência do bloqueio meiótico e redução de fatores fundamentais para a manutenção da espermatogênese (Lance, 1984; Vieira et al., 2001; Khan e Rai, 2005; Boretto et al., 2010). Em nosso estudo, as mudanças sazonais na morfologia das células de Leydig coincidem com a atividade espermatogênica, verificada pela hipertrofia celular, refletindo o aumento dos volumes do núcleo, citoplasma e individual, observado na fase de maior produção espermática. Dados semelhantes foram encontrados em outros animais sazonais, como répteis, aves e mamíferos (Leceta et al., 1982; Komatsu et al., 1997; Tsubota et al., 1997; Johnson e Thompson, 2004; Hayakawa et al., 2010; Boretto et al., 2010; Villagran-Santa Cruz et al., 2014; Islam et al., 2015; Hussin et al., 2018). Adicionalmente, o retículo endoplasmático liso (REL), organela onde ocorrem etapas fundamentais para a síntese dos hormônios esteroides sexuais, ocupou amplamente o citoplasma das células de Leydig da fase ativa, corroborando a tendência observada no presente estudo, que correlaciona positivamente volume citoplasmático e níveis de testosterona. De maneira semelhante, durante o período reprodutivo do lagarto *Sceloporus mucronatus* foi constatado a hipertrofia citoplasmática e nuclear, além do aumento de inclusões lipídicas nas células de Leydig. Por outro lado, na fase de inatividade reprodutiva, o núcleo e citoplasma estavam hipotróficos e o material lipídico em seu citoplasma estava reduzido (Villagran-Santa Cruz et al., 2014). Logo, a variação na atividade das células de Leydig tem sido associada a alterações sazonais do epitélio seminífero e comportamentos reprodutivos (Shivanandappa e Sarkar, 1979; Leceta et al., 1982; Islam et al., 2015; Jiménez et al., 2015; Hussin et al., 2018).

A resposta de hiperplasia de células de Leydig observada nos animais em recrudescência sugere a tentativa de recuperação ou manutenção dos níveis dos esteroides sexuais, que se encontravam reduzidos na fase de regressão. A

demanda emergente de células germinativas avançando na espermatogênese, conforme caracterizado pela citoarquitetura do epitélio seminífero, corresponde ao estímulo (direto ou indireto), que determinará a predominância dos fatores de proliferação sobre os de morte, que se distinguiram durante a regressão. Portanto, células menores individualmente, mas em maior quantidade, caracterizaram as células de Leydig na fase de recrudescência. Este comportamento já foi descrito em outras espécies de amniotas, particularmente em ratos portadores de diabetes mellitus tipo 2, em resposta a fase aguda da doença (Cardoso, 2021) e em diferentes modelos de camundongos, nos quais a esteroidogênese se desenvolve de maneira subnormal (Auharek et al., 2012; Oliveira et al., 2020; Gonçalves et al., 2021).

#### 6.2.2. Proliferação e morte de células de Leydig

Nossos resultados mostram a interação entre morte da célula de Leydig por apoptose e as reduções das concentrações plasmáticas de testosterona ( $r = -0,398$ ;  $p = 0,049$ ) e IGS ( $r = -0,445$ ;  $p = 0,034$ ) durante a regressão. No entanto, uma dinâmica cíclica pode ser observada, uma vez que nas fases de recrudescência e atividade plena, observamos células em proliferação no compartimento intertubular. Conforme já mencionado, a atividade proliferativa das células tronco/progenitoras de Leydig no interstício de cascavéis parece ser modulada pelo crescente suporte exigido para a manutenção da espermatogênese. Assim, para produção de andrógenos, o estímulo produzido pela ação do hormônio luteinizante (LH) sobre as células de Leydig maduras também é responsável por promover a proliferação das células progenitoras de Leydig, resultando no aumento desta população celular. Portanto, a correlação encontrada entre a taxa de proliferação por PCNA e testosterona ( $r = 0,989$ ;  $p = 0,03$ ) indica relação direta e significativa entre estas variáveis. Ademais, as células que apresentavam menor volume nuclear eram também aquelas positivas para PCNA. Esse comportamento, denotando equilíbrio entre a taxa de recrutamento e apoptose de célula de Leydig, foi demonstrado para hamster adulto (Johnson et al., 1987), assim como foi observado maior número de células de Leydig durante o período reprodutivo do cavalo, cão, lagarto e corvo (Johnson e Thompson 2004; Villagran-Santa Cruz et al. 2014; Islam et al., 2015; Hussin et

al., 2018). Cabe destacar que essa alteração populacional da célula de Leydig não é regra em animais com reprodução sazonal. Assim, em *Sturnus vulgaris* (Linnaeus, 1758), uma ave europeia com reprodução sazonal, foram observadas apoptoses de células germinativas e de Sertoli, mas não em Leydig (Young et al., 2005).

A atividade esteroidogênica das células tem sido caracterizada por estudos ultraestruturais que identificam o desenvolvimento acentuado do retículo endoplasmático liso, presença abundante de mitocôndrias com cristas tubulares e redução de gotas lipídicas citoplasmáticas (Ferreira e Dolder, 2003; Chung, 2008). A presença de corpos osmiofílicos densos, sugestivo de glicogênio, também é indicada como estrutura frequente em células em plena atividade esteroidogênica (Colombo e Burighel, 1974). Nesse sentido, conforme mencionado previamente, o estudo ultraestrutural das células de Leydig de *C. durissus* nos possibilitou relacionar a ocorrência de REL aos níveis periféricos de andrógenos. A maior concentração de REL no citoplasma das células de Leydig corrobora nossos achados quanto a importância da maquinaria celular necessária para a produção de andrógenos. Além disso, foi observado nos indivíduos em regressão que as gotas lipídicas foram substituídas por vacúolos, sugerindo a redução dos substratos para síntese hormonal e assim, refletindo na diminuição da testosterona. Nenhuma modificação foi observada quando a morfologia das mitocôndrias nas diferentes fases investigadas. Corroborando com a demanda energética das células de Leydig para desenvolver a atividade esteroidogênica, os grânulos eletrondensos presentes no citoplasma e descritos no presente estudo, sugerem a presença de glicogênio, haja vista a maior frequência destes durante a recrudescência e pico da atividade espermatogênica, em detrimento da fase de regressão, na qual esses grânulos foram poucos observados. Assim, essa associação entre maior atividade esteroidogênica e os grânulos de glicogênio, conforme sugerido neste trabalho, embora esperada (Russo, 1970), indica que se trata de um processo muito conservado entre os diferentes grupos filogeneticamente distantes.

## 7. CONCLUSÃO

De acordo com nossos achados podemos sugerir que as células de Sertoli e as células de Leydig de cascavéis respondem de maneira cíclica às condições sazonais, embora não estejam claros os mecanismos que determinam o início destes eventos. Além disso, a célula de Sertoli desta espécie parece manter a homeostase do epitélio seminífero não só por meio da fagocitose de corpos residuais e células apoptóticas, mas também por meio de um mecanismo de morte celular recém atribuído a essa célula somática, conhecido por entose. Acreditamos que a célula de Sertoli desempenha a rápida remoção de células germinativas apoptóticas e entóticas durante a regressão e que os subprodutos lipídicos desse processo são armazenados em corpos lipídicos, para garantir a nutrição do compartimento tubular de acordo com a demanda sazonal, assim como se proteger da lipotoxicidade celular que o mesmo processo pode fornecer diante da grande digestão celular durante a regressão.

Para alcançar a homeostase diante das flutuações sazonais dos fatores bióticos e abióticos, *Crotalus durissus* sofre alterações na síntese de andrógenos, associada a modificações da morfologia e composição da organização da célula de Leydig, assim como sua população. Nesse contexto, é importante investigar as relações de causa e efeito desencadeado por essas variações, inclusive na resposta positiva das células progenitoras aos andrógenos, os quais estimulam sua proliferação. Além disso ainda permanece para ser esclarecido como se dão as interações entre os compartimentos intertubular e tubular quanto a regulação da atividade e população das células de Leydig nesta espécie de serpente Neotropical.

## 8. REFERÊNCIA

- Abramoff MD, Magalhães PJ, Ram, SJ. Image Processing with ImageJ. *J Biophotonics* 2004, 11(7): 36–42.
- Ahmed N, Yang P, Huang Y, Chen H, Liu T, Wang L, Nabi F, Liu Y, Chen Q. Entosis acts as a novel way within Sertoli cells to eliminate spermatozoa in seminiferous tubule. *Frontiers in physiology* 2017, 8, 361.
- Al-Amri IS, Mahmoud IY, Waring CP, Alkindi AY, Khan T, Bakheit C, Al-Mawali KM. The reproductive cycle of the male house gecko, *Hemidactylus flaviviridis*, in relation to plasma steroid concentrations, progesterone receptors, and steroidogenic ultrastructural features, in oman. *General and Comparative Endocrinology* 2013; 187: 23–31.
- Al-Dokhi OA, Al-Onazee YZ, Mubarak M. Light and electron microscopy of the testicular tissue of the snake *Eryx jayakari* (Squamata, Reptilia) with a reference to the dividing germ cells. *Journal of Biological Science* 2004, 3: 345-351.
- Aldridge RD. 1975. Environmental control of spermatogenesis in the rattlesnake *Crotalus viridis*. *Copeia* 1975, 3: 493– 496.
- Almeida-Santos SM. 2005. Modelos reprodutivos em serpentes: estocagem de esperma e placentação em *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae) (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Almeida-Santos SM, Abdalla FMF, Silveira PF, Yamanouye N, Breno MC, Salomão MC. Reproductive cycle of the neotropical *Crotalus durissus terrificus*: I. seasonal levels and interplay between steroid hormones and vasotocinase. *General and Comparative Endocrinology* 2004; 139(2): 143–150.
- Almeida-Santos SM, Laporta-Ferreira IL, Puerto G. Ritual de combate em *Crotalus durissus*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 1990; 62: 418.
- Almeida-Santos SM, Salomão MG. 1997. Long-term sperm storage in the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae: Crotalinae). *Japanese Journal of Herpetology* 1997, 17: 46–52.
- Almeida-Santos SM, Salomão MG. 2002. Reproduction in neotropical pitvipers, with emphasis on species of the genus bothrops. ed. Schuett HW, Hoggren G, Douglas M, Greene ME. Eagle Mountain, Carmel, IN.: *Biology of the Vipers*, 2002: 445-462.
- Almeida-Santos SM, Salomão MG, Peneti EA, Sena PS, Guimarães ES. Predatory combat and tail wrestling in hierarchical contests of the neotropical rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes: Viperidae). *Amphibia-Reptilia* 1999; 20: 88–96.

- Amer MH, Al-Haak AG, Zaid NW. Seasonal histological effects on the leydig and sertoli cells in the testis of indigenous dogs (*Canis familiaris*). Al-Qadisiyah Journal of Veterinary Medicine Sciences 2018, 17(1): 125–131.
- Andelkovic M, Nikolic S, Tomovic L. Reproductive characteristics, diet composition and fat reserves of nose-horned vipers (*Vipera ammodytes*). Herpetological Journal 2021, 31(3): 151-161.
- Araújo FAA, SantaLúcia M, Cabral RF. Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos.. Pp. 6-12 In: Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. Cardoso et al. (Orgs.). 2003, Sarvier: São Paulo – SP.
- Argaez MAH. A cascavel neotropical *Crotalus durissus*: uma abordagem morfológica e da história natural em populações do Brasil. Diss. Universidade de São Paulo, 2012.
- Aubret F, Bonnet X, Shine R, Lourdaís O. Fat is sexy for females but not males: the influence of body reserves on reproduction in snakes (*Vipera aspis*). Hormones and Behavior 2002, 42(2): 135–147.
- Auharek SA, Lara NL, Avelar GF, Sharpe RM, França LR. Effects of inducible nitric oxide synthase (iNOS) deficiency in mice on Sertoli cell proliferation and perinatal testis development. International Journal of Andrology 2012, 35(5): 741-51.
- Baccetti B, Bigliardi E, Talluri MV, Burrini AG. The sertoli cell in lizards, Journal of Ultrastructure Research 1983, 85: 11-23.
- Baccetti B, Collodel G, Costantino-Ceccarini E, Eshkol A, Gambera L, Moretti E, Strazzae M, Piomboni P. Localization of human follicle-stimulating hormone in the testis. The FASEB journal 1998, 12(11): 1045-1054.
- Bartholomew GA Jr. The modification by temperature of the photoperiodic control of gonadal development in the lizard *Xantusia vigilis*. Copeia 1953, 45–50.
- Belluomini HE, Franco de Mello E, Penha AM, Schreiber G. 1996. Estudo citológico e ponderal do testículo de *Crotalus durissus terrificus* durante o ciclo reprodutivo anual. Memorial do Instituto Butantan 1996, 33: 761– 766.
- Benício RA. *Crotalus durissus* (South American Rattlesnake) arboreal habitat use. Herpetological Review 2016, 47: 477–477.
- Benício, RA Notes on habitat use of *Crotalus durissus* (South American Rattlesnake). Herpetology Notes 2018, 11: 645-646.
- Bennett AF, WR Dawson. Metabolism. Biology of the Reptilia 1976, 5: 127-223.
- Bernarde PS, Abe AS. Hábitos alimentares de serpentes em Espigão do Oeste, Rondônia, Brasil. Biota Neotropical 2010, 10(1): 167-173.
- Biology and Phylogeny of Snakes. Enfield, NH: Science Publishers 2011; 183–264.
- Bishop JE. A histological and histochemical study of the kidney tubule of the common garter snake, *Thamnophis sirtalis*, with special reference to the sexual segment



in the male. *Journal of Morphology* 1959; 104: 307–358.

- Bisneto PF, Kaeffer IL. Reproductive and feeding biology of the common lancehead *Bothrops atrox* (serpentes, viperidae) from central and southwestern Brazilian Amazonia. *Acta Amazonica* 2019; 49(2): 105–113.
- Blottner H0, Meyer HHD. Inverse relationship between testicular proliferation and apoptosis in mammalian seasonal breeders. *Theriogenology* 1995, 44(3): 321-328.
- Bochner R, Fiszton JT, Machado C. A profile of snake bites in Brazil, 2001 to 2012. *Clinical Toxicology* 2014, 4: 194.
- Bonnet X, Bradshaw D, Shine R. Capital versus income breeding: An ectothermic perspective. *Oikos* 1998, 83: 333–342.
- Bonnet X, Naulleau G, Lourdais O. The benefits of complementary techniques: using capture-recapture and physiological approaches to understand costs of reproduction in the asp viper. Pp. 483–495 in G.W. Schuett, M. Hoggren, and M.E. Douglas, eds. *Biology of the vipers*. Eagle Mountain Publishing, 2002. Eagle Mountain, Utah.
- Boretto JM, Ibarquengoytía NR, Jahn GA, Acosta JC; Vincenti AE, Fornés MW. Asynchronic steroid activity of Leydig and Sertoli cells related to spermatogenic and testosterone cycle in *Phymaturus antofagastensis*. *General and Comparative Endocrinology* 2010; 166(3): 556–664.
- Bourne AR, Raylor JL, Watson TG. Effect of temperature on the seasonal production of testicular androgens, *in vitro*, by the lizard *Tiliqua rugosa*. *Comparative biochemistry and physiology* 1986, 85A, 527–530.
- Braga FMS. Feeding and condition factor of characidinn fish in Ribeirão Grande system, southeastern Brazil. *Acta Scientiarum Biological Sciences* 2005; 27: 271-276.
- Brasil. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Acidentes por Animais Peçonhentos. Guia de vigilância Epidemiológica: Caderno 14- Secretaria de Vigilância em Saúde. Mato Grosso do Sul. 2008.
- Brown GP, Shine R. 2006. Why do most tropical animals reproduce seasonally? Testing hypotheses on an Australian snake. *Ecology* 2006; 87(1): 133–43.
- Brun B, Djelati R, Rumpler Y, Koehl C, Fabre M. Seasonal ultrastructural modifications of the seminiferous epithelium in two Eulemur species: *E. fulvus* and *E. macaco*. *Primates* 2001, 42(4): 281-290.
- Callard IP, Callard GV, Lance V, Eccles S. Seasonal changes in testicular structure and function and the effects of gonadotropins in the freshwater turtle, *Chrysemys picta*. *General and Comparative Endocrinology* 1976, 30(3): 347-356.
- Campbell JA, Lamar WW. *The venomous reptiles of Latin America*. Comstock. Cornell Univ. Press, Ithaca 1989, New York.

- Campbell JA, Lamar WW. The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere. 2 Vol. Ithaca: Cornell University Press 2004, 898 p.
- Campeiro JD, Marinovic MP, Carapeto FC, Dal Mas C, Monte GG, Porta LC, Nering MB, Oliveira EB, Hayashi MA. Oral treatment with a rattlesnake native polypeptide crotamine efficiently inhibits the tumor growth with no potential toxicity for the host animal and with suggestive positive effects on animal metabolic profile. *Amino acids* 2018, 50(2): 267-278.
- Carbajal-Márquez, R. A., Cedeño-Vázquez, J. R., Martins, M., e Koehler, G. Life history, activity pattern, and morphology of *Crotalus tzabcan* Klauber, 1952 (Serpentes: Viperidae). *Herpetological Conservation and Biology* 2020, 15: 228-37.
- Cardoso BRL. Avaliação dos parâmetros espermatogênicos de ratos *Wistar* portadores de *diabetes mellitus* tipo 2 induzida por meio de dieta hipercalórica. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade do Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2021.
- Chen H, Huang Y, Liu T, Haseeb A, Ahmed N, Zhang L, Bian X, Chen Q. Characteristics of seasonal spermatogenesis in the soft-shelled turtle. *Animal reproduction science* 2020, 214: 106307.
- Chung EY. Ultrastructure of germ cells, the Leydig cells, and Sertoli cells during spermatogenesis in *Boleophthalmus pectinirostris* (Teleostei, Perciformes, Gobiidae). *Tissue Cell* 2008, 40: 195-205.
- Colli GR, Pinho AA. Interstitial cell cycle of *Ameiva Ameiva* (Sauria, Teiidae) in the Cerrado Region of Central Brazil. *Journal of morphology* 1997, 233: 99–104.
- Colombo L, Burighel P. Fine structure of the testicular gland of the black goby *Gogius jozo* L. *Cell and Tissue Research* 1974, 154: 39-45.
- Cooke PS; Hess RA, Kirby JD. A model system for increasing testis size and sperm production: Potential application to animal science. *Journal of Animal Science* 1994, 72: 43-54.
- Costa, Kadigna Carla Silva. Histomorfometria testicular e processo espermatogênico do morcego *Artibeus planirostris* (Chiroptera: Phyllostomidae). Tese de mestrado. Brasil, 2016.
- Cox RM, Barrett MM, John-Alder HB. Effects of food restriction on growth, energy allocation, and sexual size dimorphism in Yarrow's spiny lizard, *Sceloporus jarrovi*. *Canadian Journal of Zoology* 2008, 86:268–276.
- Crews, D. Gamete production, sex hormone secretion, and mating behavior uncoupled. *Hormones and behavior* 1984, 18: 22–28
- Dadhich RK, Real FM, Zurita F, Barrionuevo FJ, Burgos M, Jiménez R. Role of apoptosis and cell proliferation in the testicular dynamics of seasonal breeding mammals: a study in the Iberian mole, *Talpa occidentalis*. *Biology of Reproduction* 2010;

83:83–91.

- Dal Mas C, Moreira JT, Pinto S, Monte GG, Nering MB, Oliveira EBD, Gazarini ML, Mori MA, Hayashi MAF. Anthelmintic effects of a cationic toxin from a South American rattlesnake venom. *Toxicon* 2016, 116: 49-55.
- De Carvalho CCCR, Caramujo MJ. The Various Roles of Fatty Acids. *Molecules* 2018, 23(10):2583.
- De Kretser DM, Kerr JB. The physiology of Reproduction. Knobil E, 1994: 837-932.
- Dietz JDC; Almeida DAD, Cintra LC, Oliveira BFRD, Magalhães MR, Jesuíno RSA. Avaliação da atividade antibacteriana do veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus*. *Ciência Animal Brasileira* 2018, 19.
- Duarte MR, Menezes FA. Is the population of *Crotalus durissus* (Serpentes, Viperidae) expanding in Brazil? *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 2013; 19: 30.
- Dubois W, Pudney J, Callard IP. The annual testicular cycle in the turtle, *Chrysemys picta*: A histochemical and electron microscopic study. *General and Comparative Endocrinology* 1988, 7(2): 191-204.
- Duvall D, Arnold SJ, Schuett GW. Pitviper mating systems: ecological potential, sexual selection, and microevolution. In: Campbell JA, Brodie EDJr. *Biology of the Pitvipers* 1992: 321–336.
- Dym M. The fine structure of the monkey (Macaca) Sertoli cell and its role in maintaining the blood-testis barrier. *The Anatomical Record* 1973, 75: 639–656.
- Fan X, Robaire B. Orchidectomy induces a wave of apoptotic cell death in the epididymis. *Endocrinology* 1998, 139: 2128-2136.
- Farese RV, Walther TC. Lipid droplets finally get a little R-E-S-P-E-C-T. *Cell* 2009, 139 (5): 855–860.
- Ferrante L, Menegucci M, Machado IF. *Crotalus durissus* (South American rattlesnake) swimming behavior to cross geographical barrier. *Herpetological Review* 2015, 46 (4): 640.
- Ferreira A, Dolder H. Sperm ultrastructure and spermatogenesis in the lizard, *Tropidurus itambere*. *Biocell: official journal of the Sociedades Latinoamericanas de Microscopia Electronica* 2003, 27(3):353-62.
- Ferrell BR. Photoperiodism in the lizard, *Anolis carolinensis*. *Journal of Experimental Zoology* 1984, 232(1): 19–27.
- Figueiredo AFA, França LR, Hess RA, Costa GMJ. Sertoli cells are capable of proliferation into adulthood in the transition region between the seminiferous tubules and the rete testis in Wistar rats. *Cell Cycle* 2016: 1-29.
- Fitch HS. Reproductive cycles in lizards and snakes. University of Kansas Museum of Natural History miscellaneous publication 1970, 52: 52-247.

- Florey O, Krajcovic M, Sun Q, Overholtzer M. Entosis. *Current Biology* 2010, 20(3): R88–R89.
- França LR, Hess RA, Dufour JM, Hofmann MC, Griswold MD. The Sertoli cell: One hundred fifty years of beauty and plasticity. *Andrology* 2016, 4(2), 189–212.
- França LR, Jackson A, Russell LD. Hormone sensitive of germ cells in stage XIV and in stage I of rat spermatogenic cycle. *Tissue Cell* 1994, 26: 375-383.
- França LR, Russell LD. The testis of domestic mammals. In: *Male reproduction; a multidisciplinary overview*. Ed. Madrid: Churchill Communications Europe Espana 1998, 16: 198-219.
- Gonçalves MFF, Lacerda SMDSN, Lara NLEM, Oliveira CFA, Figueiredo AFA, Brener MRG, Cavalcante MA, Santos AK, Campolina-Silva GH, Costa VV, Santana ACC, Lopes RA, Szawka RE, Costa GMJ. GATA-1 mutation alters the spermatogonial phase and steroidogenesis in adult mouse testis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2021,542: 111519.
- Goyal HO, Williams CS, Khalil ML, Vig MM, Maloney MA. Postnatal differentiation of ductus deferens, tail of the epididymis, and distal body of epididymis in goats occurs independently of rete testis fluid. *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 1999, 254: 508-520.
- Graham SP, Earley RL, Hoss SK, Schuett GW, Grober MS. The reproductive biology of male cottonmouths (*Agkistrodon piscivorus*): do plasma steroid hormones predict the mating season?" *General and Comparative Endocrinology* 2008, 159(2–3): 226–35.
- Greene HW. 1997. *Snakes: the evolution of mystery in nature*. Berkeley: University of California Press.
- Gribbins KM. Reptilien spermatogenesis 2011, 1(3): 250–269.
- Gribbins K, Anzalone M, Collier M, Granados-González G, Villagrán-Santa MC, Hernández-Gallegos O. Temporal germ cell development strategy during continuous spermatogenesis within the montane lizard, *Sceloporus bicanthalis* (Squamata; Phrynosomatidae). *Theriogenology* 2011, 76(6): 1090–99.
- Gribbins KM, Happ CS, Sever DM. Ultrastructure of the reproductive system of the Black Swamp Snake (*Seminatrix pygaea*) V. The temporal germ cell development strategy of the testis. *Acta Zoológica* 2005, 86: 223-230.
- Gribbins K, Rheubert J. The Ophidian Testis, Spermatogenesis and Mature Spermatozoa. In: Aldridge RD, Sever DM (eds.), *Reproductive Biology and Phylogeny of Snakes*. Enfield, NH: Science Publishers 2011; 183–264.
- Gribbins KM, Rheubert JL, Collier MH, Siegel DS, Sever DM. 2008 histological analysis of spermatogenesis and the germ cell development strategy within the testis of the male Western Cottonmouth Snake, *Agkistrodon piscivorus leucostoma*.

Annals of Anatomy 2008, 20(5):461-476.

Griswold MD. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. In Seminars in cell e developmental biology 1998, 9: 411-416.

Haider SG. Cell biology of Leydig cells in the testis. International review of cytology 2004, 223: 181-241.

Hayakawa D, Sasaki M, Suzuki M, Tsubota T, Igota H, Kaji K; Kitamura N. Immunohistochemical localization of steroidogenic enzymes in the testis of the Sika Deer (*Cervus nippon*) during developmental and seasonal changes. Journal of Reproduction and Development 2010, 56:117-123.

Hayrabyan S, Todorova K, Pashova S, Mollova M, Fernández N. Sertoli cell quiescence - new insights. American journal of reproductive immunology 2012, 68(6): 451-455.

Henne WM, Reese ML, Goodman JM. The assembly of lipid droplets and their roles in challenged cells The EMBO Journal. 2018.

Hermo L, Pelletier RM, Cyr DG, Smith CE. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: background to spermatogenesis, spermatogonia, and spermatocytes. Microscopy research and technique 2010, 73(4): 241-278.

Hess R, França LR. Structure of the Sertoli cell. In: Griswold M, Skinner M, editors. Sertoli Cell Biology. Elsevier Academic Press; San Diego 2005: 19–40.

<sup>a</sup>Hikim APS, Bartke A, Russell LD. Morphometric Studies on Hamster Testes in Gonadally Active and Inactive States: Light Microscope Findings, Biology of Reproduction 1988, 39(5): 1225–1237.

<sup>b</sup>Hikim APS, Bartke A, Russell LD. The seasonal breeding hamster as a model to study structure-function relationships in the testis. Tissue and Cell 1988, 20: 63-78.

Holding ML, Frazier JA, Dorr SW, Pollock NB, Muelleman P, Branske A, Henningsen SN, Eikenaar C, Escallón C, Montgomery CE. Wet- and dry-season steroid hormone profiles and stress reactivity of an insular dwarf snake, the Hog Island boa (*Boa constrictor imperator*). Physiological and Biochemical Zoology 2014, 87 (3):363–373.

Hombach-Klonisch S, Schon J, Kehlen A, Blottner S, Klonisch T. Seasonal expression of INSL3 and *Lgr8/Insl3* receptor transcripts indicates variable differentiation of Leydig cells in the roe deer testis. Biology of Reproduction 2004, 71: 1079–108.

Islam MN, Aoyama M, Sugita S. Seasonal Cycle of Leydig cells in the japanese jungle crow (*Corvus macrorhynchos*). Asian Journal of Medical and Biological Research 2015, 1(1): 65–73.

Islam MN, Tsukahara N, Sugita S. Apoptosis-mediated seasonal testicular regression in the Japanese Jungle crow (*Corvus macrorhynchos*). Theriogenology 2012, 77(9): 1854–1865.

- Jenkins LK, Ross WL, Young K A. Increases in apoptosis and declines in Bcl-XL protein characterise testicular regression in American crows (*Corvus brachyrhynchos*). *Reproduction, Fertility and Development* 2007, 19(3): 461-469.
- Jiménez R, Burgos M, Barrionuevo FJ. Circannual testis changes in seasonally breeding mammals. *Sexual development* 2015, 9: 205–215.
- Jiménez R, Burgos M, Barrionuevo FJ. Circannual Testis Changes in Seasonally Breeding Mammals. *Sexual Development* 2015, 9: 205-215.
- Jiménez-Reina L, Maartens PJ, Jimena-Medina I, Agarwal A, du Plessis SS. Overview of the male reproductive system. In *Exercise and Human Reproduction 2016*: 1-17. Springer, New York, NY.
- Johnson L, Matt KS, Bartke A, Nguyen HB, Le HT: Effect of photoperiod on the size of the Leydig cell population and the rate of recruitment of Leydig cells in adult Syrian hamsters. *Biology of Reproduction* 1987, 37(3): 727–738.
- Johnson L, Thompson DL Jr, Varner DD. Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. *Animal reproduction science* 2008, 105: 23–51.
- Johnson L, Thompson DL. Effect of seasonal changes in Leydig cell number on the volume of smooth endoplasmic reticulum in Leydig cells and intratesticular testosterone content in stallions. *Reproduction* 2004, 81(1): 227–232.
- Kerr JB, Knell CM. The fate of fetal Leydig cells during the development of the fetal and postnatal rat testis. *Development* 1988, 103: 535-544.
- Khan UW, Rai U. Endocrine and paracrine control of Leydig cell steroidogenesis and proliferation in the wall lizard: an in vitro study. *General and comparative endocrinology* 2005, 140(2): 109-115.
- King RB, Bowden RM. Seasonal, conditiondependent, and individual variation in testosterone in a natricine snake. *Journal of Herpetology* 2013, 47: 179–183.
- Komatsu T, Tsubota T, Yamamoto Y, Atoji Y, Suzuki Y. Seasonal changes in the immunolocalization of steroidogenic enzymes in the testes of the japanese black bear (*Ursus thibetanus japonicus*). *Journal of Veterinary Medical Science* 1997, 59: 521–529.
- Koulish S, Kramer CR, Grier HJ. Organization of the male gonad in a protogynous fish, *Thalassoma bifasciatum* (Teleostei: Labridae). *Journal of Morphology* 2002, 254: 292-311.
- Krajcovic M, Johnson NB, Sun Q, Normand G, Hoover N, Yao E, Richardson AL, King RW, Cibas ES, Schinitt SJ, Brugge JS. A non-genetic route to aneuploidy in human cancers. *Nature cell biology* 2011, 13(3): 324-330.

- Kreiner A, Van Der Lingen CD, Fréon P. A comparison of condition factor and gonadosomatic index of sardine *Sardinops sagax* stocks in the northern and southern Benguela upwelling ecosystems, 1984–1999. *African Journal of Marine Science* 2001, 23: 123–134.
- Krohmer RW. Effects of mammalian gonadotropins (oFSH and oLH) on testicular development in the immature water snake, *Nerodia sipedon*. *General and comparative endocrinology* 1986, 64 (3): 330-338.
- Krzanowska H, Bilinska B. Number of chromocentres in the nuclei of mouse Sertoli cells in relation to the strain and age of males from puberty to senescence. *Journal of reproduction and fertility* 2000, 118(2): 343-350.
- Kumar A, Raut S, Balasinor NH. Endocrine Regulation of Sperm Release. *Reproduction, Fertility and Development* 2018, 30(12): 1595-1603.
- Lance VJ. Endocrinology of reproduction in male reptiles. *Symposium of the zoological society of London* 1984, 52:357–383
- Lara NLM, Avelar GF, Costa GMJ, Lacerda SMSN, Hess RA, França LR. Cell - Cell Interactions Structural. In Skinner MK (ed) *Encyclopedia of Reproduction*, 2nd ed. Elsevier Academic Press, 2018: 68-75.
- Leceta J, Barrutia MG, Fernández J. Seasonal ultrastructural changes of Leydig cells in *Lacerta muralis*. *Acta Zoologica* 1982, 63(1): 33–38.
- Li D, Liu Q, Gong Y, Huang Y, Han X. Cytotoxicity and oxidative stress study in cultured rat Sertoli cells with methyl tert-butyl ether (MTBE) exposure. *Reproductive toxicology* 2009, 27(2): 170-176.
- Licht P. Seasonal cycles in reptilian reproductive physiology. In Marshall FHA, Lamming GE, Parkes AS. eds. *Marshall's physiology of reproduction* Vol. 1. Churchill Livingstone, Edinburgh, New York, 1984.
- Licht P, Denver RJ, Pavgi S. Temperature dependence of *in vitro* pituitary, testis, and thyroid secretion in a turtle, *Pseudemys scripta*. *General and comparative endocrinology* 1989, 76(2): 274–285.
- Lincoln GA. Seasonal aspects of testicular function. In *The Testis*. Eds Burger H, de Kretser D. Raven Press, New York, 1989: 329-386.
- Lind CM, Beaupre SJ. Male snakes allocate time and energy according to individual energetic status: Body condition, steroid hormones, and reproductive behavior in Timber Rattlesnakes, *Crotalus horridus*. *Physiological and Biochemical Zoology* 2015, 88: 624- 633.
- Lind CM, Beaupre SJ. Natural variation in steroid hormone profiles of male Timber Rattlesnakes, *Crotalus horridus*, in northwest Arkansas. *General and Comparative Endocrinology* 2014, 206: 72–79.
- Lind CM, Husak JF, Eikenaar C, Moore IT, Taylor EM. The relationship between plasma steroid hormone concentrations and the reproductive cycle in the northern

- pacific rattlesnake, *Crotalus oreganus*. General and Comparative Endocrinology 2010, 166: 590-599.
- Lind CM, Husak JF, Eikenaar C, Moore IT, Taylor EN. The relationship between plasma steroid hormone concentrations and the reproductive cycle in the northern pacific rattlesnake, *Crotalus oreganus*. General and Comparative Endocrinology 2010, 166(3): 590–599.
- Luke MC, Coffey DS. The male sex accessory tissue: structure, androgen action and physiology. In: Knobil E, Neil JD. The Physiology of Reproduction (2<sup>a</sup> Ed). Raven Press, NY, 1994, 1435-1488.
- Mackay S. Gonadal development in mammals at the cellular and molecular levels. 2000: 47-99.
- Maga G, Hubscher U. Proliferation cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. Journal of Cell Science 2003, 116: 3051–3060
- Maluf SEC, Dal Mas C, Oliveira EBD, Melo PM, Carmona AK, Gazarini ML, Hayashi MAF. Inhibition of malaria parasite *Plasmodium falciparum* development by crotamine, a cell penetrating peptide from the snake venom. Peptides 2016, 78: 11-16.
- Mancin AC, Soares AM, Andrião-Escarso SH, Faça VM, Green LJ, Zuccolotto S, Pelá IR, Giglio JR. The analgesic activity of crotamine, a neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom: a biochemical and pharmacological study. Toxicon 1998, 36(12): 1927-1937.
- Marinho CE. A cascavel *Crotalus durissus terrificus* (Viperidae: Crotalinae) como modelo experimental para o estudo do envolvimento de peptidases na sobrevivência de espermatozoides. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2007, 115 p.
- Marinovic MP, Campeiro JD, Lima SC, Rocha AL, Nering MB, Oliveira EB, Hayashi MA. Crotamine induces browning of adipose tissue and increases energy expenditure in mice. Scientific reports 2018, 8(1): 1-12.
- Marler C, Ryan M. Energetic constraints and steroid hormone correlates of male calling behaviour in the túngara frog. Journal of Zoology 1996, 240:397–409.
- Marques AR, Sazima I. História natural das serpentes. In: Cardoso JLC, França FDS, Wen FH, Malaque CMS, Haddad Jr V. Animais peçonhentos do Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier, 2003. 62-71.
- Martínez-Hernández J, Seco-Rovira V, Beltrán-Frutos E, Ferrer C, Serrano-Sánchez MI, Pastor LM. Proliferation, apoptosis, and number of Sertoli cells in the Syrian hamster during recrudescence after exposure to short photoperiod. Biology of reproduction 2020, 102(3): 588-597.
- Martins I, Raza SQ, Voisin L, Dakhli H, Law F, De Jong D, Allouch A, Thoreau M, Bremmer C, Deutsch E, Perfettini JL. Entosis: The emerging face of non-cell-autonomous type IV programmed death. Biomedical journal 2017, 40(3): 133-140.



- Martins M, Molina FB. Répteis: panorama geral dos répteis ameaçados do Brasil. In: Fonseca G, editor. Livro vermelho das espécies da fauna brasileira ameaçadas de extinção, Brasília: Ministério do Meio Ambiente e Fundação Biodiversitas 2008, 326-373.
- Martins M, Oliveira ME. Natural history of snakes in forests of the Manaus region, Central Amazonia, Brazil. *Herpetological Natural History* 1998, 6(2):78-150.
- Matayoshi PM, Souza PM, Gasparoto VP, Araujo MS, Simões CR, Souza FF, Oba E, Machado VMV, Júnior RSF, Prestes NC. Hormonal and ultrasonographic characterization of the seasonal reproductive cycle of male and female *Crotalus durissus terrificus*. *Animal Reproduction (AR)* 2018, 15(4): 1236-1245.
- Melgarejo AR. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: Cardoso JLC, França OSF, Wen FH, Málaque CMS, Haddad JR V. (orgs.). Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier, 2003: 33-61.
- Mendis-Handagama SM, Ariyaratne HB. Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biology of Reproduction* 2001, 65: 660–671.
- Moore IT, Jessop TS. Stress, reproduction, and adrenocortical modulation in amphibians and reptiles. *Hormones and Behavior* 2003, 43:39–47.
- Moore MC, Lindzey J. The physiological basis of sexual behavior in male reptiles. *Biology of the Reptilia* 1992, 18: 70-113.
- Mora JD. Classification of several types of maturational arrest of spermatogonia according to Sertoli cell morphology: an approach to aetiology. *International journal of andrology* 1998, 21(6): 317-326.
- Morales E, Ferrer C, Zuasti A, Garcia-Borron JC, Canteras M, Pastor LM. Apoptosis and molecular pathways in the seminiferous epithelium of aged and photoinhibited Syrian Hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Journal of Andrology* 2007, 28(1): 123–135.
- Muñoz EM Fogal T, Dominguez S, Scardapane L, Piezzi RS. Ultrastructural and morphometric study of the Sertoli cell of the Viscacha (*Lagostomus maximus maximus*) during the annual reproductive cycle. *The Anatomical Record* 2001, 262(2): 176–185.
- Murphy G, Rouse RL, Polk WW, Henk WG, Barker SA, Boudreaux MJ, Floyd ZE, Penn AL. Combustion-derived hydrocarbons localize to lipid droplets in respiratory cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2008, 38, 532–540.
- Nakane Y, Yoshimura T. Universality and diversity in the signal transduction pathway that regulates seasonal reproduction in vertebrates. *Frontiers in Neuroscience* 2014, 8: 1–7.
- Nakanishi Y, Shiratsuchi A. Phagocytic removal of apoptotic spermatogenic cells by Sertoli cells: mechanisms and consequences. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 2004, 27: 13–16.

- Nandi S, Banerjee PP, Zirkin BR. Germ cell apoptosis in the testes of Sprague Dawley rats following testosterone withdrawal by ethane 1,2-dimethanesulfonate administration: relationship to Fas? *Biologia da Reprodução* 1999; 61:70–75.
- Nishiwaki-Ohkawa T, Yoshimura T. Molecular basis for regulating seasonal reproduction in vertebrates. *Journal of Endocrinology* 2016, 229(3): R117–R127.
- Nistal M, JC Mora, Paniagua R. Classification of several types of maturational arrest of spermatogonia according to Sertoli cell morphology: an approach to aetiology. *International Journal of Andrology* 1998, 21: 317-326.
- O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER. Estrogen and spermatogenesis. *Endocrine Reviews* 2001, 22(3): 289–318.
- Oliveira CF, Lara NL, Lacerda SM, Resende RR, França LR, Avelar GF. Foxn1 and Prkdc genes are important for testis function: evidence from nude and scid adult mice. *Cell Tissue Res.* 2020, 380(3):615-625.
- Oliveira MR, Braghirolli FM, Lanés LEK, Verrastro L, Oliveira GT. Avaliação da variação sazonal dos parâmetros do estado oxidativo de *Tropidurus catalanensis* Gudynas e Skuk, 1983. *South American Journal of Herpetology* 2021, 19 (1): 12-21.
- Oliveira MR, Braghirolli FM, Verrastro L, Oliveira GT. Seasonal and Sexual Variation of the Intermediate Metabolism and Body Condition Indexes in the Lizard *Tropidurus catalanensis* (Gudynas and Skuk, 1983) (Squamata: Tropiduridae). *South American Journal of Herpetology* 2018, 13(1): 85-95.
- Olofsson SO, Boström P, Andersson L, Rutberg M, Perman J, Borén J. Lipid droplets as dynamic organelles connecting storage and efflux of lipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 2009, 1791, 448–458.
- Orth JM. Cell Biology of Testicular Development in fetus and neonate. In: Desjardins C, Ewing LL. *Cell and molecular biology of the testis*. New York: Oxford University Press, 1993, 1: 3-42.
- Pelletier RM. The blood-testis barrier: the junctional permeability, the proteins and the lipids. *Progress in histochemistry and cytochemistry* 2011, 46(2), 49-127.
- Pierantoni R. Male reproductive system, amphibians. In: Knobil E, Neill JD. *Encyclopedia of Reproduction*. San Diego: Academic Press. 1998, 10-15.
- Pinheiro-Junior EL, Boldrini-França J, Takeda AAS, Costa TR, Peigneur S, Cardoso IA, Oliveira IS, Sampaio SV, de Mattos Fontes MR, Tytgat J, Arantes EC. Towards toxin PEGylation: The example of rCollinein-1, a snake venom thrombin-like enzyme, as a PEGylated biopharmaceutical prototype. *International Journal of Biological Macromolecules* 2021, 190: 564-573.
- Pizzato L, Marques OAV. Interpopulational variation in reproductive cycles and activity of the water snake *Liophis miliaris* (Colubridae) in Brazil. *Herpetological Journal* 2006, 16: 353-362.

- Pontes GMF. História natural de *Philodryas patagoniensis* (sepentes: colubridae) no litoral do Rio Grande do Sul, Brasil. 2007.
- Pudney J. Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. *Microscopy research and technique* 1995, 32(6): 459-497.
- Resende FCD, Avelar GFD. The sexual segment of the kidney of a tropical rattlesnake, *Crotalus durissus* (Reptilia, Squamata, Viperidae), and its relationship to seasonal testicular and androgen cycles. *Journal of Morphology* 2021, 282(9): 1402-1414.
- Ritzen EM, Hansson V e French FS. The Sertoli cell. In: *The Testis* (eds. HG Burger e D de Kretser), Raven Press, New York 1981: 171–194.
- Rojas CA., Barros VA, Almeida-Santos SM. The Reproductive cycle of the male sleep snake *Sibynomorphus mikanii* (Schlegel, 1837) from southeastern Brazil. *Journal of Morphology* 2013, 274(2): 215–228.
- Röll, B. e von Düring, MU. Características sexuais e espermatogênese em machos da lagartixa partenogenética *Lepidodactylus lugubris* (Reptilia, Gekkonidae). *Zoology* 2008, 111 (5): 385-400.
- Romero LM. Seasonal changes in plasma glucocorticoid concentrations in free-living vertebrates. *General and Comparative Endocrinology* 2002, 128:1–24.
- Rowan-Carroll A, Halappanavar S, Williams A, Somers CM, Yauk CL. Mice exposed in situ to urban air pollution exhibit pulmonary alterations in gene expression in the lipid droplet synthesis pathways. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 2013, 54, 240–249.
- Ruiz M, French SS, Demas GE, Martins EP. Food supplementation and testosterone interact to influence reproductive behavior and immune function in *Sceloporus graciosus*. *Hormones and Behavior* 2010, 57:134–139.
- Russell LD. Morphological and functional evidence for Sertoli- germ cell relationships. In: *The Sertoli Cell* (eds. LD Russell e MD Griswold) 1993, 365–390. Cache River Press, Clearwater, FL.
- Russell LD. Observations on the inter- relationships of Sertoli cells at the level of the blood- testis barrier: evidence for formation and resorption of Sertoli-Sertoli tubulobulbar complexes dduboiuring the spermatogenic cycle of the rat. *American Journal of Anatomy* 1979, 155(2): 259-79.
- Russell LD. Postnatal and pubertal development. In: Russell LD, Griswold MD. (Ed.). *The Sertoli Cell*. Cache River Press, Clearwater, 1993: 115-153
- Russell LD. Sertoli-germ cell interactions: a review. *Gamete Research* 1980, 3: 179–202.
- Russell LD, Corbin TJ, Borg KE, França LR, Grasso P, Bartke A. Recombinant human follicle-stimulating hormone is capable of exerting a biological effect in the adult hypophysectomized rat by reducing the numbers of degenerating germ cells. *Endocrinology* 1993, 133: 2062-2070.

- Saez JM. Leydig cells: endocrine, paracrine, and autocrine regulation. *Endocrine Reviews* 1994, 15(5): 574–626.
- Safdarian P, Todehdehghanb F, Hojatia V, Shiravi A. Seasonal changes in the testicular activity of the Iranian mountain viper, *Montivipera albicornuta* (Nilson e Andrén, 1985) (Reptilia: Viperidae). *Zoology in the Middle East* 2016, 62(1): 39–45.
- Saint Girons H. Reproductive cycles of male snakes and their relationships with climate and female reproductive cycles. *Herpetologica* 1982, 38: 5–16.
- Salomão MG, Almeida-Santos SM. The Reproductive cycle in male neotropical rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). In: Schuett GW, Hfggren M, Douglas ME, Greene HW. (Eds.), *Biology of the Vipers*. Eagle Mountain Publishing, Carmel, IN, 2002: 507–514.
- Santos X, Liorente GA, Feriche M, Pleguezuelos JM, Casals F, de Sostoa A. 2005. Food availability induces geographic variation in reproductive timing of an aquatic oviparous snake (*Natrix maura*). *Amphibia-Reptilia* 2005, 26(2):183–191.
- Sartim MA, Menaldo DL, Sampaio SV. Immunotherapeutic potential of Crotoxin: Anti-inflammatory and immunosuppressive properties. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 2019, 24: 1-13.
- Schuett GW, Harlow HJ, Rose JD, Van Kirk EA, Murdoch WJ. Annual cycle of plasma testosterone in male copperheads, *Agkistrodon contortrix* (Serpentes, Viperidae): relationship to timing of spermatogenesis, mating, and agonistic behavior." *General and Comparative Endocrinology* 1997, 105(3): 417–424.
- Schulz W, Holstein AF. Postnatal and pubertal development. In: Russell LD, Griswold MD. *The Sertoli Cell*. Cache River Press, Clearwater, FL., 1993: 115 -153.
- Schulze C, Holstein AF, Schirren C, Korner F. On the morphology of the human Sertoli cells under normal conditions and in patients with impaired fertility. *Andrologia* 1976, 8:167–178.
- Seigel RA., Huggins MM, Ford NB. Reduction in locomotor ability as a cost of reproduction in gravid snakes. *Oecologia* 1987, 73(4): 481-485.
- Setchell BP. Male reproductive organs and semen. In: Cupps PT. *Reproduction in Domestic Animals*. (4<sup>a</sup> Ed.) San Diego: Academic Press 1991: 221-250.
- Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C, Fisher JS. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* 2003, 125: 769–784.
- Sharpe RM. Environmental/Lifestyle effects on spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 2010, 365(1546): 1697–1712.
- Sharpe RM. Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. *The Physiology of Reproduction*. (2a Ed). Raven Press, NY, 1994, 1363 p.

- Shi JF, Li YK, Ren K, Xie YJ, Yin W, Mo ZC: Characterization of cholesterol metabolism in Sertoli cells and spermatogenesis (Review). *Molecular Medicine Reports* 2018, 17: 705-713.
- Shima Y, Miyabayashi K, Haraguchi S, Arakawa T, Otake H, Baba T, Matsuzaki S, Shishido Y, Akiyama H, Tachibana T, Tsutsui K, Morohashi K. Contribution of Leydig and Sertoli cells to testosterone production in mouse fetal testes. *Molecular Endocrinology* 2013; 27 63–73.
- Shine, R. Reproductive strategies in snakes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 2003, 270(1519): 995-1004.
- Shine, R. Sexual size dimorphism and male combat in snakes. *Oecologia* 1978, 33: 269–278.
- Shivanandappa T, Sarkar HBD. Seasonal lipid cycle and steroidogenic activity in the testis of the tropical skink, *Mabuya carinata* (Schneider): A histochemical study. *General and comparative endocrinology* 1979, 38(4): 491–495.
- Siegel DS, Sever DM. Utero-muscular twisting and sperm storage in viperids. *Herpetological Conservation and Biology* 2006, 1(2): 87-92.
- Silveira JA. Histologia testicular e caracterização dos estádios do ciclo do epitélio seminífero de *Hemidactylus mobouia* (Moreau de Jonnes, 1818) (Reptilia, Squamata, SAuria Gekkonidae) Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa, 2009.
- Sinclair M, Grossmann M, Gow PJ, Angus PW. Testosterone in men with advanced liver disease: Abnormalities and implications. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 2015, 30(2): 244–251.
- Sousa AL, Campos-Junior PHA, Costa GMJ, França LR. Spermatogenic cycle length and sperm production in the freshwater turtle *Kinosternon scorpioides*. *Biology of Reproduction* 2014, 90 (2): 35, 1-10.
- Southwood AL, Reina RD, Jones VS, Speakman JR, Jones DR. Seasonal metabolism of juvenile green turtles (*Chelonia mydas*) at Heron Island, Australia. *Canadian Journal of Zoology* 2006, 84: 125-135.
- Steinberger A, Steinberger E. The sertoli cells. *Advances in Physiology, Biochemistry, and Function*. Academic Press 1977: 371-399.
- Strben M, Fazarinc G, Bavdek SV, Pogačnik A. Apoptosis and proliferation during seasonal testis regression in the brown hare (*Lepus europaeus* L.). *Anatomia, histologia, embryologia* 2003, 32(1): 48-53.
- Tanaka S, Yasuda M. Histological changes in the testis of the domestic fowl after adenohipophysectomy. *Poultry science* 1980: 1538-1545
- Thiam, AR, Farese Jr, RV e Walther, TC. The biophysics and cell biology of lipid droplets. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2013, 14 (12): 775-786.

- Tozetti AM, Martins M. Habitat use by the South American rattlesnake (*Crotalus durissus*) in south-eastern Brazil. *Journal of Natural History* 2008, 42: 1435–1444.
- Tsubota T, Howell-Skalla L, Nitta H, Osawa Y, Mason JI, Kita I, Tiba T, Bahr JM: Seasonal changes in spermatogenesis and testicular steroidogenesis in the male black bear *Ursus americanus*. *Journal of Reproduction and Fertility* 1997, 109: 21–27.
- Ueno H, Mori H. Morphometrical analysis of Sertoli cell ultrastructure during the seminiferous epithelial cycle in rats. *Biology of Reproduction* 1990, 43: 769–776.
- Uetz P, Hošek J. 2018. The Reptile Database. Acessado em 26 de novembro de 2021. [www.reptile-database.org](http://www.reptile-database.org).
- Underwood H, Hall D. Photoperiodic control of reproduction in the male lizard *Anolis carolinensis*. *Journal of comparative physiology* 1982, 146: 485–492.
- Vieira GHC, Weiderhecker HC, Colli GR, Bao SN. Spermiogenesis and testicular cycle of the lizards *Tropidurus torquatus* (Squamata, Tropiduridae) in the Cerrado of central Brazil. *Amphibia-Reptilia* 2001, 22: 217–233.
- Villagran-SantaCruz M, Hernández-Aguacaliente MJ, Méndez-de la Cruz FR, Gribbins KM, Granados-González G, Hernández-Gallegos O. The germ cell development strategy and seasonal changes in spermatogenesis and Leydig cell morphologies of the spiny lizard *Sceloporus mucronatus* (Squamata: Phrynosomatidae). *Zoomorphology* 2014, 133(2): 151–165.
- Vinegar A. Evolutionary implications of temperature induced anomalies of development in snake embryos. *Herpetologica* 1974, 72-74.
- Vitt, LJ, Caldwell JP. 2013. *Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles*. Academic press.
- Wältermann M, Hinz A, Robenek H, Troyer D, Reichelt R, Malkus U, Galla HJ, Kalscheuer R, Stöveken T, Von Landenberg P, Steinbüchel A. Mechanism of lipid-body formation in prokaryotes: how bacteria fatten up. *Molecular microbiology* 2005 55(3): 750-763.
- Williard AS, Harden LA. Seasonal changes in thermal environment and metabolic enzyme activity in the diamondback terrapin (*Malaclemys terrapin*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology* 2011, 158(4): 477-484.
- Wingfield JC, Hegner RE, Dufty Jr. AM, Ball G. The “challenge hypothesis”: theoretical implications for patterns of testosterone secretion, mating systems, and breeding strategies. *The American Naturalist* 1990, 136(6): 829-846.
- Wingfield JC, Sapolsky R. Reproduction and resistance to stress: when and how. *Journal of Neuroendocrinology* 2003, 15: 711– 724.

- Wu X, Wan S, Lee MM. Key factors in the regulation of fetal and postnatal Leydig cell development. *Journal of cellular physiology* 2007, 213(2): 429-433.
- Wüster W, Ferguson JE, Quijada-Mascareñas JA, Pook CE, Salomão MG., Thorpe, R.S. Tracing an invasion: landbridges, refugia, and the phylogeography of the Neotropical rattlesnake (Serpentes: Viperidae: *Crotalus durissus*). *Molecular Ecology* 2005, 14: 1095–1108.
- Xiong W, Wang H, Wu H, Chen Y, Han D. Apoptotic spermatogenic cells can be energy sources for Sertoli cells. *Reproduction*, 2009 137(3), 469-479.
- Young KA, Ball GF, Nelson RJ. Photoperiod-induced testicular apoptosis in European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Biology of reproduction* 2001; 64:706–713.
- Young KA, Gregory FB, Nelson RJ. 2005. Photoperiod-induced testicular apoptosis in european starlings (*Sturnus vulgaris*). *Biology of Reproduction* 2005, 64(2): 706–713.
- Young KA, Nelson RJ. Mediation of seasonal testicular regression by apoptosis. *Reproduction* 2001, 122(5): 677–685.
- Zhang L, Han XK, Qi YY, Liu Y, Chen QS. Seasonal effects on apoptosis and proliferation of germ cells in the testes of the Chinese soft-shelled turtle, *Pelodiscus sinensis*. *Theriogenology* 2008, 69(9): 1148–1158.
- Zirkin BR, Santulli R, Awoniyi CA, Ewing LL. 1989. Maintenance of Advanced Spermatogenic Cells in the Adult Rat Testis: Quantitative Relationship to Testosterone Concentration within the Testis. *Endocrinology* 1989; 124(6): 3043–3049.