



# INSTITUTO DE BIOLOGIA

ESTUDO ESTRUTURAL, ULTRA-ESTRUTURAL E CITOQUÍMICO DA  
ESPERMATOGÊNESE, COM ÊNFASE NA ESPERMIOGÊNESE DE HYLA RANKI  
(AMPHIBIA, ANURA, HYLIDAE).

*Este exemplar corresponde à redação  
final da tese defendida pelo condi-  
tante pela comissão julgadora*

*H. H. de  
30/05/90*

T114e

13146/BC

CAMPINAS SP

SEBASTIÃO ROBERTO TABOGA



ESTUDO ESTRUTURAL, ULTRA-ESTRUTURAL E CITOQUÍMICO DA  
ESPERMATOGÊNESE, COM ÊNFASE NA ESPERMIOGÊNESE DE HYLA RANKI  
(AMPHIBIA, ANURA, HYLIDAE).

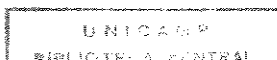
Tese apresentada ao  
Instituto de Biologia da  
Universidade Estadual de  
Campinas para a obtenção  
do título de Mestre em  
Ciências, área de  
Biologia Celular.

30/9/00 295

Orientadora: Mary Anne Heidi Dolder

Campinas

1990



CLASSIF.	T
UTCR.	T114e
EX	
MBO 87	13146

CM-00010746-6

" A ciência como produto da atividade humana e, portanto, pertence ao seu sistema cultural. Pode-se, melhor, dizer que a ciência faz parte do todo sócio-cultural da humanidade. Ela, como qualquer dos seus ramos, não é "boa" ou "má", é um produto, uma consequência do homem. Este poderá ser bom ou mau. Não quero resvalar pelos difíceis caminhos da ética, para mim essencialmente antropocêntrica (bom ou mau é tudo é tudo que faça bem ou mal ao homem ou sua "alma")."

Benedicto de Campos Vidal

"Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos... mesmo que eu tivesse o dom da profecia e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência; mesmo que eu tivesse toda a fé, a ponto de remover montanhas... Ainda que eu distribuísse todos os meus bens em sustento dos pobres e ainda que eu entregasse o meu corpo a ser queimado, se não tiver caridade, de nada valeria!" (I Cor. 13, 1-3).

Eterna gratidão Senhor!

DEDICO :

Aos meus pais

SEBASTIÃO e MARIA IVONE

Aos meus irmãos

CARLOS, GILBERTO, SÍLVIA e ELAINE

Às minhas avós

TEREZA e ROSA

Aos meus sobrinhos

LUIZ FERNANDO e RODRIGO

Aos meus cunhados

LUZIA e WALDEMAR

É muito bom poder tê-los  
presentes na minha vida,  
encorajando-me e compreendendo  
as minhas ausências na família

OFEREÇO :

AOS MEUS AMIGOS:

da infância

PAULA, TONHO, SILVANA e JOÃO

da graduação

ALEX, BORIS, RICARDO, ZÉ ROBERTO, MAURÍCIO, CLÁUDIA, LUCELI  
e ÉRICA

da pós graduação

SÍLVIA, MARLY, HERNANDES, NAZÁRIO, MARCO, VERA, BEL, ESTELA,  
ANA PAULA e KÁTIA

da república

SÔNIA, ISABEL, FÁBIO, HÉLIO, CÍNTIA, OSCAR, VANILDE e MÔNICA

À minha orientadora

MARY ANNE HEIDI DOLDER

Às minhas professoras

ADELINA, SÔNIA MARIA, ASTRIDE, TERCÍLIA, LETÍCIA E BERNADETE

À estas e tantas outras pessoas que  
Deus colocou em meu caminho para  
alegrar meus dias.

## AGRADECIMENTOS

Ao término deste trabalho quero demonstrar minha sincera gratidão às pessoas e entidades que colaboraram direta ou indiretamente para que este fôsse findado.

À Professora Doutora Mary Anne Heidi Dolder, orientadora e amiga, que com sua dedicação e exemplo de sabedoria e inteligência me conduziu até aqui.

À Professora Doutora Maria Luiza Silveira Mello, pelas ricas sugestões durante a leitura deste trabalho e pelo exemplo de eficiência e rigor científico.

Ao Professor Doutor Flávio Henrique Caetano, pelas sugestões apresentadas na leitura deste e pela amizade.

À Professora Doutora Maria Alice da Cruz Höffling, pelas sugestões na leitura deste, pela convivência e pela amizade.

Ao Professor Doutor Adão José Cardoso e ao acadêmico Ariovaldo José Giaretta pelo auxílio nas coletas e identificação dos animais



Aos Professores do Departamento de Biologia Celular desta Instituição: Dr. Angelo Luiz Cortelazzo, Dra. Maria Lúcia Furlan Wada, Dra. Laurecir Gomes, Dra. Maria Luiza Silveira Mello, Dr. Benedicto de Campos Vidal, Dr. Edson Rosa Pimentel, Dra. Shirlei Maria Recco Pimentel e Hernandes Faustino de Carvalho, pelos ensinamentos e convivência salutar e agradável.

Aos Funcionários do Departamento de Biologia Celular desta Instituição: Cidinha, Lillian, Francisco, Ester, Mário, Sidney, D. Irma e D. Luiza, pela amizade, carinho e eficiência.

À Srta. Sílvia Regina Pérgamo de Miranda, pela cuidadosa leitura desta, pelos auxílios no uso do microcomputador e pelo carinho e amizade.

À chefe da Biblioteca do Instituto de Biologia, Sra. Ana Gagliardi, e demais funcionários pela eficiência e prontidão no auxílio durante a revisão bibliográfica.

Aos Centros de microscopia eletrônica do Instituto de Biologia e da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP e do Instituto de Biologia da Universidade Estadual Paulista UNESP - Rio Claro, pelo uso dos aparelhos para a análise do material de tese.

Aos funcionários do Centro de microscopia eletrônica do Instituto de Biologia - UNICAMP: Terezinha, Bauer, Antonia, Loló e Adriana, pelo auxílio e amizade.

Às professoras do Departamento de Biologia da UNESP - São José do Rio Preto: Dra. Adelina Buzini da Costa-Silva, Dra. Maria Astride Saad Corradi, Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira e Sônia Maria Oliani, pelo incentivo e por terem me mostrado as maravilhas da Biologia Celular.

Às professoras do Colégio "Dinah Lúcia Balestrero" - Brotas (SP), Maria Letícia Jordani e Bernadete Jordani Barbosa, por mostrarem-me quão linda é a Biologia.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela bolsa de estudos usufruída durante o período de desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais Sr. Sebastião Taboga Filho e Sra. Maria Ivone Rebecca Taboga, por terem confiado em minha capacidade e investido na minha carreira científica.

A Deus, pai de bondade infinita, pela vida e pelas maravilhas que me concede, todos os dias de minha história.

## ÍNDICE

INTRODUÇÃO .....	2
1. Panorama geral dos Anfíbios .....	2
2. A Ordem Anura .....	2
3. A Família Hylidae .....	4
4. A espécie <i>Hyla ranki</i> (ANDRADE & CARDOSO, 1987) ...	5
6. Os Espermatozóides dos Anfíbios .....	6
OBJETIVOS .....	14
MATERIAL E MÉTODOS .....	16
1. Material .....	16
2. Métodos .....	18
2.1. Preparo dos testículos para microscopia de luz .....	18
2.1.1. Coloração por hematoxilina-eosina ...	19
2.1.2. Tratamento pelo azul de toluidina a pH 4,0 .....	20
2.1.3. Teste do PAS .....	20
2.2. Preparo dos testículos para microscopia eletrônica .....	21
2.2.1. Fixação I .....	21

2.2.2. Fixação II .....	22
2.2.3. Fixação III - Detecção de proteínas básicas .....	23
2.2.4. Fixação IV - Detecção de proteínas básicas .....	23
2.2.5. Desidratação e Inclusão .....	24
2.3. Obtenção de cortes semifinos .....	25
2.4. Obtenção de cortes ultra-finos .....	26
2.5. Observação e obtenção das micrografias .....	27
RESULTADOS .....	28
1. O aparelho reprodutor masculino .....	28
2. Organização tecidual dos testículos .....	32
3. Aspectos morfológicos das células germinativas ..	34
3.1. Espermatogônias .....	34
3.2. Espermatócitos .....	34
3.3. Espermátides .....	35
3.4. Espermatozóides .....	36
4. Reações citoquímicas .....	45
4.1. Tratamento pelo azul de toluidina a pH 4,0.	45
4.2. Teste do PAS .....	48
5. Aspectos ultra-estruturais .....	51
5.1. Espermatogônias .....	51
5.2. Espermatócitos .....	57
5.3. Espermátides .....	65

5.3.1. Formação do acrossomo .....	65
5.3.2. Alongamento e compactação do material nuclear e processos citoplasmáticos associados .....	73
5.3.3. Desenvolvimento do filamento caudal ..	85
5.4. Espermiogênese anormal .....	100
5.5. Detecção de proteínas básicas pelo E-PTA ...	105
 DISCUSSÃO .....	 115
1. Organização tecidual dos testículos .....	115
2. Aspectos estruturais e ultra-estruturais das cé- lulas germinativas .....	116
2.1. Espermatogônias .....	118
2.2. Espermatócitos .....	120
2.3. Espermátides .....	123
2.3.1. Formação do acrossomo .....	124
2.3.2. Alongamento e compactação do material nuclear e processos citoplasmáticos associados .....	127
2.3.3. Desenvolvimento do filamento caudal ..	131
2.4. Espermiogênese anormal .....	138
3. Reações citoquímicas .....	139
3.1. A basofilia nuclear com o azul de toluidina a pH 4,0 .....	139
3.2. A reatividade ao Teste do PAS .....	142
3.3. Detecção de proteínas básicas pelo E-PTA ...	144

CONCLUSÕES .....	149
RESUMO .....	151
SUMMARY .....	153
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	155

ESTUDO ESTRUTURAL, ULTRA-ESTRUTURAL E  
CITOQUÍMICO DA ESPERMATOGÊNESE, COM ÊNFASE NA  
ESPERMIOGÊNESE DE Hyla ranki (AMPHIBIA,  
ANURA, HYLIDAE).

# INTRODUÇÃO



# INTRODUÇÃO

## 1. Panorama Geral dos Anfíbios

A classe Amphibia está dividida em três subclasses: Labyrinthodontia, Lepsospondilis e Lissamphibia (DUELLMAN & TRUEB, 1986).

As duas primeiras subclasses foram as pioneiras sobre a face da Terra há cerca de 350 milhões de anos, tendo se extinguido após 200 milhões de anos (ALMEIDA, 1984).

A subclasse Lissamphibia apareceu no período Jurássico da era Mesozóica, há cerca de 150 milhões de anos. Expandiu-se rapidamente e apresenta atualmente cerca de 3.000 espécies distribuídas em três Ordens: Anura (Salientia), Urodela (Caudata) e Apoda (Gymnophiona). Do total de espécies vivas, 85% são Anuros, 10% são Urodelos e 5% Ápodos (ALMEIDA, 1984).

## 2. A Ordem Anura

A ordem Anura, a mais bem sucedida dos anfíbios, apresenta 77% de suas famílias com centro de distribuição tropical, 14% em áreas sub-tropicais do hemisfério norte e 9% distribuídas pelo restante do Globo.

Os Anura, também chamados de Salientia, são anfíbios sem cauda, possuindo membros posteriores modificados para o salto; os indivíduos desta Ordem são conhecidos como sapos, rãs e pererecas (ORR, 1986).

Uma dúvida comum a leigos e até mesmo a biólogos não especialistas em anfíbios é o uso destes nomes populares. A grosso modo, sapos seriam anfíbios anuros que apresentam pele rugosa e de aspecto seco, rãs teriam pele lisa e de aspecto úmido e pererecas possuiriam discos adesivos na ponta dos dedos, os quais facilitam a locomoção em superfícies inclinadas (MARTINS & SAZIMA, 1989).

A uniformidade morfológica dos anuros é característica, o que explica a fácil identificação da ordem. Entretanto, as semelhanças exibidas dentro do grupo tornam difíceis as análises das tendências filogenéticas e a distribuição dos caracteres convergentes dentro da Ordem (ALMEIDA, 1984).

Os estudos taxonômicos começaram em meados do século XVIII com LAURIENTI (1768), introdutor do termo sinônimo Salientia para denominação do grupo (apud GRIFFITHS, 1962).

Na década de 60, o conhecimento e melhor entendimento dos padrões de distribuição zoogeográfica (SAVAGE, 1973) e a melhor avaliação dos critérios filogenéticos dentro do grupo (GRIFFITHS, 1962), permitiram melhor classificação dos anuros. Porém, uma classificação ideal e completa não foi ainda alcançada (ALMEIDA, 1984). E

mesmo algumas famílias apresentam dificuldades de posicionamento taxonômico (BOGART, 1971; MORESCALCHI, 1968).

Estudos mais abrangentes e o desenvolvimento de novos critérios associando aspectos biológicos, ecológicos, comportamentais, bioacústicos, citogenéticos, dentre outros poderão ajudar a contornar estes problemas, levando a uma melhor compreensão da taxonomia e evolução dos anuros.

### 3. A Família Hylidae

Os Hylidae são taxonomicamente divididos em quatro subfamílias, contendo 630 espécies em 37 gêneros, e mais 2 gêneros fósseis (DUELLMAN & TRUEB, 1986). Muitos Hylidae podem ser identificados pela presença de discos adesivos na posição terminal dos dedos, contudo alguns Hylidae podem não possuí-los (STORER *et alii*, 1979).

Os Hylidae apresentam grande variedade e distribuição geográfica, tendo alcançado maior grau de diferenciação na região neo-tropical, que inclui o Brasil (ALMEIDA, 1984). Incluídos nesta família têm-se alguns gêneros de pererecas de tamanho reduzido e características de vocalização peculiares, à que a literatura se refere como complexo ou grupo rubra - catharinae, dos quais a espécie *Hyla ranki*, alvo deste estudo, faz parte.

O grupo rubra - catharinae é considerado pelos especialistas um grupo bastante complexo taxonomicamente, pois apresenta muitas dúvidas de ordem nomenclatural (ANDRADE & CARDOSO, 1987).

#### 4. A espécie Hyla ranki (ANDRADE & CARDOSO, 1987)

Espécie de pequeno porte (machos com 20-23mm), incluída no grupo catharinae, apresenta coloração dorsal castanha, mancha interocular triangular com ápice voltado para trás e região ventral clara com pontuações escuras, principalmente nos membros e região gular.

Os indivíduos são endêmicos do Morro do Ferro, município de Poços de Caldas, MG, encontrados em pequenas matas ciliares, local onde os machos vocalizam logo após o ocaso solar.

Os sítios de canto são geralmente pteridófitas (samambaias) e gramíneas numa altura variável entre 0,2 e 1 metro, estando esta vegetação à beira de riachos ou poças de água parada ou renovada (ANDRADE & CARDOSO, 1987).

## 5. Os Espermatozóides dos anfíbios

A maturação dos espermatozóides ocorre em lóculos nos testículos, que poderão ser lobulados (comum em urodelos) ou estruturas ovóides (característico de anuros), onde o espermatozóide é transportado através de ductos coletores para um ducto longitudinal que sai do testículo e chega aos rins por ductos eferentes (DUELLMAN & TRUEB, 1986).

Os espermatozóides maduros formam normalmente um tipo celular alongado e especialmente modificado para locomoção ativa (ALMEIDA, 1984). A morfologia básica dos espermatozóides de anfíbios consiste das seguintes estruturas lineares: capa acrossomal, cabeça, colo (peça intermediária) e flagelo em uma seqüência linear ântero-posterior (DUELLMAN & TRUEB, 1986); contudo algumas espécies podem possuir espermatozóides com estrutura espiralada (MIZUHIRA *et alii*, 1986) e piriforme (FURIERI, 1975).

Os espermatozóides dos anfíbios anuros apresentam grande variabilidade de morfologia na dependência da espécie analisada (BARKER & BAKER, 1970; NICANDER, 1970; WERNER, 1970 e WORTHAM *et alii*, 1977), e as proporções no tamanho da cabeça, peça intermediária e cauda podem sofrer variações consideráveis (BERNARDINI *et alii*, 1986). Até a década de 30 acreditava-se que os espermatozóides dos urodelos apresentavam uniformidade morfológica (NOBLE,

1931), porém estudos posteriores indicaram considerável diversidade na estrutura de tais espermatozóides (PICHERAL, 1972a; BRANDON et alli, 1974; WORTHAM et alli, 1977;).

A morfologia dos espermatozóides de vários Hylidae pertencentes ao gênero *Hyla* do grupo *rubra-catharinae* foram analisados por FOUQUETTE & DELLAHOUSSEY (1977), a nível de microscopia de luz. Estes autores descreveram aspectos comuns quanto à estrutura dos espermatozóides de indivíduos do complexo acima referido. A morfologia dos espermatozóides dos animais deste grupo é fusiforme, com seus componentes dispostos linearmente, semelhante ao que ocorre na maioria dos demais anuros.

A região anterior (cabeça e peça intermediária) dos espermatozóides destes animais se assemelha à de outros Hylidae. A diferença consiste na presença de dois filamentos caudais nos espermatozóides dos animais do grupo *rubra-catharinae*, enquanto os outros Hylidae possuem apenas um filamento caudal (ALMEIDA, 1984).

A presença de dois filamentos caudais sugere certo grau de primitividade, quando se compara com espermatozóides possuidores de apenas um filamento caudal (FOUQUETTE & DELLAHOUSSEY, 1977; ALMEIDA, 1984; THIAW et alli, 1986). O conservadorismo nas estruturas dos espermatozóides e as diferenças morfológicas e morfométricas encontradas entre componentes de espermatozóides de indivíduos da família Hylidae têm sido utilizados como referência taxonômica para a separação das espécies do grupo

rubra - catharinae dos demais Hylidae. FOUQUETTE & DELLAHOUSAYE (1977) propõem inclusive o resgate de um gênero, que estava em desuso, para os animais do referido grupo, o *Ololygon*, baseados nas diferenças morfológicas dos espermatozóides. Contudo, a aceitação do gênero *Ololygon* para as espécies do grupo rubra - catharinae é discutível; alguns autores aceitam a proposta (HEYER, 1980; DUELLMAN & TRUEB, 1986) e outros a questionam (CARDOSO & SAZIMA, 1980; ANDRADE & CARDOSO, 1987; CRUZ & PEIXOTO, 1982).

Em estudos com *Hyla fuscovaria*, ALMEIDA & CARDOSO (1985) detectaram que na maioria dos casos observados, apenas um dos filamentos caudais dos espermatozóides apresentava batimentos do tipo ondulatório, onde a movimentação da cauda se realizava como um todo, visto que os filamentos se apresentavam paralelos.

FOUQUETTE & DELLAHOUSAYE (1977), através da microscopia de luz, descrevem que pelo aspecto paralelo dos filamentos, ambos devem estar envolvidos por membrana comum aos dois, fato confirmado posteriormente por DOLDER & CARDOSO (1988) através da microscopia eletrônica de transmissão.

ALMEIDA (1984) e ALMEIDA & CARDOSO (1985) obtiveram resultados acerca da morfologia e morfometria dos espermatozóides de *Hyla fuscovaria*, os quais demonstraram variações significativas no comprimento das várias regiões dos espermatozóides. Estes dados levaram os autores a proporem que tal parâmetro é discutível, e deve ser

utilizado como elemento auxiliar nos estudos taxonômicos e não como critério sistemático de exclusão.

A importância da proposta de FOUQUETTE & DELLAHOUSAYE (1977) para a sistemática e a existência de considerável variabilidade morfológica já demonstrada nos espermatozóides das diversas espécies de vertebrados (BARKER & BAKER, 1970; NICANDER, 1970; RASTOGI et alii, 1988; PHILLIPS & ASA, 1989 e FAWCETT, 1975), tornam de grande interesse o estudo morfológico e ultraestrutural dos espermatozóides dos Hylidae do grupo rubra - catharinae, o qual inclui as espécies cujos espermatozóides apresentam duplo filamento caudal.

Dois ou mais filamentos caudais em espermatozóides ocorrem na maioria das espécies das famílias Ascaphidae, Liopelmatidae, Discoglossidae, Pipidae e Pelobatidae, consideradas famílias primitivas em outros caracteres. Mesmo que pareçam constituir uma cauda única (com um único filamento) à microscopia de luz, em muitos destes taxa primitivos, podem de fato ser dois filamentos compelidos juntos, o qual foi detectado no gênero Scaphiopus (MORRISETT, 1974 - apud FOUQUETTE & DELLAHOUSAYE, 1977), ou então um dos dois filamentos caudais, isto é, o bastão eletrodenso, se apresenta helicoidalmente disposto ao longo do axonema (DALTON et alii, 1989). Outros animais, ainda, como os da família Ranidae, não apresentam bastão axial eletrodenso à microscopia eletrônica. É o caso de *Rana pipiens* e *R. clamitans* (ZIRKIN, 1971; POIRRIER & SPINK,



1971). BERNARDINI *et alii* (1986), estudando espermatozóides de *Xenopus* também não detectaram a presença de nenhuma estrutura em forma de bastão axial ou qualquer acessório caudal associado ao axonema.

MORRISETT (1974 apud FOUQUETTE & DELLAHOUSSEY, 1977), em estudos ultraestruturais de espermatozóides de várias famílias de anuros, detectou no exemplo de gênero *Hyla* uma cauda constituída verdadeiramente por um simples flagelo.

Estudos ultra-estruturais em vários anfíbios, tanto em urodelos (BARKER & BAKER, 1970 ; WERNER, 1970), como em anuros (SANDOZ, 1973; NICANDER, 1970; RASTOGI *et alii*, 1988 ; GATENBY, 1961; DALTON *et alii*, 1989) mostraram uma peça eletrodensa que se dispunha paralela ou helicoidalmente à cauda, muitas vezes assumindo a forma de bastão. Principalmente nos anuros esta peça era bastante uniforme em seu diâmetro e separava-se do axonema por uma membrana ondulante. Além deste bastão axial ocorria também com frequência a presença de um filamento marginal de origem semelhante ao bastão, que podia estar presente na altura do 3º par de microtúbulos do axonema (DALTON *et alii*, 1989) no anuro *Odontophrynus cultripes* ou na altura do 8º par (PICHERAL, 1972a) no urodelo *Pleurodelis waltlii*.

Em espermatozóides de *Hyla caldarum* foi demonstrado que o flagelo apresentava apenas um axonema típico de vertebrados, e não dois filamentos caudais como visto à microscopia de luz (DOLDER & CARDOSO, 1988).

Estes mesmos autores encontraram também um bastonete eletrodenso disposto paralelamente ao axonema e também o filamento marginal, ambos estando envolvidos pela membrana plasmática, o que podia se sugerir, a nível de microscopia de luz uma cauda de duplo filamento.

DALTON e colaboradores (1989), estudando o anuro *Odontophrynus cultripes*, determinaram a natureza proteinácea do bastão axial, sendo este constituído principalmente por proteínas básicas (E-PTA positivas). Entretanto, neste animal o bastonete dispõe-se helicoidalmente ao axonema e não paralelamente como encontrado por DOLDER & CARDOSO (1988), analisando os espermatozóides de *Hyla caldarum*.

A natureza básica das proteínas do bastão eletrodenso de espermatozóides da salamandra *Triturus alpestris* L. foi determinada citoquímica e bioquimicamente, assim como o seu seqüenciamento de aminoácidos a partir de frações das referidas proteínas (WERNER et alii, 1972).

Este tipo de estrutura de bastonete eletrodenso foi observado em espermatozóides do anfíbio *Discoglossus pictus*, (SANDOZ, 1973) e também de *Pachymedusa dachnicolor* (RASTOGI et alii, 1988), de *Bufo arenarum* em réplicas de criofratura (CAVICCHIA & MOVIGLIA, 1982) e de *Bufo vulgaris* (NICANDER, 1970). Contudo a disposição helicoidal ou paralela do bastonete não ficou bem estabelecida.

RASTOGI et alii (1988), estudando a reprodução em *P. dacnicolor*, determinaram o desenvolvimento do seu espermatozóide e as fases que envolvem a diferenciação de tal célula.

Quanto à espermiogênese dos anfíbios, outros enfoques ultra-estruturais tem sido dados, dentre eles a formação do acrossomo (SANDOZ, 1970; PICHERAL, 1972b e SANDOZ, 1973), modificações citoplasmáticas e eliminação de membranas (PICHERAL, 1972c e SPRANDO & RUSSELL, 1988a). No entanto os estudos são apresentados com certa compartimentalização e não como um todo.

Da mesma forma, embora RASTOGI et alii (1988) tenham determinado todo um curso da espermatogênese, em *P. dacnicolor*, muitas são ainda as questões acerca do estudo da espermatogênese e espermiogênese em Hylidae, principalmente os que se referem às espécies do grupo rubra-catharinae.

Estudos de basofilia nuclear em espermatozóides, bem como tipos de complexos DNA-proteínas nestas células, tem sido estudados em *Triatoma infestans* (MELLO, 1987), boi (BRITO & MELLO, 1988) e gafanhoto (MELLO & VIDAL, 1977). Também em outros tipos celulares, como células do túbulo de Malpighi de *T. infestans* testes de interação DNA-protaminas tem sido feitos, promovendo diferentes respostas de basofilia e metacromasia na eu e heterocromatina (MELLO, 1985). Embora trabalhos de caracterização de proteínas básicas nucleares tenham sido

feitos em anfíbios (BLOCH, 1969; ZIRKIN, 1970; KASINSKY, 1989) nada existe na literatura a respeito de basofilia nuclear e caracterização citoquímica de complexos DNA-proteínas em espermatozoides destes animais.

A caracterização citoquímica de acrossomos em microscopia de luz tem sido feita em espermatozoides de urodelos pelas técnicas do Proteinato de Prata e PAS (PICHERAL, 1972b). Entretanto, em anuros, devido ao seu tamanho reduzido pouco se conhece sobre a sua estrutura e composição química. Por isso o nosso interesse, além da caracterização estrutural e ultra-estrutural, também o estudo citoquímico da espermatogênese com principal enfoque na citodiferenciação espermática em *Hyla ranki*.

**OBJETIVOS**

## OBJETIVOS

Tendo em vista a carência de informações à cerca da morfologia tecidual dos testículos e processos que envolvem a maturação dos espermatozóides, o objetivo principal deste trabalho é contribuir para a análise estrutural, citoquímica e ultra-estrutural da espermatogênese de *Hyla ranki*.

A referida espécie, descrita recentemente por ANDRADE & CARDOSO (1987), é endêmica de uma região com elevada taxa de radioatividade natural (Morro do Ferro - MG), fato que desperta interesse nos estudos destes animais. Também a carência de informações acerca da biologia reprodutiva deste animal levou-nos à escolha do mesmo.

No presente estudo será dado enfoque nos seguintes tópicos:

1. Estudo histológico dos testículos, bem como análise estrutural e ultra-estrutural das células germinativas ao longo da espermatogênese.
2. Estudos citoquímicos relacionados com a formação e maturação dos espermatozóides durante o processo de espermiogênese.

3 Estudos citoquímicos e ultraestruturais do bastonete que se dispõe paralelamente ao axonema flagelar.

4. Estudo citoquímico e ultraestrutural do comportamento nuclear (compactação cromatínica e tipos de complexos DNA-proteínas) ao longo do processo de espermiogênese.

Para atingir os objetivos propostos serão utilizadas metodologias para a análise à microscopia de luz e eletrônica de transmissão, as quais estão descritas pormenorizadamente no capítulo seguinte.

## **MATERIAL E MÉTODOS**



# MATERIAL E MÉTODOS

## 1. MATERIAL

Machos adultos de *Hyla ranki* (foto 1) foram coletados em pequenas matas ciliares por volta de 20:00 horas, quando estes animais vocalizavam para a atração das fêmeas. O local de coleta foi a região endêmica da espécie, Morro do Ferro, município de Poços de Caldas, Minas Gerais.

Os animais coletados foram identificados pelo Prof. Dr. Adão José Cardoso do Departamento de Zoologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (I.B.- UNICAMP).

Tendo sido os animais coletados e devidamente classificados, não se ultrapassaram 12 horas para que se processasse a sua dissecação. Durante este período, até o momento da dissecação para a retirada dos testículos, os animais foram mantidos em sacos plásticos gotejados com água em caixas de isopor com algumas pedras de gelo, para a manutenção da temperatura e umidade próprias do local de coleta.



Foto 1. Macho adulto de *Hyla ranki*  
(H. Dolder).

## 2. MÉTODOS

### 2.1. Preparo dos testículos para microscopia de luz

Os animais anestesiados com éter sulfúrico foram dissecados ao microscópio estereoscópio Zeiss em solução fixadora de Paraformol - Glutaraldeído 4% preparada em tampão fosfato pH 7,2. Os testículos depois de removidos foram mantidos no fixador por 24 horas a 4°C.

Após a lavagem em água destilada, os testículos foram desidratados em uma série crescente de álcool etílico, partindo de 70% até 100% (2 banhos), permanecendo 1 hora em cada banho.

Depois, os testículos foram submetidos a 3 banhos em misturas de álcool etílico-xilol (V/V), em concentrações de mistura crescentes para xilol, isto é, álcool-xilol 2:1 por 1 hora, álcool-xilol 1:1 por 1 hora e álcool-xilol 1:2 por 1 hora.

A diafanização se deu em xilol P.A., onde os testículos permaneceram imersos até a clarificação do material (imersão não superior a 1 hora).

O emblocamento se deu em parafina p.f. 57°C depois do material ter permanecido em parafina fundida (3 banhos de 1 hora cada) em estufa a 60°C.

Uma vez incluídos, os testículos foram seccionados em cortes seriados de 6 µm em micrótomo manual R. Jung - Heidelberg e distendidos em banho-Maria à aproximadamente 40°C.

Depois de distendidos em lâminas de vidro previamente preparadas com albumina 10%, os cortes permaneceram em estufa a 37°C por 30 minutos e em geladeira por 24 horas para melhor adesão nas lâminas. Retirados da estufa, os cortes foram imersos em 2 banhos de xilol por 15 minutos cada e subseqüentemente em uma mistura de metanol-clorofórmio 1:1 (V/V), onde permaneceram por 2 horas a fim de se remover a gordura dos testículos. Posteriormente se procedeu à hidratação do material em uma série decrescente de álcool etílico, partindo da concentração 100% até a de 50%. Depois os cortes foram lavados em água destilada por 10 minutos e em água corrente por 5 minutos. Uma vez hidratados, os cortes estavam prontos para proceder-se às colorações. Os testículos assim processados foram submetidos às colorações por Hematoxilina-Eosina e Azul de Toluidina a pH 4,0. Tais técnicas foram utilizadas respectivamente com a finalidade de estudar a histologia do órgão e a basofilia nuclear das células germinativas.

#### **2.1.1. Coloração por hematoxilina-eosina:**

Os cortes depois de hidratados foram corados pela hematoxilina de Harris por 4 minutos e então lavados em água corrente por 10 minutos. Posteriormente foram contra-corados com solução de eosina diluída em álcool etílico 95% por 15 minutos. Em seguida, os cortes foram lavados em álcool etílico 95% e 100% e clarificados em xilol P.A. A montagem do material se deu em bálsamo do Canadá.

### 2.1.2. Tratamento pelo azul de toluidina a pH 4,0

Os cortes devidamente hidratados, foram corados pelo azul de toluidina em tampão McIlvaine a pH 4,0 por 15 minutos, segundo o método de Vidal (MELLO & VIDAL, 1980) e depois lavados rapidamente em água corrente e secos ao ar. Foram clarificados em xilol PA. e a montagem das lamínulas se deu em bálsamo do Canadá.

### 2.1.3. Teste do PAS

Para o procedimento deste teste, os testículos foram fixados em uma solução 3:1 de etanol - ácido acético (V/V) por 20 minutos a 40°C, condições escolhidas após testes preliminares.

Depois de lavados por dez minutos em água corrente, os testículos foram desidratados, clarificados em xilol, emblocados em parafina, cortados, montados e reidratados como descrito no item 2.1.

Os cortes hidratados, foram oxidados pelo Ácido Periódico 0,5% por 10 minutos. Após serem lavados em vários banhos de água destilada por 5 minutos e levemente secos, os cortes foram tratados pelo reativo Schiff segundo Lillie (MELLO & VIDAL, 1980) por 9 minutos. Com a finalidade de se remover as moléculas do reativo excedentes e não ligadas ao substrato, processou-se à lavagem dos cortes em

pelos menos 3 banhos de água sulfurosa (metabissulfito de sódio: ácido clorídrico 1N: água destilada, 1:1:18, V/V/V).

Depois da lavagem em água destilada por 5 minutos, desidratação rápida e diafanização em xilol PA., os cortes foram montados sob lamínulas com bálsamo do Canadá.

## **2.2. Preparo dos testículos para microscopia eletrônica**

Os animais foram anestesiados com éter sulfúrico e dissecados sob microscópio estereoscópico. A dissecação e fragmentação dos testículos em pedaços de aproximadamente 0,5 mm se deu em solução de glutaraldeído 3% em tampão fosfato Sörensen 0,1M pH 7,4 (GLAUERT, 1975) contendo 3,5% de sacarose e traços de cloreto de cálcio.

Quatro procedimentos distintos de fixação foram desenvolvidos neste trabalho e são descritos abaixo:

### **2.2.1. Fixação I**

Os fragmentos permaneceram no fixador acima referido por 3 horas a 4°C. Após uma lavagem de 1 hora e 30 minutos no tampão Sörensen em que o fixador foi diluído (2 trocas do tampão), os fragmentos foram tratados com

solução de tetróxido de ósmio 2% diluído no mesmo tampão fosfato por 1 hora a 4°C, e lavados rapidamente em tampão fosfato.

Posteriormente submeteu-se os fragmentos ao tratamento pelo ácido tânico 2% em tampão fosfato Sörensen 0,1M, pH 7,4 por 1 hora a 4°C, a fim de se obter maior contraste do material no momento da análise (método segundo SIMIONESCU & SIMIONESCU, 1976 a, b, com algumas modificações).

Os fragmentos passaram por uma rápida lavagem em água destilada a 4°C e foram então, submetidos ao processo de desidratação em uma série crescente de álcool etílico como descrita no item 2.2.5.

### 2.2.2. Fixação II

Os fragmentos de testículos permaneceram no glutaraldeído 3% em tampão fosfato Sörensen 0,1M pH 7,4 contendo 3,5% de sacarose e traços de cloreto de cálcio por um período de 15 horas a 4°C ("overnight").

No dia seguinte procedeu-se à lavagem dos fragmentos no tampão diluente do fixador por um período de 5 horas a 4°C. Depois de lavados, os fragmentos foram imersos numa solução de tetróxido de ósmio 2% em tampão fosfato Sörensen 0,1M pH 7,4 por 1 hora a 4°C. Após rápida lavagem no mesmo tampão, os fragmentos foram tratados pela solução de ácido tânico 2% no mesmo tampão por 1 hora a 4°C

(SIMIONESCU & SIMIONESCU, 1976 a, b, com algumas modificações).

Depois de uma rápida lavagem em água destilada a 4°C processou-se à desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico (descrita no item 2.2.5.).

### 2.2.3. Fixação III - Detecção de proteínas básicas

Os fragmentos de testículos permaneceram no fixador (glutaraldeído 3% em tampão fosfato Sörensen 0,1M pH 7,4 contendo 3,5% de sacarose e traços de cloreto de cálcio) por 2 horas e 30 minutos a 4°C, depois lavados por 1 hora e 15 minutos a 4°C no tampão diluente; após uma rápida lavagem em água destilada a 4°C, procedeu-se à desidratação em uma série crescente de álcool etílico (como descritas no item 2.2.5.).

O álcool etílico 95% utilizado nesta desidratação continha 1% de ácido fosfotúngstico (PTA) segundo BLOOM & AGHAJANIAN (1968). Tal metodologia promove uma seleção na eletrodensidade das proteínas básicas. O termo E-PTA é uma abreviação do nome em inglês "Ethanollic - Phosphotungstic Acid".

### 2.2.4. Fixação IV - Detecção de proteínas básicas

Os fragmentos de testículos permaneceram no fixador (glutaraldeído 3% em tampão fosfato Sörensen 0,1M pH 7,4 contendo 3,5% de sacarose e traços de cloreto de cálcio) por 15 horas a 4°C ("overnight"). Depois



de uma lavagem em tampão fosfato Sørensen por 5 horas a 4°C e rápida lavagem em água destilada a 4°C, procedeu-se à desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico (item 2.2.5).

O álcool etílico 95% utilizado na desidratação deste material continha 1% de ácido fosfotúngstico (PTA) segundo BLOOM & AGHAJANIAN (1968).

### 2.2.5. Desidratação e Inclusão

Após a lavagem dos fragmentos em água destilada a 4°C, em pequeno volume adicionou-se álcool etílico 95%, gota a gota, durante 15 minutos a 4°C até a obtenção do dobro do volume inicial da água destilada, obtendo-se portanto, uma concentração final de álcool etílico próxima de 45%.

Desprezou-se metade do volume do álcool etílico 45% no qual estavam imersos os fragmentos de testículos e adicionou-se, gota a gota, álcool etílico 95% durante 15 minutos a 4°C, até a obtenção do volume inicial do álcool etílico 45%, obtendo-se portanto, uma concentração de álcool etílico final de 75% aproximadamente.

O volume total de álcool etílico 75% foi substituído por álcool etílico 95% a 4°C, ficando os fragmentos nele imersos por 15 minutos. Este processo se deu por mais duas vezes, ficando os fragmentos por 45 minutos a 4°C no referido álcool.

O álcool etílico 95% foi substituído pelo álcool etílico 100%, à temperatura ambiente, ficando o material em contato com o referido álcool durante 30 minutos (3 banhos de 10 minutos).

Uma vez desidratados os fragmentos de testículos, desprezou-se metade do volume do álcool etílico 100% e adicionou-se, acetona até a obtenção do volume inicial do álcool, concentração final 1:1 (V/V), durante 5 minutos em temperatura ambiente.

Posteriormente imergiu-se os fragmentos em dois banhos de acetona, ficando estes 5 minutos em cada banho.

Os fragmentos foram então embebidos em uma mistura de Epon-acetona (1:1), V/V, "overnight" em frasco aberto inclinado, à temperatura ambiente. Na manhã seguinte processou-se à inclusão do material em Epon-812, utilizando-se a forma dura (mistura B) descrita por LUFT (1961) para a obtenção da máxima dureza final dos blocos. Os blocos permaneceram em estufa a 60°C até a completa polimerização do Epon.

### 2.3. Obtenção de cortes semifinos

Os cortes semifinos de aproximadamente 0,5µm de espessura foram obtidos em ultramicrótomo LKB, com utilização de navalhas de vidro.

Estes cortes foram coletados em lâminas de vidro, e depois de secos e aderidos nas referidas lâminas, processou-se à sua coloração, gotejando sobre os mesmos a solução de azul de toluidina a 1% (diluída em solução a 0,5% de carbonato de sódio). Depois de corados os cortes foram lavados rápida e delicadamente em água corrente a fim de se remover o excesso de corante. Depois dos cortes ficarem bem secos, procedeu-se ao tratamento pelo xilol PA. e à montagem das lâminas em bálsamo do Canadá.

#### 2.4. Obtenção de cortes ultra-finos

Cortes ultra-finos de aproximadamente 30 a 50 nm de espessura; apresentando coloração que variava do cinza ao levemente dourado, segundo a escala de cores de interferência proposta por PEACHEY (1958), foram obtidos em ultramicrótomo LKB com utilização de navalhas de vidro.

Estes cortes foram colhidos em telas de cobre de 200 "mesh" e contrastados em solução aquosa de acetato de uranila a 2% por 30 minutos à temperatura ambiente (WATSON, 1958). Depois de rápida lavagem em água bidestilada e secagem, colocaram os cortes na superfície de uma gota de citrato de chumbo a 2% em solução 1N de hidróxido de sódio (VENABLE & COGGESHALL, 1965, modificado) por 2 minutos à temperatura ambiente e dentro de placa de

Petri selada, onde grande parte do dióxido de carbono é absorvido por pastilhas de hidróxido de sódio. Depois de rápida e cuidadosa lavagem em água bidestilada, as telas foram secas ao ar.

## 2.5. Observação e obtenção das micrografias

As lâminas foram observadas em Fotomicroscópio ZEISS e fotografadas em filmes Kodak Panatomic-X, 32 ASA (135) e Kodacolor II, 100 ASA (135).

A observação das telas se deu em microscópio eletrônico de transmissão ZEISS EM 9S - 2, operado em 60 kV do Centro de Microscopia Eletônica do Instituto de Biologia da UNICAMP e algumas telas foram observadas no ZEISS EM-10 C operado em 60 kV, do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas- UNICAMP e outras em microscópio eletrônico de transmissão ZEISS EM 9S - 2, operado em 60 kV do Departamento de Biologia da Universidade Estadual Paulista - UNESP - campus de Rio Claro (SP). As eletromicrografias foram obtidas em filmes Fuji (Fuji-Electron-Microscopy Film - FG).

A revelação dos filmes e ampliação em papel se deu de maneira rotineira no laboratório fotográfico do Departamento de Biologia Celular.

**RESULTADOS**

## RESULTADOS

Os resultados obtidos da análise dos testículos em microscopia de luz, bem como os resultados das reações citoquímicas serão apresentados separadamente daqueles obtidos a partir da análise das telas em microscópio eletrônico de transmissão, por uma questão de estética e na tentativa de facilitar a compreensão das pranchas de micrografias e micrografias eletrônicas.

### 1. O aparelho reprodutor masculino

Os nossos resultados acerca da localização anatômica e morfologia externa dos testículos, bem como a sua íntima relação com os rins, não apresentam nada que contradiga os descritos por DUELLMAN & TRUEB (1986), ORR (1986) e NOBLE (1931), além da vasta literatura de cunho didático-acadêmico.

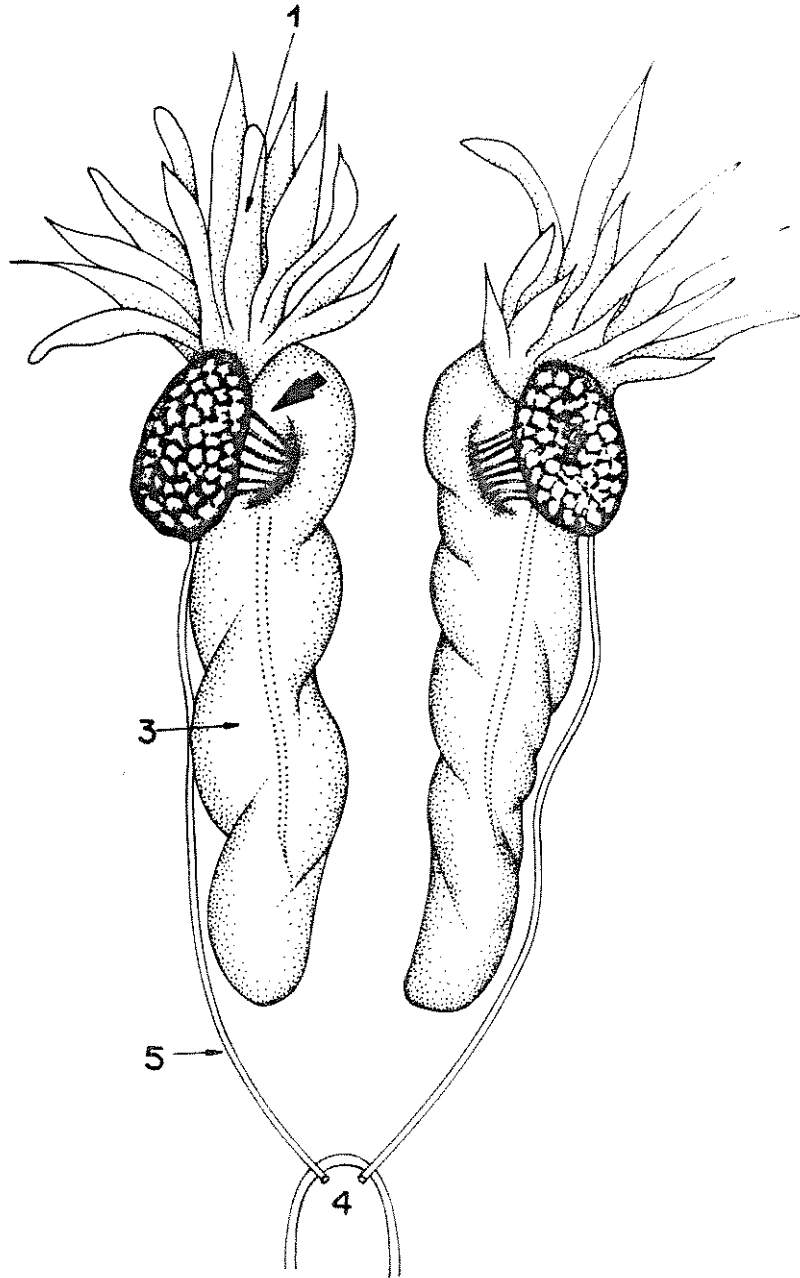
Contudo podemos acrescentar à descrição do aparelho urogenital da espécie *H. ranki*, que os testículos são ovóides, não ultrapassando 3mm no diâmetro maior por 2mm no diâmetro menor (Esq. I).

Estes testículos apresentam granulações esféricas pequenas em seu interior que podem ser vistas ao microscópio estereoscópico por transparência da cápsula

testicular e a coloração do órgão é branco amarelada.

Como na maioria dos anuros, também encontramos um par de corpos adiposos amarelo-alaranjados bem desenvolvidos.

Pode-se também observar que os ductos deferentes partem dos testículos para os rins através de ductos menores, e estes desembocam em um par de ductos coletores que farão conexão com a cloaca para a eliminação dos espermatozóides.





## 2. Organização tecidual dos testículos

A análise dos cortes histológicos de 6 micrômetros (inclusão em parafina) bem como a dos cortes semi-finos (inclusão em Epon-812) revelaram que os testículos apresentam uma fina cápsula testicular rica em fibras conjuntivas e musculares lisas com vasos sangüíneos permeando a cápsula e o tecido germinativo (Figs. 1 a 4).

Os espermatozoides se desenvolvem no interior de lóculos ou lojas seminíferas dispostas por toda a área testicular (Figs. 2 e 3), sendo que estes lóculos são delimitados por um tecido conjuntivo frouxo (Fig. 3).

No interior das lojas seminíferas encontrou-se células germinativas em diferentes estádios de diferenciação (Fig. 4) e freqüentemente encontrou-se no tecido germinativo células em divisão meiótica (Figs. 8 a 12).

Entre as lojas seminíferas foram encontrados ductos com espermatozoides maduros no lúmem. Estes ductos apresentam paredes constituídas por células pavimentosas, o que aumenta ainda mais a luz do ducto (Figs. 20 e 21).

O posicionamento dos espermatozoides maduros, ou em estágio avançado de maturação no lúmem dos lóculos seminíferos parece não obedecer uma organização

preferencial (Figs. 4 e 17), contudo as espermatídes em diferentes estádios de maturação se posicionam entremeadas ao citoplasma de células de Sertoli, formando feixes bem organizados (Figs. 14, 15 e 18).

No estudo morfológico do processo de espermatogênese e diferenciação das células germinativas de *Hyla ranki* é observada uma íntima relação entre as células da linhagem germinativa e as células de Sertoli. As células germinativas, ainda arredondadas, relacionam-se com as células de Sertoli, formando grandes espermatocistos (Figs. 3 e 4 e Esq. II.2).

As células de Sertoli são bastante freqüentes em tais lóculos e apresentam núcleos com morfologia irregular e citoplasma bastante amplo (Figs. 6, 14 e 16).

### 3. Aspectos morfológicos das células germinativas

A produção dos espermatozóides em *Hyla ranki*, é contínua nas lojas seminíferas e pode-se encontrar numa mesma loja estádios diferentes do desenvolvimento de células germinativas (figs. 3 e 4).

#### 3.1. Espermatogônias

Nos lóculos seminíferos, estas células podem ser classificadas como: 1. Espermatogônias primárias que são células volumosas com núcleo bastante irregular e pouco corado. Estes núcleos podem apresentar granulações correspondentes à cromatina condensada. A estas células se associa uma célula de Sertoli, que apresenta o núcleo com morfologia peculiar falciforme ou semi-lunar (Figs. 6 e 7 e Esq. II 1, 2). 2. Espermatogônias secundárias (ou cisto de espermatogônias ou espermatocistos) são caracterizados por apresentarem células com tamanho aproximadamente igual e com núcleos esféricos de diâmetros bastante uniformes. Estes apresentam granulações cromatínicas puntiformes uniformemente distribuídas (Fig. 7 e Esq. II 2).

#### 3.2. Espermatócitos

Estas células são caracterizadas pelos diferentes aspectos de condensação dos seus núcleos (Figs. 8 a 12). Em uma fase menos adiantada da divisão meiótica, o

material nuclear está condensado na periferia do núcleo (Fig. 10 e 11 e Esq. II 3b,c) e também puderam ser vistas células em metáfases meióticas (Fig. 12 e Esq. II 3d). Estas células se encontram nos espermatocistos e os núcleos apresentam sincronia de fases da divisão meiótica.

### 3.3. Espermátides

As espermátides são facilmente identificadas pelo seu aspecto bastante heterogêneo de diferenciação, variando desde o esférico ao fusiforme (Figs. 13 a 15 e Esq. II 4).

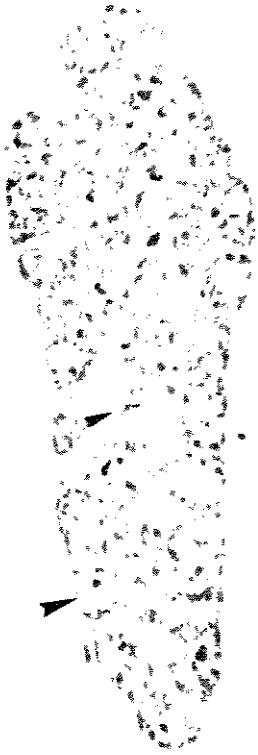
Na fase em que as espermátides se encontram com núcleos esféricos, pôde ser observado um acúmulo de vesículas golgianas que se fundem para formar uma ampla vesícula acrossômica (Fig. 13 e Esq. II 4a,b). Com esta metodologia o acrossomo não pôde ser observado nas espermátides em alongamento.

À medida que as espermátides se alongam, estas se organizam em feixes e são entremeadas pelos prolongamentos citoplasmáticos da célula de Sertoli, inexistindo o espermatocisto nesta fase. Neste momento de alongamento celular também pôde ser observada a formação dos filamentos caudais (Figs. 16 e Esq. II 4). As células mesmo alongadas apresentam uma notória quantidade de citoplasma (Figs. 14 e 15 e Esq. II 4c).

### 3.4. Espermatozoides

Os espermatozoides maduros apresentam um alto grau de compactação cromatínica e conspícua redução do material citoplasmático (Fig. 16 e Esq. II 5). Posicionam-se aos feixes entremeados pelo citoplasma das células de Sertoli e a cauda já está completamente formada, podendo-se inclusive notar o ponto inicial de formação na região proximal da cauda, isto é, no início da peça intermediária. O acrossomo não pode ser observado nesta fase pela microscopia de luz.

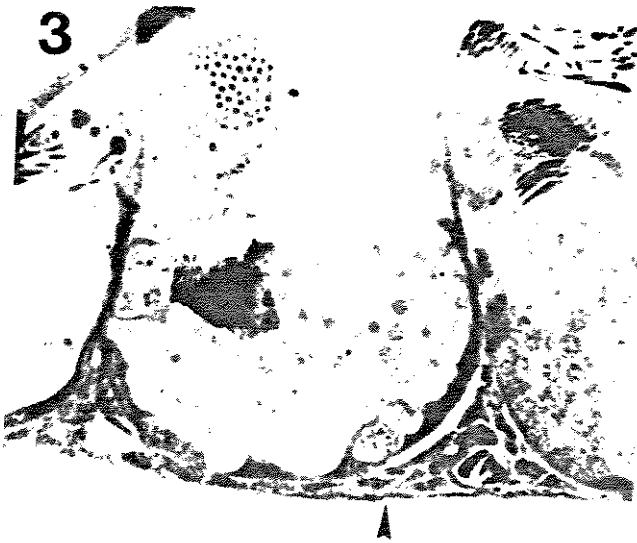
1

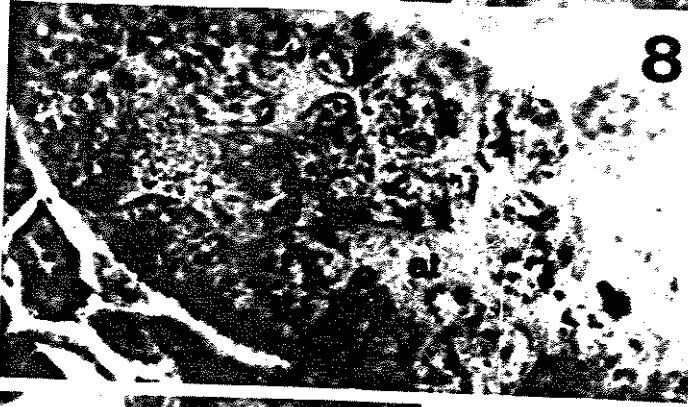


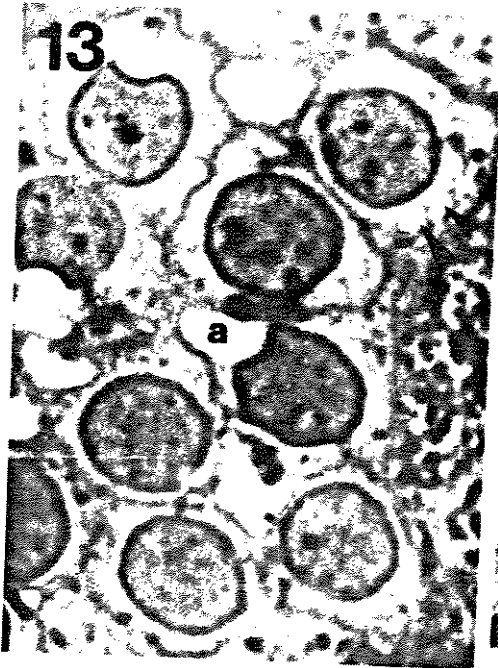
2



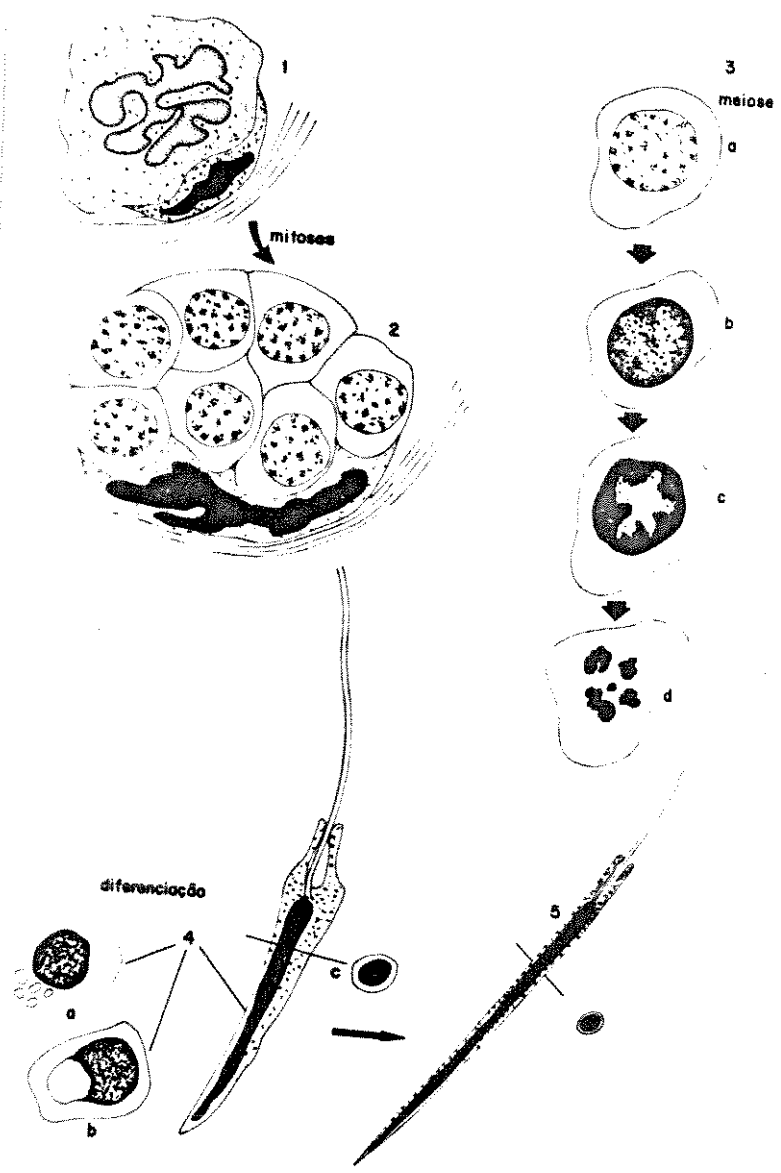
3











## 4. Reações citoquímicas

### 4.1. Tratamento pelo azul de toluidina a pH 4,0

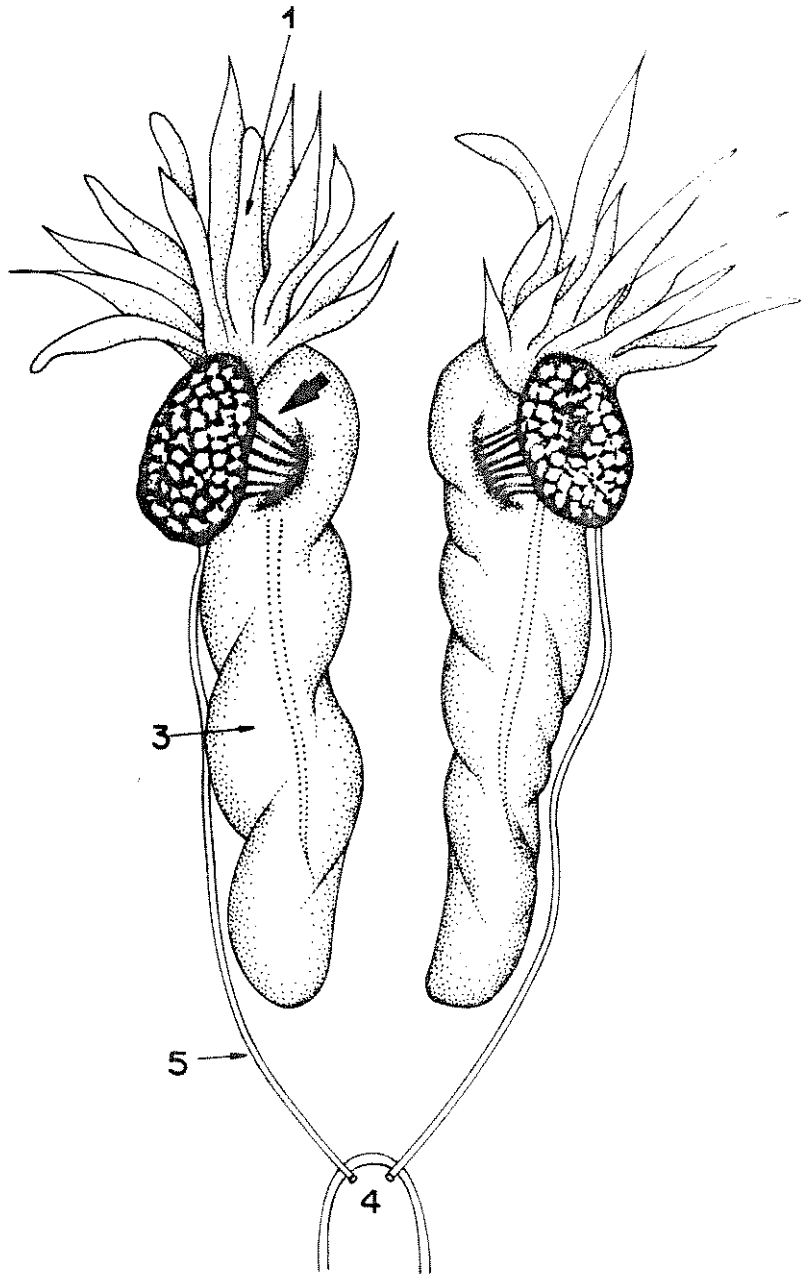
Esta reação evidenciando ácidos nucleicos, revelou uma notável diferença de associação das moléculas do corante com o substrato (DNA e RNA).

Neste pH, os grupos fosfatos dos ácidos nucleicos ligam-se à moléculas do corante proporcionando diferentes respostas de basofilia. Os núcleos apresentaram coloração azulada (metacromasia beta, segundo LISON, 1960). Os espermatozoides maduros apresentaram os núcleos com intensa metacromasia alfa (verde intenso) segundo LISON (1960) e o citoplasma das células imaturas apresentou-se, por vezes, com sutil metacromasia gama (coloração rósea) segundo LISON (1960) (Figs. 17 a 21).

Com esta técnica foi fácil a detecção dos ductos no tecido, devido às células parietais dos ductos apresentarem núcleos corados intensamente em azul, enquanto os espermatozoides maduros, apresentaram núcleos corados em verde (Figs. 17 e 18).

A figura 19 mostra espermatogônias e espermatócitos; estes apresentam seus cromossomos com aspecto morular, devido à compactação destes na metáfase.

ESQUEMA I. Representação esquemática do aparelho urogenital de um anuro. Corpos adiposos (1), testículos (2), rins (3) cloaca (4), túbulos coletores (5) e ductos deferentes (seta). Segundo ROMER (1970), modificado.



## 2. Organização tecidual dos testículos

A análise dos cortes histológicos de 6 micrômetros (inclusão em parafina) bem como a dos cortes semi-finos (inclusão em Epon-812) revelaram que os testículos apresentam uma fina cápsula testicular rica em fibras conjuntivas e musculares lisas com vasos sanguíneos permeando a cápsula e o tecido germinativo (Figs. 1 a 4).

Os espermatozóides se desenvolvem no interior de lóculos ou lojas seminíferas dispostas por toda a área testicular (Figs. 2 e 3), sendo que estes lóculos são delimitados por um tecido conjuntivo frouxo (Fig. 3).

No interior das lojas seminíferas encontrou-se células germinativas em diferentes estádios de diferenciação (Fig. 4) e freqüentemente encontrou-se no tecido germinativo células em divisão meiótica (Figs. 8 a 12).

Entre as lojas seminíferas foram encontrados ductos com espermatozóides maduros no lúmen. Estes ductos apresentam paredes constituídas por células pavimentosas, o que aumenta ainda mais a luz do ducto (Figs. 20 e 21).

O posicionamento dos espermatozóides maduros, ou em estágio avançado de maturação no lúmen dos lóculos seminíferos parece não obedecer uma organização

preferencial (Figs. 4 e 17), contudo as espermatídes em diferentes estádios de maturação se posicionam entremeadas ao citoplasma de células de Sertoli, formando feixes bem organizados (Figs. 14, 15 e 18).

No estudo morfológico do processo de espermatogênese e diferenciação das células germinativas de *Hyla ranki* é observada uma íntima relação entre as células da linhagem germinativa e as células de Sertoli. As células germinativas, ainda arredondadas, relacionam-se com as células de Sertoli, formando grandes espermatocistos (Figs. 3 e 4 e Esq. II.2).

As células de Sertoli são bastante freqüentes em tais lóculos e apresentam núcleos com morfologia irregular e citoplasma bastante amplo (Figs. 6, 14 e 16).

### **3. Aspectos morfológicos das células germinativas**

A produção dos espermatozóides em *Hyla ranki*, é contínua nas lojas seminíferas e pode-se encontrar numa mesma loja estádios diferentes do desenvolvimento de células germinativas (figs. 3 e 4).

#### **3.1. Espermatogônias**

Nos lóculos seminíferos, estas células podem ser classificadas como: 1. Espermatogônias primárias que são células volumosas com núcleo bastante irregular e pouco corado. Estes núcleos podem apresentar granulações correspondentes à cromatina condensada. À estas células se associa uma célula de Sertoli, que apresenta o núcleo com morfologia peculiar falciforme ou semi-lunar (Figs. 6 e 7 e Esq. II 1, 2). 2. Espermatogônias secundárias (ou cisto de espermatogônias ou espermatocistos) são caracterizados por apresentarem células com tamanho aproximadamente igual e com núcleos esféricos de diâmetros bastante uniformes. Estes apresentam granulações cromatínicas puntiformes uniformemente distribuídas (Fig. 7 e Esq. II 2).

#### **3.2. Espermatócitos**

Estas células são caracterizadas pelos diferentes aspectos de condensação dos seus núcleos (Figs. 8 a 12). Em uma fase menos adiantada da divisão meiótica, o

material nuclear está condensado na periferia do núcleo (Fig. 10 e 11 e Esq. II 3b,c) e também puderam ser vistas células em metáfases meióticas (Fig. 12 e Esq. II 3d). Estas células se encontram nos espermatocistos e os núcleos apresentam sincronia de fases da divisão meiótica.

### 3.3. Espermátides

As espermátides são facilmente identificadas pelo seu aspecto bastante heterogêneo de diferenciação, variando desde o esférico ao fusiforme (Figs. 13 a 15 e Esq. II 4).

Na fase em que as espermátides se encontram com núcleos esféricos, pôde ser observado um acúmulo de vesículas golgianas que se fundem para formar uma ampla vesícula acrossômica (Fig. 13 e Esq. II 4a,b). Com esta metodologia o acrossomo não pôde ser observado nas espermátides em alongamento.

A medida que as espermátides se alongam, estas se organizam em feixes e são entremeadas pelos prolongamentos citoplasmáticos da célula de Sertoli, inexistindo o espermatocisto nesta fase. Neste momento de alongamento celular também pôde ser observada a formação dos filamentos caudais (Figs. 14 e Esq. II 4). As células mesmo alongadas apresentam uma notória quantidade de citoplasma (Figs. 14 e 15 e Esq. II 4c).



### 3.4. Espermatozoides

Os espermatozoides maduros apresentam um alto grau de compactação cromatinica e conspícua redução do material citoplasmático (Fig. 16 e Esq. II 5). Posicionam-se aos feixes entremeados pelo citoplasma das células de Sertoli e a cauda já está completamente formada, podendo-se inclusive notar o ponto inicial de formação na região proximal da cauda, isto é, no início da peça intermediária. O acrossomo não pode ser observado nesta fase pela microscopia de luz.

## PRANCHA I

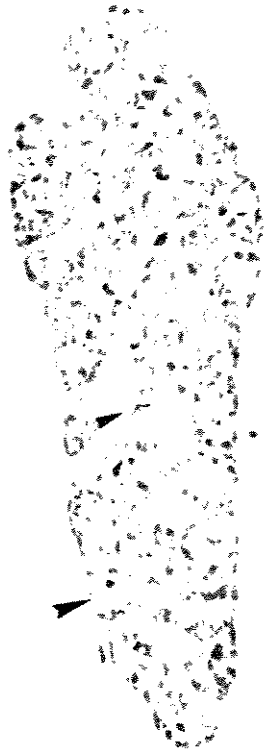
FIGURA 1. Visão geral do órgão em corte longitudinal. Inclusão em parafina e coloração pela hematoxilina-eosina. Os lóculos seminíferos estão indicados pelas setas. Aumento 50x.

FIGURA 2. Fragmento de testículo em corte semifino. Lóculos indicados por L; vasos sanguíneos periféricos (seta). Aumento 300x.

FIGURA 3. Detalhe dos lóculos seminíferos. Cápsula fibromuscular (seta) com vasos sanguíneos entre os lóculos. Aumento 600x.

FIGURA 4. Células germinativas em vários estádios de diferenciação, no interior dos lóculos. Espermatogônia (eg), espermatócitos organizados em espermatocistos (et), espermatídes (ep). A cápsula conjuntiva está indicada pela seta. Aumento 1.500x.

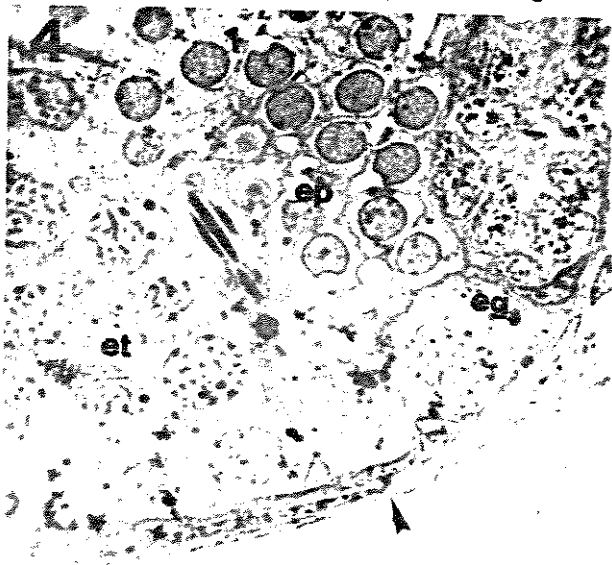
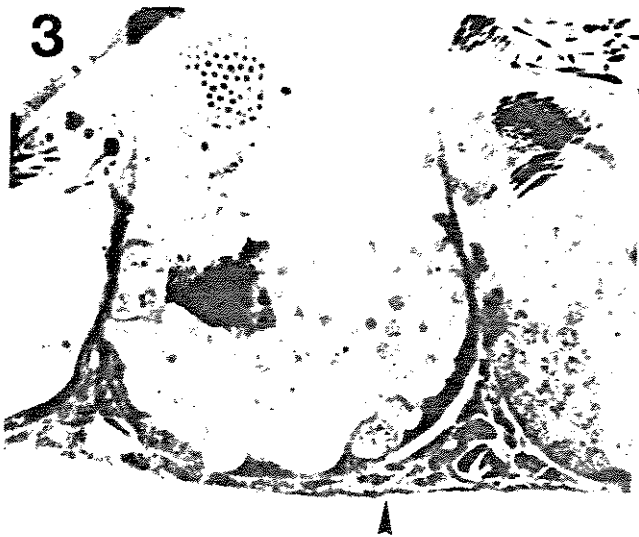
1



2



3



## PRANCHA II

Cortes semifinos incluídos em Epon-812 corados pelo azul de toluidina 1%, montados em bálsamo do Canadá. Aumento 3.100x.

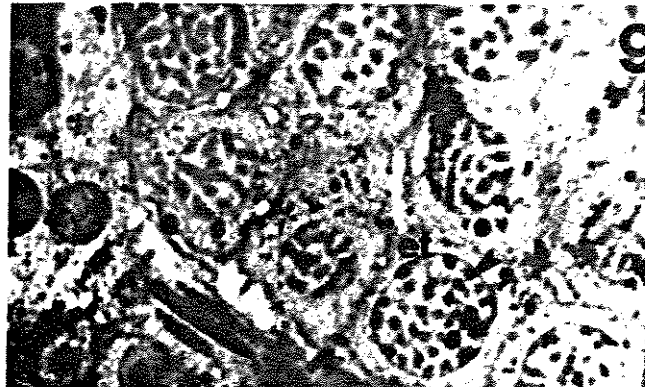
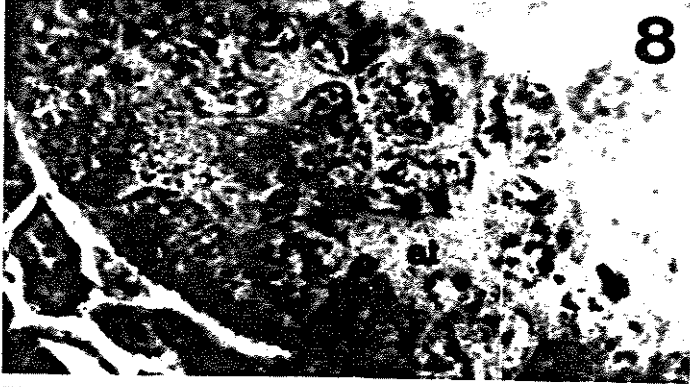
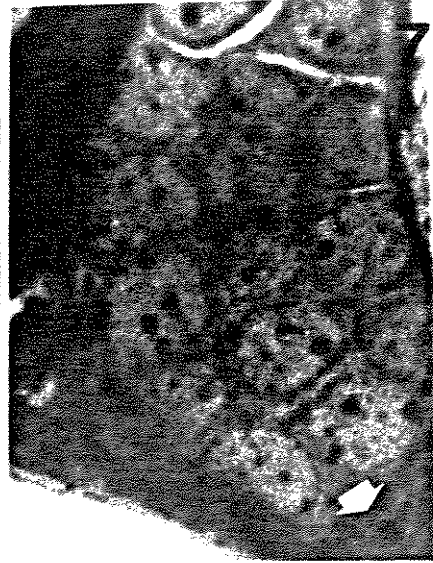
FIGURA 5. Espermatogônia primária apresentando núcleo com morfologia irregular (setas).

FIGURA 6. Grupo de espermatogônias primárias (eg) com núcleos pouco corados (N) e associada a essas células pode-se observar a Célula de Sertoli (seta).

FIGURA 7. Espermatogônias secundárias organizadas em cisto (espermatocisto) com célula de Sertoli associada a este (seta).

FIGURAS 8 a 11. Espermatócitos (et) com crescentes graus de compactação do material nuclear (seta).

FIGURA 12. Espermatócitos com cromossomos metafásicos (seta).



### PRANCHA III

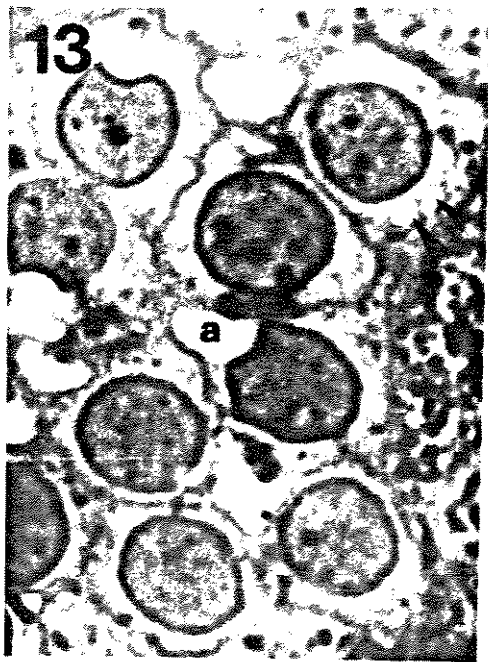
Cortes semifinos de testículos. Inclusão em Epon-812, coloração pelo azul de toluidina 1% e montagem em bálsamo do Canadá. Aumento 3.100x.

FIGURA 13. Espermatídes com acrossomo em desenvolvimento. Vesículas golgianas (setas) se fundem para formar uma ampla vesícula acrossômica (a).

FIGURA 14. Corte transversal em espermatídes com adiantado grau de compactação nuclear. A célula de Sertoli (s) aparece associada a estas células. Citoplasma das espermatídes (seta).

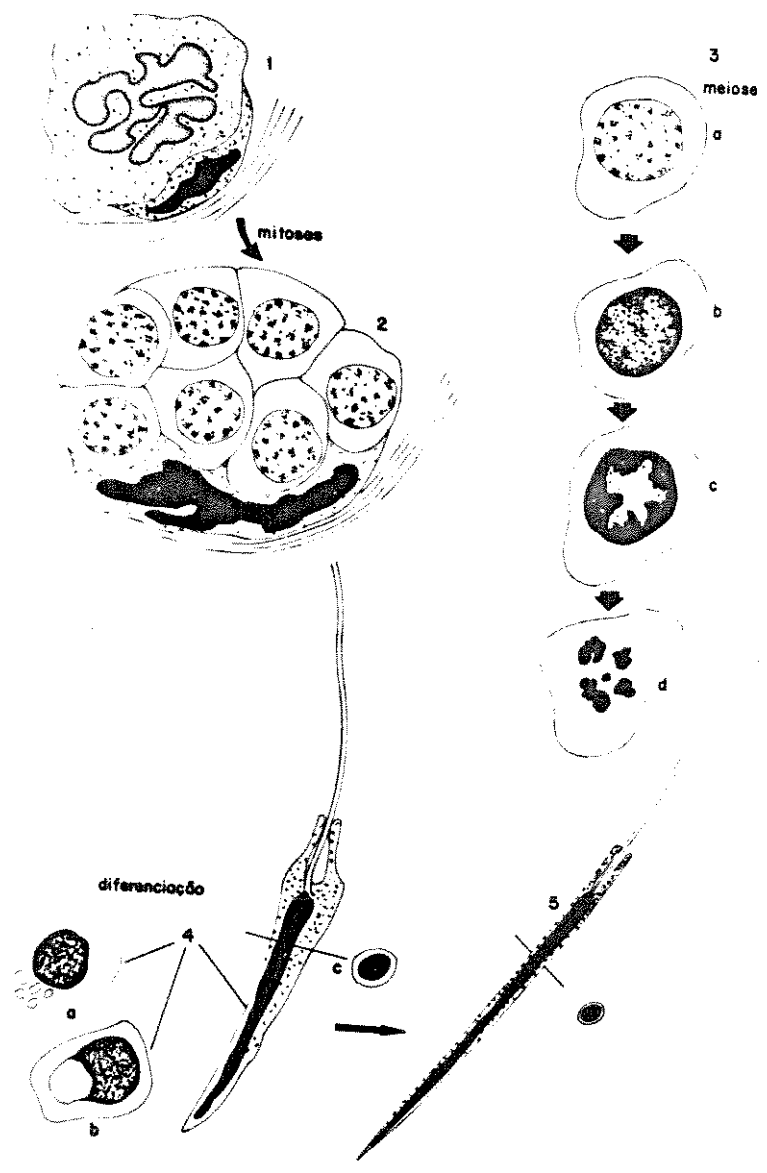
FIGURA 15. Corte longitudinal em espermatídes. Notar o citoplasma (seta) que ainda não foi absorvido pela célula de Sertoli (s).

FIGURA 16. Corte longitudinal e transversal em feixes de espermatozóides maduros, unidos à célula de Sertoli (s).



**ESQUEMA II.** Representação esquemática das células germinativas analisadas em microscopia de luz. As espermatogônias primárias (1) estão associadas à uma célula de Sertoli que apresentam seus núcleos falciformes ou semi-lunares. Por divisão mitótica origina-se cisto de espermatogônias secundárias (2) que se desenvolvem para a formação de espermatócitos (3). Estas sofrem meiose e originarão as espermatídes (4). As espermatídes haplóides sofrerão diferenciações citoplasmáticas e nucleares (4 a,b,c) e originarão os espermatozóides (5).





## 4. Reações citoquímicas

### 4.1. Tratamento pelo azul de toluidina a pH 4,0

Esta reação evidenciando ácidos nucleicos, revelou uma notável diferença de associação das moléculas do corante com o substrato (DNA e RNA).

Neste pH, os grupos fosfatos dos ácidos nucleicos ligam-se à moléculas do corante proporcionando diferentes respostas de basofilia. Os núcleos apresentaram coloração azulada (metacromasia beta, segundo LISON, 1960). Os espermatozoides maduros apresentaram os núcleos com intensa metacromasia alfa (verde intenso) segundo LISON (1960) e o citoplasma das células imaturas apresentou-se, por vezes, com sutil metacromasia gama (coloração rósea) segundo LISON (1960) (Figs. 17 a 21).

Com esta técnica foi fácil a detecção dos ductos no tecido, devido às células parietais dos ductos apresentarem núcleos corados intensamente em azul, enquanto os espermatozoides maduros, apresentaram núcleos corados em verde (Figs. 17 e 18).

A figura 19 mostra espermatogônias e espermatócitos; estes apresentam seus cromossomos com aspecto morular, devido à compactação destes na metáfase.

## PRANCHA IV

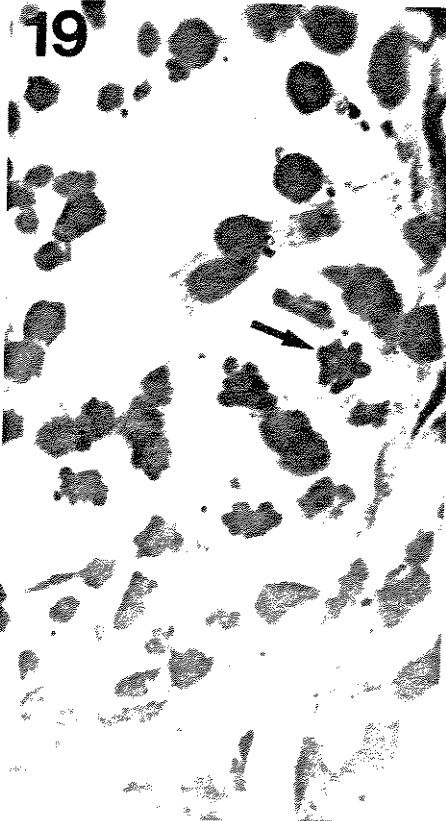
Cortes de testículos de 6µm. Incluídos em parafina, corados pelo azul de toluidina a pH 4,0, montados com bálsamo do Canadá.

FIGURA 17. Lóculos seminíferos com espermatídes (ep) e espermatozóides (e) com diferentes respostas de basofilia. Aumento 460x.

FIGURA 18. Espermatozóides com coloração esverdeada (e) e espermatídes com coloração azul intensa (ep). Aumento 1.100x.

FIGURA 19. Cromossomos metafásicos (seta) dos espermatócitos apresentando um aspecto morular. Aumento 1.100x.

FIGURAS 20 e 21. Cortes transversais em ductos espermáticos (d), mostrando as células parietais pavimentosas do ducto com núcleos corados em azul (seta) e espermatozóides maduros no interior. Cistoplasma das células germinativas imaturas violáceo (\*). Aumentos: Fig.20. 460x e Fig 21. 1.100x.



#### 4.2. Teste do P.A.S.

Este teste citoquímico foi utilizado nos cortes de testículos a fim de determinar as glicoproteínas acrossomais. Entretanto, as referidas glicoproteínas reagiram fracamente ao tratamento pelo reativo de Schiff, desde a fase inicial onde as vesículas golgianas são bastante amplas, até a fase alongada final dos espermatozoides (Fig. 24).

Com o uso deste teste pôde ser detectada a presença de grânulos esparsos de glicogênio tanto em espermatogônias primárias como nas células de Sertoli (Figs. 23 e 25).

As membranas basais dos lóculos seminíferos apresentaram alta reatividade pelo teste (Figs. 22, 23 e 26) devido à grande quantidade de moléculas de glicanos neutros e glicoproteínas existentes na estrutura.

Os filamentos caudais não apresentaram nenhuma reatividade ao teste do PAS (Fig. 24), entretanto os ductos espermáticos foram facilmente distintos devido às membranas basais destes apresentarem-se altamente PAS positivas.

## FRANCHA V

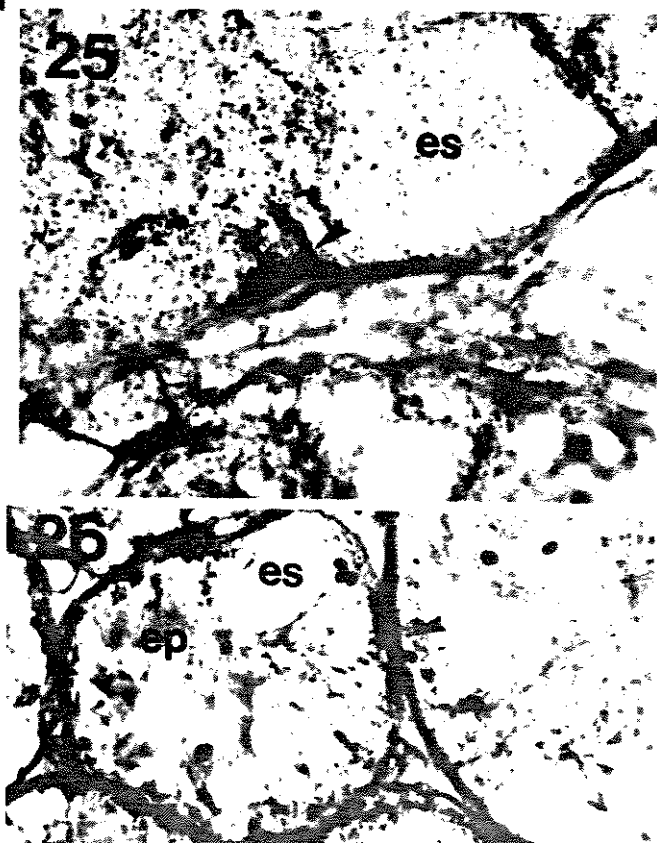
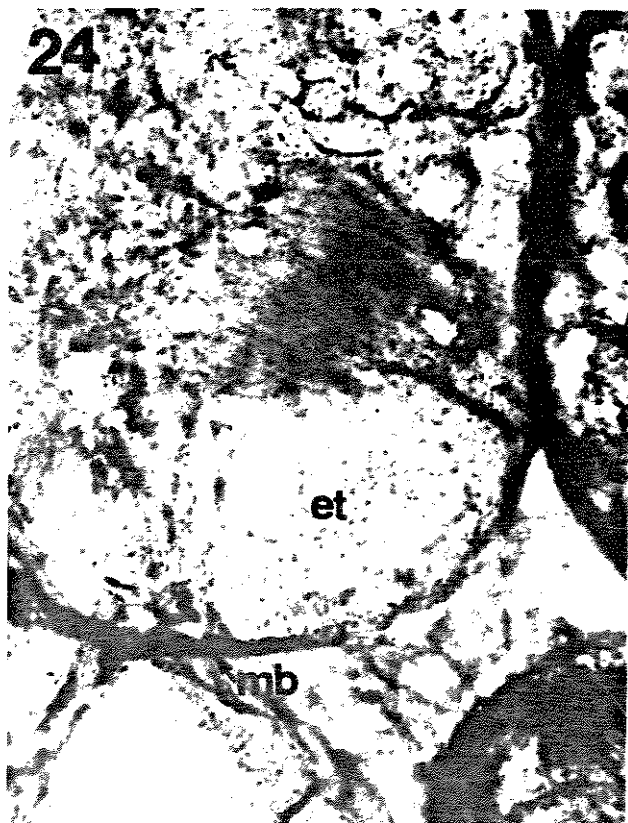
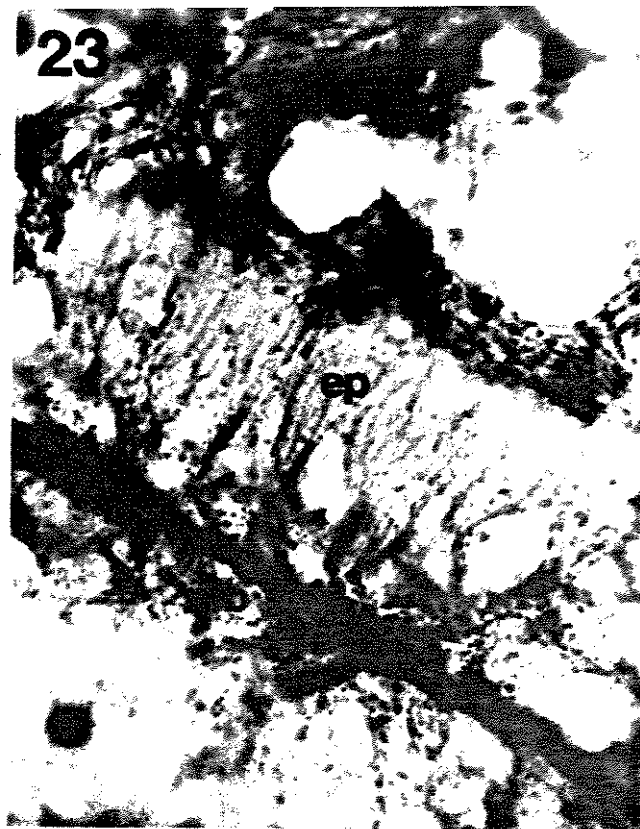
Cortes de testículos de 6  $\mu\text{m}$ , incluídos em parafina, tratados pelo teste do PAS e montados em bálsamo do Canadá.

FIGURA 22. Lóculos seminíferos com as células germinativas (g) em seu interior fracamente PAS positivas. As membranas basais são intensamente marcadas pelo teste (setas). Aumento 460x.

FIGURAS 23 e 24. Detalhes de feixes de espermatozóides (ep) e espermatídes (et) sem reatividade específica pelo PAS. Membranas basais com intensa reatividade (Mb), e também PAS positivo temos glicogênio (cabecas de setas) em células de Sertoli. Aumento 1.100x.

FIGURA 25. Espermatocisto (es) com baixa reatividade e célula de Sertoli com grânulos de glicogênio (seta). Aumento 1.100x.

FIGURA 26. Lóculo seminífero com espermatozóides (ep), espermatocistos (es) e membranas basais fortemente marcadas pelo teste (seta). Aumento 460x.



## 5. Aspectos ultra-estruturais

Os diferentes tempos de fixação e lavagem em tampão não apresentaram diferenças significativas, por isso não discriminar-se-á quais das fixações foram utilizadas.

No estudo ultra-estrutural da espermatogênese de *Hyla ranki* é observada uma íntima relação morfofuncional entre as células da linhagem germinativa (espermatogônias, espermatócitos e espermátides) e as células de Sertoli, formando grandes e numerosos espermatocistos no interior dos lóculos seminíferos.

Os aspectos ultra-estruturais da espermatogênese estão descritos a seguir separadamente para facilitar a posterior interpretação dos resultados, além de se obter uma melhor visualização geral das pranchas de ultra-micrografias.

### 5.1. Espermatogônias

As espermatogônias primárias são células volumosas, as maiores encontradas nos lóculos seminíferos, apresentando seus núcleos pouco contrastados pelo acetato de uranila, devido à descompactação do material cromatínico, além de apresentarem forma multilobulada.

Nestes núcleos podem ser encontrados com frequência massas de cromatina condensada (Figs. 27, 29 e 30)



altamente contrastadas pelo acetato de uranila, com aspecto esférico de diâmetros variáveis.

A lobulação do núcleo é tal que entre os lóbulos deste, podem ser encontradas mitocôndrias (Fig. 28).

O citoplasma destas células pode apresentar grande quantidade de mitocôndrias, ribossomos e retículo endoplasmático bem desenvolvido (Figs. 29 e 30), contudo não existe organização preferencial destas organelas no citoplasma das espermatogônias.

As espermatogônias estão sempre associadas à uma célula de Sertoli, que nesta fase apresenta seu núcleo com aspecto falciforme ou semi-lunar (Fig. 27).

No estudo ultra-estrutural não foram vistas as espermatogônias secundárias contidas nos espermatocistos, e encontradas nos cortes semifinos à microscopia de luz.

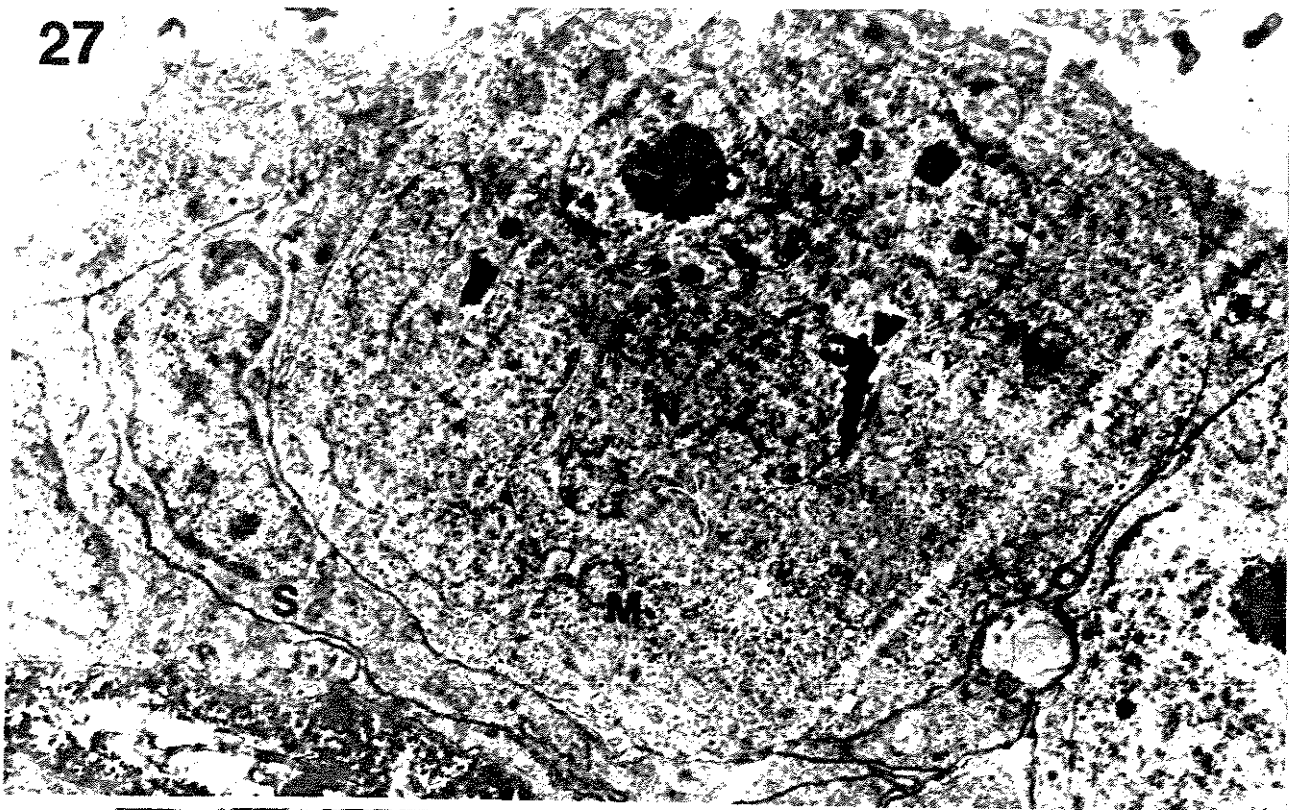
## PRANCHA VI

Cortes ultra-finos em testículos de *Hyla ranki*. Fixação em glutaraldeído 3%, pós-fixação em tetróxido de ósmio 2% e ácido tânico 2%. Cortes contrastados pelo acetato de uranila e citrato de chumbo.

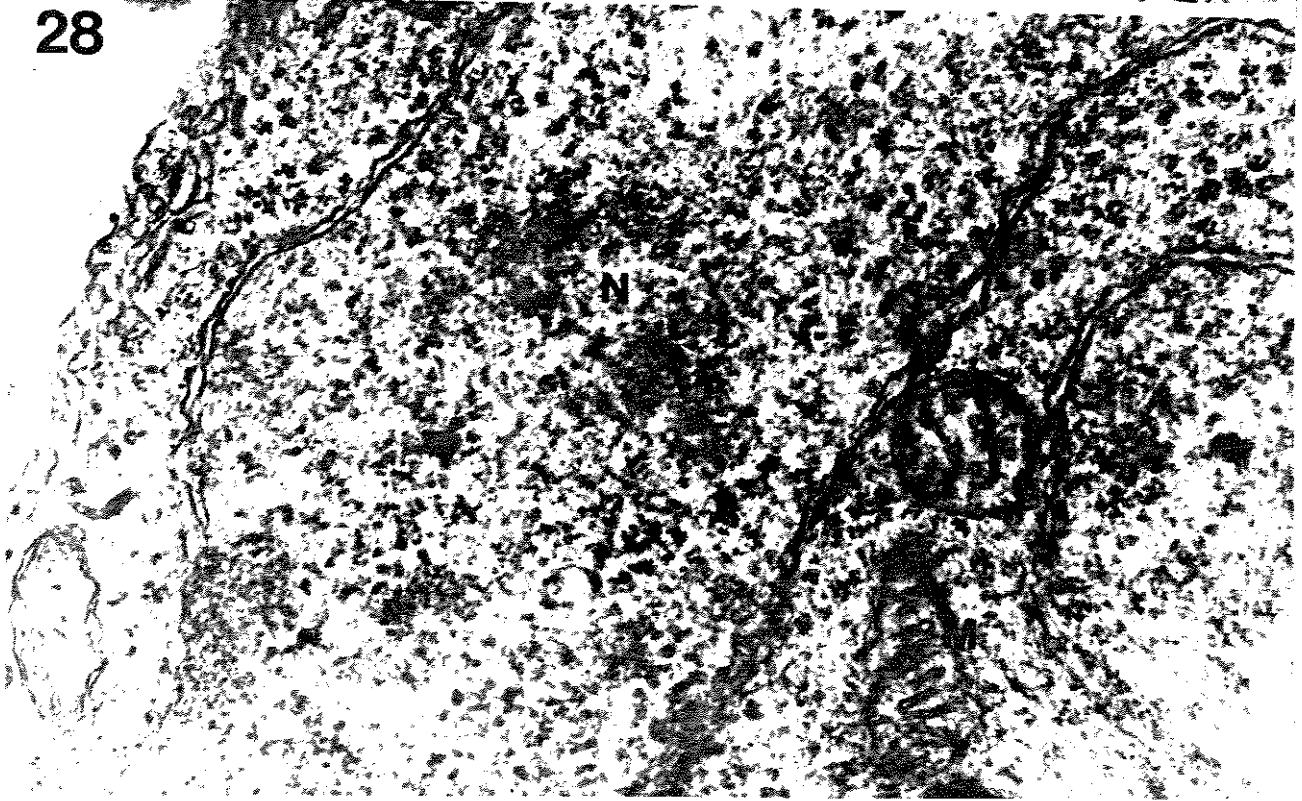
FIGURA 27. Vista geral de uma espermatogônia primária em associação à uma célula de Sertoli (S). Esta célula germinativa inicial apresenta seu núcleo bastante polimórfico (N) com massas de cromatina condensada (C) em seu interior. Mitocôndrias (M). Aumento 14.500x.

FIGURA 28. Detalhe da região do núcleo (N) mostrando mitocôndrias entre os lóbulos do mesmo (M). Aumento 42.400x.

27



28



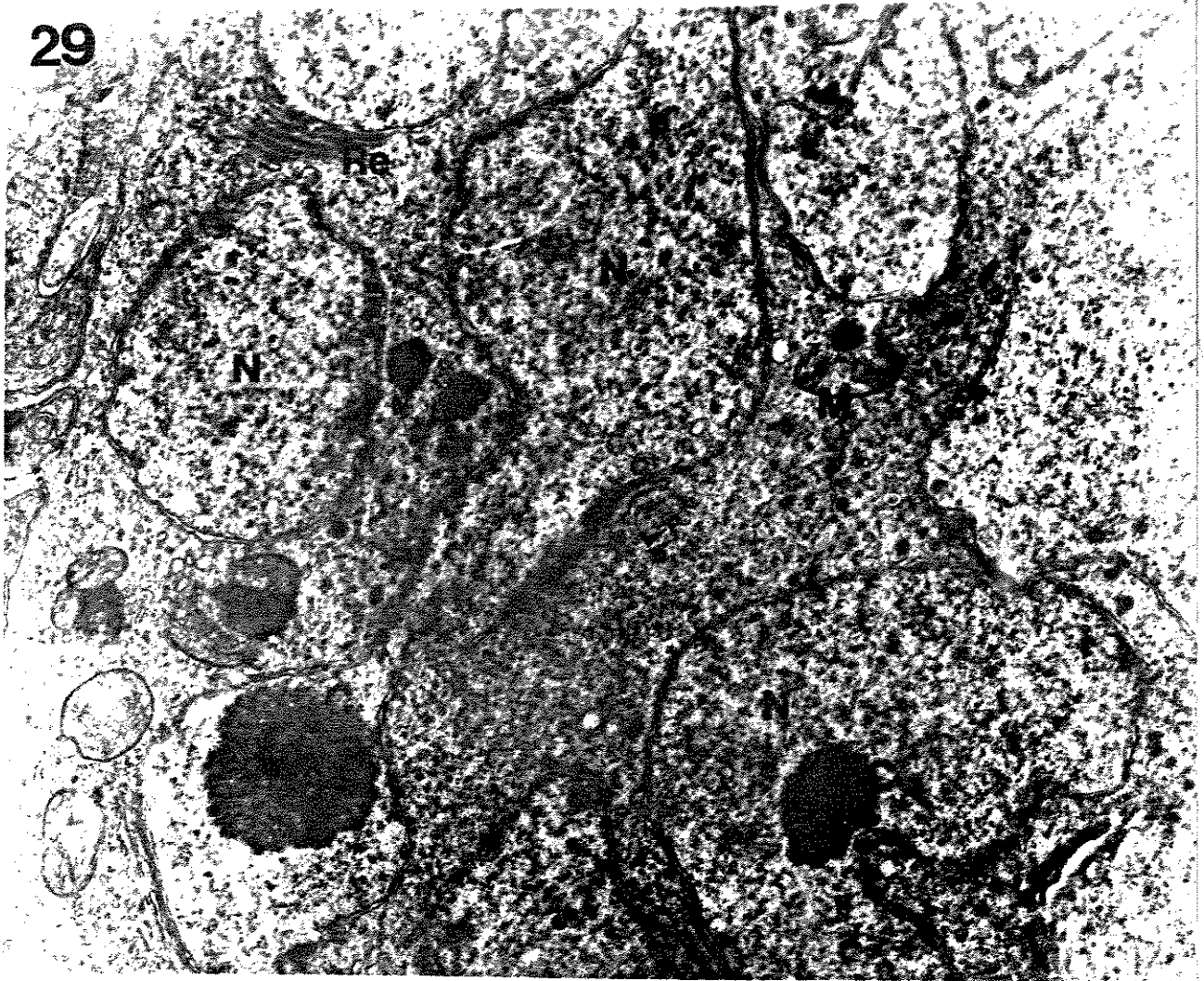
## PRANCHA VII

Cortes ultra-finos em testículos de *Hyla ranki*. Fixados em glutaraldeído 3%, pós-fixados em tetróxido de ósmio 2% e ácido tânico 2%. Cortes contrastados pelo acetato de uranila e citrato de chumbo.

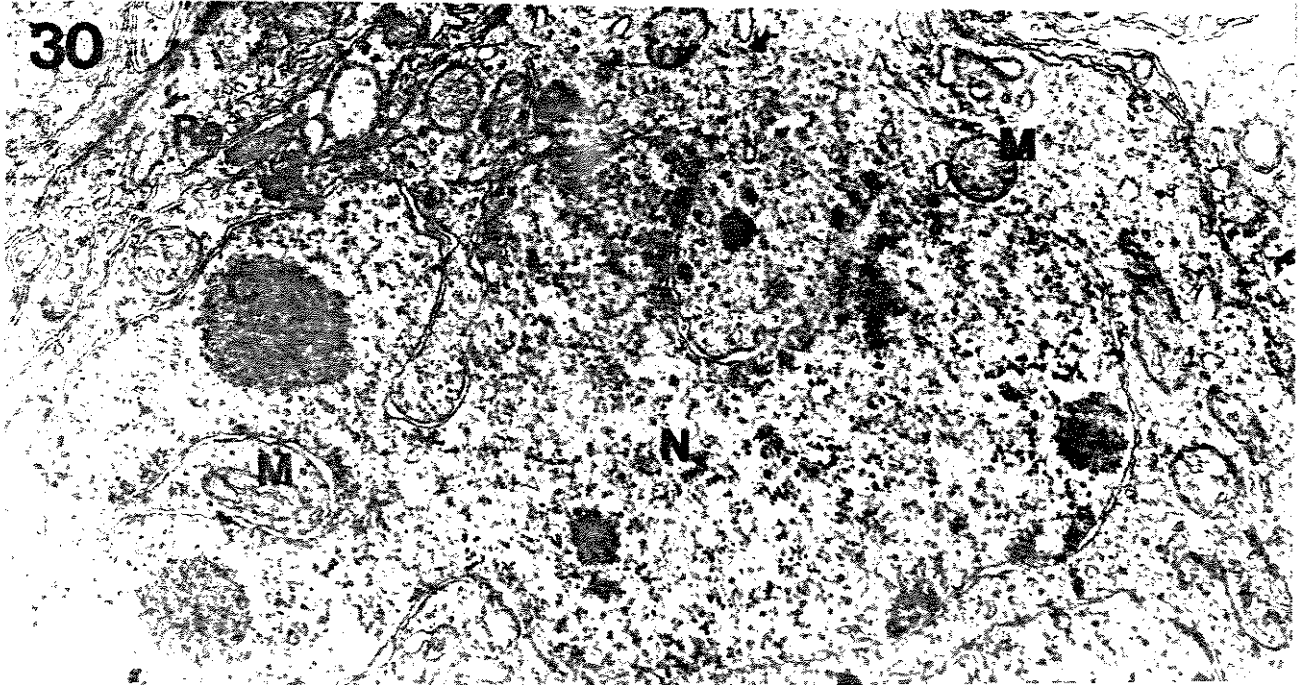
FIGURA 29. Espermatogônia primária com seu núcleo bastante lobulado (N) e apresentando massas de cromatina condensada (C). Citoplasma com retículo endoplasmático rugoso (Re) e mitocôndrias (M) e grande quantidade de polissomos (setas). Aumento 35.000x.

FIGURA 30. Espermatogônia primária com grande quantidade de retículo endoplasmático (Re) e mitocôndrias (M). Núcleo multilobulado (N) com massas de cromatina condensada (C). Aumento 31.000x.

29



30



## 5.2. Espermatócitos.

Os espermatócitos são caracterizados por serem células que se encontram em divisão meiótica. São células com núcleo esférico ou levemente irregular com a cromatina em diferentes graus de compactação (Figs. 31 a 37).

Os espermatócitos primários no início da primeira divisão meiótica foram encontrados com muita freqüência nos lóculos seminíferos porque a prófase da primeira divisão meiótica é extremamente longa quando comparada com as outras fases da meiose.

Os espermatócitos I foram identificados pela presença de grandes complexos sinaptonêmicos (Figs. 31 e 34), os quais são vistos associando-se ao envoltório nuclear (Figs. 32 e 35).

Antecedendo esta fase inicial de divisão, um nucléolo bastante desenvolvido e conspicuo pôde ser observado nos núcleos dos espermatócitos (Fig. 33 e 36).

A identificação dos espermatócitos II foi feita pela proximidade de células muito semelhantes morfológicamente e com sincronia nas fases da meiose, além de serem menores que os espermatócitos I. A compactação cromatínica é bastante ampla, ocupando áreas consideráveis do núcleo (Fig. 37).

Freqüentemente, foi detectada a presença de células de Sertoli, com grande quantidade de retículo endoplasmático, com seu citoplasma entremeando os espermatócitos (Fig. 37).

Uma quantidade notável de complexos de poros no envoltório nuclear foram detectadas em espermatócitos I (Figs. 31 e 32), além de organelas membranosas como o complexo de Golgi (Fig. 35), mitocôndrias (Fig. 33 e 35) e retículo endoplasmático (Fig. 31).

Associadas ao envoltório nuclear e no interior do nucleoplasma, vesículas membranosas eletrolúcidas foram encontradas, muitas vezes se assemelhando a dilatações do envoltório, ocorrendo exclusivamente nesta fase inicial de espermatócito (Figs. 31, 34 e 36).

## PRANCHA VIII

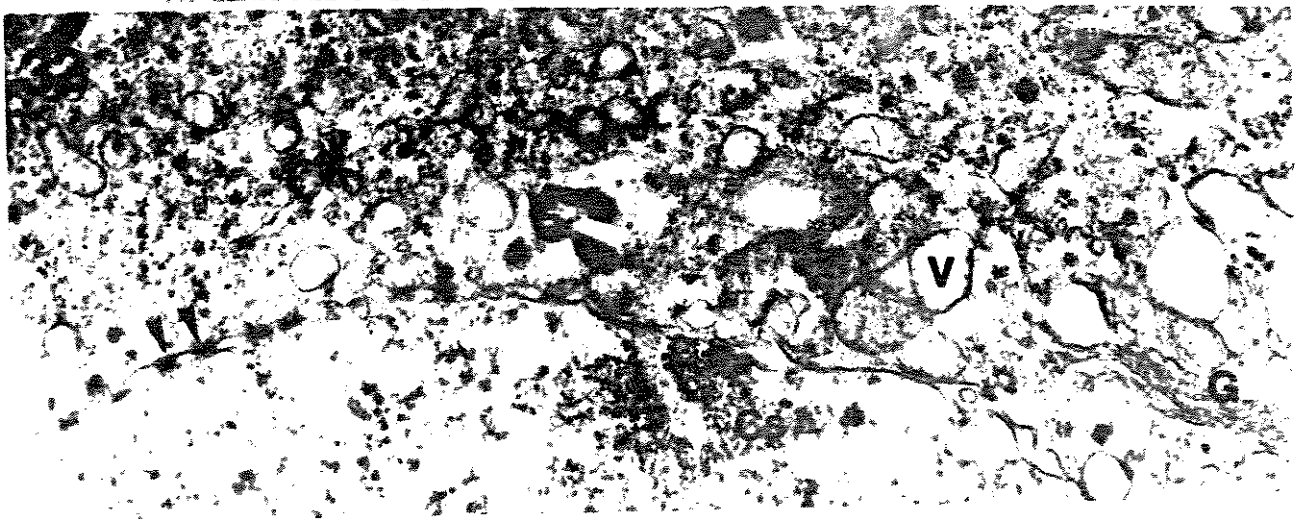
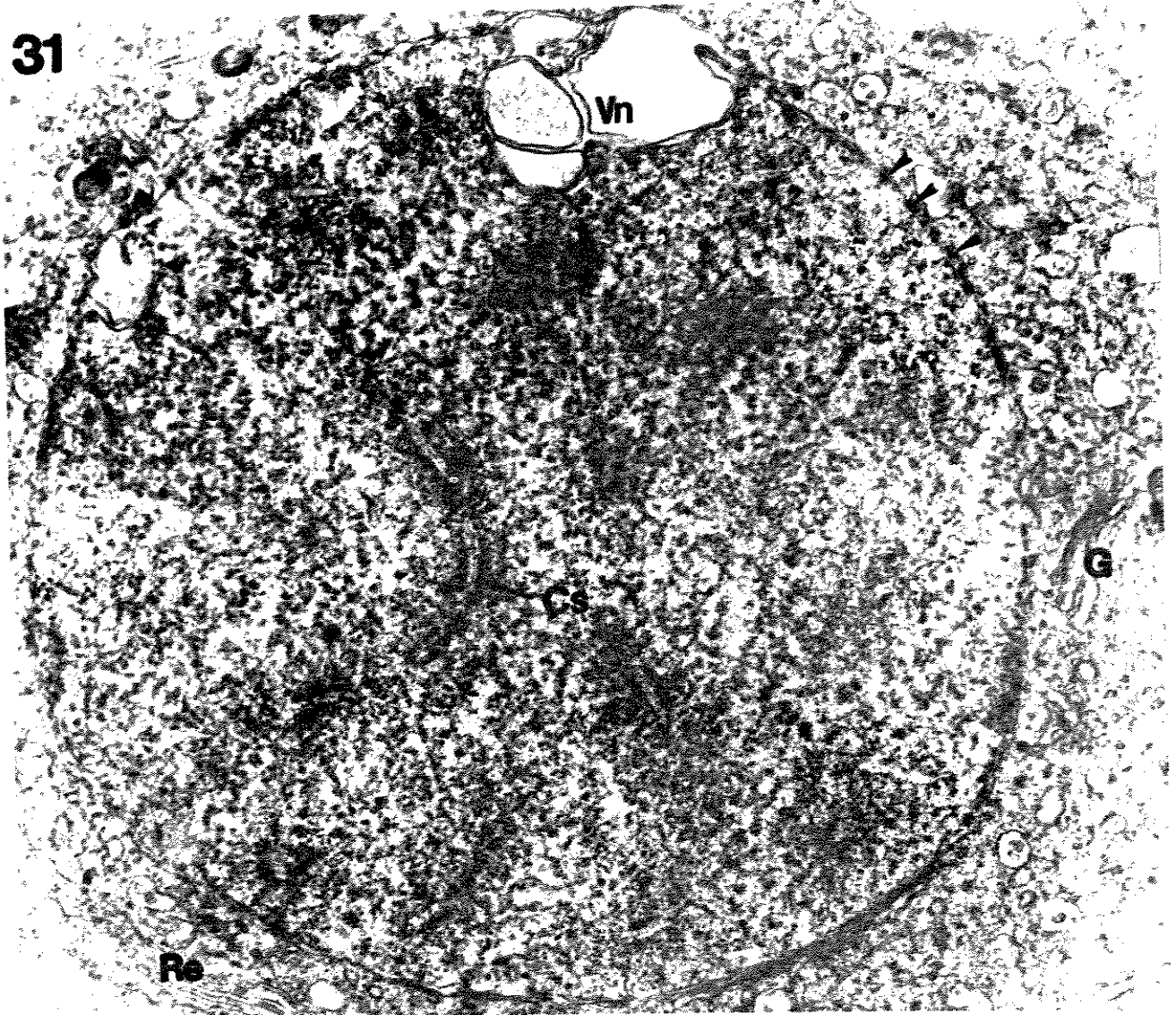
Cortes ultra-finos de testículos de *Hyla ranki*. Fixação pelo glutaraldeído 3%, pós-fixação pelo tetróxido de ósmio 2% e ácido tânico 2%. Contrastação feita pelo acetato de uranila e citrato de chumbo.

FIGURA 31. Espermatócito primário em início de divisão meiótica. Poros nucleares (setas), Complexo de Golgi (G), retículo endoplasmático (Re). No interior do núcleo encontra-se complexos sinaptonêmicos desenvolvidos (Cs) e vesículas próximas do envoltório nuclear (Vn). Aumento 17.500x.

FIGURA 32. Detalhe do envelope nuclear com seus complexos de poro (setas). Complexo sinaptonêmicos (Cs) associado ao envólucro nuclear, vesículas citoplasmáticas (V) e complexo de Golgi (G). Aumento 30.500x.



31



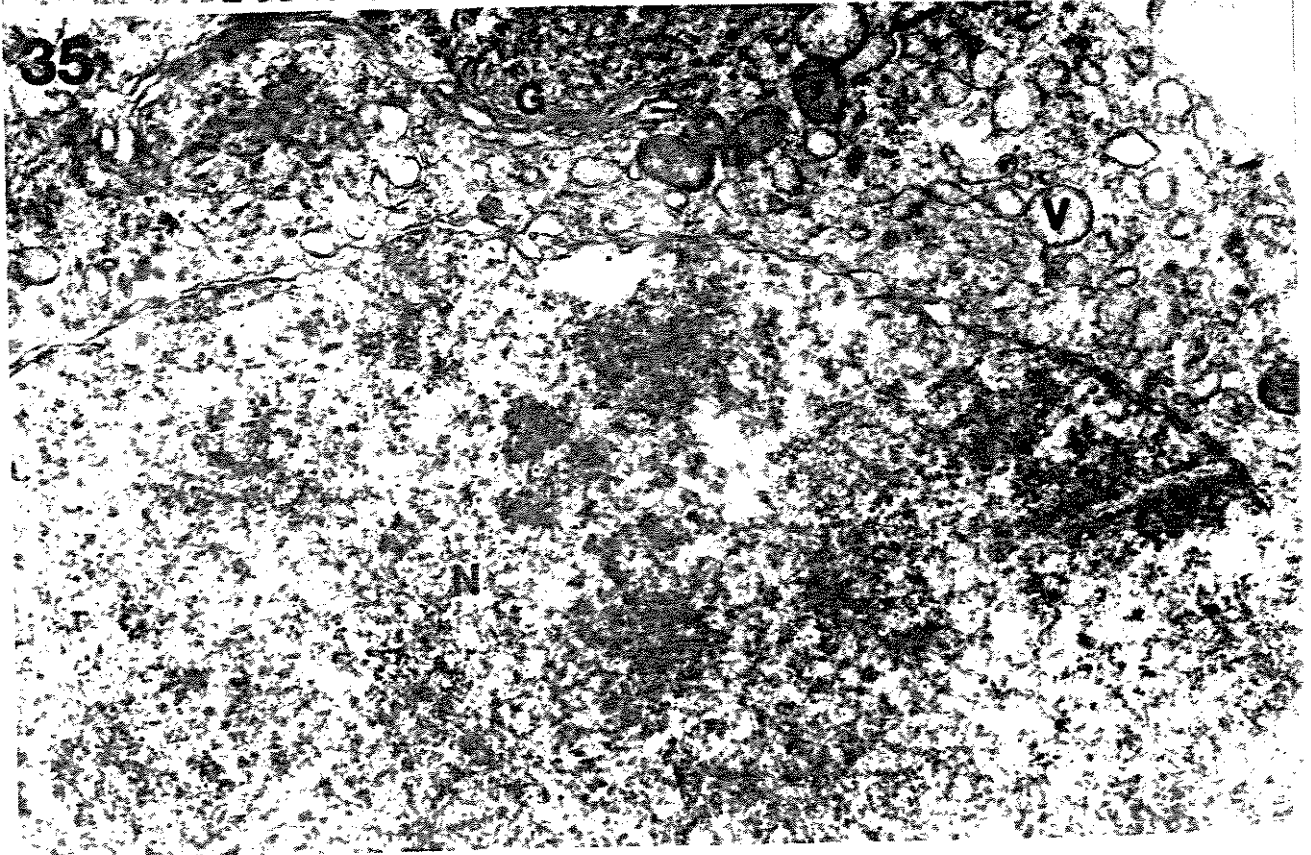
## PRANCHA IX

Cortes ultra-finos de testículo de *Hyla ranki*. Fixação pelo glutaraldeído 3%, pós-fixação pelo tetróxido de ósmio 2% e ácido tânico 2%. Contrastação pelo acetato de uranila e citrato de chumbo.

FIGURA 33. Espermatócitos primários antes do início da meiose. Núcleo (N), nucléolo (Nu) e mitocôndrias (m). Aumento 8.300x.

FIGURA 34. Espermatócito primário em prófase I. Notar complexos sinaptonêmicos (Cs) e vesículas intranucleares (V). Aumento 12.100x.

FIGURA 35. Espermatócito primário em prófase I. Núcleo (N), complexo sinaptonêmico (Cs) associado ao envoltório nuclear e no citoplasma encontra-se vesículas (V), complexo de Golgi (G) e mitocôndrias (m). Aumento 22.500x.



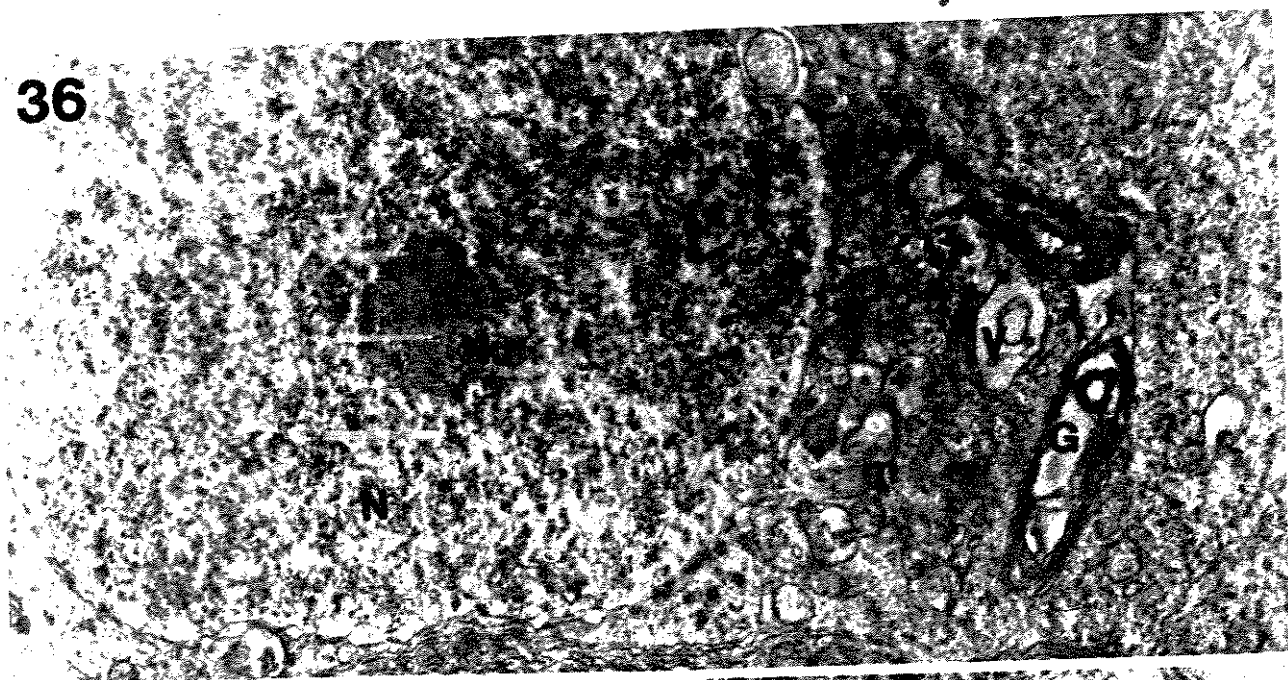
## PRANCHA X

Cortes ultra-finos em testículo de *Hyla ranki*. Fixação pelo glutaraldeído 3%, pós-fixação pelo tetróxido de ósmio 2% e ácido tânico 2%. Contrastação pelo acetato de uranila e citrato de chumbo.

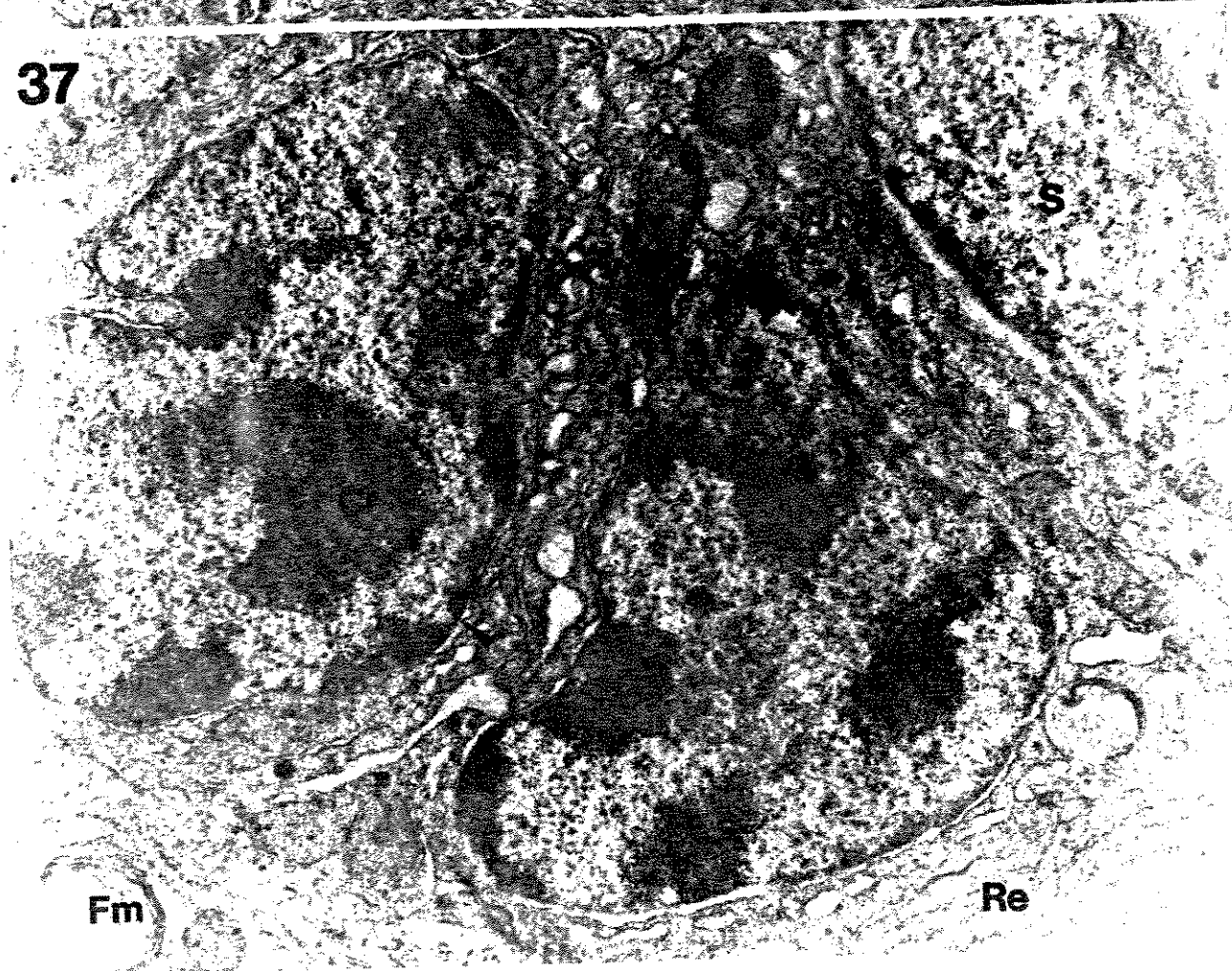
FIGURA 36. Espermatócito primário antes do início da divisão meiótica. O seu núcleo (N) apresenta nucléolo (Nu) desenvolvido. No citoplasma pode-se notar o complexo de Golgi (G), mitocôndrias (m) e vesículas (V). Notar a existência de vesícula no envoltório nuclear (seta). Aumento 18.400x.

FIGURA 37. Espermatócitos secundários mostrando adiantado grau de compactação cromatínica (Cr). Envoltório nuclear (seta), mitocôndria (m), retículo endoplasmático (Re), figuras mielínicas (Fm) e célula de Sertoli (S). Aumento 18.400x.

36



37



### 5.3. Espermátides

As espermátides originadas da segunda divisão meiótica, são células inicialmente arredondadas que sofrem um alto grau de diferenciação celular e modificações núcleo-citoplasmáticas notáveis para chegar à forma alongada final dos espermatozóides.

A estas modificações núcleo-citoplasmáticas que ocorrem nas espermátides dá-se o nome de espermiogênese.

Para descrever a espermiogênese, subdividiremos em etapas as modificações nestas células da seguinte maneira: 1. formação do acrossomo, 2. alongamento e compactação do material nuclear e processos citoplasmáticos associados e 3. desenvolvimento do filamento caudal.

#### 5.3.1. Formação do acrossomo

Um ou mais dictiossomas do complexo de Golgi puderam ser detectados em espermátides com grau de compactação nuclear e cromatínica bastante baixo (Fig. 38). Estes dictiossomas produzem uma grande quantidade de vesículas que se fundem para formar uma ampla vesícula acrossômica (Figs. 39 e 40), que pode se aproximar em diâmetro ao tamanho do núcleo (Fig. 42).

A ampla vesícula acrossômica, ao se colabar ao envelope nuclear proporciona uma depressão no núcleo e as membranas desta região juncional acrossomo-núcleo são mais eletrodensas quando comparadas às outras.

endomembranas (Fig. 42).

As grandes vesículas acrossômicas são pouco contrastadas pelos contrastantes utilizados e parecem estar vazias.

É comum encontrar nas espermatídes imaturas uma agregação de membranas acrossomais (Figs. 39 e 41), entretanto, não foi possível observar, no caso de *Hyla ranki*, em que fase específica da formação do acrossomo este fato ocorre.

Com o alongamento celular e compactação nuclear, o acrossomo, que inicialmente era amplo, passa a ocupar uma porção apical bastante reduzida em forma de capuz o qual, em corte tansversal apresenta um diâmetro bastante reduzido e é acompanhado de um complexo de membranas acrossomais (Fig. 43).

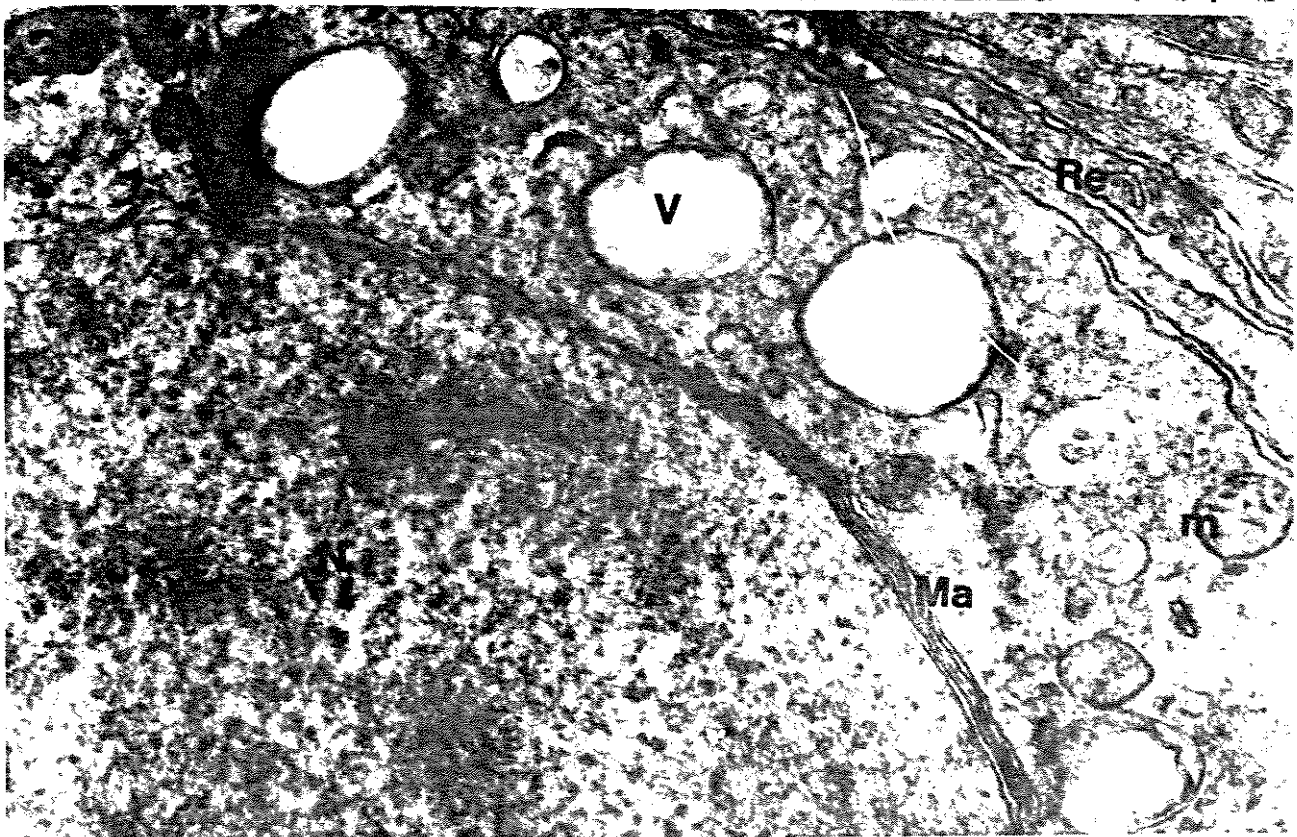
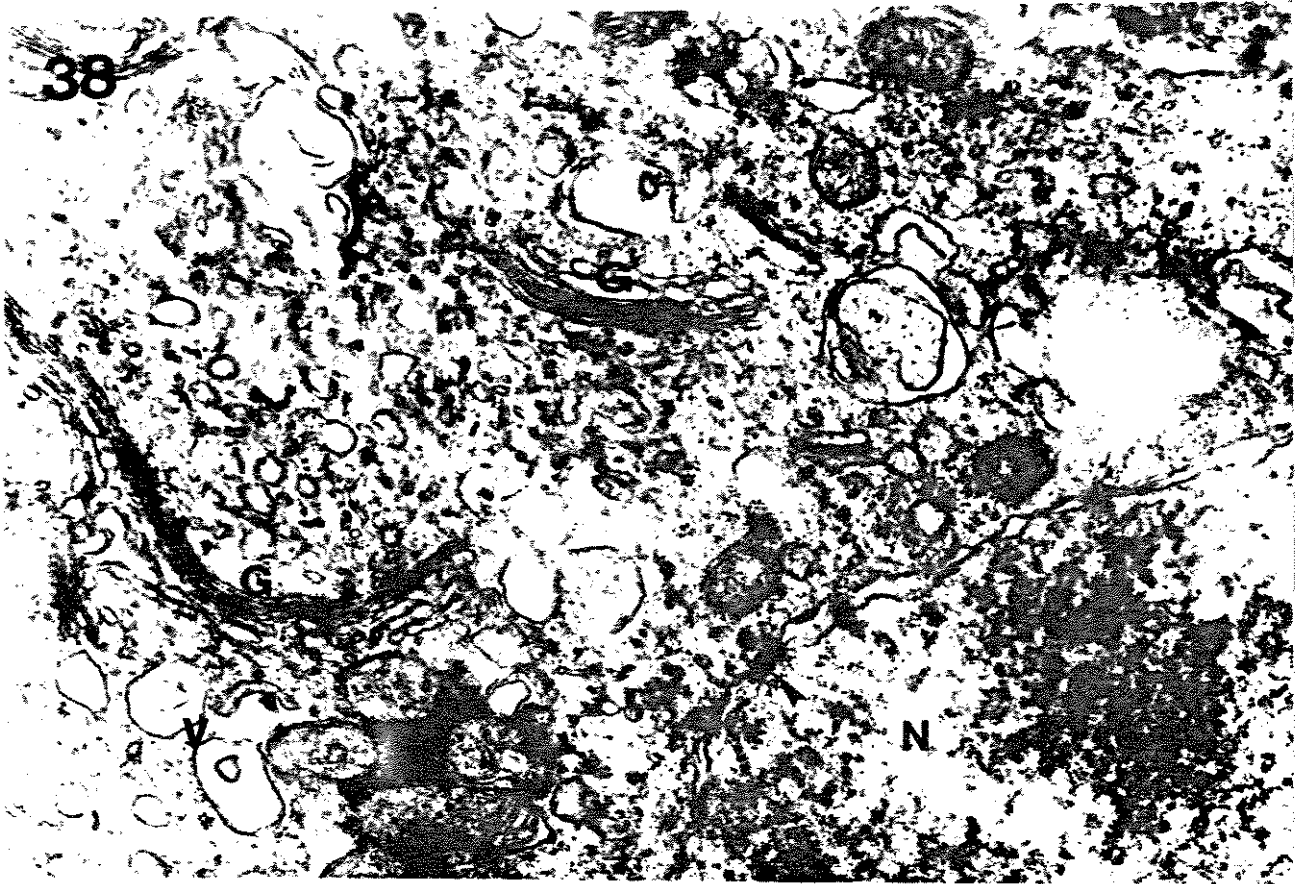
## PRANCHA XI

Cortes ultra-finos de testículo de *Hyla ranki*. Fixação pelo glutaraldeído 3%, pós-fixação pelo tetróxido de ósmio 2% e ácido tânico 2%. Contrastação pelo acetato de uranila e citrato de chumbo.

FIGURA 38. Espermatíde em estágio imaturo de formação do acrossomo, apresentando amplos dictiossomas do complexo de Golgi (G), vesículas golgianas (V), mitocôndrias (m). O núcleo (N) apresenta poros no envoltório nuclear (seta). Aumento 28.800x.

FIGURA 39. Espermatíde em estágio mais avançado da formação do acrossomo. Acúmulo de vesículas golgianas (V) em uma das extremidades da célula. Núcleo (N) e membranas acrossomais (Ma) próximas ao envoltório nuclear. Reticulo endoplasmático (Re) e mitocôndrias (m). Aumento 30.100x.



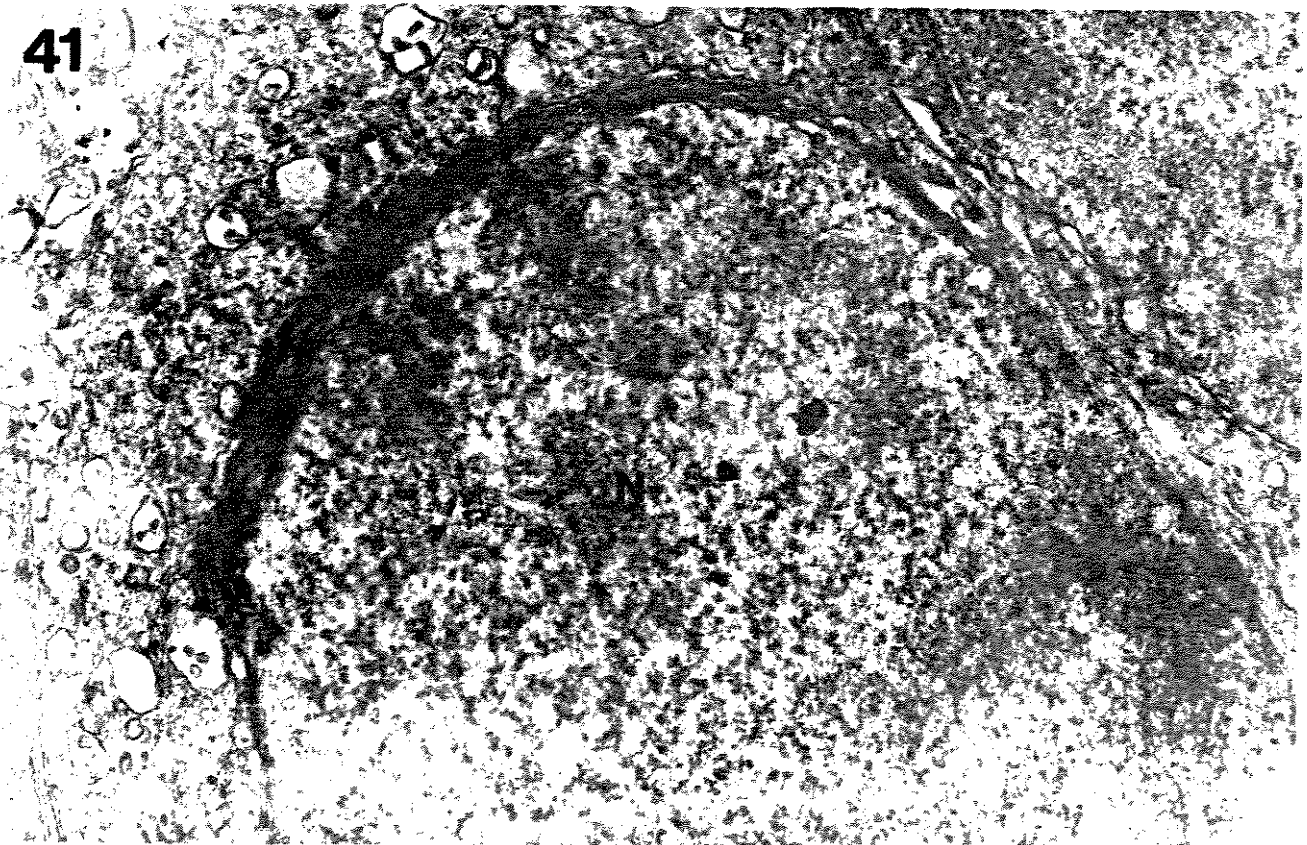
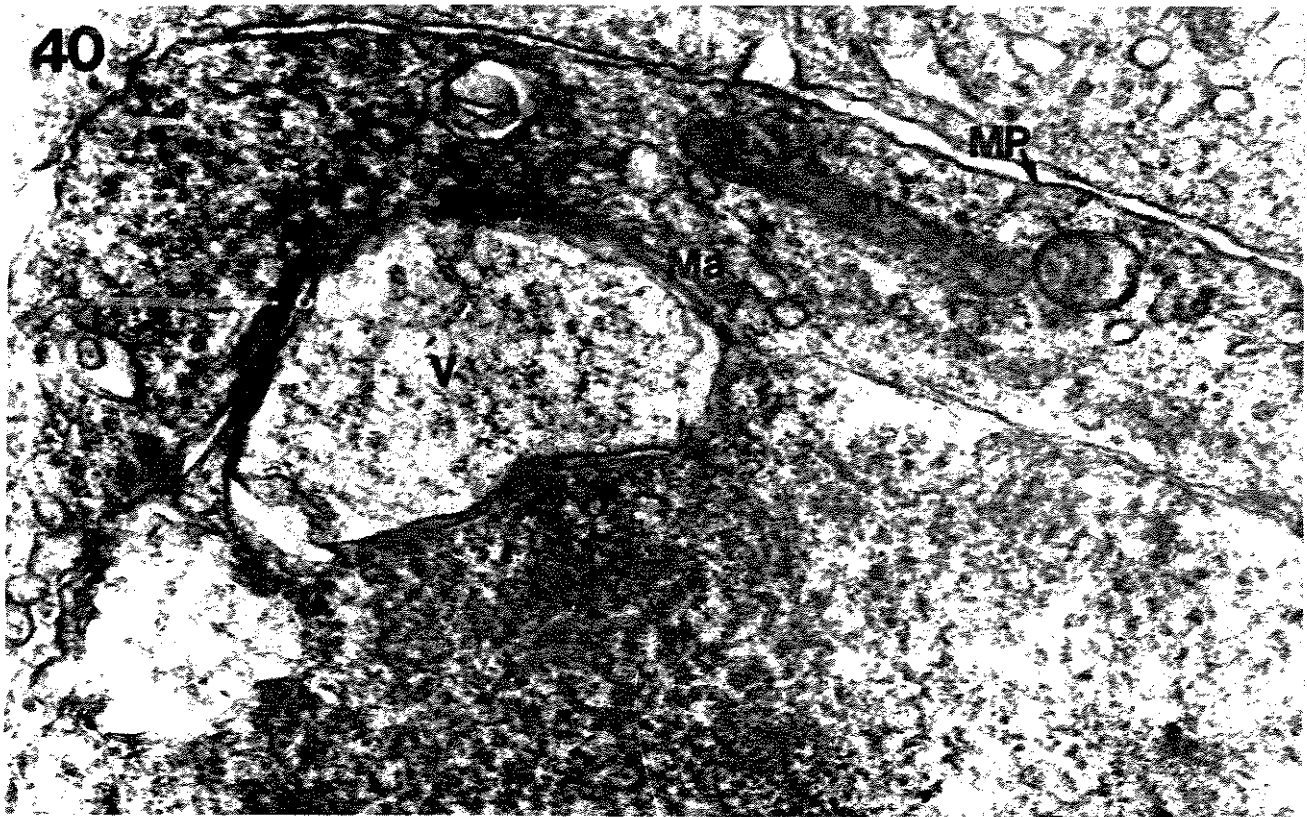


## PRANCHA XII

Cortes ultra-finos de testículo de *Hyla ranki*. Fixação pelo glutaraldeído 3%, pós-fixação pelo tetróxido de ósmio 2% e ácido tânico 2%. Contrastação pelo acetato de uranila e citrato de chumbo.

FIGURA 40. Fusão de vesículas golgianas (V) no processo de formação do acrossomo. Associadas à esta vesícula encontramos membranas acrossomais (Ma). Mitocôndrias (m) e membrana plasmática (MP). Aumento 30.500x.

FIGURA 41. Espermatíde em corte sagital à altura do núcleo (N) mostrando um acúmulo de membranas acrossomais (Ma) na região de desenvolvimento do acrossomo. Aumento 20.300x.



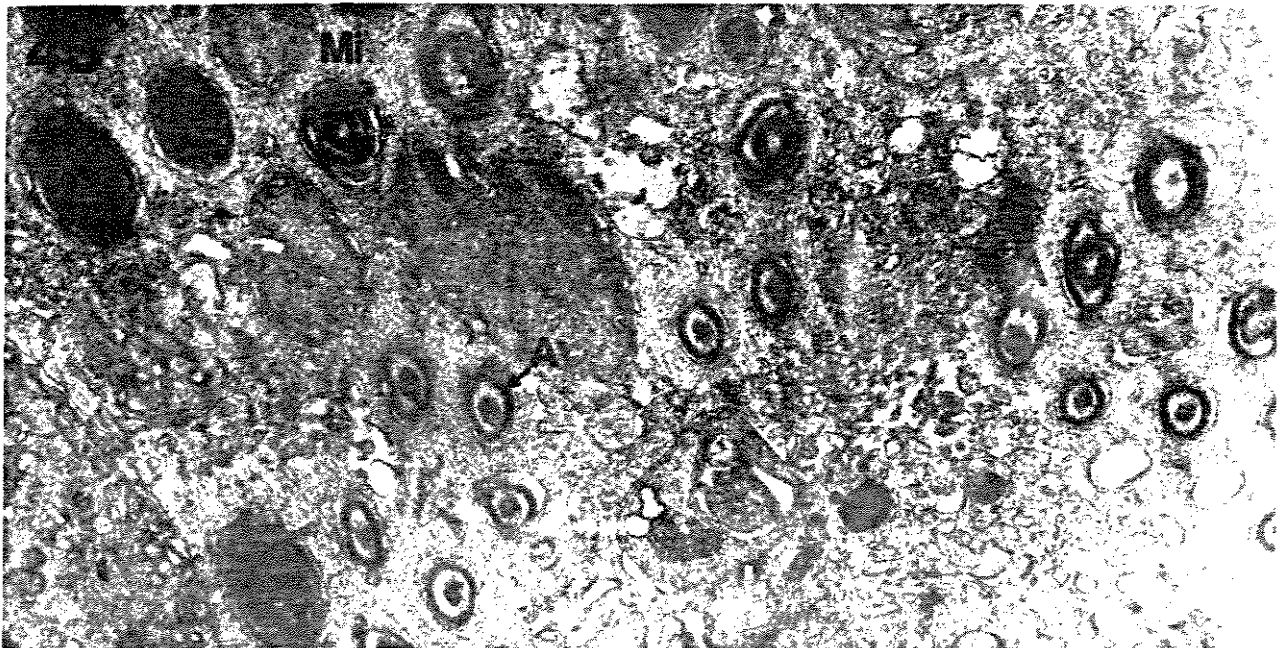
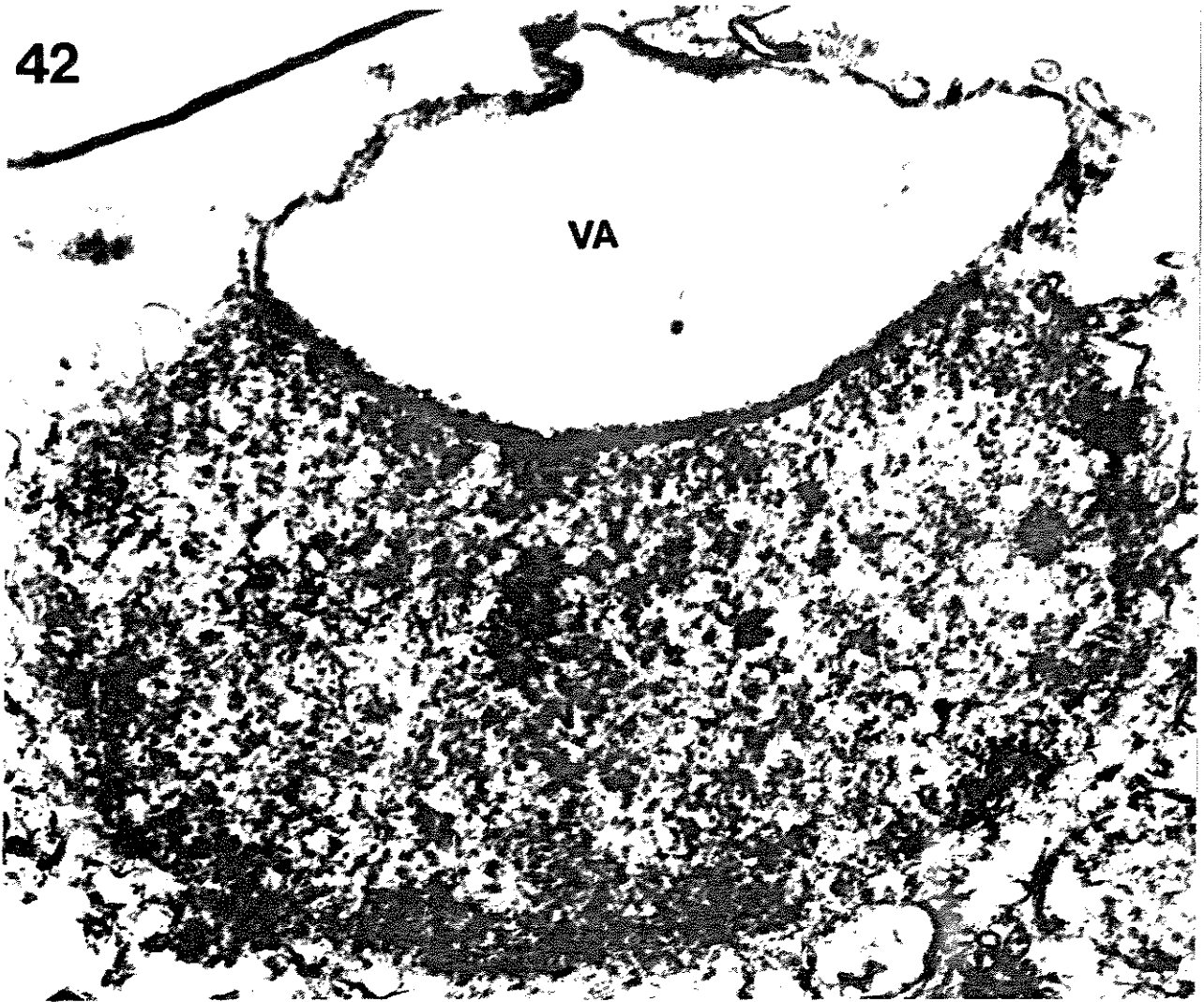
## PRANCHA XIII

Cortes ultra-finos de testículo de *Hyla ranki*. Fixação pelo glutaraldeído 3%, pós-fixação pelo tetróxido de ósmio 2% e ácido tânico 2%. Contrastação pelo acetato de uranila e citrato de chumbo.

FIGURA 42. Ampla vesícula acrossômica (VA) derivada da fusão de muitas vesículas golgianas. O núcleo (N) e a vesícula apresentam aproximadamente o mesmo diâmetro. Aumento 23.400x.

FIGURA 43. Cortes transversais em espermátides com adiantado grau de alongamento e compactação nuclear. O acrossomo (A) ocupa a região mais apical da "cabeça" da espermátide nesta fase. Em corte da região mediana da "cabeça" da espermátide não é observado o acrossomo, somente o núcleo (N). Muitos microtúbulos (Mi) são observados no citoplasma da célula de Sertoli que permeia estas células. Aumento 18.900x.

42



### 5.3.2. Alongamento e compactação do material nuclear e processos citoplasmáticos associados

Na diferenciação espermiática, o núcleo sofre um processo contínuo e homogêneo de compactação cromatínica, simultaneamente a um alongamento e a uma notável redução do volume nuclear.

Ao mesmo tempo notamos também, uma redução do volume citoplasmático (Figs. 44 a 52).

Toda esta dinâmica de alongamento celular e redução do volume das células espermiáticas está intimamente relacionada com as células de Sertoli (Fig. 53).

Estas células apresentam uma quantidade notável de microtúbulos altamente organizados na direção do alongamento celular das espermiátides (Figs. 43, 46, 49 e 50).

Foram detectadas junções de membranas do tipo desmossomo e zônula de adesão em membranas plasmáticas entre espermiátides e células de Sertoli (Fig. 45).

As espermiátides imaturas (Fig. 52) apresentam o volume nuclear bastante pronunciado, a cromatina menos contrastada do que os maduros e com o seu material de aspecto filamentososo e bastante frouxo.

O material citoplasmático, vesículas e organelas membranosas são muito conspícuos; este material a ser eliminado da espermiátide freqüentemente está associado às células de Sertoli.

A medida que o núcleo se compacta e a célula se alonga, muitos microtúbulos são encontrados no citoplasma das células de Sertoli e estes microtúbulos estão dispostos longitudinalmente, paralelos à direção do alongamento celular (Figs. 46 e 50). É comum encontrar-se microtúbulos dispostos longitudinalmente paralelos ao núcleo da espermatíde em alongamento celular, adjacentes ao envólucro nuclear (Figs. 46 e 48) entretanto os microtúbulos são mais abundantes nas células de Sertoli.

A compactação do material cromatínico é uniforme começando por pequenos grumos uniformemente distribuídos, até uma massa cromatínica bastante compacta (Figs. 45 a 51).

A perda do material citoplasmático se dá pelo deslocamento de amplas massas membranosas citoplasmáticas (Fig. 52). Este material membranoso e vacuolizado sob a forma de vesículas pode ser encontrado sendo desprendido da região da cabeça, peça intermediária e filamento caudal (Figs. 49, 51, 52, 56 e 61).

Estruturas membranosas semelhante a lamelas aneladas (Figs. 47 e 51) foram encontradas em espermatídes em estágio avançado de diferenciação.

Na região basal dos lóculos encontraram-se células intersticiais com abundância de retículo endoplasmático com alto nível de organização (Fig. 54) podendo ser consideradas células secretoras à semelhança das células de Leydig dos mamíferos.

## FRANCHA XIV

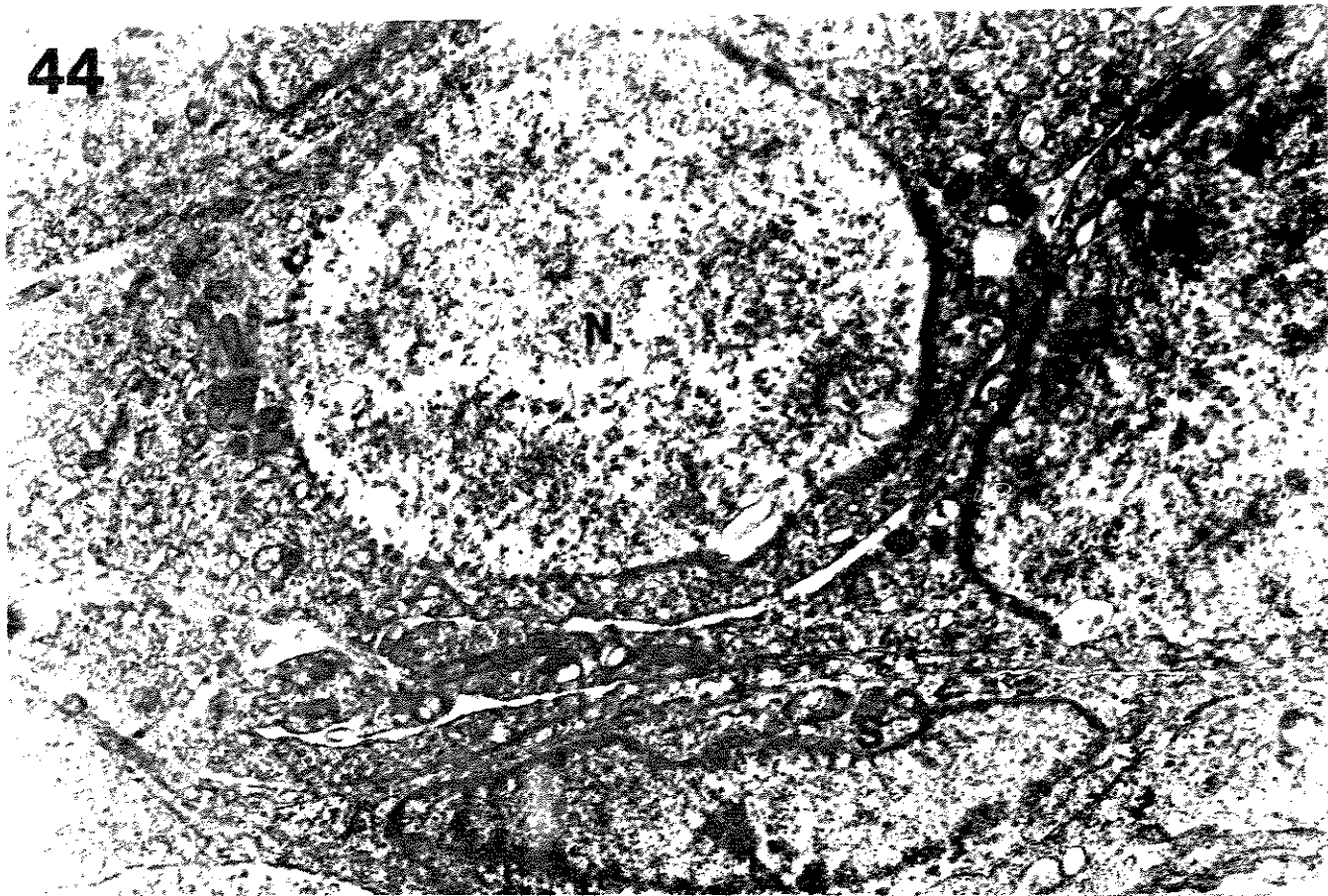
Cortes ultra-finos de testículo de *Hyla ranki*. Fixação pelo glutaraldeído 3%, pós-fixação pelo tetróxido de ósmio 2% e ácido tânico 2%. Contrastação pelo acetato de uranila e citrato de chumbo.

FIGURA 44. Espermátide imatura com núcleo (N) esférico e cromatina pouco compactada. Em associação a estes tipos celulares observam-se células de Sertoli (S). Aumento 11.600x.

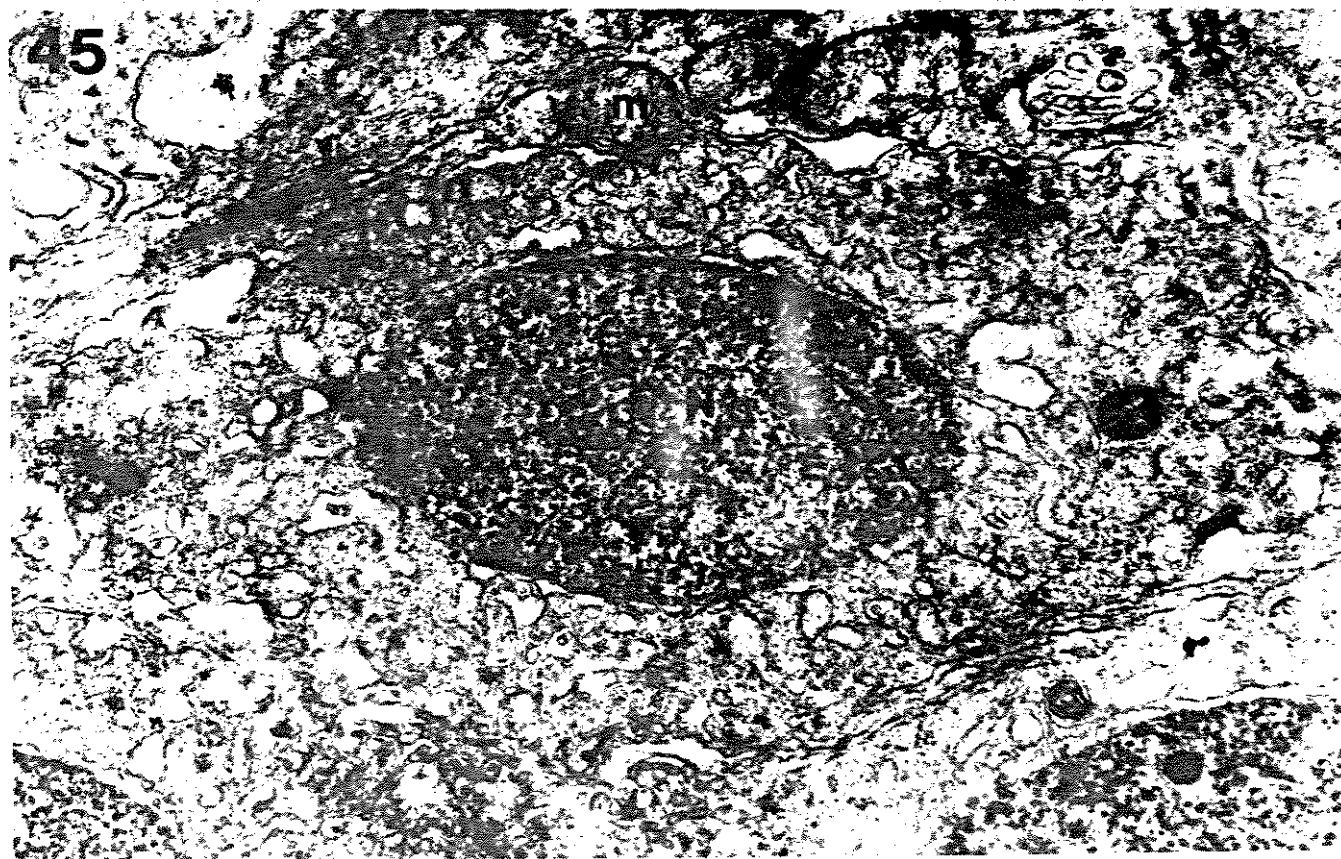
FIGURA 45. Espermátide apresentando o material nuclear (N) com aspecto uniforme de compactação cromatínica e alongamento celular (corte aproximadamente transversal). Junções entre as membranas plasmáticas de espermátides e célula de Sertoli (seta). Aumento 29.000x.



44



45



## PRANCHA XV

Cortes ultra-finos de testículo de *Hyla ranki*. Fixação pelo glutaraldeído 3%, pós-fixação pelo tetróxido de ósmio 2% e ácido tânico 2%. Contrastação pelo acetato de uranila e citrato de chumbo.

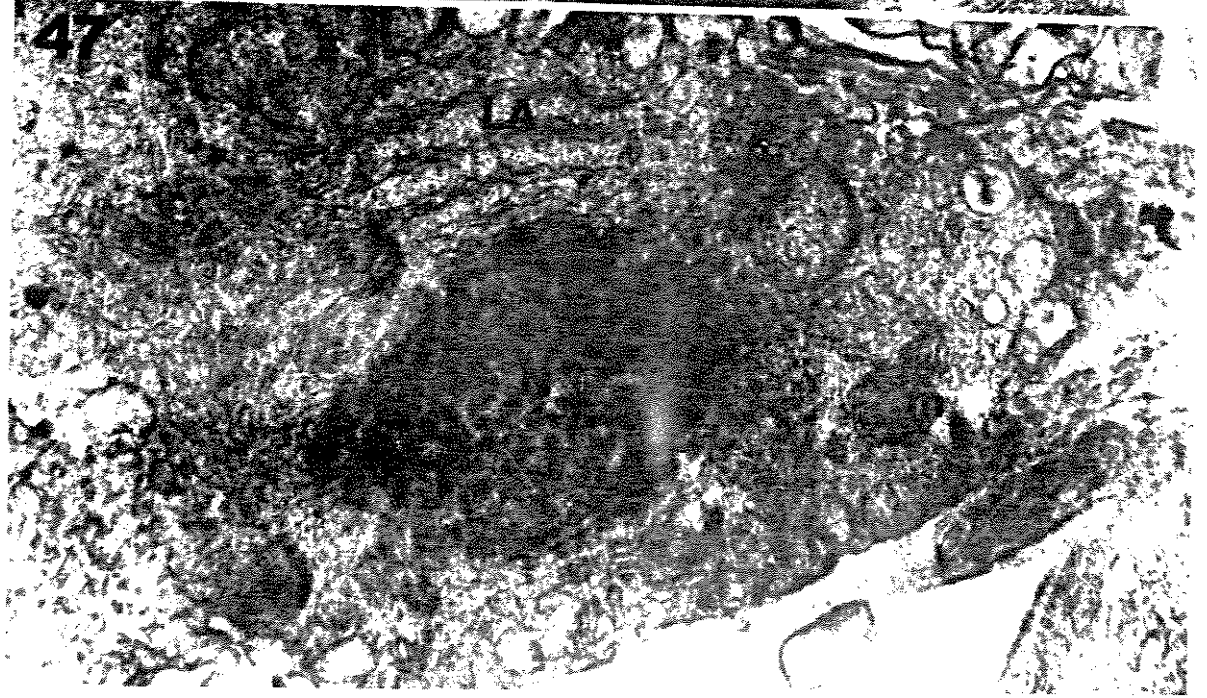
FIGURA 46. Compactação nuclear das espermatídes e alongamento celular. Corte transversal em núcleos (N) com cromatina uniformemente compactada. Microtúbulos (Mi) abundantes no citoplasma das células de Sertoli e nas espermatídes, adjacentes ao núcleo (setas). Na região apical do núcleo há presença de membranas acrossomais (Ma). Núcleo da célula de Sertoli (S). Aumento 38.000x.

FIGURA 47. Corte transversal em espermatíde com adiantado grau de alongamento e compactação nuclear. Lamelas aneladas (LA), mitocôndrias (m) e núcleo (N). Aumento 52.900x.

46



47



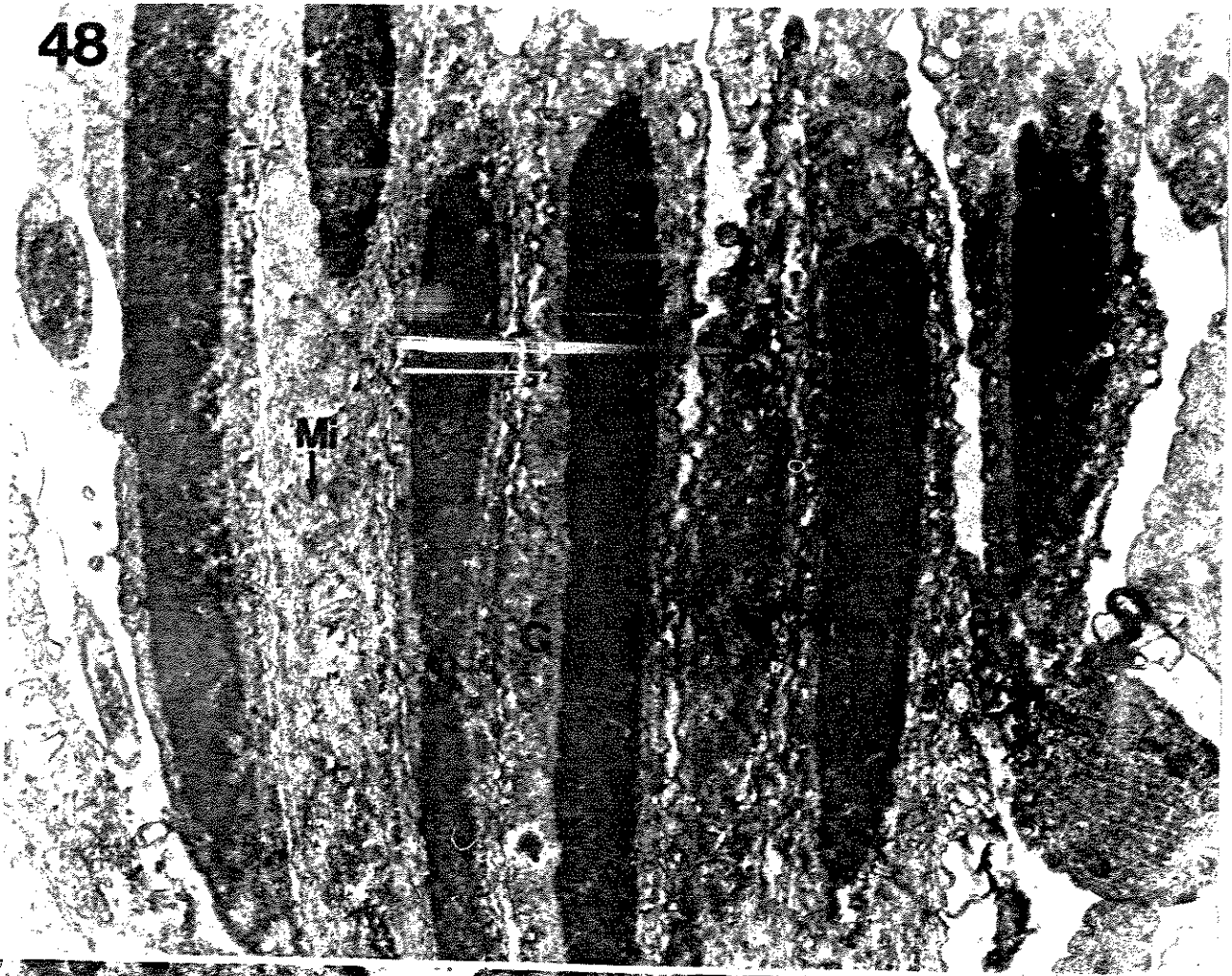
## PRANCHA XVI

Cortes ultra-finos de testículo de *Hyla ranki*. Fixação pelo glutaraldeído 3%, pós-fixação pelo tetróxido de ósmio 2% e ácido tânico 2%. Contrastação pelo acetato de uranila e citrato de chumbo.

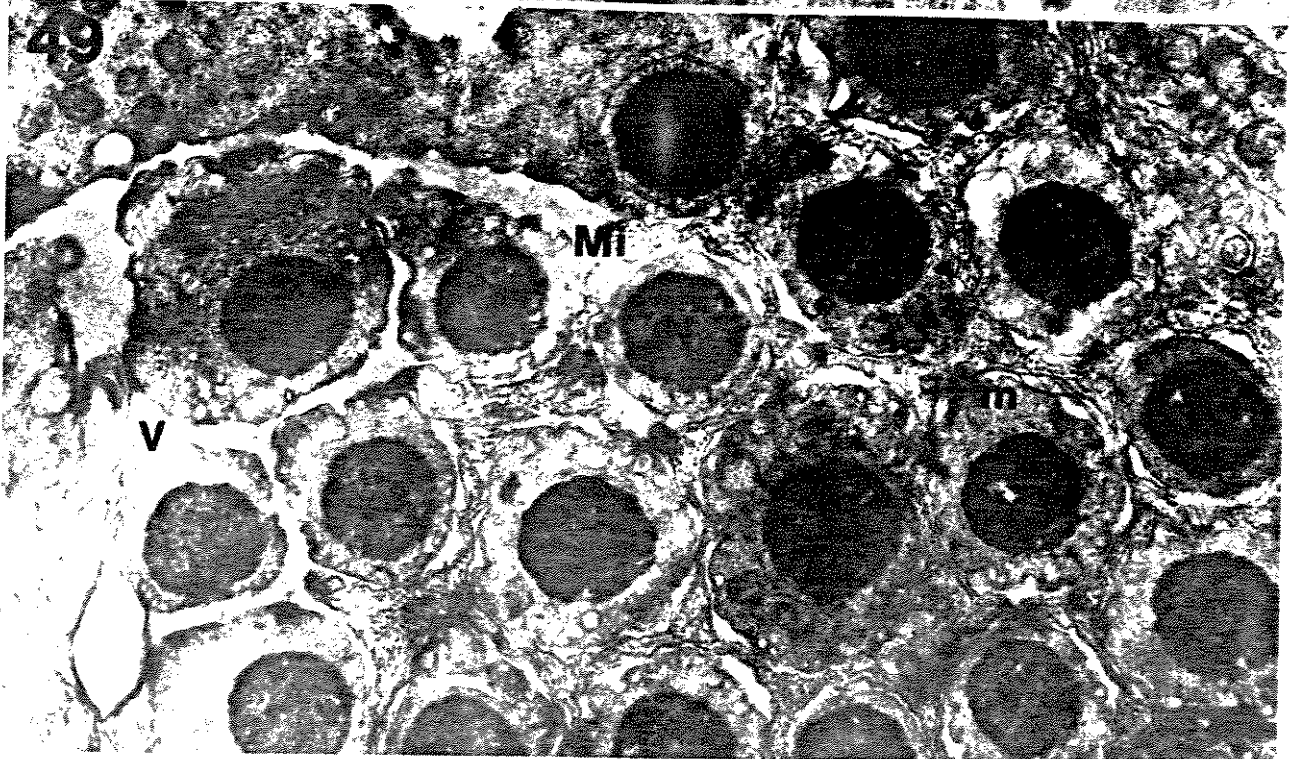
FIGURA 48. Corte longitudinal em espermátides com alongamento e compactação nuclear pronunciados. Núcleos (N), citoplasma (C) com microtúbulos (Mi). Aumento 16.200x.

FIGURA 49. Corte transversal em feixe de espermátides permeadas por célula de Sertoli com microtúbulos abundantes em seu citoplasma (Mi) seguindo o eixo maior do núcleo (N). Vesículas (V) e mitocôndrias (m). Aumento 20.300x.

48



49



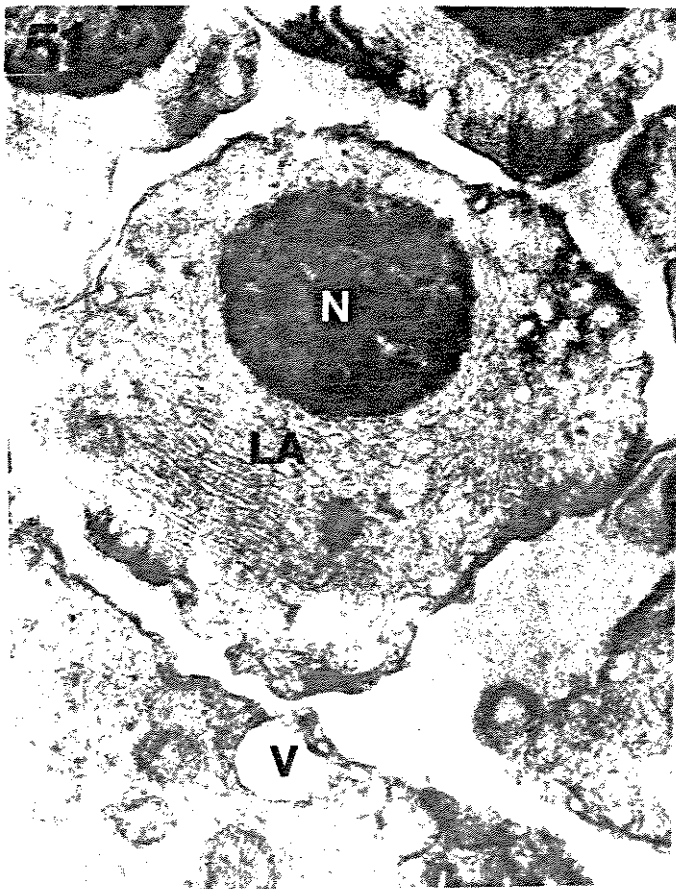
## PRANCHA XVII

Cortes ultra-finos de testículos de *Hyla ranki*. Fixação pelo glutaraldeído 3%, pós-fixação pelo tetróxido de ósmio 2% e ácido tânico 2%. Contrastação pelo acetato de uranila e citrato de chumbo.

FIGURA 50. Corte longitudinal da parte apical da cabeça de um espermatozóide mostrando o acrossomo (A), membranas acrossomais (Ma) e núcleo (N). No citoplasma da célula de Sertoli uma grande quantidade de microtúbulos (Mi) pode ser observado. Aumento 94.800x.

FIGURA 51. Corte transversal de espermátide. Núcleo (N), lamelas aneladas (LA) e vesículas (V). Aumento 39.600x.

FIGURA 52. Corte transversal em espermátide. Grande quantidade de material membranoso liberado das espermátides (M). Axonema (a), bastonete axial (b). Aumento 24.200x.



## FRANCHA XVIII

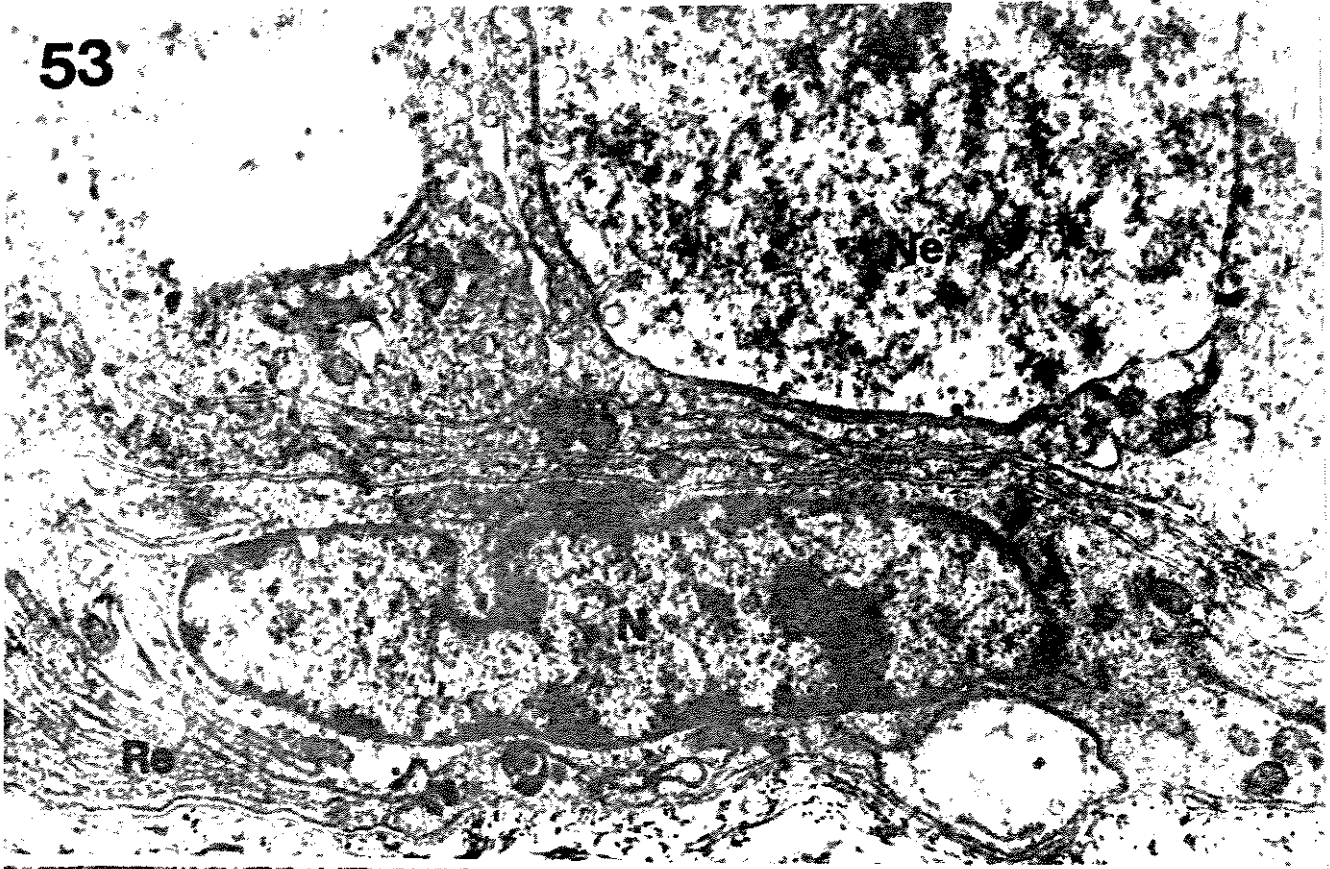
Cortes ultra-finos de testículo de *Hyla ranki*. Fixação pelo glutaraldeído 3%, pós-fixação pelo tetróxido de ósmio 2% e ácido tânico 2%. Contrastação pelo acetato de uranila e citrato de chumbo.

FIGURA 53. Célula de Sertoli na região basal do lóculo. Núcleo (N), retículo endoplasmático (Re), mitocôndrias (m). Na região superior da micrografia têm-se núcleos de espermatídes (Ne). Aumento 13.700x.

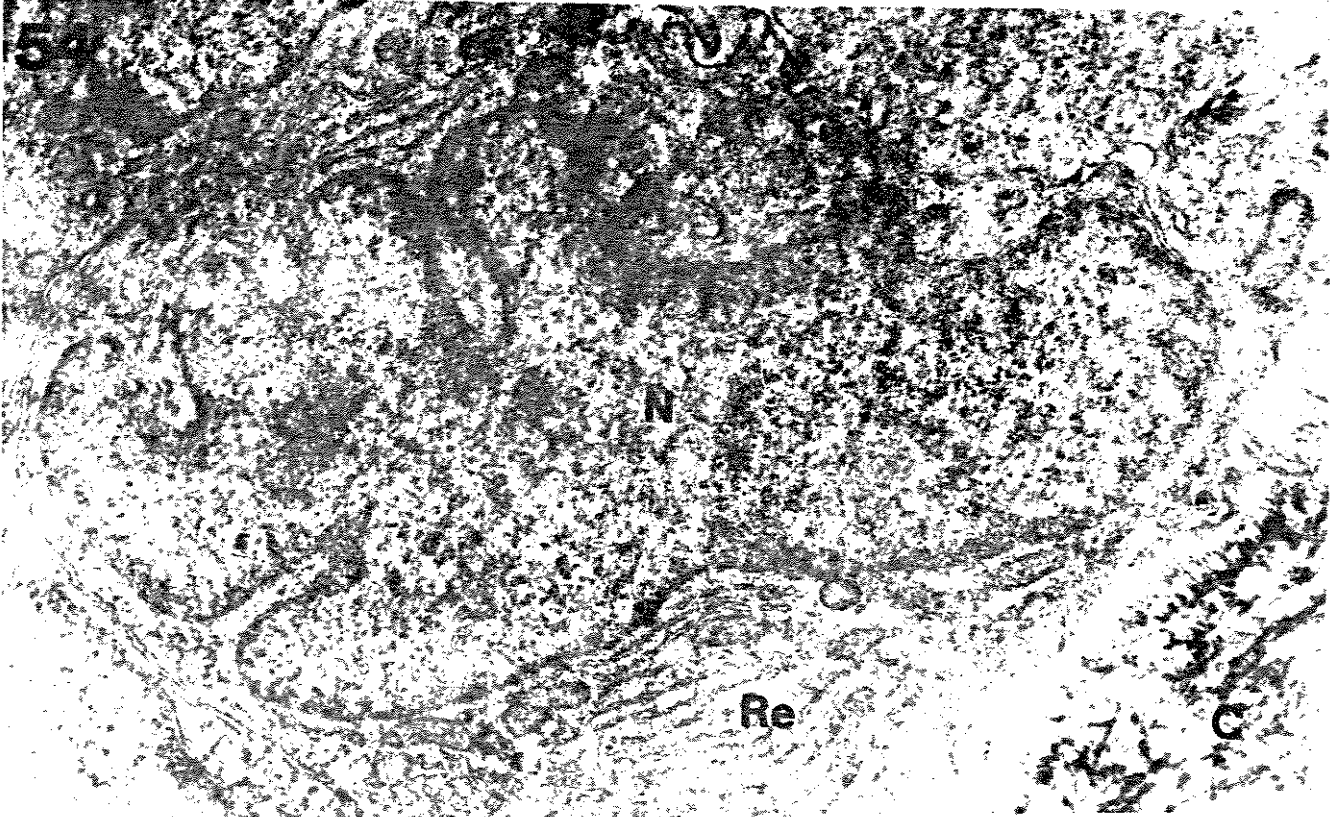
FIGURA 54. Célula intersticial. Núcleo (N), retículo endoplasmático (Re) e colágeno (C). Aumento 14.700x.



53



54



### 5.3.3. Desenvolvimento do filamento caudal

Ultra-estruturalmente a cauda dos espermatozóides e das espermatídes em estádios avançados de diferenciação apresenta-se com um axonema típico de vertebrado, isto é, 9 pares de microtúbulos periféricos e 1 par central (Fig. 67).

Associado a este axonema tem-se um bastão axial eletrodenso que segue toda extensão da cauda e um filamento marginal que, em corte transversal tem forma triangular (Fig. 57).

Em todos os espécimens analisados este bastão tem diâmetro uniforme, aproximadamente com a metade do diâmetro ocupado pelo axonema; salvo algumas fusões anormais de cauda, somente um bastão está associado ao axonema (Figs. 57, 61 e 65).

Em corte transversal na região mediana da cauda (Fig. 61) observa-se uma organização preferencial dos filamentos caudais, pois as espermatídes mesmo em estágio avançado de diferenciação são mantidas organizadas em feixes, permeadas ao nível do núcleo e peça intermediária pelo citoplasma das células de Sertoli (Figs. 59, 75 e 76). Assim, estes filamentos são organizados de tal sorte, que os axonemas e os bastonetes ficam regularmente apostos.

O bastão axial tem sua origem ainda na peça intermediária, onde está presente dentro de uma bainha de mitocôndrias (Fig. 55, 56, 62 e 66) que circunda o filamento caudal como um todo nesta região.

Na região da peça intermediária o axonema e o bastão axial são próximos entre si (Figs. 56 e 62) e à medida que se progride para a porção mediana da cauda (Fig. 65) tais estruturas se afastam e são interligadas por uma membrana ondulante, seguindo do bastão axial até o filamento marginal.

Na região mediana da cauda, uma massa eletrodensa encontra-se apostada e adjacente ao axonema (Fig. 65), tendo a mesma origem do bastão e aspecto triangular em corte transversal, esta massa eletrodensa sempre está na altura do par 8 de microtúbulos do axonema, sempre apostada a ele (Fig. 67) e recebe o nome de filamento marginal.

À medida que os cortes transversais vão se aproximando da região terminal da cauda, o bastão axial e o axonema reaproximam-se, inexistindo a membrana ondulante entre eles e também o filamento marginal (Fig. 63). Na porção mais distal (telomérica) da cauda o axonema não apresenta bastão associado (Fig. 64).

A análise dos cortes transversais das várias porções da cauda permitiu a construção de um esquema onde se adotaram numerações para as diferentes porções da cauda (Esq. III).

Na porção mais proximal da cauda (porção 1) encontraram-se centríolos (Fig. 59), estruturas estas, que muitas vezes podem estar embutidas numa invaginação da porção basal do núcleo (Fig. 55). Cortes transversais (Fig. 58) e longitudinais (Fig. 60) da região transicional entre o

centríolo e o axonema foram encontrados, os quais foram aqui considerados como corpúsculo basal.

Nesta fase de diferenciação espermiática, grande quantidade de membranas e citoplasma são eliminados. Na região da peça intermediária e caudal amplas vesículas membranosas foram encontradas no espaço extracelular (Figs. 52 e 61).

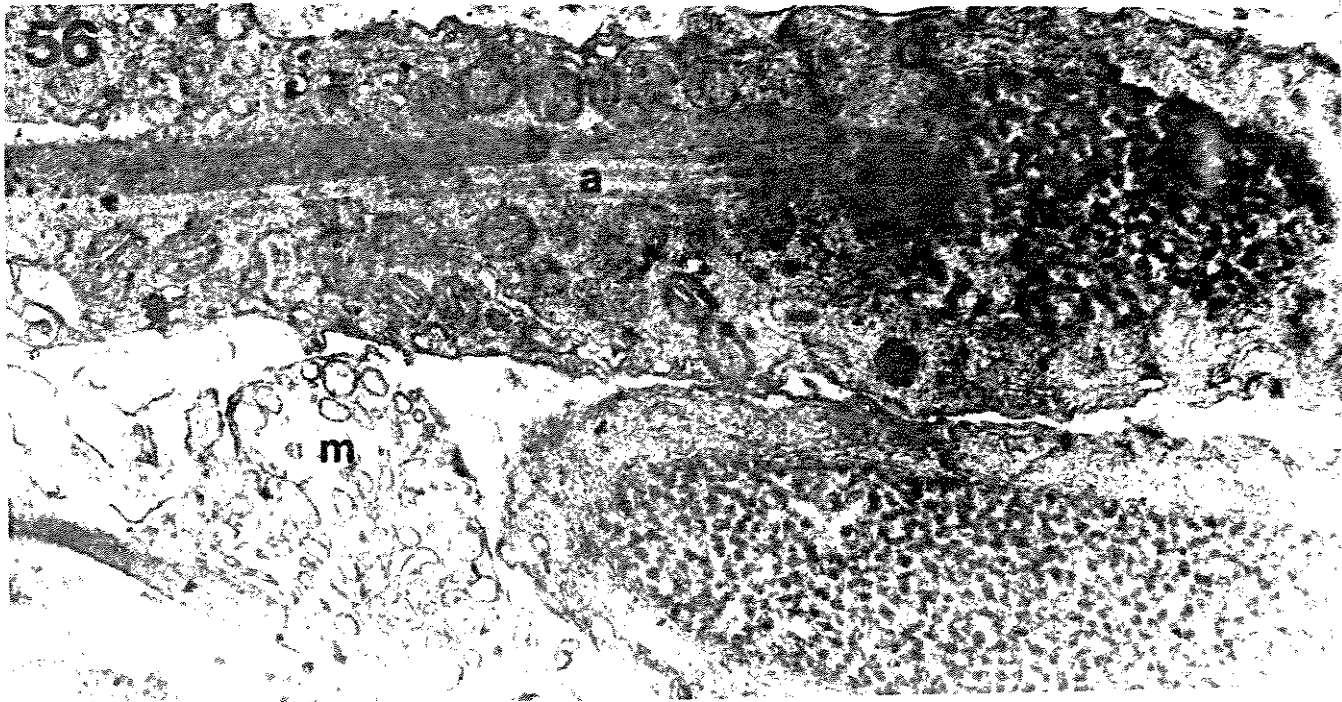
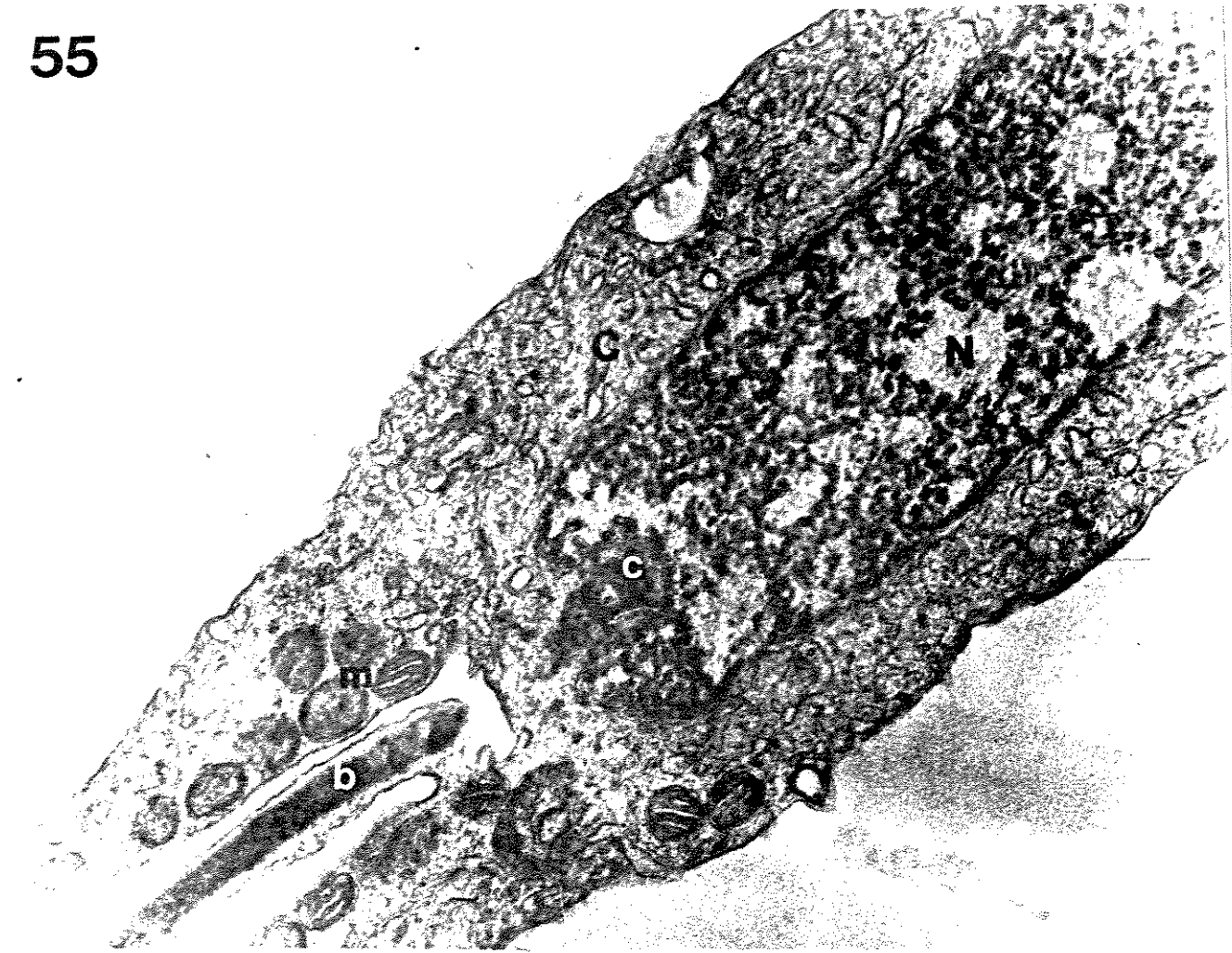
## FRANCHA XIX

Cortes ultra-finos de testículo de *Hyla ranki*. Fixação pelo glutaraldeído 3%, pós-fixação pelo tetróxido de ósmio 2% e ácido tânico 2%. Contrastação pelo acetato de uranila e citrato de chumbo.

FIGURA 55. Corte longitudinal de espermátide. Núcleo (N), citoplasma (C), bainha de mitocôndrias da peça intermediária (mi) e bastonete axial (b). Na região basal do núcleo tem-se uma invaginação do envoltório nuclear onde se encontra o centríolo (c). Aumento 51.000x.

FIGURA 56. Corte longitudinal em espermátide. Núcleo (N), citoplasma (C) e mitocôndrias da peça intermediária (mi). Na região da peça intermediária encontra-se o axonema (a) e o bastonete axial (b) bastante aproximados. Nesta fase da espermiogênese muitas estruturas membranosas (m) são encontradas no lúmen do lóculo. Aumento 32.000x.

55



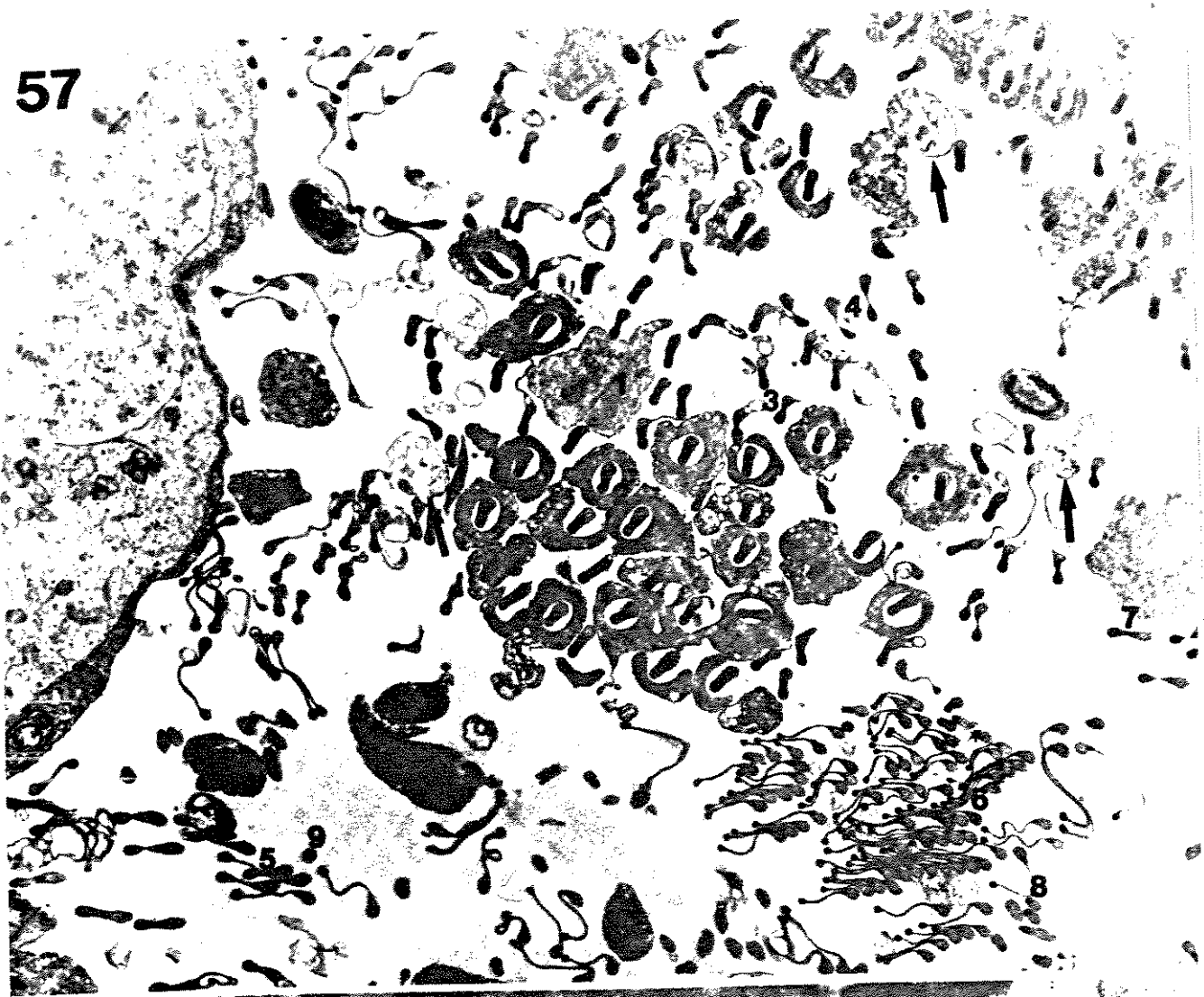
## PRANCHA XX

Cortes ultra-finos em testículos de *Hyla ranki*. Fixação pelo glutaraldeído 3%, pós-fixação pelo tetróxido de ósmio 2% e ácido tânico 2%. Contrastação pelo acetato de uranila e citrato de chumbo.

FIGURA 57. Corte transversal em caudas de espermátides nas várias porções da mesma. Os números de 1 a 9 indicam as várias porções de cortes na cauda. Porções 1 a 3 - proximal, porções 4 a 6 - mediana, porções 7 e 8 - final e porção 9 - telomérica. Muitas estruturas membranosas liberadas pelas espermátides são encontradas entre as caudas (setas). Aumento 7.000x.

FIGURA 58. Corte transversal nas porções mais proximais da cauda, região da peça intermediária, (porção 1). Axonema (a), corpúsculo basal (Cb), microtúbulos (M) das células de Sertoli. Nesta secção o bastonete axial é pouco distinto. Aumento 32.200x.

57



58





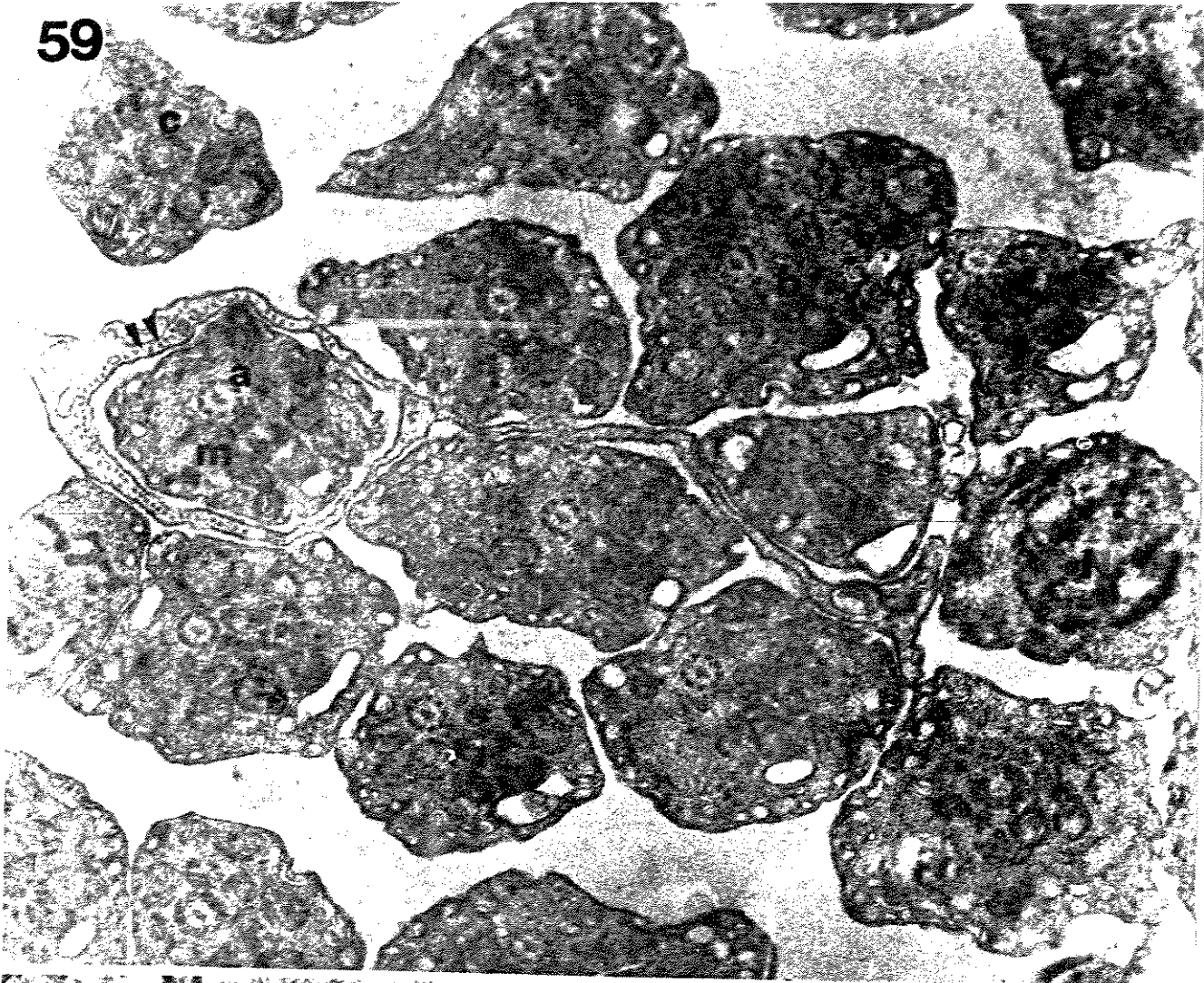
## PRANCHA XXI

Cortes ultra-finos de testículo de *Hyla ranki*. Fixação pelo glutaraldeído 3%, pós-fixação pelo tetróxido de ósmio 2% e ácido tânico 2%. Contrastação pelo acetato de uranila e citrato de chumbo.

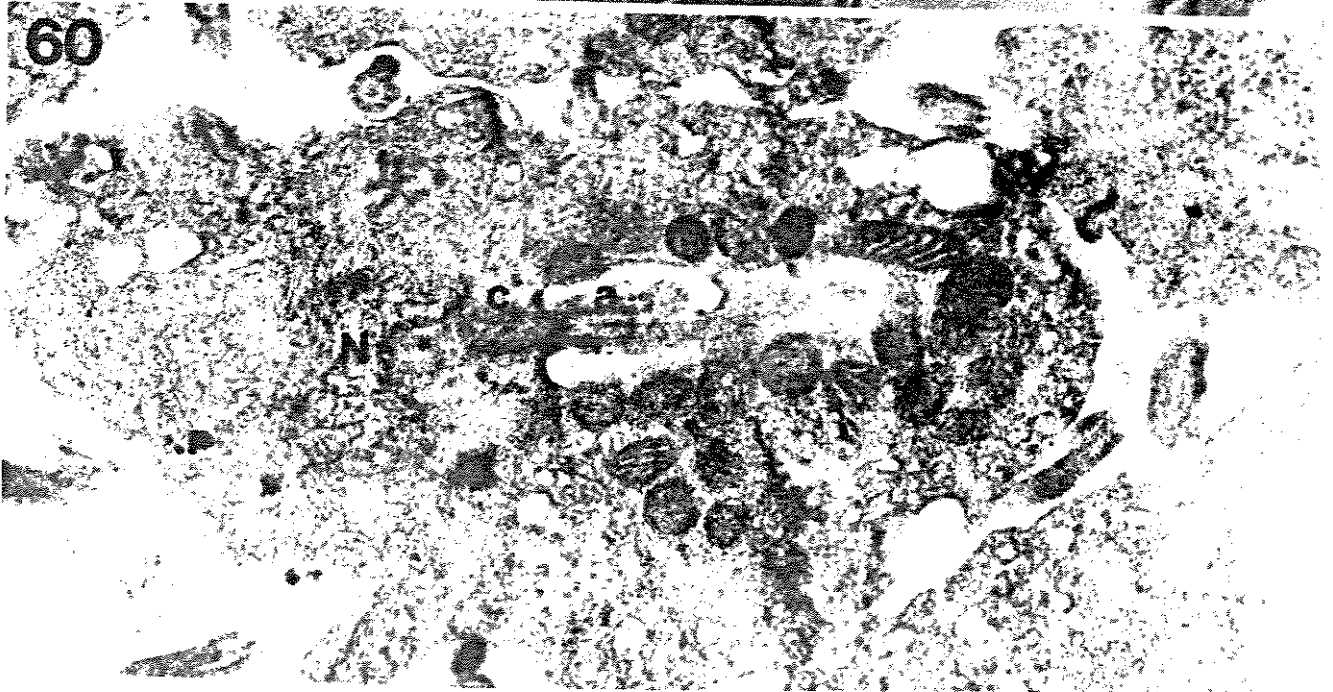
FIGURA 59. Corte transversal na peça intermediária de espermátides (porção 1). Centríolo (c), axonema (a), bastonete axial (b), mitocôndrias (m), núcleos (N) e microtúbulos das células de Sertoli (setas). Aumento 29.200x.

FIGURA 60. Corte sagital na peça intermediária de espermátide, onde a região de transição entre o centríolo (c) e o axonema (a) pode ser observada. Uma conspícua bainha de mitocôndrias (m) pode de ser vista. Núcleo (N). Aumento 25.500x.

59



60



## PRANCHA XXII

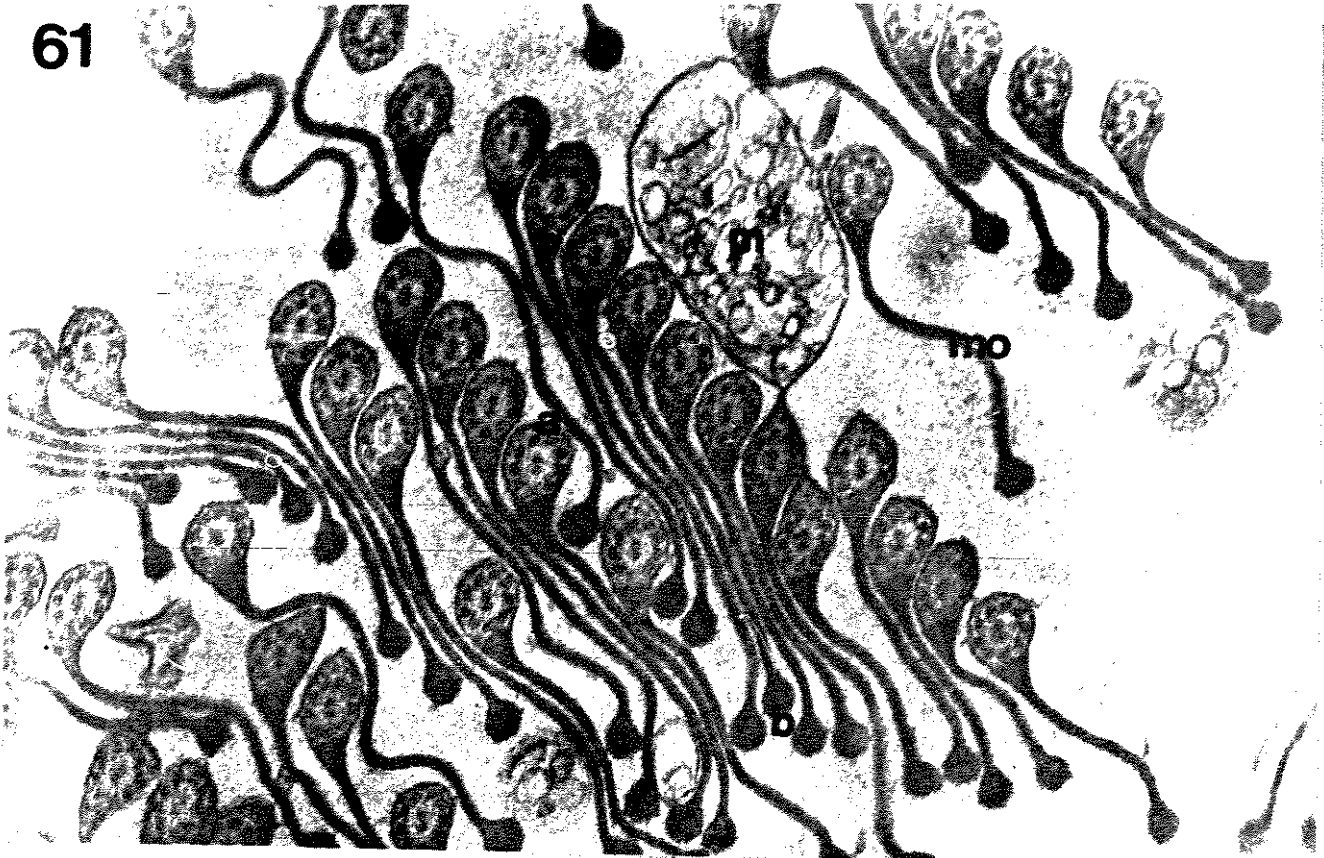
Cortes ultra-finos de testículo de *Hyla ranki*. Fixação pelo glutaraldeído 3%, pós-fixação pelo tetróxido de ósmio 2% e ácido tânico 2%. Contrastação pelo acetato de uranila e citrato de chumbo.

FIGURA 61. Corte transversal na porção mediana da cauda (porção 6). O axonema (a) e o bastonete axial (b) são separados nesta região, por uma membrana ondulante (mo). Estruturas membranosas de eliminação citoplasmática (m) são observadas entre estas caudas. Aumento 39.500x.

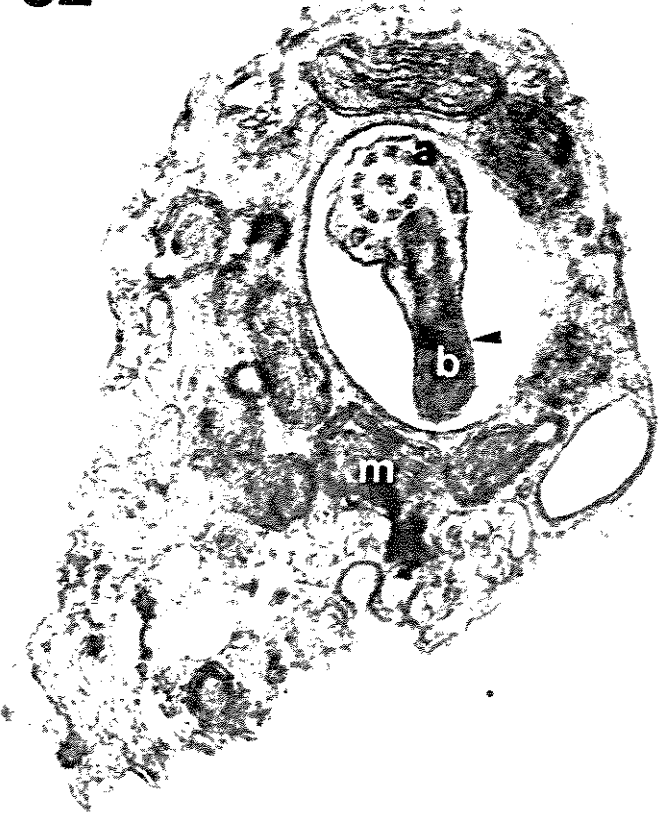
FIGURA 62. Corte transversal na peça intermediária (porção 2). O axonema (a) e o bastonete axial (b) estão muito aproximados e são envolvidos pela membrana plasmática (seta), circundados pela bainha de mitocôndrias (m). Aumento 55.000x.

FIGURAS 63 e 64. Cortes transversais na porção final da cauda (porções 8 e 9). O bastonete axial se encontra muito aproximado do axonema (a) e na porção telomérica da cauda (porção 9) o axonema se encontra sem bastonete associado (t). Aumento 40.200x.

61



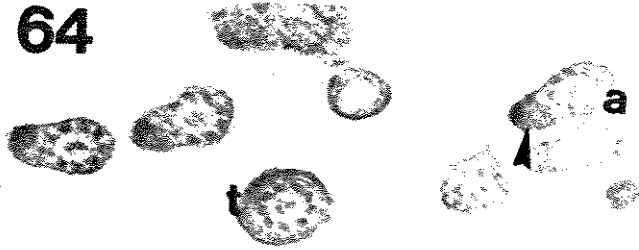
62



63



64



## FRANCHA XXIII

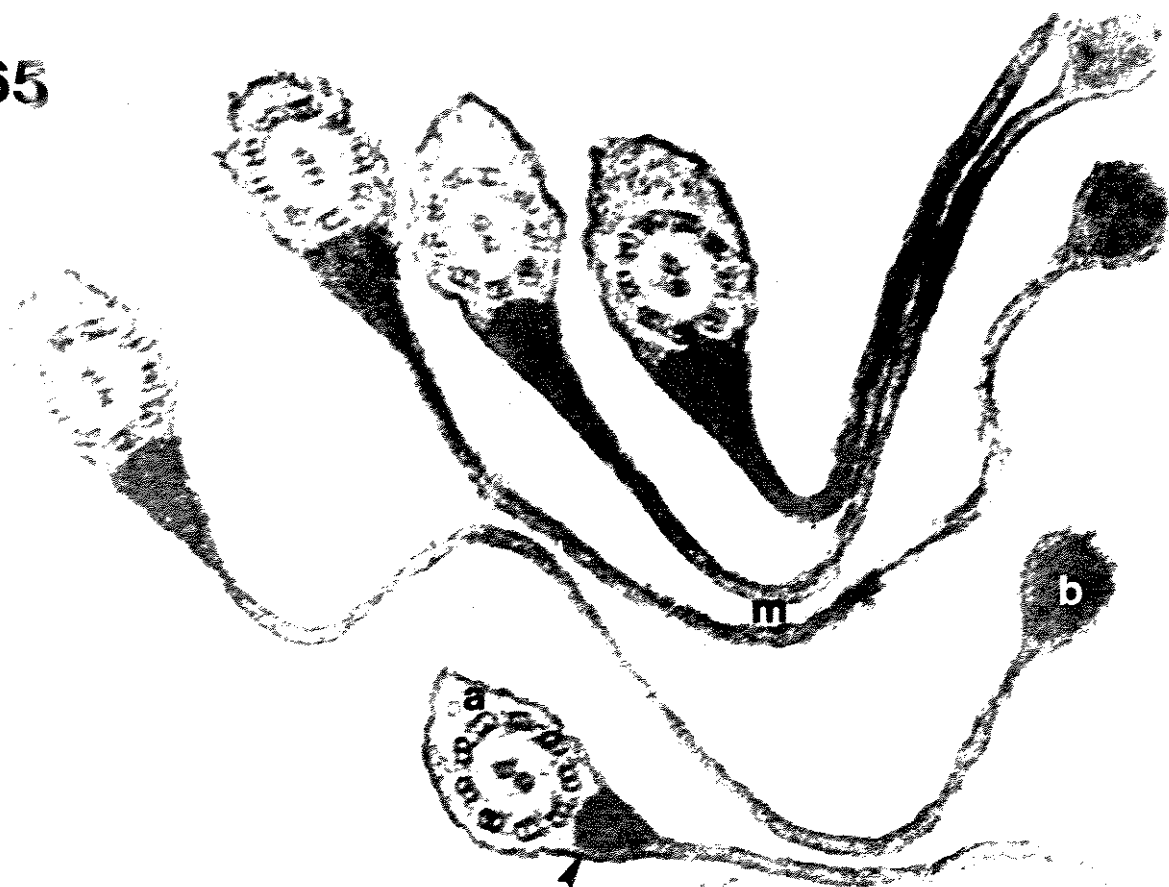
Cortes ultra-finos de testículo de *Hyla ranki*. Fixação pelo glutaraldeído 3%, pós-fixação pelo tetróxido de ósmio 2% e ácido tânico 2%. Contrastação pelo acetato de uranila e citrato de chumbo.

FIGURA 65. Corte transversal da região mediana da cauda (porção 6). Axonema (a), bastonete axial (b), membrana ondulante (mo). Próximo ao axonema existe um acúmulo de material eletrodense de forma triangular, que é o filamento marginal (seta). Aumento 93.700x.

FIGURA 66. Corte transversal da peça intermediária (porção 2). Axonema (a), bastonete axial (b) e bainha de mitocôndrias (m). Quantidade considerável de citoplasma (c) é encontrada nesta região na fase imatura. Aumento 40.200x.

FIGURA 67. Corte transversal no axonema, que é um axonema típico de vertebrado (9+2). Próximo a este axonema, na região do par 8 de microtúbulos, existe um filamento marginal de aspecto triangular (seta). Aumento 178.800x.

65



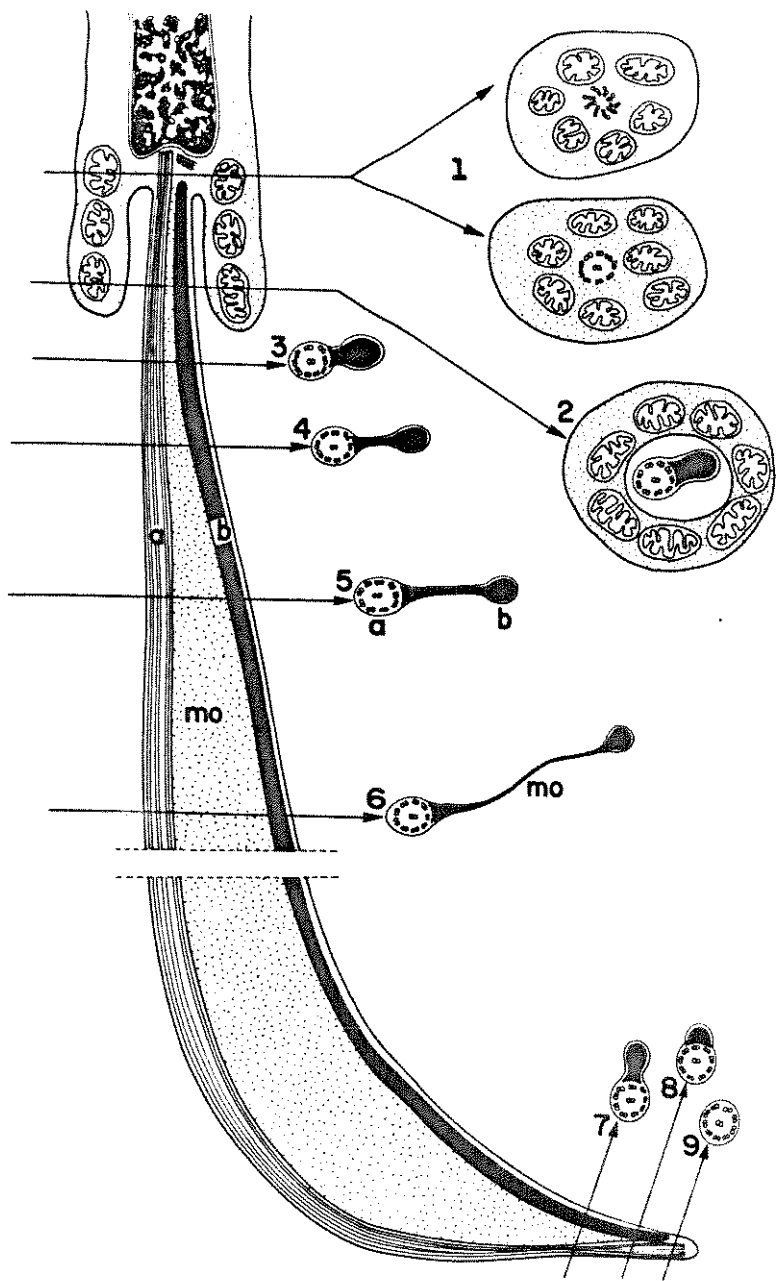
66



67



ESQUEMA III. Representação esquemática do filamento caudal do espermatozóide de *Hyla ranki*. Região proximal (1, 2 e 3), Região mediana (4, 5 e 6), Região final (7 e 8) e Região telomérica (9). O axonema (a) segue paralelamente ao bastão axial (b) os quais na porção mediana são separados por uma membrana ondulante (mo)





#### 5.4. Espermiogênese anormal

Na análise da diferenciação espermiogênica ao microscópio eletrônico, algumas alterações do referido processo foram detectadas.

Dentre as alterações, as mais freqüentes se relacionavam com a formação do filamento caudal, os quais se apresentavam com diferentes tipos de fusão dos referidos filamentos (Figs. 71 e 72).

Poucas alterações a nível nuclear, principalmente relacionadas com anormalidades na compactação cromatínica no momento do alongamento celular, foram detectadas (Fig. 70) e também um caso específico de espermatíde anormal com 7 axonemas associados a bastonetes, núcleo e vesícula acrossômica anormais (Figs. 68 e 69).

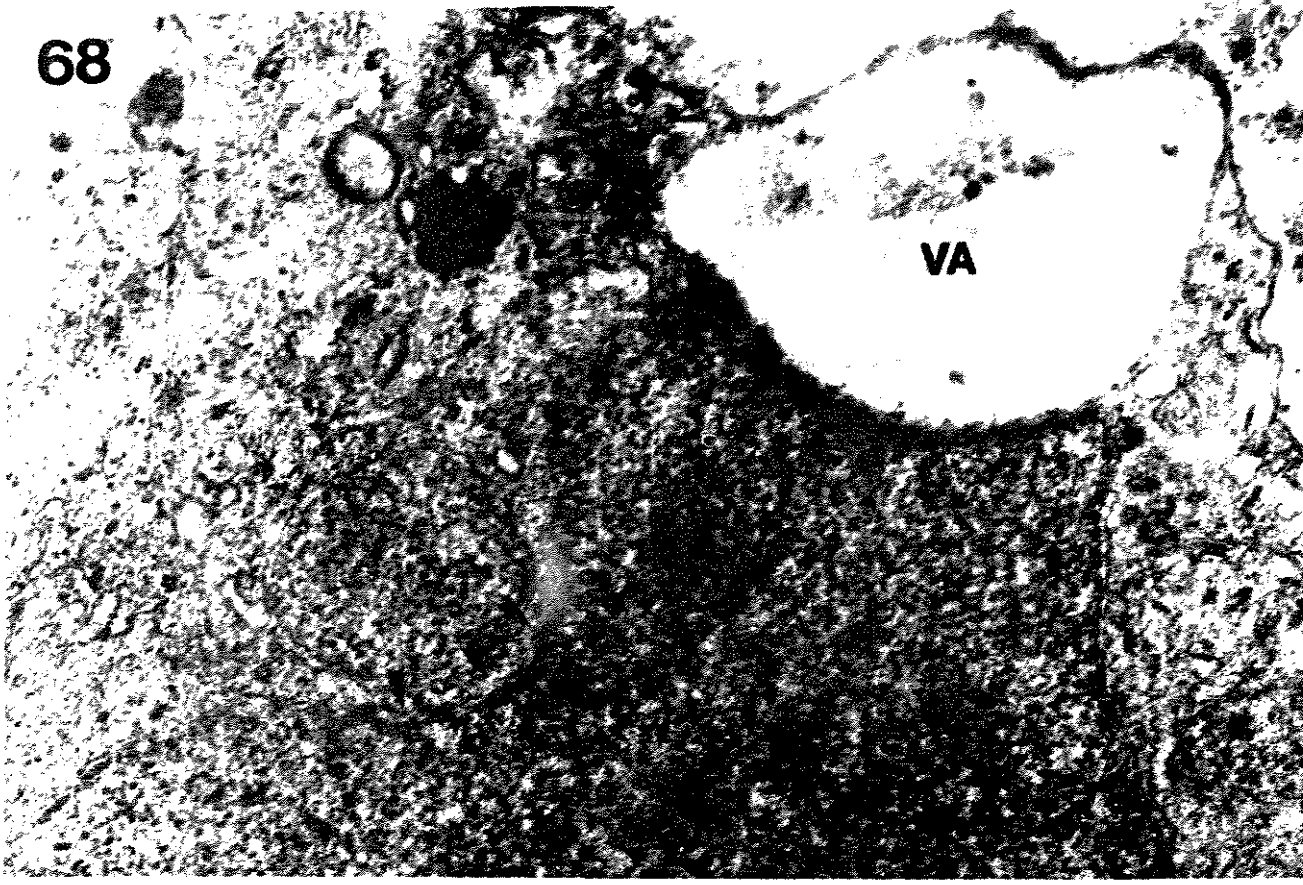
## PRANCHA XXIV

Cortes ultra-finos de testículo de *Hyla ranki*. Fixação pelo glutaraldeído 3%, pós-fixação pelo tetróxido de ósmio 2% e ácido tânico 2%. Contrastação pelo acetato de uranila e citrato de chumbo.

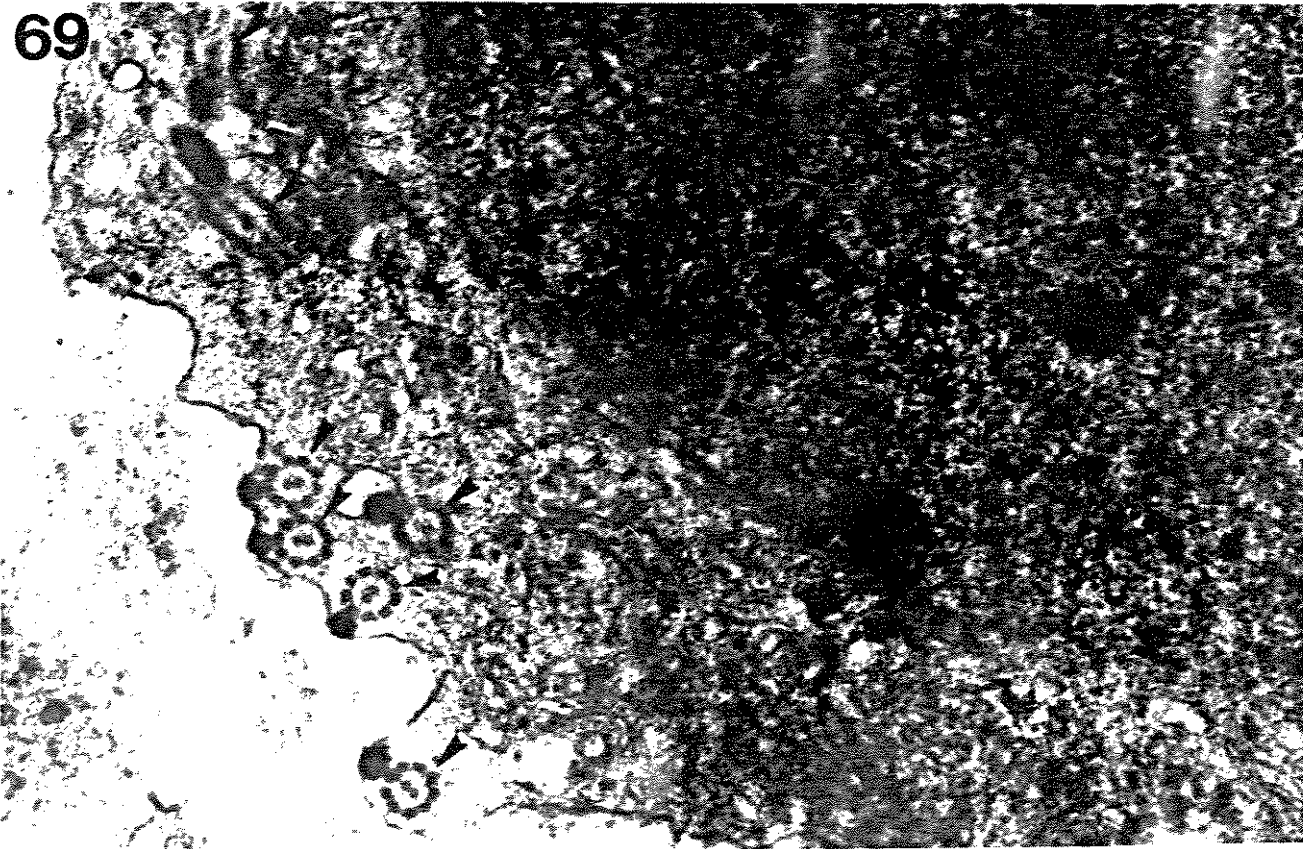
FIGURA 68. Espermátide anormal, com vesícula acrossômica (VA) e núcleo (N) de aspectos atípicos. Invaginação anormal do núcleo (setas). Aumento 32.000x.

FIGURA 69. Espermátide alterada com 7 axonemas associados a bastonetes eletrodensos (setas) também formados de maneira anormal, Núcleo (N). Aumento 32.000x.

68



69



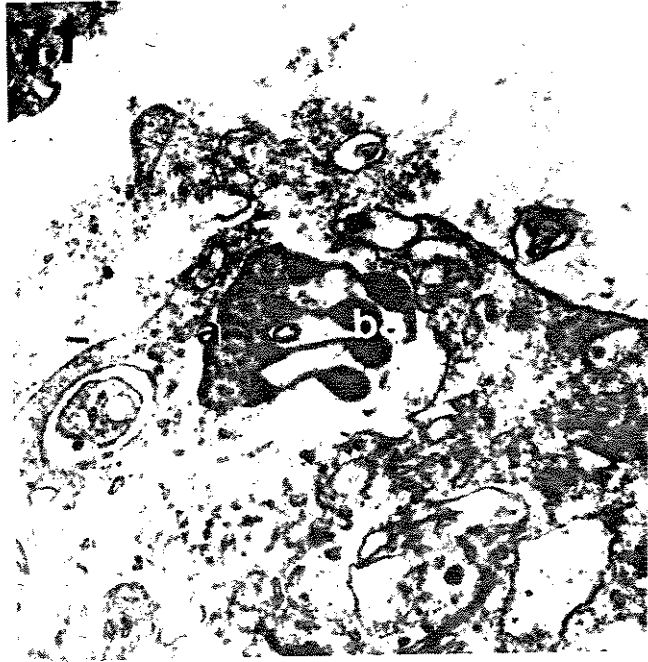
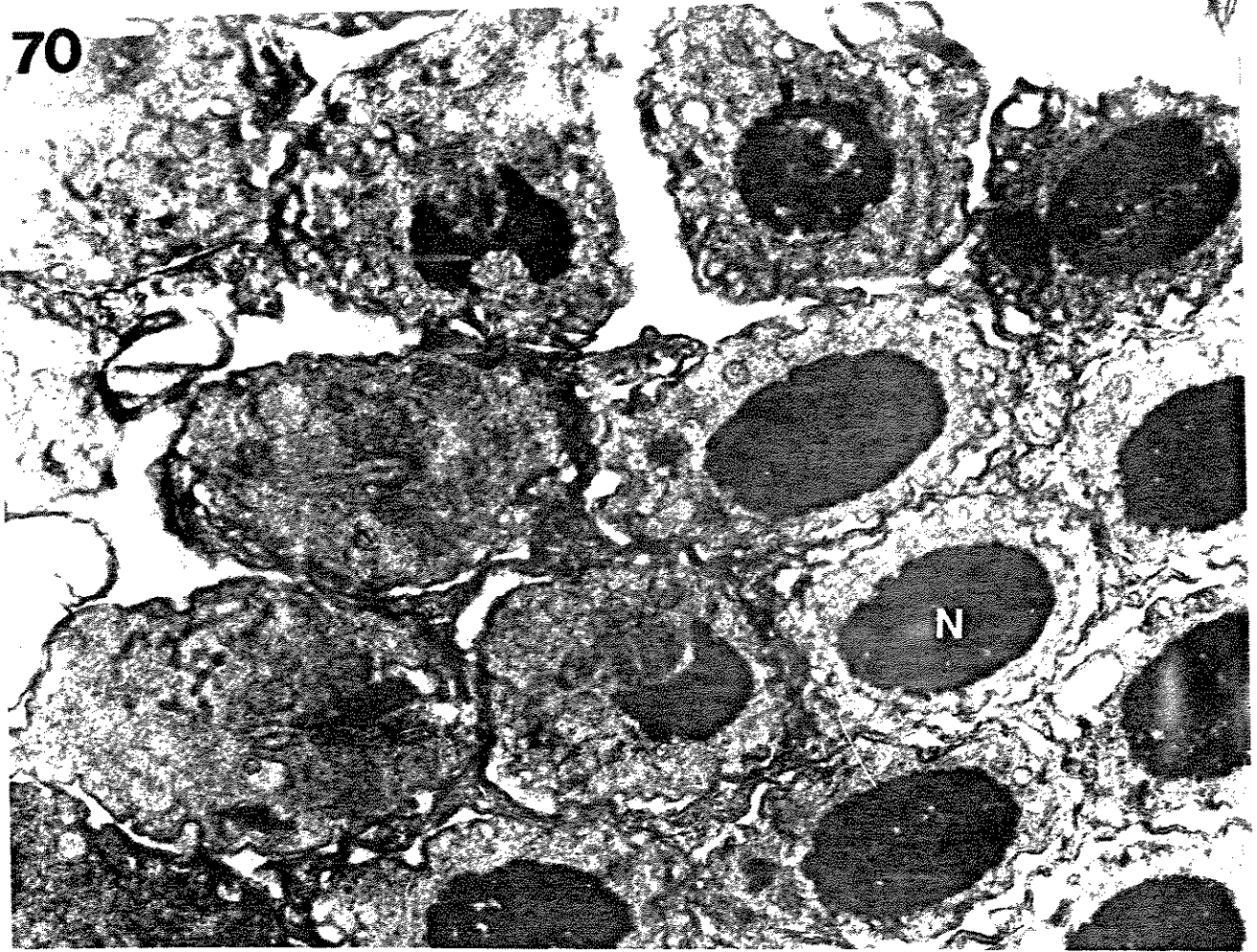
## FRANCHA XXV

Cortes ultra-finos de testículos de *Hyla ranki*. Fixação pelo glutaraldeído 3%, pós-fixação pelo tetróxido de ósmio 2% e ácido tânico 2%. Contrastação pelo acetato de uranila e citrato de chumbo.

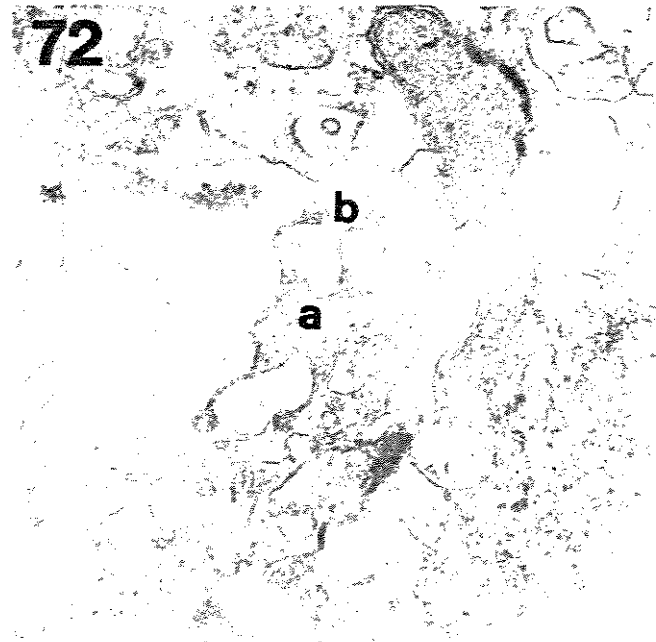
FIGURA 70. Corte transversal em núcleos de espermatídes com compactação nuclear anômala (setas). Núcleos normais (N). Aumento 27.900x.

FIGURA 71 e 72. Fusão dos filamentos caudais. Axonemas (a) e bastonetes axiais (b). Aumento 27.900x.

70



72



## 5.5. Detecção de proteínas básicas pelo E-PTA

A análise dos cortes ultra-finos dos testículos tratados pelo E-PTA revelou seletivamente a presença de proteínas nucleares básicas das células germinativas (Figs. 73 a 77) além das proteínas que compõem o filamento marginal e bastão axial no filamento caudal (Figs. 78 a 81).

As células do espermatocisto, isto é, espermatídes imaturas e espermatócitos apresentaram-se com seus núcleos pouco contrastados (Figs. 73 e 74). A eletrodensidade dos núcleos jovens e dos cromossomos dos espermatócitos foi baixa, este fato teve uma considerável intensificação somente após o alongamento celular, quando as espermatídes em alongamento e adiantado grau de citodiferenciação apresentaram alta concentração de proteínas com riqueza em aminoácidos básicos, foram evidenciadas pelo E-PTA (Figs 75 e 76).

Os núcleos das células de Sertoli e citoplasma das espermatídes em alongamento apresentaram sempre uma baixa eletrodensidade e falta de contraste, nos preparados submetidos a este método (Figs. 75 e 76).

Os espermatozóides maduros apresentaram imagens variadas quanto à eletrodensidade nuclear, devido ao alto grau de compactação cromatínica e diferentes intensidades de penetração da molécula de PTA, restringindo

a penetração por vezes, somente às membranas acrossomais (Fig. 77).

Os componentes da cauda foram altamente reativos ao E-PTA o que revela uma constituição proteínácea com riqueza de aminoácidos básicos em sua estrutura molecular (Figs. 78 a 81). Com esta metodologia pôde-se sugerir uma ligação entre o filamento marginal e o 8º par de microtúbulos do axonema (Fig. 81), fato este não detectado pelos tratamentos rotineiros com uranila e chumbo.

## PRANCHA XXVI

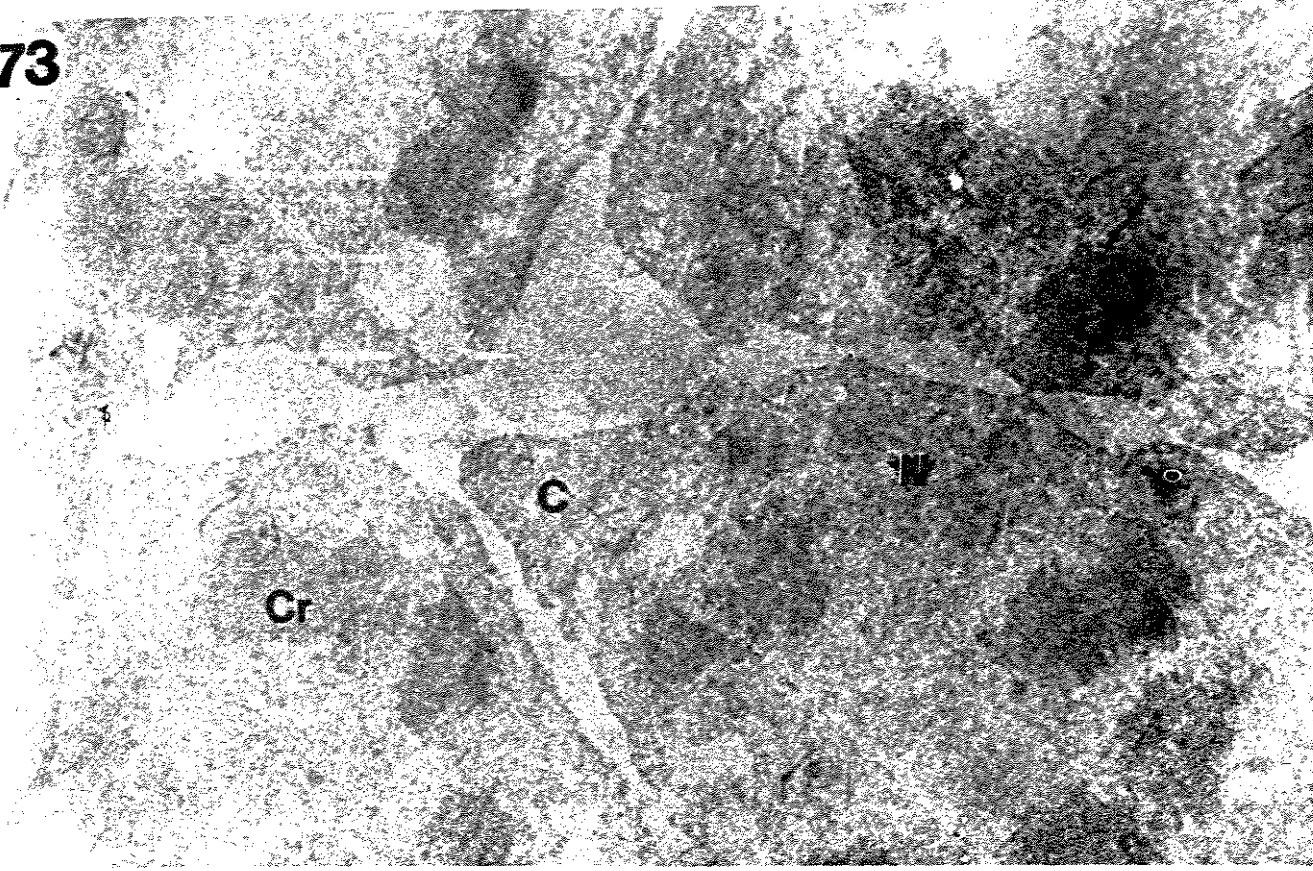
Cortes ultra-finos em testículos de *Hyla ranki* fixados pelo glutaraldeído 3% e desidratados pelo E-PTA.

FIGURA 73. Baixa reatividade ao ácido fosfotúngstico (PTA) em espermatócitos. Núcleo (N), citoplasma (C) e cromossomos (Cr). Aumento 25.400x.

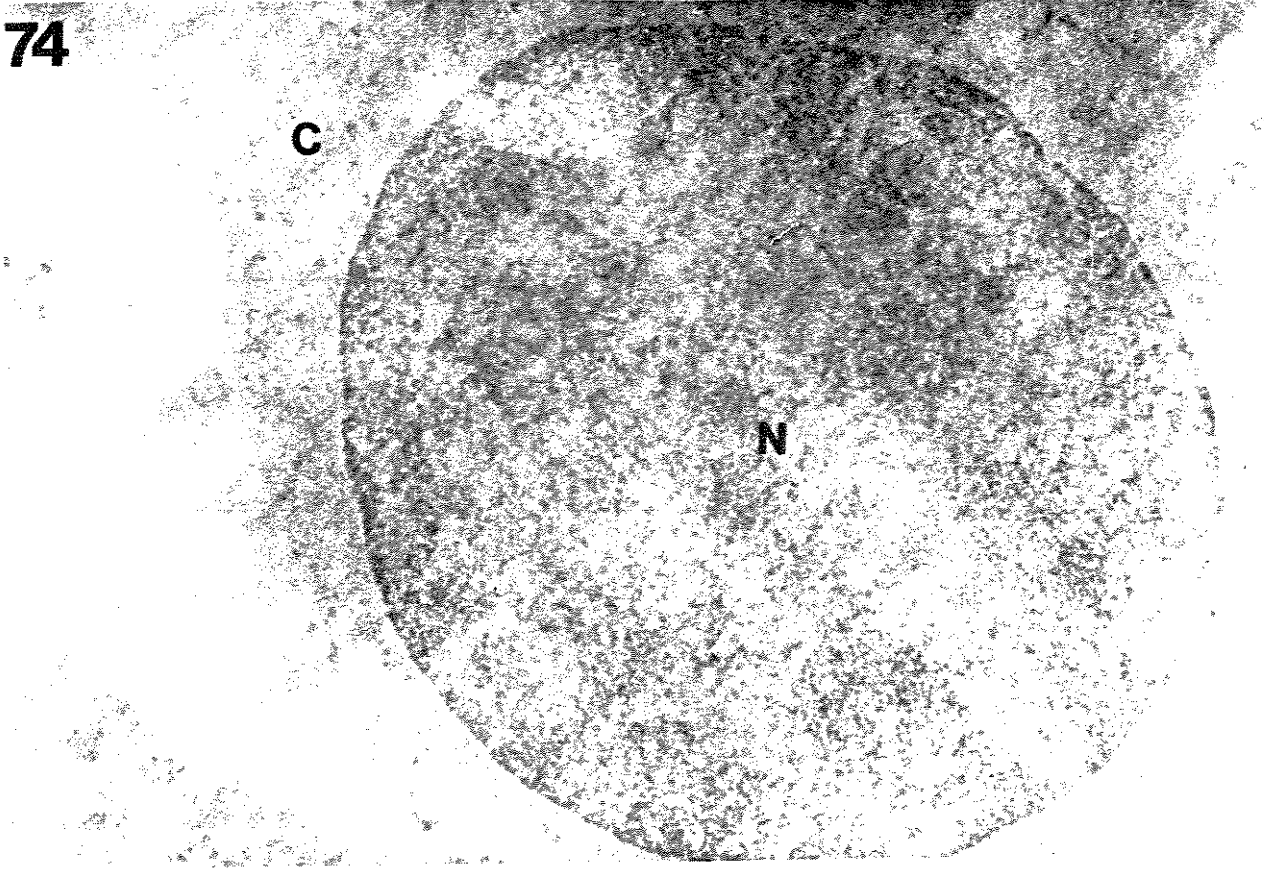
FIGURA 74. Baixa reatividade ao ácido fosfotúngstico (PTA) em espermátides imaturas. Núcleo (N) e citoplasma (C). Aumento 24.000x.



73



74

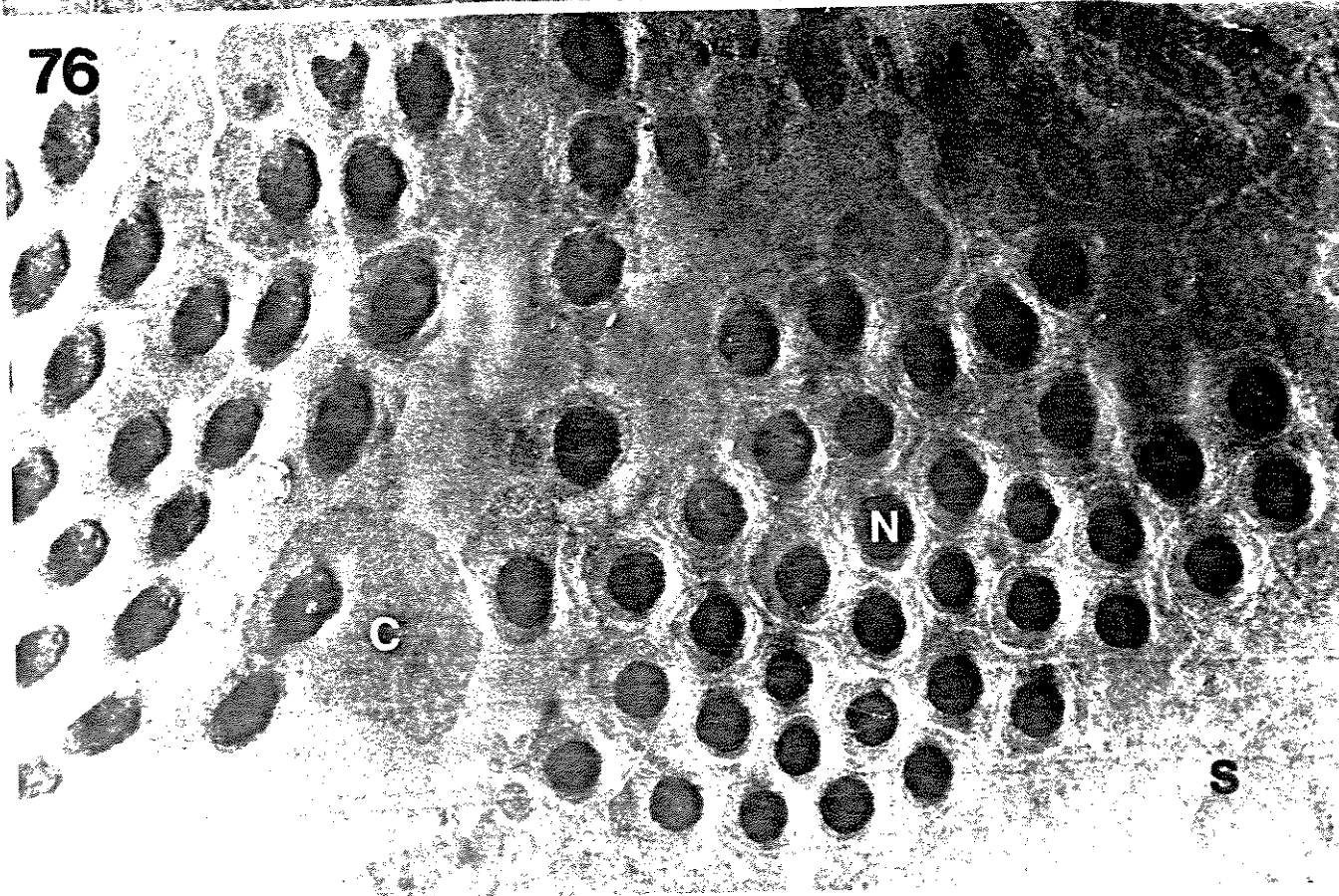
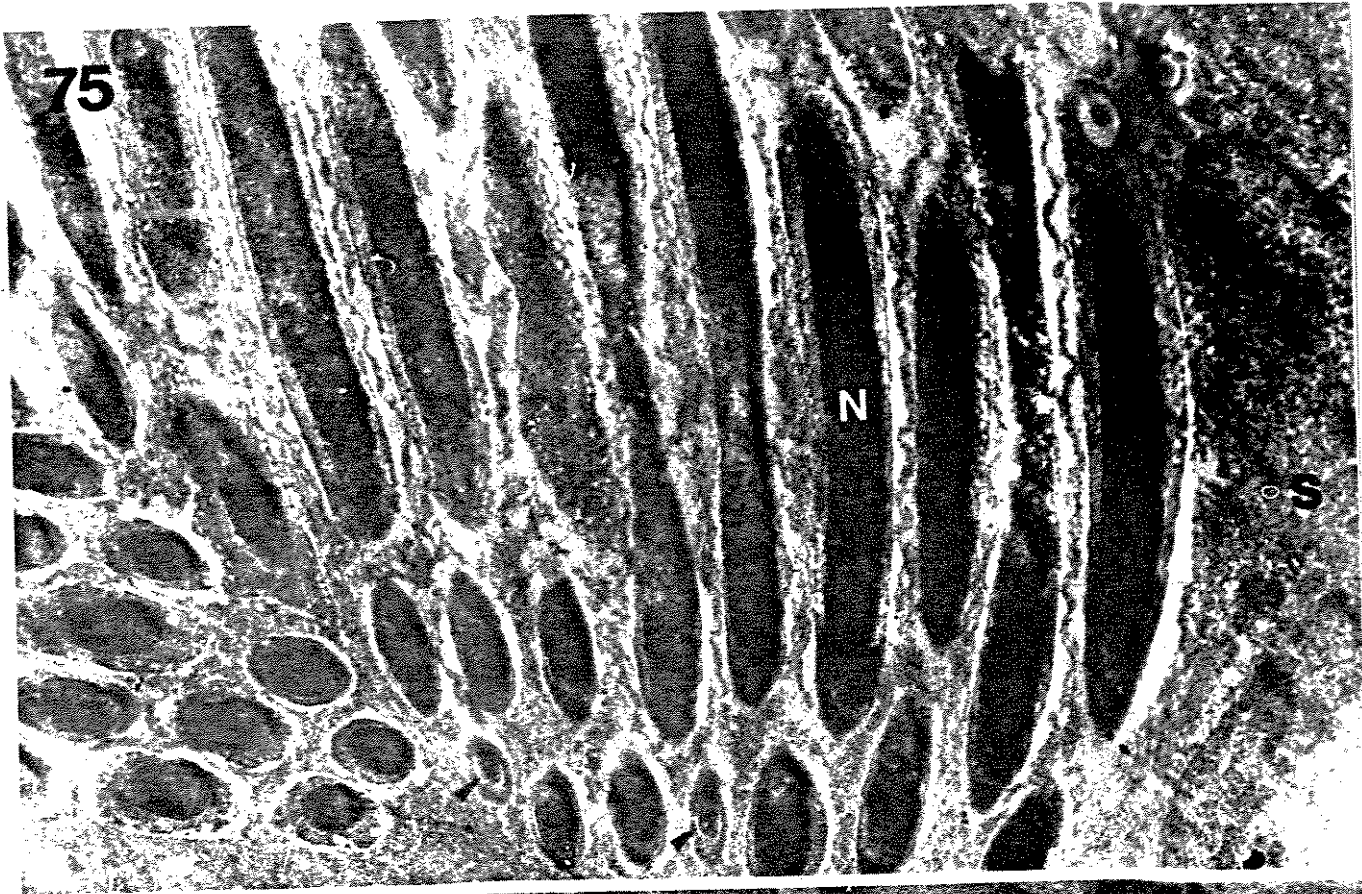


## FRANCHA XXVII

Cortes ultra-finos em testículos de *Hyla ranki* fixados pelo glutaraldeído 3% e desidratados pelo E-PTA.

FIGURA 75. Alta reatividade ao ácido fosfotúngstico em corte longitudinal de núcleos (N) de espermatídes em adiantado grau de citodiferenciação e alongamento. As setas indicam a região do acrossomo. O núcleo da célula de Sertoli está indicado pela letra S. Aumento 9.700x.

FIGURA 76. Corte transversal de espermatídes em adiantado grau de alongamento celular. Alta reatividade ao PTA em núcleos (N). Citoplasma (C) e célula de Sertoli (S). Aumento 9.700x.

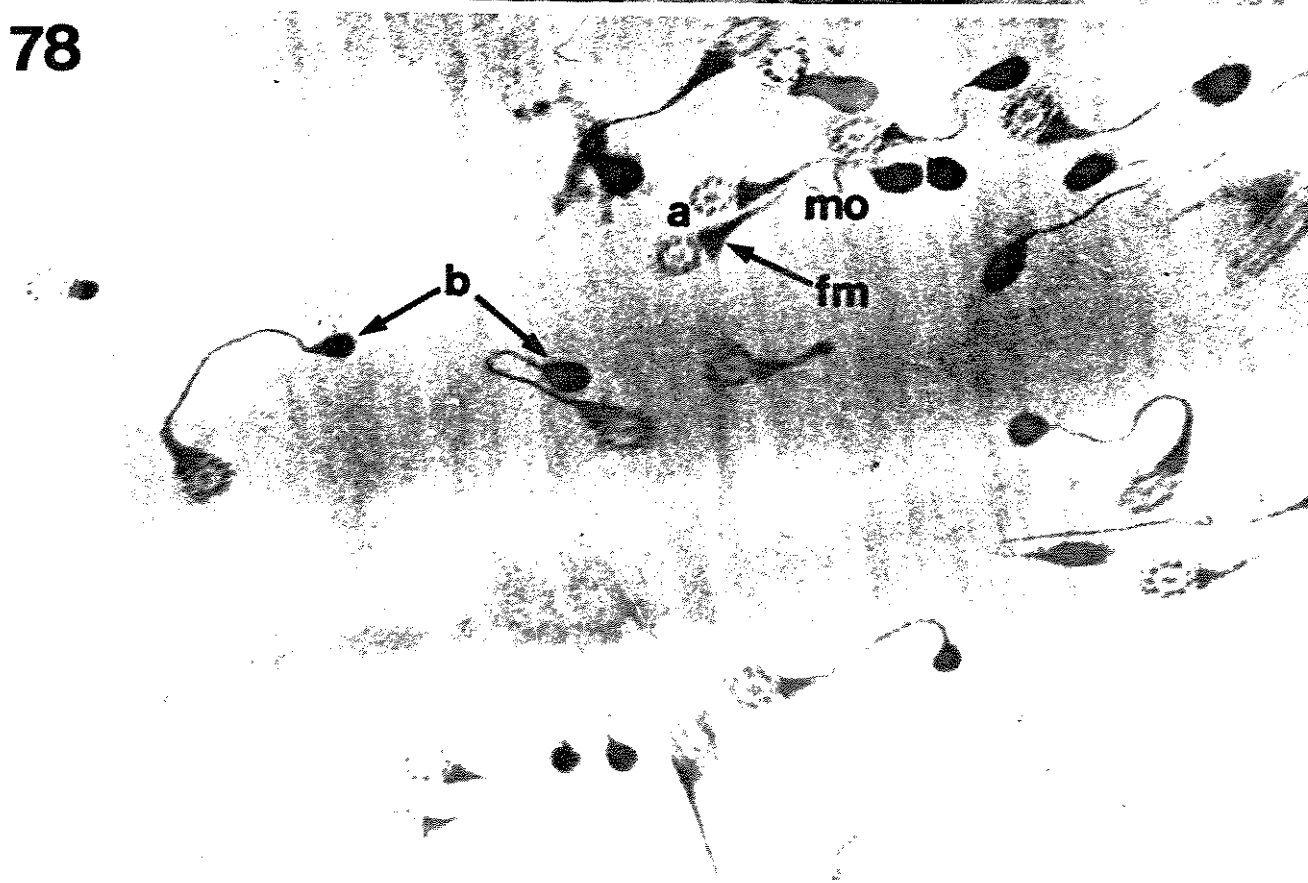
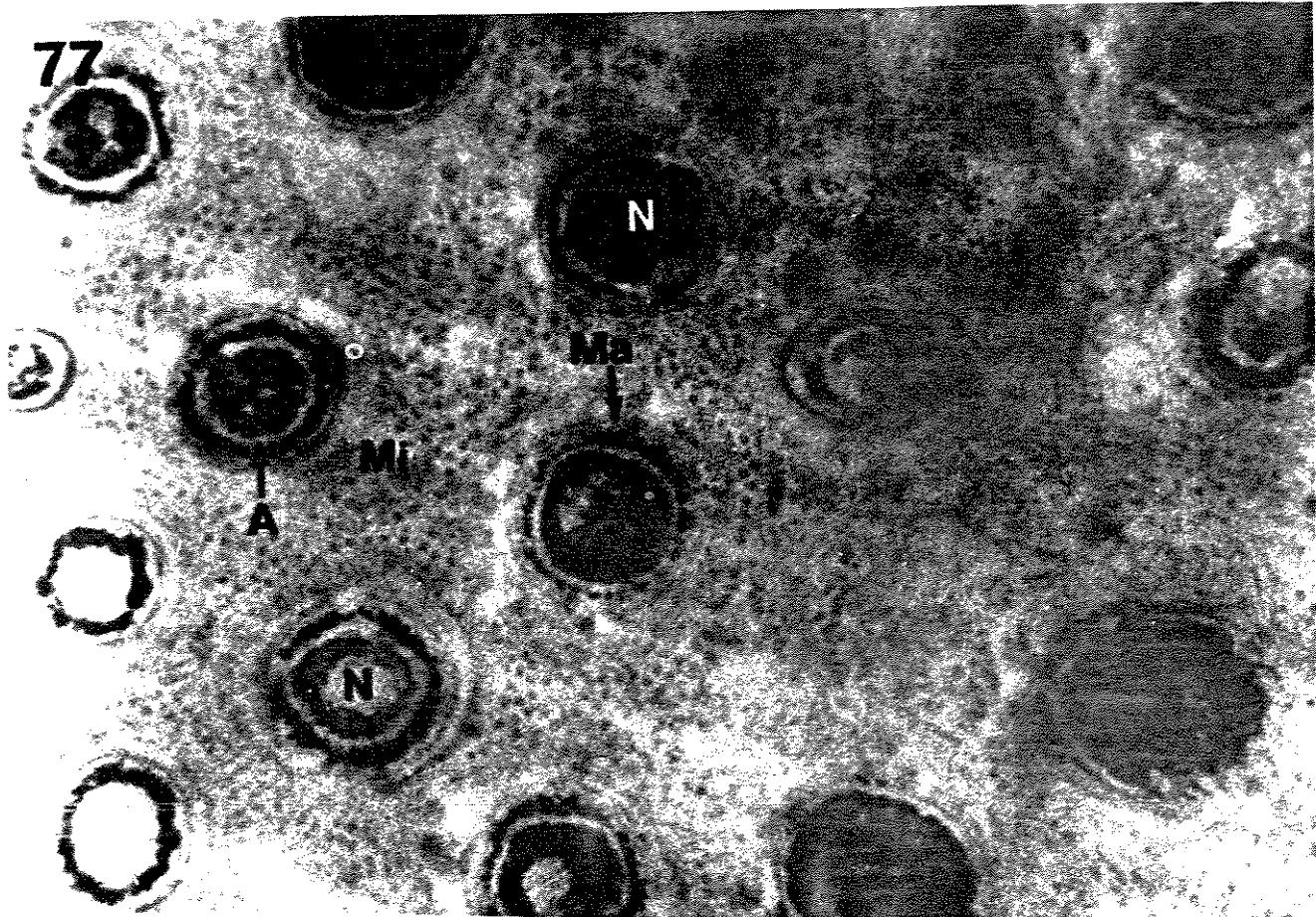


## PRANCHA XXVIII

Cortes ultra-finos em testículos de *Hyla ranki* fixados pelo glutaraldeído 3% e desidratados pelo E-PTA.

FIGURA 77. Corte transversal em espermatozóides maduros. Devido ao alto grau de compactação nuclear, os núcleos (N) apresentam padrões diferentes de penetração do PTA, inclusive na região das membranas acrossomais (Ma). Acrossomo (A) e microtúbulos citoplasmáticos (Mi). Aumento 48.500x.

FIGURA 78. Cortes transversais nas várias porções da cauda, mostrando positividade ao PTA na região do filamento marginal (fm), bastão axial (b) e no interior das membranas ondulantes (mo). Axonema (a). Aumento 30.600x.



## FRANCHA XXIX

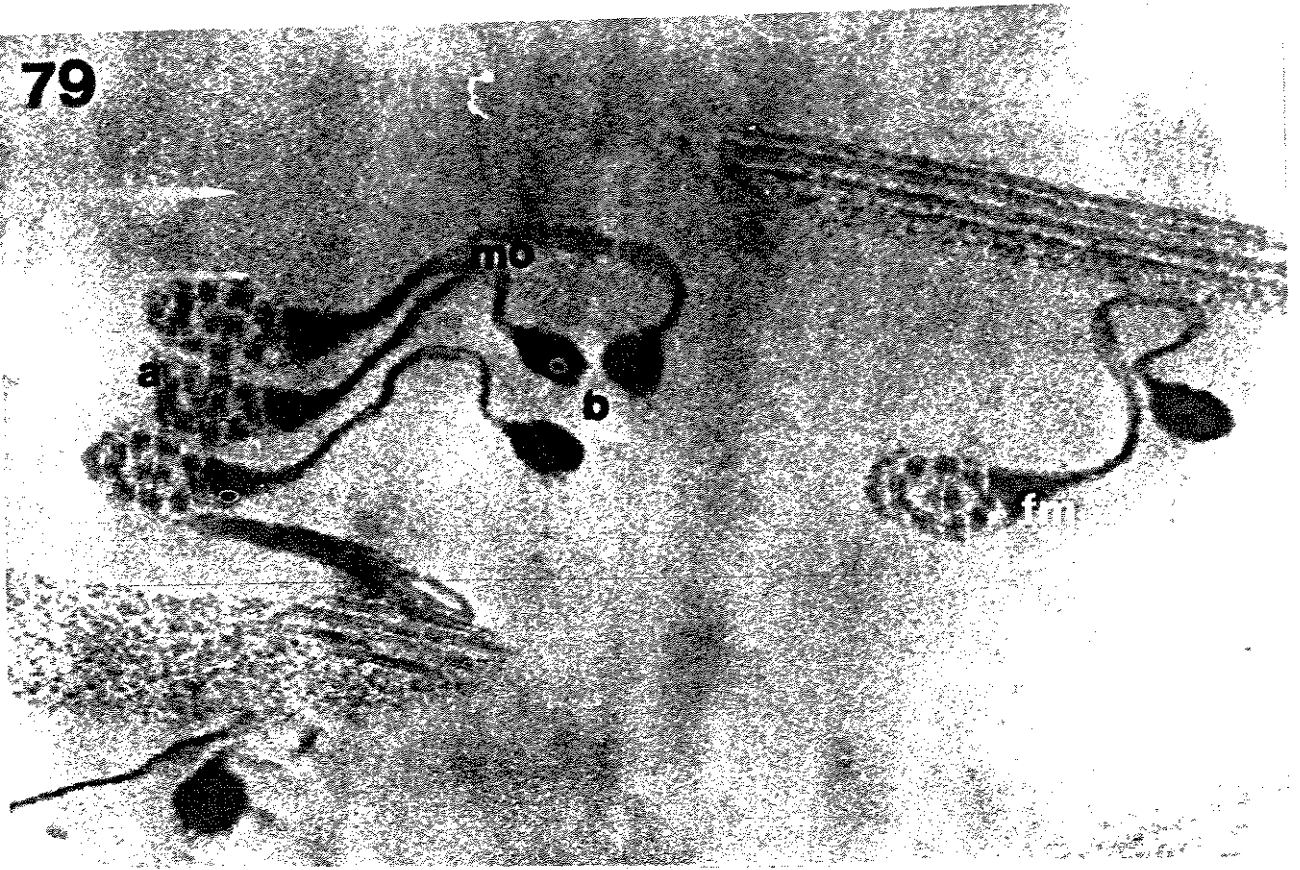
Cortes ultra-finos em testículos de *Hyla ranki* fixados pelo glutaraldeído 3% e desidratados pelo E-PTA.

FIGURA 79. Corte transversal na porção mediana das caudas. A positividade ao PTA ocorre nos bastões axiais (b), filamento marginal (fm) e no interior das membranas ondulantes (mo). O axonema (a) apresenta-se pouco contrastado. Aumento 61.800x.

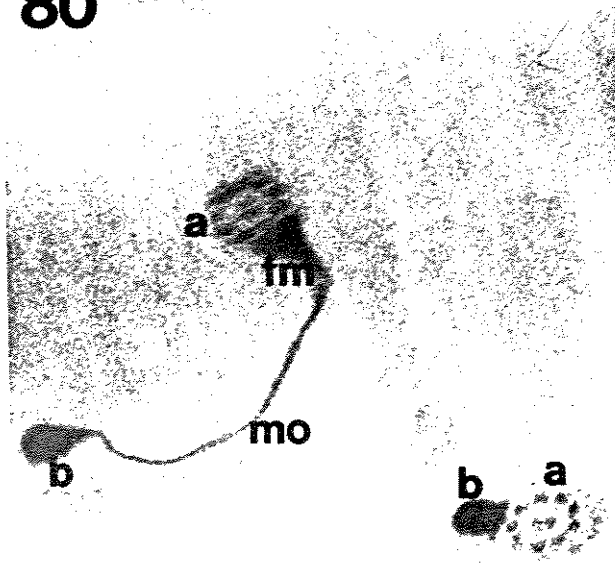
FIGURA 80. Corte transversal em porção mediana e final de caudas. Reatividade ao PTA nos filamentos marginais (fm), bastão axial (b) e membrana ondulante (mo). Baixo contraste nos axonemas (a). Aumento 48.400x.

FIGURA 81. Corte transversal na porção mediana da cauda. Na altura do 8º par de microtúbulos do axonema pode-se notar uma pequena ligação destes ao filamento marginal (fm) indicado pela seta. Bastão axial (b) e membrana ondulante (mo) contrastados pelo PTA. Aumento 107.400x.

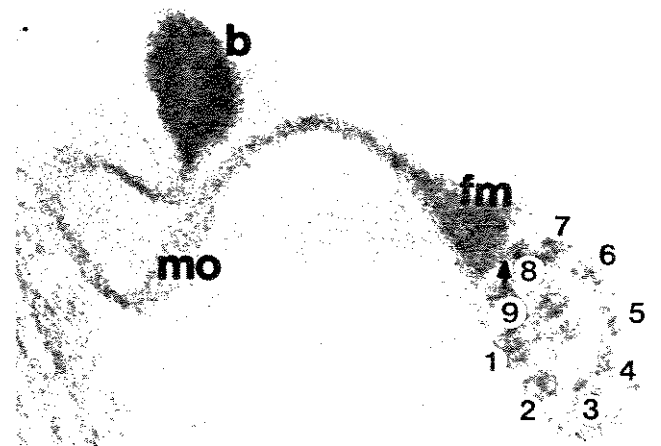
79



80



81



**DISCUSSÃO**



## 1. Organização tecidual dos testículos

A análise dos nossos resultados referentes aos cortes seriados em parafina, nos permite dizer que a disposição das células germinativas nos testículos de *Hyla ranki* se dá de maneira túbulo-ocular, isto é, o tecido seminífero se apresenta tubular, no sentido de ser continuamente interligado. Entretanto estes túbulos apresentam-se expandidos de maneira esférica assemelhando-se a um "colar de contas", sendo no interior destas esferas bem desenvolvidas que ocorre toda a espermatogênese.

DUELLMAN & TRUEB (1986) já haviam descrito esta morfologia túbulo-ocular para os testículos dos anfíbios, entretanto enfocaram a morfologia dos testículos de urodélos. Além de não existir referência mais profunda a respeito da histologia do órgão para anuros, existe apenas uma análise estereoscópica deste órgão.

ALMEIDA & CARDOSO (1985) referem-se em seu trabalho, que a espermiogênese do anuro *Hyla fuscovaria* ocorre no interior de túbulos seminíferos, sem mencionar a existência de protuberâncias esféricas dando o aspecto ocular ao túbulo. Esta interpretação poderia estar baseada no fato que estes autores

dilaceravam os testículos para remover os espermatozóides de seu interior e não promoveram nenhum estudo histológico do órgão.

As granulações esféricas observadas na análise macroscópica dos testículos correspondem aos lóculos seminíferos muito desenvolvidos no macho adulto, podendo estas esferas inclusive ser observadas a olho nú pela transparência da cápsula testicular.

## **2. Aspectos estruturais e ultra-estruturais das células germinativas**

Em *Hyla ranki* a produção dos espermatozóides nos lóculos seminíferos é constante e de maneira contínua, isto é, após o amadurecimento sexual do animal as células da linhagem germinativa sofrem contínuas divisões e diferenciações ao longo de toda a época reprodutiva da espécie.

Outros anfíbios, como salamandras e alguns anuros podem apresentar a espermatogênese e espermiogênese sincrônica, isto é, as células germinativas começam a se dividir e a se diferenciar resultando num amadurecimento quase uniforme dos espermatozóides no interior dos testículos. Este acontecimento culminaria com época de maturidade

reprodutiva da espécie, a qual estaria em ambiente com recursos favoráveis para a reprodução (WORTAM et alii, 1977 e GRIFFITHS, 1962).

Estudos à microscopia de luz, em cortes em parafina de testículos de anfíbios são relativamente raros. No levantamento bibliográfico aqui apresentado não encontramos referências a esta metodologia, talvez pela dificuldade de identificação das células germinativas imaturas devido à alta retração tecidual no processamento do material ou no decorrer do método.

Neste trabalho a utilização da referida metodologia se deu somente no processamento das técnicas citoquímicas (azul de toluidina a pH 4,0 e PAS) e para a descrição histológica do órgão através da coloração por hematoxilina-eosina, pois é muito difícil a identificação das células germinativas neste material.

A identificação das células germinativas - espermatogônias, espermatócitos, espermatídes e espermatozóides foi facilmente realizada à microscopia de luz utilizando-se da metodologia de cortes semifinos dos testículos incluídos em Epon-B12. Muitos autores vêm utilizando esta metodologia para descrever a espermiogênese de animais como *Rana pipiens* na qual ZIRKIN (1971) estudou o comportamento nuclear durante a espermiogênese e *Pachymedusa dachnicolor* na

qual RASTOGI et alii (1988) fizeram estudos morfológicos das células germinativas.

A classificação das células germinativas de *Hyla ranki* foi feita de acordo com os resultados reportados por RASTOGI et alii (1988) devido à grande semelhança das células e pela proximidade filogenética das espécies.

### 2.1. Espermatogônias

A análise dos cortes semifinos e ultra-finos revelaram que as espermatogônias primárias e secundárias são células bastante volumosas e com os seus núcleos de forma irregular. Dadas as mitoses sucessivas, estas células se acumulam sempre associadas às células de Sertoli formando amplos espermatocistos. É a partir destes espermatocistos que a divisão meiótica ocorre sincronicamente para originar as espermatídes.

As espermatogônias primárias são denominadas por outros autores como "espermatogônias residuais" (WITSCHI, 1924 apud REED & STANLEY, 1972) por serem encontradas em testículos de machos adultos com grande frequência de espermatozóides maduros no seu interior. A denominação "espermoblastos" (RUSH, 1941 apud REED & STANLEY, 1972) também foi utilizada devido ao seu alto grau de indiferenciação. Entretanto REED & STANLEY (1972) adotaram uma terminologia que abrange

ambas as definições, denominando tais células de "células germinativas primordiais".

O termo "espermatogônia primária" tem sido utilizado atualmente com mais freqüência pelos autores, por isso adotou-se o termo neste trabalho.

As espermatogônias são células bastante volumosas, tendo até muitas vezes, o dobro ou o triplo das demais células em diferenciação. Isto pode ser visto tanto na microscopia de luz como ultra-estruturalmente. Seu núcleo é bastante irregular e se cora fracamente pelo azul de toluidina, quando em cortes semifinos. As massas de cromatina condensada vistas ao microscópio eletrônico também são vistas pontualmente à microscopia de luz.

O grande tamanho e morfologia irregular multilobulada do núcleo acarreta uma diminuição da área citoplasmática, a qual apresenta organelas como mitocôndrias, retículo endoplasmático e ribossomos por entre os lóbulos do núcleo.

Em associação às espermatogônias primárias e secundárias (células do espermatocisto) têm-se células de Sertoli com características de células produtoras de hormônios.

Freqüentemente junções entre células da linhagem germinativa e células de Sertoli são encontradas na análise dos cortes ultra-finos de *Hyla ranki*. Este tipo de junção não foi detectado na

análise feita por RASTOGI et alii (1988), os quais detectaram apenas junções entre células de Sertoli e propuzeram inclusive a existência de uma barreira cística através da aposição destas células.

RASTOGI et alii (1988) encontraram além de espermatogônias primárias e secundárias típicas, células semelhantes em estado adiantado de degeneração, as quais foram chamadas pelos autores de "espermatogônias primárias em degeneração". Em nossas análises encontramos tais células, com amplas vesículas e membranas rompidas, entretanto não podemos afirmar se a presença de tais células é fato natural ou se é artefato de fixação ou produzida até mesmo por "stress" a que o animal tenha sido submetido durante o transporte da área de coleta.

## 2.2. Espermatócitos

Os espermatócitos são muito pouco abordados na literatura analisada, assim como as espermatogônias. Poucos autores quando analisam a espermatogênese, se referem às células haplóides, as espermatídes, e reportam as diferenciações núcleo-citoplasmáticas durante a espermiogênese.

Em cortes semifinos os espermatócitos puderam ser observados em amplos espermatocistos com grau de compactação nuclear crescente até a formação dos cromossomos metafásicos,

os quais foram os mais facilmente identificados.

Da literatura citada e consultada somente três trabalhos tratam com detalhes sobre a estrutura dos espermatócitos, tanto em análise à microscopia de luz (RASTOGI et alii, 1988), como em seus aspectos ultra-estruturais (RASTOGI et alii, 1988; REED & STANLEY, 1972 e CAVICCHIA & MOVIGLIA, 1982).

Os nossos resultados corroboram os acima citados, pois as células apresentam características bastante similares mesmo em se tratando de espécies diferentes.

No estágio inicial de espermatócito, isto é, antes do início das divisões meióticas é difícil dizer se as células são espermatócitos ou espermatogônias secundárias; aqui nós utilizamos a semelhança do material nuclear como parâmetro de identificação. No entanto, RASTOGI et alii (1988) classificaram tais células pelo tamanho até 1,8 vezes maior em relação aos núcleos das espermatogônias secundárias.

CAVICCHIA & MOVIGLIA (1982) utilizaram como parâmetro de identificação dos espermatócitos a grande quantidade de complexos de poro no envoltório nuclear em estudos por réplicas de criofratura e a presença de grandes complexos sinaptonêmicos em cortes ultra-finos. Também detectaram, que à medida que a cromatina se compacta, o

número de complexos de poro diminuem na superfície do envoltório nuclear dos espermatócitos.

A presença de grandes complexos sinaptonêmicos garante a identificação dos espermatócitos no início da divisão meiótica, inclusive tal estrutura foi também parâmetro de identificação para REED & STANLEY (1972).

Em *Hyla ranki*, muitas organelas membranosas podem se acumular nas proximidades do núcleo, como retículo endoplasmático, complexo de Golgi e vesículas golgianas, e no envoltório nuclear grande quantidade de poros puderam ser identificados. Nesta fase muitas proteínas são sintetizadas, principalmente as nucleares, as quais são elaboradas pela maquinaria citoplasmática e possivelmente passam para o núcleo via complexos de poro.

Também, os espermatócitos secundários podem ser facilmente distintos dos espermatócitos primários pelo tamanho sempre menor destas células, que têm seus diâmetros aproximadamente reduzidos pela metade. Outro fator de identificação destes espermatócitos secundários é a inexistência de complexos sinaptonêmicos nos núcleos. Mesmo na análise dos cortes semifinos estas células são aparentemente menores quando as observamos no interior dos espermatocistos, os quais apresentam grande sincronia na divisão celular.



Na análise histológica e ultra-estrutural dos espermatócitos de *P. dacnicolor*, RASTOGI et alii (1988) detectaram a presença de pontes citoplasmáticas entre estas células as quais fortalecem a interpretação da grande sincronia celular no interior dos espermatocistos. Entretanto em *Hyla ranki*, pontes citoplasmáticas não puderam ser detectadas nos cortes analisados, embora nos cortes semi-finos, algumas sugestões de pontes citoplasmáticas entre espermatídes tenham sido observadas.

A presença de volumosas vesículas associadas ao envoltório nuclear pode sugerir uma grande quantidade de trocas núcleo-citoplasmáticas nesta fase, ou ainda a eliminação de membranas internas que poderiam ter se fusionado ao envoltório nuclear ao invés de serem eliminadas dos espermatócitos, além de uma maior labilidade das membranas do envoltório nesta fase que precede a divisão meiótica.

### **2.3. Espermatídes**

As espermatídes são células haplóides originadas da segunda divisão meiótica dos espermatócitos. Estas células passarão por um processo de diferenciação núcleo-citoplasmática, no qual as células de Sertoli têm um papel fundamental na reabsorção e remodelação espermática para originar o espermatozóide. A este processo denomina-se

espermiogênese, processo este pelo qual as espermatídes esféricas do espermatocisto se alongarão e formarão feixes organizados de espermatozóides com as caudas voltadas para o lumen do lóculo seminífero e as cabeças em íntimo contacto com expansões citoplasmáticas das células de Sertoli.

O processo da espermiogênese é muito importante pois é nesta fase que as principais organelas específicas dos espermatozóides são sintetizadas e organizadas, como por exemplo o acrossomo, a bainha de mitocôndrias da peça intermediária e a cauda com seus anexos protéicos.

### 2.3.1. Formação do acrossomo

No processo citoplasmático que envolve a formação do acrossomo, cisternas do complexo de Golgi liberam muitas vesículas pequenas que com suas fusões originarão uma ampla vesícula acrossômica. Esta se encontra no polo oposto da região de origem da cauda.

No processo citoplasmático de formação do acrossomo de espermatozóides dos anfíbios *Xenopus laevis* (REED & STANLEY, 1972) e *Pachymedusa dactinolor* (RASTOGI et alii, 1988) foram reportados alguns resultados semelhantes aos da formação do acrossomo em *H. ranki*; entretanto, RASTOGI et alii (1988) detectaram a presença de um material fibrilar

eletrodenso no interior da ampla vesícula acrossômica pela metodologia convencional de contrastação pelo acetato de uranila e citrato de chumbo. Este resultado, difere dos achados de REED & STANLEY (1972) e dos aqui apresentados onde, com a mesma metodologia, não se detectou material eletrodenso no interior das vesículas, parecendo que estas se encontravam vazias. Estes resultados podem ser interpretados como remoção de material durante o processo de fixação, desidratação ou baixa eletrodensidade natural dos componentes macromoleculares das vesículas que não se contrastam nem pela uranila, nem pelo chumbo. Entretanto, mesmo com a diminuição em volume do acrossomo de espermatozóides, o conteúdo acrossômico permaneceu eletrolúcido, sugerindo ser característica esta baixa eletrodensidade dos acrossomos de alguns anuros.

A depressão do envoltório nuclear e a eletrodensidade alta da membrana acrossomal que se colaba ao envoltório nuclear deprimido foi também detectado por REED & STANLEY (1972) e RASTOGI *et alii* (1988). Entretanto estes autores não reportam a existência de membranas acrossomais em espermátides imaturas, encontrando-as nas espermátides com estágio adiantado de alongamento nuclear.

A diminuição da vesícula acrossomal em tamanho e volume é muito grande, a ponto destas ocuparem a região mais apical da cabeça dos

espermatozóides, região esta que foi denominada por PICAL (1972b) de coifa acrossomal, definindo tal região como a porção mais apical do acrossomo onde estariam, em maior concentração, as enzimas acrossomais. Partindo da região da coifa acrossomal o autor descreveu uma grande quantidade de membranas acrossomais envolvendo parte do núcleo.

SANDOZ (1970) estudando o anfíbio *Discoglossus pictus* com técnicas citoquímicas para proteínas acrossomais reportou que já na fase de espermatócito as cisternas golgianas são osmiofílicas e apresentam indícios de que serão responsáveis pela formação do acrossomo pois existe positividade à reação citoquímica para o proteinato de prata.

Também este autor descreveu as etapas da formação do acrossomo, as quais são muito semelhantes às descritas e discutidas aqui. No entanto na espécie de anuro estudada por ele, assim como em aves (PHILLIPS & ASA, 1989) e tartarugas (SPRANDO & RUSSELL, 1988b), há presença de uma haste protéica digitiforme que invade o núcleo segundo o eixo maior do espermatozóide. Não existindo membranas separando o acrossomo da haste, os autores acima discutem a origem desta haste de proteínas filamentosas como sendo do próprio acrossomo.

FURIERI (1975) estudando o anfíbio anuro *Bombina variegata* demonstrou a peculiaridade dos

espermatozóides desta espécie, os quais apresentam um aspecto piriforme e o seu acrossomo é cilíndrico, com os constituintes internos fibrilares muito organizados e apresentando também uma haste que penetra para o interior do núcleo.

A diminuição do volume acrossomal e o posicionamento do mesmo na porção mais apical da cabeça, formando o capuz ou coifa acrossomal nos anfíbios *P. dachnicolor* (RASTOGI et alii, 1988), *X. laevis* (REED & STANLEY, 1972), *D. pictus* (SANDOZ, 1970) e *Pleurodelis waltlii* (PICHERAL, 1972b) pode ser interpretado como decorrente de uma grande perda de água e membranas pela vesícula acrossômica. As membranas poderiam ficar associadas ao envoltório nuclear aumentando ainda mais a quantidade de membranas acrossomais nos espermatozóides maduros.

### 2.3.2. Alongamento e compactação do material nuclear e processos citoplasmáticos associados

O alongamento celular das espermatídes e a perda de material citoplasmático destas células no processo de espermiogênese estão intimamente ligados à célula de Sertoli, tanto que RASTOGI et alii (1988) mencionam estas células como sustentaculares, nutridoras e mantenedoras do processo de espermiogênese e dos próprios espermatozóides.

As células de Sertoli que entremeiam as espermatídes por prolongamentos citoplasmáticos, ainda nos espermatocistos apresentam uma grande quantidade de microtúbulos, que auxiliariam no processo de alongamento celular. À medida que as espermatídes se alongam os espermatocistos deixam de existir para formarem feixes altamente organizados de espermatídes em alongamento.

Os microtúbulos se polimerizam de acordo com o eixo de alongamento das espermatídes (RASTOGI *et alii*, 1988 e REED & STANLEY, 1972). Tais estruturas são muito mais abundantes nas células de Sertoli que nas espermatídes.

SPRANDO & RUSSELL (1988a) detectaram que as células de Sertoli, em alguns casos estudados, recebem grande influência de hormônios gonadotróficos humanos. Quando tratadas experimentalmente por estes hormônios, estas células são estimuladas a se dividirem e conseqüentemente aceleram o processo de alongamento e maturação espermática, além de promover um aumento da liberação dos espermatozóides maduros para o ducto de Wolffian. Os animais que não são submetidos a injeções dos hormônios não apresentam alterada a etapa de alongamento e liberação dos espermatozóides para o ducto de Wolffian, nem aumentada a quantidade de células de Sertoli por lóculo testicular.

A grande quantidade de vesículas e membranas liberadas das espermatídes para o lumen do lóculo seminífero, que serão fusionadas e reabsorvidas pelas células de Sertoli podem ser liberados das várias porções das espermatídes em alongamento, isto é, cabeça, peça intermediária e cauda. Inclusive, quando a massa membranosa é eliminada a partir do filamento caudal RASTOGI et alii (1988) denomina estas massas de membranas em degeneração, entretanto estas também serão reabsorvidas pelas células de Sertoli. Assim como no trabalho de RASTOGI et alii (1988), a degeneração de membranas foi também detectada nas várias porções das espermatídes de *Hyla ranki*. No entanto a peça intermediária e a bainha de mitocôndrias presente nesta peça permanece íntegra. Os autores acima descrevem uma degeneração parcial (semilunar) ou total da bainha de mitocôndrias e peça intermediária.

SPRANDO & RUSSELL (1988a) demonstraram matematicamente que a redução do material citoplasmático sofridas pelos espermatozóides em *Rana catesbeiana* é de 93,3%, quando comparado com o volume citoplasmático das espermatídes. A redução da área nuclear é de 76% no volume de espermatozóides quando comparados com o volume nuclear espermatídes jovens.

A grande quantidade de microtúbulos polimerizados nas células de Sertoli durante a espermiogênese foi uma das funções atribuídas por

BERNARD & HODGSON (1989) às lamelas aneladas encontradas nestas células em morcegos. Em *Hyla ranki* não detectamos lamelas aneladas em células de Sertoli, contudo lamelas desenvolvidas com ribossomos aderidos à face externa destas foram encontradas em espermatídes com adiantado grau de compactação e alongamento nuclear.

Sabe-se que esta organela é comumente encontrada em células cujo desenvolvimento e diferenciação se processam em curto espaço de tempo e a função pode estar associada a produção de tubulina (BERNARD & HODGSON, 1989). Entretanto muitos autores discutem ainda a função desta organela, e até sugerem que esta seja apenas um acúmulo organizado de restos do envoltório nuclear, sem uma função determinada (CAVICCHIA & MOVIGLIA, 1982). No entanto não excluimos a idéia de BERNARD & HODGSON (1989), porque nas espermatídes, mesmo alongadas, de *H. ranki* encontraram microtúbulos polimerizados imediatamente aposto ao núcleo e no sentido do alongamento celular.

O processo de compactação do material nuclear se deu de forma contínua e homogênea, isto é, fibras muito finas e contorcidas apareceram se agregando uniformemente em cada etapa do alongamento celular, o que está de acordo com os dados de ZIRKIN (1971) e DALTON et alii (1989).



A substituição de proteínas básicas histônicas por protaminas, poliargininas ou polilisinas será discutida no subitem de métodos citoquímicos para proteínas básicas.

### 2.3.3. Desenvolvimento do filamento caudal

Pelo alto grau de diferenciação dos espermatozóides, estas células apresentam morfologia bastante variada, quanto às partes celulares (cabeça, peça intermediária e cauda).

Dentre as partes do espermatozóide citadas, aquela que apresenta uma maior diferenciação e variabilidade é o filamento caudal, tendo em vista a grande quantidade de anexos protéicos e adereços membranosos que esta região pode apresentar nos diferentes anfíbios já estudados.

A cauda dos espermatozóides dos vertebrados apresenta um axonema típico que é caracterizado por 9 pares de microtúbulos periféricos e 2 centrais únicos (9+2). Muitos animais apresentam este axonema sem nenhum anexo caudal como por exemplo os espermatozóides do anfíbio *Xenopus laevis* (BERNARDINI et alii, 1986). Já outros possuem suas caudas ricamente circundadas por acessórios protéicos e ou membranosos. É o caso dos mamíferos com as fibras densas (FAWCETT, 1975) ou então dos peixes teleósteos que apresentam expansões laterais de membranas, como verdadeiras

"abas" (THIAW et alii, 1986).

Nos anfíbios a ultra-estrutura do filamento caudal dos espermatozóides foi vastamente estudada, principalmente em salamandras (PICHERAL, 1972 a,c; NICANDER, 1970; WERNER, 1970 e BARKER & BAKER, 1970). Nestes animais a ultra-estrutura do filamento caudal é bastante complexa e consiste de estruturas protéicas acessórias ao axonema, as quais podem assumir a forma de bastão axial muito desenvolvido que, em corte transversal, tem formas circulares, semilunares ou até mesmo de âncora (BARKER & BAKER, 1970).

Os anexos caudais de salamandras são tão constantes que PICHERAL (1972a) denominou-os de filamento de suporte ao bastão axial que é bastante rígido e compacto, podendo ser distinto da primeira estrutura. O bastão axial é a massa protéica eletrodensa que segue toda a extensão da cauda. O filamento marginal é aquele que se encontra aposto ao axonema e opostamente posicionado ao bastão axial.

Em anfíbios anuros estes componentes podem variar bastante quanto à sua existência e morfologia (NICANDER, 1970; CAVICCHIA & MOVIGLIA, 1982; BERNARDINI et alii, 1986; SANDOZ, 1973; DOLDER & CARDOSO, 1988 ; DALTON et alii, 1989).

A diferenciação da cauda dos espermatozóides dos anfíbios anuros é bastante complexa e pouco conhecida, embora muitos autores já tenham-na

estudado.

Os anexos caudais destes animais são constituídos basicamente de bastão axial, o qual pode atingir até o quádruplo do diâmetro do axonema (RASTOGI et alii, 1988), e apresenta membrana ondulante e filamento marginal.

Nossos achados são muito comuns aos reportados pelos outros autores, entretanto algumas variações quanto ao tamanho e posicionamento das estruturas anexas foram encontradas.

A origem do axonema foi observada a partir do centríolo distal o qual se encontra longitudinalmente disposto de acordo com o eixo de alongamento e polimerização dos microtúbulos do axonema e conseqüentemente do alongamento celular. Na transição do centríolo para o axonema pôde ser observado um discreto acúmulo de substância eletrodensa. PICHERAL (1972c) detectou uma massa densa desenvolvida e conspicua em torno do centríolo e na transição para o axonema a qual denominou de material pericentriolar. Ele propõe que seja a partir desta massa que se origina o bastão axial.

WERNER (1970) sugere que este acúmulo de proteínas em torno do centríolo tenha homologia com o adjunto do centríolo dos insetos e fibras densas dos mamíferos. Em nossos achados não foi possível detectar se realmente a discreta massa

protéica eletrodensa, que muitas vezes mascara a visualização dos "triplets" do centríolo ou corpúsculo basal, originaria ou não o bastão axial.

Logo abaixo do centríolo, na porção mais proximal do axonema, o bastão axial já podia ser observado, estando este apostado ao axonema na altura do 8º par de microtúbulos do referido axonema. Este bastão, ao longo de toda a peça intermediária é apostado ao axonema e bastante interligado a ele, não existindo portanto a presença de membrana ondulante nesta região, fenômeno reportado por DALTON et alii (1989) em *Odontophrynus cúltripes* e não detectado em *Pachymedusa dachnicolor* (RASTOGI et alii, 1988). Este autor detectou a presença de membrana ondulante já na peça intermediária, fenômeno este, também reportado por SANDOZ (1973), estudando *Discoglossus pictus*.

Em *Hyla ranki* o diâmetro do bastão axial permaneceu constante desde sua origem mais proximal até a porção mais distal, sendo menor, aproximadamente duas vezes em diâmetro, que o axonema. Entretanto este fato é bastante variável entre as espécies estudadas. Em *P. dachnicolor* o bastão axial afila-se à medida que progride para a região distal e é muito maior que o diâmetro do axonema, podendo chegar até aproximadamente ao quádruplo do tamanho daquele (RASTOGI et alii, 1988). Em *D. pictus* este permanece constante ao longo de toda a extensão da cauda e tem

aproximadamente o dobro do diâmetro do axonema (SANDOZ, 1973) e em *O. cultripes* o bastão é pouco maior e permanece com seu diâmetro uniforme ao longo de toda a extensão caudal (DALTON et alii, 1989).

A membrana ondulante se faz presente em todas as espécies de anuros acima citadas sendo maior ou menor a sua extensão na dependência da distância entre o bastão axial e o axonema, que pode variar dependendo da espécie estudada. No entanto este aumento progressivo e depois regressivo da membrana ondulante não foi estudado pelos autores acima, embora esta característica pudesse ser responsável pela grande variação neste anexo caudal.

Em *Hyla ranki* a membrana ondulante surge após a peça intermediária, quando o axonema e o bastão emergem da célula para formar verdadeiramente a cauda. Estas estruturas se separam e entre elas aparece a membrana ondulante. Com o surgimento da membrana ondulante distingue-se também o filamento marginal que assume a forma triangular em secção transversal e se encontra apostado ao 8º par de microtúbulos do axonema.

A presença da membrana ondulante é universal para os filamentos caudais que apresentam acessórios em forma de bastão, entretanto em *P. dacnicolor* (RASTOGI et alii, 1988) e *D. pictus* (SANDOZ, 1973) ela já existe, na peça intermediária, no

momento da origem do bastão. Em *O. cultripes* (DALTON et alii, 1989) se origina com o afastamento do axonema e bastão axial fora da peça intermediária.

O filamento marginal é também encontrado nos animais acima referidos, entretanto pode variar na morfologia.

Em *O. cultripes* tal filamento parece ser interligado ao bastão axial percorrendo a ligação pela membrana ondulante e não apresenta forma triangular. Este filamento marginal se encontra na altura do 3º par de microtúbulos do axonema (DALTON et alii, 1989). Morfologia bastante semelhante pode ser observada em *D. pictus* (SANDOZ, 1973).

Em *Hyla ranki* o filamento marginal é triangular como em *P. dacnicolor*, no entanto esse diminui consideravelmente de tamanho à medida que caminha para a região distal da cauda (RASTOGI et alii, 1988).

Em *Pleurodelis waltlii*, PICHERAL (1972a) determina a posição do filamento marginal apostado ao 8º par de microtúbulos opostamente localizado à membrana ondulante e bastão axial.

Nas publicações de GATEMBY (1961), NICANDER (1970), SANDOZ (1973) e RASTOGI et alii (1988) as micrografias de axonemas apresentam-se com aumento pequeno não sendo possível determinar com precisão a posição do filamento marginal em relação aos

microtúbulos do axonema. Entretanto, analisando os achados de DALTON et alii (1989) e PICHERAL (1972a) parece não haver localização preferencial para urodelos ou anuros, tendo em vista que *H. ranki* apresenta o filamento marginal no 8º par de microtúbulos, local onde PICHERAL (1972a) caracterizou seu posicionamento em urodelos.

Na espécie aqui estudada, existe uma organização preferencial das caudas dos espermatozóides no interior dos lóculos seminíferos, isto é, um arraço espacial de tal sorte que as membranas ondulantes se empilham ficando os axonemas todos empilhados de um lado e os bastões axiais de outro. Este arranjo morfológico empilhado nos permite dizer que o bastão axial segue paralelamente o axonema em quase toda a sua extensão, fato também reportado por CAVICCHIA & MOVIGLIA (1982) em estudos de réplicas de criofratura nos espermatozóides de *Bufo arenarum* e DOLDER & CARDOSO (1988) em cortes ultra-finos de testículos de *Hyla caldarum*. Em *O. cultripes* (DALTON et alii, 1989) e *P. dacnicolor* (RASTOGI et alii, 1988) os autores não detectaram esta organização morfológica das caudas dos espermatozóides e descrevem uma disposição helicoidal dos bastões em torno do axonema.

Com relação à peça intermediária dos espermatozóides, nenhum dos autores acima referidos, descrevem que ela desapareça ou seja

reabsorvida pelas células de Sertoli durante a espermiogênese, exceto RASTOGI et alii (1988) que reporta uma diminuição ou perda parcial, ou até mesmo total desta porção nos espermatozoides maduros.

A presença de acessórios nas caudas dos espermatozoides de anfíbios torna tal caráter muito importante no estudo de aspectos filogenéticos das espécies, entretanto, somente a análise ultra-estrutural os fazem confiáveis, porque o reduzido diâmetro do bastão axial ou mesmo a disposição helicoidal ou paralela do mesmo em relação ao axonema pode levar a conclusões errôneas ou não precisas a cerca dos filamentos caudais.

FOUQUETTE & DELLAHOUSAYE (1977) propõem o resgate do gênero *Ololygon* para os animais do grupo rubra - catharinae, os quais à microscopia de luz apresentam duplo filamento caudal, entretanto só a análise ultra-estrutural dos espermatozoides do grupo levará a resultados mais conclusivos.

#### **2.4. Espermiogênese anormal**

A análise dos vários cortes ultra-finos ao microscópio eletrônico revelou a existência de estruturas anormais, como fusões de caudas, surgimento de acrossomos e compactação nuclear



anômalos. Os espécimens coletados para este estudo foram de um local onde o índice de radiação natural pelo Urânio e Tório é detectável e promove alterações a nível cromossômico e cromatínico em anuros (FEITOSA, 1989). Entretanto não podemos tirar nenhuma conclusão sobre a origem de tais alterações porque a espécie *Hyla ranki* é endêmica do local, isto é, não ocorre em outras localidades que pudessem servir de estudos controle para análises comparativas, tal como fez FEITOSA, (1989) com *Aplastodiscus perviridis* e *Hyla albopunctata*, coletando espécimens no Morro do Ferro (área radiada) e em outras áreas não radiadas (controle). Entretanto temos afirmações (BÁO, S.N. - comunicação pessoal) que mal formações em espermatozóides não são comumente encontradas em alguns outros anfíbios.

### 3. Reações citoquímicas

#### 3.1. A basofilia nuclear com o azul de toluidina a pH 4,0

A reação citoquímica para ácidos nucléicos revelou uma metacromasia gama discreta no citoplasma, coloração violácea, devido à presença de RNA citoplasmático e uma metacromasia beta (coloração azul intensa) no núcleo das células germinativas imaturas além da coloração esverdeada (metacromasia

alfa), segundo LISON (1960) nos núcleos dos espermatozóides maduros.

Diversa à nomenclatura de Lison (1960); VIDAL (1987) caracteriza como metacromáticos os preparados corados em violeta e azul (com picos de absorção espectral em  $\lambda = 550$  e  $\lambda = 580$  nm, respectivamente) e ortocromáticos aqueles corados em verde ( $\lambda_{\text{max}} = 620$  nm), já que nos dois primeiros casos a alteração da cor é devida ao empilhamento ordenado das moléculas do corante, que são planas e rígidas, possibilitando a ocorrência de metacromasia.

O comportamento dos núcleos das células germinativas de *H. ranki* frente à coloração pelo azul de toluidina a pH 4,0 assemelha-se ao fenômeno descrito ao longo da espermiogênese de rato (LISON, 1960) e ao longo da espermiogênese de gafanhoto e *T. infestans* (MELLO & VIDAL, 1977 e MELLO, 1987) dado um crescente bloqueio dos grupamentos fosfatos do DNA por proteínas básicas.

A coloração verde dos núcleos de espermatozóides maduros revela que diferentes proteínas básicas complexam-se ao DNA nestas células, além de promoverem uma alta compactação cromatínica.

Tal compactação cromatínica e afinidade da proteína pelos grupamentos fosfatos do DNA impediria o acesso do corante azul de toluidina a pH

4,0 a estes grupamentos, já que ambos (o corante e as proteínas) têm alta afinidade pelos grupamentos fosfatos.

A baixa disponibilidade de grupos fosfatos livres e conseqüentemente a reduzida ligação do corante com o DNA acarretará um deslocamento do pico de absorção da curva espectral para comprimentos de ondas mais longos, promovendo a coloração esverdeada aos núcleos. (MELLO & VIDAL, 1977).

Contrariando os achados de BOLS & KASINSKY. (1972) e KASINSKY (1989) os quais determinaram não haver substituição de proteínas durante a espermiogênese para os animais do gênero *Hyla*, encontramos na espécie *Hyla ranki* indícios de substituição de tais proteínas. Deve-se lembrar que também ZIRKIN (1970), estudando *Rana pipiens*, observou igualmente a substituição de proteínas básicas a nível de espermiogênese deste animal.

A fim de corroborar os resultados obtidos por esta metodologia, houve o interesse de encontrar ao nível ultra-estrutural, esferas cromatofílicas (vesículas de proteínas básicas nucleares) pois a presença destas seria um indicativo morfológico da substituição de proteínas nucleares durante a espermiogênese (VAUGHN, 1966); no entanto não foram observadas tais esferas.

O fato de não serem detectáveis tais esferas pode estar relacionado com o acúmulo de proteínas básicas para a formação dos anexos caudais, bastão axial e filamento marginal (PICHERAL, 1972c) entretanto a origem destas proteínas não está bem definida e é bastante discutível.

### 3.2. A Reatividade ao Teste do P.A.S.

O teste do PAS foi aplicado em cortes de 6µm em parafina com a finalidade de detectar os açúcares das glicoproteínas acrossomais, já que tal teste é um método muito eficaz na determinação e caracterização de acrossomos de muitas espécies animais (MELLO & VIDAL, 1980) e também utilizado com sucesso em anfíbios urodélos (PICHERAL, 1972b) demarcando positivamente as amplas vesículas acrossômicas nas espermatídes e espermatozoides.

O teste do PAS é seletivo para polissacarídeos neutros e glicoproteínas, podendo reagir positivamente com o glicogênio e acrossomo (MELLO & VIDAL, 1980).

Tem sido demonstrado que proteoglicanas (constituídas de ácido urônico e acetil-hexosaminas sulfatadas ou não) não são PAS positivas (HOOGHWINKEL & SMITS, 1957). Em cortes de tecidos

fixados, o ácido periódico provavelmente libera radicais aldeídicos somente a partir dos resíduos glicosil, galactosil, manosil e fucosil (LEBLOND et alii, 1957), que são componentes do glicogênio e das glicoproteínas.

As proteoglicanas são PAS negativas porque o tratamento rotineiro com o ácido periódico não promove a oxidação em ácidos glicurônico e idurônico (SCOTT & HARBINSON, 1969).

Nos resultados obtidos neste trabalho as vesículas acrossômicas de espermátides e espermatozóides foram fracamente reativas. A fraca reatividade destas estruturas ao PAS nos espermatozóides maduros pode estar relacionada à reduzida posição que o acrossomo ocupa no ápice dos mesmos enquanto a baixa reatividade nas amplas vesículas das espermátides se deve à diluição dos componentes nas mesmas.

As membranas basais foram intensamente evidenciadas pela reação devido à grande concentração de glicoproteínas associadas às moléculas da matriz extracelular nesta região. Tal resposta nos fez abandonar a idéia de possível artefato metodológico.

Moléculas esparsas de glicogênio puderam ser detectadas no interior de células de Sertoli e espermatogônias primárias, entretanto na

análise ultra-estrutural tais moléculas não foram observadas.

Neste trabalho não se promoveu o tratamento pela diastase (que hidrolisa glicogênio) pela natureza granular característica do mesmo, além da confiabilidade do teste para glicogênio.

RASTOGI et alii (1988) nos seus estudos com *P. dachnicolor* reportaram a presença de glicogênio também no lumem dos lóculos seminíferos, associados à nutrição dos espermatozóides no momento da liberação para o ducto de Wolffian, o que também não foi verificado neste trabalho.

Um dos fatores que não pode ser desprezado na consideração de diferenças entre os preparados é a variabilidade existente entre os indivíduos analisados, seu estado nutricional, além das diferenças individuais. Este fato foi detectado por ALMEIDA & CARDOSO (1985) com relação à morfometria dos espermatozóides após encontrarem diferenças significativas entre as células num mesmo indivíduo.

### **3.3. Detecção de proteínas básicas pelo E-PTA**

A especificidade do ácido fosfotúngstico (PTA) na contrastação de espécimens biológicos depende estritamente das condições de

preparo, isto é, se o tratamento ocorre em bloc ou nos cortes, além das condições dos solventes e de pH (COURTENS & LOIR, 1981a).

Soluções aquosas em pH ácido podem ser utilizadas em cortes para detecção de grupamentos hidroxilas presentes nas glicoproteínas (MARTOJA et alii, 1975 apud COURTENS & LOIR, 1981b). Aumentando-se o pH pode-se incrementar a afinidade do PTA por proteínas (SCOTT, 1971), e usando-se o etanol como solvente, pode-se selecionar proteínas básicas (BLOOM & AGHAJANIAN, 1968).

SHERIDAN & BARNETT (1969) propõem que soluções de PTA em álcool a 100% são capazes de corar resíduos de lisina e arginina presentes nas proteínas. Entretanto, quando o E-PTA é utilizado em bloc cora especificamente proteínas ricas em arginina (COURTENS & LOIR, 1975). Nestas condições os núcleos de espermatídes em adiantado grau de citodiferenciação e dos espermatozóides maduros deste trabalho teriam proteínas ricas em arginina, porque uma molécula de PTA se liga a 6 ou 7 resíduos básicos, porém devido ao arranjo espacial na compactação do material cromatínico, isto levaria à não coloração (COURTENS & LOIR, 1981a). Inclusive estes autores em outro trabalho (COURTENS & LOIR, 1981b) reportaram que as proteínas não seriam diretamente responsáveis pela resposta ao E-PTA e sim o arranjo espacial da cromatina. Este

arranjo espacial tem função primordialmente estrutural e as ligações entre as moléculas de proteínas básicas com o DNA aumentam progressivamente, sendo responsáveis pela estabilidade da cromatina no espermatozóide maduro. A remoção de parte destas proteínas por proteases leva ao reestabelecimento da eletrodensidade dos núcleos (LOIR & LANNEAU, 1984).

Espermátides imaturas da mosca *Ceratitis capitata* apresentam uma alta eletrodensidade quando tratadas pelo E-PTA, e que se reduz à medida em que as espermátides se alongam e o material cromatínico se compacta (QUAGIO-GRASSIOTTO & DOLDER, 1988). Este fato levou as autoras a concluírem que haveria uma substituição gradual de histonas somáticas por proteínas ricas em arginina, bloqueando desta maneira os sítios de interação do PTA.

Em *Hyla ranki* admite-se que ocorra a substituição das proteínas histônicas somáticas por proteínas ricas em aminoácidos básicos, fenômeno detectado pela abolição da metacromasia gama ou beta com o tratamento pelo azul de toluidina a pH 4.0 (ítem 3.1.).

Na análise ultra-estrutural as células imaturas apresentam baixa eletrodensidade, provavelmente pela menor compactação de sua cromatina onde mesmo havendo reação, a disposição dos elementos de maneira mais frouxa, levam à menor eletrodensidade.



Porém no decorrer da citodiferenciação espermática as histonas são substituídas por outras proteínas básicas germinativas, as quais possuem grande afinidade pelo PTA, ocasionando o aumento da eletrodensidade nuclear nas células alongadas. No entanto nenhum tipo de esferas ou corpos cromatofílicos foi detectado a nível citoplasmático.

Os espermatozóides maduros apresentam notavelmente eletrolúcidos, muito mais que as espermatídes imaturas, o que se deve possivelmente a padrões variáveis de penetração do PTA, visto que o alto grau de compactação da cromatina impediria o acesso da molécula de PTA aos núcleos maduros.

Nas células maduras pode-se notar um certo acúmulo do PTA na região das membranas acrossomais, formando padrões variáveis nestas regiões.

As proteínas acessórias do filamento caudal são altamente reativas ao PTA, pela riqueza de resíduos de aminoácidos básicos (lisina ou arginina). Estes resíduos foram detectados nos acessórios caudais de outros anfíbios urodelos (WERNER et alii, 1972) entretanto, devido ao grande volume do bastão axial e de suas variações morfológicas na dependência da espécie estudada (PICHERAL, 1972a), não somente proteínas ricas em resíduos de lisina foram detectadas como também em arginina.

O reduzido diâmetro do bastão axial da cauda dos espermatozoides de *Hyla ranki*, bem como o de outros anuros dificultam um estudo citoquímico mais pormenorizado destas estruturas.

A análise do filamento marginal sugeriu uma certa ligação entre esta estrutura e o 8º par de microtúbulos do axonema por proteínas de constituição básica, ligação esta detectada nos espermatozoides de *O. cultripes* (BÁO, S.N. - comunicação pessoal) entretanto no 3º par de microtúbulos.

Entre o filamento marginal e o bastão axial, pelo interior da membrana ondulante ocorrem proteínas básicas formando uma ligação entre estas estruturas o que confirma a mesma origem de ambas.

**CONCLUSÕES**

## CONCLUSÕES

1. A organização tecidual dos testículos de *Hyla ranki* é túbulo-ocular e é no interior destes lóculos seminíferos que ocorre a espermatogênese e espermiogênese.
2. O desenvolvimento dos espermatozóides de *Hyla ranki* se dá de maneira contínua e no interior de espermatocistos, os quais apresentam sincronia nas divisões celulares e citodiferenciação.
3. No processo de citodiferenciação espermática as células de Sertoli desempenham papel fundamental tanto na reabsorção dos conteúdos citoplasmáticos como no processo de alongamento celular das espermátides.
4. Na espermiogênese de *Hyla ranki* ocorre substituição de proteínas histônicas somáticas por proteínas germinativas ricas em aminoácidos básicos (mais provavelmente arginina) detectáveis pelo E-PTA, e perda de metacromasia gama ou beta quando o material é tratado pelo azul de toluidina a pH 4,0. Os espermatozóides se coram em verde devido à baixa disponibilidade de grupamentos fosfatos do DNA após tal substituição

das proteínas histônicas.

5. As caudas dos espermatozóides de *Hyla ranki* apresentam acessórios constituídos por proteínas básicas, E-PTA positivas os quais poderiam levar a uma análise errônea à microscopia de luz como sendo duplo filamento caudal, devido ao baixo poder de resolução do microscópio óptico.

6. A análise do filamento caudal dos hilídeos como proposta por FOUQUETTE & DELLAHOUSAYE (1977) não deve ser tomada como caráter sistemático de exclusão ou proposição de resgate de gênero sinônimo, pois a morfologia das caudas dos espermatozóides dos anfíbios e a disposição dos acessórios caudais, são altamente variáveis não apresentando suficiente resolução para serem claramente detectados à microscopia de luz como procederam os referidos autores.

**RESUMO E SUMMARY**

## RESUMO

O objetivo do presente estudo foi determinar morfológica, citoquímica e ultra-estruturalmente o processo de maturação dos espermatozóides de *Hyla ranki*. Para tal utilizou-se técnicas histológicas e citoquímicas de cortes em parafina e técnicas de cortes semi e ultra-finos dos testículos incluídos em Epon.

A análise dos resultados revelou que durante a espermiogênese de *Hyla ranki*, as espermatogônias primárias originam, através de mitoses, espermatocistos cujas células germinativas entram em meiose e, após alongamento celular, organizam-se em feixes, ocorrendo a substituição de proteínas nucleares à medida que estas células se alongam. Tal substituição leva a uma alta compactação cromatínica na forma final dos espermatozóides.

O acrossomo se forma a partir da fusão de vesículas golgianas originando uma ampla vesícula acrossômica que se reduzirá consideravelmente à medida que a espermátide se alonga.

As caudas apresentam estruturas acessórias constituídas de proteínas básicas, as quais assumem a forma de bastão axial separado por uma membrana ondulante do filamento marginal que está adjacente ao axonema na altura do 89 par de microtúbulos deste.

Os processos citoplasmáticos que envolvem a maturação dos espermatozoides no interior dos testículos estão intimamente ligados à atividade das células de Sertoli, as quais são observadas desde a forma mais imatura das espermatogônias até entremeando com seu citoplasma, os amplos feixes de espermatozoides.

Embora as características morfológicas e citoquímicas de espermatozoides tenham sido utilizadas como caráter sistemático de exclusão para discriminação de espécies, como *Hyla ranki* e outras de seu grupo, que apresentam posicionamento filogenético duvidoso, nossos achados são altamente sugestivos de que não devam ser assim considerados, mas em realidade um caráter adicional.



## SUMMARY

The present study was undertaken to determine morphologically, cytochemically and ultrastructurally the maturation process of spermatozoa of *Hyla ranki*. Histological and cytochemical techniques were used with sections of material included in paraffin, as well as observation of semi-thin and ultra-thin sections of testicles included in epon.

Analysis of the results showed that primary spermatogonia, through mitosis, originate spermatocysts where the germinative cells enter meiosis. As the resulting cells elongate, they organize themselves into sheaths. Nuclear proteins are substituted as this elongation proceeds and the substitution permits a strong chromatin compactation in mature spermatozoa.

The acrosome is originated by fusion of Golgi vesicles into a large acrosomal vesicle, which is considerably compacted as the spermatid elongates.

The sperm tail presents an accessory structure consisting of basic proteins, in the shape of an axial rod and connected to the marginal filament and axoneme by an undulating membrane. The marginal filament, also made up of basic protein, follows the axoneme next to the 8th doublet of microtubules.

The cytoplasmic processes involved in sperm maturation are intimately related with the activity of Sertoli cells, which are observed from the earliest stage of spermatogonia until the formation of sperm sheaths, where the Sertoli cells surrounds each of sperm heads in the sheath.

Although the morphological and cytochemical characteristics of spermatozoa have been used as excluding systematic features to separate species, in the case of *Hyla ranki* and others of this group which have doubtful phylogenetical positions, our study suggests that sperm characteristics should not be considered alone but rather together with other features of systematic value.

---

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, C.G. Aspectos biológicos e citogenéticos de *Hyla fuscovaria* (Amphibia - Anura). Tese de Mestrado, Unicamp, 121p. 1984.

ALMEIDA, C.G. & CARDOSO, A.J. Variabilidade em medidas dos espermatozoides de *Hyla fuscovaria* (Amphibia - Anura) e seu significado taxonômico. *Rev. Bras. Biol.*, 45: 387-391. 1985.

ANDRADE, G.V. & CARDOSO, A.J. Reconhecimento do grupo *rizibilis*; descrição de uma nova espécie de *Hyla* (Amphibia - Anura). *Rev. Bras. Zool.*, SP 443 (7):433-440. 1987.

BARKER, K.R. & BAKER, C.L. Urodele Spermatoleosis: A comparative electron microscopy study. In: B. Baccetti. *Comparative Spermatology - Proceedings of the International Symposium*. N. York, Academic Press, p. 93-119. 1970.

BERNARD, R.T.F. & HODGSON, A.N. Ultrastructural changes in the seminiferous epithelium of two seasonally reproducing bats (Mammalia: Chiroptera). *J. Morphol.*, 199: 249-258, 1989.

BLOCH, D.P. A catalog of sperm histones. *Genetics*, 61: 93-111, 1969.

BERNARDINI, G., STIPAN, R. & MELONE, G. The ultrastructure of *Xenopus* spermatozoon. *J. Ultrastruct. Molec. Struct. Res.*, 94: 188-194, 1986.

BLOOM, F.E. & AGHAJANIAN, G.K. Fine structure and cytochemical analysis of the staining of synaptic junction with phosphotungstic acid. *J. Ultrastruct. Res.*, 22: 361-375, 1968.

BOGART, J.P. Afinidade entre los generos de anuros de las familias Pleobatidae y Ceratophrynidae como se muestra por analisis cromosomico. *Act. Zool. Lilloana*, 28: 19-29, 1971.

BOLS, N.C. & KASINSKI, H.E. Basic protein composition of anuran sperm: A cytochemical study. *Can. J. Zool.*, **50**: 171-177, 1972.

BRANDON, R.A.; MARTAN, J.; WORTHAN, J.W.E. & ENGLERT, D.C. The influence of interspecific hybridization on morphology of the spermatozoa of *Ambystoma* (Caudata - Ambystomatidae). *J. Reprod. Fert.*, **41**: 275-284. 1974.

BRITO, C.M.C. & MELLO, M.L.S. Induced nuclear metachromasy evaluated in spermatozoa of "pé duro" bulls. *Rev. Brazil. Genet.*, **11(2)**: 349-354, 1988.

CARDOSO, A.J. & SAZIMA, I. Nova espécie de *Hyla* do sudeste brasileiro (Amphibia, Anura, Hylidae). *Rev. Bras. Biol.*, **40(1)**: 75-79. 1980.

CAVICCHIA, J.C. & MOVIGLIA, G.A. Fine structure of the testis in the toad (*Bufo arenarum* Hensel): A Freeze fracture study. *Anat. Rec.*, **203**: 463-474, 1982.

COURTENS, J.L. & LOIR, M. Mise in evidence par cytochimie ultrastructurale de la migration des histones riches en lisine au cours de la spermiogénèse du bœlier. *J. Microscopie Biol. Cel.*, **24**: 249-258. 1975.

COURTENS, J.L. & LOIR, M. Ultrastructural detection of basic nucleoproteins: Alcoholic phosphotungstic acid does not bind to arginine residues. *J. Ultrastruct. Res.*, **74**: 322-326. 1981a.

COURTENS, J.L. & LOIR, M. A cytochemical study of nuclear changes in Boar, Bull, Goat, Mouse, Rat and Stallion spermatids. *J. Ultrastruct. Res.*, **74**: 327-340. 1981b.

---

CRUZ, C.A.G. & PEIXOTO, D.L. Uma nova espécie de *Hyla* do estado do Espírito Santo, Brasil (Amphibia, Anura, Hylidae). *Rev. Bras. Biol.* **42**(4): 721-724. 1982.

DALTON, G.C.; BÃO, S.N. & OLIVEIRA, S.F. Estudos ultraestruturais e citoquímicos para proteínas básicas (E-PTA) em espermátides de *Odontophrynus cultripes* (Anura - Leptodactylidae). XII Colóquio da Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, Vol.2, p.305-306. 1989.

DOLDER, H. & CARDOSO, A.J. Ultraestrutura do espermatozóide de *Hyla caldarum* B. Lutz (Amphibia - Anura) e a sua importância taxonômica. *Ciênc. Cult.*, 40(7<sup>o</sup>): 903. 1988.

DUELLMAN, W.E. & TRUEB, L. *Biology of Amphibians*. McGraw Hill, New York, cap.5 e cap.14 p 109-112 e p 407-408. 1986.

FAWCETT, D.W. The mammalian spermatozoon. *Develop. Biol.*, 44: 394- 436. 1975.



FEITOSA, V.L.C. Alterações na estrutura cromossômica de *Aplastodiscus perviridis* e *Hyla albopunctata* (Amphibia, Anura) provenientes do Morro do Ferro (MG), região com alta radioatividade natural. Tese de Mestrado - UNICAMP, 118pp., 1989.

FOUQUETTE, M.J.Jr. & DELLAHOSSAYE, A.J. Sperm morphology in the *Hyla rubra* group (Amphibia, Anura, Hylidae) and its bearing on generic status. *J. Herpetology*, 11(4): 387-396. 1977.

FURIERI, P. The peculiar morphology of the spermatozoon of *Bombina variegata* (L.). *Monitore Zool. Ital.*, 9: 185-201, 1975.

GATEMBY, J. The Electron Microscopy of centriole, flagellum and cilium. *J. Royal Microsc. Soc.*, 79 (4): 299-317. 1961.

GLAUERT, A.M. Fixation, dehydration and embedding of biological Specimens. In A.M. Glauert ed *Practical methods in electron microscopy*. North Holland Publishing Company. v.3 p 1-207. 1975.

GRIFFITHS, I. The phylogeny of Salientia. *Biol. Rev.*, 38: 241-292. 1962.

HEYER, W.R. The calls and taxonomic positions of *Hyla giesleri* and *Ololygon opalina* (Amphibia, Anura, Hylidae). *Proc. Biolol. Soc. Wash.*, 93(3): 655-661. 1980.

HOOGHWINKEL, G.J.M. & SMITS, G. The specificity of the periodic acid - Schiff technique studied by a quantitative test - tube method. *J. Histochem. Cytochem.*, 5: 120-126, 1957.

KASINSKY, H.E. Specificity and distribution of sperm basic proteins. In L.S. Hnilica, G.S. Stain & J.L. Stain. *Histones and other basic nuclear protein*. CRS Press, Florida, 1989.

LAURIENTI, J.N. Specimen medicum exhibens synopsis Reptilium emendatum cum experientis circa venena et antidota Reptilium austriacorum. *Viena* 1768 apud GRIFFITHS, I. The phylogeny of Salientia. *Biol. Rev.*, 38: 241-292. 1962.

LEBLOND, C.P.; GLEGG, R.E. & EIDINGER, D. Presence of carbohydrates with free 1,2-glycol groups in sites stained by the periodic acid - Schiff technique. *J. Histochem. Cytochem.*, 5: 455-458, 1957.

LISON, L. *Histochimie et Cytochimie Animales - Principes et Methodes*. Vol. I, Gauthier Villars, Paris, 397p. 1960.

LOIR, M. & LANNEAU, M. Structural function of the Basic Nuclear Proteins in Ram Spermatids. *J. Ultrastruct. Res.* 86: 262-276. 1984.

LUFT, J.H. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Bioph. Biochem. Cytolol.*, 9: 409-414. 1961.

MARTINS, M. & SAZIMA, I. Dendrobatídeos: cores e venenos. *Ciência Hoje*, 9(53): 34-38. 1989.

MARTOJA, R. SZÖLLOZI, A. & TROCHET, M. J. *Microscopie Biol. Cel.*, 22: 247-259. 1975. apud COURTENS, J.L. & LOIR, M. Ultrastructural detection of basic nucleoproteins: Alcoholic phosphotungstic acid does not bind to arginine residues. *J. Ultrastruct. Res.*, 74: 322- 326. 1981.

MELLO, M.L.S. Different affinity for clupein in heterochromatin and euchromatin of *Triatoma infestans*. *Rev. Brazil. Genet.*, VIII, 4: 755-758, 1985.

MELLO, M.L.S. Nuclear cytochemistry and polarization microscopy of the spermatozoa of *Triatoma infestans* Klug. *Z. mikrosk. -anat. Forsch. Leipzig.*, 101(2): 245-250, 1987.

MELLO, M.L.S. & VIDAL, B.C. Changes in anisotropic properties and nuclear stainability during spermatogenesis in the grasshopper, *Staurochectus longicornis* Giglios - Toss. *Adv. Invert. Rep.*, 1: 75-83. 1977.

MELLO, M.L.S. & VIDAL, B.C. Práticas em Biologia Celular.  
Edgard Bucher, São Paulo. 58-69 p. 1980.

MIZUHIRA, U.; FUTAESAKU, Y.; ONO, M.; UENO, M.;  
YOKOFUJITA, J. & OKA, T. The fine structure of the  
spermatozoa of two species of *Racophorus* (*Arboreus*,  
*Schlegelii*). I. Phase contrast microscopy, Scanning  
Electron microscopy and Cytochemical observations of  
the head piece. *J. Ultrastruct. Molec. Struct. Res.*,  
96: 41-53, 1986.

MORESCALCHI, A. Hypothesis on the phylogeny of the  
Salientia, based on karyological data. *Experientia*,  
24: 964-966. 1968.

MORRISETT, F.W. Comparative ultrastructure of sperm in  
three families of Anura (Amphibia). Master's  
thesis, 1974. apud FOUQUETTE, M.J.Jr. &  
DELLAHOUSAYE, A.J. Sperm morphology in the *Hyla*  
*rubra* group (Amphibia, Anura, Hylidae) and its  
bearing on generic status. *J. Herpetology*, 11(4):  
387-396. 1977.

NICANDER, L. Comparative studies on the fine structure of vertebrate spermatozoa. In: B. Baccetti. Comparative Spermatology: Proceedings of the International Symposium. N. York, Academic Press, p. 47-62. 1970.

NOBLE, G.K. The biology of Amphibians. Mc Graw Hill, New York, 557p. 1931.

ORR, R.T. Biologia dos Vertebrados. Rocca, São Paulo, 5ed. Cap 4, 73-91p. 1986.

PEACHEY, L.D. Thin sections. I. A study of sections thickness and physical distortion produced during microtomy. J. Biophys. Biochem. Citol, 4: 233. 1958.

PHILLIPS, D.M. & ASA, C.S. Development of spermatozoa in the Rhea. Anat. Rec., 223: 223-276. 1989.

PICHERAL, B. Les éléments cytoplasmiques au cours de la spermiogénèse du triton *Pleurodeles waltlii* Michah. III. L'évolution des formations caudales. Z. Zellforsch., 131: 399-416, 1972a.

PICHERAL, B. Les éléments cytoplasmiques au cours de la spermiogénèse du triton *Pleurodeles waltlii* Michah. I. La genèse de l'acrossome. Z. Zellforsch., 131: 347-370, 1972b.

PICHERAL, B. Les éléments cytoplasmiques au cours de la spermiogénèse du triton *Pleurodeles waltlii* Michah. II. La formation du cou et l'évolution des organites cytoplasmiques non intégrés dans le spermatozoïde. Z. Zellforsch., 131: 371-398, 1972c.

POIRRIER, G.R. & SPINK, G.C. The ultrastructure of testicular spermatozoa in two species of *Rana*. J. Ultrastruct. Res., 36:455-465. 1971.

QUAGLIO-GRASSIOTTO, I. & DOLDER, H. The basic nucleoprotein E-PTA reaction during spermiogenesis of *Ceratitis captata* (Diptera, Thephritidae). *Cytobios*, 53: 153-158. 1988.

RASTOGI, R.K.; BAGNARA, J.T.; IELA, L. & KRASOVICH, M.A. Reproduction in the Mexican leaf frog, *Pachymedusa dacnicolor*. IV. Spermatogenesis: A light and ultrasonic study. *J. Morphol.*, 197: 277-302. 1988.

REED, C.S. & STANLEY, H.P. Fine structure of spermatogenesis in the South African clawed toad *Xenopus laevis* Daudin. *J. Ultrastruct. Res.*, 41: 277-295, 1972.

ROMER, A.S. Excretory and reproductive systems. In *The Vertebrate Body*. W.B. Saund Company, London. 4ed. Cap 13, 350-391p. 1970.



RUSCH, R. Proc. Amer. Phil. Soc., 84: 617. 1941. apud  
REED, C.S. & STANLEY, H.P. Fine structure of  
spermatogenesis in the South African clawed toad  
*Xenopus laevis* Daudin. J. Ultrastruct. res., 41:  
277-295. 1972.

SANDOZ, D. étude ultrastructurale et cytochimique de la  
formation de l'acrossome du Discoglosse (Amphibiën,  
Anoure). In: B. Baccetti. Comparative spermatology -  
Proceedings of the International Symposium, New  
York, Academic Press, 93-119p, 1970.

SANDOZ, D. Development of the neck region and ring  
during spermiogenesis of *Discoglossus pictus*  
(Anuran - Amphibia) In A. ALFESIUS The  
Functional Anatomy of the Spermatozoon. Oxford,  
Pergamon Press. 237-247p. 1973.

SAVAGE, J.M. Evolutionary Biology of Anurans. Univ.  
Missouri Press, Kansas. 351-455p. 1973.

SCOTT, J.E. & HARBINSON, R.J. Periodate oxidation of acid polysaccharides. II. Rates of oxidation of uronic acids in polyuronides and acid mucopolysaccharides. *Histochemie*, 19: 155-161, 1969.

SCOTT, J.E. Phosphotungstate: A universal (nonspecific) precipitant for polar polymers in acid solution. *J. Histochem. Cytochem.*, 19(11): 689-691. 1971.

SHERIDAN, W. & BARNETT, R. Cytochemical studies on chromosome ultrastructure. *J. Ultrastruct. Res.*, 27: 216-229. 1969.

SIMIONESCU, N. & SIMIONESCU, M. Galloylglucoses of low molecular weight as a mordant in electron microscopy. I. Procedure and evidence for mordanting effect. *J. Cell Biol.*, 70: 608-621. 1976a.

SIMIONESCU, N. & SIMIONESCU, M. Galloylglucoses of low molecular weight as a mordant in electron microscopy. II. The moiety and functional groups possibly involved in the mordanting effect. *J. Cell Biol.*, 70: 622-633, 1976b.

SPRANDO, R.L. & RUSSELL, D.L. Spermiogenesis in the bullfrog (*Rana catesbeiana*): A study of cytoplasmic events including cell volume changes and cytoplasmic elimination. *J. Morphol.*, 198: 303-319, 1988a.

SPRANDO, R.L. & RUSSELL, L.D. Spermiogenesis in the Red-Ear Turtle (*Pseudemys domestica*): A study of cytoplasmic events including cell volume changes and cytoplasmic elimination. *J. Morphol.*, 198: 95-118, 1988b.

STORER, T.I.; USINGER, R.L.; STEBINS, R.C. & NYBAKKEN, J.W. *General Zoology*. 6ed, Mc Graw Hill, New York. 618-641p. 1979.

THIAW, D.T.; MATTEI, X.; RONAND, R. & MARCHAND, B. Reinvestigation of spermatid flagella structure of the teleostean Cyprinodontidae. *J. Ultrastruct. and Molec. Struct.*, 97: 109-118. 1986.

VAUGHN, J.C. The relationship of the "sphere chromatofile" to the fate of displaced histone following histone transition in rat spermiogenesis. *J. Cell Biol.*, 31: 257-278, 1966.

VENABLE, J.H. & COGGESHALL, R. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.*, 25: 407-408. 1965.

VIDAL, B.C. Métodos em Biologia Celular. In: B.C. Vidal & M.L.S.Mello. *Biologia Celular*. Atheneu, Rio de Janeiro-RJ., 5-34, 1987.

WATSON, M.L. Staining of tissue sections of electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 4(4): 475-478. 1958.

WERNER, G. On the development and structure of the neck in urodele sperm. In: B. Baccetti. *Comparative Spermatology: Proceedings of the International Symposium*. N. York, Academic Press, p.93-120. 1970.

WERNER, G.; HUBERS, E. & MORGENSTERN, E. Beziehungen  
zwischen Struktur und chemischer Zusammensetzung  
der Spermien von Bergmolch, *Triturus alpestris* Laur.  
*Hist. Ochemie*, 30: 345-358, 1972.

WITSCHI, E. Z. Zellforsch. mikrosk. Anat., 1: 523.  
1924. apud REED, C.S. & STANLEY, H.P. Fine  
structure of spermatogenesis in the South African  
clawed toad *Xenopus laevis* Davin. *J. Ultrastruct.  
Res.*, 41: 277-295. 1972.

WORTHAM, J.Jr.; BRANDON, A. & MARTAN, J. Comparative  
Morphology of some Plethodontidae salamander  
spermatozoa. *Copeia*, 1977: 666-680. 1977.

ZIRKIN, B.R. The protein composition of nuclei during  
spermiogenesis in the leopard frog, *Rana pipiens*.  
*Chromosoma.*, 31: 231-240. 1970.

ZIRKIN, B.R. The fine structure of nuclei during  
spermiogenesis in the leopard frog, *Rana pipiens*. *J.  
Ultrastruct. Res.*, 34: 159-174. 1971.