

Rita Luiza Peruquetti

Estudo do Ciclo Nucleolar no Epitélio
Seminífero de Roedores



1910001349



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS

SÃO JOSÉ DO RIO PRETO, SP.

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

RITA LUIZA PERUQUETTI

ESTUDO DO CICLO NUCLEOLAR NO EPITÉLIO

SEMINÍFERO DE ROEDORES



T. 1343/05

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO INSTITUTO DE
BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS DA
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA PARA OBTENÇÃO
DO TÍTULO DE MESTRE EM BIOLOGIA ANIMAL.

ORIENTADORA: PROFA. DRA. MARIA TERCÍLIA VILELA DE AZEREDO OLIVEIRA

2004



591.463.1

P471e

20204000

04/03/2005

Doação

R\$ 21,00

Autor(a)

076/2005

63/05

Peruquetti, Rita Luiza.

Estudo do ciclo nucleolar no epitélio seminífero de roedores / Rita Luiza Peruquetti – São José do Rio Preto : [s.n.], 2004
62 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Espermatogênese. 2. Espermatogênese em animais. 2. Células germinativas. 2. Nucléolo. 3. Corpo cromatóide. 4. *Rattus norvegicus*. 5. *Mus musculus*. 6. *Meriones unguiculatus*. I. Azeredo-Oliveira, Maria Tercília Vilela de. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 591.463.1

DATA DA DEFESA: 16/12/2004

BANCA EXAMINADORA

TITULARES:

Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira _____

(Orientadora)

UNESP / São José do Rio Preto

Profa. Dra. Cibelle Rocha Abdo Banhos _____

FAMECA / Catanduva

Profa. Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo _____

UNESP / São José do Rio Preto

SUPLENTES:

Prof. Dr. Alan Peres Ferraz de Mello _____

UNIRP / São José do Rio Preto

Profa. Dra. Rejane Maira Góes _____

UNESP / São José do Rio Preto

Prof. Dr. Reinaldo Azoubel _____

FAMERP / São José do Rio Preto



**“A maravilhosa disposição e harmonia do
Universo só pode ter tido origem segundo o plano
de um Ser que tudo sabe e tudo pode. Isto fica
sendo a minha última e mais elevada descoberta”.**

Isaac Newton

**Dedico este trabalho aos meus pais,
José Luiz e Ana, por todo apoio
e amor que me dedicaram.**

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a algumas pessoas que, direta ou indiretamente, me auxiliaram durante o período de realização deste trabalho:

- Deus, por me permitir ser a pessoa que sou, me dando a vida e me acompanhando em todos os momentos.
- Meus pais, José Luiz e Ana, por sempre acreditarem em meus sonhos e me apoiarem em todas as decisões tomadas, sempre com muito respeito, carinho e amor. Obrigada por tudo, amo vocês!
- Minha irmã Anna Carolina, que apesar das briguinhas (coisas de irmãs) sempre esteve presente em minha vida, me apoiando e me ajudando a aliviar as tensões do dia-a-dia (horas e horas assistindo filmes). Valeu maninha!
- Todos os meus familiares, que compreenderam a minha ausência nesses dois anos de trabalho, obrigada pelo apoio.
- Minha orientadora, Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira, por ter me recebido de braços abertos, me apoiando e me ensinando muito, não só profissionalmente, mas também dando exemplo de como ser um ser humano bem sucedido, competente e generoso. Obrigada!
- Meus professores da graduação e pós-graduação que sempre me apoiaram e me incentivaram.
- Meu namorado, Tiago Vasconcelos, que se tornou uma pessoa muito importante em minha vida, e sempre me ajudou e esteve presente nos momentos bons e também nos momentos difíceis. Obrigada por você existir, te amo muito! Ah, obrigada também pelas fotos dos roedores, foram muito úteis. Valeu bonitinho!
- Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga, pela valiosa contribuição com este trabalho, auxiliando na análise e obtenção das imagens de microscopia eletrônica de transmissão e também por sua participação na Banca do Exame Geral de Qualificação.
- Prof. Alan Peres Ferraz de Melo, por sua participação e contribuição na Banca do Exame Geral de Qualificação.

- Profa. Dra. Denise de Cerqueira Rossa-Ferez (ex-coordenadora do programa de pós-graduação) e Prof. Dr. Classius de Oliveira (coordenador do programa de pós-graduação), por todo apoio e empenho em levar adiante o nosso programa.
- Luiz Roberto Faleiros Júnior, amigo e técnico do laboratório do Centro de Microscopia (IBILCE/UNESP), pelo apoio imprescindível durante a realização deste trabalho, sempre me auxiliando na realização de todas as técnicas utilizadas e também por ser um companheiro tão agradável e divertido, tornando o trabalho no laboratório menos árduo. Valeu Luli!
- Rosana Silistino de Souza, técnica do Laboratório de Morfologia (IBILCE/UNESP), pelo auxílio na realização dos cortes ultra-finos para microscopia eletrônica de transmissão.
- Carlos Eduardo de Souza, técnico do Biotério do Departamento de Zoologia e Botânica (IBILCE/UNESP), pelo auxílio na manutenção dos animais.
- Funcionários da Seção de Pós-graduação, Edison Luis Pinceli, Nanci Q. A. Pereira, Rosana M. G. Ferro, Rosemar R. C. Brena e Silvia E. Kazama, pelo atendimento e pela atenção dispensados.
- Funcionários da Biblioteca pelos auxílios prestados durante o desenvolvimento deste trabalho.
- Alessandra Morielle pelo apoio na realização de algumas técnicas citoquímicas.
- Os amigos que fiz durante esse tempo de trabalho, principalmente Thaís, Tiago Gomes e Rodrigo Zieri. Obrigada pelo incentivo e pelos momentos de descontração, risadas, desabafos, congressos, enfim, obrigada pela companhia e amizade. Nunca vou esquecer de vocês.
- Todos os outros colegas do programa de pós-graduação: Fábio, Maurício, Kadu, Arthur, Rose, Eliéser, Francine, Gabi, Petérson, Renato, Vitão, Lia, Márcio, Fausto, Yoda e outros, pela companhia, pelos churrascos, pelas brincadeiras (zum, meio limão, etc). Valeu galera!
- Os colegas e amigos do laboratório: Sérgio, Ana Maria, Silvana, Maê, Cris, Lucilene, obrigada pelo auxílio e pelo apoio de vocês.

- Todos os meus amigos, em especial, Laurinha, Renata, Tati, Cami, Kbça, Luan, Rejjane, Lucilena, Hediany, Karin, Bruna, obrigada pelo carinho de vocês.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas.....	01
1. Resumo.....	02
2. Abstract.....	03
3. Introdução.....	04
3.1. Epitélio seminífero e espermatogênese.....	04
3.2. Nucléolo.....	05
3.3. O nucléolo durante a mitose.....	07
3.4. O nucléolo durante a meiose.....	09
3.5. Justificativa.....	10
3.6. Objetivo.....	11
4. Material e Método.....	12
5. Resultados.....	14
5.1. <i>Rattus norvegicus</i> e <i>Mus musculus</i>	14
Legendas e Figuras.....	18
5.2. <i>Meriones unguiculatus</i>	30
Legendas e Figuras.....	33
6. Discussão.....	41
7. Conclusões.....	47
8. Referências Bibliográficas.....	48
9. Apêndices.....	56
1. Roedores utilizados no trabalho.....	57
2. Tabela 1.....	58
3. Protocolos das técnicas citoquímicas.....	59

Lista de Abreviaturas

AgNOR: Proteínas argênticas da Região Organizadora Nucleolar

AT: Azul de Toluidina

B23: Numatrina

B36: Fibrilarina

CB: “Chromatoid body” ou “Corpo cromatóide”

CEC: Concentração Eletrolítica Crítica

CF: Centro fibrilar

CFD: Componente fibrilar denso

CG: Componente granular

C23: Nucleolina

DNAr: DNA ribossômico

MET: Microscopia eletrônica de transmissão

No38: Proteína nucleolar

PNBs: Corpos pré-nucleolares

RNA pol. I: RNA polimerase I

RNAr: RNA ribossômico

RNP: Ribonucleoproteína

RONs: Regiões Organizadoras Nucleolares

snRNA: Small nuclear RNA

snRNP: Small nucleolar ribonucleoproteins



1. Resumo

O nucléolo é um subcompartimento do núcleo responsável pela biogênese dos ribossomos. Durante o ciclo celular mitótico e meiótico, ocorre uma desorganização e posterior reorganização do material nucleolar, evento denominado nucleogênese. Na espermatogênese de mamíferos e outros vertebrados, há evidências de que a desorganização do nucléolo, no final da meiose I, fornece material para a formação de uma organela citoplasmática denominada “corpo cromatóide” (CB). O CB é uma estrutura característica de células espermatogênicas, que parece ser responsável pelo metabolismo de RNA nessas células e por vários eventos da espermiogênese, tais como: formação do acrossomo; comunicação celular entre as espermátides; formação da peça intermediária e do flagelo dos espermatozoides. O objetivo do presente trabalho foi obter dados sobre a estrutura citoquímica e ultra-estrutural do ciclo nucleolar e dos RNAs citoplasmáticos nas células dos túbulos seminíferos de *Rattus norvegicus*, *Mus musculus* e *Meriones unguiculatus*. Os testículos foram fixados em Bouin e Karnovsky para análise histológica convencional e para estudo citoquímico, que incluiu as seguintes técnicas: Periodic Acid Schiff (PAS); Hematoxilina-Eosina (HE); Reação de Feulgen; Impregnação por Íons Prata; Reticulina de Gömöri; Azul de Toluidina (AT); variante da Concentração Eletrolítica Crítica (variante de CEC); Fast green alcalino e ácido. Fragmentos testiculares fixados em glutaraldeído foram utilizados para análise ultra-estrutural em microscopia eletrônica de transmissão (MET). Os cortes ultra-finos foram contrastados com citrato de chumbo e acetato de uranila. Todas as técnicas forneceram informações sobre a origem e a função do CB nas células espermatogênicas. Portanto, considerando a persistência do RNA e das ribonucleoproteínas (RNPs) nucleolares durante a espermatogênese de *Rattus norvegicus*, *Mus musculus* e *Meriones unguiculatus*, nossos achados corroboram que esses complexos moleculares são muito importantes nas fases da espermiogênese. Pode ser sugerido que estes corpúsculos de ribonucleoproteínas (“corpo cromatóide”) são de origem nucleolar e atuam na série de eventos sucessivos que ocorrem na formação do espermatozoide. Além disso, esses resultados reforçam a conservação dos mecanismos envolvidos na preservação dos níveis necessários de proteínas nos diferentes estágios de diferenciação celular, de espermátides em espermatozoides, nessas espécies de roedores.

2. Abstract

The nucleolus is a subcompartment of the nucleus and the site of ribosome biogenesis. During the mitotic and meiotic cell cycle, occurs a disorganization and a posterior reorganization of the nucleolar material, event called nucleogenesis. In the spermatogenesis of mammals and other vertebrates occurs evidences on the disorganization of the nucleolus, at the end of meiose I, supplies material for cytoplasmic formation of organelle called "chromatoid body" (CB). The CB is a characteristic structure of spermatogenic cells, and seems to be responsible for RNA metabolism in these cells and for some events of spermiogenesis, as: formation of acrosome; cellular communication between spermatids; formation of the spermatozoon middle piece and tail. The aim of this paper was to obtain data about the cytochemical and ultrastructural structure of nucleolar cycle and the distribution of RNAs cytoplasmics in the seminiferous tubules cells of *Rattus norvegicus*, *Mus musculus* and *Meriones unguiculatus*. The testis had been fixed in Bouin and Karnovsky for conventional histological analysis and for cytochemical study that included: Periodic Acid Schiff (P.A.S), Hematoxilin-Eosin (HE), Feulgen Reaction, Silver-ion Impregnation, Gömöri Reticulin, Toluidine Blue, modified method of Critical Electrolyte Concentration (CEC) and basic and acid Fast green. The blocks of testis fixed in glutaraldehyde were used for ultrastructural analysis by transmission electronic microscopy (TEM). Ultrathin sections were double-stained with uranyl acetate and lead citrate. All the used techniques had brought information on the origin and the function of the CB in the spermatogenesis cells. Therefore, considering the persistence of the RNA and nucleolar ribonucleoproteins (RNPs) during spermatogenesis of *Rattus norvegicus*, *Mus musculus* and *Meriones unguiculatus*, our findings corroborate that these molecular complexes are very important in the spermiogenesis phases. It can be suggested that these ribonucleoprotein corpuscles ("chromatoid body") are nuclear origin and have a role in a successive series of events that occur in the formation of the spermatozoon. Beyond, these results reinforce the conservation involving mechanisms for preserving necessary levels of proteins stocks in different stages of cell differentiation, spermatids to spermatozoon, in this rodents species.

3. Introdução

3.1. Epitélio seminífero e espermatogênese

O estudo da espermatogênese dos roedores tem sido utilizado como padrão para entender a formação dos espermatozoides em mamíferos. Esse processo ocorre nos túbulos seminíferos, onde o epitélio germinativo fica isolado no seu interior e é constituído por uma população estável de células de suporte (células de Sertoli) e por células proliferativas em diferenciação (células espermatogênicas) (MATSUMOTO, 1996). As células germinativas se dispõem em associações celulares bem definidas dentro dos túbulos seminíferos evoluindo sincronicamente em diferentes estádios da espermatogênese.

Uma investigação histológica em um corte transversal de testículo de rato é suficiente para demonstrar que existe um padrão de desenvolvimento das células germinativas o qual, embora variado, se faz de maneira repetida. Entretanto, o esclarecimento sobre a regularidade do processo da espermatogênese só pôde ser suficientemente determinado após rigorosos estudos das diferentes gerações celulares. Somente após esses estudos é que foi possível o estabelecimento do conceito de “ciclo do epitélio seminífero” que se definiu como “a série de alterações celulares que ocorrem em dada área do epitélio seminífero, entre dois aparecimentos sucessivos de uma mesma associação celular” (ORSI & FERREIRA, 1978).

Diversos trabalhos, nas décadas de 50, 60 e 70, permitiram estabelecer bases morfológicas seguras sobre a sequência da espermatogênese em vários mamíferos, inclusive no homem. Esses trabalhos tiveram, assim, o grande mérito de estabelecer uma terminologia adequada (fases, ciclos, estádios), a qual define facilmente as ocorrências do ciclo espermatogenético, não só no rato, como também de inúmeros outros animais (ORSI, 1974).

Apesar das dúvidas que ainda existem em relação a muitos fatos ligados à espermatogênese de mamíferos e, em especial, à do homem - por exemplo, a renovação das espermatogônias (“stem cells”) e o controle da “onda espermatogenética” -, os ciclos espermatogenéticos em muitos animais já foram analisados permitindo tirar conclusões válidas sobre estudos de diversas naturezas, tais como a ação de fatores tóxicos ou de fatores endócrinos. Também já foram realizados estudos sobre a localização, estrutura e atividade do nucléolo na gametogênese de roedores. No entanto, pouca ênfase foi dada à distribuição do material nucleolar (RNAr + proteínas) durante a meiose e a espermiogênese destes mamíferos (FAKAN & HERNANDEZ-VERDUN, 1986; PARVINEN *et al.*, 1986).



3.2. Nucléolo

O nucléolo interfásico encontra-se organizado ao redor de regiões cromossômicas denominadas “Regiões Organizadoras Nucleolares” (RONs). As RONs são locais dos cromossomos que possuem genes para RNA ribossômico (RNAr), que são transcritos e processados em pré-ribossomos no interior do nucléolo. Os genes ribossomais estão presentes em seqüências altamente repetidas em *tandem*, existindo várias cópias de genes RNAr em cada RON (SUMMER, 1990). A transcrição dos genes RNAr é realizada pela RNA polimerase I (RNA pol I) e ocorre em seqüência, deixando a estrutura com um aspecto de “árvore de natal”, como observado primeiramente por MILLER & BEATTY (1969) e por SCHEER *et al.* (1997).

O nucléolo é um território particular do núcleo, que está relacionado com a compartimentalização das funções nucleares (HERNANDEZ-VERDUN, 1991). É considerado um subcompartimento do núcleo, altamente organizado e não envolto por membrana, e também é o local da biogênese dos ribossomos (GERBI, 2003). O transcrito primário RNAr 45S é processado em RNAr maduros 18S, 5,8S e 28S e, então, proteínas são adicionadas aos pré-ribossomos nascentes e, também, o RNAr 5S (sintetizado fora do nucléolo) é incorporado (THIRY & GOESSENS, 1996). As unidades de transcrição para o RNAr 45S são separadas por grandes espaços não transcritos ou regiões intergênicas (IGR), e dentro das unidades de transcrição encontram-se as regiões espaçadoras (TS), que possuem espaçadores externos nos finais (ETS) e espaçadores internos (ITS) dentro da unidade (SCHWARZACHER & WACHTLER, 1993).

A formação do nucléolo é um processo dinâmico no desenvolvimento da vida da célula sendo denominado nucleologênese. Visto ao microscópio eletrônico, o nucléolo geralmente apresenta três domínios nucleolares maiores: o centro fibrilar (CF), o componente fibrilar denso (CFD) e o componente granular (CG), contudo, durante a nucleologênese, esses domínios desorganizam-se e reorganizam-se no ciclo celular (ZATSEPINA *et al.*, 1997). Os CFDs formam uma rede que liga os CFs. Essa organização espacial é similar à descrita para nucléolos de plantas (JUNÉRA *et al.*, 1995). O CF está em contato direto com a RON e na sua periferia ocorre a transcrição do RNAr 45S. O processamento do RNAr e sua reunião com as proteínas e o RNAr 5S, que irá formar as subunidades ribossômicas maduras, ocorrem no CFD e CG (THIRY & GOESSENS, 1996).

O nucléolo possui outras funções, como a ligação e maturação de vários outros tipos de RNAs (pequenos RNAs nucleares – snRNAs) (GERBI, 2003). Estes snRNAs complexam-se com proteínas formando pequenas ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs) que representam uma classe estável de complexos RNA-proteínas que é encontrada no núcleo de todas as células eucarióticas (LÜHRMANN, 1990). Algumas dessas snRNPs possuem importante função no

processamento do pré-RNAr 45S. Por exemplo, a snRNP denominada MRP é importante para a produção do RNAr 5,8S, em organismos superiores a snRNP U8 é necessária para formar o RNAr 28S (GERBI, 2003). A mais estudada é a snRNP U3 que, provavelmente, está relacionada com a clivagem do pré-RNAr 45S no local situado entre o ITS1 e 5,8S. Foi sugerido que partículas de U3 sejam as marcações eletrondensas conhecidas como “botões terminais”, observadas na extremidade 5' terminal das moléculas de RNAr pré-sintetizadas (HERNANDEZ-VERDUN, 1991).

Há aproximadamente 271 proteínas nucleolares envolvidas na síntese e no processamento de RNAr, porém existem outras proteínas que parecem possuir diferentes funções, como: modificações de nucleotídeos de snRNPs; biosíntese de sinais de reconhecimento de partículas; captura e liberação de proteínas envolvidas em silenciamento gênico (PEDERSON, 2002). Além disso, o nucléolo abriga proteínas que são responsáveis por mecanismos de controle do ciclo celular e possui uma proteína, denominada ARF, que é considerada supressora de tumor (CARMO-FONSECA *et al.*, 2000).

A composição química do nucléolo é relativamente bem definida. É composto por DNAr e RNAr em seus três domínios (CF, CFD e CG). Possui várias proteínas classificadas como: histonas, proteínas ácidas e enzimas. As histonas estão presentes nos três domínios nucleolares por estarem complexadas com DNAr. As proteínas ácidas possuem localizações variadas: a fibrilarina (B36), que forma um complexo com o U3 e é um importante fator de processamento de RNAr, é encontrada no CF e no CFD; a nucleolina (C23), que está relacionada com a transcrição de DNAr e com o processamento de RNAr, regulando a taxa de produção de pré-ribossomos, pode ser encontrada no CF e CFD; a numatrina (B23), que é responsável pelos estádios tardios de reunião de pré-ribossomos, é encontrada associada com RNP pré-ribossômicas maduras e está envolvida no transporte de pré-ribossomos para o citoplasma, sendo observada no CFD e CG; a ribogranulina (52kDa), assim como a fibrilarina, também está associada com U3 snRNA, importante para o processamento de RNAr, sendo encontrada no CG. As enzimas também possuem diferentes localizações: a RNA pol I, específica para a síntese de RNAr é localizada no CF e CFD; a DNA topoisomerase I, necessária para a descondensação do DNA no curso da transcrição, não é específica para DNAr e encontra-se no CF e CFD; a DNA topoisomerase II, também é responsável pela mudança na topologia da hélice de DNA e é encontrada somente no CFD do nucléolo (MORIELLE & AZEREDO-OLIVEIRA, 2004b; THIRY E GOESSENS, 1996). Achados citológicos descrevem que as proteínas C23 e B23 são responsáveis pela impregnação pelos íons prata (OCHS & BUSCH, 1984; CASSEB-HASSAN & AZEREDO-OLIVEIRA, 1999).

3.3. O nucléolo durante a mitose

Em ciclos celulares de plantas e de animais, quando as células entram em mitose e cessa-se a transcrição do DNAr na prófase, os nucléolos desintegram-se estruturalmente e a maior parte das proteínas nucleolares migra para o citoplasma. Parte dessas proteínas nucleolares pode permanecer associada às RONS dos cromossomos mitóticos, dissolver-se no citoplasma ou, ainda, ligar-se à periferia cromossômica, como uma bainha pericromossomal. Imediatamente após a segregação dos cromossomos no final da anáfase, a transcrição do DNAr é reativada e os nucléolos gradualmente reorganizam-se. A reorganização do nucléolo inicia-se quando o material nucleolar formado por complexos RNA/proteínas, condensa-se e reúne-se em estruturas discretas denominadas de corpos pré-nucleolares (*pré nucleolar bodies* – PNBs) que, subseqüentemente, fundem-se nas RONS cromossômicas, na telófase e no início da intérfase, fornecendo, assim, a base da formação de nucléolos interfásicos maduros (OCHS *et al.*, 1985; FAKAN & HERNANDEZ-VERDUM, 1986; WACHTLER & STHAL, 1993; SCHARZACHER & WACHTLER, 1993; GONZALES-GARCIA *et al.*, 1995; MELLO, 1995; BARAN *et al.* 1997; FLÉCHON & KOPECNÝ, 1998; DUNDR *et al.*, 2000).

MELLO (1995) utilizando células somáticas de mamíferos e baseando-se no padrão metacromático dessas células devido à presença de moléculas de RNA, detectadas pela técnica variante da Concentração Eletrolítica Crítica (CEC), observou que, durante as fases mitóticas de prometáfase e metáfase inicial, havia um “deslocamento” do material nucleolar metacromático para as proximidades dos cromossomos que “se moviam” para a placa celular equatorial. Observou, também, corpos pré-nucleolares metacromáticos que permaneciam nas extremidades da placa cromossômica ou afastados dos cromossomos. Essa última situação foi verificada nas outras fases subseqüentes da mitose. A autora pôde constatar que durante a anáfase a reação de metacromasia deslocava-se das bordas da placa cromossômica para a região entre os dois conjuntos de cromossomos em movimento e, na telófase inicial, a zona celular envolvida com essa reação adquiria um formato de ampulheta.

Ainda nesse estudo, realizado por MELLO (1995), os nucléolos em reorganização não foram vistos como corpos distintos durante a telófase tardia, mas na citocinese avançada pequenos corpos pré-nucleolares metacromáticos tornavam-se gradualmente evidentes dentro do núcleo das células-filhas. Além disso, os sítios da resposta metacromática durante a mitose não foram coincidentes com as regiões Ag-NOR positivas. Baseando-se nos vários aspectos observados, a autora sugeriu que o RNA responsável pela camada pericromossomal metacromática não seria de origem nucleolar, pois, outros RNAs poderiam estar participando da resposta metacromática. No entanto, a migração e a íntima associação dos corpúsculos com os

cromossomos seriam sugestivos da participação do RNA nucleolar no padrão de metacromasia detectado.

A relação entre estrutura e função das sub-estruturas nucleolares também foi estudada no ciclo celular de células somáticas de embriões de coelhos (BARAN, *et al.*, 1997) e porcos (VIUFF *et al.*, 2002). No trabalho de BARAN *et al.* (1997), foi verificado que a nucleologênese estendia-se além dos primeiros quatro ciclos celulares e não era sincrônica em cada blastômero. Métodos imunocitoquímicos, utilizando microscopia de luz e eletrônica, foram aplicados para a localização de proteínas e de RNA, bem como técnicas para a detecção de DNA. Nesse estudo foi observado que o DNA apresentava-se gradualmente associado com a periferia dos corpos precursores de nucléolos (PNBs) compactos, mas nunca eram encontrados dentro dos PNBs, nos quatro estágios celulares. Nas células embrionárias alguns PNBs exibiam periferia reticulada formando redes de ramificações do componente fibrilar denso (CFD) envolvendo o “corpo residual” (remanescente do PNB) no processo de ativação. O RNA foi primariamente detectado em íntimo contato com o CFD, assim como dentro do “corpo residual”, o qual não se apresentava imunomarcado com os anticorpos utilizados para DNA. Quando observadas na microscopia de luz, as proteínas nucleolares exibiam uma mudança no padrão de distribuição durante a nucleologênese. Em estágios iniciais, pequenos pontos e marcações semelhantes aos PNBs eram distribuídos dentro de todo o núcleo. Em algumas células embrionárias, as proteínas começavam a acumular-se em finas camadas irregulares rodeando os PNBs em processo de ativação. Os autores consideraram que este processo de organização poderia ter uma relação com a redistribuição da cromatina e dos componentes da matriz nuclear/nucleolar, durante a ativação da transcrição do DNA ribossômico (DNAr) localizado na superfície do PNB (BARAN *et al.*, 1997). Em um estudo com pré-implantação de embriões de ratos (BARAN *et al.* 2001), foi verificada a presença da proteína Nopp 140, nas proximidades dos PNBs, desde o primeiro ciclo celular, indicando que essa proteína pode estar relacionada com o início da transcrição de RNAr, e, também, com a reestruturação do nucléolo maduro nestas células.

A presença do nucléolo através da divisão celular é um fenômeno conhecido como “persistência do material nucleolar”. Esse fenômeno já foi observado, em divisões mitóticas, nos dinoflagelados e nas células malignas de mamíferos (WACHTLER & STHAL, 1993). A persistência dos PNBs durante a mitose dá suporte à idéia de que o material nucleolar não se rompe completamente durante a metáfase e anáfase, tendo um significado funcional ainda não muito claro. Pode ser hipotetizado que estes corpos carregam um “primeiro” ou “novo” material ou, ainda, represente uma fonte de RNA nucleolar para as células-filhas enquanto o novo nucléolo está sendo organizado (MELLO, 1995).

Vários estudos têm procurado caracterizar esses corpos pré-nucleolares. Os PNBs tem sido descritos como estruturas fibrogranulares densas de tamanho e morfologias variáveis, as quais contêm RNA e proteínas B23, C23, No38 e que se destacam pela impregnação argêntica (OCHS *et al.*, 1985; FLECHON & KOPECNY, 1998). Também foi verificado que a fusão dos PNBs, no final da telófase, pode ser impedida por tratamentos que empregam, por exemplo, doses baixas de actinomicina-D, resultando em um acúmulo de células com inúmeros PNBs distribuídos aleatoriamente no interior do núcleo interfásico (OCHS *et al.*, 1985).

3.4. O nucléolo durante a meiose

Alguns estudos foram realizados, com o objetivo de acompanhar o ciclo nucleolar durante a divisão meiótica, como os estudos com células espermatogênicas dos túbulos seminíferos de insetos hematófagos da família Triatominae (TARTAROTTI & AZEREDO-OLIVEIRA, 1999; SEVERI-AGUIAR *et al.*, 2002; MORIELLE & AZEREDO-OLIVEIRA, 2004a).

Contudo, há muito ainda a ser entendido na divisão celular meiótica. Apesar de existirem poucos estudos identificando o ciclo nucleolar meiótico, deve ser destacado que os espermátócitos e os oócitos, na prófase I da meiose, apresentam diversas vantagens para o estudo do nucléolo e dos cromossomos organizadores nucleolares. Os cromossomos meióticos na prófase I são bem individualizados e o grau de condensação desses é menor do que os cromossomos metafásicos, facilitando as análises morfológicas, aos microscópios de luz e eletrônico, e citoquímicas. Além disso, deve ser considerado que nas células somáticas a transcrição é suspensa no início do ciclo de condensação cromossômica, mas nas células gaméticas os genes ribossomais são ativos durante a Prófase I (leptóteno, zigóteno e início do paquíteno) nos espermátócitos e, até o diplóteno, nos oócitos (WACHTLER & STHAL, 1993).

TAKEUCHI & TAKEUCHI (1990) observaram que o CFD e o CG desorganizam-se, desestruturando, assim, todo o arranjo nucleolar nas espermátides, durante a espermatogênese em camundongos. Constituintes desses sítios nucleolares (RNAr complexados com RNPs) migram para o citoplasma formando pequenas estruturas denominadas “nuages”. Esses “nuages”, por sua vez, coalescem formando uma organela citoplasmática conhecida como “corpo cromatóide” (CB) (PANIAGUA *et al.*, 1986). Outros autores também sustentam a idéia da origem nucleolar para o CB (COMINGS & OKADA, 1972; ANDERSEN, 1978; ANDONOV, 1990).

O “corpo cromatóide” (CB) é uma organela citoplasmática exclusiva das células espermatogênicas, que tem sido indicada como possuindo um papel relacionado ao estoque de RNA e de proteínas para a diferenciação final dos espermatozóides (SÖDERSTRÖM & PARVINEN, 1976). Análises ultra-estruturais revelaram que o CB possui uma estrutura semelhante a uma esponja, contendo regiões que possuem diferentes densidades (FIGUEROA &

BURZIO, 1998). Vários trabalhos foram realizados com a finalidade de comprovar que o CB é responsável pelo estoque de RNAs e proteínas que serão utilizadas durante o processo de espermiogênese (FIGUEROA & BURZIO, 1998; MORALES & HECHT, 1994; SÖNDERSTRÖM & PARVINEN, 1976; SÖNDERSTRÖM, 1977; MOUSSA *et al.*, 1994; OKO *et al.*, 1996). O CB também já foi observado em associação com algumas organelas citoplasmáticas de espermátides iniciais e em alongamento, como o complexo de Golgi (SÖNDERSTRÖM & PARVINEN, 1976; TANG *et al.*, 1982; ANTON, 1983), indicando que essa organela pode possuir alguma função na formação do acrossomo de espermátides. A associação do CB com mitocôndrias foi observada por FAWCETT *et al.* (1970), porém esses autores determinaram que o CB deveria originar-se de um material inter-mitocondrial, o que não está de acordo com as observações de PARVINEN & PARVINEN (1979) e PARVINEN *et al.* (1997), que sugerem uma origem nuclear para o CB. Essa organela foi, ainda, observada freqüentemente na região da formação da peça intermediária e da cauda do espermatozóide, sugerindo que o CB também pode ter um papel na formação dessas estruturas (SOLEY, 1994).

Estruturas com funções semelhantes à do CB são descritas em outros organismos, como os grânulos polares em insetos (HEGNER, 1911) e o plasma germinal em anfíbios (BOUNOURE, 1934), porém ainda não há estudos relacionando se estas estruturas possuem a mesma origem do CB ou se apenas possuem funções semelhantes.

3.5. Justificativa

Uma abordagem comparativa da espermatogênese em espécies diferentes de roedores, com base em métodos citoquímicos apropriados e na análise ultra-estrutural, torna-se importante e necessária para um melhor acompanhamento da distribuição do material nucleolar nas células meióticas e, também, para entender os mecanismos que governam a reorganização do nucléolo.

Dessa forma, no presente trabalho realizou-se um estudo dos túbulos seminíferos de camundongos, ratos e gerbilos, por meio de diferentes técnicas citoquímicas que identificam proteínas nucleolares e complexos RNA/proteínas (ribonucleoproteínas – RNP) e com a análise ultra-estrutural convencional, dando ênfase à distribuição desses produtos moleculares e à sua função no processo de espermatogênese.

Portanto, tendo como base os argumentos descritos, consideramos que o estudo das etapas da nucleologênese e a relação desse processo com a espermatogênese, utilizando-se roedores como modelos biológicos, são relevantes para ampliar os conhecimentos sobre as alterações celulares que ocorrem na série de eventos característicos na diferenciação de espermátides em espermatozoides.

3.6. Objetivo

O objetivo do presente trabalho foi estudar, comparativamente, a distribuição do material nucleolar (RNAr e proteínas) nas células do epitélio seminífero de três espécies de roedores (*Mus musculus*, *Rattus norvegicus* e *Meriones unguiculatus*), por meio de diversas técnicas citoquímicas e de análise ultra – estrutural.^(*)

(*) O presente trabalho originará dois artigos científicos, intitulados: “Origem e função do Corpo Cromatóide durante a espermatogênese de *Rattus norvegicus* e *Mus musculus*” e “Estudo do Corpo Cromatóide (CB) na espermatogênese de *Meriones unguiculatus*”, que serão submetidos a revistas científicas especializadas. Nesta dissertação apenas o capítulo de resultados está subdividido, conforme os temas indicados para os artigos. Os demais capítulos (introdução, material e método e discussão) são únicos.



4. Material e Método

Foram utilizados ratos^(*) (*Rattus norvegicus*), camundongos^(*) (*Mus musculus*) e gerbilos^(*) (*Meriones unguiculatus*) com idades entre 4 e 8 semanas, pois os animais mais jovens possuem túbulos seminíferos com maior quantidade de espermatogônias e espermátócitos I, enquanto que os animais mais velhos possuem túbulos seminíferos com grande quantidade de células em diferenciação (espermátides), espermatozóides e corpos residuais no lúmen do túbulo seminífero. Os animais foram cedidos pelo biotério do Departamento de Biologia – IBILCE/UNESP – São José do Rio Preto – SP, e receberam cuidados de acordo com as recomendações do *Comitee on Care and Use of Laboratory Animals of The Institute of Laboratory Animals Resources – National Research Council – “Guide for The Care and Use Laboratory Animals”* (NIH – número 80-23, revisado em 1978, reimpresso em 1980). Os roedores foram anestesiados e mortos por meio de inalação de gás carbônico (CO₂), de acordo com a Resolução 714 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV). Os testículos foram removidos^(*) e o material foi fixado em Bouin e Karnovsky e incluído em parafina e historesina (para análises em microscopia de luz). Algumas amostras de testículo foram fixadas em glutaraldeído a 3% e ácido tânico a 0,25% em tampão *Miloning*, pH 7,3, durante 2 horas em temperatura ambiente. Após a lavagem em tampão, os fragmentos foram pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1%, durante 2 horas em geladeira, em seguida, essas amostras foram lavadas em água destilada e desidratadas, em baterias de acetona em ordem crescente de concentração e passaram por uma infiltração em araldite pura por 2 horas, a 37°C (para análises em microscopia eletrônica de transmissão - MET).

Dos fragmentos testiculares incluídos em parafina e historesina, foram obtidos cortes de 3 µm em micrótomo Leica RM 2155. Esses cortes foram submetidos a várias técnicas citoquímicas^(**): *Periodic Acid Schiff* (P.A.S) (RIBEIRO & LIMA, 2000), Hematoxilina-Eosina (HE) (RIBEIRO & LIMA, 2000), Azul de Toluidina (MELLO & VIDAL, 1980), Variante da Concentração Crítica de Eletrólitos (Variante de CEC) (VIDAL & MELLO, 1987; TABOGA, 1997; MELLO, 1997), Impregnação por Íons Prata (HOWELL & BLACK, 1980), Reticulina de Gömöri (TABOGA & VIDAL, 2003), Reação de Feulgen (MELLO & VIDAL, 1980, com modificações), *Fast green* alcalino e ácido (MELLO & VIDAL, 1980). As lâminas foram analisadas em microscópio Olympus BX60, com sistema analisador de imagem *Image Pró-Plus - Média Cybernetics*, Versão 4.5 para Windows. Dos fragmentos testiculares incluídos em araldite, foram obtidos cortes semi-finos e ultra-finos, em ultramicrótomo Leica Ultracut UCT.

(*) Os animais (Apêndice 1) e os testículos foram pesados e as medidas estão representadas no Apêndice 2 (Tabela 1).

(**) Os protocolos das técnicas citoquímicas estão descritos detalhadamente no Apêndice 3.



Os cortes ultrafinos foram coletados em *grids* e, posteriormente, contrastados com acetato de uranila a 2%, por 20 minutos (WATSON, 1958) e, depois, em citrato de chumbo a 2%, em solução de hidróxido de sódio 1N, por 6 minutos (VENABLE & COGGESHALL, 1965). Os resultados das técnicas de microscopia eletrônica foram documentados por eletromicrografias obtidas em microscópio eletrônico de transmissão Leo-Zeiss (Cambridge, UK) 906.



5. Resultados

5.1 – *Rattus novergicus* e *Mus musculus*

Microscopia de Luz

Os túbulos seminíferos de *Rattus novergicus* e *Mus musculus*, incluídos em parafina e historesina foram submetidos a várias técnicas citoquímicas. A técnica de *Periodic Acid Schiff* - P.A.S, foi utilizada para identificação dos estádios dos túbulos seminíferos. Foram analisados túbulos seminíferos entre os estádios I e VII (segundo LEBLOND & CLERMONT, 1952), pois apresentam espermatogônias A e B, espermatócitos I, espermatídes em várias fases de desenvolvimento e espermatozóides maduros, facilitando a observação do ciclo nucleolar durante o processo de espermatogênese. Na visão geral do túbulo seminífero (Figs. 1 e 9 [insets]), observar as espermatídes no início da fase do Capuz Cefálico ou fase Cap (ORSI & FERREIRA, 1978), ou seja, fase de surgimento do grânulo acrossomal na superfície nuclear (setas grandes - Figs. 1 e 9). A técnica de P.A.S permitiu observar, ainda, uma marcação basófila próxima ao núcleo, geralmente ao lado do local onde está havendo a formação do acrossomo (asteriscos - Figs. 1 e 9).

A técnica de Hematoxilina-Eosina (HE) permitiu uma análise geral do túbulo seminífero (Figs. 2 e 10 [insets]) e pode-se notar uma marcação basófila no citoplasma das espermatídes iniciais (cabeças de seta, Figs. 2 e 10), provavelmente na região de formação do grânulo pré-acrossomal.

Com a aplicação da técnica de coloração pelo Azul de Toluidina (AT, pH 4,0) foi destacada nas células dos túbulos seminíferos, uma intensa metacromasia (coloração: azul a roxo) nas estruturas nucleares, como, eucromatina, heterocromatina, nucléolo e cromossomos (setas - Fig.3 [inset b] e Fig. 11 [inset a]). A técnica de coloração pelo Azul de Toluidina foi utilizada como controle da técnica variante da Concentração Eletrolítica Crítica (CEC), onde foram destacadas diversas regiões com diferentes graus de intensidade de metacromasia. As áreas nucleolares das espermatogônias e espermatócitos I foram destacadas em azul, já nas espermatídes a marcação foi fraca ou ausente (setas grandes - Fig. 3 e inset a; Fig. 11 e inset b). A cromatina de todas as células do epitélio germinativo apresentou a coloração verde, em diferentes tons, variando de acordo com o grau de compactação, e nos citoplasmas foi possível observar uma intensa basofilia. Os “corpúsculos residuais” ou “esferas cromatofílicas” (restos citoplasmáticos), próximos à luz dos túbulos ficaram intensamente metacromáticos (cabeças de setas - Fig. 3 e inset a; Fig. 11 e inset b).

A técnica de Impregnação por Íons Prata (AgNOR), evidenciou as regiões nucleolares das diferentes células do túbulo seminífero. Uma visão geral do túbulo foi obtida, onde se pode

observar a forte impregnação pelos íons prata das regiões nucleolares em todas as células do túbulo, porém nas espermatídes iniciais, a região nucleolar apresentou-se fragmentada (setas grandes - Figs. 4 e 12). Em fases mais adiantadas da espermiogênese, um pequeno arco, destacado pela prata, foi notado nas espermatídes (cabeças de seta - Figs. 4 e 12 [insets]).

A impregnação argêntica, promovida pela solução de prata amoniacal, na técnica de Reticulina de Gömöri destacou, em negro, as fibras reticulares da região basal do túbulo e, em marrom-caramelado, o citoplasma e a cromatina das células espermatogênicas. As áreas nucleolares dos espermátócitos e das espermatídes, nas fases iniciais da diferenciação celular, foram fortemente impregnadas pela prata amoniacal. Podem ser observadas as áreas nucleolares fragmentadas nas espermatídes iniciais (setas grandes - Figs. 5 e 13). No detalhe das espermatídes iniciais pode ser notada uma região de material fortemente impregnado pela prata em uma porção da superfície nuclear, e, também, uma região clara ligada às áreas nucleolares, indicando a presença de heterocromatina (cabeças de seta - Figs. 5 e 13 [insets]). Essa técnica destacou também os “corpos residuais” ou “esferas cromatofílicas” no lúmen do túbulo seminífero (asteriscos - Figs. 5 e 13). Apesar da técnica de Reticulina de Gömöri ser específica para marcação de fibras reticulares do tecido conjuntivo e não ser utilizada rotineiramente para estudos de áreas nucleolares, a mesma se mostrou eficiente na realização deste trabalho devido à afinidade de alguns componentes nucleolares pelos corantes utilizados, e, assim, essa técnica foi utilizada como um complemento aos resultados obtidos com a Impregnação por Íons Prata (AgNOR).

Os túbulos seminíferos submetidos à técnica citoquímica específica para DNA (Reação de Feulgen) revelou todos os núcleos das células em cor púrpura, variando em intensidade de acordo com o grau de ploidia e de compactação da cromatina. Dessa forma, as espermatogônias periféricas e as espermatídes próximas à luz do túbulo apresentaram-se fortemente coradas e as demais células do túbulo (células de Sertoli, espermátócitos e espermatídes iniciais) tiveram a cromatina levemente corada em rosa, sendo possível observar as regiões heterocromáticas destacadas mais fortemente e envoltas por halos claros sugestivos da presença de material nucleolar (setas e cabeças de seta - Fig. 6 e inset; Fig. 14 e inset b). Pode ser notado que as áreas claras são melhor observadas nos espermátócitos I (setas) do que nas espermatídes (cabeças de seta). Não foi observada a marcação dos “corpúsculos residuais”, proveniente das fases finais da diferenciação das espermatídes (restos citoplasmáticos), na luz do túbulo, por meio da aplicação da Reação de Feulgen (asterisco - Fig. 6 e Fig. 14 [inset a]).

A utilização da técnica de *fast green* ácido demonstrou uma intensa marcação no núcleo e citoplasma de todas as células do epitélio germinativo, inclusive nos flagelos dos espermatozóides. Essa técnica destacou também, uma forte resposta positiva nos “corpos

residuais” ou “esferas cromatofílicas”, no lúmen do túbulo seminífero (setas grandes - Figs.7 e 15). Já a técnica de *fast green* alcalino, evidenciou apenas os núcleos das células da linhagem germinativa, sendo que, os núcleos dos espermatozóides maduros, próximos ao lúmen do túbulo, foram fortemente corados. Porém, não houve a marcação de “corpos residuais” ou “esferas cromatofílicas”, no lúmen do túbulo seminífero (setas grandes - Figs. 8 e 16).

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Os túbulos seminíferos de *Rattus novergicus* e *Mus musculus*, incluídos em araldite, foram submetidos a contrastação para microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Os resultados obtidos em *Rattus novergicus* estão descritos nas figuras 17 a 23. Na figura 17, pode-se observar a ultra-estrutura de um espermatócito I, onde está sendo iniciada a formação de “nuages” no citoplasma celular (seta). É observado também um material semelhante, provavelmente de origem ribonucleoprotéica (RNP), próximo a um complexo sinaptonêmico (cabeça de seta). Um detalhe de um “corpo cromatóide” (CB), em uma espermátide inicial, está demonstrado na figura 18 (seta). A estrutura apresenta um grande volume, demonstrando uma ampla migração de material nuclear para o citoplasma, neste estágio. Na figura 19, nota-se o CB ligado a algumas vesículas, provavelmente originárias do Complexo de Golgi (setas). Durante a formação do acrossomo, demonstrada na figura 20, é possível verificar uma íntima associação entre o Complexo de Golgi (seta), o “corpo cromatóide” (cabeça de seta) e o acrossomo (asterisco), que está sendo formado em uma espermátide inicial. Em espermátides em fase de alongamento (Figs. 21 e 22) pode ser notada uma migração do “corpo cromatóide” para regiões próximas ao axonema (setas), local da formação do flagelo do espermatozóide. Na figura 23, observa-se a eliminação desse material, juntamente com restos citoplasmáticos, provenientes da diferenciação espermática, no lúmen do túbulo seminífero (setas).

Os resultados obtidos em *Mus musculus* estão descritos nas figuras 24 a 31. Na figura 24, pode ser observada a ultra-estrutura de um espermatócito I (paquíteno), onde um material nuclear, provavelmente composto de ribonucleoproteínas (RNPs), está em íntima associação com um Complexo Sinaptonêmico (CS) (seta). É possível notar, também, que em outra região do núcleo está sendo iniciada a migração de um material semelhante para o citoplasma celular, formando “nuages” (cabeça de seta). Um detalhe da migração do “corpo cromatóide” (CB), através de pontes citoplasmáticas existentes entre duas espermátides iniciais, é observado na figura 25 (ponte citoplasmática – seta e CB – cabeça de seta). Na figura 26, podem ser verificadas algumas vesículas, sendo emitidas do Complexo de Golgi (seta) e migrando para regiões próximas ao “corpo cromatóide” (cabeça de seta). Nas figuras 27 e 28, nota-se, no citoplasma de espermátides iniciais, a união entre o “corpo cromatóide” e aglomerados de mitocôndrias (setas). Ainda na figura 28, é

possível observar, também, a ligação do “corpo cromatóide” com vesículas, provavelmente originárias do complexo de Golgi. Em espermátides em fase de alongamento (Fig. 29) é possível notar uma migração do “corpo cromatóide” para regiões próximas ao axonema (seta), onde ocorrerá a formação do flagelo do espermatozóide. Nas figuras 30 e 31, observa-se a eliminação do material proveniente do “corpo cromatóide”, no lúmen do túbulo seminífero (setas), sob a forma de estruturas denominadas “esferas cromatofílicas”.



Figuras 1 – 8: Cortes histológicos de túbulos seminíferos de *Rattus norvegicus*.

Fig. 1: Periodic Acid Schiff (P.A.S.) – Observar as espermátides no início da fase do Capuz Cefálico (setas grandes) e marcações basófilas no citoplasma das espermátides, indicando o local de formação do “corpo cromatóide” (CB) (asteriscos). Inset: Visão geral do túbulo seminífero.

Fig. 2: Hematoxilina-Eosina (HE) – Observar as espermátides em maturação com uma marcação basófila no citoplasma, indicando a formação do grânulo pré-acrossomal (cabeças de seta). Inset: Visão geral do túbulo seminífero.

Fig. 3/Inset a: Variante da Concentração Crítica de Eletrólitos (CEC) – Observar a metacromasia em diferentes graus de intensidade nos corpúsculos residuais (cabeças de seta) e nas áreas nucleolares de espermatogônias, espermatócitos I e espermátides (setas grandes). A cromatina das células do epitélio germinativo aparece esverdeada. **Inset b:** Azul de Toluidina em pH 4,0 – Observar a metacromasia acentuada de todas as células do epitélio germinativo (células de Sertoli, espermatogônias, espermatócitos e espermátides).

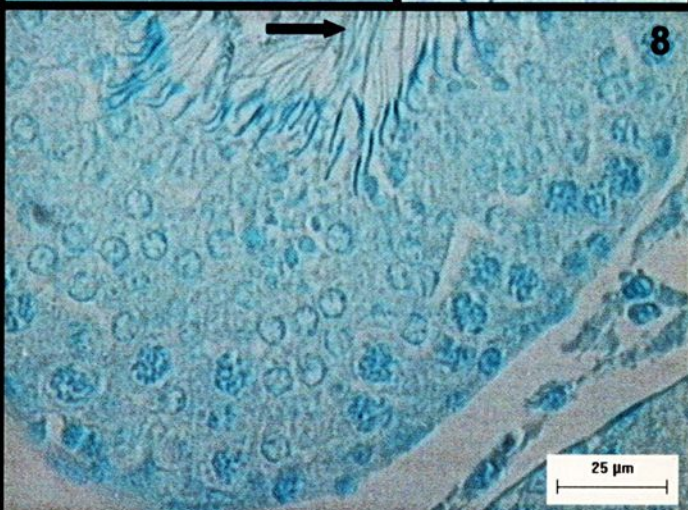
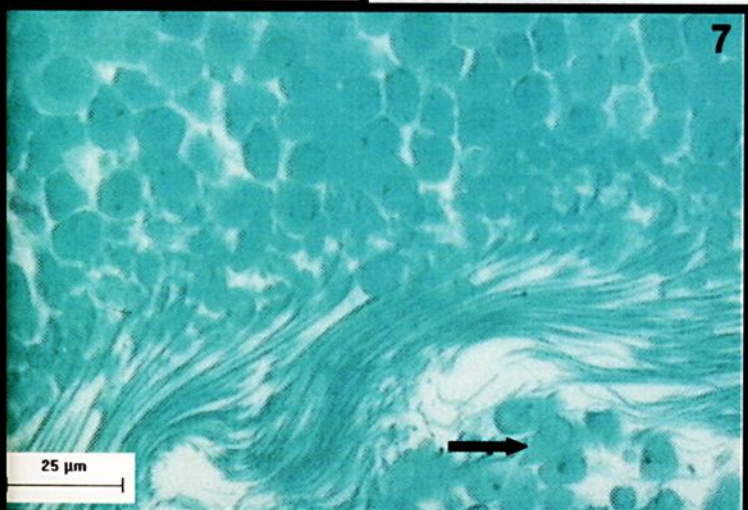
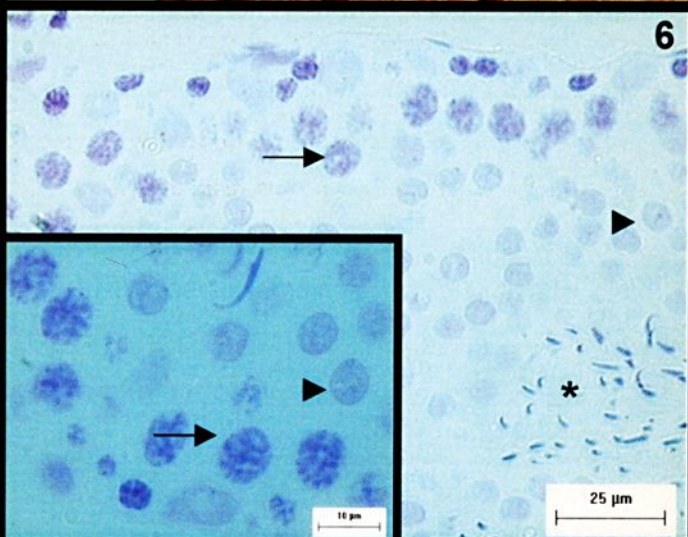
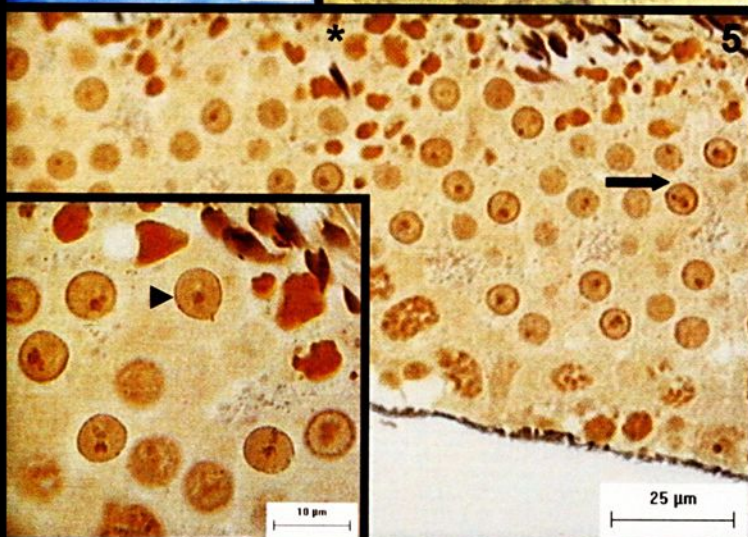
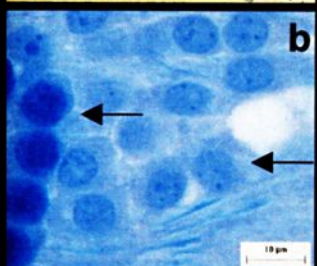
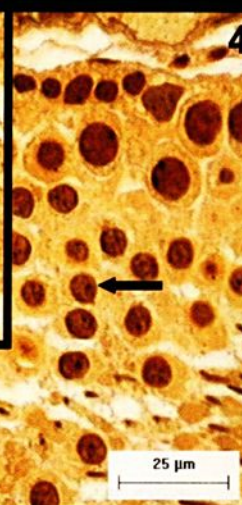
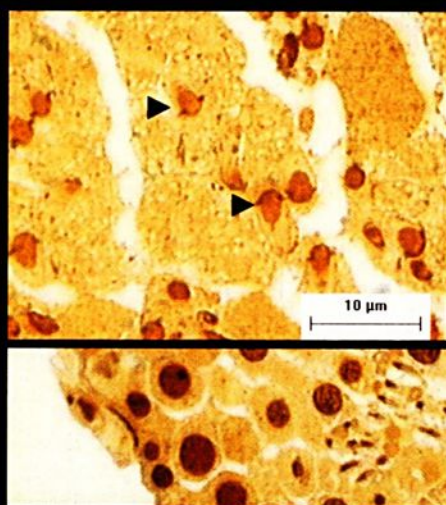
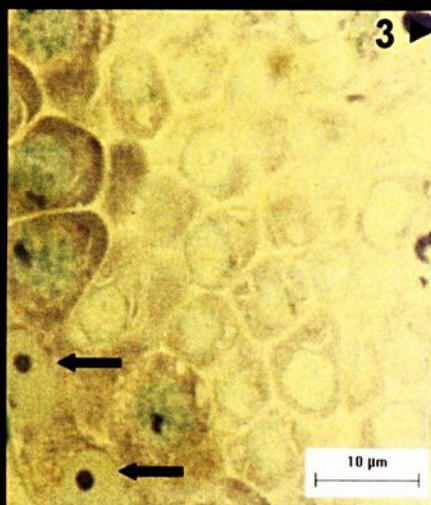
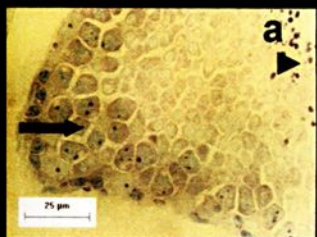
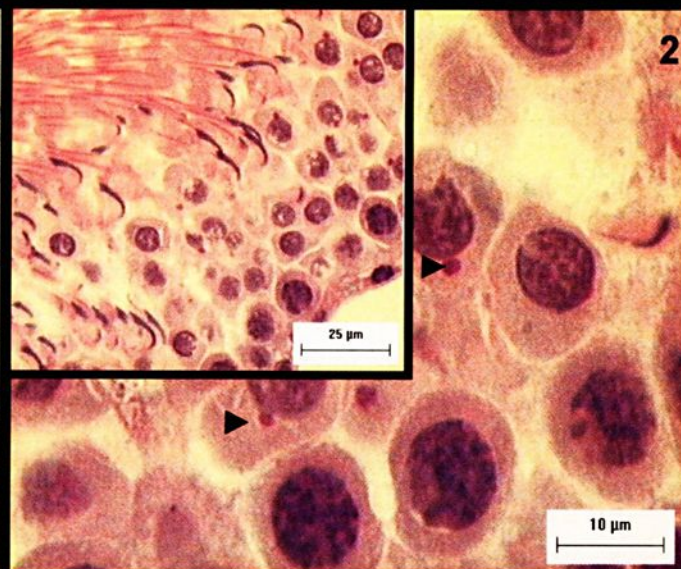
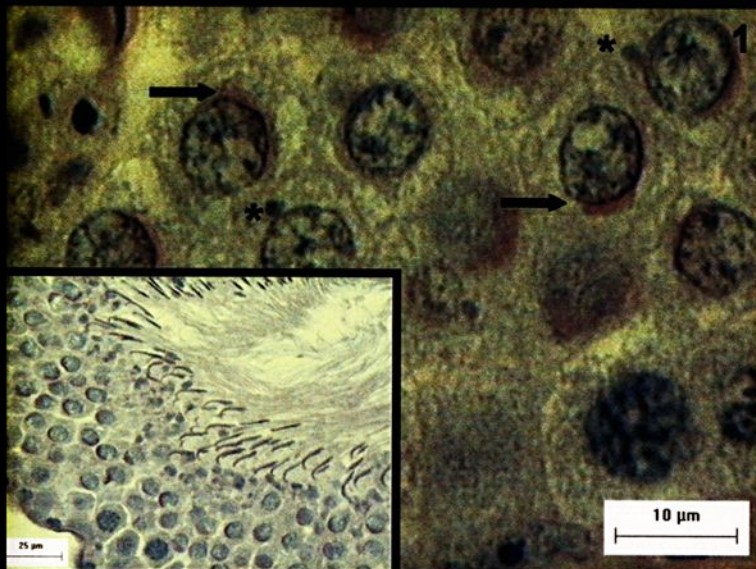
Fig. 4: Impregnação por Íons Prata (AgNOR) – Observar a fragmentação do nucléolo no núcleo de espermátides iniciais (seta grande). Inset: Notar as espermátides em alongamento, com um pequeno arco impregnado pelos íons prata (cabeças de seta).

Fig. 5: Reticulina de Gömöri – Observar a fragmentação do nucléolo no núcleo de espermátides iniciais (seta grande) e a marcação de corpos residuais no lúmen do túbulo seminífero (asterisco). Inset: Notar a marcação nucleolar associada a uma área clara (indicando a presença de heterocromatina) e a presença de um material impregnado pela prata amoniacal ao redor do núcleo das espermátides iniciais (cabeça de seta).

Fig. 6/Inset: Reação de Feulgen – Núcleos de espermatócitos I (setas) e espermátides (cabeças de seta) com regiões heterocromáticas evidenciadas, próximas à halos claros, sugerindo a presença do nucléolo. Observar que esta marcação é mais evidente nos espermatócitos, indicando uma diminuição do volume nucleolar nas espermátides. Notar a ausência da marcação de corpos residuais no lúmen do túbulo seminífero (asterisco).

Fig. 7: *Fast green* ácido – Observar a intensa marcação no núcleo e citoplasma de todas as células do epitélio germinativo. Notar a marcação de corpos residuais no lúmen do túbulo seminífero (seta grande).

Fig. 8: *Fast green* alcalino – Notar a marcação no núcleo das células espermatogênicas, principalmente uma intensa marcação no núcleo de espermatozóides maduros. Observar a ausência de marcação de corpos residuais no lúmen do túbulo seminífero (seta grande).



Figuras 9 – 16: Cortes histológicos de túbulos seminíferos de *Mus musculus*.

Fig. 9: Periodic Acid Schiff (P.A.S.) – Observar as espermátides no início da fase do Capuz Cefálico (setas grandes) e marcações basófilas no citoplasma das espermátides, indicando o local de formação do “corpo cromatóide” (CB) (asteriscos). Inset: Visão geral do túbulo seminífero.

Fig. 10: Hematoxilina-Eosina (HE) – Observar as espermátides em maturação com uma marcação basófila no citoplasma, indicando a formação do grânulo pré-acrossomal (cabeças de seta). Inset: Visão geral do túbulo seminífero.

Fig. 11/Inset b: Variante da Concentração Crítica de Eletrólitos (CEC) – Observar a metacromasia em diferentes graus de intensidade nos corpúsculos residuais (cabeças de seta) e nas áreas nucleolares de espermatogônias, espermatócitos I e espermátides (setas grandes). A cromatina das células do epitélio germinativo aparece esverdeada. **Inset a:** Azul de Toluidina em pH 4,0 – Observar a metacromasia acentuada de todas as células do epitélio germinativo (células de Sertoli, espermatogônias, espermatócitos e espermátides).

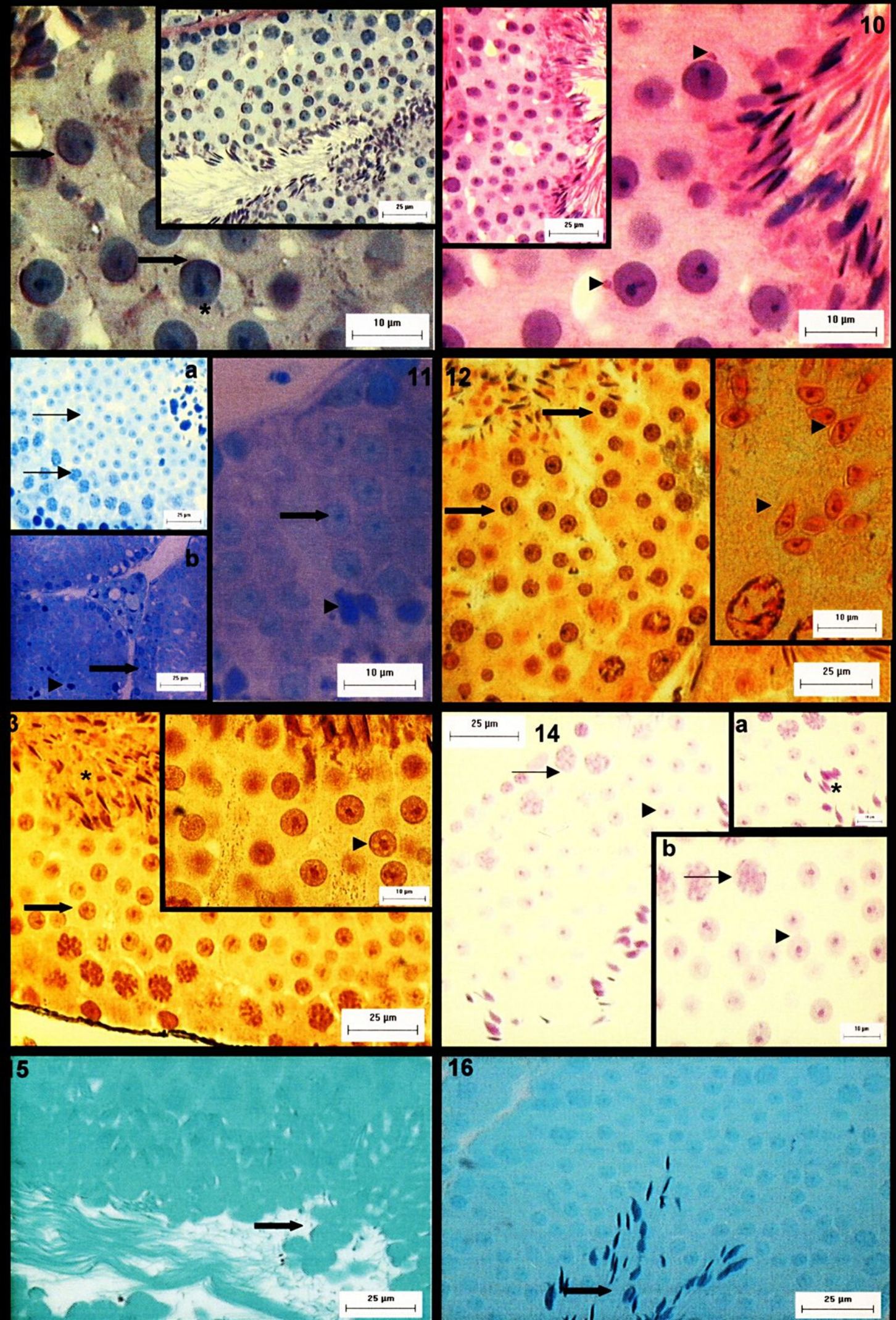
Fig. 12: Impregnação por Íons Prata (AgNOR) – Observar a fragmentação do nucléolo no núcleo de espermátides iniciais (setas grandes). Inset: Notar as espermátides em alongamento, com um pequeno arco impregnado pelos íons prata e fragmentos do material nucleolar no interior do núcleo (cabeças de seta).

Fig. 13: Reticulina de Gömöri – Observar a fragmentação do nucléolo no núcleo de espermátides iniciais (seta grande) e a marcação de corpos residuais no lúmen do túbulo seminífero (asterisco). Inset: Notar a marcação nucleolar associada a uma área clara (indicando a presença de heterocromatina) e a presença de um material impregnado pela prata amoniacal ao redor do núcleo das espermátides iniciais (cabeça de seta).

Fig. 14/Inset b: Reação de Feulgen – Núcleos de espermatócitos I (setas) e espermátides (cabeças de seta) com regiões heterocromáticas evidenciadas próximas à halos claros, sugerindo a presença do nucléolo. Observar que esta marcação é mais evidente nos espermatócitos, indicando uma diminuição no volume nucleolar nas espermátides. **Inset a:** Notar a ausência da marcação dos corpos residuais no lúmen do túbulo seminífero (asterisco).

Fig. 15: *Fast green* ácido – Observar a intensa marcação no núcleo e citoplasma de todas as células do epitélio germinativo. Notar a marcação de corpos residuais no lúmen do túbulo seminífero (seta grande).

Fig. 16: *Fast green* alcalino – Notar a marcação no núcleo das células espermatogênicas, principalmente uma intensa marcação no núcleo de espermatozóides maduros. Observar a ausência de marcação de corpos residuais no lúmen do túbulo seminífero (seta grande).

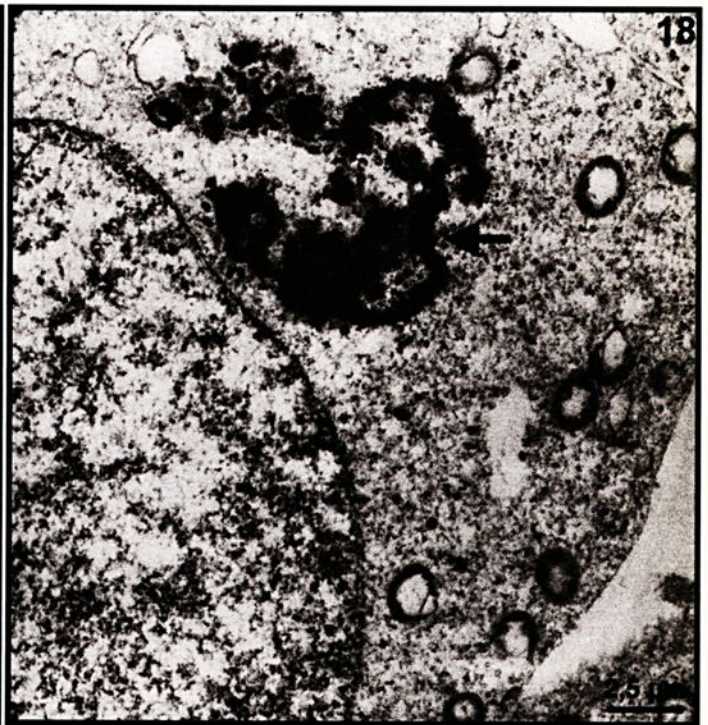


Figuras 17 - 19: Ultra-estrutura de túbulos seminíferos de *Rattus norvegicus*.

Fig. 17: Observar a formação de “nuages” no citoplasma de um espermatócito I (seta) e notar o material próximo a um complexo sinaptonêmico, provavelmente constituído por ribonucleoproteínas (RNPs) (cabeça de seta).

Fig. 18: Detalhe do “corpo cromatóide” (CB), formado pela reunião de “nuages” que migraram do núcleo para o citoplasma, em uma espermátide inicial. Observar o aspecto reticulado da estrutura da organela, que contém regiões de diferentes densidades (seta).

Fig. 19: Em uma espermátide inicial, notar o CB próximo ao núcleo e rodeado por vesículas, provavelmente vindas do complexo de Golgi (setas).



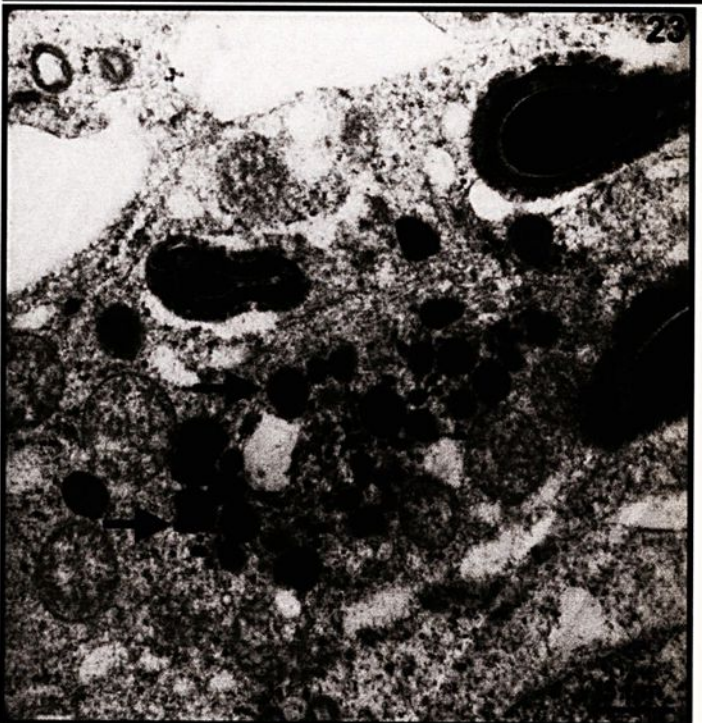
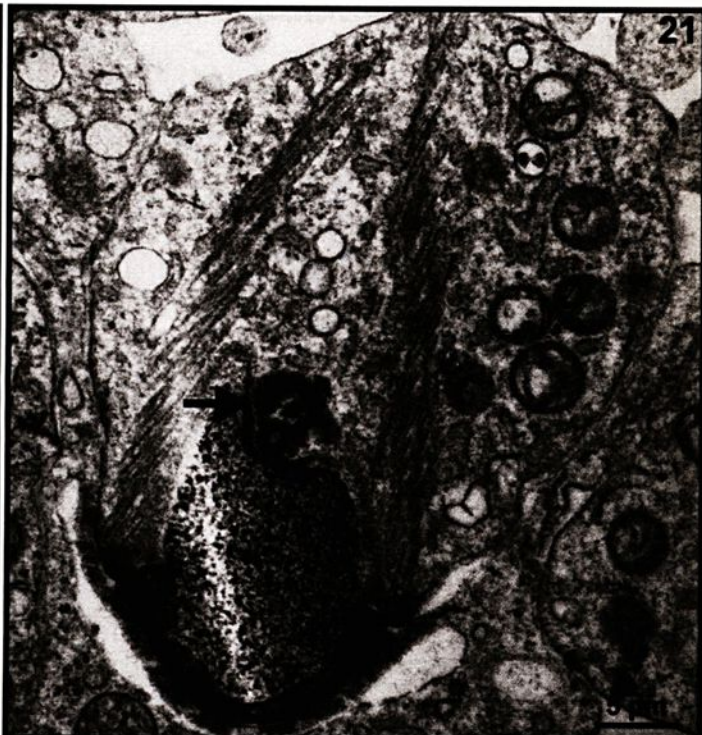
Figuras 20 - 23: Ultra-estrutura de túbulos seminíferos de *Rattus norvegicus*.

Fig. 20: Observar a relação entre o material proveniente do “corpo cromatóide” (CB) (cabeça de seta), o complexo de Golgi (seta) e o sistema acrossômico em formação (asterisco), indicando que o CB pode estar relacionado com a formação do acrossomo em espermátides.

Fig. 21: Detalhe de uma espermátide em alongamento, onde é possível observar que o CB migrou para o pólo caudal do núcleo e está localizado ao redor do axonema, onde serão formados a peça intermediária e flagelo do espermatozóide (seta).

Fig. 22: Espermátide em alongamento em um estágio mais avançado (devido ao maior grau de compactação do núcleo), revelando a presença do CB nas regiões próximas ao axonema (seta).

Fig. 23: Detalhe dos corpos residuais, que são eliminados no lúmen do túbulo seminífero, constituídos por materiais compostos por ribonucleoproteínas (RNPs), provavelmente originados da eliminação do CB (setas).



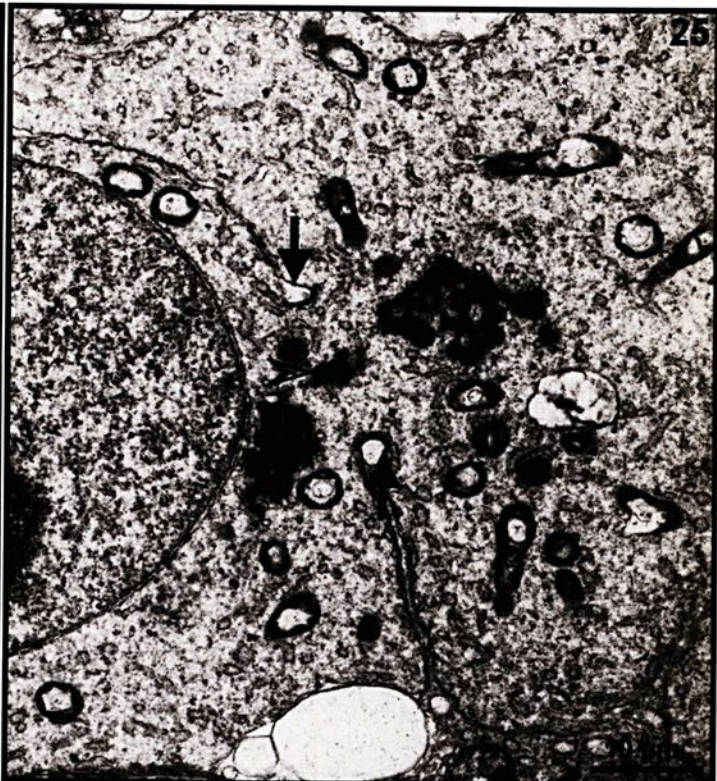
Figuras 24 - 27: Ultra-estrutura de túbulos seminíferos de *Mus musculus*.

Fig. 24: Observar a formação de “nuages” no citoplasma de um espermatócito I (cabeça de seta) e notar o material no núcleo, próximo a um complexo sinaptonêmico, provavelmente constituído por ribonucleoproteínas (RNPs) (seta).

Fig. 25: Notar a ponte citoplasmática entre duas espermátides iniciais (setas) e observar que o movimento do “corpo cromatóide” (CB) que ocorre através dessa ponte (cabeça de seta).

Fig. 26: Detalhe de uma espermátide inicial com o complexo do Golgi (seta) emitindo vesículas que se deslocam para regiões próximas ao CB (cabeça de seta).

Fig. 27: Observar a migração de “nuages” do núcleo para o citoplasma em uma espermátide inicial, e a deposição desse material próximo a um aglomerado de mitocôndrias (seta).

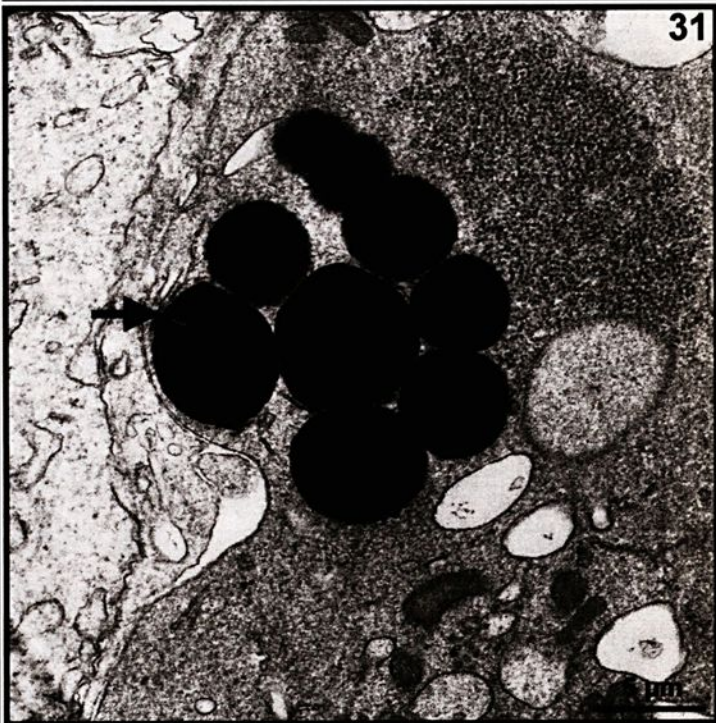
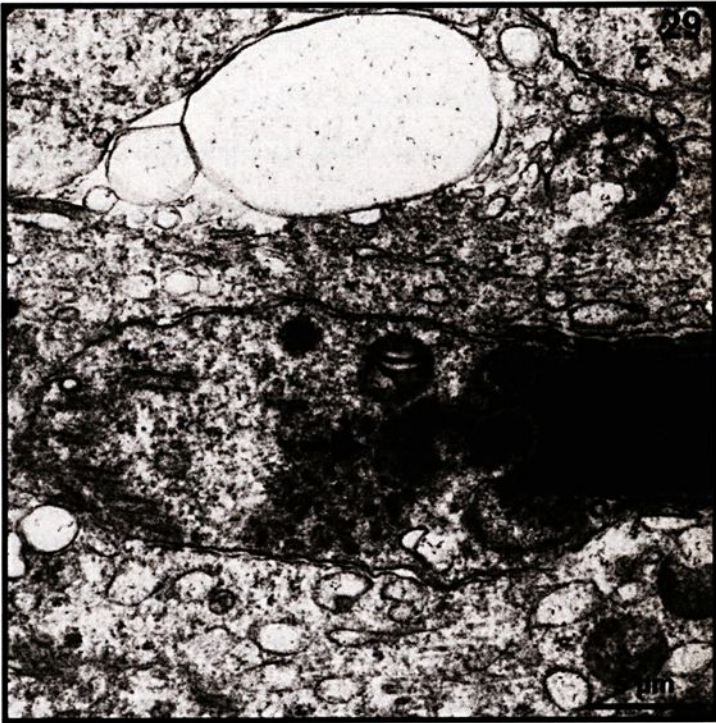


Figuras 28 - 31: Ultra-estrutura de túbulos seminíferos de *Mus musculus*.

Fig. 28: Detalhe de um “corpo cromatóide” (CB) no citoplasma de uma espermatíde inicial. Notar que o CB encontra-se rodeado por vesículas provavelmente emitidas pelo complexo de Golgi (setas), localizado próximo a um conjunto de mitocôndrias.

Fig. 29: Espermatíde em alongamento em um estágio mais avançado (devido ao maior grau de compactação do núcleo). Observar que o CB migrou para o pólo caudal do núcleo e está localizado ao redor do axonema, onde serão formados a peça intermediária e o flagelo do espermatozóide (seta).

Fig. 30 e 31: Detalhe dos corpos residuais, contendo esferas cromatofílicas, que são eliminados no lúmen do túbulo seminífero, constituídos por materiais compostos por ribonucleoproteínas (RNPs), provavelmente originados da eliminação do CB (setas).



5.2 – *Meriones unguiculatus*

Microscopia de Luz

Os túbulos seminíferos de *Meriones unguiculatus*, incluídos em parafina e historesina foram submetidos a várias técnicas citoquímicas. A técnica de *Periodic Acid Schiff* - P.A.S, foi utilizada para identificação dos estádios dos túbulos seminíferos. Foram analisados túbulos seminíferos entre os estádios I a VI (segundo SEGATELLI *et al.*, 2000), pois apresentam espermatogônias A e B, espermatócitos I, espermatídes em várias fases de desenvolvimento e espermatozóides maduros, facilitando a observação do ciclo nucleolar durante o processo de espermatogênese. Visão geral do túbulo seminífero (Fig. 1 [inset]), observar as espermatídes em estágio 5 de desenvolvimento, ou seja, fase de surgimento do grânulo acrossomal na superfície nuclear (SEGATELLI *et al.*, 2000) (setas grandes - Fig. 1). A técnica de P.A.S. permitiu observar, ainda, uma marcação basófila próxima ao núcleo, geralmente ao lado do local onde está havendo a formação do acrossomo (asterisco - Fig. 1).

Utilizando-se a técnica de Hematoxilina-Eosina - HE, foi obtida uma visão geral do túbulo seminífero (Fig. 2 [inset]) e pode-se notar uma marcação basófila no citoplasma das espermatídes iniciais (cabeças de seta - Fig. 2), na região de formação do grânulo pré-acrossomal.

A aplicação da técnica de coloração pelo Azul de Toluidina (AT, pH 4,0) permitiu destacar nas células dos túbulos seminíferos uma intensa metacromasia (coloração: azul a roxo) nas estruturas nucleares, como, eucromatina, heterocromatina, nucléolo e cromossomos (setas - Fig.3 [inset a]). A técnica de coloração pelo Azul de Toluidina foi utilizada como controle da técnica variante da Concentração Eletrolítica Crítica (CEC), onde foram destacadas diversas regiões com diferentes graus de intensidade de metacromasia. As áreas nucleolares das espermatogônias e dos espermatócitos I foram destacadas em azul, o que não ocorreu nas espermatídes (setas grandes - Fig. 3 e inset b). A cromatina de todas as células do epitélio germinativo apresentou a coloração verde, em diferentes tons, variando de acordo com o grau de compactação e em todas as células foi possível observar uma intensa basofilia citoplasmática. Os “corpúsculos residuais” ou “esferas cromatofílicas” (restos citoplasmáticos), próximos à luz dos túbulos ficaram intensamente metacromáticos (cabeças de setas - Fig. 3 e inset b).

A técnica de Impregnação por Íons Prata (AgNOR), evidenciou as regiões nucleolares das diferentes células do túbulo seminífero. Uma visão geral do túbulo foi obtida, onde se pode observar a forte impregnação pelos íons prata nas regiões nucleolares em todas as células do túbulo (Fig. 4 [inset a]), porém nas espermatídes iniciais, a região nucleolar apresentou-se fragmentada e foi possível observar um material impregnado por íons prata ao redor do núcleo (setas grandes - Fig. 4). Em fases mais adiantadas da espermiogênese, um pequeno arco, destacado pela prata, foi notado nas espermatídes (cabeças de seta - Fig. 4 [inset b]).

A impregnação argêntica, promovida pela solução de prata amoniacal, na técnica de Reticulina de Gömöri destacou em marrom-caramelado o citoplasma e a cromatina das células espermatogênicas. As áreas nucleolares dos espermatócitos e das espermátides, nas fases iniciais da diferenciação celular, foram mais fortemente impregnadas pela prata. Observar na figura 5 as áreas nucleolares fragmentadas nas espermátides iniciais. Notar, no detalhe (inset) das espermátides iniciais, uma região de material fortemente impregnado pela prata em uma porção da superfície nuclear, e, também, uma região clara ligada às áreas nucleolares, indicando a presença de heterocromatina (cabeças de seta - Fig. 5 - inset). Essa técnica destacou também os “corpos residuais” ou “esferas cromatofílicas” no lúmen do túbulo seminífero (asterisco - Fig. 5).

Os túbulos seminíferos submetidos à técnica citoquímica específica para DNA (Reação de Feulgen) revelou todos os núcleos das células em cor púrpura, variando em intensidade de acordo com o grau de ploidia e de compactação da cromatina. Dessa forma, as espermatogônias periféricas e as espermátides próximas à luz do túbulo apresentaram-se fortemente coradas e as demais células do túbulo (células de Sertoli, espermatócitos e espermátides iniciais) tiveram a cromatina levemente corada em rosa, sendo possível observar as regiões heterocromáticas destacadas mais fortemente e envoltas por halos claros sugestivos da presença de material nucleolar (setas e cabeças de seta - Fig. 6 e inset). Pode ser notado que as áreas claras são melhor observadas nos espermatócitos I (setas) do que nas espermátides (cabeças de seta). Não foi observada a marcação dos “corpúsculos residuais”, proveniente das fases finais da diferenciação das espermátides (restos citoplasmáticos), na luz do túbulo, por meio da aplicação da Reação de Feulgen (asterisco - Fig. 6 [inset]).

A utilização da técnica de *fast green* ácido demonstrou uma intensa marcação no núcleo e no citoplasma de todas as células do epitélio germinativo, inclusive nos flagelos dos espermatozoides. Essa técnica demonstrou também, uma forte impregnação nos “corpos residuais”, no lúmen do túbulo seminífero (setas grandes - Fig. 7). Já a técnica de *fast green* alcalino, evidenciou apenas os núcleos das células testiculares, sendo que, os núcleos dos espermatozoides maduros, próximos ao lúmen do túbulo, foram fortemente corados. Porém, não houve a marcação de “corpos residuais”, no lúmen do túbulo seminífero (setas grandes - Fig. 8).

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Os túbulos seminíferos de *Meriones unguiculatus*, incluídos em araldite, foram submetidos a contrastação para MET.

Os resultados obtidos estão descritos nas figuras 9 a 17. Na figura 9, pode-se observar a ultra-estrutura de um espermatócito I, onde está sendo iniciada a formação de “nuages” no citoplasma celular (seta). Observa-se também, um material semelhante, provavelmente de origem ribonucleoprotéica (RNP), no interior do núcleo celular (cabeça de seta). Um detalhe do “corpo

cromatóide” (CB), em uma espermatíde inicial está demonstrado na figura 10 (seta). A estrutura apresenta um grande volume, indicando que neste estágio ocorre uma ampla migração desse tipo de material nuclear para o citoplasma. Na figura 11, pode ser constatado o momento da migração do material nuclear, através do complexo de poro, para o citoplasma da espermatíde, fornecendo material para a formação do “corpo cromatóide” (CB) (seta). Nas figuras 12 e 13, pode-se observar a associação entre o “corpo cromatóide” e os aglomerados de mitocôndrias. Na figura 13 também é possível observar a associação entre o “corpo cromatóide” e pequenas vesículas, provavelmente originárias do complexo de Golgi (setas). Um detalhe da associação entre o “corpo cromatóide” e alguns depósitos de gordura, no citoplasma de espermatídes tardias, pode ser constatado na figura 14 (seta). Em espermatídes em fase de alongamento (Figs. 15 e 16) foi possível notar a presença de fragmentos de material RNP no núcleo celular (setas) e, também, na região envolvendo o acrossomo (cabeça de seta). Na figura 17, constata-se uma relação entre o “corpo cromatóide” e a região do ânulo (setas).

Figuras 1 – 8: Cortes histológicos de túbulos seminíferos de *Meriones unguiculatus*.

Fig. 1: Periodic Acid Schiff (P.A.S.) – Observar as espermátides no início da fase do Capuz Cefálico (setas grandes) e marcações basófilas no citoplasma das espermátides, indicando o local de formação do “corpo cromatóide” (CB) (asterisco). Inset: Visão geral do túbulo seminífero.

Fig. 2: Hematoxilina-Eosina (HE) – Observar as espermátides em maturação com uma marcação basófila no citoplasma, indicando a formação do grânulo pré-acrossomal (cabeças de seta). Inset: Visão geral do túbulo seminífero.

Fig. 3/Inset b: Variante da Concentração Crítica de Eletrólitos (CEC) – Observar a metacromasia em diferentes graus de intensidade nos corpúsculos residuais (cabeças de seta) e nas áreas nucleolares de espermatogônias, espermátocitos I e espermátides (setas grandes). A cromatina das células do epitélio germinativo aparece esverdeada. **Inset a:** Azul de Toluidina em pH 4,0 – Observar a metacromasia acentuada de todas as células do epitélio germinativo (células de Sertoli, espermatogônias, espermátocitos e espermátides).

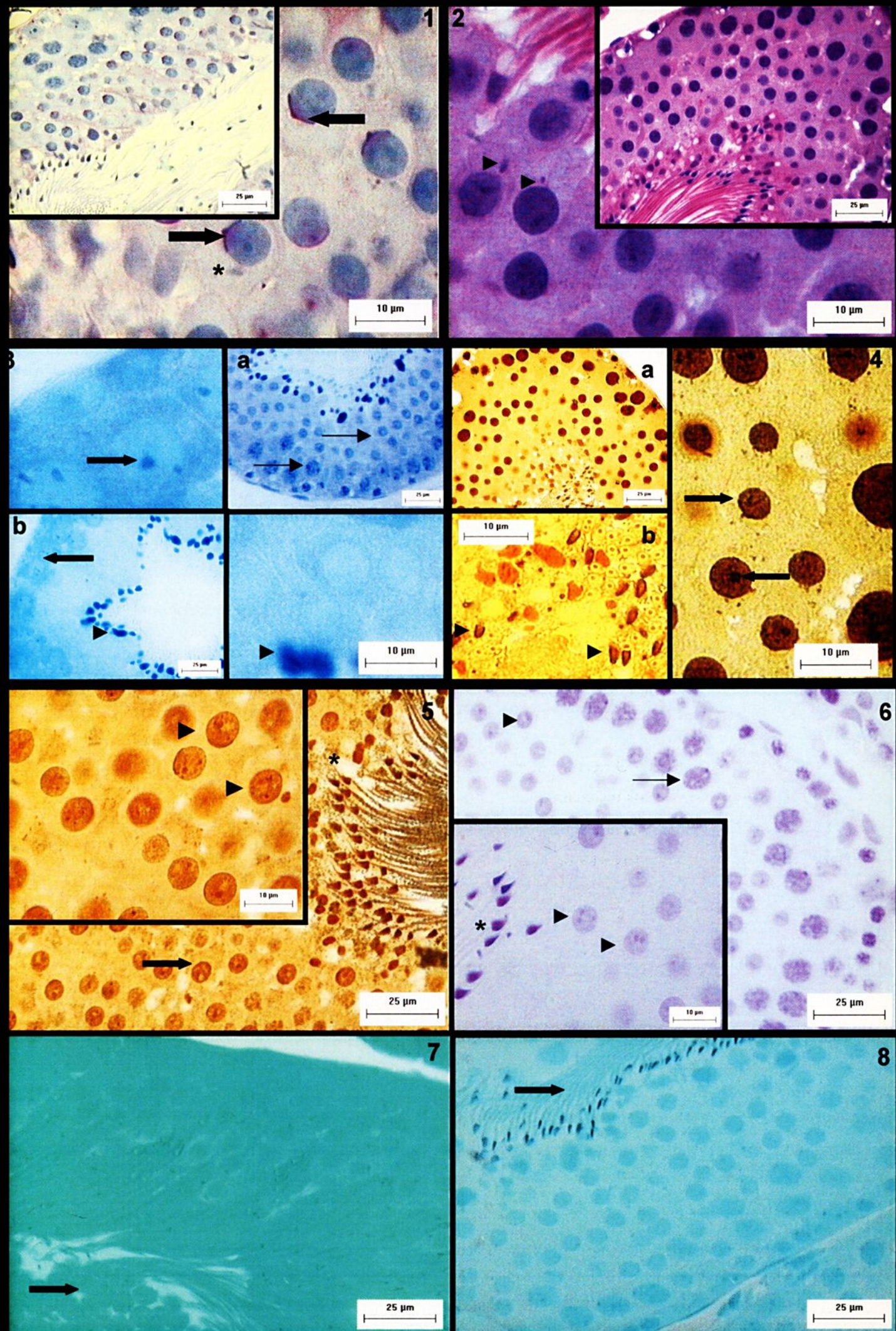
Fig. 4: Impregnação por Íons Prata (AgNOR) – Observar a fragmentação do nucléolo no núcleo de espermátides iniciais (setas grandes). **Inset a:** Visão geral do túbulo seminífero impregnados pelos íons prata. **Inset b:** notar as espermátides em alongamento, com um pequeno arco impregnado pelos íons prata (cabeças de seta).

Fig. 5: Reticulina de Gömöri – Observar a fragmentação do nucléolo no núcleo de espermátides iniciais (seta grande) e a marcação de corpos residuais no lúmen do túbulo seminífero (asterisco). Inset: notar a marcação nucleolar associada a uma área clara (indicando a presença de heterocromatina) e a presença de um material impregnado pela prata amoniacal ao redor do núcleo das espermátides iniciais (cabeça de seta).

Fig. 6: Reação de Feulgen – Núcleos de espermátocitos I (setas) e espermátides (cabeças de seta) com regiões heterocromáticas evidenciadas próximas à halos claros, sugerindo a presença do nucléolo. Observar que esta marcação é mais evidente nos espermátocitos, indicando uma diminuição no volume nucleolar nas espermátides. Inset: Notar a ausência da marcação de corpos residuais no lúmen do túbulo seminífero (asterisco).

Fig. 7: *Fast green* ácido – Observar a intensa marcação no núcleo e citoplasma de todas as células do epitélio germinativo. Notar a marcação de corpos residuais no lúmen do túbulo seminífero (seta grande).

Fig. 8: *Fast green* alcalino – Notar a marcação no núcleo das células espermatogênicas, principalmente uma intensa marcação no núcleo de espermatozóides maduros. Observar a ausência de marcação de corpos residuais no lúmen do túbulo seminífero (seta grande).

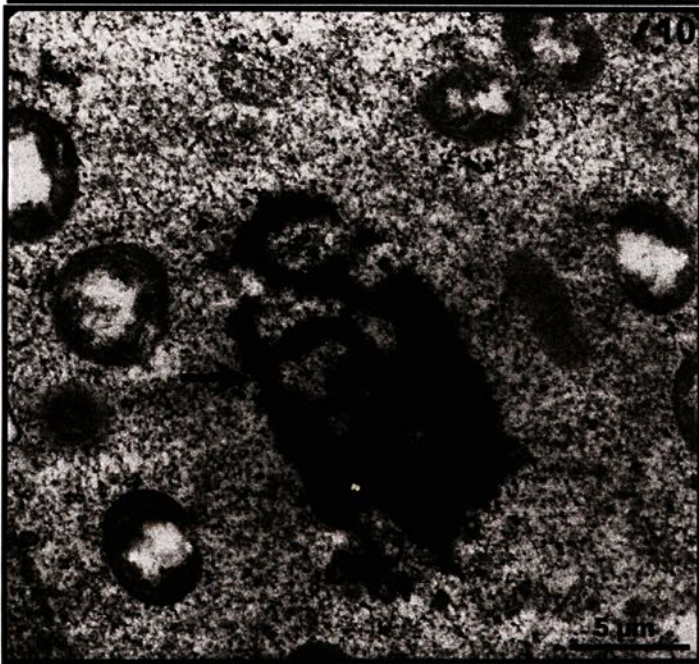
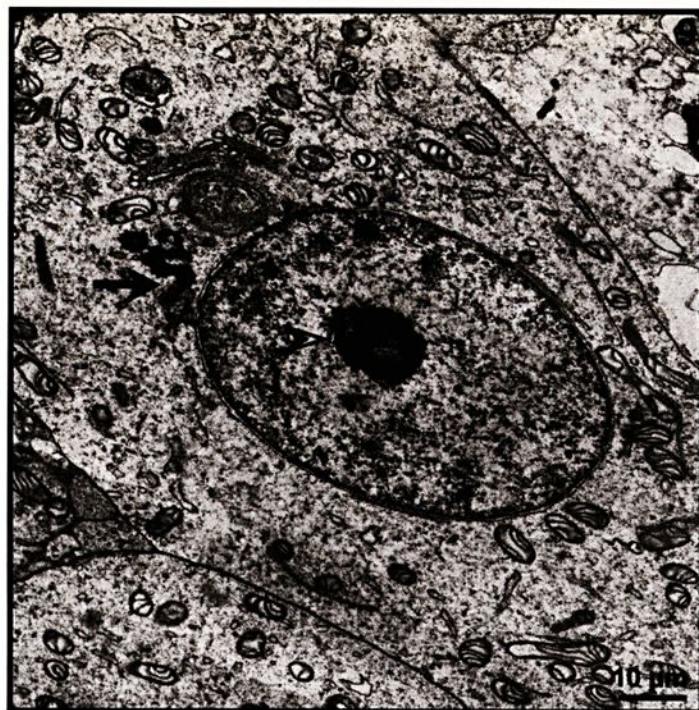


Figuras 9 - 11: Ultra-estrutura de túbulos seminíferos de *Meriones unguiculatus*.

Fig. 9: Observar a formação de “nuages” no citoplasma de um espermátócito I (seta) e notar o material, provavelmente constituído por ribonucleoproteínas (RNPs), no interior do núcleo celular (cabeça de seta).

Fig. 10: Detalhe do “corpo cromatóide” (CB), formado pela reunião de “nuages” que migraram do núcleo para o citoplasma, em uma espermátide inicial. Observar o aspecto reticulado da estrutura da organela, que contém regiões de diferentes densidades (seta).

Fig. 11: Observar a migração do material nuclear, através do complexo do poro, que se reúne no citoplasma formando o CB (seta).

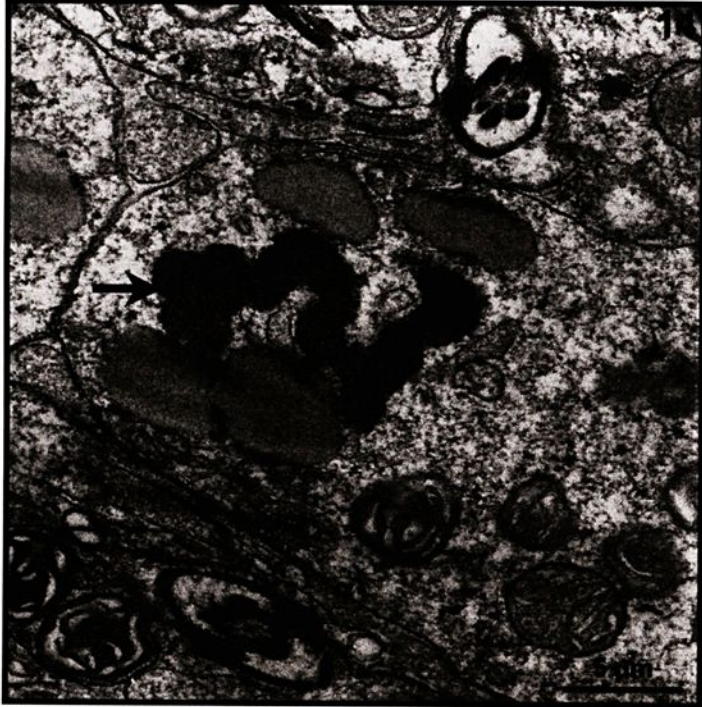
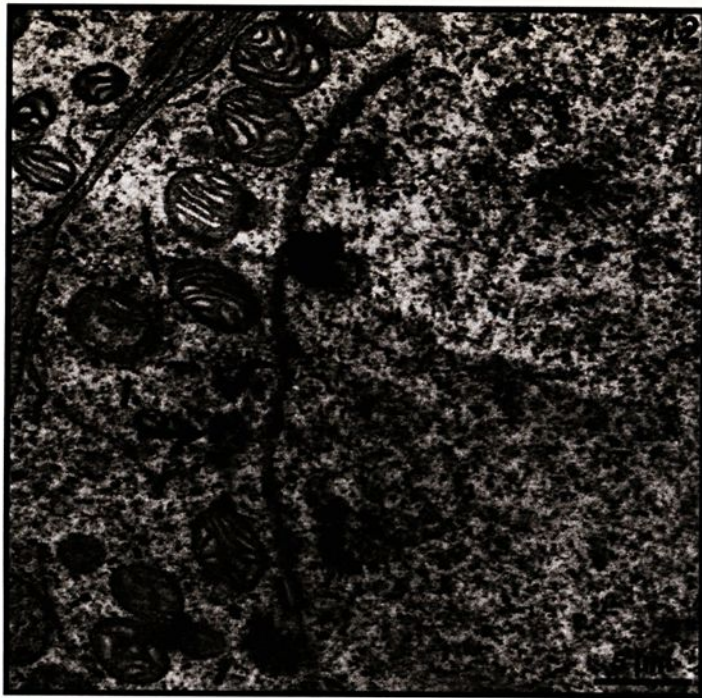


Figuras 12 -14: Ultra-estrutura de túbulos seminíferos de *Meriones unguiculatus*.

Fig. 12: Observar a migração de “nuages” do núcleo para o citoplasma de uma espermatíde inicial, e a deposição desse material próximo a um aglomerado de mitocôndrias (seta).

Fig. 13: Detalhe de um “corpo cromatóide” (CB) no citoplasma de uma espermatíde inicial. Notar que o CB encontra-se rodeado por vesículas, provavelmente emitidas pelo complexo de Golgi (setas), e localizado próximo a um conjunto de mitocôndrias.

Fig. 14: Espermatíde em alongamento, onde é possível observar a ligação entre o CB e depósitos de gordura no citoplasma celular (seta).

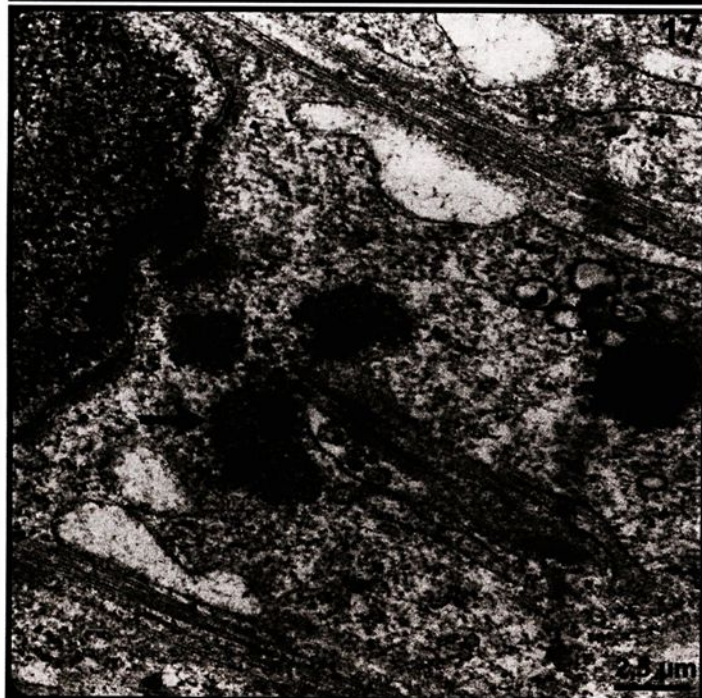
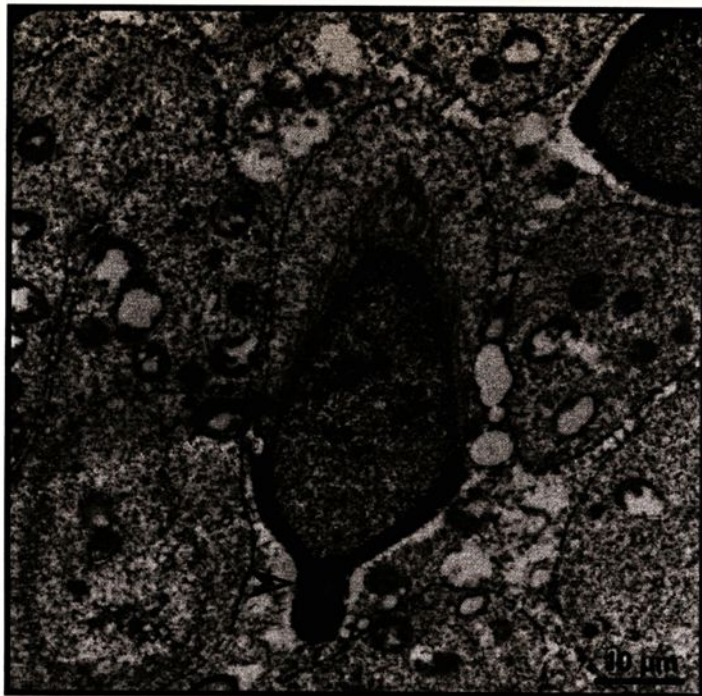


Figuras 15 - 17: Ultra-estrutura de túbulos seminíferos de *Meriones unguiculatus*.

Fig. 15: Observar no núcleo de uma espermatíde em alongamento, um material fragmentado, provavelmente de origem nucleolar (seta). Notar que esse mesmo material também pode ser encontrado ao redor do sistema acrossômico (cabeça de seta).

Fig. 16: Detalhe do material fragmentado, provavelmente de origem nucleolar, no interior do núcleo de uma espermatíde em alongamento (seta).

Fig. 17: Espermatíde em alongamento, onde é possível observar o “corpo cromatóide” (CB) no pólo caudal do núcleo, localizado próximo a região do ânulo, onde está ocorrendo a formação da peça intermediária e do flagelo do espermatozóide (seta).



6. Discussão

Análises citoquímicas em túbulos seminíferos de *Rattus norvegicus*, *Mus musculus* e *Meriones unguiculatus* trouxeram informações sobre o ciclo nucleolar nas células germinativas do epitélio seminífero desses roedores. Utilizando-se a técnica convencional de Hematoxilina-Eosina (HE) e, também, a técnica de *Periodic Acid Schiff* (P.A.S), foi possível obter informações sobre os estádios e a estrutura dos túbulos seminíferos desses roedores, e assim, pode ser padronizada a utilização de túbulos entre os estádios I a VII (segundo LEBLOND & CLERMONT, 1952), para *Rattus norvegicus* e *Mus musculus* e de túbulos entre os estádios de I a VI (segundo SEGATELLI *et al.*, 2000), para *Meriones unguiculatus*. Esses estádios apresentam espermatogônias A e B, espermatócitos I, espermatídes em várias fases de desenvolvimento e espermatozóides maduros, facilitando a observação do ciclo nucleolar durante o processo de espermatogênese.

Em espermatídes de camundongos (TAKEUCHI & TAKEUCHI, 1990), foi verificado que no início da diferenciação das espermatídes, parte do CFD e o CG do nucléolo desorganizam-se, desestruturando, assim, todo o arranjo nucleolar das espermatídes. Foi observada, também, a diminuição da quantidade de B23 e C23 no nucléolo de espermatócitos e espermatídes de camundongo (BIGGIOGERA *et al.*, 1991). Esses dados da literatura auxiliam na interpretação das observações realizadas no presente trabalho, pois, com a utilização das técnicas de Impregnação por Íons Prata (AgNOR) e de Reticulina de Gömöri, foi possível observar uma fragmentação do material nucleolar nas espermatídes e a provável migração desse material para o citoplasma. Esse fenômeno pode ser evidenciado devido a presença de proteínas AgNOR positivas (B23 e C23) no CFD e CG do nucléolo (THIRY & GOESSENS, 1996), regiões que se desorganizam durante esta etapa da diferenciação celular. Também nessas regiões nucleolares, encontram-se as subunidades ribossomais e os complexos de RNPs que, provavelmente, migram para o citoplasma, formando uma estrutura denominada “corpo cromatóide - CB”, que parece desempenhar várias funções durante a espermiogênese. Outros autores apóiam a idéia da origem nucleolar para o CB (COMINGS & OKADA, 1972; ANDERSEN, 1978; ANDONOV, 1990). No presente estudo a marcação das proteínas nucleolares C23 e B23, no citoplasma de espermatócitos e espermatídes, pode não ter sido tão evidente devido a ligação dessas proteínas com a atividade nucleolar de transcrição dos genes RNAr (HOFGÄRTNER *et al.*, 1979), que não ocorre no CB. A técnica de Reticulina de Gömöri é comumente utilizada para identificar fibras reticulares do tecido conjuntivo. Porém, neste trabalho, essa técnica, aplicada nos cortes dos testículos de roedores, foi eficiente para a marcação das áreas nucleolares e, ainda, destacou a associação dessas marcações com áreas claras, indicando a presença de heterocromatina. A ligação entre nucléolo e

heterocromatina é de fundamental importância para a manutenção da arquitetura nucleolar (CARMO-FONSECA *et al.*, 2000).

As técnicas específicas referentes aos complexos ribonucleoprotéicos (Reação de Feulgen; Azul de Toluidina – pH 4,0 e Variante da Concentração Eletrolítica Crítica – CEC), proporcionaram uma interpretação citoquímica revelando que a atividade nucleolar está presente em todo o epitélio germinativo, isto é, tanto na população estável de células de suporte (células de Sertoli) como nas células proliferativas em diferenciação (células espermátogênicas) (ASSIS *et al.*, 2002; ASSIS & AZEREDO-OLIVEIRA, 2002).

A aplicação da coloração pelo Azul de Toluidina, em solução tampão com pH 4,0, possibilitou a ligação e a união desse corante de caráter catiônico (básico) com os materiais nucleares, de caráter aniônico (ácidos). Os ácidos nucléicos (DNA e RNA) corados apresentaram uma intensa metacromasia. Esse tipo de ligação é eletrostática e ocorre entre os grupos fosfatos livres dos ácidos nucléicos e o corante (MELLO & VIDAL, 1980). A técnica do Azul de Toluidina foi utilizada como controle da técnica Variante da Concentração Eletrolítica Crítica (CEC) (MELLO *et al.*, 1993), onde o material corado com Azul de Toluidina é mergulhado em uma solução contendo microcátions (Mg^{++}), com carga semelhante ao corante. Dessa forma, ocorre uma competição desses cátions inorgânicos pelas cargas negativas do substrato, isto é, os fosfatos livres das moléculas de DNA, não ligadas às proteínas. Sobre essas condições, enquanto o DNA fica menos metacromático, corando-se em verde, o RNA, por estar altamente complexado com as proteínas (ribonucleoproteínas – RNPs), permanece azul (metacromático). Assim, foi possível discriminar diferencialmente as áreas nucleolares, ricas em RNAr, e acompanhar as moléculas de RNA complexadas às proteínas durante a espermatogênese. Foi notada uma marcação intensa dessas estruturas nucleolares nas células de Sertoli, espermátogônias e espermátócitos I, já nas espermátides, onde está ocorrendo a desorganização nucleolar e a provável migração desse material para o citoplasma, a marcação foi muito fraca ou ausente. Essa mesma técnica foi utilizada anteriormente no acompanhamento do RNA durante divisão mitótica de células em cultura (MELLO, 1995).

A análise da técnica Reação de Feulgen (específica para DNA) proporcionou não somente analisar a atividade nucleolar, visualizando a diminuição da marcação nucleolar nas espermátides, como também verificar a íntima relação entre as regiões heterocromáticas e os nucléolos, nos núcleos interfásicos (células de Sertoli e espermátogônias) e nas células em divisão (espermátócitos e espermátides). Essa associação entre heterocromatina e nucléolo, já foi também observada em órgãos somáticos de várias espécies de vertebrados e invertebrados (AZEREDO-OLIVEIRA & MELLO, 1986, 1997, 1998) e é muito importante para a manutenção da arquitetura nucleolar (CARMO-FONSECA *et al.*, 2000). Portanto, os dados obtidos durante a

espermatogênese de *Rattus norvegicus*, *Mus musculus* e *Meriones unguiculatus*, confirmaram a relação morfofuncional que ocorre entre essas duas estruturas nucleares, também nas células testiculares.

Nos resultados obtidos com a técnica de P.A.S., foi possível notar uma marcação basófila, próxima ao envelope nuclear, em uma região oposta ou ao lado do local de formação do acrossomo. O tipo e o local da marcação coincidem com a localização do CB em espermátides de rato, tratadas com actinomicina D, observadas por SÖDERSTRÖM (1977).

Com a utilização das técnicas de Reação de Feulgen (específica para DNA) e de *Fast green* alcalino (específica para proteínas básicas – como histonas e protaminas), não foram observadas marcações de corpúsculos residuais ou “esferas cromatofílicas” no lúmen do túbulo seminífero. No entanto, na análise das técnicas Variante de CEC, Reticulina de Gömöri e *Fast green* ácido, esses corpúsculos residuais foram destacados no lúmen do túbulo seminífero, indicando que, provavelmente, são compostos por complexos de RNPs, proteínas acídicas que se coram pela prata (provavelmente B23 e C23) (OCHS & BUSCH, 1984) e glicoproteínas, entre outras. Sugerimos, assim, que os restos citoplasmáticos fagocitados pelas células de Sertoli durante a espermiogênese e, posteriormente, liberados na luz dos túbulos seminíferos (KRAUSE, 1994), contém parte dos RNPs excedentes, não totalmente utilizados no processo de diferenciação.

As evidências citoquímicas analisadas ao microscópio de luz, sugerem que o “corpo cromatóide” (CB) é originado de material nucleolar. Para complementar as informações sobre a formação e a função dessa organela, foram também realizadas análises ultra-estruturais em túbulos seminíferos de *Rattus norvegicus*, *Mus musculus* e *Meriones unguiculatus*.

O corpo cromatóide (CB) é uma organela citoplasmática exclusiva das células espermatógênicas, e tem sido indicada como uma “reserva” ou “estoque” de RNA e proteínas para a diferenciação final dos espermatozóides (SÖDERSTRÖM & PARVINEN, 1976). Análises ultra-estruturais revelaram que o CB possui uma estrutura semelhante a uma esponja, contendo regiões que apresentam diferentes eletron-densidades (FIGUEROA & BURZIO, 1998). Observações obtidas no presente trabalho, demonstram um material semelhante ao CB localizado próximo ao Complexo Sinaptonêmico de espermatócitos I (paquíteno), indicando que essa estrutura poderia estar armazenando RNAm, que, ainda, estaria sendo transcrito nessa fase. Também, nos espermatócitos I, foi possível observar o início da migração de “nuages” para o citoplasma. A relação entre “nuages” e CB é um pouco contraditória, pois alguns autores sugerem que essas duas estruturas são independentes e possuem funções diferentes, apesar de apresentarem ligação durante algumas etapas da espermiogênese (SÖDERSTRÖM, 1981). Porém, outros autores sugerem que o “nuage”, composto principalmente por RNPs, portanto, provavelmente derivado do nucléolo, migra para o citoplasma, onde se coalescem formando uma estrutura maior, o “corpo

cromatóide" (CB) (PANIAGUA *et al.*, 1986). Nossos resultados confirmam as observações realizadas nos estudos de PANIAGUA *et al.* (1986). Recentemente foi detectada a presença de uma proteína denominada MTR-1 no CB de espermátides de ratos. Essa proteína pode realizar a reunião de várias outras proteínas e outros componentes celulares em complexos macromoleculares no citoplasma celular (CHUMA *et al.*, 2003). Portanto, a MTR-1, pode ser responsável pela reunião dos materiais que migram do núcleo para o citoplasma, em uma única estrutura, o CB.

Alguns trabalhos suportam a idéia de que o material que origina o CB é proveniente do núcleo, passando para o citoplasma através do complexo de poro (PARVINEN & PARVINEN, 1979; PARVINEN *et al.*, 1997), dado que está em concordância com os resultados obtidos neste presente trabalho.

A transcrição de RNAm cessa nas espermátides iniciais, quando seus núcleos começam a alongar-se, entretanto a síntese de proteínas continua até os passos finais da espermiogênese (MONESI, 1965). Essa observação remete para a necessidade de uma "reserva" de RNAs mensageiro (RNAm) nas espermátides, para que essas moléculas possam ser traduzidas durante o processo da espermiogênese. Essa função de estoque de RNAm é proposta para o CB por observações de vários autores. FIGUEROA & BURZIO (1998) descreveram a presença de estruturas semelhantes a poliribossomos, em associação com a superfície do CB. MORALES & HECHT (1994) detectaram que o CB possui uma grande quantidade de RNAm, porém esses não são RNAm com cauda polyA. SÖNDERSTRÖM & PARVINEN (1976) obtiveram marcações no CB, após o tratamento dos tecidos com [3H] uridina. SÖNDERSTRÖM (1977) demonstrou mudanças na estrutura do CB das espermátides, após aplicação de um inibidor específico para síntese de RNA, a actinomicina D. MOUSSA *et al.* (1994), demonstraram a ocorrência de um aumento da quantidade de snRNPs no núcleo e no citoplasma de espermátócitos I e a diminuição dessas moléculas nas espermátides. Essas snRNPs são preferencialmente encontradas nas áreas claras do CB. A idéia de que o CB é responsável pelo armazenamento de RNAm inativo, que é utilizado durante as fases finais da espermiogênese também é reforçada pelas observações realizadas por OKO *et al.* (1996). Esses autores detectaram a presença das proteínas p48/52 - essas proteínas são consideradas reguladoras de transcrição, pois são capazes de inibir a transcrição - nas proximidades do CB em espermátócitos, na fase de paquíteno. A proteína p52 também foi observada no CG do nucléolo interfásico (THIRY & GOESSENS, 1996). Ainda, foi proposto que o CB seria uma fonte de proteínas pré-sintetizadas que seriam estocadas para, posteriormente, comporem estruturas da própria espermátide (PARVINEN *et al.*, 1986).

Além de RNAm, foi descrito que o CB é composto também por RNAr 5S e 5,8S (FIGUEROA & BURZIO, 1998), actina (WALT & ARMBRUSTER, 1984; AUMÜLLER & SEITZ, 1988) e

íons cálcio (ANDONOV & CHALDAKOV, 1989). A presença de actina e de cálcio pode estar relacionada com a motilidade da organela, já que no presente estudo, o CB foi detectado em várias posições no citoplasma de espermátócitos e espermátides, e, também, migrando através das pontes citoplasmáticas entre as espermátides. A movimentação do CB através de pontes citoplasmáticas também foi descrita por VENTELÄ *et al.* (2003). O autor sugeriu que esse fenômeno é importante para a divisão dos produtos do genoma haplóide das espermátides e demonstrou o transporte da proteína TRA54, que é processada no complexo de Golgi de uma espermátide e enviada para o sistema acrossômico da espermátide vizinha, através do CB.

Os resultados obtidos neste trabalho evidenciaram uma intensa relação do CB com o complexo de Golgi. Essa interação entre as duas estruturas pode estar relacionada com a formação do sistema acrossômico nas espermátides iniciais, já que freqüentemente são observadas vesículas deslocando-se entre o complexo de Golgi e o CB. Os dados de SÖDERSTRÖM & PARVINEN (1976) e TANG *et al.* (1982), também mostraram a relação entre as duas estruturas citadas. ANTON (1983) sugere que a ligação entre o complexo de Golgi e o CB pode estar relacionada com o acúmulo de enzimas providas do complexo de Golgi e que rodeiam o CB, para ação na região caudal do núcleo nas fases finais da espermiogênese.

O CB pode também estar relacionado com a compactação do núcleo das espermátides, através da substituição das proteínas histonas por protaminas. O TP2RNAm foi especificamente localizado em uma estrutura perinuclear, que se acredita ser o CB. Os RNAsm para proteína de transição são transcritos muito antes da substituição de histonas por protaminas, indicando que o CB possa servir como estoque e transporte desses materiais (SAUNDERS *et al.*, 1992). O mecanismo de ativação do TP2RNAm, nas espermátides, foi descrito por STEGER (1999). Esse autor considera que os TP2RNAm transcritos são estocados como partículas de RNPs em um estado de repressão de tradução por vários dias e, depois, são traduzidos nas espermátides em alongamento e já alongadas. A regulação traducional envolve proteínas repressoras que se ligam à cauda poly-A ou seqüências específicas de RNA localizadas na 3' UTR.

Os resultados do presente estudo também demonstraram a ligação do CB com aglomerados de mitocôndrias. A união entre estas duas estruturas foi previamente descrita, e alguns autores chegaram até a propor que o CB poderia originar-se de um material inter-mitocondrial (FAWCETT *et al.*, 1970). Porém, essa ligação pode estar relacionada com o direcionamento de aglomerados de mitocôndrias para a direção caudal do núcleo, onde as mesmas irão formar uma bainha mitocondrial, ao redor da peça intermediária dos espermatozóides.

Os túbulos seminíferos analisados permitiram visualizar, ainda, a associação entre a região do ânulo e o CB. PHILLIPS (1974) sugere que em mamíferos o deslocamento caudal do ânulo é um pré-requisito para a formação da bainha mitocondrial. SOLEY (1994) propôs que a manchete, isto

é, estrutura proteinácea que se projeta ao longo do flagelo, age como uma barreira mecânica para o alinhamento de mitocôndrias ao redor do axonema/centríolo distal em mamíferos e aves. Portanto, a ligação entre essas estruturas (ânulo e CB), observadas no presente trabalho, sugere que o CB também participa da formação da bainha mitocondrial na peça intermediária e, também, pode atuar na formação do flagelo do espermatozóide.

Os fragmentos do CB contribuem para a formação de massas basófilas ricas em RNA que se acumulam no citoplasma de espermátides e que constituem o maior componente do corpo residual (SUSI & CLERMONT, 1970), dado que também foi observado no presente estudo.

Portanto, pode-se concluir que em roedores, o CB é um complexo supramolecular citoplasmático, constituído por material de origem nucleolar e que atua de forma relevante nas etapas da espermiogênese, como a formação do acrossomo, comunicação celular entre as espermátides e formação da peça intermediária e cauda dos espermatozoides.

7. Conclusões

Os resultados do presente estudo sobre a atividade nucleolar na espermatogênese das três espécies de roedores estudadas, por meio de técnicas citoquímicas e de análises ultra-estruturais, sugerem as seguintes conclusões:

- Os produtos da transcrição nucleolar, isto é, moléculas de RNAr (45S) associadas à proteínas acídicas específicas, recém sintetizadas, agrupam-se em partículas de ribonucleoproteínas (RNPs). As partículas de RNPs migram para o citoplasma e reúnem-se formando o CB, que representa uma reserva de RNA e proteínas que será utilizada ao longo do processo de espermiogênese, com ênfase aos seguintes aspectos da diferenciação espermática:
 - √ formação do acrossomo
 - √ comunicação citoplasmática entre as espermátides
 - √ formação do flagelo
- No final da diferenciação celular, os fragmentos citoplasmáticos (corpos residuais), que são liberados no lúmen dos túbulos seminíferos, contém parte das partículas de RNPs excedentes não utilizadas para o processo final da espermiogênese.
- A estrutura química dos corpos residuais é composta de ribonucleoproteínas (RNPs) – proteínas acídicas e RNA - e glicoproteínas.
- As “esferas cromatofílicas” presentes no final da espermiogênese de *Mus musculus* possuem a mesma natureza química e funcional dos corpos cromatóides (CB) observados ao longo da espermatogênese de *Rattus norvegicus*, *Mus musculus* e *Meriones unguiculatus*.
- O fenômeno estudado foi semelhante nas três espécies de roedores, indicando uma provável conservação dos mecanismos envolvidos na preservação dos níveis necessários de estoques de proteínas ao longo dos diferentes estágios de diferenciação celular na espermatogênese.

8. Referências Bibliográficas

- ANDERSEN, K. Fine structure of spermatogonia and spermatocytes in the blue fox (*Alopex lagopus*). *Acta Veterinaria Scandinavica (Denmark)*, v. 19(2), p. 229-242, 1978.
- ANDONOV, M. Further study of the chromatoid body in rat spermatocytes and spermatids. *Z. mikrosk. Anat.*, v. 104, p. 46-54, 1990.
- ANDONOV, M. D., CHALDAKOV, G. N. Morphological evidence for calcium storage in the chromatoid body of rat spermatids. *Experientia*, v. 45, p. 377-378, 1989.
- ANTON, E. Association of Golgi vesicles containing acid phosphatase with the chromatoid body of rat spermatids. *Experientia*, v. 39, p. 393-394, 1983.
- ASSIS, I. M., AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Estudo da atividade nucleolar nas células espermatogênicas de *Mus musculus*. In: *Congresso Nacional de Genética, 48º, Águas de Lindóia, SP, p.268, CD, 2002.*
- ASSIS, I. M., SOUZA, R. S., AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Atividade nucleolar durante a espermatogênese de *Rattus norvegicus*. In: *Congresso Brasileiro de Biologia Celular, XI, Porto Alegre, RS, p.195, n. 350, 2002b. In: Colóquio de Incentivo à Pesquisa, 29º, São José do Rio Preto, SP, p.67-68, n. PB 27, 2002.*
- AUMÜLLER, G., SEITZ, J. Immunocytochemical localization of actin and tubulin in rat testis and spermatozoa. *Histochemistry*, v. 89, p. 261-267, 1988.
- AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V., MELLO, M. L. S. Mg²⁺ - dependent ATPase activity investigated in heterocromatin, euchromatin and nucleoli of *Triatoma infestans*. *Revista Brasileira de Genética (Brazil J. Genetics)* v. IX, p. 223-229, 1986.
- AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V., MELLO, M. L. S. Acid phosphatase activity in Malpighian tubules of *Triatoma infestans* Klug. *Cytobios*, v. 92, p. 23-28, 1997.
- AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V., MELLO, M. L. S. Ultrastructural aspects of acid phosphatase activity in Malpighian tubules of *Triatoma infestans* Klug. *Cytobios*, v. 93, p.33-42, 1998.



- BARAN, V., MERCIER, Y., RENARD, J. P., FLECHON, J. E. Nucleolar substructures of rabbit cleaving embryos: An immunocytochemical study. *Molecular Reproduction and Development*, v. 48(1), p. 34-44, 1997.
- BARAN, V., BROCHARD, V., RENARD, J. P., FLECHON, J. E. Nopp 140 involvement in nucleogenesis of mouse preimplantation embryos. *Molecular Reproduction and Development*, v. 59, p. 277-284, 2001.
- BIGGIOGERA, M., KAUFMANN, S. H., SHAPER, J. H., GAS, N., AMALRIC, F., FAKAN, S. Distribution of nucleolar proteins B23 and nucleolin during mouse spermatogenesis. *Chromosoma*, v. 100, p. 162-172, 1991.
- BOUNOURE, L. Recherches sur la lignée germinale chez la Grenouille rousse aux premiers stades du development. *Ann. Sci. Nat.* 10e sér., v 17, p.67-248, 1934.
- CARMO-FONSECA, M., MENDES-SOARES, L., CAMPOS, I. To be or not to be in the nucleolus. *Nature Cell Biology*, v. 2, p.E107-E112, 2000.
- CASSEB-HASSAN, P. M., AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Estrutura nucleolar e impregnação por íons prata. *HB Científica*, v.6(3), p. 172-178, 1999.
- CHUMA, S., HIYOSHI, M., YAMAMOTO, A., HOSOKAWA, M., TAKAMUNE, K., NAKATSUJI, N. Mouse tudor repeat-1 (MTR-1) is a novel component of chromatoid bodies/nuages in male germ cells and forms a complex with snRNPs. *Mechanisms of Development*, v. 120, p. 979-990, 2003.
- COMINGS, D. E., OKADA, T. A. The chromatoid body in mouse spermatogenesis: Evidence that it may be formed by the extrusion of nucleolar components. *Journal Ultrastructure Research*, v. 39(1), p. 15-23, 1972.
- Committee On Care and Use of Laboratory Animals. Guide For The Care And Use Laboratory Animals. *National Research Council, Publication N° 96-03*, 1980.
- DUNDR, M., MISTELI, T., OLSON, M. O. J. The Dynamics of Postmitotic Reassembly of the Nucleolus. *The Journal of the Cell Biology*, v. 150(3), p. 433-446, 2000.
- FAKAN, S., HERNANDEZ-VERDUN, D. The nucleolus and the nucleolar organizer regions. *Biology of the Cell*, v. 56, p. 189-206, 1986.

- FAWCETT, D. W., EDDY, E. M., PHILLIPS, D. M. Observations on the fine structure and relationships of the chromatoid body in mammalian spermatogenesis. *Biology of Reproduction*, v.2(1), p. 129-153, 1970.
- FIGUEROA, J., BURZIO, L. O. Polysome-like structures in the chromatoid body of rat spermatids. *Cell and Tissue Research*, v. 291, p. 575-579, 1998.
- FLECHON, J. E., KOPECNY, V. The nature of the 'nucleolus precursor body' in early preimplantation embryos: a review of fine-structure cytochemical, immunocytochemical and autoradiographic data related to nucleolar function. *Zygote*, v.6, p.183-191, 1998.
- GERBI, S. A., BOROVJAGIN, A. V., LANGE, T. S. The nucleolus: a site of ribonucleoprotein maturation. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 15, p. 318-325, 2003.
- GONZÁLES-GARCIA, J. M., RUFAS, J. S., ANTONIO, C., SUJA, J. A. Nucleolar cycle and localization of NORs in early embryos of *Parascaris univalens*. *Chromosoma*, v.104, p.287-297, 1995.
- HEGNER, R. W. Experiments with chrysomelid beetles. III. The effects of killing parts of the eggs of *Leptinotarsa decemlineata*. *Biol. Bull*, v. 20, p.237-251, 1911.
- HERNANDEZ-VERDUN, D. The nucleolus today. *Journal of Cell Science*, v. 99, p. 465-471, 1991.
- HOFGÄRTNER, F. J., SCHMID, M., KRONE, W., ZENZES, M. T., ENGEL, W. Pattern of activity of nucleolus organizers during spermatogenesis in mammals as analyzed by silver-staining. *Chromosoma*, v. 71, p. 197-216, 1979.
- HOWELL, W. M., BLACK, D. A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: I-step method. *Experientia*, v.36, p. 104-5, 1980.
- JUNÉRA, H.R., MASSON, C., GÉRAUD, G., HERNANDEZ-VERDUN, D. The three-dimensional organization of ribosomal genes and the architecture of the nucleoli vary with G1, S and G2 phases. *Journal of Cell Science*, v. 108, p. 3427-3441, 1995.
- KRAUSE, W. J. *Essentials of Human Histology*. 2nd ed. Printed in USA. Little, Brown and company (Inc.), 1994, 432p.



- LEBLOND, C. P., CLERMONT, Y. Spermatogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the "periodic acid-fuchsin-sulfurous acid" technique. *American Journal of Anatomy*, v. 90, p. 167-216, 1952.
- LÜHRMANN, R. Functions of U-snRNPs. *Molecular Biology of Reproduction*, v. 14, p. 183-192, 1990.
- MATSUMOTO, A. M. Spermatogenesis. *Reproductive Endocrinology, Surgery and Technology*. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996.
- MELLO, M. L. S.; VIDAL, B. C. Práticas de Biologia Celular. FUNCAMP. Editora Edgard Blücher LTDA, Campinas – SP, 1980, 71 p.
- MELLO, M. L. S., VIDAL, B. C., DANTAS, M. N., MONTEIRO, A. C. P. Discrimination of the nucleolus by a critical electrolyte concentration method. *Acta Histochem. Cytochem.*, v. 26, p. 1-3, 1993.
- MELLO, M. L. S. Relocation of RNA metachromasy at mitosis. *Acta Histochem. Cytochem.*, v. 28, n.2, p. 149-154, 1995.
- MELLO, M. L. S. Cytochemistry of DNA, RNA and nuclear proteins. *Brazilian Journal of Genetics*, v.20 (2): p. 257-264, 1997.
- MILLER, O. L., BEATTY, R. R. Visualization of nucleolar genes. *Science*, v.164, p. 955-957, 1969.
- MONESI, V. Synthetic activities during spermatogenesis in the mouse RNA and protein. *Exp. Cell Res.*, v. 39(1), p. 197-224, 1965.
- MORALES, C. R., HECHT, N. B. Poly(A)⁺ Ribonucleic acids are enriched in spermatocyte nuclei but not in chromatoid bodies in the rat testis. *Biology of Reproduction*, v. 50, p. 309-319, 1994.
- MORIELLE, A., AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Description of the nucleolar activity and karyotype in germinative cell lines of *Rhodnius domesticus* (Triatominae, Heteroptera). *Caryologia*, vol. 57(1), p. 31-37, 2004a.
- MORIELLE, A., AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. O comportamento do nucléolo durante o ciclo celular. *Monografia apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética, para exame Geral de Qualificação de Doutorado*. UNESP - São José do Rio Preto - SP, 34p., 2004b.



- MOUSSA, F., OKO, R., HERMO, L. The immunolocalization of small nuclear ribonucleoprotein particles in testicular cells during the cycle of the seminiferous epithelium of the adult rat. *Cell and Tissue Research*, v. 278, p. 363-378, 1994.
- OCHS, R. L., BUSCH, H. Further evidence that phosphoprotein C23 (110KD/pl 5.1) is the nucleolar silver staining protein. *Experientia Cell Research*, v. 152, p. 260-265, 1984.
- OCHS, R. L., LISCHWE, M. A., SHEN, E., CARROL, R. E., BUSCH, H. Nucleologenesis: Composition and fate of prenucleolar bodies. *Chromosoma*, v.92, n.5, p.330-336, 1985.
- OKO, R., KORLEY, R., MURRAY, M. T., HECHT, N. B., HERMO, L. Germ cell-specific DNA and RNA binding proteins p48/52 are expressed at specific stages of male germ cell development and are present in the chromatoid body. *Molecular Reproduction and Development*, v. 44, p. 1-13, 1996.
- ORSI, A. M. Definição dos estádios do ciclo do epitélio seminífero do gambá (*Didelphis azarae*, Temminck, 1825) *Tese de Mestrado*, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, FMRP, USP, 1974.
- ORSI, A. M., FERREIRA, L. F. Reexame do processo de espermatogênese em mamíferos principalmente em rato e gambá. *Ciência e Cultura*, v. 30, n. 1, p. 65-69, 1978.
- PANIAGUA, R., NISTAL, M., AMAT, P., RODRIGUEZ, M. C. Ultrastructural observations on nucleoli and related structures during human spermatogenesis. *Anat. Embryol.*, v. 174, p. 301-306, 1986.
- PARVINEN, M., PARVINEN, L. Active movements of the chromatoid body: A possible transport mechanism for haploid gene products. *Journal of the Cell Biology*, v. 80, p. 621-628, 1979.
- PARVINEN, M., VIHKO, K. K., TOPPARI, J. Cell interactions during the seminiferous epithelial cycle. In: *Cytology: A survey of cell biology*. 3 ed. New York: Academic Press, v. 104, p. 115-151, 1986.

- PARVINEN, M., SALO, J., TOIVONEN, M., NEVALAINEN, O., SOINI, E., PELLINIEMI, L. Computer análisis of living cells: movements of the chromatoid body in early spermatids compared with its ultrastructure in snap-frozen preparations. *Histochem. Cell Biology*, v. 108, p. 77-81, 1997.
- PEDERSON, T. Proteomics of the nucleolus: more proteins, more functions? *TRENDS in Biochemical Sciences*, v. 27(3), p. 111-112, 2002.
- PHILLIPS, D. M. Spermiogenesis. *New York: Academic Press*, 1974.
- RIBEIRO, M. G.; LIMA, S. R. Iniciação às técnicas de preparação de material para o estudo e pesquisa em morfologia. SEGRAC Editora e Gráfica Limitada, Belo Horizonte – MG, 2000, 106p.
- SAUNDERS, P. T. K., MILLAR, M. R., MAGUIRE, S. M., SHARPE, R. M. Stage-specific expression of rat transition protein 2 mRNA and possible localization to the chromatoid body of step 7 spermatids by in situ hybridization using a nonradioactive riboprobe. *Molecular Reproduction and Development*, v. 33, p. 385-391, 1992.
- SCHEER, U., XIA, B., MERKERT, H., WEISENBERGER, D. Looking at Christmas trees in the nucleolus. *Chromosoma*, v.105, n. 7-8, p. 470-80, 1997.
- SCHWARZACHER, H. G., WACHTLER, F. The nucleolus *Anat. Embryol.*, v. 188, p. 515-536, 1993.
- SEGATELLI, T. M., ALMEIDA, C. C.D., PINHEIRO, P. F. F., MARTINEZ, M., PADOVANI, C. R., MARTINEZ, F. E. Ultrastructural study of acrosome formation in mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Tissue & Cell*, v. 32(6), p. 508-517, 2000.
- SEVERI-AGUIAR, G.D.C., MORIELLE, A., AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Nucleolar activity during the spermatogenesis in Heteroptera. *Biocell*, v.26, p. 303, 2002.
- SOLEY, J. T. Centriole development and formation of the flagellum during spermiogenesis in the ostrich (*Struthio camelus*). *Journal of Anatomy*, v. 185, p. 301-313, 1994.
- SÖDERSTRÖM, K., PARVINEN, M. Incorporation of [3 H]uridine by the chromatoid body during rat spermatogenesis. *The Journal of Cell Biology*, v. 70, p. 239-246, 1976.

- SÖDERSTRÖM, K. Effect of actinomycin D on the structure of the chromatoid body in the rat spermatids. *Cell and Tissue Research*, v. 184, p. 411-421, 1977.
- SÖDERSTRÖM, K. The relationship between the nuage and the chromatoid body during spermatogenesis in the rat. *Cell and Tissue Research*, v. 215, p. 425-430, 1981.
- STEGEER, K. Transcriptional and translational regulation of gene expression in haploid spermatids. *Anat. Embryol.*, v. 199, p. 471-487, 1999.
- SUMMER, A. T. Chromosome banding. *Unwin Human London*, 434 p., 1990.
- SUSI, F. R., CLERMONT, Y. Fine structural modifications of the rat chromatoid body during spermiogenesis. *American Journal of Anatomy*, v. 129, p. 177-192, 1970.
- TABOGA, S. R. *Estudo citoquímico e morfométrico em núcleos e distribuição das fibras no estroma e lesões da próstata humana*. Campinas, 1997. 102p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, UNICAMP.
- TABOGA, S. R., VIDAL, B.C. Collagen fibers in human prostatic lesions: histochemistry and anisotropies. *Journal Submicrosc. Cytol. Pathol.*, v. 35(1), p. 11-16, 2003.
- TAKEUCHI, I. K., TAKEUCHI, Y. K. Ethanol-phosphotungstic acid and bismuth staining of spermatid nucleoli in mouse spermiogenesis. *Journal of Structural Biology*, v. 103, p. 104-112, 1990.
- TANG, X. M., LALLI, M. F., CLERMONT, Y. A cytochemical study of the Golgi apparatus of the spermatid during spermiogenesis in the rat. *The American Journal of Anatomy*, v. 163, p. 283-294, 1982.
- TARTAROTTI, E., AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Patterns of nucleolar activity during spermatogenesis of two triatomines, *Panstrongylus megistus* and *P. herreri*. *Caryologia*, v. 5, n. 3-4, p. 177-184, 1999.
- THIRY, M., GOESSENS, G. The nucleolus during the cell cycle. *Springer*, 146p., 1996.

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

VENTELÄ, S., TOPPARI, J., PARVINEN, M. Intercellular organelle traffic through cytoplasmic bridges in early spermatids of the rat: mechanisms of haploid gene product sharing. *Molecular Biology of the Cell*, v. 14, p. 2768-2780, 2003.

VIDAL, B. C., MELLO, M. L. Critical electrolyte concentration of DNA and nucleolprotein complexes *in vitro*. *Acta Histochem. Cytochem.*, v. 22, p. 437-478, 1987.

VIUFF, D., GREVE, T., HOLM, P., CALLESEN, H., HYTTEL, P., THOMSEN, P.D. Activation of the ribosomal RNA genes in the third cell cycle of porcine embryos. *Biology of Reproduction*, v. 66, p. 629-634, 2002.

WACHTLER, F., STAHL, A. The nucleolus: A structural and functional interpretation. *Micron.*, v.24, n.5, p. 473-505, 1993.

WALT, H., ARMBRUSTER, B. L. Actin and RNA are components of the chromatoid bodies in spermatids of the rat. *Cell and Tissue Research*, v. 236, p. 487-490, 1984.

WATSON, M.L. Staining tissue section of electron microscopy with heavy metals. *J Biophys Biochem Cytol*, v.4, p. 475-478, 1958.

ZATSEPINA, O. V., DUDNIC, O. A., TODOROV, I. T., THIRY, M., SPRING, H., TRENDLENBURG, M. F. Experimental induction of prenucleolar bodies (PNBs) in interphase cells: interphase PNBs show similar characteristics as those typically observed at telophase of mitosis in untreated cells. *Chromosoma*, v. 105, n. 7-8, p. 418-30, 1997.

9. Apêndices

1. Roedores utilizados no trabalho

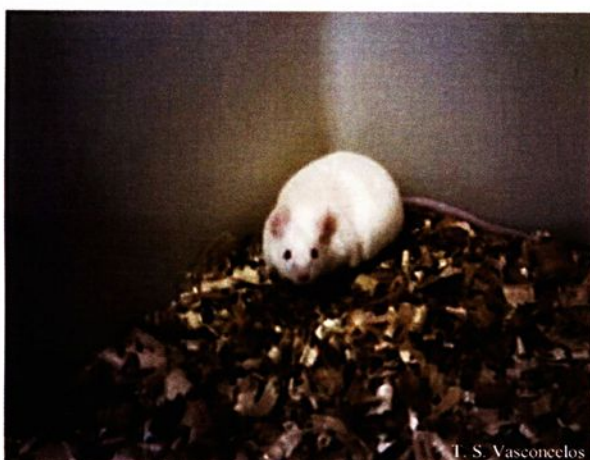
2. Tabela 1

3. Protocolo das técnicas citoquímicas

Apêndice 1



T. S. Vasconcelos

Rattus norvegicus

T. S. Vasconcelos

Mus musculus

T. S. Vasconcelos

Meriones unguiculatus

Apêndice 2

Animal	Peso (g)	Peso (g) - T1	Peso (g) - T2
Camundongo 1 (<i>M. musculus</i>)	52,40	0,076	0,082
Camundongo 2 (<i>M. musculus</i>)	63,90	0,148	0,161
Camundongo 3 (<i>M. musculus</i>)	59,92	0,136	0,134
Camundongo 4 (<i>M. musculus</i>)	48,05	0,132	0,131
Rato 1 (<i>Rattus norvegicus</i>)	234,50	0,784	0,812
Rato 2 (<i>R. norvegicus</i>)	560,50	1,669	1,586
Rato 3 (<i>R. norvegicus</i>)	555,75	1,524	1,604
Rato 4 (<i>R. norvegicus</i>)	520,50	1,145	1,172
Gerbilo 1 (<i>Meriones unguiculatus</i>)	58,10	0,497	0,483
Gerbilo 2 (<i>M. unguiculatus</i>)	61,65	0,499	0,498
Gerbilo 3 (<i>M. unguiculatus</i>)	71,62	0,680	0,687

Tabela 1: Representação dos pesos (g) dos roedores utilizados nos trabalhos e representação dos pesos (g) dos testículos (T) que foram fragmentados e incluídos em parafina e historesina (para microscopia de luz) e araldite (para microscopia eletrônica).

Apêndice 3

Protocolo das Técnicas Citoquímicas

2.1 – Hematoxilina-Eosina (RIBEIRO & LIMA, 2000)

- ✓ *Coloração de rotina para análise geral da morfologia dos túbulos seminíferos.*

Reidratar em água destilada por 5 minutos; deixar 8 minutos na hematoxilina; lavar 10 minutos em água corrente; deixar 1 minuto em álcool 80%; banhar 5 minutos na eosina; lavar rapidamente em álcool 95%; 1 minuto álcool absoluto I; 1 minuto álcool absoluto II; 1 minuto álcool absoluto III; 1 minuto xilol I; 1 minuto xilol II; 1 minuto xilol III; montar em Bálsamo do Canadá.

2.2 – Reação de Feulgen (MELLO & VIDAL, 1980, com modificações)

- ✓ *Método específico para DNA, destacando cromatina (eucromatina e heterocromatina) e os cromossomos.*

Parte 1 – Hidrólise:

HCl 4N durante 1h e 5 minutos, com controle do tempo.

Parte 2 – Reativo de Schiff:

Tirar o Schiff da geladeira; colocar as lâminas em cubeta; preparar o HCl 0,1N e deixar na geladeira (tirar somente uns 10 minutos antes de ser utilizado); colocar HCl 4N nas cubetas e deixar por 1h e 5 minutos. A temperatura ambiente deve ser acompanhada constantemente e estar em torno de 25°C; tirar o HCl 4N e colocar HCl 0,1N gelado (somente um banho rápido para parar a hidrólise); adicionar o reativo de Schiff na cubeta e deixar por 40 minutos, e, imediatamente, cobrir com papel alumínio; para finalizar: 3 banhos em água sulfurosa, por 5 minutos cada um (sempre manter coberto com papel alumínio); 3 banhos rápidos em água destilada; deixar secar (sempre protegido da luz). Para montar as lâminas: banho de xilol por 15 minutos e montagem em Bálsamo do Canadá.



2.3 – Impregnação pelos íons prata (HOWELL & BLACK, 1980)

- ✓ *Identificação das proteínas nucleolares, marcando os nucléolos e as Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs), em diferentes fases celulares da espermatogênese [espermatogônias, espermátocitos (I e II) e espermátides].*

Tratar a lâmina contendo o material a ser analisado, com uma gota de solução reveladora (solução de gelatina a 2%, acrescida de ácido fórmico); adicionar sobre essa, duas gotas de solução de Nitrato de Prata a 50% e misturá-las; cobrir com lamínula; colocar as lâminas em placa de Petri contendo papel de filtro umedecido com água deionizada e incubar as lâminas em estufa a 70°C, durante 15 minutos (acompanhar até a mistura das soluções tornar-se marrom dourada); lavar cada lâmina em água deionizada até que a lamínula se solte; deixar secar ao ar; montar a lâmina com Bálsamo do Canadá.

2.4 – Azul de Toluidina pH 4,0 (MELLO & VIDAL, 1980)

- ✓ *Análise das estruturas nucleares das células do epitélio seminífero.*

Reidratar em água destilada por 5 minutos; corar pelo Azul de Toluidina (pH 4,0), por 15 minutos; lavar rapidamente em água destilada; secar naturalmente; 1 minuto xilol I; 1 minuto xilol II; 1 minuto xilol III; montar em Bálsamo do Canadá.

2.5 – Variante da técnica da Concentração Crítica de Eletrólitos – CEC (VIDAL & MELLO, 1987; TABOGA, 1997; MELLO, 1997)

- ✓ *Identificação e acompanhamento do material nucleolar nas células do epitélio seminífero: nucléolo, corpúsculos nucleolares (PNBs) e RNAs citoplasmáticos.*

Fixar o material em ácido-etanol acético (3:1), durante 1 minuto; enxagüar em etanol 70%, por 3-5 minutos; secar ao ar; corar com Azul de Toluidina a 0,025% - diluído em tampão McIlvaine pH 4,1, por 15 minutos; mergulhar o material em solução de $MgCl_2$ a 0,05M, por 15 minutos; lavar rapidamente em água destilada; deixar o material secar ao ar (no mínimo 6 horas); 1 minuto xilol I; 1 minuto xilol II; 1 minuto xilol III; montar em Bálsamo do Canadá.

2.6 – Reticulina de Gömöri (TABOGA & VIDAL, 2003)

- ✓ *Identificação das fibras reticulares que compõem o tecido conjuntivo, utilizando-se impregnação argêntica.*

Permanganato de Potássio 1%, por 2 minutos; lavar em água corrente; ácido Oxálico 3 %, por 1 minuto; lavar em água corrente; alúmen férrico 1%, por 2 minutos; lavar em água corrente; solução de Prata Amoniacal, por 2 minutos; lavar em água corrente; Formol 10 %, por 3 minutos; lavar em água corrente; Cloreto de Ouro 0,2%, por tempo indeterminado (gotejar a solução sobre o corte e observar ao microscópio até que atinja a tonalidade desejada); lavar em água corrente; Hipossulfito de Sódio 2%, por 2 minutos; lavar bem em água destilada; corar pelo Ácido Pícrico, por 2 minutos; lavar rapidamente em água destilada; 1 minuto álcool absoluto I; 1 minuto álcool absoluto II; 1 minuto álcool absoluto III; 1 minuto xilol I; 1 minuto xilol II; 1 minuto xilol III; montar em Bálsamo do Canadá.

2.7 – P. A. S. (Periódic Acid & Schiff) (RIBEIRO & LIMA, 2000)

- ✓ *Identificação das estruturas acrossômicas durante a espermiogênese (glicoproteínas neutras e ácidas).*

Reidratar em água destilada por 5 minutos; ácido periódico 0,5%, por 15 minutos; lavar em água corrente, por 40 minutos; reativo de Schiff, durante 15 minutos (para tecidos incluídos em parafina) e 1 hora (para tecidos incluídos em historesina); dar 3 banhos de 5 minutos em metabissulfito de sódio 0,5%; lavar em água corrente por 10 minutos; corar pela Hematoxilina de Harris por 2 minutos; lavar em água corrente por 10 minutos; 1 minuto álcool 95%; 1 minuto álcool absoluto I; 1 minuto álcool absoluto II; 1 minuto álcool absoluto III; 1 minuto xilol I; 1 minuto xilol II; 1 minuto xilol III; montar em bálsamo do Canadá.

2.8 – Fast green alcalino de Alfert e Geschwind, modificado segundo Deitch (MELLO & VIDAL, 1980)

- ✓ *Identificação de proteínas básicas (histona e protamina).*

Tratar o material com TCA (triclóro acético) a 5%, recém preparado, durante 15 minutos, a 90°C; mergulhar as lâminas em TCA a 5%, recém-preparado, frio, e, a seguir, lavar várias vezes

em água destilada; corar com a solução de *fast green* (pH 8.0), durante 30 minutos; lavar os preparados muitas vezes em água destilada; desidratá-los em etanol 95% (2 a 5 minutos); etanol 100% (2 banhos de 5 minutos cada); diafanizá-los em xilol e montá-los em bálsamo do Canadá.

2.9 – *Fast green* ácido, segundo Deitch (MELLO & VIDAL, 1980)

✓ *Identificação de proteínas totais.*

Corar o material com solução de *fast green* (pH 2.7), durante 30 minutos; lavar os preparados, durante 1 minuto com solução de ácido acético a 1%; deixar secar, durante 24 horas; diafanizar em xilol e montar e bálsamo do Canadá.



