

RITA LUIZA PERUQUETTI

**CARACTERIZAÇÃO DO CICLO NUCLEOLAR E DA FORMAÇÃO DO
CORPO CROMATÓIDE NA ESPERMATOGÊNESE DE ALGUNS
VERTEBRADOS**

São José do Rio Preto

2009

RITA LUIZA PERUQUETTI

**CARACTERIZAÇÃO DO CICLO NUCLEOLAR E DA FORMAÇÃO DO
CORPO CROMATÓIDE NA ESPERMATOGÊNESE DE ALGUNS
VERTEBRADOS**

Orientadora: Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira

Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia, Letras e Ciências Exatas
(IBILCE/UNESP) – São José do Rio Preto
para obtenção do título de Doutor em
Genética.

São José do Rio Preto

2009

Peruquetti, Rita Luiza.

Caracterização do ciclo nucleolar e da formação do corpo cromatóide na espermatogênese de alguns vertebrados / Rita Luiza Peruquetti. - São José do Rio Preto: [s.n.], 2009.

129 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira
Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Espermatogênese em animais. 2. Nucléolo. 3. Ciclo nucleolar. 4. Corpo cromatóide. 5. Células Germinativas - Ultra-estrutura. 6. Citoquímica. 7. Vertebrado - Reprodução. I. Azeredo-Oliveira, Maria Tercília Vilela de. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU - 591.463.1

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
Campus de São José do Rio Preto - UNESP

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular – Departamento de Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto (UNESP/IBILCE), com auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Processo no. 141375/2006-0 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Processo no. 2007/04521-4.

RITA LUIZA PERUQUETTI

**CARACTERIZAÇÃO DO CICLO NUCLEOLAR E DA FORMAÇÃO DO
CORPO CROMATÓIDE NA ESPERMATOGÊNESE DE ALGUNS
VERTEBRADOS**

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Titulares:

Prof. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira _____

(Presidente e Orientadora)

Prof. Dra. Maria Luiza Silveira Mello _____

Prof. Dr. Reinaldo Azoubel _____

Prof. Dr. Carlos Alberto Vicentini _____

Prof. Dra. Eliana Morielle Versute _____

Suplentes:

Prof. Dr. Antônio Marcos Orsi _____

Prof. Dra. Ivanira José Bechara _____

Prof. Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo _____

São José do Rio Preto, ____/____/____.

“Grandes resultados não podem ser conseguidos de uma vez, e devemos ficar satisfeitos a avançar na vida assim como caminhamos – passo a passo.”

Samuel Smiles

“A morte é apenas uma travessia do mundo, tal como os amigos que atravessam o mar e permanecem vivos uns nos outros. Porque sentem necessidade de estar presentes, para amar e viver o que é onipresente. Nesse espelho divino vêem-se face a face; e sua conversa é livre e pura. Este é o consolo dos amigos e embora se diga que morrem, sua amizade e convívio estão, no melhor sentido, sempre presentes, porque são imortais.”

*William Penn, **More Fruits of Solitude***

*Dedico este trabalho aos meus avós maternos Ana Pimentel Tronfino (**in memorian**) e José Tronfino (**in memorian**) e aos meus avós paternos Darcy Villela Peruquetti e Alcídio Silvério Peruquetti (**in memorian**) que possibilitaram a formação da família maravilhosa à qual pertenço. Espero que, estejam onde estiverem, sempre sintam orgulho de mim, pois me orgulho muito de fazer ou já ter feito parte de suas vidas.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida que Ele me deu e por tudo que me permitiu viver até hoje. Sem Sua presença em minha vida jamais teria conseguido chegar até aqui, tendo tantas experiências fantásticas e conhecido tantas pessoas maravilhosas, às quais posso, nesse momento, agradecer.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira, por tudo que me ensinou nesses seis anos de convivência. Além da valiosa contribuição para a minha formação científica, sempre a considerei como sendo uma amiga muito querida. Seu exemplo, tanto profissional quanto pessoal, jamais será, por mim, esquecido.

Ao Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga pela parceria, pelo incentivo e, também, pela colaboração durante a execução desse trabalho.

À Profa. Dra. Rejane Máira Góes e ao Prof. Dr. Classius de Oliveira pelas valiosas sugestões feitas durante o exame geral de qualificação ao Doutorado.

À Profa. Dra. Cláudia Regina Bonini Domingos, atual coordenadora do Programa de Pós-graduação em Genética (UNESP/IBILCE), por todo apoio e entusiasmo demonstrado no comando do programa. Agradeço também a todos os demais professores, colegas e colaboradores do referido programa de pós-graduação.

À Profa. Dra. Ana Lucia Dias (Laboratório de Citogenética de Peixes/UEL) por ter me recebido tão bem em seu laboratório e ter me ensinado a técnica de preparação citogenética de cromossomos meióticos.

A todos os funcionários do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto (UNESP/IBILCE) e, em particular, aos funcionários do Departamento de Biologia que sempre possibilitam, direta ou indiretamente, a realização das pesquisas científicas. Agradecimentos especiais à direção do Instituto, aos funcionários da Biblioteca e aos funcionários da Seção de Pós-graduação. Agradecimentos especiais, também, ao Sr. Luis Roberto Faleiros Jr e à MSc. Rosana Silistino de Souza por seu auxílio com as técnicas de laboratório.

Aos meus pais, José Luiz Peruquetti e Ana de Lourdes Tronfino Peruquetti, por todo amor e dedicação a mim dispensados. Agradeço, principalmente, por terem

batalhado tanto para que pudessem me deixar a melhor herança de todas: a educação e o caráter. Jamais terei palavras suficientes para expressar a minha gratidão e o tamanho do meu amor por vocês, por isso digo apenas: muito obrigada sempre e por tudo. Saibam que tudo que faço em minha vida é dedicado a vocês. Quero que se orgulhem de mim sempre, e estou em busca disso a todo o momento.

À minha irmã, Anna Carolina Peruquetti, simplesmente pelo fato de ela existir em minha vida. Não consigo me imaginar vivendo sem a sua presença tão querida e fundamental para mim. Tenho certeza que esse sentimento estará sempre aceso em meu coração e, pode ter certeza que, mesmo distante, sempre estarei pensando e torcendo por você. Você é o meu orgulho!

Ao meu namorado, Tiago da Silveira Vasconcelos, por sua presença constante em minha vida. Mais do que um namorado, você tem sido um companheiro, um colega de profissão e um amigo inseparável nos bons e nos maus momentos. Mesmo que daqui pra frente as coisas não saiam da maneira que planejei, tenho a certeza que já valeu a pena ter chegado até aqui, somente por ter te conhecido. Sua presença em minha vida tem sido tão importante que será destacada mais algumas vezes, no decorrer desses agradecimentos. Agradeço também aos seus pais, Manoel Otávio de Vasconcelos e Maria Cristina da Silveira Vasconcelos, por terem me recebido de braços abertos em sua casa e, também, por terem se tornado minha segunda família.

*À um membro recém chegado na família, um **Felis silvestris catus**, mais conhecido como "Bichento". Obrigada por me fazer companhia durante a redação deste trabalho. Sentir você se aninhando no meu colo, ronronando e me olhando com esses olhos felinos foram um estímulo para que eu pudesse realizar essa tarefa.*

Às colegas MSc. Lia Raquel de Souza Santos e MSc. Sílvia Regina Pagliarini Cabral e ao Prof. Dr. Classius de Oliveira pela colaboração com este trabalho, fornecendo parte do material biológico de algumas espécies utilizadas no presente trabalho.

Aos colegas MSc. Thaís Billalba Carvalho, MSc. Roselene Carvalho, Sr. Carlos Eduardo de Souza, MSc. Tiago Gomes dos Santos, MSc. Tiago da Silveira Vasconcelos e MSc. Carlos Eduardo Saranz Zago, pelo auxílio na coleta de material biológico utilizado no presente trabalho.

À MSc. Thaís Billalba Carvalho e ao MSc. Tiago da Silveira Vasconcelos, pela valiosa e imprescindível colaboração nas análises estatísticas.

A todos os colegas da Iniciação Científica, Mestrado e Doutorado que fazem parte ou que já fizeram parte do Laboratório de Biologia Celular (UNESP/IBILCE) por qualquer tipo auxílio durante a realização deste trabalho. Agradecimentos especiais à MSc. Lucilene Regina Maschio, MSc. Ana Carolina Borella Anhô, MSc. Weverson Luciano Pires, Vanessa Bellini Bardella, Priscila Pasqüeto Mendonça, Maysa Succi e Tamires Villasboas Cordeiro.

Às amigas de república Thaís Billalba Carvalho, Luciana de Souza Ondeí, Isabeth da Fonseca Estevão e Renata Vieira Nobre. Sabendo como são difíceis as relações humanas, posso dizer que tivemos sucesso em nosso convívio, no local que por nós sempre foi considerado nossa segunda casa. Com certeza serão pessoas que irão comigo em meus pensamentos, por onde quer que eu vá.

A todos os amigos que fiz durante esses anos cursando a pós-graduação. Tenho medo de esquecer alguém, mas gostaria de citar alguns nomes: Thaís Billalba Carvalho, Tiago Gomes dos Santos, Rodrigo Zieri, Marilanda Ferreira Bellini, Lucilene Regina Maschio e Isabeth da Fonseca Estevão. Considero-me uma pessoa iluminada por ter feito tão boas amizades. Sei que sentirei saudades, mas mesmo assim ainda me sinto feliz. Afinal, como já dizia o poeta, quem teve amor tem saudade!

A todos os meus amigos de Vista Alegre do Alto (SP) por sempre me apoiarem e vibrarem com todas as minhas conquistas. Em especial agradeço à Eloísa Maria Steluti, Daina Bettini, Daniele Camila Dias e Tatiane Olívio.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas.....	x
Resumo.....	xii
Abstract.....	xiv
1. Introdução geral.....	01
1.1. Corpo cromatóide.....	01
1.2. Nucléolo.....	01
1.3. Nucléolo durante a mitose.....	03
1.4. Nucléolo durante a meiose.....	04
2. Objetivo geral.....	06
3. Referências Bibliográficas.....	06
4. Artigos científicos a serem submetidos para publicação em revistas especializadas.....	12
Artigo 1: "Análise do ciclo nucleolar e sua relação com a formação do corpo cromatóide durante a espermatogênese de <i>Tilapia rendalli</i> (Teleostei, Cichlidae)".....	13
Artigo 2: "Ciclo nucleolar e formação do corpo cromatóide: Qual a relação entre esses dois processos na espermatogênese de <i>Dendropsophus minutus</i> (Amphibia, Anura)?".....	41
Artigo 3: "Relação entre o ciclo nucleolar e a formação do corpo cromatóide na espermatogênese de <i>Phrynops geoffroanus</i> (Reptilia, Testudines)".....	70
Artigo 4: "Formação do corpo cromatóide nas células germinativas de coelhos: Esse evento possui relação com o ciclo nucleolar na espermatogênese?".....	96
5. Considerações finais.....	124
Apêndice.....	128
Protocolo Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEAA).....	129

LISTA DE ABREVIATURAS

AgNOR: Impregnação por íons prata ou Silver-ion impregnation
ARF: Proteína supressora de tumor
AT: Azul de toluidina
B23: Numatrina
B36: Fibrilarina
CB: Corpo cromatóide ou chromatoid body
Cdc14: Quinase dependente de ciclina 14
CEC: Concentração crítica de eletrólitos ou Critical electrolyte concentration
CF: Centro fibrilar
CFD: Componente fibrilar denso
CG: Componente granular
COX1: citocromo *c* oxidase
CS: Complexo sinaptonêmico
C23: Nucleolina
DNA: Ácido desoxiribonucléico
DNAr: DNA ribossômico
DNA top II: DNA topoisomerase II
ETS: Regiões espaçadoras externas
HE: Hematoxilina-eosina ou Hematoxylin-eosin
IGR: Regiões intergênicas
ITS: Regiões espaçadoras internas
KCl: Cloreto de potássio
MET: Microscopia eletrônica de transmissão
Myc: Oncoproteína
Net1: Proteína de silenciamento gênico (silenciadores genéticos tipo siRNA)
OX3: Antígeno de histocompatibilidade (Antígenos polimórficos classe II)
Pch2: Proteína responsável pelo *checkpoint* do paquíteno
PNB: Corpúsculos pré-nucleolares
p53: Proteína supressora de tumor
RNA: Ácido ribonucléico
RNA_m: RNA mensageiro
RNA_r: RNA ribossômico
RNA pol I: RNA polimerase I
RNP: Ribonucleoproteínas
RON: Região Organizadora Nucleolar
TB: Toluidine blue

TDR1/MTR-1: *Mouse TUDOR repeat 1*

TEM: Transmission electron microscopy

TP2RNAm: RNAm que codifica a proteína de transição 2

TS: Regiões espaçadoras

Sir2: Proteína de silenciamento gênico

snRNA: Pequenos RNA nucleares

snRNP: Pequenas ribonucleoproteínas nucleares

snoRNA: Pequenos RNA nucleolares

snoRNP: Pequenas ribonucleoproteínas nucleolares

Resumo

O corpo cromatóide (CB) é uma organela citoplasmática que, aparentemente, possui um papel no estoque de RNA e proteínas para a diferenciação final dos espermatozoides. Existem algumas teorias que tentam explicar a origem do material que compõe essa organela. Uma dessas teorias, proposta por alguns autores, sugere que o CB se origine a partir de material nucleolar, que se fragmenta nas etapas iniciais da espermatogênese e, em seguida, migra para o citoplasma. O objetivo do presente estudo foi acompanhar o ciclo nucleolar por meio de análises citoquímicas – hematoxilina-eosina (HE); azul de toluidina (AT); variante da concentração crítica de eletrólitos (CEC); reação de Feulgen; impregnação por íons prata (AgNOR); citogenéticas – impregnação por íons prata (AgNOR), e análises ultra-estruturais – microscopia eletrônica de transmissão (MET), para verificar a relação da fragmentação do material nucleolar com a formação do corpo cromatóide (CB), em algumas espécies de vertebrados: *Tilapia rendalli* (Teleostei, Cichlidae); *Dendropsophus minutus* (Amphibia, Anura); *Phrynos geoffroanus* (Reptilia, Testudines) e coelho albino da raça Nova Zelândia – *Oryctolagus cuniculus* (Mammalia, Lagomorpha). Por meio das análises citoquímicas foi possível observar que ocorre uma fragmentação do material nucleolar no início da prófase I, em todas as espécies analisadas, e uma posterior reorganização do nucléolo no núcleo de espermátides iniciais, com uma área significativamente menor do que a área do nucléolo das espermatogônias. Três fenômenos podem contribuir para essa diferença significativa entre as áreas nucleolar de espermatogônias e espermátides: a) Modificação no estado funcional da célula; b) Diminuição no número de RONS nas espermátides; c) Migração de material nucleolar fragmentado para o citoplasma e passando a fazer parte da constituição química do CB. Por meio das análises ultra-estruturais nos túbulos seminíferos de *T. rendalli* e *D. minutus* foi possível observar que o CB começa a se formar no citoplasma das espermatogônias, por meio do acúmulo de pequenas “nuages” que começam a migrar do núcleo para o citoplasma e, posteriormente, se acumulam em regiões adjacentes ao núcleo, antes de ocorrer a fragmentação do material nucleolar. Já em *P. geoffroanus* e *O. cuniculus* esse complexo macromolecular citoplasmático somente inicia seu processo de formação nos espermátocitos primários. Em todas as espécies estudadas o CB aparece completamente formado no citoplasma dos espermátocitos primários, após ocorrer a fragmentação do material nucleolar. No citoplasma de espermátocitos primários essa organela está, freqüentemente, associada com aglomerados de mitocôndrias, em todos os animais utilizados. Essa estrutura também foi encontrada em associação com o complexo de Golgi, nos espermátocitos primários de *P. geoffroanus*. Nas espermátides iniciais de *P. geoffroanus* e *O. cuniculus* o CB foi observado em associação com mitocôndrias e próximos à região de formação da vesícula acrossomal, o que não foi observado em *T. rendalli* e em *D. minutus*. Nas espermátides iniciais de *P. geoffroanus* houve a associação entre material

esse ribonucleoproteico e gotículas de lipídios. Nas espermátides em alongamento, de todas as espécies estudadas, o CB foi observado na região da formação da bainha mitocondrial e cauda dos espermatozóides, indicando que essa estrutura pode estar relacionada com o direcionamento das mitocôndrias para a região posterior do núcleo. Portanto, conclui-se que, em todas as espécies estudadas, ocorre fragmentação do material nucleolar no início da prófase I e que, provavelmente, parte desse material nucleolar fragmentado migre para o citoplasma celular, auxiliando na formação do CB. Essa estrutura parece desempenhar importantes funções durante a espermatogênese dessas espécies de vertebrados.

Palavras-chave: Nucléolo; Ciclo nucleolar; Corpo cromatóide; Espermatogênese; Células germinativas; Citoquímica; Ultra-estrutura; Vertebrados.

Abstract

The chromatoid body (CB) is a cytoplasmic organelle that has a function related to RNA and protein accumulation and / or storage for later germ-cell differentiation. Many theories have been postulated in order to explain the origins of the CB material. One of the most accepted theory describes that it originates from a nucleolar material, where it was fragmented in the early spermatogenesis, and finally, this fragmented nucleolar material migrates to cytoplasm. The aims of the present study were: 1) monitoring the nucleolar material distribution by means of cytochemical techniques (hematoxylin–eosin (HE), toluidine blue (TB), modified Critical Electrolyte Concentration for detecting RNA (CEC), silver-ion impregnation (AgNOR) and Feulgen reaction), and by ultrastructural analysis (Transmission Electron Microscopy – TEM); and 2) comparing the nucleolar material distribution with the formation of CB in some vertebrate species: *Tilapia rendalli* (Teleostei, Cichlidae); *Dendropsophus minutus* (Amphibia, Anura); *Phrynos geoffroanus* (Reptilia, Testudines); and *Oryctolagus cuniculus* (Mammalia, Lagomorpha). For all analyzed species, the cytochemical techniques showed that the nucleolar fragmentation occurred during the beginning of prophase I, and the nucleolus reorganization occurred in the early spermatids nucleus. Statistical tests evidenced that area of the early spermatids nucleolus were smaller than the spermatogonia nucleolus area. Three phenomena can contribute for the statistical difference between the spermatogonia nucleolar area and the early spermatids nucleolar area: a) Modification of cell activity; b) Decrease of the number of NORs in the spermatids; c) Migration of the fragmented nucleolar material from the nucleus to the cytoplasm. This nucleolar material will participate in the CB formation process. The ultrastructural analysis showed an accumulation of nuages, which will form the CB before the nucleolar fragmentation, in the spermatogonia cytoplasm of *T. rendalli* and *D. minutus*. Otherwise in *P. geoffroanus* and *O. cuniculus* this macromolecular complex is formed only in the primary spermatocytes cytoplasm, when the nucleolus was fragmented. That structure was associated with mitochondrial clusters in the primary spermatocyte cytoplasm, in all studied species. This cytoplasmic organelle was observed in association with Golgi complex in the primary spermatocytes of *P. geoffroanus*. This unique cloud-like structure of male germ cells was detected near the region of the acrosomal vesicle formation, and it was associated with mitochondria in the early spermatids of *P. geoffroanus* and *O. cuniculus*. This association was absent in the early spermatids of *T. rendalli* and *D. minutus*. The CB was linked with some lipid droplets in the early spermatids cytoplasm of *P. geoffroanus*. The later spermatids for all studied species had CB near the region where the formation of mitochondrial sheath and spermatozoon tail take place, which suggests that CB is related to the development of these structures. In conclusion, the nucleolus was fragmented in the beginning of prophase I for all studied species. This

fragmented nucleolar material probably migrates to the cytoplasm, where it will participate in the formation of CB. The CB seems to have some important functions related to the spermatogenesis of some vertebrate species.

Key words: Nucleolus; Nucleolar cycle; Chromatoid body; Spermatogenesis; Germ cells; Citochemistry; Ultrastructure; Vertebrate.

INTRODUÇÃO GERAL

OBJETIVO GERAL

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Introdução

1.1. Corpo cromatóide (CB)

Toda célula germinativa do reino animal possui em seu citoplasma um acúmulo de material, chamado “nuage”. O corpo polar dos oócitos de *Drosophila* é, provavelmente, o tipo mais bem conhecido de “nuage”. Em células germinativas a “nuage” recebe o nome de corpo cromatóide (CB) (PARVINEN, 2005). O CB é uma organela citoplasmática que, aparentemente, possui um papel no estoque de RNA e proteínas para a diferenciação final dos espermatozoides (SÖDERSTRÖM; PARVINEN, 1976; SAUNDERS et al., 1992). O CB é considerado um complexo macromolecular que parece ter um papel como coordenador do controle pós-transcricional de produtos gênicos em células germinativas masculinas haplóides e também como centro de determinação dos destinos de RNAm (KOTAJA; SASSONE-CORSI, 2007). Devido a essas características, essa estrutura possui funções importantes no processo de espermiogênese, como por exemplo, comunicação celular entre as espermátides (VENTELÄ et al., 2003; PERUQUETTI et al., 2008 a,b), direcionamento de mitocôndrias para a região posterior do núcleo das espermátides (onde auxilia na formação da bainha mitocondrial e flagelo do espermatozoide) (FAWCETT et al., 1970; PERUQUETTI et al., 2008 a,b) e auxílio na formação do acrossomo do espermatozoide (SÖDERSTRÖM; PARVINEN, 1976; TANG et al., 1982; PERUQUETTI et al., 2008 a,b).

Alguns autores propõem que o CB se origine a partir de material nucleolar, que se fragmenta nas etapas iniciais da espermatogênese e migra para o citoplasma, formando pequenas “nuages”, que aos poucos se coalescem, originando a estrutura denominada CB (COMINGS; OKADA, 1972; ANDERSEN, 1978; ANDONOV, 1990). A fragmentação do material nucleolar, nas etapas iniciais da espermatogênese, também foi demonstrada por Takeuchi e Takeuchi (1990) e Peruquetti et al. (2008 a,b). Outros autores, porém, afirmam que o CB origina-se a partir de um material existente entre aglomerados de mitocôndrias, presente no citoplasma das células germinativas (FAWCETT et al., 1970). Portanto, ainda existem muitas dúvidas sobre a origem e a função do CB e, devido a aparente importância dessa estrutura para o evento da espermatogênese, suas características precisam ser melhor esclarecidas em todas as classes animais.

1.2. Nucléolo

O nucléolo é um domínio nuclear, que está relacionado com a compartimentalização das funções do núcleo (HERNANDEZ-VERDUN, 1991). É considerado um subcompartimento nuclear altamente organizado, não envolto por membrana e, também, é o local onde ocorre a

biogênese dos ribossomos (GERBI et al., 2003). O nucléolo interfásico encontra-se organizado ao redor de regiões cromossômicas denominadas “Regiões Organizadoras Nucleolares” (RONs). As RONs são locais dos cromossomos que possuem os genes que determinam a transcrição de RNA ribossômico (RNAr) que são, posteriormente, processados em pré-ribossomos, no interior do nucléolo. Os genes ribossomais estão presentes em seqüências de DNAr, altamente repetidas em *tandem*, existindo, portanto, 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 uma seqüência, deixando a estrutura com um aspecto de “árvore de natal”, como observado, primeiramente, por Miller e Beatty (1969) e, posteriormente, por Scheer et al. (1997).

O transcrito primário RNAr 45S é processado em RNAr maduros 18S, 5,8S e 28S e, concomitantemente, proteínas são adicionadas aos pré-ribossomos nascentes e, também, o RNAr 5S (sintetizado fora do nucléolo) vai sendo incorporado ao transcrito final (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 ao longo 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 nucleolares desorganizam-se e reorganizam-se, no decorrer do 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, em 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 et al., 2003). Estes snRNAs complexam-se com proteínas formando pequenas ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs) que representam uma classe estável de complexos RNA-proteínas encontrada no núcleo de todas as células eucarióticas (LÜHRMANN, 1990). Algumas dessas snRNPs possuem função importante no processamento do pré-RNAr 45S. Por exemplo, a snRNP denominada MRP é importante para a produção do RNAr 5,8S, e, em organismos superiores, a snRNP U8 é necessária para formar o RNAr 28S (GERBI et al., 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).

Aproximadamente 271 proteínas nucleolares estão envolvidas na síntese e no processamento de RNAr, porém existem outras proteínas que parecem possuir diferentes funções, como: modificações de nucleotídeos de snRNPs; biossíntese de sinais de reconhecimento de partículas; captura e liberação de proteínas envolvidas em silenciamento gênico (PEDERSON, 2002). Além disso, algumas proteínas que são responsáveis por mecanismos de controle do ciclo celular podem ser encontradas no nucléolo, que também 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 acídicas e enzimas. As histonas estão presentes nos três domínios nucleolares por estarem complexadas com DNAr. As proteínas acídicas 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), 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, 2004a; THIRY; GOESSENS, 1996). Alguns achados citológicos descrevem que as proteínas C23 e B23 são responsáveis pela impregnação pelos íons prata (OCHS; BUSCH, 1984; CASSEB-HASSAN; AZEREDO-OLIVEIRA, 1999).

1.3 Nucléolo durante a mitose

Em ciclos celulares de plantas e de animais, quando as células entram em mitose e, conseqüentemente, ocorre a interrupção da transcrição do DNAr, durante a prófase mitótica, os nucléolos desorganizam-se estruturalmente e, a maior parte das proteínas nucleolares, migra para o citoplasma. Durante a divisão mitótica, 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, durante a telófase ou 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; BARAN et al., 2002). 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).

1.4. Nucléolo durante a meiose

Alguns estudos foram realizados, com o objetivo de acompanhar o ciclo nucleolar durante a divisão meiótica, como os estudos utilizando-se células germinativas dos túbulos seminíferos de insetos hematófagos da família Triatominae (TARTAROTTI; AZEREDO-OLIVEIRA, 1999; SEVERI-AGUIAR et al., 2002; MORIELLE; AZEREDO-OLIVEIRA, 2004b) e estudos no epitélio seminífero de roedores (PERUQUETTI et al., 2008 a,b). Porém, ainda há muito para ser descrito sobre este fenômeno.

Nos trabalhos de Peruquetti et al. (2008 a,b), foram utilizadas várias técnicas citoquímicas, como, a técnica de Impregnação por Íons Prata (AgNOR), Reticulina de Gömöri, azul de toluidina (AT), variante da concentração eletrolítica crítica (CEC), reação de Feulgen, *Fast green* alcalino e *Fast green* ácido. Com base na análise e interpretação de todas as técnicas utilizadas, pode ser observada uma fragmentação do nucléolo e possível migração de parte desse material nucleolar fragmentado para o citoplasma dos espermátocitos primários e, conseqüentemente, uma aparente diminuição do volume nucleolar que se reorganiza no núcleo das espermátides iniciais. O fenômeno da desorganização e reorganização do material nucleolar, no epitélio germinativo, já havia sido observado por Takeuchi e Takeuchi (1990) em estudos utilizando-se células germinativas de

camundongo. Essas observações sugerem que a migração do material nucleolar para o citoplasma dos espermatócitos primários, possivelmente, está relacionada com a formação do corpo cromatóide (CB). Ainda nos estudos, realizados por Peruquetti et al. (2008 a,b), foi observada a marcação dos “corpos residuais” ou “esferas cromatofílicas”, na luz dos túbulos seminíferos, de uma forma muito semelhante à marcação do material nucleolar, indicando que essas duas estruturas possuem uma composição química muito semelhante. Esse achado biológico reforça a idéia de que o CB possui uma origem nucleolar, pois no final da diferenciação das espermátides, o CB é eliminado juntamente com os restos citoplasmáticos para a luz do túbulo seminífero, constituindo grande parte dos “corpos residuais”. Também nesses mesmos trabalhos, por meio da análise ultra-estrutural de túbulos seminíferos de roedores, utilizando-se microscopia eletrônica de transmissão (MET), a presença de material nucleolar pôde ser identificada, próximo a regiões de complexo sinaptonêmico (CS), nos espermatócitos primários. A análise ultra-estrutural revela a migração desse componente do núcleo para o citoplasma de espermatócitos primários, através do complexo do poro, ocasionando a formação de pequenas “nuages”, que se coalescem, formando o CB. As observações acima descritas reforçam a idéia de que o CB tenha uma função de estoque de RNAm e proteínas, que são utilizados nas fases finais da espermiogênese, como já proposto por outros autores (FIGUEROA; BURZIO, 1998; MORALES; HECHT, 1994; SÖNDERSTRÖM; PARVINEN, 1976; SÖNDERSTRÖM, 1977; MOUSSA et al., 1994; OKO et al., 1996), e, também, comprova que o CB é formado a partir de um material que migra do núcleo para o citoplasma, diferentemente do que foi proposto por Fawcett et al. (1970), que afirmavam que o CB originava-se a partir de um material inter-mitocondrial. Saunders et al. (1992) demonstraram que o TP2RNAm, que será traduzido em um tipo de proteína básica não-histônica (que será responsável pela compactação do núcleo das espermátides), é transcrito no início do processo de diferenciação e, posteriormente, é enviado para o citoplasma, onde fica armazenado de forma inativa, em uma estrutura perinuclear até o momento da tradução. Há indícios de que essa estrutura perinuclear possa ser o CB. Sendo assim, o CB também pode atuar na compactação do núcleo de espermátides.

Nas espermátides iniciais foi observado que o CB localizava-se em íntimo contato com o complexo de Golgi e, também, com as vesículas emitidas por essa organela (PERUQUETTI et al., 2008 a,b), o que poderia indicar uma atuação na formação do acrossomo (SÖNDERSTRÖM; PARVINEN, 1976; TANG et al., 1982). Também pode ser inferido que a ligação entre o complexo de Golgi e o CB pode estar relacionada com o acúmulo de enzimas provindas do complexo de Golgi e que se depositam ao redor do CB, para ação na região posterior do núcleo, nas fases finais da espermiogênese (ANTON, 1983). Também foi demonstrada a associação entre o CB e depósitos de gordura no citoplasma de espermátides em alongamento, indicando que esta estrutura pode participar

na absorção e no metabolismo de hormônios esteróides, nessas células germinativas em fases finais de diferenciação (PERUQUETTI et al., 2008 b).

A movimentação do CB através de pontes citoplasmáticas foi observada por Ventelä et al. (2003) e Peruquetti et al. (2008 a,b), sugerindo que esse fenômeno é importante para a divisão dos produtos do genoma haplóide das espermátides. Ventelä et al. (2003) demonstraram o transporte da proteína TRA54, que é processada no complexo de Golgi de espermátides e, em seguida, enviada para o sistema acrossômico da espermátide vizinha, provavelmente por meio da ação do CB. Em espermátides, foi observada, também, a íntima associação do CB com aglomerados de mitocôndrias (PERUQUETTI et al. 2008 a,b; FAWCETT et al., 1970) e com a região da manchete e ânulo (PERUQUETTI et al. 2008 a,b; PHILLIPS, 1974; SOLEY, 1994), dados que permitem concluir que o CB é importante na formação da bainha mitocondrial, da peça intermediária e do flagelo dos espermatozóides.

2. Objetivo geral

O objetivo do presente estudo foi acompanhar o ciclo nucleolar por meio de análises citoquímicas, aplicadas em cortes histológicos e em preparações citogenéticas de túbulos seminíferos, e também por análises ultra-estruturais do mesmo material, verificando a relação da fragmentação do material nucleolar, durante a divisão meiótica, com a formação do corpo cromatóide (CB), durante o processo de espermatogênese em quatro espécies de diferentes grupos de vertebrados: *Tilapia rendalli* (Teleostei, Cichlidae), *Dendropsophus minutus* (Amphibia, Anura), *Phrynops geoffroanus* (Reptilia, Testudines) e coelho albino da raça Nova Zelândia – *Oryctolagus cuniculus* (Mammalia, Lagomorpha).

3. 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. **Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie**, v. 104, p. 46-54, 1990.

ANTON, E. Association of Golgi vesicles containing acid phosphatase with the chromatoid body of rat spermatids. **Experientia**, v. 39, p. 393-394, 1983.

BARAN, V.; MERCIER, Y.; RENARD, J. P.; FLÉCHON, J. E. Nucleolar substructures of rabbit cleaving embryos: An immunocytochemical study. **Molecular Reproduction and Development**, v. 48(1), p. 34-44, 1997.

BARAN, V.; VIGNON, X.; LEBOURHIS, D.; RENARD, J. P.; FLÉCHON, J. E. Nucleolar changes in bovine nucleotransferred embryos. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 534-543, 2002.

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.

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.

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.

FLÉCHON, 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.

HERNANDEZ-VERDUN, D. The nucleolus today. **Journal of Cell Science**, v. 99, p. 465-471, 1991.

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.

KOTAJA, N.; SASSONE-CORSI, P. The chromatoid body: a germ-cell specific RNA-processing centre. **Nature reviews – Molecular Cell Biology**, v.8, p. 85-90, 2007.

LÜHRMANN, R. Functions of U-snRNPs. **Molecular Biology of Reproduction**, v. 14, p. 183-192, 1990.

MELLO, M. L. S. Relocation of RNA metachromasy at mitosis. **Acta Histochemica et Cytochemica**, v. 28, n.2, p. 149-154, 1995.

MILLER, O. L.; BEATTY, R. R. Visualization of nucleolar genes. **Science**, v.164, p. 955-957, 1969.

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. **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., 2004a.

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, 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/p1 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. Nucleologensis: 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.

PARVINEN, M. The chromatoid body in spermatogenesis. **International Journal of Andrology**, v. 28, p. 189-201, 2005.

PEDERSON, T. Proteomics of the nucleolus: more proteins, more functions? **TRENDS in Biochemical Sciences**, v. 27(3), p. 111-112, 2002.

PERUQUETTI, R.L.; ASSIS, I.M.; TABOGA, S.R.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Meiotic nucleolar cycle and chromatoid body formation during the rat (*Rattus norvegicus*) and mouse (*Mus musculus*) spermiogenesis. **Micron**, v. 39, p. 419-425, 2008a.

PERUQUETTI, R.L.; TABOGA, S.R.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. Characterization of Mongolian gerbil chromatoid bodies and their correlation with nucleolar cycle during spermatogenesis. **Reproduction in Domestic Animals**, doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01204.x, 2008b.

PHILLIPS, D. M. **Spermiogenesis**. New York: Academic Press, 1974.

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. **Anatomy and Embryology**, v. 188, p. 515-536, 1993.

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 [³H]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.

SUMMER, A. T. **Chromosome banding**. Unwin Human London, 434 p., 1990.

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.

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.

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

ZATSEPINA, O. V.; DUDNIC, O. A.; TODOROV, I. T.; THIRY, M.; SPRING, H.; TRENDELENBURG, 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.

**ARTIGOS CIENTÍFICOS A SEREM SUBMETIDOS PARA
PUBLICAÇÃO EM REVISTAS ESPECIALIZADAS**

Análise do ciclo nucleolar e sua relação com a formação do corpo cromatóide durante a espermatogênese de *Tilapia rendalli* (Teleostei, Cichlidae).

Rita Luiza Peruquetti

Sebastião Roberto Taboga

Maria Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira*

Universidade Estadual Paulista – UNESP/IBILCE, Departamento de Biologia.
Rua Cristóvão Colombo, 2265 – São José do Rio Preto, SP, Brasil, CEP 15054-000.

***Autor Correspondente:**

Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira
Departamento de Biologia – IBILCE/UNESP
Rua Cristóvão Colombo, 2265 – Jardim Nazareth
CEP 15054 000 São José do Rio Preto, SP, Brasil
Phone: +55 17 3221 2378
Fax: +55 17 3221 2390
e-mail: tercilia@ibilce.unesp.br

**O presente artigo foi escrito sob as normas da revista *Reproduction in Domestic Animals*:
Impresso (ISSN: 0936-6768); On-line (ISSN: 1439-0531).**

Resumo

O corpo cromatóide (CB) é uma organela citoplasmática característica de células germinativas e tem sido indicada como uma “reserva” ou “estoque” de RNA e proteínas para a diferenciação final dos espermatozóides. Acredita-se que essa estrutura citoplasmática seja parcialmente formada a partir de material nucleolar, que se fragmenta e se desorganiza no decorrer do processo de espermatogênese. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi acompanhar o ciclo nucleolar durante a espermatogênese de *Tilapia rendalli* (Teleostei, Cichlidae), e correlacionar esse ciclo nucleolar com a formação do CB nessa espécie de peixe. Para acompanhar o processo de desorganização e reorganização do nucléolo durante a espermatogênese foram utilizadas algumas técnicas citoquímicas, como, Hematoxilina-eosina (HE), azul de toluidina (AT), variante da concentração crítica de eletrólitos (CEC), reação de Feulgen e impregnação por íons prata (AgNOR) em cortes histológicos de testículos maduros de *T. rendalli* e, também, foi empregada a técnica de AgNOR em preparações citogenéticas do mesmo tecido. O número de nucléolos presentes nas espermatogônias e nas espermátides iniciais foi determinado e comparado por Análise de Variância de duas vias, completada pelo teste LSD para comparações múltiplas. As áreas nuclear e nucleolar das espermatogônias e espermátides iniciais foram mensuradas e, em seguida, comparadas por meio da aplicação do teste t independente. Para acompanhar a formação do CB no epitélio germinativo de *T. rendalli* foi aplicada a técnica convencional para análise em microscopia eletrônica de transmissão (MET). As técnicas citoquímicas aplicadas nos cortes histológicos e nas preparações citogenéticas, evidenciaram que ocorre uma desorganização e, conseqüentemente, uma fragmentação do material nucleolar enquanto os espermátócitos primários estão no leptóteno da prófase I meiótica. O nucléolo volta a se reorganizar no núcleo das espermátides iniciais, porém nas espermátides finais e nos espermatozóides maduros, não é mais possível a observação de material nucleolar organizado. Não houve diferença entre o número de nucléolos organizados presentes no núcleo das espermatogônias e das espermátides iniciais, porém a área nucleolar foi significativamente maior nas espermatogônias em relação à área nucleolar das espermátides iniciais, indicando que ocorre uma redução da área nucleolar durante a divisão meiótica. Por meio da análise ultra-estrutural foi possível observar que o CB começa a se formar discretamente, no citoplasma das espermatogônias, somente atingindo seu maior volume no citoplasma dos espermátócitos primários, fase onde está havendo a fragmentação do material nucleolar. O CB foi freqüentemente observado em associação com aglomerados de mitocôndrias, tanto no citoplasma dos espermátócitos primários quanto no citoplasma das espermátides iniciais e finais, sendo que nos espermátócitos primários e nas

espermátides iniciais essa associação foi observada em posições adjacentes ao núcleo e nas espermátides em alongamento essa mesma associação foi observada na região posterior do núcleo, onde haverá formação da bainha mitocondrial e cauda dos espermatozóides. Portanto, em *T. rendalli* o nucléolo parece estar relacionado com a formação do CB, pois no momento em que ocorre a fragmentação do nucléolo, nos espermátocitos primários, o CB atinge sua maior área no citoplasma, iniciando o desempenho de suas importantes funções durante a espermatogênese. Quando ocorre a reorganização do nucléolo nas espermátides iniciais, o mesmo apresenta uma área menor, devido a vários fatores, entre eles essa possível migração de material nucleolar do núcleo para o citoplasma, para auxiliar na formação do CB.

1. Introdução

Toda célula germinativa do reino animal possui em seu citoplasma, um acúmulo de material que é denominado “nuage”. O corpo polar dos oócitos de *Drosophila* é, provavelmente, o tipo mais bem conhecido de “nuage”. Em células germinativas a “nuage” é conhecida como corpo cromatóide (CB) (Parvinen, 2005). O CB é uma organela citoplasmática que, aparentemente, funciona como uma “reserva” ou “estoque” de RNA e proteínas para a diferenciação final dos espermatozóides (Söderström e Parvinen, 1976a; Saunders et al., 1992). O CB é considerado um complexo macromolecular que parece ter um papel como coordenador do controle pós-transcricional de produtos gênicos em células germinativas masculinas haplóides e, também, como centro de determinação dos destinos de RNAm (Kotaja et al., 2006; Kotaja e Sassone-Corsi, 2007). Análises ultra-estruturais revelaram que o CB possui uma estrutura porosa, contendo regiões que apresentam diferentes eletro-densidades (Figuroa e Burzio, 1998). A origem dessa estrutura citoplasmática ainda permanece incerta. Alguns autores defendem a idéia de que o CB seja proveniente de algum produto nuclear, que atravessa o complexo de poro em direção ao citoplasma das células (Parvinen e Parvinen, 1979; Parvinen et al., 1997). Existem autores que afirmam que o CB se origina a partir do acúmulo de um material inter-mitocondrial, no citoplasma das espermátides (Fawcett et al., 1970) ou de alguns produtos mitocondriais que são liberados para o citoplasma celular (Reunov et al., 2000). Porém, outros autores acreditam que o CB seja uma estrutura derivada da fragmentação e migração de material nucleolar do núcleo para o citoplasma (Comings e Okada, 1972; Andersen, 1978; Andonov, 1990; Peruquetti et al., 2008 a,b).

O nucléolo é um domínio territorial nuclear, que está relacionado com a compartimentalização das funções do núcleo (Hernandez-Verdun, 1991). É considerado um subcompartimento nuclear, altamente organizado e não envolto por membrana, e a

principal função atribuída ao nucléolo é o seu papel na biogênese de ribossomos (Gerbi et al., 2003; Boisvert et al., 2007; Sirri et al., 2008). A maquinaria nucleolar de biogênese de ribossomos está distribuída em três compartimentos nucleolares distintos, que podem ser observados em microscopia eletrônica de transmissão (MET): centro fibrilar (CF), componente fibrilar denso (CFD) e componente granular (CG). Cada um desses compartimentos abrigam etapas diferentes da biogênese de ribossomos, desde a transcrição de RNAr, maturação e *splicing* dos RNAr imaturos, até a reunião das partículas pré-ribossomais (Sirri et al., 2008). A grande maioria das proteínas nucleolares estão envolvidas na síntese e no processamento de RNAr, porém existem algumas proteínas que possuem diferentes funções, como: modificações de nucleotídeos de snRNPs; biossíntese de sinais de reconhecimento de partículas; captura e liberação de proteínas envolvidas em silenciamento gênico (Pederson, 2002). Além disso, proteínas como a Net1, Cdc14 e Sir2, que são responsáveis por mecanismos de controle do ciclo celular, podem ser encontradas nos compartimentos nucleolares (Shou et al., 1999; Straight et al., 1999; Visitin et al., 1999; Garcia e Pillus, 1999), além de proteínas supressoras de tumor, como a ARF (Carmo-Fonseca et al., 2000) e a p53 e a Myc (Montanaro et al., 2007). O nucléolo de células germinativas também pode atuar no controle do ciclo celular meiótico, pois abriga as proteínas Pch2 e Sir2, que estão ligadas ao silenciamento cromatínico e a promoção do *checkpoint* do paquíteno (San-Segundo e Roeder, 1999).

Muitos estudos têm sido realizados com a intenção de descrever a localização e função do CB durante a espermatogênese de várias espécies de animais, tanto vertebrados quanto invertebrados (Parvinen, 2005; Yokota, 2008), porém poucos desses estudos são realizados durante a reprodução de peixes (por exemplo, Braat et al., 1999; Knaut et al., 2000). Além disso, nenhum desses trabalhos tentou relacionar o ciclo nucleolar, e a conseqüente fragmentação do nucléolo, durante a divisão meiótica, com a formação do CB durante o processo de espermatogênese.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi acompanhar o ciclo nucleolar no decorrer da espermatogênese de *Tilapia rendalli* (Teleostei, Cichlidae), uma espécie que, por interesses sócio-econômicos, vem sendo introduzida no Brasil desde 1956 (Gurgel e Fernando, 1994; Soares et al., 2004), e correlacionar esse ciclo nucleolar com a formação do CB nessa espécie de peixe.

2. Material e Método

Foram utilizados cinco machos adultos de *Tilapia rendalli* (Teleostei, Cichlidae) provenientes da Mini-Estação de Piscicultura do CAUNESP / UNESP, São José do Rio Preto, SP. Após a coleta dos exemplares, os mesmos foram aclimatados em caixas de

cimento amianto 500 L (1 peixe . 5L⁻¹) durante 15 dias. A água foi mantida à 27° C e o fotoperíodo foi controlado em 12 h (7:00 às 19:00 h). Filtro biológico e aeração constante garantiram a qualidade da água. Os animais foram alimentados com ração para peixes tropicais (28% de proteína), oferecida em excesso no início da manhã e no final da tarde.

Após o período de aclimação, os espécimes foram mortos por imersão em dose letal de anestésico (benzocaína: 25,6 mg/L). Em seguida, os animais foram pesados e dissecados para a retirada das gônadas.

Análises Citoquímicas

Os testículos maduros dos exemplares de *T. rendalli* foram removidos e, imediatamente, fixados em Karnovsky, para posterior inclusão em historesina. Desses fragmentos testiculares foram obtidos cortes de 3 µm em micrótomo Leica RM 2155. Esses cortes foram submetidos a algumas técnicas citoquímicas para acompanhar a distribuição do material nucleolar nas células germinativas. As técnicas citoquímicas utilizadas foram: Hematoxilina-Eosina (Ribeiro e Lima, 2000); azul de toluidina (AT) pH 4,0 (Mello e Vidal, 1980); Variante da técnica da Concentração Crítica de Eletrólitos (CEC) (Mello et al., 1993); reação de Feulgen (Mello e Vidal, 1980, com modificações); Impregnação pelos íons prata (AgNOR) (Howell e Black, 1980). Todas as lâminas foram analisadas em microscópio Olympus BX60, com sistema analisador de imagem *Image Pró-Plus – Média Cybernetics*, Versão 6.1 para Windows.

Além das análises qualitativas da distribuição do material nucleolar, os cortes histológicos impregnados pela prata também foram utilizados para a realização de algumas análises quantitativas: análise do número de nucléolos presentes nas espermatogônias e nas espermátides iniciais; e análises das áreas nuclear e nucleolar nas espermatogônias e nas espermátides iniciais.

Análise do número de nucléolos presentes nas espermatogônias e nas espermátides

Foram analisadas $130,8 \pm 48,1$ espermatogônias e $145,0 \pm 5,05$ espermátides iniciais, de cada peixe utilizado (n=5). O número de nucléolos foi determinado para as todas as espermatogônias e as espermátides iniciais analisadas, em cada um dos cinco animais. Após a determinação de todos os valores absolutos, procedeu-se o cálculo da porcentagem do número de nucléolos existentes em cada tipo celular analisado. A porcentagem de células com diferente número de nucléolos foi utilizada devido à variação do número de células mensuradas em cada animal (n=5).

Análises das áreas nuclear e nucleolar nas espermatogônias e nas espermátides iniciais

As células analisadas anteriormente foram fotodocumentadas em um microscópio Olympus BX 40, com sistema analisador de imagem *Image Pró-Plus – Média Cybernetics*, Versão 4.5 para Windows. Posteriormente, foram realizadas medidas das áreas nuclear e nucleolar dessas células, em sistema analisador de imagens *Image J – Image Processing and Analysis in Java*, Versão 1.40 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Para as células com um único nucléolo, a medida da área obtida era prontamente mensurada. Já para as células que possuíam dois ou mais nucléolos, considerou-se como área nucleolar total (utilizada para realização das análises), a soma das áreas de cada nucléolo.

Análise dos dados

A normalidade dos dados foi testada por meio da análise do Skewness e do Kurtosis (Ha & Ha, 2007) e a homogeneidade de variância pelo teste F max (Zar, 1999). O número de nucléolos foi comparado entre espermatogônias e espermátides iniciais e dentro do mesmo tipo celular por Análise de Variância de duas vias, completada pelo teste LSD para comparações múltiplas (Zar, 1999). Já as áreas nucleares e nucleolares das espermatogônias foram comparadas com as áreas nucleares e nucleolares das espermátides iniciais, por meio do teste t independente (Zar, 1999). Para significância estatística, foi considerado $p \leq 0,05$, em todas as análises utilizadas.

Análise citogenética

Os testículos maduros dos exemplares de *T. rendalli* foram preparados seguindo o procedimento de Kligerman e Bloom (1977), adaptado por Bertollo (1978) que consiste em seccionar os testículos em fragmentos pequenos e tratá-los com uma solução hipotônica de KCl 0,075 M durante 20 minutos e, logo em seguida, fixar o material durante 10 minutos em metanol: ácido acético (3:1) recém-preparado, repetindo o processo de fixação mais uma vez. O material foi, então, retirado do fixador e alguns fragmentos do órgão foram transferidos para uma placa escavada, onde foram adicionadas de duas a três gotas de ácido acético a 50%. O material foi fragmentado com cuidado com intuito de se obter uma suspensão celular e com uma pipeta Pasteur, foi colocada uma gota de suspensão sobre uma lâmina aquecida a 30-35°C, re-aspirando-a imediatamente (esse procedimento foi repetido em mais dois ou três campos da lâmina). Em seguida, as lâminas foram submetidas à técnica de Impregnação por íons prata (AgNOR) (Howell e Black, 1980) para visualização e acompanhamento

do material nucleolar durante a divisão meiótica das células germinativas. Todas as lâminas foram analisadas em microscópio Olympus BX60, com sistema analisador de imagem *Image Pró-Plus – Média Cybernetics*, Versão 6.1 para Windows.

Análise ultra-estrutural (MET)

Amostras testiculares dos espécimes utilizados 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 (1%), durante 2 horas em geladeira, e 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. Desses fragmentos testiculares incluídos em araldite, foram obtidos cortes semi-finos e ultra-finos, em ultramicrotomo Leica Ultracut UCT. Os cortes ultra-finos 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 e Coggeshall, 1965). Os resultados das técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram documentados por eletromicrografias obtidas em microscópio eletrônico de transmissão Leo-Zeiss (Cambridge, UK) 906 com sistema analisador de imagens ITEM (*Soft Image System – Câmera Veleta 2K x 2K TEM CCD Camera*).

Nota ética

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEAA) – UNESP / Botucatu – SP, sob protocolo nº057/06.

3. Resultados

Análises citoquímicas

Cortes histológicos dos túbulos seminíferos de *Tilapia rendalli* foram submetidos a diversos procedimentos citoquímicos. A técnica de Hematoxilina-Eosina (HE) foi utilizada para análise geral da morfologia do tecido analisado, evidenciando um padrão de espermatogênese em cistos, com as espermatogônias distribuídas ao longo do comprimento do túbulo (Figura 1A). A análise da estrutura tubular dos testículos maduros analisados e a identificação das células germinativas foram feitas, respectivamente, segundo Grier (1981) e Hyder (1965). A técnica de azul de toluidina

(AT) permitiu observar que as células do epitélio germinativo possuíam uma intensa metacromasia em todos os domínios nucleares (Figuras 1C, 1D e 1E), e também uma basofilia citoplasmática. O grau de metacromasia, geralmente, variou com o nível de compactação do material genético, com a ploidia do núcleo celular e com a intensidade de complexação dos ácidos nucleicos com corpúsculos de ribonucleoproteínas (RNPs). A técnica de coloração pelo AT foi utilizada como controle para a técnica variante da concentração crítica de eletrólitos (CEC) (Figura 1B). Com a aplicação desse procedimento foi possível observar a presença de nucléolo organizado nas espermatogônias (Figura 1F), material nucleolar fragmentado e distribuído ao redor dos cromossomos nos espermatócitos primários (Figura 1G), e ausência de marcação nucleolar ou marcação nucleolar muito fraca nas espermátides iniciais (Figura 1H). A técnica de variante de CEC também permitiu observar a presença de alguns corpos residuais no lúmen do túbulo seminífero, onde os espermatozóides em maturação são liberados (Figura 1B). A técnica citoquímica específica para detecção de DNA (reação de Feulgen) revelou todos os núcleos das células germinativas em cor púrpura, variando em intensidade de acordo com o grau de ploidia, estado funcional e compactação da cromatina das células. Dessa forma, as células de Sertoli, espermatogônias (Figura 1I) e espermátides iniciais (Figura 1K) mostraram a cromatina levemente corada em rosa, enquanto que as demais células do epitélio germinativo, como os espermatócitos primários (Figura 1J), as espermátides próximas à luz do túbulo e os espermatozóides apresentaram-se com uma coloração mais intensa. Pode-se observar a presença de regiões heterocromáticas destacadas mais fortemente, sempre em associação com halos claros, que indicam a presença de material nucleolar (Figuras 1I, 1J e 1K). Pode ser notado que as áreas claras são mais evidentes nas espermatogônias e nos espermatócitos primários do que nas espermátides iniciais, indicando a ocorrência de fragmentação e diminuição da área nucleolar nas nesse tipo celular. A impregnação pelos íons prata (AgNOR) evidenciou as regiões nucleolares das diferentes células do túbulo seminífero, sendo que nas espermatogônias o nucléolo foi claramente destacado (Figura 1L), enquanto que nos espermatócitos primários (Figura 1M) e nas espermátides iniciais (Figura 1N), o nucléolo apresentou-se fragmentado e com área reduzida.

Análise do número de nucléolos presentes nas espermatogônias e nas espermátides iniciais

Não houve interação entre o tipo celular e o número de nucléolos ($F = 0,5788$; $p = 0,633$). No entanto, houve diferença no número de nucléolos em cada tipo celular ($F = 826,10$; $p = 0,000$). Todas as espermatogônias e espermátides iniciais analisadas possuíam entre 1 e 4 nucléolos. A maioria das células apresentaram apenas 1 nucléolo

(LSD, $p < 0,000$). O número de células com 2 nucléolos foi maior do que com 3 e 4 nucléolos (LSD, $p < 0,000$). As porcentagens de espermatogônias e espermátides iniciais com maior número de nucléolos (três e quatro) foram semelhantes (LSD, $p = 0,355$). Não houve diferença no número de nucléolos entre os dois tipos celulares analisados ($F = 0,01902$; $p = 0,891$) (Figura 2).

Análises das áreas nuclear e nucleolar nas espermatogônias e nas espermátides iniciais

Foi encontrada diferença significativa entre as áreas nucleares das espermatogônias e das espermátides iniciais ($t = 7,15$; $p = 0,000097$) e, entre as áreas nucleolares das espermatogônias e das espermátides iniciais ($t = 12,40$; $p = 0,0000002$). Em ambos os casos, a área nas espermatogônias foi maior do que nas espermátides iniciais (Figura 3).

Análise citogenética

Nas preparações citogenéticas impregnadas pela prata foi possível encontrar espermatogônias em metáfase, revelando um número cromossômico diplóide $2n = 44$ (Figuras 4A e 4B), sendo que alguns cromossomos apresentaram regiões mais fortemente coradas, indicando a localização das regiões organizadoras nucleolar (RONs) nessas posições. As espermatogônias em intérfase apresentaram nucléolos centrais organizados (Figura 4C). Nos espermatócitos primários em zigóteno (Figura 4D) e em paquíteno (Figura 4E) não foram observados corpúsculos nucleolares, demonstrando uma completa desorganização do nucléolo nesses estágios. Durante as fases de metáfase I (Figura 4F) e metáfase II (Figura 4G) não foi detectada a presença de material nucleolar organizado, porém os cromossomos apresentaram-se altamente impregnados pela prata. Células em telófase II foram observadas com núcleo fortemente impregnado pela prata (Figura 4H). Espermátides iniciais (redondas) e espermátides em alongamento foram observadas apresentando corpúsculos nucleolares no centro do núcleo (Figuras 4I e 4J), porém a área nucleolar foi, aparentemente, menor do que a área nucleolar das espermatogônias.

Análise ultra-estrutural (MET)

Os fragmentos testiculares de *T. rendalli* foram analisados ultra – estruturalmente (Figuras 5 e 6). Nas figuras 5A e 5B pode-se observar a ultra-estrutura de uma espermatogônia com nucléolo totalmente organizado e o início da formação de algumas “nuages” no citoplasma. Essas aglomerações de material ribonucleoproteico estão,

provavelmente, sendo formadas por meio de produtos nucleares que estão saindo do núcleo, através do complexo de poro, e se acumulando em regiões adjacentes ao envoltório nuclear. As espermatogônias apresentaram nucléolo em camadas concêntricas (Figura 5C). Na figura 5D foi possível observar um espermatócito primário com material nucleolar visivelmente em fragmentação e, no citoplasma, pode-se observar o CB com uma grande área e próximo a aglomerados de mitocôndrias. É possível observar a presença de uma material ribonucleoproteico, semelhante ao que está migrando do núcleo para o citoplasma, próximo a complexos sinaptonêmicos, no núcleo de espermatócitos primários (Figura 5G) . No citoplasma de espermatócitos primários o CB raramente é observado isolado (Figura 5H), na maioria das vezes o CB é observado em associação com aglomerados de mitocôndrias (Figuras 5D, 5E, 5G) e algumas vezes o CB é observado totalmente envolto por mitocôndrias (Figura 5F). Em espermátides em alongamento o CB começa a adquirir um aspecto granuloso (Figura 6A), e parece sofrer uma redução de área sendo sempre observado em associação com mitocôndrias que estão sendo direcionadas para a região de formação da bainha mitocondrial (Figura 6C) e em associação com os centríolos da região onde haverá a formação da cauda do espermatozóide (Figuras 6B e 6D). Nas espermátides finais, já diferenciadas, não foi possível observar a presença de acúmulo de material ribonucleoprotéico em nenhuma região celular (Figuras 6E e 6F).

4. Discussão

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a fragmentação nucleolar, durante a meiose masculina de *Tilapia rendalli*, e verificar sua relação com a formação do corpo cromatóide (CB).

O nucléolo é um domínio nuclear, que está relacionado com a compartimentalização das funções do núcleo (Hernandez-Verdun, 1991), sendo que a principal função atribuída ao nucléolo está relacionada com sua ativa e imprescindível participação na biogênese de ribossomos (Gerbi et al., 2003; Boisvert et al., 2007; Sirri et al., 2008). Embora o nucléolo seja preliminarmente associado com a biogênese de ribossomos, várias linhas de pesquisa têm demonstrado que ele possui funções adicionais. Algumas dessas funções são: regulação da mitose, progressão do ciclo celular e da proliferação celular, muitas formas de resposta ao estresse celular, biogênese de muitas partículas de ribonucleoproteínas e relação como algumas doenças humanas como o câncer, infecções virais e doenças degenerativas (Boisvert et al. 2007). O tamanho do nucléolo aumenta e diminui em células em crescimento e células em período de restrição, e ele se organiza e se desorganiza a cada ciclo celular mitótico ou meiótico (Pikaard, 2002; Teruel et al., 2007). Além disso, o próprio nucléolo abriga as

proteínas Pch2 e Sir2 que são responsáveis pelo *checkpoint* do paquíteno, reprimindo a recombinação nas regiões de DNAr (Garcia e Pillus, 1999; San-Segundo e Roeder, 1999).

Por meio da aplicação de algumas técnicas citoquímicas, aplicadas em cortes histológicos e preparações citogenéticas de túbulos seminíferos de *T. rendalli*, foi detectado que em espermatogônias são observados de 1 a 4 corpúsculos nucleolares organizados. Já nos espermátocitos primários ocorre uma completa fragmentação do nucléolo, durante o leptóteno da prófase I e, posteriormente, nas espermátides iniciais, ocorre a reorganização da estrutura nucleolar, podendo novamente ser observado de 1 a 4 corpúsculos nucleolares organizados, logo após o final da segunda divisão meiótica. Esse fenômeno da fragmentação nucleolar durante a prófase I e, posterior reorganização desses nucléolos nas espermátides iniciais, já foi amplamente descrito em vários trabalhos (por exemplo, Takeuchi e Takeuchi, 1990; Peruquetti et al. 2008a,b). Também já foi observada a diminuição da quantidade das proteínas C23 e B23, presentes no CF e CFD e que são responsáveis, respectivamente, pela transcrição de RNAr e clivagem dos pré-RNAr, no nucléolo de espermátocitos e espermátides de camundongo (Biggiogera et al.,1991). Todos esses dados indicam a ocorrência de fragmentação nucleolar no início prófase meiótica e sua posterior reorganização no núcleo de espermátides iniciais. Também é descrito que, em alguns cordados, há uma vigorosa atividade nucleolar na prófase I, com atividade máxima em paquíteno (Hofgärtner et al, 1979; Schmid et al., 1982; Wachtler e Stahl, 1993; Teruel et al, 2007). Esse fato não foi observado em *T. rendalli*, onde a atividade nucleolar perdurou somente até leptóteno, pois no zigóteno não observamos mais nenhum nucléolo organizado. Esse processo de fragmentação nucleolar assemelha-se muito com o processo que ocorre em humanos, onde a fragmentação nucleolar ocorre já nas espermatogônias B, indicando a ocorrência de interrupção da transcrição de DNAr no estágio de pré-leptóteno. (Hartung et al., 1990). Nas espermátides finais e nos espermatozoides maduros os nucléolos desorganizam-se novamente e não foram mais observados. A presença do nucléolo no espermatozoide não é necessária, uma vez que após a fecundação os nucléolos dos pró-núcleos masculino e feminino são, ambos, de origem materna. Trabalhos recentes demonstraram que o nucléolo materno, junto com outros elementos nucleoplasmáticos, são essenciais para o desenvolvimento embrionário (Lefrève, 2008).

O número de nucléolos presentes nas espermatogônias e nas espermátides iniciais foi registrado e comparado, para verificar se ocorre uma diminuição desse número, após a divisão celular meiótica. Não houve diferença significativa no número de nucléolos entre os dois tipos celulares analisados, sendo que, tanto as espermatogônias quanto as espermátides iniciais, em sua grande maioria, apresentaram um único nucléolo. Células com dois nucléolos foram observadas em segunda maior quantidade

e, células com três e quatro nucléolos, foram observadas com uma frequência muito baixa. É bem conhecido que o número de nucléolos de uma célula germinativa está relacionado com o número de RONS que ela possui (Guo et al., 1996; Teruel et al., 2007). Sendo assim, nas espermatogônias diplóides seria esperado encontrar o dobro de nucléolos do que o encontrado nas espermátides iniciais haplóides. Porém, como a grande maioria das espermatogônias possuía um nucléolo, tal diferença não pode ser detectada.

As áreas nuclear e nucleolar foram mensuradas nas espermatogônias e nas espermátides iniciais para testar se os nucléolos, que se reorganizam nas espermátides iniciais, possuem a mesma área, ou uma área menor, do que os nucléolos das espermatogônias. Foi encontrado que as áreas nuclear e nucleolar nas espermatogônias foram significativamente maiores quando comparadas às áreas nuclear e nucleolar das espermátides iniciais, indicando que ocorre uma redução do tamanho do nucléolo de um tipo celular para outro. Tem sido demonstrado que o tamanho do nucléolo é proporcional à quantidade de síntese de RNAr (Caspersson, 1950), que o tamanho da RON (número de cístrons de RNAr) é, em geral, correlacionado com seu nível de expressão (Shubert e Künzel, 1990), que a hipertrofia do nucléolo é um estado em que a síntese de RNAr e ribossomos está aumentada (Nakamoto et al., 2001) e que um nucléolo grande pode estar correlacionado com atividade de divisão celular e com estágios que possuem uma alta demanda de proteína (Mosgoeller, 2004). Todos esses fatos podem ser usados para explicar a redução da área nucleolar nas espermátides, porém essa redução da área nucleolar das espermátides iniciais também pode estar relacionada com a fragmentação do material nucleolar, no início da prófase I, e migração de parte desse material para o citoplasma das células germinativas, onde esse material participaria na formação do corpo cromatóide (CB).

O CB é uma organela citoplasmática característica de células germinativas e tem sido indicada como uma “reserva” ou “estoque” de RNA e proteínas para a diferenciação final dos espermatozóides (Söderström e Parvinen, 1976a; Saunders et al., 1992). A ação dessa estrutura parece ser muito importante para o processo de espermatogênese, pois, a presença de mutações na proteína TDR1/MTR-1 e no antígeno de histocompatibilidade OX3, presentes no CB, causam esterilidade em ratos (Head e Kresge, 1985; Chuma et al., 2006). Porém, apesar da importância dessa estrutura para o processo espermatogênese, sua origem ainda permanece incerta.

Para verificar a relação entre a fragmentação do material nucleolar, durante a espermatogênese de *T. rendalli* e, sua provável relação com o processo de formação do CB, no presente trabalho, foi utilizada a técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET). Foi observado que o CB se origina a partir de migração de material ribonucleoproteico do núcleo para o citoplasma das espermatogônias, através do

complexo do poro e se acumula em pequenas porções em regiões adjacentes ao núcleo celular. Nesse tipo celular o nucléolo ainda está organizado, não podendo contribuir para a formação inicial da estrutura. Porém, é na fase de espermatócito primário que o CB atinge o seu maior volume, ficando completamente formado e pronto para desempenhar suas funções. Nesse tipo celular ocorre fragmentação nucleolar e parte desse material nucleolar fragmentado deve migrar para o citoplasma e se unir com o material ribonucleoprotéico, já depositado naquela região, passando a fazer parte da constituição química do CB. Essa formação do CB em *T. rendalli* é diferente da que ocorre em cágados (*Phrynosops geoffroanus*) (Peruquetti, 2009) e em alguns mamíferos, como, ratos (*Rattus norvegicus*), camundongos (*Mus musculus*) (Peruquetti et al., 2008a), e gerbilos (*Meriones unguiculatus*) (Peruquetti et al., 2008b), pois nessas espécies de o CB começa a se formar somente na fase de espermatócito primário. Outros autores também demonstram a formação do CB ocorrendo somente na fase de espermatócitos primário (Kotaja e Sassone-Corsi, 2007).

Observações obtidas por meio das análises dos espermatócitos primários em paquíteno, no presente trabalho, demonstraram um material ribonucleoprotéico, semelhante ao material que migra para o citoplasma para a formação do CB, localizado próximo ao complexo sinaptonêmico (CS), indicando que essa estrutura poderia estar armazenando RNAm, que, ainda estaria sendo transcrito nessa fase, para ser usado em fases posteriores da diferenciação celular. Essa função de armazenamento de RNAm, que é proposta para o CB, é de relevante importância, pois 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, por meio da identificação de vários componentes diferentes, sob a aplicação de diversos tratamentos (Söderström e Parvinen, 1976b; Söderström, 1977; Morales e Hecht, 1994; Moussa et al., 1994; Oko et al., 1996; Figueroa e Burzio, 1998). 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 e Burzio, 1998), actina (Walt e Armbruster, 1984; Aumüller e Seitz, 1988) e íons cálcio (Andonov e 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 espermatócitos e das espermátides. A alta mobilidade da organela também foi registrada por Parvinen et al. (1997) onde o CB foi observado em rápida

mudança de posição em relação ao envelope nuclear, complexo de Golgi e áreas de cromatina clara nuclear em espermátides iniciais vivas de rato.

Os resultados do presente estudo também demonstraram uma intensa 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 a partir de um material inter-mitochondrial (Fawcett et al., 1970). Outros autores acreditam que o CB seja parcialmente formado por produtos do genoma nuclear e suplementado por produtos do genoma mitocondrial (Reunov et al., 2000). Existe ainda uma indicação de que a ligação entre CB e mitocôndrias esteja relacionada com a participação do CB na síntese e no transporte de apocitocromos c_1 , uma isoforma do citocromo c somente expressa nos testículos (Hess et al., 1993). Além disso, foi detectada a presença da citocromo c oxidase (COXI) codificada pelo genoma mitocondrial no CB (Haraguchi et al., 2005). Porém, como já proposto em outros trabalhos (Soley, 1994; Peruquetti et al., 2008 a,b), sugere-se, neste trabalho, que a ligação entre CB e mitocôndrias 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, pois aglomerados de mitocôndrias em associação com o CB foram observados na região posterior do núcleo de espermátides em alongamento, região onde irá ocorrer a formação da cauda e bainha mitocondrial dos espermatozóides. Em espermátides finais não foi observada a presença de material do CB em nenhum compartimento celular, sugerindo que esse material seja disperso nos corpos residuais e, possivelmente, degradado (Sud, 1961; Yokota, 2008).

Portanto, em *T. rendalli* o nucléolo parece estar relacionado com a formação do CB, pois no momento em que ocorre a fragmentação do nucléolo, nos espermatócitos primários, o CB atinge sua maior área no citoplasma iniciando o desempenho de suas importantes funções durante a espermatogênese. Quando ocorre a reorganização do nucléolo nas espermátides iniciais, o mesmo possuiu uma área menor, devido a vários fatores, entre eles essa possível migração de material nucleolar do núcleo para o citoplasma, para auxiliar na formação do CB.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem à MSc. Thaís Billalba Carvalho (Laboratório de Comportamento de Peixes – UNESP/IBILCE), à MSc. Roselene Carvalho (Laboratório de Ictiologia – UNESP/IBILCE) e ao Sr. Carlos Eduardo de Souza (Laboratórios de Biologia Animal – UNESP/IBILCE) pelo auxílio na coleta dos exemplares utilizados no

presente estudo, e ao MSc. Tiago da Silveira Vasconcelos (Laboratório de Herpetologia – UNESP/IB) e à MSc. Thaís Billalba Carvalho (Laboratório de Comportamento de Peixes – UNESP/IBILCE) pelo auxílio nas análises estatísticas. Agradecimentos especiais ao Sr. Luis Roberto Faleiros Jr (Laboratório de Microscopia e Microanálise – UNESP/IBILCE) e à MSc. Rosana Silistino de Souza (Laboratório de Morfologia – UNESP/IBILCE) por seu auxílio com as técnicas de laboratório. Agradecemos também a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro e pela bolsa de estudo, respectivamente.

6. Referências Bibliográficas

- Andersen K, 1978: Fine structure of spermatogonia and spermatocytes in the blue fox (*Alopex lagopus*). *Acta Veter. Scandi. (Denmark)*. 19 (2) 229-42.
- Andonov M, 1990: Further study of the chromatoid body in rat spermatocytes and spermatids. *Z. Mikrosk. Anat.* 104 46-54.
- Andonov MD, Chaldakov GN, 1989: Morphological evidence for calcium storage in the chromatoid body of rat spermatids. *Experientia*. 45 377-378.
- Aumüller G, Seitz J, 1988: Immunocytochemical localization of actin and tubulin in rat testis and spermatozoa. *Histochemistry*. 39 261-267.
- Bertolo LAC, 1978: Estudos citogenéticos no gênero *Hoplias* Gill, 1903 (Pisces, Erytrinae). Tese de Doutorado. Departamento de Matemática Aplicada à Biologia. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brasil.
- Biggiogera M, Kaufmann SH, Shaper JH, Gas N, Amalric F, Fakan S, 1991: Distribution of nucleolar proteins B23 and nucleolin during mouse spermatogenesis. *Chromosoma*. 100 162-172.
- Boisvert FM, van Koningsbruggen S, Navascués J, Lammond AI, 2007: The multifunctional nucleolus. *Nature Reviews: Mol. Cell Biol.* 8 574-585.
- Braat A, Zandbergen T, van de Water S, Goos H, Zivkovic D, 1999: Characterization of zebrafish primordial germ cells: morphology and early distribution of vasa RNA. *Dev. Dyn.* 216 153-167.
- Carmo-Fonseca M, Mendes-Soares L, Campos I, 2000: To be or not to be in the nucleolus. *Nat. Cell Biol.* 2 E107-E112.
- Caspersson T, 1950: Cell growth and cell function, a cytochemical study. WW Norton, New York, New York, USA,.
- Chuma S, Hosokawa M, Kitamura K, Kasai S, Fujioka M, Hiyoshi M, Takamune K, Noce T, Nakatsuji N, 2006: Tdrd1/Mtr-1, a tudor-related gene, is essential for male

germ-cell differentiation and nuage/germinal granule formation in mice. *PNAS* 103 15894-15899.

Comings DE, Okada TA, 1972: The chromatoid body in mouse spermatogenesis: Evidence that it may be formed by the extrusion of nucleolar components. *J. Ultrastr. Res.* 39 (1) 15-23.

Fawcett DW, Eddy EM, Phillips DM, 1970: Observations on the fine structure and relationships of the chromatoid body in mammalian spermatogenesis. *Biol. Reprod.* 2 (1) 129-153.

Figuroa J, Burzio LO, 1998: Polysome-like structures in the chromatoid body of rat spermatids. *Cell Tissue Res.* 291 575-579.

Garcia SN, Pillus L, 1999: Net results of nucleolar dynamics. *Cell* 97 825-828.

Gerbi SA, Borovjagin AV, Lange TS, 2003: The nucleolus: a site of ribonucleoprotein maturation. *Curr. Op. Cell Biol.* 15 318-325.

Grier HJ, 1981: Cellular organization of the testis and spermatogenesis in fishes. *Amer. Zool.* 21 345-357.

Guo M, Davis D, Birchler JA, 1996: Dosage effects on gene expression in a maize ploidy series. *Genetics* 142 1349-1355.

Gurgel JJS, Fernando CH, 1994: Fisheries in semi-arid Northeast Brazil with special reference to the role of tilapias. *Int. Revue ges. Hydrobiol.* 79(1) 77-94.

Ha RR, Ha JC, 2007: Integrative statistics for behavioral science. Pearson Custom Publishing, Boston, Washington, USA.

Haraguchi CM, Mabuchi T, Hirata S, Shoda T, Hoshi K, Akasaki K, Yokota S, 2005: Chromatoid bodies: aggresome-like characteristics and degradation sites for organelles of spermiogenic cells. *J. Histochem. Cytochem.* 53(4) 455-465.

Hartung M, Wachtler F, Lanversin A, Fouet C, Schwarzacher HG, Stahl A, 1990: Sequential changes in the nucleoli of human spermatogonia with special reference to rDNA location and transcription. *Tissue Cell* 22(1) 25-36.

Head JR, Kresge CK, 1985: Reaction of the chromatoid body with a monoclonal antibody to a rat histocompatibility antigen. *Biol. Reprod.* 33 1001-1008.

Hernandez-Verdun D, 1991: The nucleolus today. *J. Cell Sci.* 99 465-471.

Hess RA, Miller LA, Kirby JD, Margoliash E, Goldberg E, 1993: Immunoelectron microscopic localization of testicular and somatic cytochromes *c* in the seminiferous epithelium of the rat. *Biol. Reprod.* 48 1299-1308.

Hofgärtner FJ, Schmid M, Krone W, Zenzes MT, Engel W, 1979: Pattern of activity of nucleolus organizers during spermatogenesis in mammals as analyzed by silver-staining. *Chromosoma* 71 197-216.

Howell WM, Black DA, 1980: Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: I-step method. *Experientia.* 36 104-105.

Hyder M, 1965: Histological studies on the testis of *Tilapia leucostica* and other species of the genus *Tilapia* (Pisces: Teleostei). Trans. Amer. Microsc. Soc. 88(2) 211-231.

Kligerman AD, Bloom SE, 1977: Distribution of F-bodies, heterocromatin and nuclear organizers in the genome of the central mudminnow, Umbralimi. Cytogenet. Cell Genet. 18 182-196.

Knaut H, Pelegri F, Bohmann K, Schwarz H, Nusslein-Volhard C, 2000: Zebrafish vasa RNA but not its protein is a component of the germ plasm and segregates asymmetrically before germline specification. J. Cell Biol. 149 875-888.

Kotaja N, Bhattacharyya SN, Jaskiewicz L, Kimmins S, Parvinen M, Filipowicz W, Sassone-Corsi P, 2006: The chromatoid body of male germ cells: Similarity with processing bodies and presence of Dicer and microRNA pathway components. PNAS. 103(8) 2647-2652.

Kotaja N, Sassone-Corsi P, 2007: The chromatoid body: a germ-cellspecific RNA-processing centre. Mol. Cell Biol. 8 85-90.

Lefèvre B, 2008: The nucleolus of the maternal gamete is essential for life. BioEssays 30 613-616.

Mello MLS, Vidal BC, Dantas MN, Monteiro ACP, 1993: Discrimination of the nucleolus by a critical electrolyte concentration method. Acta Histochem. Cytochem. 26 1-3.

Mello MLS, Vidal BC, 1980: Práticas de Biologia Celular. FUNCAMP Editora Edgard Blücher LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil.

Monesi V, 1965: Synthetic activities during spermatogenesis in the mouse RNA and protein. Exp. Cell Res. 39(1) 197-224.

Montanaro L, Treré D, Derenzini M, 2007: Nucleolus, ribosomes, and câncer. Am. J. Pathol. 173(2) 301-310.

Morales CR, Hecht NB, 1994: Poly(A)+ Ribonucleic acids are enriched in spermatocyte nuclei but not in chromatoid bodies in the rat testis. Biol. Reprod. 50 309-319.

Mosgoeller W, 2004: Nucleolar ultrastructure in vertebrates. In: Olson MOJ (ed) The nucleolus. Kluwer, New York, New York, USA.

Moussa F, Oko R, Hermo L, 1994: The immunolocalization of small nuclear ribonucleoprotein particles in testicular cells during the cycle of the seminiferous epithelium of the adult rat. Cell Tissue Res. 278 363-378.

Nakamoto K, Ito A, Watabe K et al, 2001: Increased expression of a nucleolar Nop5/Sik family member in metastatic melanoma cells: evidence for its role in nucleolar sizing and function. Am. J. Pathol. 159 1363-1374.

Oko R, Korley R, Murray MT, Hecht NB, Hermo L, 1996: 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. Mol. Reprod. Develop. 44 1-13.

- Parvinen M, 2005: The chromatoid body in spermatogenesis. *Int. J. Androl.* 28 189-201.
- Parvinen M, Parvinen L, 1979: Active movements of the chromatoid body: A possible transport mechanism for haploid gene products. *J. Cell Biol.* 80 621-628.
- Parvinen M, Salo J, Toivonen M, Nevalainen O, Soini E, Pelliniemi L, 1997: Computer analysis of living cells: movements of the chromatoid body in early spermatids compared with its ultrastructure in snap-frozen preparations. *Histochem. Cell Biol.* 108 77-81.
- Parvinen M, Vihko KK, Toppari J, 1986: Cell interactions during the seminiferous epithelial cycle. In: *Cytology: A survey of cell biology*. 3 ed. Academic Press, New York, New York, USA.
- Pederson T, 2002: Proteomics of the nucleolus: more proteins, more functions? *Trends Biochem. Sci.* 27(3) 111-112.
- Peruquetti RL, Assis IM, Taboga SR, Azeredo-Oliveira MTV, 2008a: Meiotic nucleolar cycle and chromatoid body formation during the rat (*Rattus norvegicus*) and mouse (*Mus musculus*) spermiogenesis. *Micron* 39 419-425.
- Peruquetti RL, Taboga SR, Azeredo-Oliveira MTV, 2008b: Characterization of Mongolian gerbil chromatoid bodies and their correlation with nucleolar cycle during spermatogenesis. *Reprod. Dom. Anim.* doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01204.x.
- Peruquetti RL, 2009: Caracterização do ciclo nucleolar e da formação do corpo cromatóide na espermatogênese de algumas espécies de vertebrados. Tese (Doutorado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas UNESP/IBILCE, São José do Rio Preto.
- Pikaard CS, 2002: Transcription and tyranny in the nucleolus: the organization, activation, dominance and repression of ribosomal RNA genes. In: Somerville CR, Meyerowitz EM (eds) *The Arabidopsis Book*. Rockville: American Society of Plant Biologists.
- Reunov A, Isaeva V, Au D, Wu R, 2000: Nuage constituents arising from mitochondria: Is it possible? *Develop. Growth Differ.* 42 139-143.
- Ribeiro MG, Lima SR, 2000: Iniciação às técnicas de preparação de material para estudo e pesquisa em morfologia, SEGRAC Editora e Gráfica Limitada, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.
- San-Segundo PA, Roeder GS, 1999: Pch2 links chromatin silencing to meiotic checkpoint control. *Cell* 97 313-324.
- Saunders PTK, Millar MR, Maguire SM, Sharpe RM, 1992: 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. *Mol. Reprod. Develop.* *33* 385-391.

Schmid M, Löser C, Schmidtke J, Engel W, 1982: Evolutionary conservation of a common pattern of activity of nucleolus organizers during spermatogenesis in vertebrates. *Chromosoma* *86* 149-179.

Shou W, Seol JH, Shevchenko A, Baskerville C, Moazed D, Chen ZW, Jang J, Shevchenko A, Charbonneau H, Deshaies RJ, 1999: Exit from mitosis is triggered by tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex. *Cell* *97* 233-244.

Shubert I, Künzel G, 1990: Position dependent NOR activity in barley. *Chromosoma* *99* 352-359.

Sirri V, Urcuqui-Inchima S, Roussel P, Hernandez-Verdun D, 2008: Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochem. Cell Biol.* *129* 13-31.

Soares RM, Magalhães VF, Azevedo SMFO, 2004: Accumulation and depuration of microcystins (cyanobacteria hepatotoxins) in *Tilapia rendalli* (Cichlidae) under laboratory conditions. *Aquat. Toxicol.* *70* 1-10.

Söderström K, 1977: Effect of actinomycin D on the structure of the chromatoid body in the rat spermatids. *Cell Tissue Res.* *184* 411-421.

Söderström K, Parvinen M, 1976a: Transport of material between the nucleus, the chromatoid body and the Golgi complex in the early spermatids of the rat. *Cell Tissue Res.* *168* 335-342.

Söderström K, Parvinen M. 1976b: Incorporation of [³H]uridine by the chromatoid body during rat spermatogenesis. *J. Cell Biol.* *70* 239-246.

Soley JT, 1994: Centriole development and formation of the flagellum during spermiogenesis in the ostrich (*Struthio camelus*). *J. Anat.* *185* 301-313.

Straight AF, Shou W, Dowd GJ, Turck CW, Deshaies RH, Johnson AD, Moazed D, 1999: Net1, a Sir2-associated nucleolar protein required for rDNA silencing and nucleolar integrity. *Cell* *97* 245-256.

Sud B, 1961: Morphological and histochemical studies of the chromatoid body and related elements in the spermatogenesis of rat. *Q. J. Microsc. Sci.* *102* 273-292.

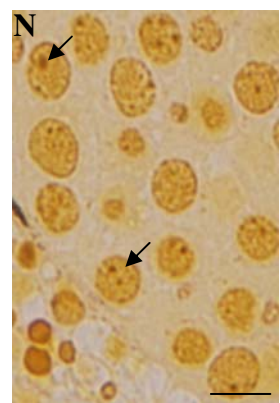
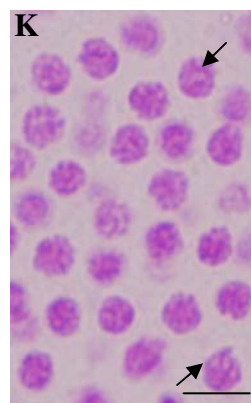
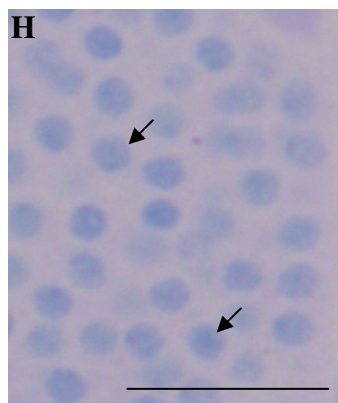
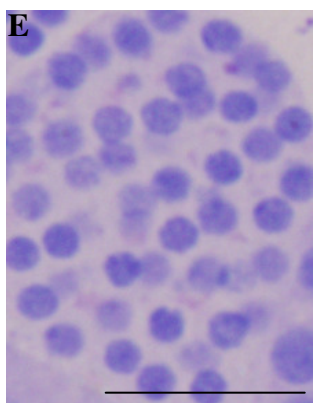
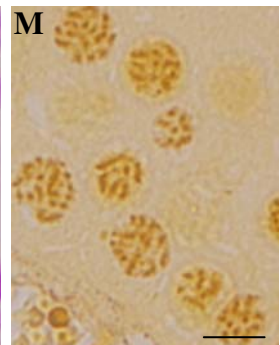
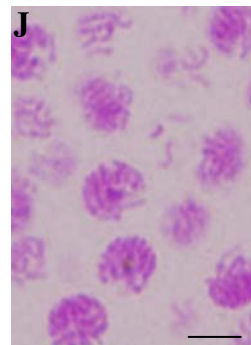
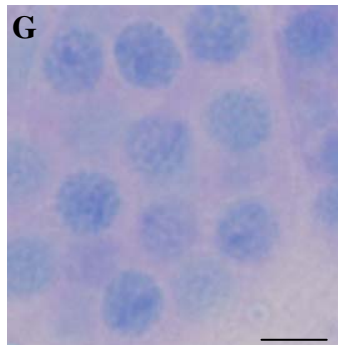
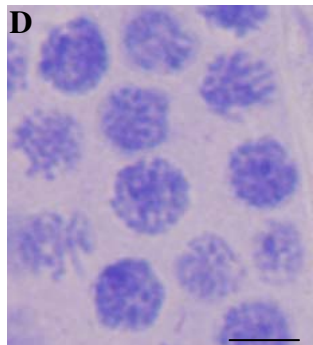
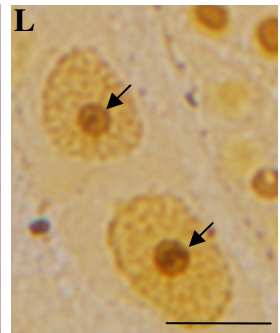
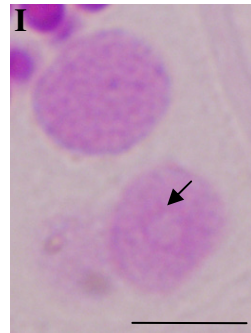
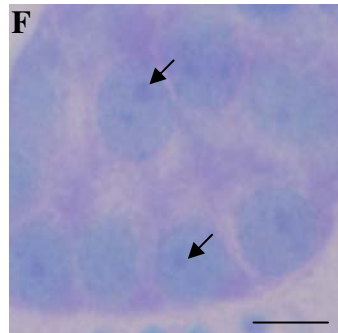
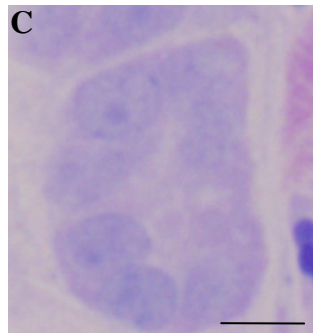
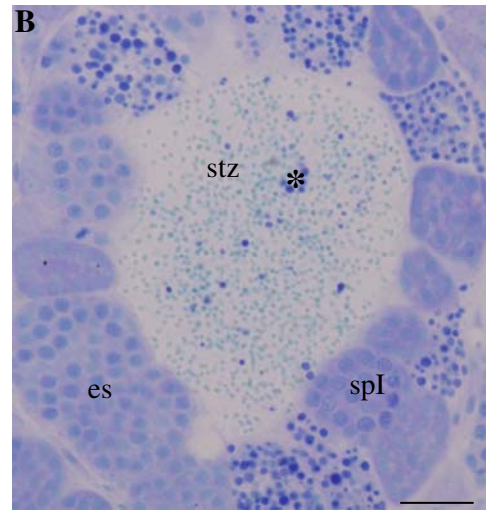
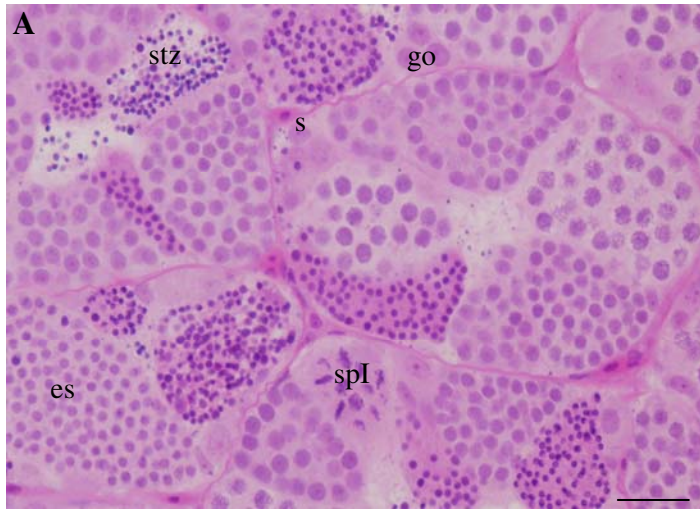
Takeuchi IK, Takeuchi YK, 1990: Ethanol-phosphotungstic acid and bismuth staining of spermatid nucleoli in mouse spermiogenesis. *J. Struct. Biol.* *103* 104-112.

Teruel M, Cabrero J, Perfecti F, Camacho JPM, 2007: Nucleolus size variation during meiosis and NOR activity of a B chromosome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosome Res.* *15* 755-765.

Venable JH, Coggeshall RA, 1965: A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* *25* 407-408.

- Visitin R, Hwang ES, Arnon A, 1999: Cfi1 prevents premature exit from mitosis by anchoring Cdc14 phosphatase in the nucleolus. *Nature* 398 818-823.
- Wachtler F, Stahl A, 1993: The nucleolus: a structural and functional interpretation. *Micron* 24 473-505.
- Walt H, Armbruster BL, 1984: Actin and RNA are components of the chromatoid bodies in spermatids of the rat. *Cell Tissue Res.* 236 487-490.
- Watson ML, 1958: Staining tissue section of electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4 475-478.
- Yokota S, 2008: Historical survey on chromatoid body research. *Acta Histochem. Cytochem.* 41(4) 65-82.
- Zar JH, 1999: *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, New Jersey, USA.

Figura 1: Análise citoquímica de túbulos seminíferos de *Tilapia rendalli*. A: Hematoxilina-eosina (HE); C-E: Azul de toluidina (AT); B, F-H: Variante da concentração eletrolítica crítica (CEC); I-K: Reação de Feulgen; L-N: Impregnação por íons prata. A e B: s (células de Sertoli); go (espermatogônias); spI (espermátocitos primários); es (espermátides iniciais); stz (espermatozóides); * (corpúsculos residuais). F, H, I, K, L e N: setas (marcações nucleolares). Barras: A, B, C, E e H: 20µm; D, F, G, I, J, K, L, M e N: 5µm.



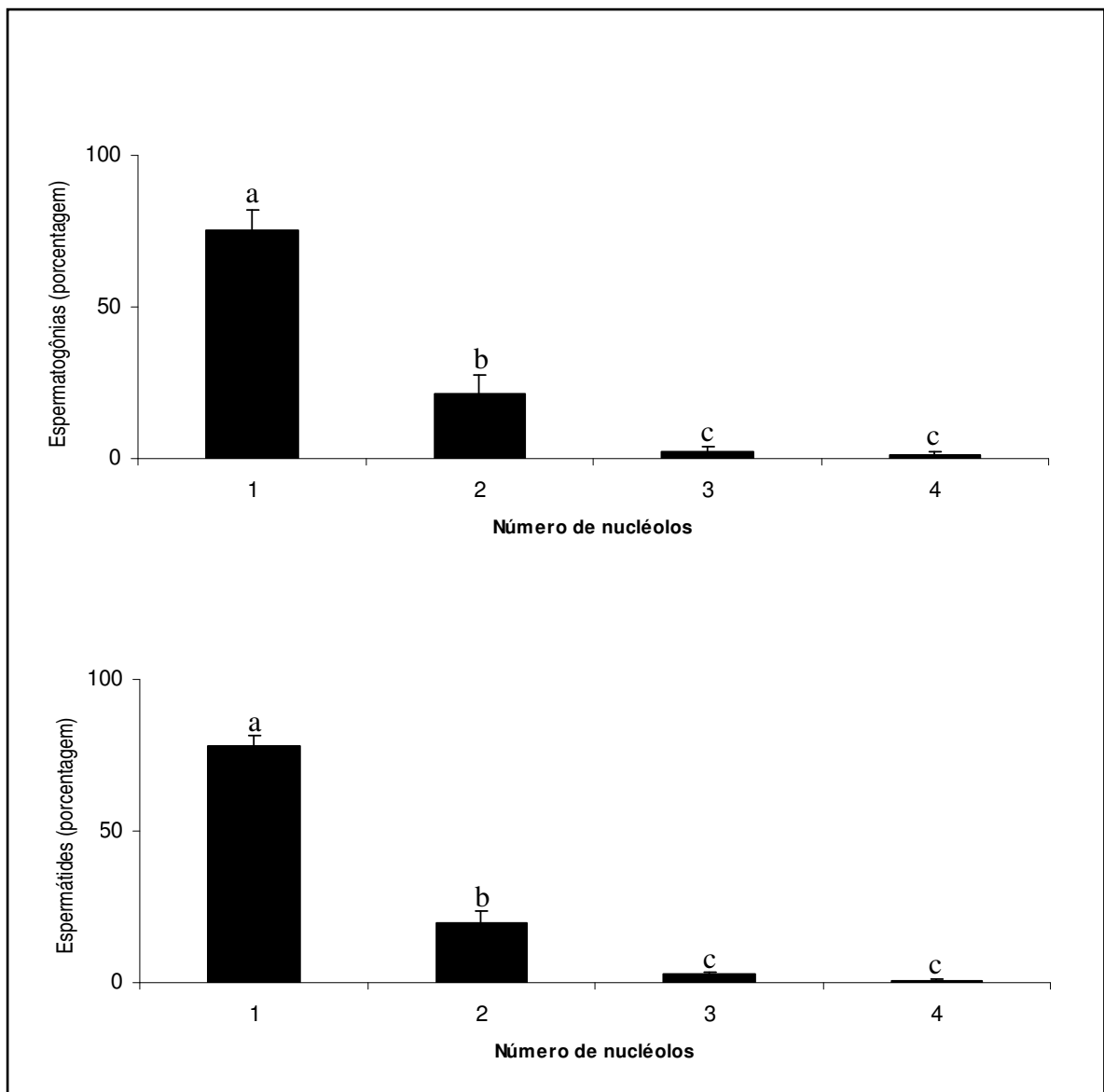


Figura 2: Porcentagem de células germinativas (espermatogônias e espermátides iniciais) de *Tilapia rendalli* que apresentaram de 1 a 4 nucléolos. As letras indicam diferença significativa no número de nucléolos em cada tipo celular (LSD, $p < 0,05$).

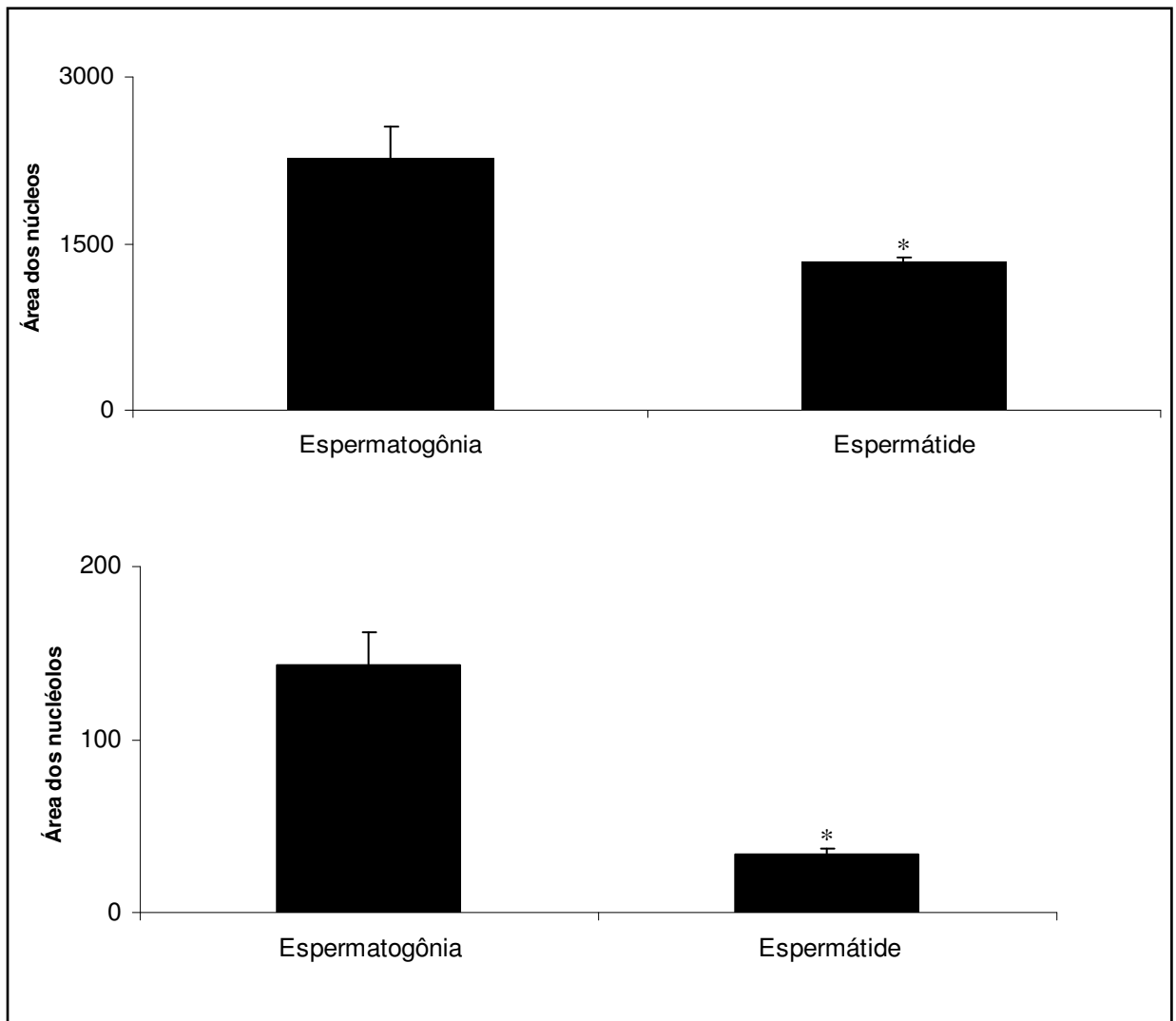


Figura 3: Área (nm²) do núcleo e do nucléolo de espermatogônias e de espermatídes iniciais de *Tilapia rendalli*. O asterisco indica diferença significativa entre os tipos celulares (teste t independente, p<0,05).

Figura 4: Células germinativas de *Tilapia rendalli*. Impregnação por íons prata (AgNOR). A e B: Metáfases de espermatogônias demonstrando um cariótipo $2n = 44$. Cromossomos com regiões organizadoras nucleolares (RONs) evidenciadas pela prata (setas). C: Espermatócito primário em início de divisão apresentando material nucleolar organizado (setas). D e E: Espermatócitos primários em zigóteno e paquíteno, respectivamente, com ausência de nucléolo organizado. F e G: Metáfases I e II, respectivamente, com ausência de nucléolo. H: Telófase II, com cromatina descondensada e uma forte marcação pela prata. I: Espermátides iniciais apresentando uma reorganização do nucléolo (setas). J: Espermátides iniciais com material nucleolar fragmentado (setas). Barras: $5\mu\text{m}$.

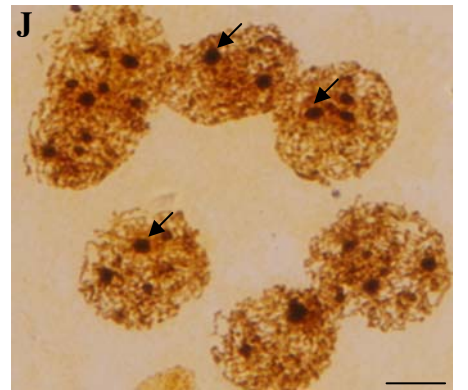
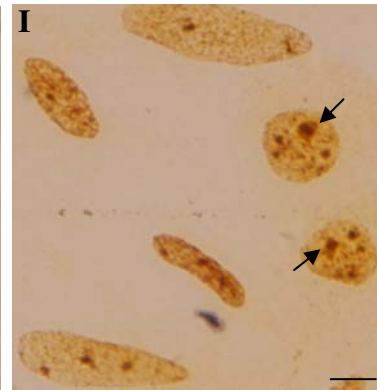
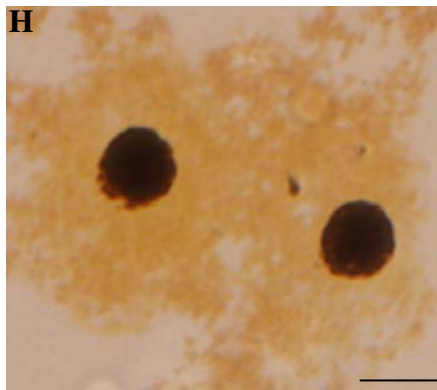
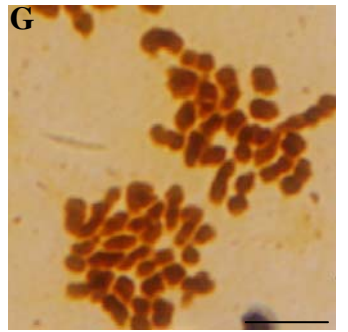
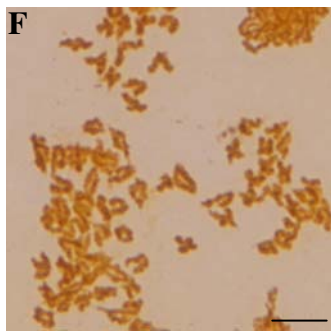
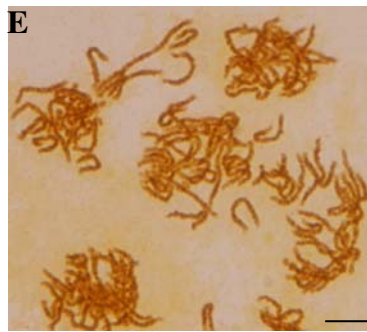
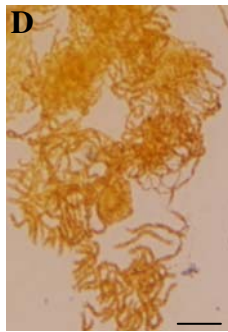
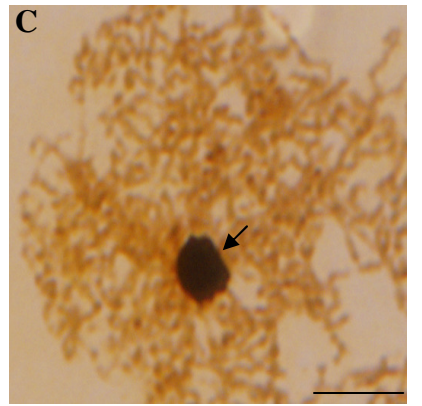
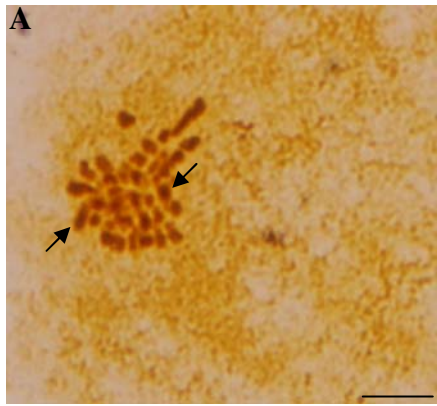
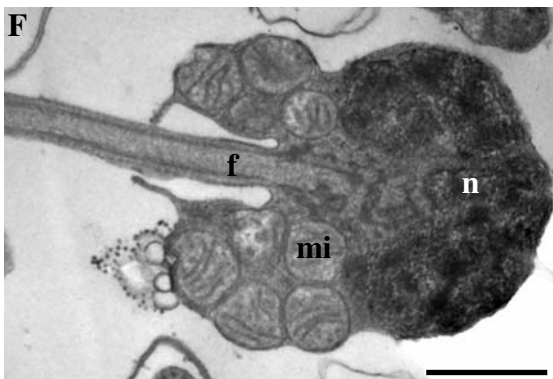
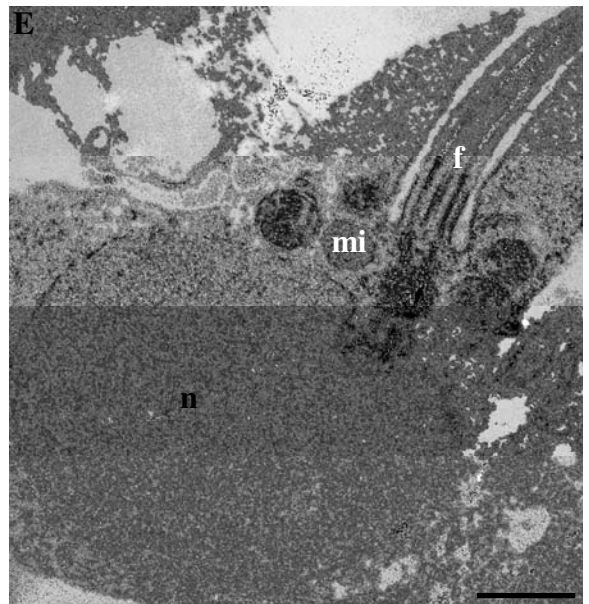
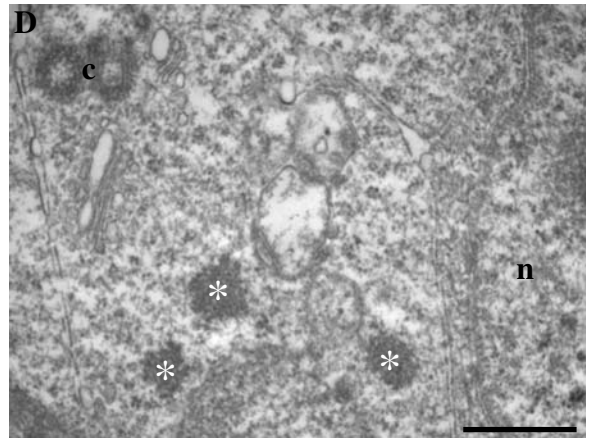
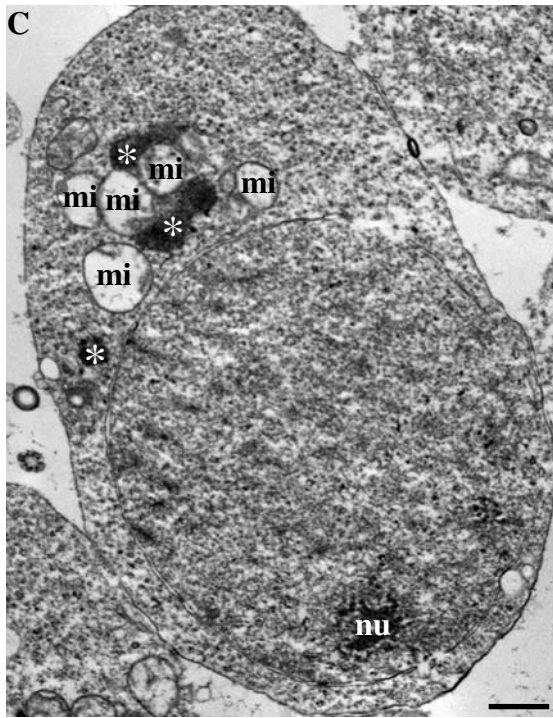
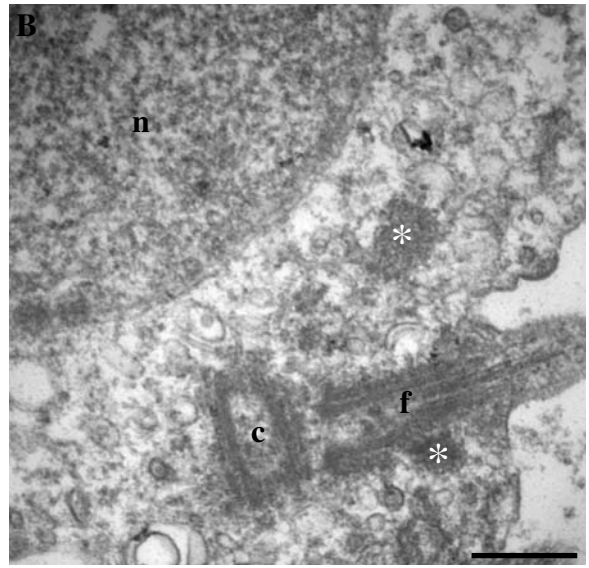
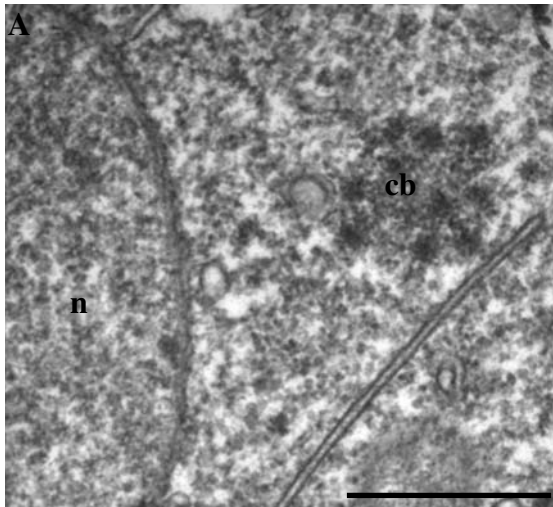


Figura 5: Análise ultra-estrutural de túbulos seminíferos de *Tilapia rendalli*. A e B: Espermatogônias com nucléolo (nu) do tipo granular organizado. Observa-se a migração de material ribonucleoproteico do núcleo para o citoplasma através do complexo de poro (setas) e a acumulação desse material em regiões adjacentes ao envoltório nuclear (asterisco). C: Detalhe do nucléolo de espermatogônia. D: Espermatócito primário inicial com nucléolo (nu) em fragmentação e corpo cromatóide (cb) em formação no citoplasma e, em associação com aglomerados de mitocôndrias (mi). E e G: Corpo cromatóide (cb) associado com aglomerados de mitocôndrias (mi) no citoplasma de espermatócitos primários. F: Aglomerados de mitocôndrias (mi) distribuídos ao redor do corpo cromatóide (cb) no citoplasma de espermatócitos primários. H: Corpo cromatóide (cb) em região adjacente ao envoltório nuclear de espermatócitos primários. É possível observar a presença de material ribonucleoproteico, semelhante ao material presente no citoplasma, em associação com o complexo sinaptonêmico (cabeça de seta). (n – núcleo). Barras = 10µm.

Figura 6: Análise ultra-estrutural de túbulos seminíferos de *Tilapia rendalli*. A: Espermátide final apresentando corpo cromatóide (cb) com aspecto granuloso. B e D: Observar a presença de material ribonucleoproteico (asterisco) próximo à região de formação da cauda do espermatozóide. C: Espermátide final apresentando a presença de um material nucleolar reorganizado (nu) e acúmulo de material ribonucleoproteico (asterisco) associado com aglomerados de mitocôndrias (mi), na região posterior da célula, onde haverá a formação da cauda e da bainha mitocondrial do espermatozóide. E e F: Espermatozoides em maturação não apresentando a presença de material ribonucleoproteico. (n – núcleo; c – centríolo; f – flagelo; mi – mitocôndria). Barras = 10µm.



Ciclo nucleolar e formação do corpo cromatóide: Qual a relação entre esses dois processos na espermatogênese de *Dendropsophus minutus* (Amphibia, Anura)?

Rita Luiza Peruquetti
Sebastião Roberto Taboga
Lia Raquel de Souza Santos
Classius de Oliveira
Maria Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira*

Universidade Estadual Paulista – UNESP/IBILCE, Departamento de Biologia.
Rua Cristóvão Colombo, 2265 – São José do Rio Preto, SP, Brasil, CEP 15054-000.

***Autor Correspondente:**

Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira
Departamento de Biologia – IBILCE/UNESP
Rua Cristóvão Colombo, 2265 – Jardim Nazareth
CEP 15054 000 São José do Rio Preto, SP, Brasil
Phone: +55 17 3221 2378
Fax: +55 17 3221 2390
e-mail: tercilia@ibilce.unesp.br

**O presente artigo foi escrito sob as normas da revista *Reproduction in Domestic Animals*:
Impresso (ISSN: 0936-6768); On-line (ISSN: 1439-0531).**

Resumo

O nucléolo é um domínio nuclear que desempenha vários papéis cruciais no núcleo. Além da sua função na produção de ribossomos, a atividade nucleolar também pode estar ligada com várias patologias. Acredita-se que a fragmentação do material nucleolar durante a espermatogênese possa estar relacionada com a formação do corpo cromatóide (CB). O CB é uma organela citoplasmática característica de células germinativas e tem sido indicada como uma “reserva” ou “estoque” de RNA e proteínas para a diferenciação final dos espermatozóides. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi acompanhar o ciclo nucleolar durante a espermatogênese de *Dendropsophus minutus* (Amphibia, Anura), e correlacionar a fragmentação e distribuição do material nucleolar com a formação do CB, nessa espécie de anfíbio. Para acompanhar o processo de desorganização e reorganização do nucléolo durante a espermatogênese foram utilizadas algumas técnicas citoquímicas, como Hematoxilina-eosina (HE), azul de toluidina (AT), variante da concentração crítica de eletrólitos (CEC), reação de Feulgen e impregnação por íons prata (AgNOR) em cortes histológicos de testículos de *D. minutus* e, também, foi empregada a técnica de AgNOR em preparações citogenéticas, do mesmo tecido. O número de nucléolos presentes nas espermatogônias e nas espermátides iniciais foi determinado e comparado por Análise de Variância de duas vias, completada pelo teste LSD para comparações múltiplas. As áreas nuclear e nucleolar das espermatogônias e espermátides iniciais foram mensuradas e, posteriormente, comparadas por meio da aplicação do teste t independente. Para acompanhar a formação do CB no epitélio seminífero de *D. minutus* foi aplicada a técnica convencional para análise em microscopia eletrônica de transmissão (MET). As técnicas citoquímicas aplicadas nos cortes histológicos e nas preparações citogenéticas, evidenciaram que ocorre uma desorganização e, conseqüentemente, uma fragmentação do material nucleolar após o paquíteno da primeira divisão meiótica, nos espermátocitos primários. O nucléolo volta a se reorganizar no núcleo das espermátides iniciais, porém nas espermátides finais e espermatozóides maduros, não é mais possível a observação de material nucleolar organizado. Não houve diferença entre o número de nucléolos organizados presentes no núcleo das espermatogônias e das espermátides iniciais, porém a área nucleolar foi significativamente maior nas espermatogônias em relação à área nucleolar das espermátides iniciais, indicando que ocorre uma redução da área nucleolar durante a divisão meiótica. Por meio da análise ultra-estrutural foi possível observar que o CB começa a se formar discretamente, no citoplasma das espermatogônias, somente atingindo seu maior volume no citoplasma dos espermátocitos primários, fase onde está havendo a fragmentação do material nucleolar. O CB foi observado em associação discreta com aglomerados de mitocôndrias tanto no

citoplasma dos espermátocitos primários quanto no citoplasma das espermátides iniciais, sendo que essa associação foi observada em posições adjacentes ao núcleo. Sendo assim, concluí-se que em *D. minutus* o nucléolo parece estar relacionado com a formação do CB, pois no momento em que ocorre a fragmentação do nucléolo, no núcleo dos espermátocitos primários, o CB parece completar seu processo de formação podendo, assim, iniciar o desempenho de suas importantes funções durante a espermatogênese. No momento da reorganização do nucléolo, no núcleo das espermátides iniciais, o mesmo possuiu uma área menor, devido a vários fatores, entre eles pode-se destacar essa possível migração de material nucleolar do núcleo para o citoplasma, para auxiliar na composição do CB.

1. Introdução

O nucléolo é um domínio territorial particular do núcleo, que está relacionado com a compartimentalização das funções nucleares (Hernandez-Verdun, 1991). A maioria dos eventos de biogênese de ribossomos, como a síntese de RNA ribossomal (RNAr) e o processamento e a reunião das subunidades ribossomais ocorre no interior do nucléolo (Cmarko et al., 2008). Por meio da microscopia eletrônica de transmissão é possível observar a existência de três compartimentos nucleolares distintos, que abrigam a maquinaria nucleolar de biogênese de ribossomos: centro fibrilar (CF), componente fibrilar denso (CFD) e componente granular (CG). Cada um desses compartimentos abrigam etapas diferentes da biogênese de ribossomos, desde a transcrição de RNAr, maturação e *splicing* dos RNAr imaturos, até a reunião das partículas pré-ribossomais (Sirri et al., 2008). Devido a isso, a principal função atribuída ao nucléolo é o seu papel na biogênese de ribossomos (Gerbi et al., 2003; Boisvert et al., 2007; Sirri et al., 2008). De fato, há aproximadamente 271 proteínas nucleolares envolvidas nesse processo de síntese e processamento de RNAr. Porém, vários estudos têm demonstrado que o nucléolo possui várias funções não ribossomais, como: modificações de nucleotídeos de ribonucleoproteínas nucleolares (snRNPs); biossíntese de sinais de reconhecimento de partículas; captura e liberação de proteínas envolvidas em silenciamento gênico (Pederson, 2002). Além disso, o nucléolo abriga as proteínas Net1, Cdc14 e Sir2, que são responsáveis por mecanismos de controle do ciclo celular (Shou et al., 1999; Straight et al., 1999; Visitin et al., 1999; Garcia e Pillus, 1999) e proteínas supressoras de tumor, como a ARF (Carmo-Fonseca et al., 2000) e a p53 e a Myc (Montanaro et al., 2007). O nucléolo de células germinativas pode atuar no controle do ciclo celular meiótico, pois abriga as proteínas Pch2 e Sir2, que estão ligadas ao silenciamento cromatínico e a promoção do *checkpoint* do paquíteno (San-Segundo e Roeder, 1999).

Alguns autores acreditam que a fragmentação do material nucleolar, durante o processo de espermatogênese, pode estar relacionada com a formação do corpo cromatóide (CB) (Comings e Okada, 1972; Andersen, 1978; Andonov, 1990; Peruquetti et al., 2008 a,b). O CB é uma organela citoplasmática característica de células germinativas e tem sido indicada como uma “reserva” ou “estoque” de RNA e proteínas para a diferenciação final dos espermatozoides (Söderström e Parvinen, 1976a; Saunders et al., 1992). O CB é considerado um complexo macromolecular que, provavelmente, desempenha um papel de coordenador do controle pós-transcricional de produtos gênicos em células germinativas masculinas haplóides e, também, funciona como um centro de determinação dos destinos de RNAm (Parvinen, 2005; Kotaja et al., 2006; Kotaja e Sassone-Corsi, 2007). Porém, alguns autores sugerem que o CB possui algumas características agregativas, indicando que ele não é um local de síntese, como proposto previamente, mas um local de degradação onde DNA, RNA e proteínas desnecessárias são digeridas (Haraguchi et al., 2005). Além das dúvidas que existem em relação à função dessa estrutura citoplasmática das células germinativas, a sua origem também permanece incerta. Em adição à origem nucleolar, proposta por alguns autores, outras origens são cogitadas para essa estrutura. Alguns autores defendem a idéia de que o CB seja proveniente de algum outro produto nuclear, que atravessa o complexo de poro em direção ao citoplasma das células (Parvinen e Parvinen, 1979; Parvinen et al., 1997). Existem, ainda, autores que afirmam que o CB se origina a partir do acúmulo de um material inter-mitochondrial no citoplasma das espermátides (Fawcett et al., 1970) ou de alguns produtos mitocondriais que são liberados para o citoplasma celular (Reunov et al., 2000).

Portanto, o objetivo do presente estudo, foi acompanhar o ciclo nucleolar, e sua conseqüente fragmentação durante a divisão celular meiótica, e verificar se existe alguma relação entre o material nucleolar fragmentado durante a espermatogênese e a formação do CB. O estudo foi realizado utilizando-se machos adultos de *Dendropsophus minutus*, uma espécie de anuro hílideo de regiões tropicais que possui reprodução do tipo contínua, onde pode haver uma interrupção parcial na atividade espermatogênica durante algumas estações do ano, mas espermatogônias primárias permanecem sensíveis à estimulação gonotrófica durante o ano todo (Lofts, 1974; Huang et al., 1997; Santos e Oliveira, 2007). A escolha de animais com reprodução do tipo contínua facilitou a execução do estudo, pois animais com atividade no epitélio germinativo, foram encontrados em todas as excursões ao campo, realizadas com o objetivo de coletar os exemplares a serem utilizados no presente trabalho.

2. Material e Método

Para as análises citoquímicas, para as medidas das áreas nuclear e nucleolar de espermatogônias e espermátides iniciais, e para a análise ultra-estrutural foram utilizados dez machos adultos de *Dendropsophus minutus* (Amphibia, Anura), que foram obtidos em coletas noturnas realizadas no município de Talhados – SP. Para a análise citogenética foram utilizados quinze machos adultos de *D. minutus* (Amphibia, Anura) que foram obtidos em excursões noturnas ao campo realizadas no Parque Estadual do Morro do Diabo (PEMD) – Teodoro Sampaio – SP. Todos os animais foram coletados, aclimatados em sacos plásticos contendo água e vegetação do ambiente de coleta, trazidos do campo para o laboratório, e, posteriormente, acondicionados em terrários no Biotério do Departamento de Zoologia e Botânica do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE/UNESP) – São José do Rio Preto – SP – Brasil. Após o período de aclimação, todos exemplares foram anestesiados e mortos por meio de inalação excessiva de éter etílico e, posteriormente, as gônadas foram retiradas e processadas para cada tipo de análise.

Análises citoquímicas

Os testículos dos exemplares de *D. minutus* foram removidos e, imediatamente, fixados em Karnovsky, para posterior inclusão em historesina. Desses fragmentos testiculares foram obtidos cortes de 3 µm em micrótomo Leica RM 2155. Esses cortes foram submetidos a algumas técnicas citoquímicas para acompanhar a distribuição do material nucleolar nas células germinativas. As técnicas citoquímicas utilizadas foram: Hematoxilina-Eosina (Ribeiro e Lima, 2000); azul de toluidina (AT) pH 4,0 (Mello e Vidal, 1980); Variante da técnica da Concentração Crítica de Eletrólitos – CEC (Mello et al., 1993); reação de Feulgen (Mello e Vidal, 1980, com modificações); Impregnação pelos íons prata (AgNOR) (Howell e Black, 1980). Todas as lâminas foram analisadas em microscópio Olympus BX60, com sistema analisador de imagem *Image Pró-Plus – Média Cybernetics*, Versão 6.1 para Windows.

Além das análises qualitativas da distribuição do material nucleolar, os cortes histológicos impregnados pela prata, provenientes de cinco animais, também foram utilizados para a realização de algumas análises quantitativas para acompanhamento do ciclo nucleolar durante a espermatogênese: análise do número de nucléolo nas espermatogônias e nas espermátides iniciais; e análise das áreas nuclear e nucleolar nas espermatogônias e espermátides iniciais.

Análise do número de nucléolos nas espermatogônias e nas espermátides

Foram analisadas espermatogônias ($109,8 \pm 6,14$ / cada animal) e espermatídes iniciais ($133,2 \pm 12,91$ / cada animal) em cada anfíbio utilizado ($n=5$). O número de nucléolos foi determinado para as espermatogônias e espermatídes iniciais analisadas em cada um dos cinco animais. Após a determinação de todos os valores absolutos, procedeu-se o cálculo da porcentagem de espermatogônias e espermatídes iniciais com diferentes números de nucléolos, uma vez que o total de células variou em cada animal utilizado ($n=5$).

Análises das áreas nuclear e nucleolar nas espermatogônias e espermatídes

Todas as células, utilizadas na análise anterior, foram fotodocumentadas em um microscópio Olympus BX 40, com sistema analisador de imagem *Image Pró-Plus – Média Cybernetics*, Versão 4.5 para Windows. Posteriormente, foram realizadas medidas das áreas nuclear e nucleolar dessas células, em sistema analisador de imagens *Image J – Image Processing and Analysis in Java*, Versão 1.40 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Para as células com um único nucléolo, a medida da área obtida era prontamente mensurada. Já para as células que possuíam dois ou mais nucléolos, considerou-se como área nucleolar total (utilizada para realização das análises) a soma das áreas de cada nucléolo.

Análise dos dados

A normalidade dos dados foi testada por meio da análise do Skewness e do Kurtosis (Ha e Ha, 2007) e a homogeneidade de variância pelo teste F max (Zar, 1999). O número de nucléolos foi comparado entre espermatogônias e espermatídes iniciais e dentro do mesmo tipo celular por Análise de Variância de duas vias, completada pelo teste LSD para comparações múltiplas. Já as áreas nucleares e nucleolares das espermatogônias foram comparadas com as áreas nucleares e nucleolares das espermatídes iniciais, por meio do teste t independente. Foi considerado $p \leq 0,05$ para significância estatística e todas as análises utilizadas foram baseadas em Zar (1999).

Análise citogenética

Os testículos dos exemplares de *D. minutus* foram preparados seguindo o procedimento de Kligerman e Bloom (1977), adaptado por Bertollo (1978) que consiste em seccionar os testículos em fragmentos pequenos e tratá-los com uma solução hipotônica de KCl 0,075 M durante 20 minutos e, logo em seguida, fixar o material

durante 10 minutos em metanol: ácido acético (3:1) recém-preparado, repetindo o processo de fixação mais uma vez. O material foi, então, retirado do fixador e alguns fragmentos do órgão foram transferidos para uma placa escavada, onde foram adicionadas de duas a três gotas de ácido acético a 50%. O material foi fragmentado com cuidado a fim de se obter uma suspensão celular e com uma pipeta Pasteur, foi colocada uma gota de suspensão sobre uma lâmina pré-aquecida a 30-35°C, sendo a gota reaspirada imediatamente (esse procedimento foi repetido em mais dois ou três campos da lâmina). Em seguida, as lâminas foram submetidas à técnica de Impregnação por íons prata (AgNOR) (Howell e Black, 1980) para visualização e acompanhamento do material nucleolar durante a divisão meiótica das células germinativas. Todas as lâminas foram analisadas em microscópio Olympus BX60, com sistema analisador de imagem *Image Pró-Plus – Média Cybernetics*, Versão 6.1 para Windows.

Análise Ultra-estrutural – Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Amostras testiculares dos espécimes utilizados 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, e, 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. Desses fragmentos testiculares incluídos em araldite, foram obtidos cortes semi-finos e ultra-finos, em ultramicrotomo Leica Ultracut UCT. Os cortes ultra-finos 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 e Coggeshall, 1965). Os resultados das técnicas de MET foram documentados por eletromicrografias obtidas em microscópio eletrônico de transmissão Leo-Zeiss (Cambridge, UK) 906 com sistema analisador de imagens ITEM (*Soft Image System – Câmera Veleta 2K x 2K TEM CCD Camera*).

Nota ética

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEAA) – UNESP / Botucatu – SP, sob protocolo nº057/06.

3. Resultados

Análises citoquímicas

As técnicas citoquímicas foram empregadas para acompanhar, qualitativamente, a distribuição do material nucleolar durante a espermatogênese de *Dendropsophus minutus*. Porém, a técnica de HE, foi utilizada para caracterizar o tipo de epitélio seminífero da espécie estudada, tendo a mesma, evidenciado que essa espécie possui espermatogênese cística, tendo sido observados cistos contendo células em todos os estágios de desenvolvimento e as espermatogônias formando espermatocistos (Figura 1A). A identificação das células germinativas foi realizada segundo Oliveira et al. (2002 e 2003). A técnica de azul de toluidina (AT) permitiu observar que as células do epitélio germinativo possuíam uma intensa metacromasia em todas as estruturas nucleares (eucromatina, heterocromatina, nucléolo, cromossomos) (Figuras 1C, 1D e 1E). O grau de metacromasia, geralmente, variou com o nível de compactação dos ácidos nucléicos, com a ploidia do núcleo celular e com a intensidade de complexação do material genético com corpúsculos de ribonucleoproteínas (RNPs). A técnica de coloração pelo AT foi utilizada como controle para a técnica variante da concentração crítica de eletrólitos (CEC). Com a utilização da técnica de variante de CEC foi observada a presença de nucléolos metacromáticos nas espermatogônias (Figura 1F) e a fragmentação desse material nucleolar no núcleo de espermatócitos primários e de espermátides iniciais (Figuras 1G e 1H), sendo que nos espermatócitos primários o material nucleolar fragmentado parece distribuir-se aleatoriamente pelo núcleo. A presença de “corpúsculos residuais” metacromáticos foi detectada no lúmen dos túbulos seminíferos (Figura 1B). A técnica citoquímica específica para detecção de DNA (reação de Feulgen) revelou todos os núcleos das células germinativas em cor púrpura, variando em intensidade de acordo com o grau de ploidia, o estágio funcional e a intensidade de compactação da cromatina das células. Pode-se observar a presença de regiões heterocromáticas destacadas mais fortemente, sempre em associação com halos claros, que sugerem a presença de material nucleolar. Pode ser notado que as áreas claras são mais evidentes nas espermatogônias (Figura 1I) e nos espermatócitos primários (Figura 1J) do que nas espermátides (Figura 1K), indicando uma fragmentação e diminuição da área nucleolar nas espermátides. A impregnação por íons prata (AgNOR) evidenciou as regiões nucleolares das diferentes células do túbulo seminífero, sendo que nas espermatogônias (Figura 1L) o nucléolo foi claramente destacado, enquanto que nos espermatócitos primários (Figura 1M) e nas espermátides iniciais (Figura 1N), o nucléolo apresentou-se fragmentado e com área reduzida.

Análise do número de nucléolos nas espermatogônias e nas espermatídes

Não houve interação entre o tipo celular e o número de nucléolos ($F = 0,732$; $p = 0,54$). No entanto, houve diferença no número de nucléolos em cada tipo celular ($F = 1536,71$; $p = 0,000000$) Todas as espermatogônias e espermatídes iniciais analisadas possuíam entre 1 e 4 nucléolos, sendo que a maioria das células apresentaram apenas 1 nucléolo (LSD, $p < 0,00$). O número de células com 2 nucléolos foi maior do que o número de células com 3 e 4 nucléolos (LSD, $p < 0,00$). Já as porcentagens de espermatogônias e espermatídes iniciais com maior número de nucléolos (três e quatro) foram semelhantes (LSD, $p = 0,524030$). Não houve diferença no número de nucléolos entre os dois tipos celulares analisados ($F = 0,000$; $p = 1,000$) (Figura 2).

Análise das áreas nuclear e nucleolar nas espermatogônias e espermatídes

Foi encontrada diferença significativa entre as áreas nucleares das espermatogônias e das espermatídes iniciais ($t = 6,68$; $p = 0,0001$), e entre as áreas nucleolares das espermatogônias e das espermatídes iniciais ($t = 17,25$; $p = 0,00$). Em ambos os casos, as áreas nas espermatogônias foram maiores do que as áreas nas espermatídes iniciais (Figura 3).

Análise citogenética

Nas preparações citogenéticas das células germinativas impregnadas pela prata, da espécie utilizada, foi possível localizar espermatogônias em metáfase, indicando que o número cromossômico diplóide da espécie é $2n=30$ (Figura 4A). Nas metáfases de espermatogônias foi possível observar alguns cromossomos com marcações mais intensas, indicando a presença de regiões organizadoras nucleolar (RONs). Espermatócitos primários em início de divisão (Figura 4B) foram observados apresentando aproximadamente 4 corpúsculos nucleolares. Em espermatócitos primários na fase de zigóteno (Figura 4C) e na fase de paquíteno (Figura 4D) foi observada a presença de um único corpúsculo nucleolar no centro do núcleo. Em outras fases, durante a progressão da divisão meiótica, não foi observada a presença de material nucleolar, como por exemplo, espermatócitos primários em diplóteno inicial (Figura 4E), em diplóteno (Figura 4F), em diacinese (Figura 4G) e células em metáfase II (Figura 4H). Espermatídes iniciais (redondas) e espermatídes em alongamento foram observadas apresentando entre 1 e 4 corpúsculos nucleolares no centro do núcleo

(Figura 4I), porém a área nucleolar foi, aparentemente, menor do que a área nucleolar das células germinativas iniciais (espermatogônias e espermatócitos primários).

Análise Ultra-estrutural – Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A análise ultra-estrutural foi utilizada para acompanhar, qualitativamente, a fragmentação do material nucleolar e a formação do corpo cromatóide (CB) durante a espermatogênese de *D. minutus*. Nas figuras 5A, 5B e 5C, pode-se observar a ultra-estrutura das espermatogônias com nucléolo totalmente organizado e o início da formação de algumas “nuages” no citoplasma. Sugere-se que essas aglomerações de material ribonucleoprotéico estão sendo formadas por meio de produtos nucleares, que estão saindo do núcleo através do complexo de poro, e se acumulando em regiões adjacentes ao envoltório nuclear. As espermatogônias apresentaram nucléolo do tipo compacto (Figuras 5A e 5C). Nas figuras 5D, 5F e 5G foi possível observar espermatócitos primários, que possuem material nucleolar em fragmentação, com material ribonucleoprotéico migrando do núcleo para o citoplasma através do complexo do poro e se acumulando em regiões adjacentes ao núcleo, geralmente próximos aos aglomerados de mitocôndrias. Os CBs de *D. minutus* possuem uma área muito reduzida. É possível observar a presença de uma material ribonucleoprotéico, semelhante ao que está migrando do núcleo para o citoplasma, próximo à complexos sinaptonêmicos, no núcleo de espermatócitos primários (Figuras 5F e 5G). Em espermátides em alongamento foi possível observar a reorganização do material nucleolar, possuindo uma pequena área, e a formação da vesícula acrossomal com algumas mitocôndrias em sua proximidade (Figura 6A). As mitocôndrias se afastam da região de formação da vesícula acrossomal em associação com material ribonucleoprotéico de aspecto granular (Figuras 6B e 6C), provavelmente proveniente de uma precoce desorganização do CB. Na região de formação da cauda e bainha mitocondrial do espermatozóide não foi observado acúmulo de material ribonucleoprotéico (Figuras 5E e 6D). Não foi possível observar a presença de aglomeração de material ribonucleoprotéico em nenhuma região celular das espermátides finais e espermatozóides maduros (Figuras 6E e 6F).

4. Discussão

Toda célula germinativa do reino animal possui, em seu citoplasma, um acúmulo de material que recebe o nome de “nuage”. O corpo polar dos oócitos de *Drosophila* é, provavelmente, o tipo mais bem conhecido de “nuage”. Em células germinativas a “nuage” é denominada de corpo cromatóide (CB) (Parvinen, 2005). O CB é uma organela citoplasmática característica de células germinativas e tem sido

indicada como uma “reserva” ou “estoque” de RNA e proteínas para a diferenciação final dos espermatozoides (Söderström e Parvinen, 1976a; Saunders et al., 1992). A ação dessa estrutura parece ser muito importante para que ocorra a espermatogênese, pois, a presença de mutações em algumas proteínas que se localizam no CB, como a TDR1/MTR-1 e o antígeno de histocompatibilidade OX3, causam esterilidade em ratos (Head e Kresge, 1985; Chuma et al., 2006). Alguns autores identificaram que o CB possui algumas características agregativas, sugerindo que ele não é um local de síntese, como proposto previamente, mas um local de degradação onde DNA, RNA e proteínas desnecessárias são digeridas (Haraguchi et al., 2005). Apesar da recente realização de vários estudos que visam estabelecer a função dessa estrutura das células germinativas, muitos aspectos sobre seu mecanismo de ação ainda permanecem indefinidos. Também existem controvérsias sobre a origem do CB, sendo que uma das linhas de evidências indica que esse complexo macromolecular se origine a partir de material nucleolar, que se fragmenta durante a divisão meiótica (Comings e Okada, 1972; Andersen, 1978; Andonov, 1990; Peruquetti et al., 2008 a,b).

O nucléolo é um compartimento nuclear que representa a mais óbvia e diferenciada estrutura nuclear que pode ser observada ao microscópio. A maioria dos eventos de biogênese de ribossomos, como a síntese de RNA ribossomal (RNAr) e o processamento e a reunião das subunidades ribossomais ocorre no interior do nucléolo. Porém, vários estudos têm demonstrado que o nucléolo possui várias funções não ribossomais (Cmarko et al., 2008). Algumas dessas funções são: regulação da mitose, progressão do ciclo celular e da proliferação celular, muitas formas de resposta ao estresse celular, biogênese de muitas partículas de ribonucleoproteínas e relação como algumas doenças humanas como o câncer, infecções virais e doenças degenerativas (Boisvert et al. 2007).

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo acompanhar o ciclo nucleolar durante a espermatogênese de *D. minutus* e, identificar possíveis relações entre a fragmentação nucleolar e a formação do CB, no epitélio germinativo da espécie estudada.

Por meio da aplicação de algumas análises citoquímicas, realizadas em cortes histológicos e em preparações citogenéticas dos túbulos seminíferos, da espécie utilizada no presente estudo, foi detectado que nas espermatogônias podem ser observados de 1 a 4 corpúsculos nucleolares organizados. Já nos espermátocitos primários ocorre uma completa fragmentação do nucléolo, logo após o paquíteno da prófase I. Os dados do presente trabalho corroboram com a descrição da fragmentação nucleolar proposta para os cordados, na qual se afirma que, na maioria dos cordados, há uma vigorosa atividade nucleolar na prófase I, sendo que a máxima atividade nucleolar é observada em paquíteno, seguida de fragmentação nucleolar (Hofgärtner et al, 1979;

Schmid et al., 1982; Wachtler e Stahl, 1993; Teruel et al., 2007). Posteriormente, nas espermatídes iniciais, ocorre a reorganização da estrutura nucleolar, podendo novamente ser observado de 1 a 4 corpúsculos nucleolares organizados, ao final da segunda divisão meiótica. Esse fenômeno da fragmentação nucleolar durante a prófase I e, posterior reorganização desses nucléolos nas espermatídes iniciais, já foi amplamente descrito em vários trabalhos (por exemplo, Takeuchi e Takeuchi, 1990; Morielle e Azeredo-Oliveira, 2004; Morielle-Souza e Azeredo-Oliveira, 2008; Peruquetti et al., 2008a,b). Também já foi observada a diminuição da quantidade das proteínas C23 e B23, presentes no CF e CFD e que são responsáveis, respectivamente, pela transcrição de RNAr e clivagem dos pré-RNAr, no nucléolo de espermátócitos e espermatídes de camundongo (Biggiogera et al., 1991). Todas essas observações, realizadas por diversos autores em diferentes grupos animais, indicam a ocorrência de fragmentação nucleolar na prófase meiótica e, sua posterior reorganização no núcleo de espermatídes iniciais. Nas espermatídes finais e espermatozóides maduros os nucléolos desorganizam-se novamente, e não voltam a ser observados. A presença do nucléolo no espermatozóide não é necessária, uma vez que após a fecundação os nucléolos dos pró-núcleos masculino e feminino são, ambos, de origem materna. Trabalhos recentes demonstraram que o nucléolo materno, junto com outros elementos nucleoplasmáticos, são essenciais para o desenvolvimento embrionário (Lefrève, 2008).

O número de nucléolos presentes nas espermatogônias e nas espermatídes iniciais foi determinado e comparado, para verificar se ocorre uma diminuição da quantidade de nucléolos presentes nas células germinativas, antes e após a divisão meiótica. Não houve diferença significativa no número de nucléolos presentes nos dois tipos celulares analisados, sendo que, tanto as espermatogônias quanto as espermatídes iniciais, em sua grande maioria, apresentaram um único nucléolo. Células com dois nucléolos foram observadas em segunda maior quantidade e, células com três e quatro nucléolos, foram observadas com uma frequência muito baixa. É bem conhecido que o número de nucléolos de uma célula germinativa está relacionado com o número de regiões organizadoras nucleolar (RONs) que ela possui (Guo et al., 1996; Teruel et al., 2007). Sendo assim, nas espermatogônias diplóides seria esperado encontrar o dobro de nucléolos do que o encontrado nas espermatídes iniciais haplóides. Porém, como a grande maioria das espermatogônias possuía um nucléolo, tal diferença não pode ser detectada.

É bem estabelecido o nucléolo apresenta uma variação de tamanho, ou seja ele pode aumentar e diminuir, em células em crescimento e em células em período de restrição, e o nucléolo se organiza e se desorganiza a cada ciclo celular, tanto no ciclo celular mitótico quanto no ciclo celular meiótico (Pikaard, 2002; Teruel et al., 2007). Além disso, o próprio nucléolo abriga algumas proteínas que são responsáveis pelo

checkpoint do paquíteno, reprimindo a recombinação nas regiões de DNAr, como as proteínas Pch2 e Sir2 (Garcia e Pillus, 1999; San-Segundo e Roeder, 1999). Para comprovar a redução do tamanho do nucléolo durante a espermatogênese de *D. minutus*, as áreas nuclear e nucleolar das espermatogônias e das espermátides iniciais foram mensuradas e, posteriormente, comparadas. Foi observado que as áreas nuclear e nucleolar nas espermatogônias foram significativamente maiores quando comparadas às áreas nuclear e nucleolar das espermátides iniciais, indicando que ocorre uma redução do tamanho do nucléolo de um tipo celular para outro. Vários estudos vêm demonstrando que o tamanho do nucléolo é proporcional à quantidade de síntese de RNAr (Caspersson, 1950), que o tamanho da RON (número de cístrons de RNAr) está, em geral, correlacionado com seu nível de expressão (Shubert e Künzel, 1990), que a hipertrofia do nucléolo é um estado em que a síntese de RNAr e ribossomos está aumentada (Nakamoto et al., 2001) e que um nucléolo grande pode estar correlacionado com atividade de divisão celular e com estágios que possuem uma alta demanda de proteína (Mosgoeller, 2004). Todas essas evidências podem ser usadas para explicar a redução da área nucleolar nas espermátides, porém essa redução da área nucleolar das espermátides iniciais, também pode estar relacionada com a fragmentação do material nucleolar, no início da prófase I, e migração de parte desse material para o citoplasma das células germinativas, onde esse material participaria na formação do CB.

O processo de formação do CB, no presente trabalho, foi acompanhado por meio da utilização da técnica de microscopia eletrônica de transmissão (MET). Nossas observações demonstraram que o CB começa a se originar a partir da migração de material ribonucleoprotéico do núcleo para o citoplasma das espermatogônias, através do complexo do poro, sendo que esse material se acumula em pequenas porções em regiões adjacentes ao núcleo celular. Nesse tipo celular o nucléolo ainda está organizado, não podendo contribuir para a formação inicial da estrutura. Entretanto, somente na fase de espermátide primária, podemos observar um CB totalmente organizado, porém com tamanho reduzido quando comparado com CBs de outras espécies (Peruquetti, 2009), e esse CB parece pronto para desempenhar seu importante papel durante a espermatogênese. Além disso, é nos espermátides primários que ocorre fragmentação nucleolar, sendo que parte desse material nucleolar fragmentado, provavelmente, migra para o citoplasma e se une com o material ribonucleoprotéico, já depositado nas regiões adjacentes ao núcleo, passando a fazer parte da constituição química do CB. Essa formação do CB em *D. minutus* é diferente da que ocorre em outros organismos, como por exemplo em cágados (*Phrynosoma marmoratus*), em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) (Peruquetti, 2009), em ratos (*Rattus norvegicus*), em camundongos (*Mus musculus*) (Peruquetti et al., 2008a) e em gerbilos (*Meriones unguiculatus*) (Peruquetti et al., 2008b), pois nessas espécies o CB começa a se formar

somente na fase de espermatócito primário. Outros autores também demonstram que a formação do CB somente ocorre na fase de espermatócitos primário (Tandler e Moriber, 1965; Kotaja e Sassone-Corsi, 2007).

Observações obtidas por meio de análise ultra-estrutural dos espermatócitos primários em paquíteno, no presente trabalho, demonstraram um material ribonucleoproteico, semelhante ao material que migra do núcleo para o citoplasma, determinando o início da formação do CB, localizado próximo a complexos sinaptonêmicos, indicando que essa estrutura poderia estar armazenando RNAm, que, ainda estaria sendo transcrito nessa fase, para ser usado em fases posteriores da diferenciação celular. Essa função de armazenamento de RNAm, que é proposta para o CB, é de relevante importância, pois a transcrição de RNAm cessa nas espermatídes iniciais, quando seus núcleos começam a alongar-se, porém a síntese de proteínas deve continuar até os passos finais da espermiogênese (Monesi, 1965). Essa observação remete para a necessidade da existência de uma “reserva” de RNAm nas espermatídes, para que essas moléculas possam ser traduzidas durante todo o processo de formação dos espermatozóides. Vários autores já sugeriram que o CB possui essa função, por meio da identificação de diferentes componentes do CB, com a aplicação de diversos tratamentos (Söderström e Parvinen, 1976b; Söderström, 1977; Morales e Hecht, 1994; Moussa et al., 1994; Oko et al., 1996; Figueroa e Burzio, 1998). Ainda, foi proposto que o CB seria uma fonte de proteínas pré-sintetizadas que seriam estocadas para, posteriormente, comporem estruturas da própria espermatíde (Parvinen et al., 1986). Essas observações discordam da afirmação feita por Haraguchi et al. (2005) de que o CB funcionaria somente como um local de degradação onde DNA, RNA e proteínas desnecessárias seriam digeridas.

O CB é uma estrutura extremamente móvel, tendo sido observado em várias posições no citoplasma dos espermatócitos primários (regiões adjacentes ao núcleo, aglomerados de mitocôndrias) e das espermatídes iniciais (região anterior do núcleo). A detecção da presença de actina (Walt e Armbruster, 1984) e de cálcio (Andonov e Chaldakov, 1989) no CB, pode estar relacionada com sua alta taxa de movimentação. Essa alta mobilidade da organela também foi registrada por Parvinen et al. (1997) onde o CB foi observado em rápida mudança de posição em relação ao envelope nuclear, complexo de Golgi e áreas de cromatina clara nuclear em espermatídes iniciais vivas de rato.

Os resultados do presente estudo também demonstraram uma discreta 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 a partir de um material inter-mitocondrial (Fawcett et al., 1970). Outros autores acreditam que o CB seja parcialmente formado por produtos do genoma nuclear e

suplementado por produtos do genoma mitocondrial (Reunov et al., 2000). Existe ainda uma indicação de que a ligação entre CB e mitocôndrias esteja relacionada com a participação do CB na síntese e no transporte de apocitocromos c_r , uma isoforma do citocromo c , somente expressa nos testículos (Hess et al., 1993). Para reforçar as duas últimas hipóteses, foi detectada a presença da citocromo c oxidase (COXI), codificada pelo genoma mitocondrial, no CB (Haraguchi et al., 2005). Porém, como já proposto em outros trabalhos (Soley, 1994; Peruquetti et al., 2008 a,b), sugere-se, nesse trabalho, que a ligação entre CB e mitocôndrias pode estar relacionada com o direcionamento de aglomerados de mitocôndrias para a direção posterior do núcleo, onde as mesmas irão participar da formação da bainha mitocondrial, ao redor da peça intermediária dos espermatozoides. Essa função é sugerida, pois, aglomerados de mitocôndrias em associação com fragmentos do CB, foram observados no citoplasma de espermátides em alongamento, provavelmente migrando para a região onde haverá a formação da cauda e bainha mitocondrial dos espermatozoides. Em espermátides finais não foi observada a presença de material do CB em nenhum compartimento celular, sugerindo que esse material seja disperso nos corpos residuais e, possivelmente, degradado ao final do processo de espermiogênese (Sud, 1961; Yokota, 2008).

Sendo assim, concluí-se que em *D. minutus* o nucléolo parece estar relacionado com a formação do CB, pois no momento em que ocorre a fragmentação do nucléolo, no núcleo dos espermátides primários, o CB parece completar seu processo de formação podendo, assim, iniciar o desempenho de suas importantes funções durante a espermatogênese. No momento da reorganização do nucléolo, no núcleo das espermátides iniciais, o mesmo possuiu uma área menor, devido a vários fatores, entre eles pode-se destacar essa possível migração de material nucleolar do núcleo para o citoplasma, para auxiliar na composição química do CB.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem ao MSc. Tiago da Silveira Vasconcelos e ao MSc. Tiago Gomes dos Santos (Laboratório de Herpetologia – UNESP/IB) pelo auxílio na coleta dos exemplares provenientes do Parque Estadual do Morro do Diabo (PEMD) – Teodoro Sampaio – SP, utilizados no presente estudo, e ao MSc. Tiago da Silveira Vasconcelos (Laboratório de Herpetologia – UNESP/IB) e à MSc. Thaís Billalba Carvalho (Laboratório de Comportamento de Peixes – UNESP/IBILCE) pelo auxílio nas análises estatísticas. Agradecimentos especiais ao Sr. Luis Roberto Faleiros Jr (Laboratório de Microscopia e Microanálise – UNESP/IBILCE) e à MSc. Rosana Silistino de Souza (Laboratório de Morfologia – UNESP/IBILCE) por seu auxílio com as técnicas de laboratório. Agradecemos também a Fundação de Amparo à Pesquisa do

Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro e pela bolsa de estudo, respectivamente.

6. Referências Bibliográficas

Andersen K, 1978: Fine structure of spermatogonia and spermatocytes in the blue fox (*Alopex lagopus*). *Acta Veter. Scandi. (Denmark)*. 19 (2) 229-42.

Andonov M, 1990: Further study of the chromatoid body in rat spermatocytes and spermatids. *Z. Mikrosk. Anat.* 104 46-54.

Andonov MD, Chaldakov GN, 1989: Morphological evidence for calcium storage in the chromatoid body of rat spermatids. *Experientia*. 45 377-378.

Bertolo LAC, 1978: Estudos citogenéticos no gênero *Hoplias* Gill, 1903 (Pisces, Erythrinidae). Tese de Doutorado. Departamento de Matemática Aplicada à Biologia. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brasil.

Biggiogera M, Kaufmann SH, Shaper JH, Gas N, Amalric F, Fakan S, 1991: Distribution of nucleolar proteins B23 and nucleolin during mouse spermatogenesis. *Chromosoma*. 100 162-172.

Boisvert FM, van Koningsbruggen S, Navascués J, Lammond AI, 2007: The multifunctional nucleolus. *Nature Reviews: Mol. Cell Biol.* 8 574-585.

Carmo-Fonseca M, Mendes-Soares L, Campos I, 2000: To be or not to be in the nucleolus. *Nat. Cell Biol.* 2 E107-E112.

Caspersson T, 1950: Cell growth and cell function, a cytochemical study. WW Norton, New York, New York, USA.

Chuma S, Hosokawa M, Kitamura K, Kasai S, Fujioka M, Hiyoshi M, Takamune K, Noce T, Nakatsuji N, 2006: Tdrd1/Mtr-1, a tudor-related gene, is essential for male germ-cell differentiation and nuage/germinal granule formation in mice. *PNAS* 103 15894-15899.

Cmarko D, Smigova J, Minichova L, Popov A, 2008: Nucleolus: The ribosome factory. *Histol. Histopathol.* 23 1291-1298.

Comings DE, Okada TA, 1972: The chromatoid body in mouse spermatogenesis: Evidence that it may be formed by the extrusion of nucleolar components. *J. Ultrastr. Res.* 39 (1) 15-23.

Fawcett DW, Eddy EM, Phillips DM, 1970: Observations on the fine structure and relationships of the chromatoid body in mammalian spermatogenesis. *Biol. Reprod.* 2 (1) 129-153.

Figueroa J, Burzio LO, 1998: Polysome-like structures in the chromatoid body of rat spermatids. *Cell Tissue Res.* 291 575-579.

- Garcia SN, Pillus L, 1999: Net results of nucleolar dynamics. *Cell* 97 825-828.
- Gerbi SA, Borovjagin AV, Lange TS, 2003: The nucleolus: a site of ribonucleoprotein maturation. *Curr. Op. Cell Biol.* 15 318-325.
- Guo M, Davis D, Birchler JA, 1996: Dosage effects on gene expression in a maize ploidy series. *Genetics* 142 1349-1355.
- Ha RR, Ha JC, 2007: Integrative statistics for behavioral science. Pearson Custom Publishing, Boston, Washington, USA.
- Haraguchi CM, Mabuchi T, Hirata S, Shoda T, Hoshi K, Akasaki K, Yokota S, 2005: Chromatoid bodies: aggresome-like characteristics and degradation sites for organelles of spermiogenic cells. *J. Histochem. Cytochem.* 53(4) 455-465.
- Head JR, Kresge CK, 1985: Reaction of the chromatoid body with a monoclonal antibody to a rat histocompatibility antigen. *Biol. Reprod.* 33 1001-1008.
- Hernandez-Verdun D, 1991: The nucleolus today. *J. Cell Scie.* 99 465-471.
- Hess RA, Miller LA, Kirby JD, Margoliash E, Goldberg E, 1993: Immunoelectron microscopic localization of testicular and somatic cytochromes *c* in the seminiferous epithelium of the rat. *Biol. Reprod.* 48 1299-1308.
- Hofgärtner FJ, Schmid M, Krone W, Zenzes MT, Engel W, 1979: Pattern of activity of nucleolus organizers during spermatogenesis in mammals as analyzed by silver-staining. *Chromosoma* 71 197-216.
- Howell WM, Black DA, 1980: Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: I-step method. *Experientia.* 36 104-105.
- Huang WS, Lin JY, Yu JYL, 1997: Male reproductive cycle of the toad *Bufo bankorensis* in Taiwan. *Can. J. Res.: Zool. Sci.* 14 497-503.
- Kligerman AD, Bloom SE, 1977: Distribution of F-bodies, heterochromatin and nuclear organizers in the genome of the central mudminnow, *Umbra limi*. *Cytogenet. Cell Genet.* 18 182-196.
- Kotaja N, Bhattacharyya SN, Jaskiewicz L, Kimmins S, Parvinen M, Filipowicz W, Sassone-Corsi P, 2006: The chromatoid body of male germ cells: Similarity with processing bodies and presence of Dicer and microRNA pathway components. *PNAS.* 103(8) 2647-2652.
- Kotaja N, Sassone-Corsi P, 2007: The chromatoid body: a germ-cell-specific RNA-processing centre. *Mol. Cell Biol.* 8 85-90.
- Lefèvre B, 2008: The nucleolus of the maternal gamete is essential for life. *BioEssays* 30 613-616.
- Lofts B, 1974: Reproduction. In: Lofts B (ed) *Physiology of the Amphibians*. Academic Press, New York, New York, USA.

- Mello MLS, Vidal BC, Dantas MN, Monteiro ACP, 1993: Discrimination of the nucleolus by a critical electrolyte concentration method. *Acta Histochem. Cytochem.* 26 1-3.
- Mello MLS, Vidal BC, 1980: *Práticas de Biologia Celular*. FUNCAMP Editora Edgard Blücher LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil.
- Monesi V, 1965: Synthetic activities during spermatogenesis in the mouse RNA and protein. *Exp.Cell Res.* 39(1) 197-224.
- Montanaro L, Treré D, Derenzini M, 2007: Nucleolus, ribosomes, and câncer. *Am. J. Pathol.* 173(2) 301-310.
- Morales CR, Hecht NB, 1994: Poly(A)+ Ribonucleic acids are enriched in spermatocyte nuclei but not in chromatoid bodies in the rat testis. *Biol. Reprod.* 50 309-319.
- Morielle A, Azeredo-Oliveira MTV, 2004: Description of the nucleolar activity and karyotype in germinative cell lines of *Rhodnius domesticus* (Triatominae, Heteroptera). *Caryologia* 57(1) 31-37.
- Morielle-Souza A, Azeredo-Oliveira MTV, 2008: Study of the nucleolar cycle and ribosomal RNA distribution during meiosis in triatomines (Triatominae, Heteroptera). *Micron* 39 1020-1026.
- Mosgoeller W, 2004: Nucleolar ultrastructure in vertebrates. In: Olson MOJ (ed) *The nucleolus*. Kluwer, New York, New York, USA.
- Moussa F, Oko R, Hermo L, 1994: The immunolocalization of small nuclear ribonucleoprotein particles in testicular cells during the cycle of the seminiferous epithelium of the adult rat. *Cell Tissue Res.* 278 363-378.
- Nakamoto K, Ito A, Watabe K et al, 2001: Increased expression of a nucleolar Nop5/Sik family member in metastatic melanoma cells: evidence for its role in nucleolar sizing and function. *Am. J. Pathol.* 159 1363-1374.
- Oko R, Korley R, Murray MT, Hecht NB, Hermo L, 1996: 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. *Mol. Reprod. Develop.* 44 1-13.
- Oliveira C, Zanetoni C, Zieri R, 2002: Morphological observations on the testes of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia, Anura). *Rev. Chil. Anat.* 20(3) 263-268.
- Oliveira C, Vicentini CA, Taboga SR, 2003: Structural characterization of nuclear phenotypes during *Scinax fuscovarius* spermatogenesis (Anura, Hylidae). *Caryologia* 56 75-83.
- Parvinen M, 2005: The chromatoid body in spermatogenesis. *Int. J. Androl.* 28 189-201.
- Parvinen M, Parvinen L, 1979: Active movements of the chromatoid body: A possible transport mechanism for haploid gene products. *J. Cell Biol.* 80 621-628.

- Parvinen M, Salo J, Toivonen M, Nevalainen O, Soini E, Pelliniemi L, 1997: Computer analysis of living cells: movements of the chromatoid body in early spermatids compared with its ultrastructure in snap-frozen preparations. *Histochem. Cell Biol.* 108 77-81.
- Parvinen M, Vihko KK, Toppari J, 1986: Cell interactions during the seminiferous epithelial cycle. In: *Cytology: A survey of cell biology*. 3 ed. Academic Press, New York, New York, USA.
- Pederson T, 2002: Proteomics of the nucleolus: more proteins, more functions? *Trends Biochem. Sci.* 27(3) 111-112.
- Peruquetti RL, Assis IM, Taboga SR, Azeredo-Oliveira MTV, 2008a: Meiotic nucleolar cycle and chromatoid body formation during the rat (*Rattus norvegicus*) and mouse (*Mus musculus*) spermiogenesis. *Micron* 39 419-425.
- Peruquetti RL, Taboga SR, Azeredo-Oliveira MTV, 2008b: Characterization of Mongolian gerbil chromatoid bodies and their correlation with nucleolar cycle during spermatogenesis. *Reprod. Dom. Anim.* doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01204.x.
- Peruquetti RL, 2009: Caracterização do ciclo nucleolar e da formação do corpo cromatóide na espermatogênese de algumas espécies de vertebrados. Tese (Doutorado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas UNESP/IBILCE, São José do Rio Preto.
- Pikaard CS, 2002: Transcription and tyranny in the nucleolus: the organization, activation, dominance and repression of ribosomal RNA genes. In: Somerville CR, Meyerowitz EM (eds) *The Arabidopsis Book*. Rockville: American Society of Plant Biologists.
- Reunov A, Isaeva V, Au D, Wu R, 2000: Nuage constituents arising from mitochondria: Is it possible? *Develop. Growth Differ.* 42 139-143.
- Ribeiro MG, Lima SR, 2000: Iniciação às técnicas de preparação de material para estudo e pesquisa em morfologia, SEGRAC Editora e Gráfica Limitada, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.
- San-Segundo PA, Roeder GS, 1999: Pch2 links chromatin silencing to meiotic checkpoint control. *Cell* 97 313-324.
- Santos LRS, Oliveira C, 2007: Morfometria testicular durante o ciclo reprodutivo de *Dendropsophus minutus* (Peters) (Anura, Hylidae). *Rev. Bras. Zool.* 24(1) 64-70.
- Saunders PTK, Millar MR, Maguire SM, Sharpe RM, 1992: 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. *Mol. Reprod. Develop.* 33 385-391.

- Schmid M, Löser C, Schmidtke J, Engel W, 1982: Evolutionary conservation of a common pattern of activity of nucleolus organizers during spermatogenesis in vertebrates. *Chromosoma* 86 149-179.
- Shou W, Seol JH, Shevchenko A, Baskerville C, Moazed D, Chen ZW, Jang J, Shevchenko A, Charbonneau H, Deshaies RJ, 1999: Exit from mitosis is triggered by tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex. *Cell* 97 233-244.
- Shubert I, Künzel G, 1990: Position dependent NOR activity in barley. *Chromosoma* 99 352-359.
- Sirri V, Urcuqui-Inchima S, Roussel P, Hernandez-Verdun D, 2008: Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochem. Cell Biol.* 129 13-31.
- Söderström K, 1977: Effect of actinomycin D on the structure of the chromatoid body in the rat spermatids. *Cell Tissue Res.* 184 411-421.
- Söderström K, Parvinen M, 1976a: Transport of material between the nucleus, the chromatoid body and the Golgi complex in the early spermatids of the rat. *Cell Tissue Res.* 168 335-342.
- Söderström K, Parvinen M. 1976b: Incorporation of [³H]uridine by the chromatoid body during rat spermatogenesis. *J. Cell Biol.* 70 239-246.
- Soley JT, 1994: Centriole development and formation of the flagellum during spermiogenesis in the ostrich (*Struthio camelus*). *J. Anat.* 185 301-313.
- Straight AF, Shou W, Dowd GJ, Turck CW, Deshaies RH, Johnson AD, Moazed D, 1999: Net1, a Sir2-associated nucleolar protein required for rDNA silencing and nucleolar integrity. *Cell* 97 245-256.
- Sud B, 1961: Morphological and histochemical studies of the chromatoid body and related elements in the spermatogenesis of rat. *Q. J. Microsc. Sci.* 102 273-292.
- Takeuchi IK, Takeuchi YK, 1990: Ethanol-phosphotungstic acid and bismuth staining of spermatid nucleoli in mouse spermiogenesis. *J. Struct. Biol.* 103 104-112.
- Tandler B, Moriber LG, 1965: Fine structure of the chromatoid body during spermatogenesis in the Water-Strider, *Gerris remigis* (Say)*. *Z. Zellforschung* 68 301-307.
- Teruel M, Cabrero J, Perfectti F, Camacho JPM, 2007: Nucleolus size variation during meiosis and NOR activity of a B chromosome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosome Res.* 15 755-765.
- Venable JH, Coggeshall RA, 1965: A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 25 407-408.
- Visitin R, Hwang ES, Arnon A, 1999: Cfi1 prevents premature exit from mitosis by anchoring Cdc14 phosphatase in the nucleolus. *Nature* 398 818-823.

Wachtler F, Stahl A, 1993: The nucleolus: a structural and functional interpretation. *Micron* 24 473-505.

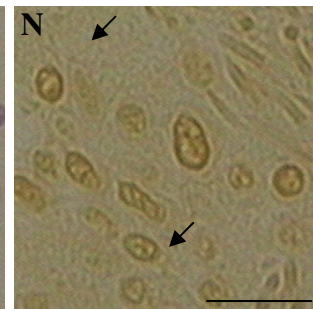
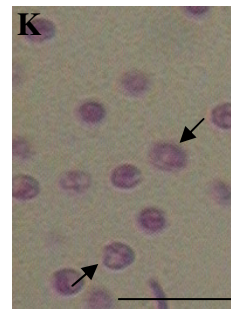
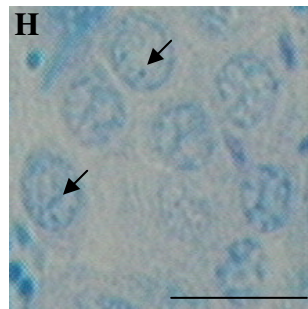
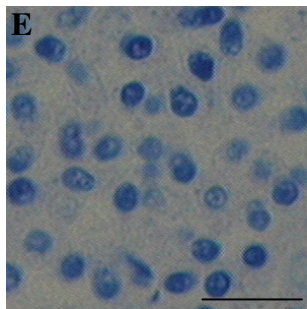
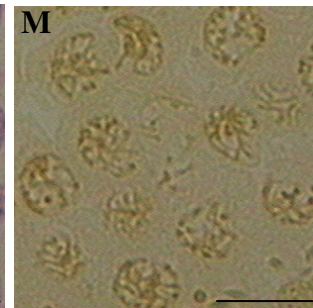
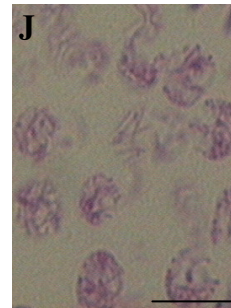
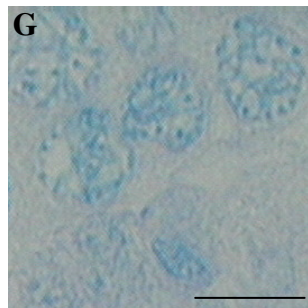
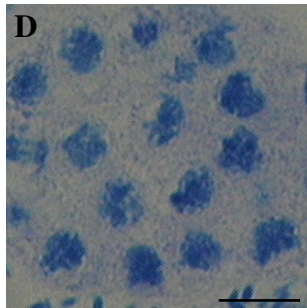
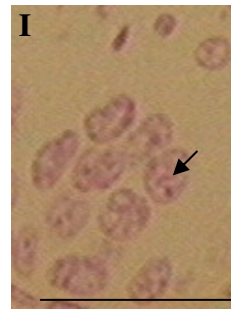
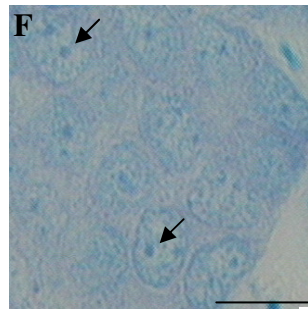
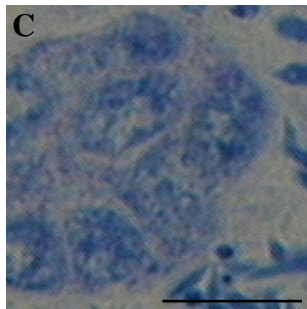
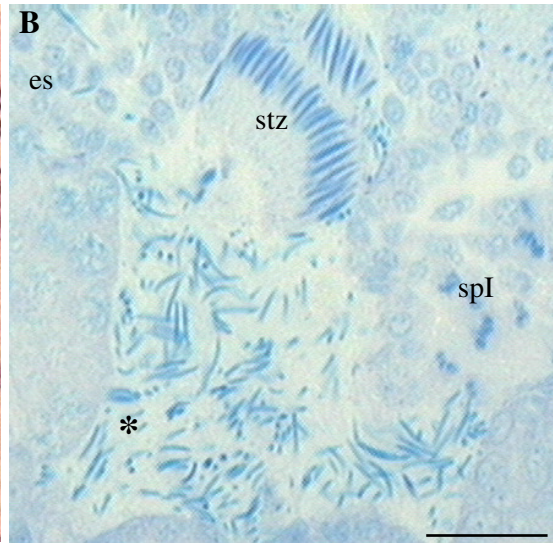
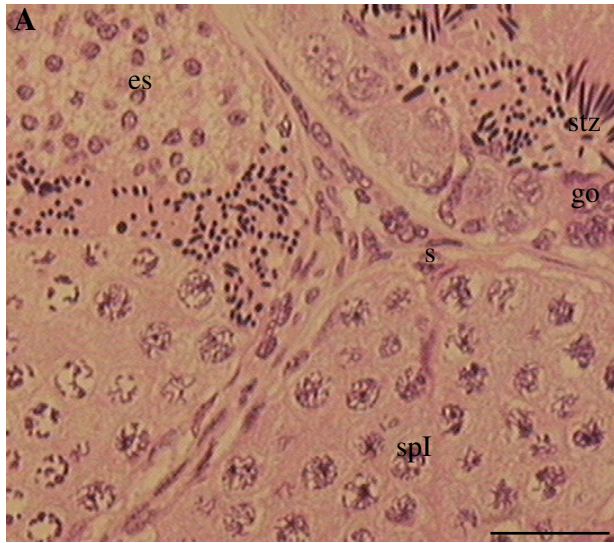
Walt H, Armbruster BL, 1984: Actin and RNA are components of the chromatoid bodies in spermatids of the rat. *Cell Tissue Res.* 236 487-490.

Watson ML, 1958: Staining tissue section of electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4 475-478.

Yokota S, 2008: Historical survey on chromatoid body research. *Acta Histochem. Cytochem.* 41(4) 65-82.

Zar JH, 1999: *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, New Jersey, USA.

Figura 1: Análise citoquímica de túbulos seminíferos de *Dendropsophus minutus*. A: Hematoxilina-eosina (HE); C-E: Azul de toluidina (AT); B, F-H: Variante da concentração eletrolítica crítica (CEC); I-K: Reação de Feulgen; L-N: Impregnação por íons prata. A e B: s (células de Sertoli); go (espermatogônias); spI (espermátocitos primários); es (espermátides iniciais); stz (espermátides finais); * (corpúsculos residuais). F, H, I, K, L e N: setas (marcações nucleolares). Barras: A, B, F, I e L: 25µm; C, D, E, G, H, J, K, M e N: 10µm.



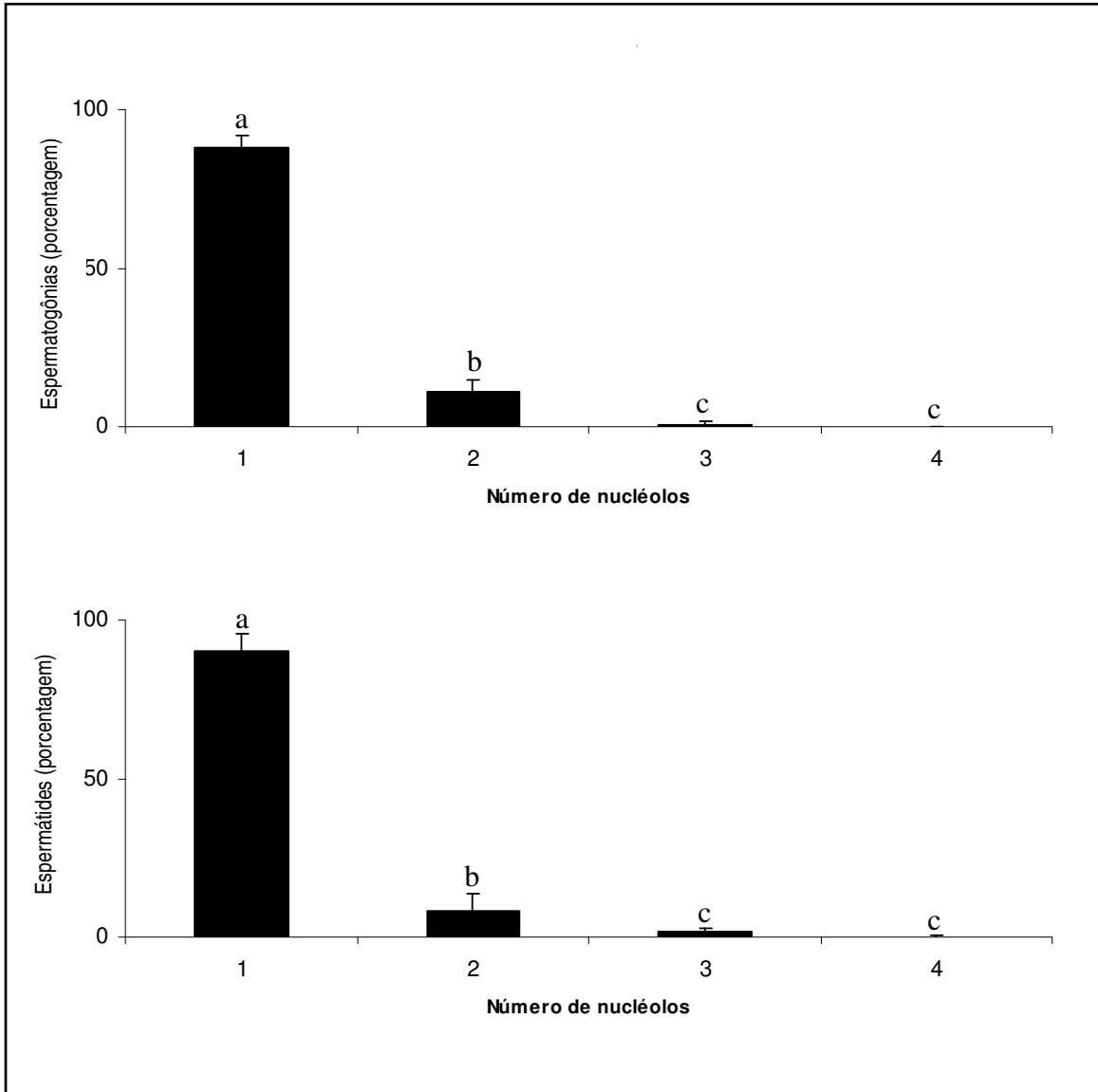


Figura 2: Porcentagem de células germinativas (espermatogônias e espermátides iniciais) de *Dendropsophus minutus* que apresentaram de 1 a 4 nucléolos. As letras indicam diferença significativa no número de nucléolos em cada tipo celular (LSD, $p < 0,05$).

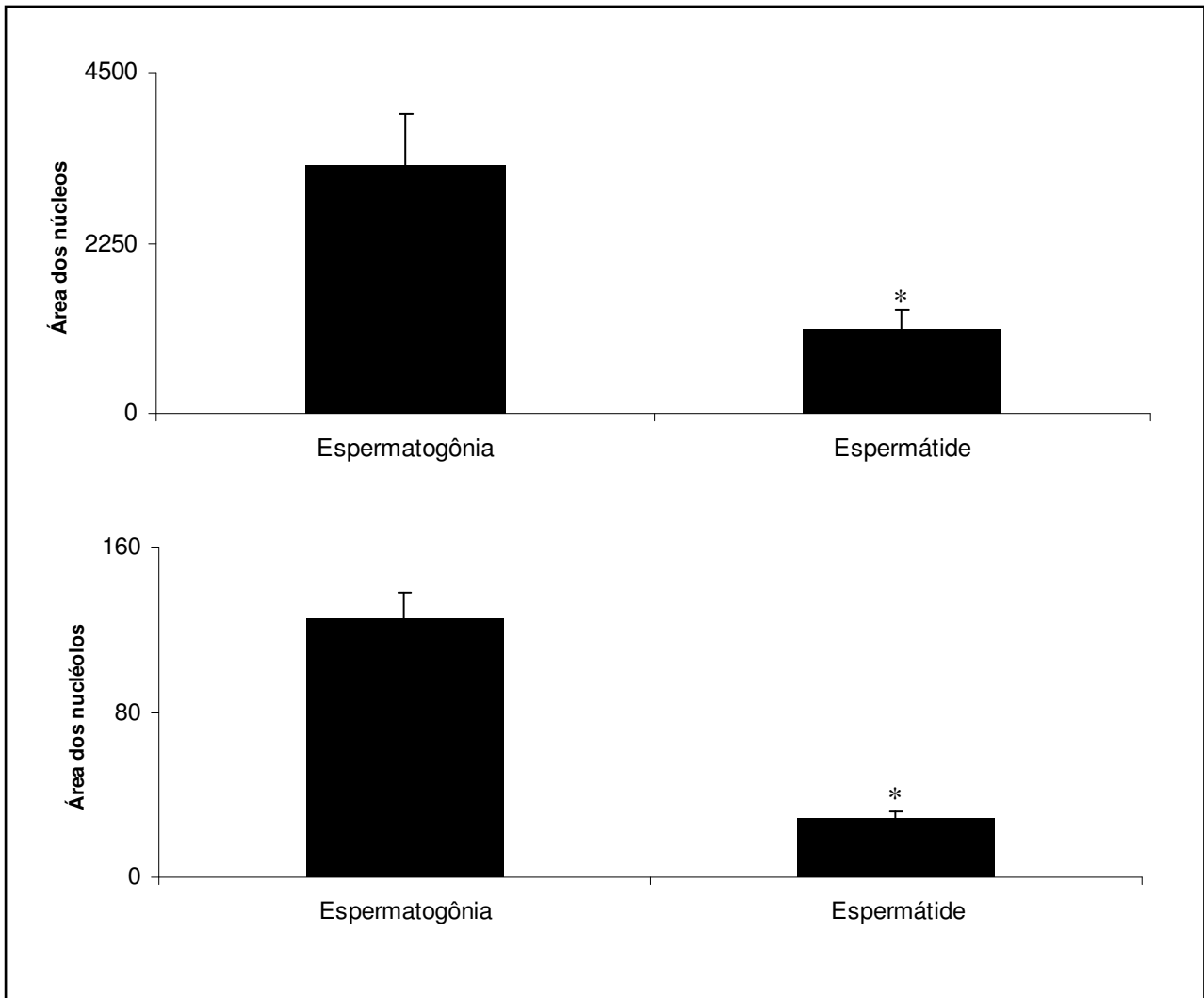


Figura 3: Área (nm²) do núcleo e do nucléolo de espermatogônias e de espermátides iniciais de *Dendropsophus minutus*. O asterisco indica diferença significativa entre os tipos celulares (teste t independente, p<0,05).

Figura 4: Células germinativas de *Dendropsophus minutus*. Impregnação por íons prata (AgNOR). A: Metáfase espermatogonial apresentando um cariótipo $2n = 30$. Alguns cromossomos com regiões organizadoras nucleolares (RONs) evidenciadas pela prata (seta). B: Espermatócitos primários em início de divisão apresentando vários corpúsculos nucleolares (seta). C e D: Espermatócitos primários em zigóteno e paquíteno, respectivamente, apresentando uma marcação nucleolar (setas). E: Diplóteno inicial, F: Diplóteno, G: Diacinese e H: Metáfase II, não apresentando evidências de material nucleolar organizado. I: Espermátides redondas (iniciais) e em alongamento apresentando material nucleolar fragmentado em reorganização. Barras: A, C, E e F: $5\mu\text{m}$; B, D, G, H e I: $10\mu\text{m}$.

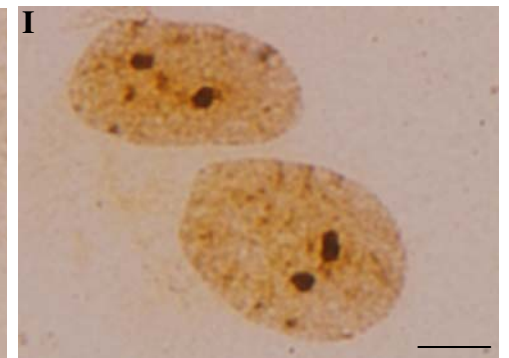
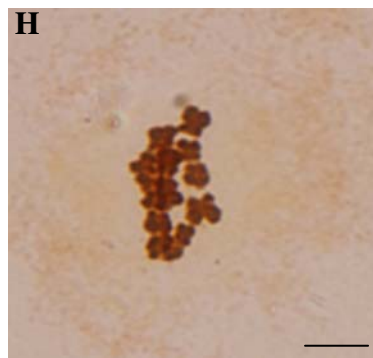
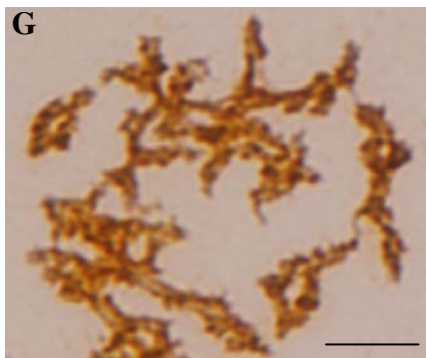
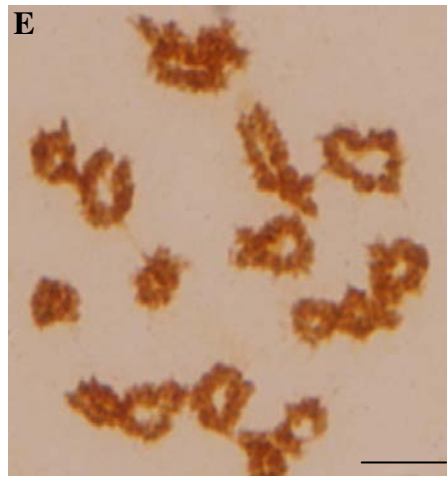
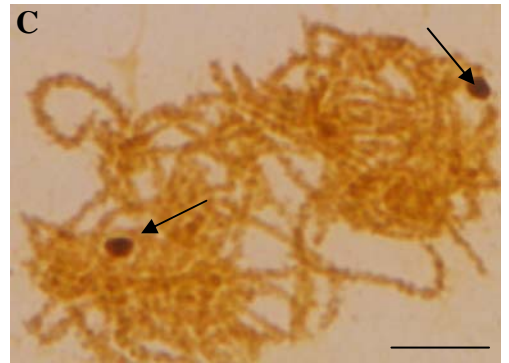
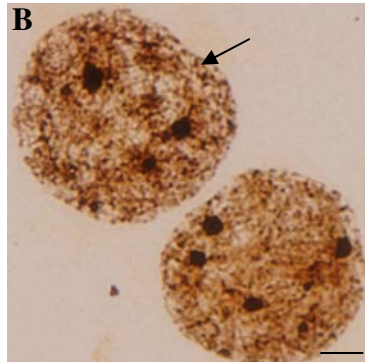


Figura 5: Análise ultra-estrutural de túbulos seminíferos de *Dendropsophus minutus*. A e C: Espermatogônias com nucléolo (nu) do tipo compacto organizado. Observa-se a presença de material ribonucleoprotéico, possivelmente migrando através do complexo de poro (setas) e, posterior acúmulo desse material em regiões adjacentes ao envoltório nuclear (asterisco). B: Material ribonucleoprotéico (asterisco) migrando do núcleo para o citoplasma das espermatogônias, através do complexo de poro (setas) e se acumulando em regiões adjacentes ao núcleo e próximos a mitocôndrias (mi). D, F e G: Espermatócitos primários apresentando migração de material ribonucleoprotéico (asterisco) do núcleo para o citoplasma através do complexo do poro e acúmulo desse material em regiões adjacentes ao envoltório nuclear e, próximas a aglomerados de mitocôndrias (mi). Material ribonucleoprotéico próxima ao complexo sinaptonêmico (cabeças de seta). E: Espermátide em alongamento com ausência de material ribonucleoprotéico próximo às mitocôndrias (mi). (n – núcleo; c – centríolo; f – flagelo). Barras = 10µm.

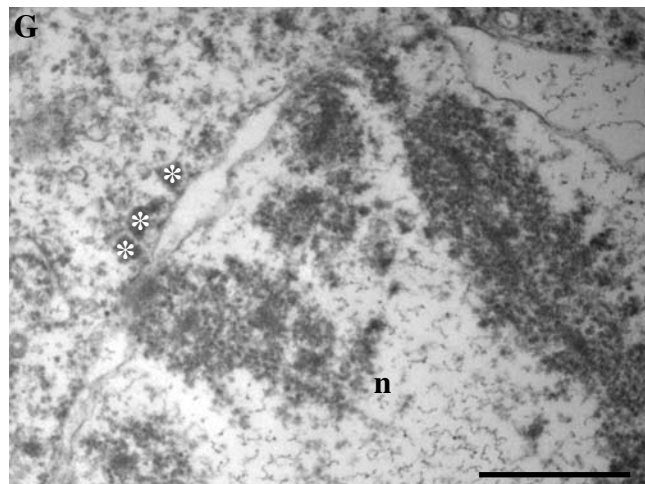
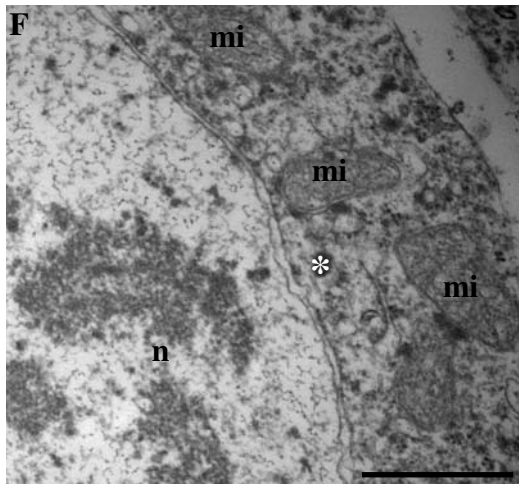
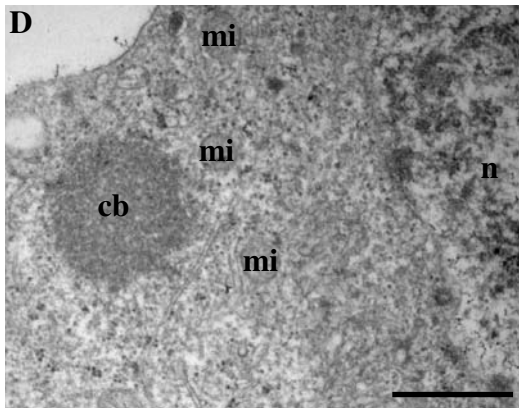
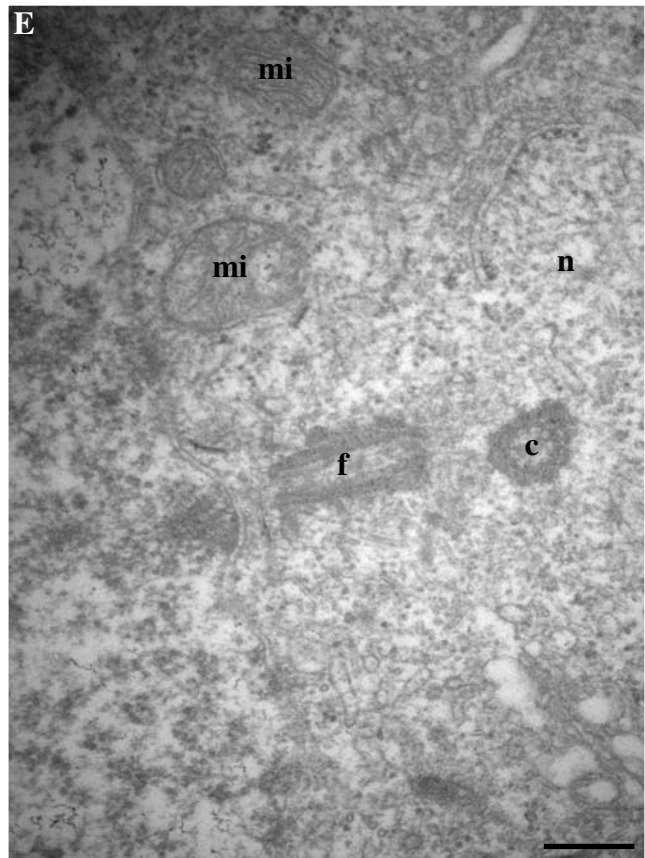
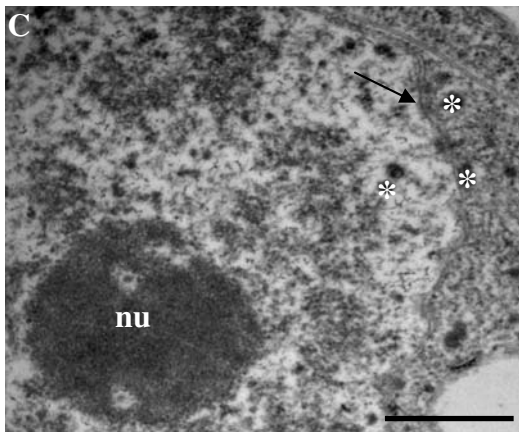
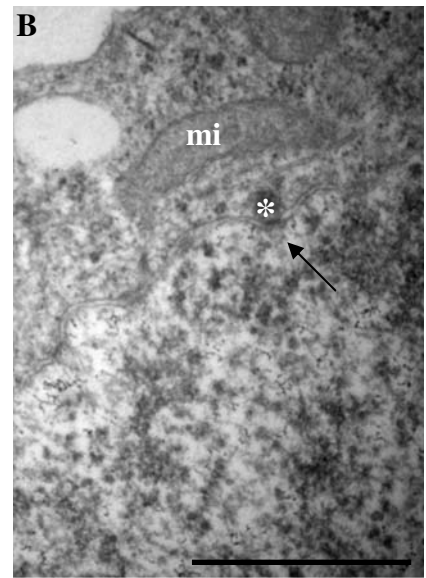
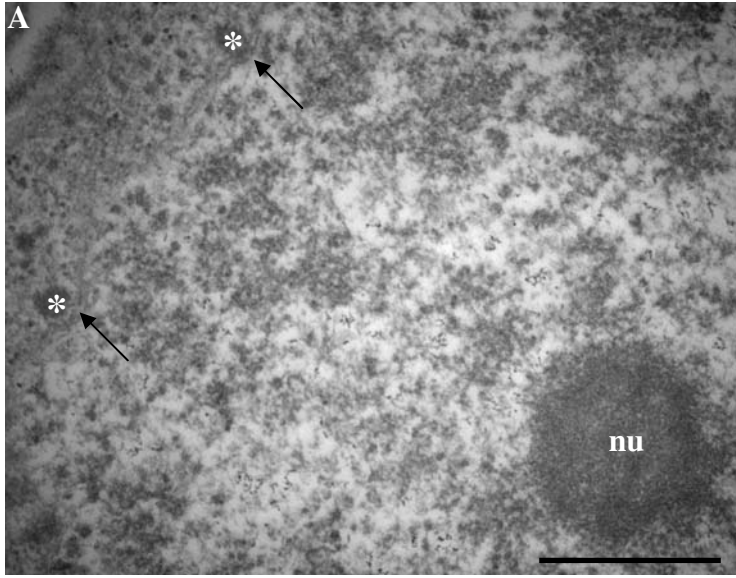
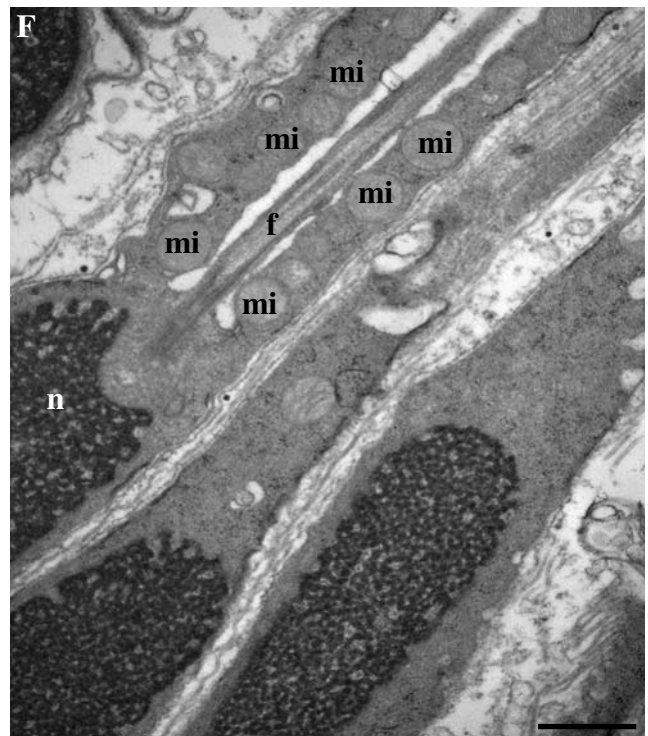
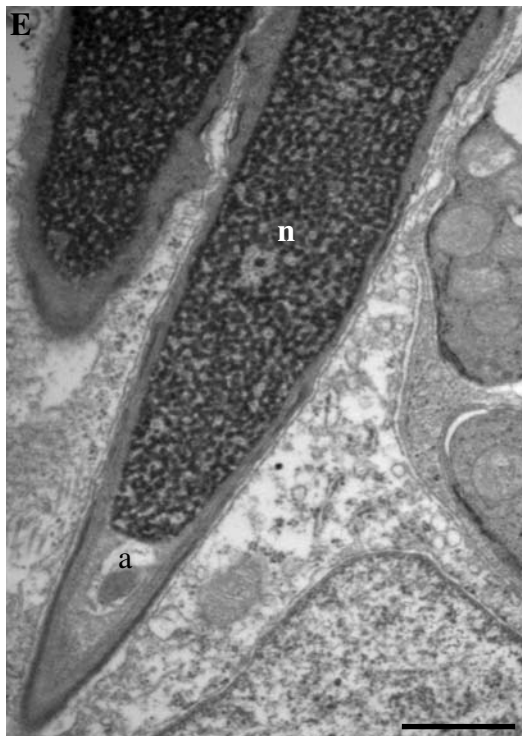
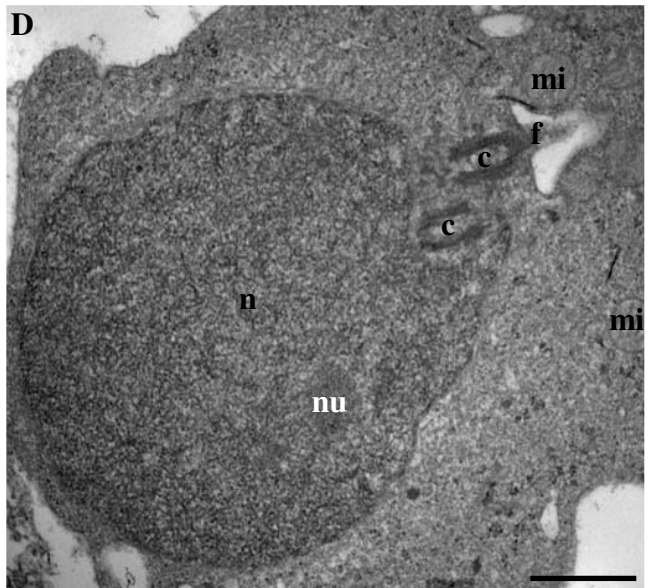
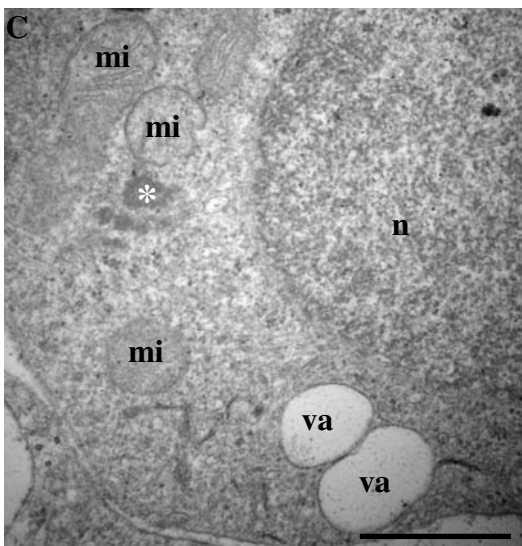
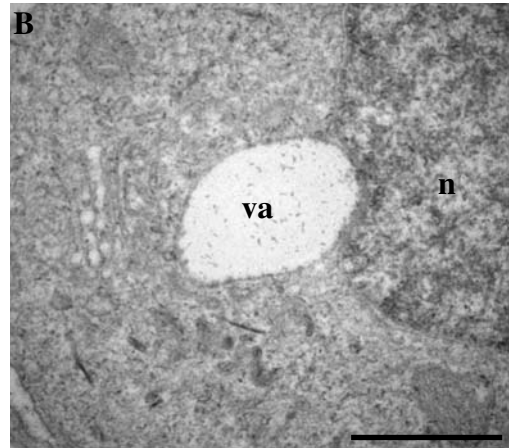
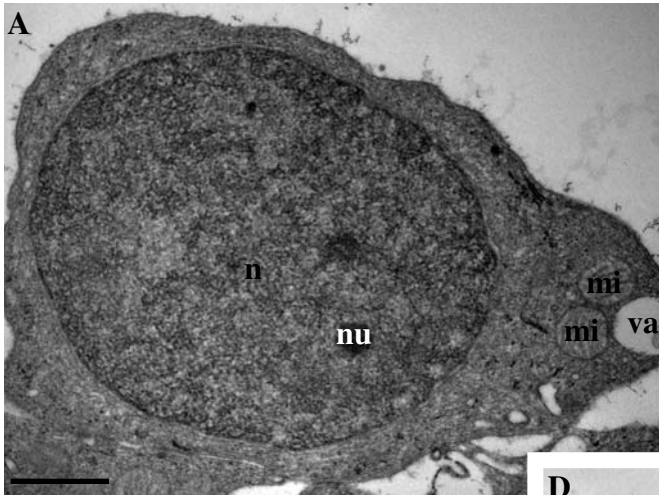


Figura 6: Análise ultra-estrutural de túbulos seminíferos de *Dendropsophus minutus*. A e B: Espermátides em alongamento com material nucleolar reorganizado (nu) e formação da vesícula acrossomal (va) na região anterior do núcleo. É possível observar a presença de aglomerados de mitocôndrias (mi) nessa região. C: Migração dos aglomerados de mitocôndrias (mi) em associação com material ribonucleoproteico granular (asterisco). D: Espermátide em alongamento sem a presença de material ribonucleoproteico próximo às mitocôndrias. E e F: Espermatozóides em maturação não apresentando a presença de material ribonucleoproteico (n – núcleo; c – centríolo; f – flagelo; mi – mitocôndria; va – vesícula acrossomal). Barras = 10µm.



**Relação entre o ciclo nucleolar e a formação do corpo cromatóide na espermatogênese de
Phrynops geoffroanus (Reptilia, Testudines).**

Rita Luiza Peruquetti
Sebastião Roberto Taboga
Sílvia Regina Pagliarini Cabral
Classius de Oliveira
Maria Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira*

Universidade Estadual Paulista – UNESP/IBILCE, Departamento de Biologia.
Rua Cristóvão Colombo, 2265 – São José do Rio Preto, SP, Brasil, CEP 15054-000.

***Autor Correspondente:**

Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira
Departamento de Biologia – IBILCE/UNESP
Rua Cristóvão Colombo, 2265 – Jardim Nazareth
CEP 15054 000 São José do Rio Preto, SP, Brasil
Phone: +55 17 3221 2378
Fax: +55 17 3221 2390
e-mail: tercilia@ibilce.unesp.br

**O presente artigo foi escrito sob as normas da revista *Reproduction in Domestic Animals*:
Impresso (ISSN: 0936-6768); On-line (ISSN: 1439-0531).**

Resumo

O nucléolo é um domínio territorial do núcleo, que está relacionado com a compartimentalização das funções nucleares. Várias funções são atribuídas ao nucléolo, sendo que a principal delas está relacionada com a biogênese dos ribossomos. Algumas evidências indicam que a fragmentação do material nucleolar durante a espermatogênese pode estar relacionada com a formação do corpo cromatóide (CB). O CB é uma estrutura citoplasmática cuja função, a ele atribuída, refere-se à “reserva” ou “estoque”, de RNA e de proteínas, para que essas moléculas possam ser utilizadas no processo de diferenciação final dos espermatozoides. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi acompanhar, qualitativamente e quantitativamente, o ciclo nucleolar durante a espermatogênese de *Phrynos geoffroanus* (Reptilia, Testudines), por meio de análises citoquímicas, realizadas em cortes histológicos de túbulos seminíferos e, também, realizar uma comparação entre essa fragmentação nucleolar e a formação do CB nessa espécie, por meio de análise ultra-estrutural. Para a realização das análises qualitativas do ciclo nucleolar foram utilizadas algumas técnicas citoquímicas, como, Hematoxilina-eosina (HE), azul de toluidina (AT), variante da concentração crítica de eletrólitos (CEC), reação de Feulgen e impregnação por íons prata (AgNOR), aplicadas em cortes histológicos de testículos. As análises quantitativas do ciclo nucleolar foram realizadas a partir dos cortes histológicos impregnados pela prata, onde, o número de nucléolos presentes nas espermatogônias e nas espermátides iniciais foi determinado e comparado por Análise de Variância de duas vias, completada pelo teste LSD para comparações múltiplas. Também foram mensuradas as áreas nuclear e nucleolar das espermatogônias e espermátides iniciais e, posteriormente, essas áreas foram comparadas por meio da aplicação do teste t independente. Para relacionar o ciclo nucleolar com a formação do CB no epitélio seminífero de *P. geoffroanus* foi aplicada a técnica convencional para análise em microscopia eletrônica de transmissão (MET). As análises qualitativas do ciclo nucleolar, evidenciaram que ocorre uma desorganização e, conseqüentemente, uma fragmentação do material nucleolar após o paquíteno da primeira divisão meiótica, nos espermátocitos primários. O nucléolo volta a se reorganizar no núcleo das espermátides iniciais, porém nas espermátides finais e espermatozoides maduros, a observação de material nucleolar organizado não foi mais possível. As análises quantitativas do ciclo nucleolar demonstraram que as espermatogônias com 1 nucléolo são mais freqüentes do que as espermátides iniciais, com esse número de nucléolo. O inverso acontece com as células que apresentam 2 nucléolos, o que indica um leve aumento do número de nucléolos nas espermátides iniciais. A área nucleolar foi significativamente maior nas espermatogônias em relação à área nucleolar das espermátides iniciais, indicando que ocorre uma redução da área

nucleolar durante a divisão meiótica. A análise ultra-estrutural demonstrou que o CB começa a se formar no citoplasma dos espermátocitos primários, fase na qual ocorre a fragmentação do material nucleolar. O CB foi observado em associação com aglomerados de mitocôndrias e em associação com o complexo de Golgi no citoplasma dos espermátocitos primários. Nas espermátides iniciais o CB foi observado em associação com aglomerados de mitocôndrias e com gotículas de lipídios, na região de formação da vesícula acrossomal. Nas espermátides em alongamento o CB foi observado em associação com essas mesmas estruturas, porém, localizado na região posterior do núcleo. Esse conjunto, formado pelo CB, gotículas de lipídios e algumas mitocôndrias, foi eliminado nos corpos residuais. Portanto, pode-se concluir que, em *P. geoffroanus*, o nucléolo pode estar relacionado com a formação do CB, essa organela citoplasmática que possui importantes funções durante o processo de espermatogênese. Algumas das funções que podem ser atribuídas ao CB, no presente estudo, são a participação do CB na formação da vesícula acrossomal e direcionamento de mitocôndrias para a região de formação da cauda e da bainha mitocondrial dos espermatozoides.

1. Introdução

O nucléolo é um domínio territorial do núcleo, que está relacionado com a compartimentalização das funções nucleares (Hernandez-Verdun, 1991). A maioria dos eventos de biogênese de ribossomos, como a síntese de RNA ribossomal (RNAr) e o processamento e a reunião das subunidades ribossomais, ocorre no interior do nucléolo (Cmarko et al., 2008). A maquinaria nucleolar de biogênese de ribossomos está distribuída em três diferentes compartimentos nucleolares, que podem ser observados em microscopia eletrônica de transmissão (MET): centro fibrilar (CF), componente fibrilar denso (CFD) e componente granular (CG). Cada um desses três compartimentos abrigam diferentes etapas da biogênese de ribossomos, como a transcrição de RNAr, a maturação e o *splicing* dos RNAr imaturos e a reunião das partículas pré-ribossomais (Sirri et al., 2008). Devido a isso, a principal função atribuída ao nucléolo é o papel que ele desempenha na biogênese de ribossomos (Gerbi et al., 2003; Boisvert et al., 2007; Sirri et al., 2008). De fato, existe uma grande quantidade de proteínas nucleolares, aproximadamente 271, envolvidas no desempenho dessa função. Porém, vários trabalhos têm demonstrado que o nucléolo possui várias outras funções, denominadas não ribossomais, como por exemplo: modificações de nucleotídeos de ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs); biossíntese de sinais de reconhecimento de partículas; captura e liberação de proteínas envolvidas em silenciamento gênico (Pederson, 2002). Além disso, em alguns compartimentos nucleolares, tem sido

observada a presença das proteínas Net1, Cdc14 e Sir2, que são responsáveis por mecanismos de controle do ciclo celular (Shou et al., 1999; Straight et al., 1999; Visitin et al., 1999; Garcia e Pillus, 1999) e proteínas supressoras de tumor, como a ARF (Carmo-Fonseca et al., 2000) e a p53 e a Myc (Montanaro et al., 2007). O nucléolo de células germinativas também pode atuar no controle do ciclo celular meiótico, pois abriga as proteínas Pch2 e Sir2, que estão ligadas ao silenciamento cromatínico e a promoção do *checkpoint* do paquíteno (San-Segundo e Roeder, 1999).

Alguns trabalhos têm sugerido que a fragmentação do material nucleolar, durante o processo de espermatogênese, pode estar relacionada com a formação do corpo cromatóide (CB) nas células germinativas masculinas (Comings e Okada, 1972; Andersen, 1978; Andonov, 1990; Peruquetti et al., 2008 a,b). O CB é uma organela citoplasmática e uma função de “reserva” ou “estoque”, de RNA e de proteínas, para que as mesmas sejam utilizadas no processo de diferenciação final dos espermatozoides, tem sido atribuída a ela (Söderström e Parvinen, 1976; Saunders et al., 1992). O CB é considerado um complexo macromolecular que parece ter um papel como coordenador do controle pós-transcricional de produtos gênicos em células germinativas masculinas haplóides e, também, como centro de determinação dos destinos de RNAm (Parvinen, 2005; Kotaja et al., 2006; Kotaja e Sassone-Corsi, 2007). Porém alguns autores encontraram evidências de que o CB possui algumas características agregativas. Essas evidências indicariam que ele não é um local de síntese, como proposto previamente, mas um local de degradação onde DNA, RNA e proteínas desnecessárias são digeridas (Haraguchi et al., 2005). Apesar dos recentes esforços, ainda existem muitas dúvidas em relação à função dessa estrutura citoplasmática nas células germinativas. A origem do CB também permanece incerta, existindo várias suposições para a mesma. Além da sugestão de que o CB se origine a partir de material nucleolar fragmentado, realizada por alguns autores, outras origens são propostas para essa estrutura. Alguns autores defendem a idéia de que o CB origine-se a partir de algum outro produto nuclear, que atravessa o complexo de poro em direção ao citoplasma das células (Parvinen e Parvinen, 1979; Parvinen et al., 1997). Existem, ainda, autores que afirmam que o CB se origina a partir do acúmulo de um material inter-mitocondrial no citoplasma das espermátides (Fawcett et al., 1970) ou de alguns produtos mitocondriais que são liberados para o citoplasma celular (Reunov et al., 2000).

Tendo em vista esse problema biológico, o objetivo do presente estudo foi acompanhar, qualitativamente e quantitativamente, o ciclo nucleolar durante a espermatogênese de *Phrynosops geoffroanus* (Reptilia, Testudines), por meio de análises citoquímicas realizadas em cortes histológicos de túbulos seminíferos e, realizar uma comparação entre essa fragmentação nucleolar e a formação do CB dessa espécie, por meio de análise ultra-estrutural. Os répteis, classe à qual a espécie utilizada no presente

estudo pertence, são os mais primitivos vertebrados amniotas e possuem como característica, além do surgimento do amnion, outros aspectos de transição da vida aquática para a terrestre, além da independência da água para a reprodução (Gribbins et al., 2003). Devido ao fato de pertencerem a um grupo de transição, possuem aspectos reprodutivos que os assemelham aos demais vertebrados amniotas (aves e mamíferos), como por exemplo, testículo tubular, fertilização interna associada a órgãos copulatórios e um órgão para estoque de espermatozóide (epidídimo) (Pudney, 1990), porém, ainda possuem alguns aspectos reprodutivos pertencentes ao grupo dos vertebrados anamniotas (peixes e anfíbios), como por exemplo, um padrão temporal e sazonal de desenvolvimento das células germinativas (Gribbins et al., 2003). A maioria dos trabalhos, realizados para caracterização do CB, tem empregado como modelo experimental algumas espécies de invertebrados, peixes, anfíbios e, a grande maioria deles, se concentra no estudo da espermatogênese de mamíferos. Dessa forma nenhum estudo que vise descrever a formação e as possíveis funções do CB, durante a espermatogênese de répteis, esse grupo animal que possui interessantes características reprodutivas, tem sido realizado. Sendo assim, o objetivo do presente trabalho visa preencher essa lacuna.

2. Material e Método

Foram utilizados cinco machos adultos de *Phrynops geoffroanus* (Reptilia, Testudines), que foram coletados por meio de busca ativa no Córrego Felicidade – São José do Rio Preto – SP. Todos os animais foram trazidos do campo para o laboratório e, durante a realização dos experimentos foram aclimatados em terrários apropriados, recebendo alimento e água *ad libitum*. Todos os exemplares foram anestesiados e mortos por meio de injeção letal do anestésico Cloridrato de Ketamina® no coração, provocando uma parada cardíaca e, posteriormente ao óbito dos animais, procedeu-se a dissecação dos mesmos e a retirada das gônadas para posterior processamento.

Análises citoquímicas

Os testículos foram removidos e, imediatamente, fixados em Karnovsky, para posterior inclusão em historesina. Desses fragmentos testiculares foram obtidos cortes de 3 µm em micrótomo Leica RM 2155. Esses cortes foram submetidos a algumas técnicas citoquímicas para um acompanhamento qualitativo da distribuição do material nucleolar nas células germinativas. As técnicas citoquímicas utilizadas foram: Hematoxilina-Eosina

(Ribeiro e Lima, 2000); azul de toluidina (AT) pH 4,0 (Mello e Vidal, 1980); Variante da técnica da Concentração Crítica de Eletrólitos – CEC (Mello et al., 1993); reação de Feulgen (Mello e Vidal, 1980, com modificações); Impregnação pelos íons prata (AgNOR) (Howell e Black, 1980). Todas as lâminas foram analisadas em microscópio Olympus BX60, com sistema analisador de imagem *Image Pró-Plus – Média Cybernetics*, Versão 6.1 para Windows.

Além das análises qualitativas da distribuição do material nucleolar, os cortes histológicos impregnados pela prata, também foram utilizados para a realização de algumas análises quantitativas, como: análise do número de nucléolos presentes nas espermatogônias e nas espermátides iniciais; e análise das áreas nuclear e nucleolar das espermatogônias e das espermátides iniciais.

Análise do número de nucléolos nas espermatogônias e nas espermátides

Foram analisadas $122,6 \pm 7,6$ espermatogônias e $138,0 \pm 3,46$ espermátides iniciais, em cada cágado utilizado (n=5). O número de nucléolos foi determinado para todas as espermatogônias e espermátides iniciais analisadas, em cada um dos cinco animais. Após a determinação de todos os valores absolutos, procedeu-se o cálculo da porcentagem de espermatogônias e espermátides iniciais com diferentes números de nucléolos, uma vez que o total de células analisadas foi diferente em cada animal utilizado.

Análises das áreas nuclear e nucleolar nas espermatogônias e espermátides

Todas as células utilizadas na análise anterior foram fotodocumentadas em um microscópio Olympus BX 40, com sistema analisador de imagem *Image Pró-Plus – Média Cybernetics*, Versão 4.5 para Windows. Posteriormente, foram obtidas as medidas das áreas nuclear e nucleolar dessas células, em sistema analisador de imagens *Image J – Image Processing and Analysis in Java*, Versão 1.40 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Para as células com um único nucléolo, a medida da área obtida era prontamente mensurada. Já para as células que possuíam dois ou mais nucléolos, considerou-se como área nucleolar total (utilizada para realização das análises) a soma das áreas de cada nucléolo.

Análise dos dados

A normalidade dos dados foi testada por meio da análise do Skewness e do Kurtosis (Ha e Ha, 2007) e a homogeneidade de variância pelo teste F max (Zar, 1999).

O número de nucléolos foi comparado entre espermatogônias e espermátides iniciais e dentro do mesmo tipo celular por Análise de Variância de duas vias, completada pelo teste LSD para comparações múltiplas. Já as áreas nucleares e nucleolares das espermatogônias foram comparadas com as áreas nucleares e nucleolares das espermátides iniciais, por meio do teste t independente. Foi considerado $p \leq 0,05$ para significância estatística e todas as análises utilizadas foram baseadas em Zar (1999).

Análise Ultra-estrutural – Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Amostras testiculares dos espécimes utilizados 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 (1%), durante 2 horas em geladeira e, 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. Desses fragmentos testiculares incluídos em araldite, foram obtidos cortes semi-finos e ultra-finos, em ultramicrotomo Leica Ultracut UCT. Os cortes ultra-finos 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 e Coggeshall, 1965). Os resultados das técnicas de MET foram documentados por eletromicrografias obtidas em microscópio eletrônico de transmissão Leo-Zeiss (Cambridge, UK) 906 com sistema analisador de imagens ITEM (*Soft Image System* – Câmera Veleta 2K x 2K TEM CCD Camera).

Nota ética

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEAA) – UNESP / Botucatu – SP, sob protocolo nº057/06.

3. Resultados

Análises citoquímicas

As análises citoquímicas qualitativas foram empregadas para acompanhar a distribuição do material nucleolar, durante a divisão meiótica, que ocorre no epitélio seminífero de *Phrynos geoffroanus*, sendo que a técnica de HE foi utilizada para identificar o padrão e o estágio de maturação dos túbulos seminíferos da espécie utilizada. Esta técnica evidenciou um padrão de espermatogênese semelhante ao dos

mamíferos, sendo que nos túbulos seminíferos utilizados foi possível observar células em diferentes graus de maturação: espermatogônias, espermatócitos primários, espermatídes iniciais e espermatozóides (Figura 1A). A identificação dos tipos celulares presentes no epitélio germinativo foi realizada segundo Gribbins et al. (2003). A técnica de coloração pelo azul de toluidina (AT) permitiu observar que as células do epitélio germinativo possuíam uma intensa metacromasia nas em todos os domínios nucleares (eucromatina, heterocromatina, nucléolo, cromossomos) (Figuras 1C, 1D e 1E). Geralmente, o grau de metacromasia variou de acordo com o nível de compactação do material genético, com a ploidia do núcleo celular e, principalmente, com a intensidade da complexação dos ácidos nucléicos com corpúsculos de ribonucleoproteínas (RNPs). A técnica do AT foi utilizada como controle da técnica variante da concentração crítica de eletrólitos (CEC) tendo, esta última, evidenciado nucléolos metacromáticos nas espermatogônias (Figura 1F), fragmentação do material nucleolar nos espermatócitos primários (Figura 1G) e ausência de marcação nucleolar nas espermatídes iniciais (Figura 1H). Foi detectada a presença de uma pequena quantidade de “corpúsculos residuais” metacromáticos no lúmen dos túbulos seminíferos. A reação de Feulgen, uma técnica citoquímica específica para detecção de DNA, revelou todos os núcleos das células germinativas em cor púrpura, variando em intensidade de acordo com o grau de ploidia do núcleo e de compactação de cromatina nuclear. Pode-se observar a presença de regiões heterocromáticas destacadas mais fortemente, sempre em associação com halos claros, que sugerem a presença de material nucleolar. Pode ser notado que as áreas claras são muito mais evidentes nas espermatogônias (Figura 1I) do que no espermatócitos primários (Figura 1J) e nas espermatídes iniciais (Figura 1K), indicando uma fragmentação e diminuição da área nucleolar nesses tipos celulares. A impregnação por íons prata (AgNOR) evidenciou as regiões nucleolares das diferentes células do túbulo seminífero, sendo que nas espermatogônias (Figura 1L) o nucléolo foi claramente destacado, enquanto que nos espermatócitos primários (Figura 1M) e nas espermatídes iniciais (Figura 1N), o nucléolo apresentou-se, respectivamente, fragmentado e com área reduzida.

Análise do número de nucléolos nas espermatogônias e nas espermatídes

Foi observada uma interação entre o tipo celular e o número de nucléolos ($F = 17,247$; $p = 0,000001$). Nessa interação o número de espermatogônias que possuíam apenas 1 nucléolo foi maior do que o número de espermatídes iniciais com apenas 1 nucléolo. Entretanto, o número de espermatogônias que possuíam 2 nucléolos foi menor do que o número de espermatídes iniciais, com a mesma quantidade de nucléolos (Figura 2).

Análises das áreas nuclear e nucleolar nas espermatogônias e espermátides

Foi encontrada diferença significativa entre as áreas nucleares das espermatogônias e espermátides iniciais ($t = 12,14$; $p = 0,000002$) e entre as áreas nucleolares das espermatogônias e das espermátides iniciais ($t = 14,36$; $p = 0,000001$). Em ambos os casos, as áreas nas espermatogônias foram maiores do que as áreas nas espermátides iniciais (Figura 3).

Análise Ultra-estrutural – Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A análise ultra-estrutural foi empregada para acompanhar a fragmentação do nucléolo, bem como a formação do CB, no epitélio seminífero da espécie utilizada no presente estudo. As espermatogônias apresentaram nucléolo do tipo compacto organizado no centro do núcleo e não houve indícios do acúmulo de “nuages”, compostas por material ribonucleoprotéico, ou do início da formação do CB, no citoplasma desse tipo celular (Figuras 4A e 4B). Algumas evidências indicaram a fragmentação tardia do material nucleolar, pois espermátócitos primários em paquíteno, nos quais foi observada a presença de complexo sinaptonêmico, ainda possuíam material nucleolar organizado (Figura 4C). Nesse estágio também não foi detectado o início da formação do CB. Nos espermátócitos primários, em estágios posteriores ao paquíteno, foi detectado o início do acúmulo de material ribonucleoprotéico que, ao se unirem, dão origem ao CB e, também foi observada, a completa desorganização do nucléolo. O material ribonucleoprotéico que se acumula no citoplasma dos espermátócitos primários, dando origem ao CB, pode ser observado em associação com aglomerados de mitocôndrias (Figura 4D), isolado (Figura 4E) ou, às vezes, em associação com o complexo de Golgi (Figura 4F). Nas espermátides iniciais o CB foi observado em associação com aglomerados de mitocôndrias e com gotículas de lipídios, na região anterior do núcleo, no local onde ocorre a formação da vesícula acrossomal (Figuras 5A, 5B e 5C). Nas espermátides em alongamento foi observada a presença de um nucléolo reorganizado, porém com uma área reduzida em relação à área do nucléolo das espermatogônias, e, também, a migração do conjunto formado pelo CB, por aglomerado de mitocôndrias e por gotículas de lipídios para a região posterior do núcleo, onde irá ocorrer a formação da cauda e da bainha mitocondrial dos espermatozóides (Figuras 5D, 5E, 5F e 5G). O material do CB, juntamente com as gotículas de lipídios e com as mitocôndrias excedentes, parece ter sido eliminado nos restos citoplasmáticos, formando os corpos residuais no lúmen do túbulo seminífero (Figura 5H).

4. Discussão

O presente estudo teve como objetivo acompanhar o ciclo nucleolar, ou seja, sua fragmentação e a distribuição desse material nucleolar durante a divisão meiótica, no epitélio germinativo de *Phrynosops geoffroanus*, e verificar se existe relação entre esse fenômeno e a formação do corpo cromatóide (CB) nessa espécie.

O nucléolo desempenha vários papéis cruciais no núcleo: além da sua função na produção de ribossomos ele é um domínio nuclear multifuncional, e a atividade nucleolar está ligada com várias patologias (Sirri et al., 2008). Além das 271 proteínas nucleolares envolvidas na síntese e no processamento de RNAr, existem outras proteínas nucleolares, que parecem possuir diferentes funções, como: modificações de nucleotídeos de snRNPs; biossíntese de sinais de reconhecimento de partículas; captura e liberação de proteínas envolvidas em silenciamento gênico (Pederson, 2002). Além disso, o nucléolo abriga as proteínas Net1, Cdc14 e Sir2, que são responsáveis por mecanismos de controle do ciclo celular (Shou et al., 1999; Straight et al., 1999; Visitin et al., 1999; Garcia e Pillus, 1999) e possui uma proteína, denominada ARF, que é considerada supressora de tumor (Carmo-Fonseca et al., 2000), além de outras proteínas que são consideradas supressoras de tumor, como a p53 e a Myc, e que podem ser responsáveis pela tumorigênese (Montanaro et al., 2007). Há uma variação no tamanho do nucléolo em células em crescimento e em células em período de restrição, sendo que ocorre a desorganização e a organização nucleolar a cada ciclo celular mitótico ou meiótico (Pikaard, 2002; Teruel et al., 2007). Além disso, o próprio nucléolo possui proteínas que são responsáveis pelo *checkpoint* do paquíteno, reprimindo a recombinação nas regiões de DNAr, como a Pch2 e Sir2 (Garcia e Pillus, 1999; San-Segundo e Roeder, 1999).

O acompanhamento qualitativo da fragmentação e distribuição do material nucleolar durante a espermatogênese de *P. geoffroanus*, por meio de técnicas citoquímicas aplicadas em cortes histológicos de túbulos seminíferos, demonstrou que o nucléolo, nas espermatogônias, permanece organizado, podendo ser observada a presença de 1 a 4 nucléolos. Após o início da divisão meiótica, ocorre uma desorganização do material nucleolar, quando os espermatócitos primários completam a fase de paquíteno. Após o final da divisão meiótica, o nucléolo se reorganiza novamente, no núcleo das espermátides iniciais, podendo ser observada, novamente, a presença de 1 a 4 nucléolos. Porém, os nucléolos reorganizados parecem possuir uma área menor do que a área dos nucléolos das espermatogônias. Esse fenômeno da fragmentação nucleolar durante a prófase I e sua, posterior, reorganização nas espermátides iniciais, já foi amplamente descrito em vários trabalhos (por exemplo,

Takeuchi e Takeuchi, 1990; Tartarotti e Azeredo-Oliveira, 1999; Severi-Aguiar et al., 2002; Peruquetti et al. 2008a,b). Também já foi observada, no nucléolo de espermatócitos e espermátides de camundongo, a diminuição da quantidade das proteínas C23 e B23, presentes no CFD e CFD, e que são responsáveis, respectivamente, pela transcrição de RNAr e clivagem dos pré-RNAr (Biggiogera et al.,1991). Todos esses dados indicam a ocorrência de fragmentação nucleolar na prófase meiótica e, sua posterior reorganização no núcleo de espermátides iniciais. Esse padrão de desorganização do material nucleolar, após o paquíteno, da primeira divisão meiótica é semelhante ao descrito para cordados em geral, onde é descrita a ocorrência de uma vigorosa atividade nucleolar durante a prófase I, com atividade nucleolar máxima em paquíteno (Schmid et al., 1982; Wachtler e Stahl, 1993; Teruel et al, 2007). Não foi observada a presença de nucléolo organizado no núcleo das espermátides finais e dos espermatozóides maduros. A presença do nucléolo nesses tipos celulares não é necessária, uma vez que, após o processo de fecundação, os nucléolos dos pró-núcleos, tanto masculino quanto feminino, são de origem materna. Trabalhos recentes demonstraram que o nucléolo materno, associado com outros elementos nucleoplasmáticos, é essencial para o desenvolvimento embrionário (Lefrève, 2008).

O ciclo nucleolar também foi analisado quantitativamente, tendo sido avaliado o número de nucléolos presentes nas espermatogônias e nas espermátides iniciais e, também, a área dos núcleos e dos nucléolos dos mesmos tipos celulares. Em relação ao número de nucléolos, foi detectada uma diferença entre os dois tipos celulares analisados, sendo que, espermatogônias com apenas 1 nucléolo foram mais freqüentes, em relação às espermátides iniciais com um único nucleólo. Já as espermátides iniciais com 2 nucléolos foram encontradas com maior freqüência, quando comparadas com as espermatogônias com o mesmo número de nucléolos. Esses resultados demonstram que houve um aumento no número de células com dois nucléolos, após a divisão meiótica. É bem conhecido que o número de nucléolos de uma célula germinativa está relacionado com o número de RONS que ela possui (Guo et al., 1996; Teruel et al., 2007). Sendo assim, nas espermatogônias diplóides seria esperado encontrar o dobro de nucléolos do que o encontrado nas espermátides iniciais haplóides. Porém, no presente trabalho, foi demonstrado exatamente o oposto, ou seja, ao invés da redução do número de nucléolos foi observado o aumento desse número, nas espermátides iniciais. Esse fato pode ser explicado pela presença de uma fragmentação nucleolar muito intensa, gerando muitos corpúsculos nucleolares, que podem ser contados como nucléolos organizados nesse tipo celular. Já em relação às áreas nuclear e nucleolar, das espermatogônias e das espermátides iniciais, foi encontrado que essas áreas nas espermatogônias foram significativamente maiores quando comparadas às mesmas áreas das espermátides iniciais, indicando que ocorre uma redução do tamanho do nucléolo de um tipo celular

para outro. Tem sido demonstrado que o tamanho do nucléolo é proporcional à quantidade de síntese de RNAr (Caspersson, 1950), o tamanho da RON (número de cístrons de RNAr) é, em geral, correlacionado com seu nível de expressão (Shubert e Künzel, 1990), que a hipertrofia do nucléolo é um estado em que a síntese de RNAr e ribossomos está aumentada (Nakamoto et al., 2001) e que um nucléolo grande pode estar correlacionado com atividade de divisão celular e com estágios que possuem uma alta demanda de proteína (Mosgoeller, 2004). Todos esses fatos podem ser usados para explicar a redução da área nucleolar das espermatídes, porém essa redução da área nucleolar das espermatídes iniciais também pode estar relacionada com a fragmentação do material nucleolar, no início da prófase I, e migração de parte desse material para o citoplasma das células germinativas, onde esse material participaria na formação do corpo cromatóide (CB).

O CB é uma organela citoplasmática e uma função de “reserva” ou “estoque”, de RNA e de proteínas, para que as mesmas sejam utilizadas no processo de diferenciação final dos espermatozoides, tem sido atribuída a ela (Söderström e Parvinen, 1976; Saunders et al., 1992). O CB é considerado um complexo macromolecular que parece ter um papel como coordenador do controle pós-transcricional de produtos gênicos em células germinativas masculinas haplóides e também como centro de determinação dos destinos de RNAm (Kootaja et al., 2006; Kootaja e Sassone-Corsi, 2007). Análises ultra-estruturais revelaram que o CB possui uma estrutura porosa, contendo regiões que apresentam diferentes eletro-densidades (Figuroa e Burzio, 1998). A origem dessa estrutura citoplasmática ainda permanece incerta. Alguns autores acreditam que o CB seja uma estrutura derivada da fragmentação e migração de material nucleolar do núcleo para o citoplasma (Comings e Okada, 1972; Andersen, 1978; Andonov, 1990; Peruquetti et al., 2008 a,b). Outros autores defendem a idéia de que o CB é proveniente de algum outro material nuclear, que atravessa o complexo de poro em direção ao citoplasma das células (Parvinen e Parvinen, 1979; Parvinen et al., 1997). Existem autores que afirmam que o CB se origina a partir do acúmulo de um material inter-mitocondrial no citoplasma das espermatídes (Fawcett et al., 1970) ou de conteúdo mitocondrial que é liberado para o citoplasma celular (Reunov et al., 2000).

Para testar se existe alguma relação entre a fragmentação do material nucleolar, durante a meiose, e o processo de formação do CB, no presente trabalho, foi empregada a análise ultra-estrutural, por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET). Foi observado que as espermatogônias possuem nucléolo organizado, e não possuem evidências do acúmulo de material ribonucleoproteico, que posteriormete se unirá e dará origem ao CB, em seu citoplasma. Os répteis são os vertebrados amniotas mais primitivos e exibem características intermediárias entre o grupo ao qual pertence e os

vertebrados amniotas (Gribins et al., 2003). Por exemplo, os répteis possuem testículo tubular, fertilização interna associada a órgãos copulatórios e um órgão para estoque de espermatozóide (epidídimo) (Pudney, 1990), como os demais vertebrados amniotas (aves e mamíferos). Porém, apesar do arranjo tubular dos testículos, a espermatogênese possui uma distribuição temporal, como ocorre nos vertebrados anamniotas (peixes e anfíbios), e não espacial como ocorre nos amniotas (Gribins et al., 2003). Com relação à formação do CB, os répteis possuem características que os aproximam mais dos demais vertebrados amniotas, pois nestes não há evidências do início da formação do CB nas espermatogônias, enquanto que, em peixes e anfíbios, foi detectado o início da formação dessa estrutura no citoplasma das espermatogônias (Peruquetti 2009).

Observou-se que o CB inicia o seu processo de formação no citoplasma dos espermatócitos primários, após a fase de paquíteno, exatamente no momento em que o nucléolo inicia o seu processo de desorganização. Muitos trabalhos, utilizando outras espécies de animais, tanto vertebrados quanto invertebrados, têm proposto que o CB realmente origina-se no citoplasma dos espermatócitos primários (Kootaja e Sassone-Corsi, 2007; Peruquetti et al., 2008a,b). Esse processo de formação do CB inicia-se por meio do acúmulo de pequenas “nuages”, um material ribonucleoproteico, no citoplasma dos espermatócitos primários. Esse material ribonucleoproteico, aos poucos, vai se coalescendo e, finalmente, dá origem a um único CB. Esse tipo de origem para o CB já foi proposto em outros trabalhos (Paniagua et al., 1986; Peruquetti et al., 2008a,b). Esse material ribonucleoproteico que irá originar o CB foi observado, no citoplasma dos espermatócitos primários, em associação com aglomerados de mitocôndrias, em associação com o complexo de Golgi, ou, às vezes, isolados. A associação com mitocôndrias já foi descrita em vários trabalhos, sendo que alguns autores sugerem que essa associação deve-se ao fato do CB ser formado, totalmente ou parcialmente, por produtos mitocondriais (Reunov et al., 2000) ou por material intermitocondrial (Fawcett et al., 1970). Existe, ainda, uma indicação de que a ligação entre CB e mitocôndrias esteja relacionada com a participação do CB na síntese e no transporte de apocitocromos c_r , uma isoforma do citocromo c somente expressa nos testículos (Hess et al., 1993). Para corroborar com essa sugestão, foi detectada a presença da citocromo c oxidase (COXI), codificada pelo genoma mitocondrial, no CB (Haraguchi et al., 2005). Outros autores, bem como os dados do presente estudos, sugerem que a associação entre CB e mitocôndrias pode estar relacionada com a função, que provavelmente o CB desempenha, de direcionar as mitocôndrias, através do citoplasma das espermátides, para a região posterior do núcleo onde haverá a formação da cauda e da bainha mitocondrial dos espermatozoides (Soley, 1994; Peruquetti et al., 2008a,b). A associação do CB com o complexo de Golgi também já foi demonstrada em vários trabalhos, tendo também recebido, diferentes explicações. Söderström e Parvinen

(1976), Tang et al. (1982), Peruquetti et al. (2008a,b) sugerem que a interação entre as duas estruturas pode estar relacionada com a formação do sistema acrossômico nas espermátides iniciais, já que frequentemente são observadas vesículas deslocando-se entre o complexo de Golgi e o CB. 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. Existe ainda a suposição de que o CB, por estar associado com produtos provenientes do complexo de Golgi, possua algumas características agregativas, sugerindo que ele não é um local de síntese, como proposto por alguns autores, mas um local de degradação onde DNA, RNA e proteínas desnecessárias são digeridas (Haraguchi et al., 2005).

Nas espermátides iniciais o CB foi observado em associação com mitocôndrias e com gotículas de lipídios, próximo à região de formação da vesícula acrossomal. A presença dessas gotículas de lipídio é muito comum nas células germinativas da espécie utilizada no presente estudo, sendo que essa mesma associação também já foi detectada em espermátides em alongamento de *Meriones unguiculatus* (Peruquetti et al., 2008b). Esses autores sugerem que essa ligação precisa ser melhor explorada, porém pode estar relacionada com a participação do CB no metabolismo de hormônios esteróides, durante a espermiogênese. Nas espermátides em alongamento o conjunto CB, aglomerado de mitocôndrias e gotículas de lipídios foi observado na região posterior do núcleo, posicionando-se na região de formação da cauda e da bainha mitocondrial dos espermatozoides. O CB apresenta-se como uma organela extremamente móvel no citoplasma das células germinativas. A presença de actina (Walt e Armbruster, 1984; Aumüller e Seitz, 1988) e de cálcio (Andonov e Chaldakov, 1989) pode estar relacionada com a alta mobilidade da organela, já que no presente estudo, o CB foi detectado em várias posições no citoplasma de espermátócitos primários e das espermátides iniciais e em alongamento. A alta mobilidade da organela também foi registrada por Parvinen et al. (1997) onde o CB foi observado em rápida mudança de posição em relação ao envelope nuclear, complexo de Golgi e áreas de cromatina clara nuclear em espermátides iniciais vivas de rato. Em espermátides finais foi observada a presença de material proveniente do CB, juntamente com as gotículas de lipídios e com algumas mitocôndrias, nos restos citoplasmáticos, sugerindo que esse material seja disperso nos corpos residuais e, possivelmente, degradado no final da espermiogênese (Sud, 1961; Yokota, 2008).

Os dados apresentados demonstram que em *Phrynosops geoffroanus* ocorre fragmentação do nucléolo, no núcleo dos espermátócitos primários que já concluíram o estágio de paquíteno e, nesse exato momento, o CB inicia o seu processo de formação no citoplasma dos espermátócitos primários. Portanto, pode-se concluir que o nucléolo

pode estar relacionado com a formação do CB, essa organela citoplasmática que possui importantes funções durante o processo de espermatogênese. Algumas das funções que podem ser atribuídas ao CB, no presente estudo, são a participação do CB na formação da vesícula acrossomal e direcionamento de mitocôndrias para a região de formação da cauda e da bainha mitocondrial dos espermatozoides.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem ao MSc. Carlos Eduardo Saranz Zago (Laboratório de Biologia Celular – UNESP/IBILCE) pelo auxílio na coleta dos exemplares utilizados no presente estudo, e ao MSc. Tiago da Silveira Vasconcelos (Laboratório de Herpetologia – UNESP/IB) e à MSc. Thaís Billalba Carvalho (Laboratório de Comportamento de Peixes – UNESP/IBILCE) pelo auxílio nas análises estatísticas. Agradecemos especiais ao Sr. Luis Roberto Faleiros Jr (Laboratório de Microscopia e Microanálise – UNESP/IBILCE) e à MSc. Rosana Silistino de Souza (Laboratório de Morfologia – UNESP/IBILCE) por seu auxílio com as técnicas de laboratório. Agradecemos também a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro e pela bolsa de estudo, respectivamente.

6. Referências Bibliográficas

- Andersen K, 1978: Fine structure of spermatogonia and spermatocytes in the blue fox (*Alopex lagopus*). Acta Veter. Scandi. (Denmark). 19 (2) 229-42.
- Andonov M, 1990: Further study of the chromatoid body in rat spermatocytes and spermatids. Z. Mikrosk. Anat. 104 46-54.
- Andonov MD, Chaldakov GN, 1989: Morphological evidence for calcium storage in the chromatoid body of rat spermatids. Experientia. 45 377-378.
- Anton E, 1983: Association of Golgi vesicles containing acid phosphatase with the chromatoid body of rat spermatids. Experientia 39 393-394.
- Aumüller G, Seitz J, 1988: Immunocytochemical localization of actin and tubulin in rat testis and spermatozoa. Histochemistry 39 261-267.
- Biggiogera M, Kaufmann SH, Shaper JH, Gas N, Amalric F, Fakan S, 1991: Distribution of nucleolar proteins B23 and nucleolin during mouse spermatogenesis. Chromosoma. 100 162-172.

Boisvert FM, van Koningsbruggen S, Navascués J, Lammond AI, 2007: The multifunctional nucleolus. *Nature Reviews: Mol. Cell Biol.* 8 574-585.

Carmo-Fonseca M, Mendes-Soares L, Campos I, 2000: To be or not to be in the nucleolus. *Nat. Cell Biol.* 2 E107-E112.

Caspersson T, 1950: Cell growth and cell function, a cytochemical study. WW Norton, New York, New York, USA,.

Cmarko D, Smigova J, Minichova L, Popov A, 2008: Nucleolus: The ribosome factory. *Histol. Histopathol.* 23 1291-1298.

Comings DE, Okada TA, 1972: The chromatoid body in mouse spermatogenesis: Evidence that it may be formed by the extrusion of nucleolar components. *J. Ultrastr. Res.* 39 (1) 15-23.

Fawcett DW, Eddy EM, Phillips DM, 1970: Observations on the fine structure and relationships of the chromatoid body in mammalian spermatogenesis. *Biol. Reprod.* 2 (1) 129-153.

Figuerola J, Burzio LO, 1998: Polysome-like structures in the chromatoid body of rat spermatids. *Cell Tissue Res.* 291 575-579.

Garcia SN, Pillus L, 1999: Net results of nucleolar dynamics. *Cell* 97 825-828.

Gerbi SA, Borovjagin AV, Lange TS, 2003: The nucleolus: a site of ribonucleoprotein maturation. *Curr. Op. Cell Biol.* 15 318-325.

Gribbins KM, Gist DH, Congdon JD, 2003: Cytological evaluation of spermatogenesis and organization of the germinal epithelium in the male slider turtle, *Trachemys scripta*. *J. Morph.* 255 337-346.

Guo M, Davis D, Birchler JA, 1996: Dosage effects on gene expression in a maize ploidy series. *Genetics* 142 1349-1355.

Ha RR, Ha JC, 2007: Integrative statistics for behavioral science. Pearson Custom Publishing, Boston, Washington, USA.

Haraguchi CM, Mabuchi T, Hirata S, Shoda T, Hoshi K, Akasaki K, Yokota S, 2005: Chromatoid bodies: aggresome-like characteristics and degradation sites for organelles of spermiogenic cells. *J. Histochem. Cytochem.* 53(4) 455-465.

Hernandez-Verdun D, 1991: The nucleolus today. *J. Cell Sci.* 99 465-471.

Hess RA, Miller LA, Kirby JD, Margoliash E, Goldberg E, 1993: Immunoelectron microscopic localization of testicular and somatic cytochromes *c* in the seminiferous epithelium of the rat. *Biol. Reprod.* 48 1299-1308.

Howell WM, Black DA, 1980: Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: I-step method. *Experientia.* 36 104-105.

Kotaja N, Bhattacharyya SN, Jaskiewicz L, Kimmins S, Parvinen M, Filipowicz W, Sassone-Corsi P, 2006: The chromatoid body of male germ cells: Similarity with

processing bodies and presence of Dicer and microRNA pathway components. PNAS. *103*(8) 2647-2652.

Kotaja N, Sassone-Corsi P, 2007: The chromatoid body: a germ-cell-specific RNA-processing centre. Mol. Cell Biol. *8* 85-90.

Lefèvre B, 2008: The nucleolus of the maternal gamete is essential for life. BioEssays *30* 613-616.

Mello MLS, Vidal BC, Dantas MN, Monteiro ACP, 1993: Discrimination of the nucleolus by a critical electrolyte concentration method. Acta Histochem. Cytochem. *26* 1-3.

Mello MLS, Vidal BC, 1980: Práticas de Biologia Celular. FUNCAMP Editora Edgard Blücher LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil.

Montanaro L, Treré D, Derenzini M, 2007: Nucleolus, ribosomes, and câncer. Am. J. Pathol. *173*(2) 301-310.

Mosgoeller W, 2004: Nucleolar ultrastructure in vertebrates. In: Olson MOJ (ed) The nucleolus. Kluwer, New York, New York, USA.

Nakamoto K, Ito A, Watabe K et al, 2001: Increased expression of a nucleolar Nop5/Sik family member in metastatic melanoma cells: evidence for its role in nucleolar sizing and function. Am. J. Pathol. *159* 1363-1374.

Paniagua R, Nistal M, Amat P, Rodriguez MC, 1986: Ultrastructural observations on nucleoli and related structures during human spermatogenesis. Anat. Embryol. *174* 301-306.

Parvinen M, 2005: The chromatoid body in spermatogenesis. Int. J. Androl. *28* 189-201.

Parvinen M, Parvinen L, 1979: Active movements of the chromatoid body: A possible transport mechanism for haploid gene products. J. Cell Biol. *80* 621-628.

Parvinen M, Salo J, Toivonen M, Nevalainen O, Soini E, Pelliniemi L, 1997: Computer analysis of living cells: movements of the chromatoid body in early spermatids compared with its ultrastructure in snap-frozen preparations. Histochem. Cell Biol. *108* 77-81.

Pederson T, 2002: Proteomics of the nucleolus: more proteins, more functions? Trends Biochem. Sci. *27*(3) 111-112.

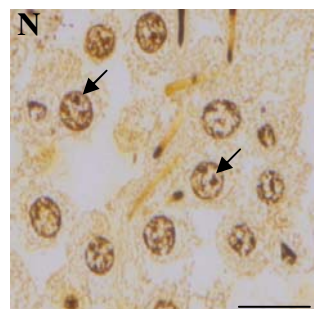
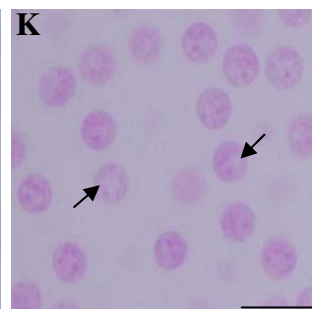
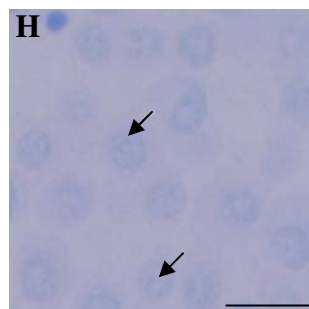
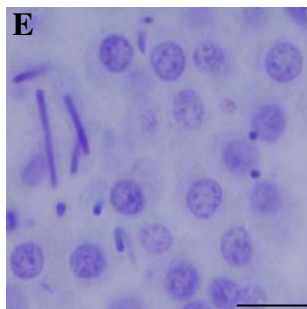
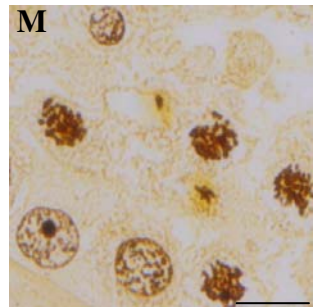
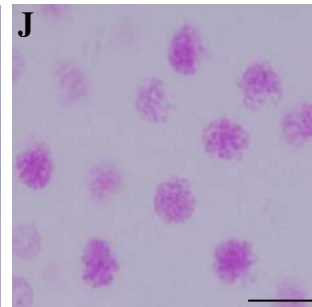
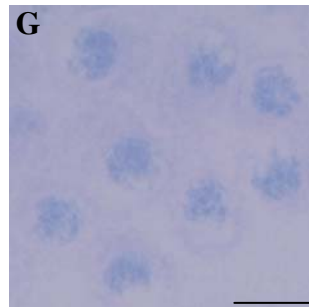
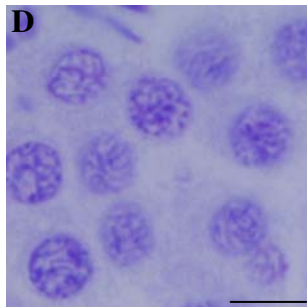
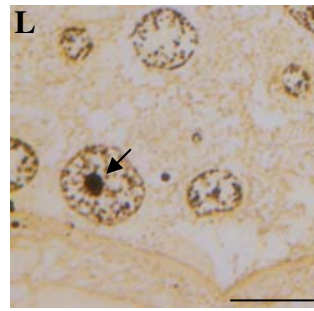
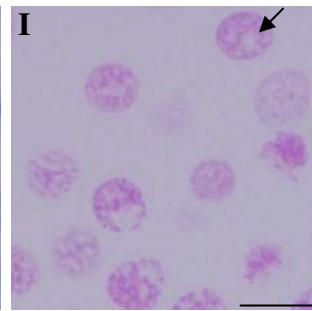
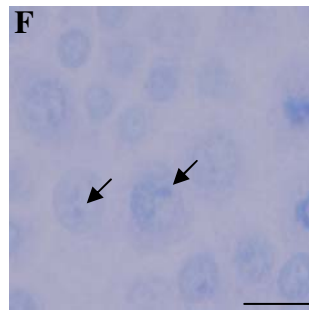
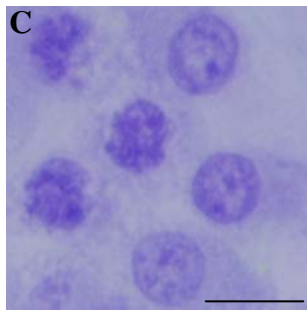
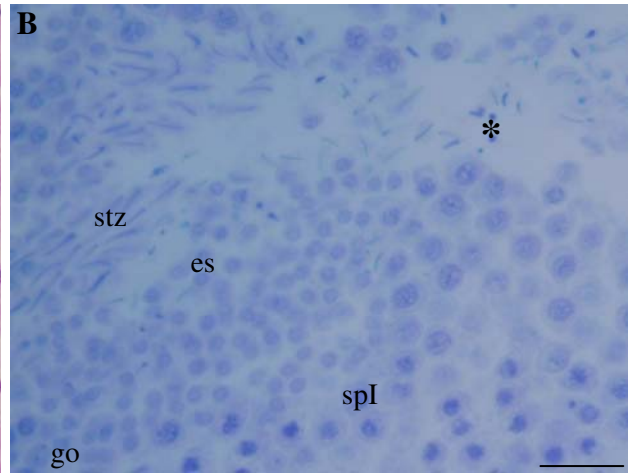
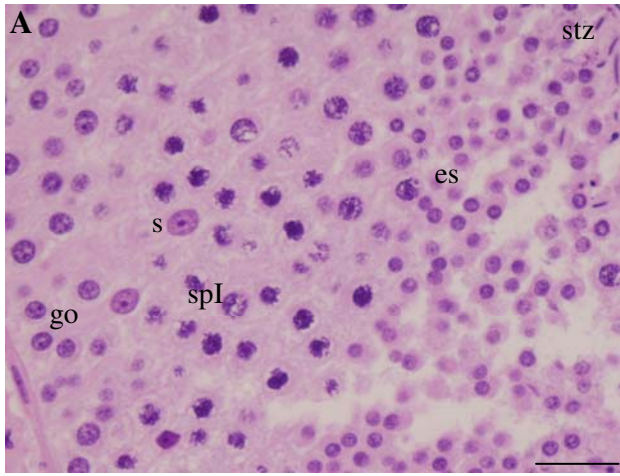
Peruquetti RL, Assis IM, Taboga SR, Azeredo-Oliveira MTV, 2008a: Meiotic nucleolar cycle and chromatoid body formation during the rat (*Rattus norvegicus*) and mouse (*Mus musculus*) spermiogenesis. Micron *39* 419-425.

Peruquetti RL, Taboga SR, Azeredo-Oliveira MTV, 2008b: Characterization of Mongolian gerbil chromatoid bodies and their correlation with nucleolar cycle during spermatogenesis. Reprod. Dom. Anim. doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01204.x.

- Peruquetti RL, 2009: Caracterização do ciclo nucleolar e da formação do corpo cromatóide na espermatogênese de algumas espécies de vertebrados. Tese (Doutorado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas UNESP/IBILCE, São José do Rio Preto.
- Pikaard CS, 2002: Transcription and tyranny in the nucleolus: the organization, activation, dominance and repression of ribosomal RNA genes. In: Somerville CR, Meyerowitz EM (eds) *The Arabidopsis Book*. Rockville: American Society of Plant Biologists.
- Pudney J. 1990. Comparative cytology of the non-mammalian vertebrate Sertoli cell. In: Russell LD, Griswold MD (ed). *The Sertoli cell*. Cache River Press, Clearwater, Flórida, USA.
- Reunov A, Isaeva V, Au D, Wu R, 2000: Nuage constituents arising from mitochondria: Is it possible? *Develop. Growth Differ.* 42 139-143.
- Ribeiro MG, Lima SR, 2000: Iniciação às técnicas de preparação de material para estudo e pesquisa em morfologia, SEGRAC Editora e Gráfica Limitada, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.
- San-Segundo PA, Roeder GS, 1999: Pch2 links chromatin silencing to meiotic checkpoint control. *Cell* 97 313-324.
- Saunders PTK, Millar MR, Maguire SM, Sharpe RM, 1992: 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. *Mol. Reprod. Develop.* 33 385-391.
- Schmid M, Löser C, Schmidtke J, Engel W, 1982: Evolutionary conservation of a common pattern of activity of nucleolus organizers during spermatogenesis in vertebrates. *Chromosoma* 86 149-179.
- Severi-Aguiar GDC, Morielle A, Azeredo-Oliveira MTV, 2002: Nucleolar activity during the spermatogenesis in Heteroptera. *Biocell* 26 303.
- Shou W, Seol JH, Shevchenko A, Baskerville C, Moazed D, Chen ZW, Jang J, Shevchenko A, Charbonneau H, Deshaies RJ, 1999: Exit from mitosis is triggered by tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex. *Cell* 97 233-244.
- Shubert I, Künzel G, 1990: Position dependent NOR activity in barley. *Chromosoma* 99 352-359.
- Sirri V, Urcuqui-Inchima S, Roussel P, Hernandez-Verdun D, 2008: Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochem. Cell Biol.* 129 13-31.
- Söderström K, Parvinen M, 1976a: Transport of material between the nucleus, the chromatoid body and the Golgi complex in the early spermatids of the rat. *Cell Tissue Res.* 168 335-342.

- Soley JT, 1994: Centriole development and formation of the flagellum during spermiogenesis in the ostrich (*Struthio camelus*). *J. Anat.* 185 301-313.
- Straight AF, Shou W, Dowd GJ, Turck CW, Deshaies RH, Johnson AD, Moazed D, 1999: Net1, a Sir2-associated nucleolar protein required for rDNA silencing and nucleolar integrity. *Cell* 97 245-256.
- Sud B, 1961: Morphological and histochemical studies of the chromatoid body and related elements in the spermatogenesis of rat. *Q. J. Microsc. Sci.* 102 273-292.
- Takeuchi IK, Takeuchi YK, 1990: Ethanol-phosphotungstic acid and bismuth staining of spermatid nucleoli in mouse spermiogenesis. *J. Struct. Biol.* 103 104-112.
- Tang XM, Lalli MF, Clermont Y, 1982: A cytochemical study of the Golgi apparatus of the spermatid during spermiogenesis in the rat. *Am. J. Anat.* 163 283-294.
- Tartarotti E, Azeredo-Oliveira MTV, 1999. Patterns of nucleolar activity during spermatogenesis of two triatomines, *Panstrongylus megistus* and *P. herreri*. *Caryologia* 5(3-4) 177-184.
- Teruel M, Cabrero J, Perfectti F, Camacho JPM, 2007: Nucleolus size variation during meiosis and NOR activity of a B chromosome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosome Res.* 15 755-765.
- Venable JH, Coggeshall RA, 1965: A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 25 407-408.
- Visitin R, Hwang ES, Arnon A, 1999: Cfi1 prevents premature exit from mitosis by anchoring Cdc14 phosphatase in the nucleolus. *Nature* 398 818-823.
- Wachtler F, Stahl A, 1993: The nucleolus: a structural and functional interpretation. *Micron* 24 473-505.
- Walt H, Armbruster BL, 1984: Actin and RNA are components of the chromatoid bodies in spermatids of the rat. *Cell Tissue Res.* 236 487-490.
- Watson ML, 1958: Staining tissue section of electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4 475-478.
- Yokota S, 2008: Historical survey on chromatoid body research. *Acta Histochem. Cytochem.* 41(4) 65-82.
- Zar JH, 1999: *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, New Jersey, USA.

Figura 1: Análise citoquímica de túbulos seminíferos de *Phrynosops geoffroanus*. A: Hematoxilina-eosina (HE); C-E: Azul de toluidina (AT); B, F-H: Variante da concentração eletrolítica crítica (CEC); I-K: Reação de Feulgen; L-N: Impregnação por íons prata. A e B: s (células de Sertoli); go (espermatogônias); spI (espermátocitos primários); es (espermátides iniciais); stz (espermátides finais); * (corpúsculos residuais). F, H, I, K, L e N: setas (marcações nucleolares). Barras: A e B: 50µm; C-N: 20µm.



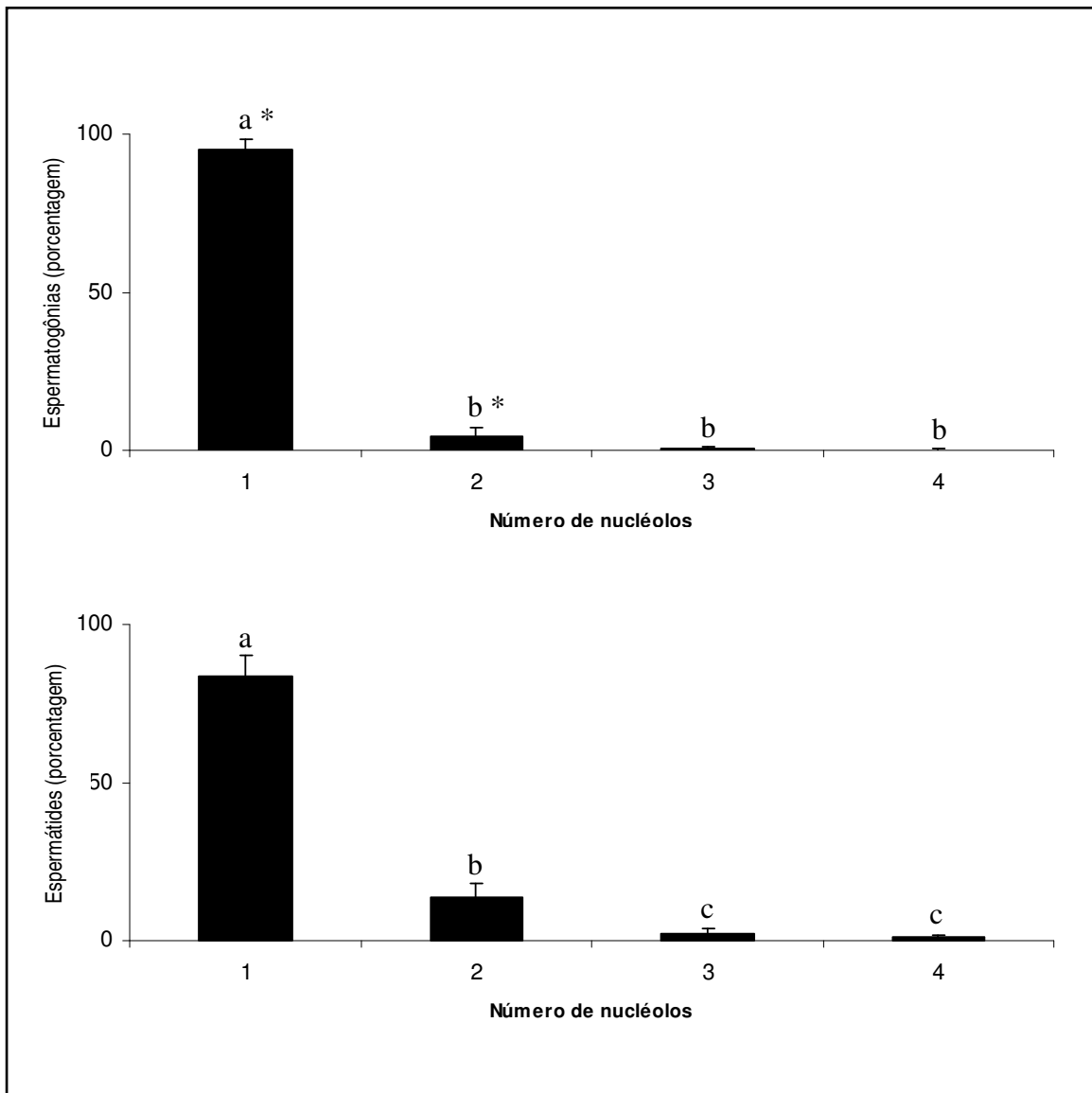


Figura 2: Porcentagem de células germinativas (espermatogônias e espermátides iniciais) de *Phrynos geoffroanus* que apresentaram de 1 a 4 nucléolos. As letras indicam diferença significativa no número de nucléolos em cada tipo celular e o asterisco indica diferença significativa entre os tipos celular (LSD, $p < 0,05$).

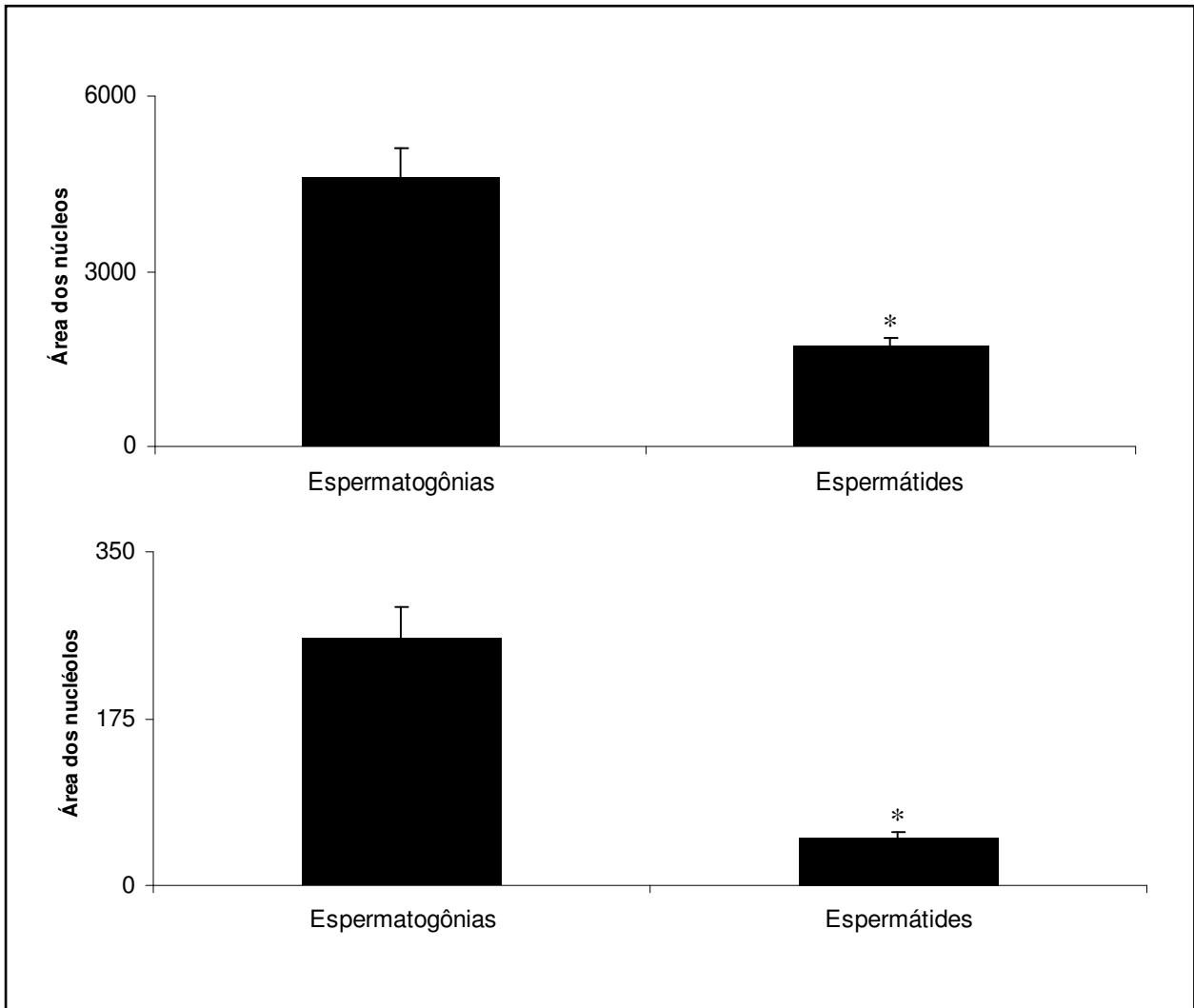


Figura 3: Área (nm²) do núcleo e do nucléolo de espermatogônias e de espermátides iniciais de *Phrynos geoffroanus*. O asterisco indica diferença significativa entre os tipos celulares (teste t independente, p<0,05).

Figura 4: Análise ultra-estrutural de túbulos seminíferos de *Phrynosops geoffroanus*. A e B: Espermatogônias com nucléolo (nu) do tipo compacto organizado. C: Espermatócito primário em paquíteno, com presença de complexo sinaptonêmico (setas) apresentando nucléolo organizado (nu). D, E e F: Espermatócitos primário após o paquíteno, sem a presença de nucléolo organizado e, com início de acúmulo de material ribonucleoproteico no citoplasma (*). Esse material se reúne e forma o CB que, posteriormente, pode ser observado em associação com aglomerados de mitocôndrias (m), isolado ou em associação com o complexo de Golgi (g). (n – núcleo; nu – nucléolo; m – mitocôndrias; setas – complexo sinaptonêmico; * - corpo cromatóide; g – complexo de Golgi). Barras = 10µm.

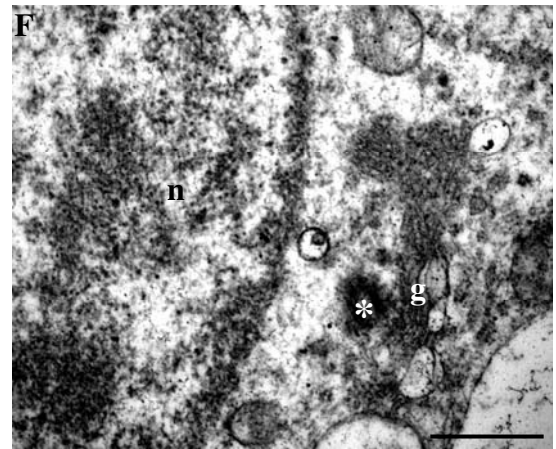
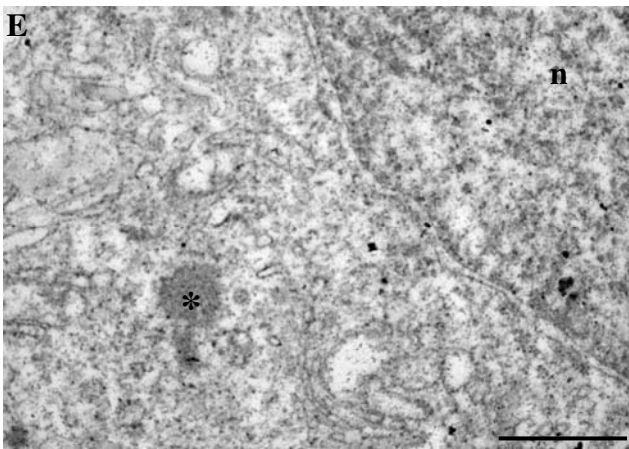
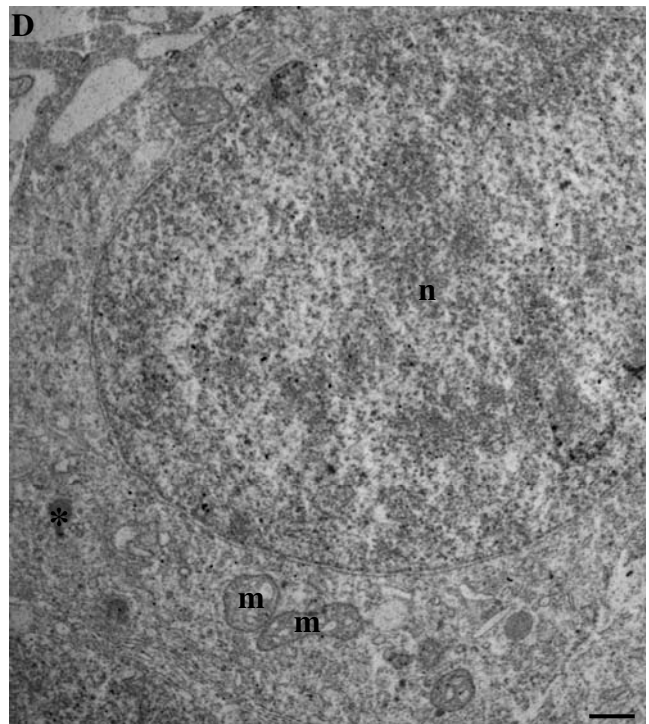
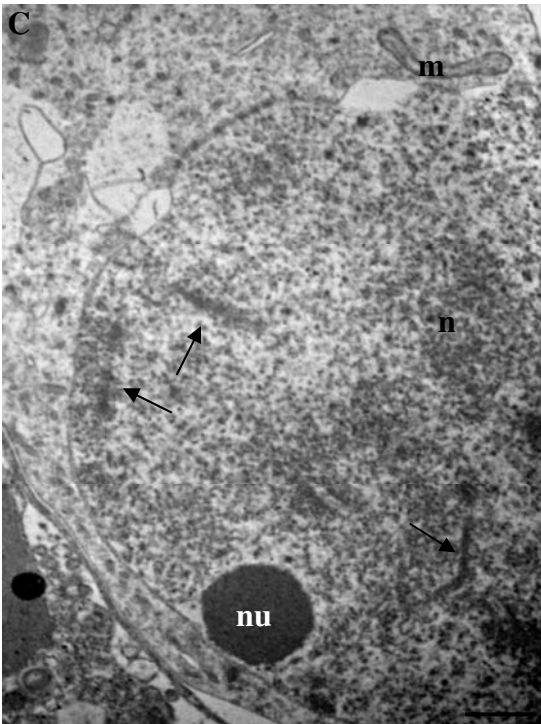
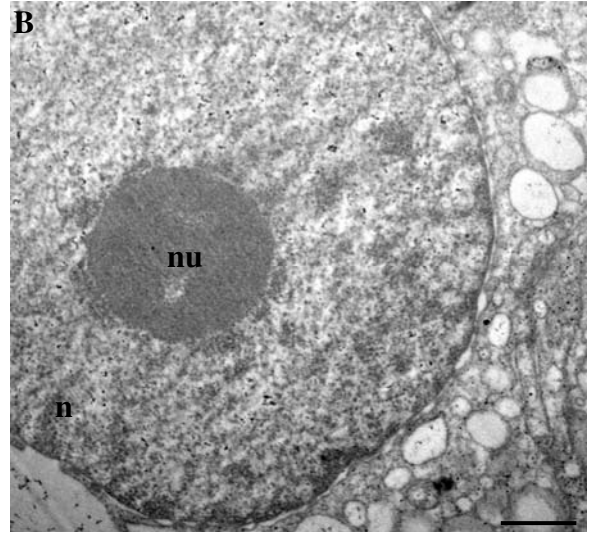
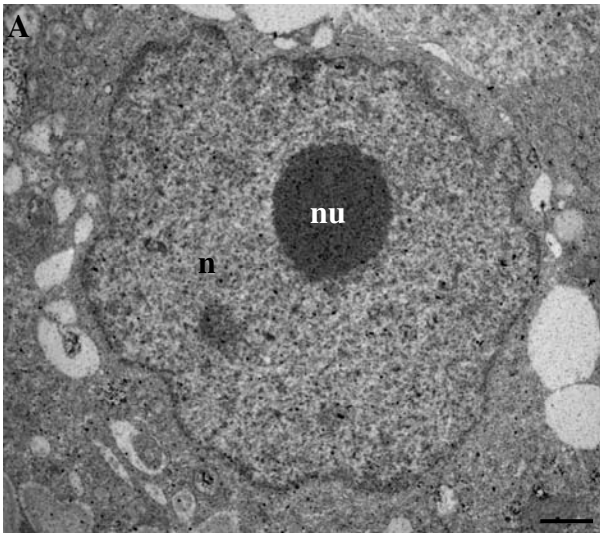
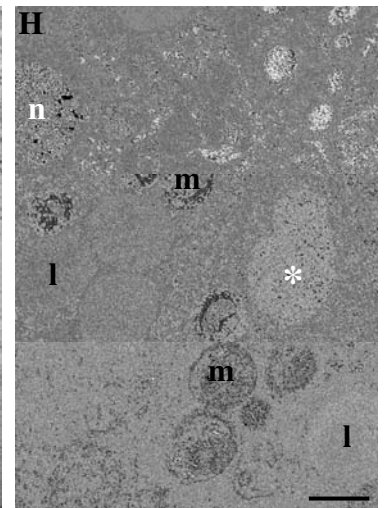
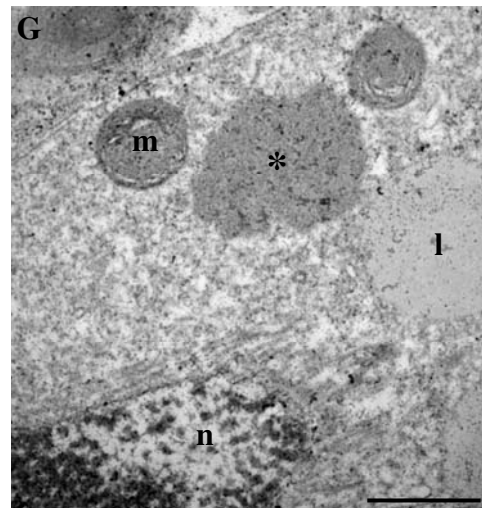
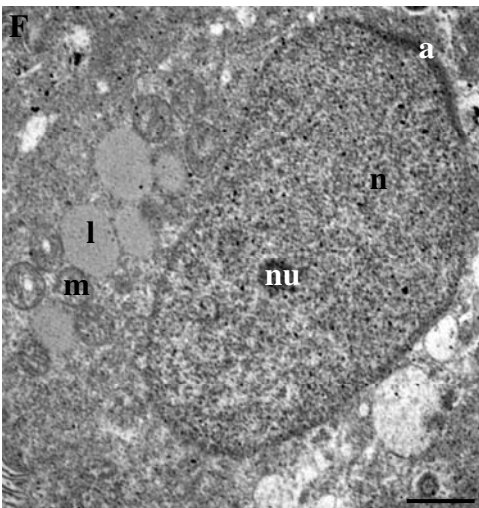
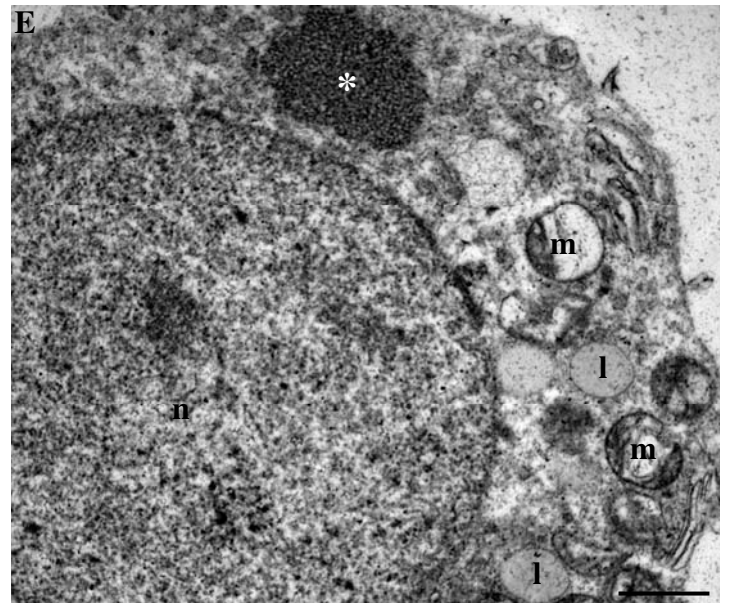
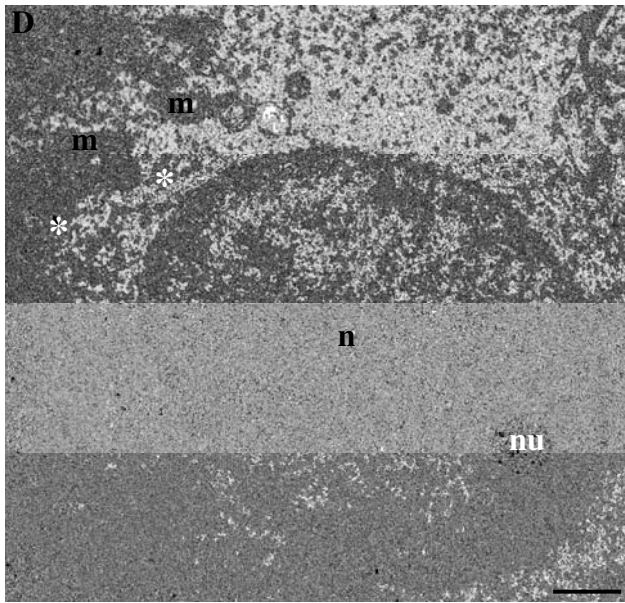
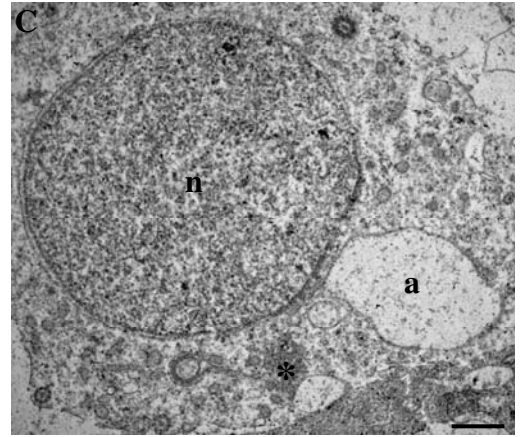
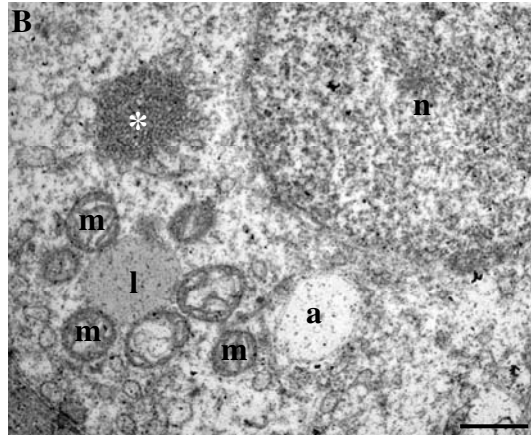
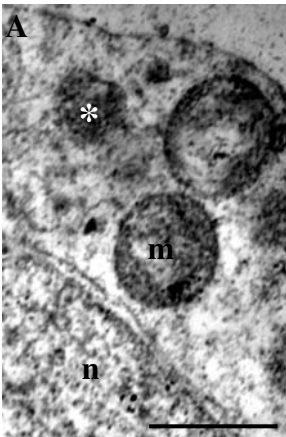


Figura 5: Análise ultra-estrutural de túbulos seminíferos de *Phrynos geoffroanus*. A: Espermátide inicial com CB (*) associado com mitocôndrias (m). B e C: Espermátides inicial apresentando CB (*) em associação com gotículas de lipídios (l) e aglomerados de mitocôndrias (m), próximo à região de formação da vesícula acrossomal (a). D, E, F e G: Espermátides em alongamento apresentando o conjunto contendo o CB (*), aglomerados de mitocôndrias (m) e gotículas de lipídios (l) em deslocamento para a região posterior do núcleo (n), onde haverá a formação da bainha mitocondrial e cauda dos espermatozóides maduros. Conjunto contendo o CB (*), mitocôndrias excedentes (m) e gotículas de lipídios (l) sendo eliminado, juntamente com os restos citoplasmáticos. (n – núcleo; nu – nucléolo; * - corpo cromatóide; m – mitocôndrias; l – gotícula de lipídio; a – vesícula acrossomal). Barras = 10µm.



Formação do corpo cromatóide nas células germinativas de coelhos: Esse evento possui relação com o ciclo nucleolar na espermatogênese?

Rita Luiza Peruquetti

Sebastião Roberto Taboga

Maria Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira*

Universidade Estadual Paulista – UNESP/IBILCE, Departamento de Biologia.
Rua Cristóvão Colombo, 2265 – São José do Rio Preto, SP, Brasil, CEP 15054-000.

***Autor Correspondente:**

Dra. Maria Tercília Vilela de Azeredo-Oliveira
Departamento de Biologia – IBILCE/UNESP
Rua Cristóvão Colombo, 2265 – Jardim Nazareth
CEP 15054 000 São José do Rio Preto, SP, Brasil
Phone: +55 17 3221 2378
Fax: +55 17 3221 2390
e-mail: tercilia@ibilce.unesp.br

**O presente artigo foi escrito sob as normas da revista *Reproduction in Domestic Animals*:
Impresso (ISSN: 0936-6768); On-line (ISSN: 1439-0531).**

Resumo

A espermatogênese de mamíferos é um processo amplamente estudado e suas características já foram exaustivamente descritas. Porém um importante aspecto da espermatogênese de mamíferos, a formação e a função do corpo cromatóide (CB), ainda permanece parcialmente indefinido. O CB é uma organela citoplasmática característica de células germinativas e, aparentemente, possui uma função de “reserva” ou “estoque”, de RNA e proteínas, para as fases finais de diferenciação dos espermatozoides. Algumas origens já foram propostas para esse complexo molecular citoplasmático, sendo que uma delas afirma que o CB possa se originar a partir de nucléolos, que se fragmentam durante a divisão celular meiótica. O nucléolo é um domínio territorial do núcleo, que está relacionado com a compartimentalização das funções nucleares. Várias funções são atribuídas ao nucléolo, sendo que a principal delas está relacionada com a biogênese dos ribossomos. Portanto, o objetivo do presente estudo foi verificar se existe alguma relação entre a desorganização, fragmentação e distribuição do material nucleolar durante a espermatogênese de mamíferos e a formação do CB, utilizando *Oryctolagus cuniculus* (Mammalia, Lagomorpha) como modelo biológico. Foram aplicadas análises citoquímicas, realizadas em cortes histológicos e em preparações citogenéticas de túbulos seminíferos, para acompanhar qualitativamente e quantitativamente o ciclo nucleolar durante a espermatogênese. Para uma comparação entre a fragmentação nucleolar e a formação do CB nessa espécie, foi aplicada análise ultra-estrutural (microscopia eletrônica de transmissão – MET). As técnicas citoquímicas utilizadas para a realização das análises qualitativas do ciclo nucleolar foram Hematoxilina-eosina (HE), azul de toluidina (AT), variante da concentração crítica de eletrólitos (CEC), reação de Feulgen e impregnação por íons prata (AgNOR) em cortes histológicos de testículos. Nas análises quantitativas do ciclo nucleolar o número de nucléolos presentes nas espermatogônias e nas espermátides iniciais foi determinado e comparado por Análise de Variância de duas vias, completada pelo teste LSD para comparações múltiplas. Também foram mensuradas as áreas nuclear e nucleolar das espermatogônias e espermátides iniciais e, posteriormente, essas áreas foram comparadas por meio da aplicação do teste t independente. As análises qualitativas do ciclo nucleolar, evidenciaram que ocorre uma desorganização e, conseqüentemente, uma fragmentação do material nucleolar após o paquíteno da primeira divisão meiótica, nos espermatócitos primários. O nucléolo volta a se reorganizar no núcleo das espermátides iniciais, porém nas espermátides finais e nos espermatozoides maduros, a observação de material nucleolar organizado não foi mais possível. As análises quantitativas do ciclo nucleolar demonstraram que as espermátides iniciais com 1 nucléolo são mais freqüentes do que as espermatogônias, com esse número de nucléolo. A área nucleolar foi

significativamente maior nas espermatogônias em relação à área nucleolar das espermatídes iniciais, indicando que ocorre uma redução da área nucleolar durante a divisão meiótica. A análise ultra-estrutural demonstrou que o CB começa a se formar no citoplasma dos espermatócitos primários, fase na qual ocorre a fragmentação do material nucleolar. O CB foi observado em associação com aglomerados de mitocôndrias no citoplasma dos espermatócitos primários. Nas espermatídes iniciais o CB foi observado em associação com aglomerados de mitocôndrias, na região de formação da vesícula acrossomal. Nas espermatídes em alongamento o CB também foi observado em associação com mitocôndrias, porém, direcionando-se para a região posterior do núcleo. Em espermatídes finais não foi observada a presença de material do CB em nenhum compartimento celular. Portanto, pode-se concluir que, em *O. cuniculus* o ciclo nucleolar pode estar relacionado com a formação do CB, pois essa organela citoplasmática começa a se formar no citoplasma dos espermatócitos primários, exatamente no momento em que o nucléolo inicia o seu processo de desorganização. Também sugerimos que o CB tem um papel fundamental na espermatogênese dessa espécie, podendo estar relacionado com eventos como a formação do sistema acrossomal das espermatídes iniciais e com a formação da bainha mitocondrial e cauda dos espermatozóides maduros.

1. Introdução

A espermatogênese é um processo biológico de transformações graduais de células germinativas em espermatozóides funcionais, em um extenso período de tempo, e que ocorre no epitélio germinativo dos túbulos seminíferos, no interior dos testículos. É um processo que envolve proliferação celular por meio de repetidas divisões mitóticas, duplicação dos cromossomos, recombinação genética por meio do *crossing-over*, divisão meiótica reducional para produção de espermatídes haplóides e diferenciação final de espermatídes em espermatozóides (Hess, 1999). Esse processo tem sido amplamente estudado e descrito em mamíferos, existindo atualmente um profundo conhecimento a respeito da espermatogênese, bem como uma terminologia adequada para descrição da mesma (Clermont, 1972). Porém aspectos como a formação e a função do corpo cromatóide (CB), que é um importante evento da espermatogênese em mamíferos, ainda permanecem pouco esclarecidos. O CB é uma organela citoplasmática característica de células germinativas e, aparentemente, possui uma função de “reserva” ou “estoque”, de RNA e proteínas, para as fases finais de diferenciação dos espermatozóides (Söderström e Parvinen, 1976; Saunders et al., 1992). Muitos estudos têm sido realizados, com o intuito de esclarecer a função dessa intrigante estrutura citoplasmática. Os mais recentes esforços, com relação à

funcionalidade do CB, têm detectado a presença de proteínas homólogas à proteína VASA, de drosófila, que é uma proteína essencial para promover o estabelecimento e a diferenciação das células da linhagem germinativa, intimamente associada com o CB de vários organismos (Raz, 2000; Noce et al., 2001; Kotaja et al., 2006a; Kotaja et al., 2006b). Um outro importante achado foi a detecção de que o CB possui a proteína MAEL, um ortólogo do MAELSTROM de drosófila, que está associado não somente com o silenciamento dos corpos XY, mas também com o silenciamento dos autossomos sem sinapse, interagindo diretamente com o remodelador de cromatina SNF5/INI1 e com a proteína associada a cromatina SINB3. A presença de MAEL no CB e suas interações promove uma ligação sugerindo seu envolvimento no direcionamento de miRNA no silenciamento meiótico de cromatina sem sinapse (MSUC) (Costa et al., 2006). Apesar da existência de muitos estudos que estão tentando esclarecer a função dessa estrutura, a origem da mesma ainda permanece incerta. Existem várias teorias que tentam explicar a origem do CB. Uma dessas teorias diz que o CB é proveniente de algum produto nuclear, que atravessa o complexo de poro em direção ao citoplasma das células (Parvinen e Parvinen, 1979; Parvinen et al., 1997). Uma outra teoria afirma que o CB se origina a partir do acúmulo de um material inter-mitocondrial no citoplasma das espermátides (Fawcett et al., 1970) ou de alguns produtos mitocondriais que são liberados para o citoplasma celular (Reunov et al., 2000). Finalmente, existe uma indicação de que o CB se origine a partir da fragmentação e migração de material nucleolar, do núcleo para o citoplasma das células germinativas masculinas (Comings e Okada, 1972; Andersen, 1978; Andonov, 1990; Peruquetti et al., 2008 a,b).

O nucléolo é um domínio territorial particular do núcleo, que está relacionado com a compartimentalização das funções nucleares (Hernandez-Verdun, 1991). É um importante subcompartimento do núcleo, altamente organizado e não envolto por membrana, e a principal função atribuída ao nucléolo é o seu papel na biogênese de ribossomos (Gerbi et al., 2003; Boisvert et al., 2007; Sirri et al., 2008). De fato, a maioria das proteínas nucleolares está envolvida na síntese e no processamento de RNA ribossomal (RNAr). Porém existem outras proteínas que possuem diferentes funções, como: modificações de nucleotídeos de ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs); biossíntese de sinais de reconhecimento de partículas; captura e liberação de proteínas envolvidas em silenciamento gênico (Pederson, 2002). Além disso, o nucléolo abriga as proteínas Net1, Cdc14 e Sir2, que são responsáveis por mecanismos de controle do ciclo celular (Shou et al., 1999; Straight et al., 1999; Visitin et al., 1999; Garcia e Pillus, 1999) e proteínas supressoras de tumor, como a ARF (Carmo-Fonseca et al., 2000) e a p53 e a Myc (Montanaro et al., 2007). O nucléolo de células germinativas pode, ainda, atuar no controle do ciclo celular meiótico, pois as proteínas Pch2 e Sir2, que estão

ligadas ao silenciamento cromatínico e a promoção do *checkpoint* do paquíteno, podem ser encontradas em seus compartimentos (San-Segundo e Roeder, 1999).

Portanto, o objetivo do presente estudo foi verificar se existe alguma relação entre a desorganização, fragmentação e distribuição do material nucleolar durante a espermatogênese de mamíferos, com o processo de formação do CB. Para realização desse estudo foram utilizadas análises citoquímicas do ciclo nucleolar e análises ultra-estruturais do ciclo nucleolar e da formação do CB em túbulos seminíferos de *Oryctolagus cuniculus* (Mammalia, Lagomorpha).

2. Material e Método

Foram utilizados cinco machos adultos de *Oryctolagus cuniculus* (Mammalia, Lagomorpha) provenientes do biotério da Faculdade de Medicina de Rio Preto (FAMERP) – São José do Rio Preto – SP – Brasil. Durante os experimentos, todos os animais foram mantidos sob condições padrão de tratamento (25°C, 40% – 70% umidade relativa, 12 hr claro/12 hr escuro), e todos tiveram acesso à comida e água *ad libitum*. Os espécimes utilizados foram anestesiados e mortos, por meio de inalação de gás-carbônico (CO₂) e, posteriormente, as gônadas foram removidas e tratadas adequadamente para cada procedimento utilizado no presente estudo.

Análises citoquímicas

Os testículos dos exemplares de *O. cuniculus* foram removidos e, imediatamente, fixados em Karnovsky, para posterior inclusão em historesina. Desses fragmentos testiculares foram obtidos cortes de 3 µm em micrótomo Leica RM 2155. Esses cortes foram submetidos a algumas técnicas citoquímicas para acompanhar a fragmentação e a distribuição do material nucleolar nas células germinativas. As técnicas citoquímicas utilizadas foram: Hematoxilina-Eosina (Ribeiro e Lima, 2000); azul de toluidina (AT) pH 4,0 (Mello e Vidal, 1980); Variante da técnica da Concentração Crítica de Eletrólitos – CEC (Mello et al., 1993); reação de Feulgen (Mello e Vidal, 1980, com modificações); Impregnação pelos íons prata (AgNOR) (Howell e Black, 1980). Todas as lâminas foram analisadas em microscópio Olympus BX60, com sistema analisador de imagem *Image Pró-Plus – Média Cybernetics*, Versão 6.1 para Windows.

Além das análises qualitativas da distribuição do material nucleolar, os cortes histológicos impregnados pela prata, provenientes dos cinco animais, também foram utilizados para a realização de algumas análises quantitativas: análise do número de

nucléolo nas espermatogônias e nas espermátides iniciais; e análise das áreas nuclear e nucleolar nas espermatogônias e nas espermátides iniciais.

Análise do número de nucléolos nas espermatogônias e nas espermátides

Foram analisadas espermatogônias ($144,2 \pm 9,47$ / cada animal) e espermátides iniciais ($169,2 \pm 13,81$ / cada animal) em cada coelho ($n=5$). O número de nucléolos foi determinado para as espermatogônias e para as espermátides iniciais analisadas, em cada um dos cinco animais. Após a determinação de todos os valores absolutos, procedeu-se o cálculo da porcentagem de espermatogônias e de espermátides iniciais com diferentes números de nucléolos, uma vez que o total de células variou em cada animal utilizado ($n=5$).

Análise das áreas nuclear e nucleolar nas espermatogônias e espermátides

Todas as células, utilizadas na análise anterior, foram fotodocumentadas em um microscópio Olympus BX 40, com sistema analisador de imagem *Image Pró-Plus – Média Cybernetics*, Versão 4.5 para Windows. Posteriormente, foram realizadas medidas das áreas nuclear e nucleolar dessas células, em sistema analisador de imagens *Image J – Image Processing and Analysis in Java*, Versão 1.40 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Para as células com um único nucléolo, a medida da área obtida era prontamente mensurada. Já para as células que possuíam dois ou mais nucléolos, considerou-se como área nucleolar total (utilizada para realização das análises) a soma das áreas de cada nucléolo.

Análise dos dados

A normalidade dos dados foi testada por meio da análise do Skewness e do Kurtosis (Ha e Ha, 2007) e a homogeneidade de variância pelo teste F max (Zar, 1999). O número de nucléolos foi comparado entre espermatogônias e espermátides iniciais e dentro do mesmo tipo celular por Análise de Variância de duas vias, completada pelo teste LSD para comparações múltiplas. Já as áreas nucleares e nucleolares das espermatogônias foram comparadas com as áreas nucleares e nucleolares das espermátides iniciais, por meio do teste t independente. Foi considerado $p \leq 0,05$ para significância estatística e todas as análises utilizadas foram baseadas em Zar (1999).

Análise citogenética

Os testículos foram preparados seguindo o procedimento de Kligerman e Bloom (1977), adaptado por Bertollo (1978), que consiste em seccionar os testículos em fragmentos pequenos e tratá-los com uma solução hipotônica de KCl 0,075 M durante 20 minutos e, logo em seguida, fixar o material durante 10 minutos em metanol: ácido acético (3:1) recém-preparado, repetindo o processo de fixação mais uma vez. O material foi, então, retirado do fixador e alguns fragmentos do órgão foram transferidos para uma placa escavada, onde foram adicionadas de duas a três gotas de ácido acético a 50%. O material foi fragmentado com cuidado a fim de se obter uma suspensão celular e com uma pipeta Pasteur, foi colocada uma gota de suspensão sobre uma lâmina aquecida a 30-35°C, reaspirando-a imediatamente (esse procedimento foi repetido em mais dois ou três campos da lâmina). Em seguida, as lâminas foram submetidas à técnica de Impregnação por íons prata (AgNOR) (Howell e Black, 1980) para visualização e acompanhamento do material nucleolar durante a divisão meiótica das células germinativas. Todas as lâminas foram analisadas em microscópio Olympus BX60, com sistema analisador de imagem *Image Pró-Plus – Média Cybernetics*, Versão 6.1 para Windows.

Análise ultra-estrutural (MET)

Amostras testiculares dos espécimes utilizados 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 e, 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. Desses fragmentos testiculares incluídos em araldite, foram obtidos cortes semi-finos e ultra-finos, em ultramicrotomo Leica Ultracut UCT. Os cortes ultra-finos 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 e Coggeshall, 1965). Os resultados das técnicas de microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram documentados por eletromicrografias obtidas em microscópio eletrônico de transmissão Leo-Zeiss (Cambridge, UK) 906 com sistema analisador de imagens ITEM (*Soft Image System – Câmera Veleta 2K x 2K TEM CCD Camera*).

Nota ética

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEAA) – UNESP / Botucatu – SP, sob protocolo nº057/06.

3. Resultados

Análises citoquímicas

Análises citoquímicas qualitativas foram empregadas para acompanhar o ciclo nucleolar no epitélio germinativo de *Oryctolagus cuniculus*, ou seja, acompanhar a fragmentação e a distribuição do material nucleolar durante a espermatogênese da espécie utilizada. A técnica de hematoxilina-eosina (HE) possibilitou realizar uma análise geral das células germinativas masculinas, tendo evidenciado um padrão de espermatogênese em ondas espermatogênicas (Figura 1A). Os estádios de desenvolvimento dos túbulos seminíferos e os tipos celulares presentes no epitélio germinativo, foram classificados de acordo com Leblond e Clermont (1952). Foi possível observar uma marcação basofílica no citoplasma de espermátides iniciais na região de formação do acrossomo. A coloração pelo azul de toluidina (AT) permitiu observar que todas as células do epitélio germinativo possuíam uma intensa metacromasia em todos os domínios nucleares (Figuras 1C, 1D e 1E). O grau de metacromasia, geralmente, variou com o nível de compactação do material genético, com a ploidia do núcleo celular e com a intensidade de complexação dos ácidos nucléicos com corpúsculos de ribonucleoproteínas (RNPs). A técnica de coloração pelo AT foi utilizada como controle da técnica variante da concentração crítica de eletrólitos (CEC) onde foi possível observar a presença de nucléolo organizado nas espermatogônias (Figura 1F). Nos espermátócitos primários o material nucleolar apresentava-se fragmentado e distribuído ao redor dos cromossomos (Figura 1G), e as espermátides iniciais apresentavam-se com ausência de marcação nucleolar ou uma marcação muito fraca (Figura 1H). A técnica de variante de CEC permitiu observar a presença de uma grande quantidade de corpos residuais no lúmen do túbulo seminífero, onde os espermatozóides são liberados (Figura 1B). A técnica de reação de Feulgen, que é uma técnica citoquímica específica para detecção de DNA, revelou todos os núcleos das células germinativas em cor púrpura, variando em intensidade de acordo com o grau de ploidia e de compactação de cromatina das células. Dessa forma, as espermatogônias periféricas (Figura 1I), as espermátides próximas à luz do túbulo e os espermatozóides apresentaram-se fortemente corados, e as demais células, como as células de Sertoli, espermátócitos primários (Figura 1J) e espermátides iniciais (Figura 1K) mostraram a cromatina levemente corada em rosa. Pode-se observar a presença de regiões heterocromáticas, destacadas mais fortemente, sempre em associação com halos claros,

que sugerem a presença de material nucleolar (Figuras 1I, 1J e 1K). Pode ser notado que as áreas claras são mais evidentes nas espermatogônias e nos espermatócitos primários do que nas espermátides iniciais, indicando uma fragmentação e, conseqüentemente, uma diminuição da área nucleolar nas espermátides iniciais. A impregnação pelos íons prata (AgNOR) evidenciou as regiões nucleolares das diferentes células do túbulo seminífero, sendo que nas espermatogônias o nucléolo foi claramente destacado (Figura 1L), enquanto que nos espermatócitos primários (Figura 1M) e nas espermátides iniciais (Figura 1N), o nucléolo apresentou-se fragmentado e com área reduzida.

Análise do número de nucléolos nas espermatogônias e nas espermátides iniciais

Foi observada uma interação entre o tipo celular e o número de nucléolos ($F = 3,63$; $p = 0,023$). Nessa interação o número de espermatogônias que possuíam apenas 1 nucléolo foi menor do que o número de espermátides iniciais com apenas 1 nucléolo. Para as demais quantidades de nucléolos, não houve diferença entre os tipos celulares (Figura 2).

Análise das áreas nuclear e nucleolar nas espermatogônias e espermátides iniciais

Foi encontrada diferença significativa entre as áreas nucleares das espermatogônias e espermátides iniciais ($t = 9,64$; $p = 0,00001$) e entre as áreas nucleolares das espermatogônias e das espermátides iniciais ($t = 10,14$; $p = 0,000008$). Em ambos os casos, a área nas espermatogônias foi maior do que nas espermátides iniciais (Figura 3).

Análise citogenética

Nas preparações citogenéticas não foram encontradas espermatogônias em mitose, mesmo assim, o número cromossômico da espécie foi determinado como sendo $2n=44$ (Korstanjea et al., 1999). As espermatogônias em intérfase apresentaram nucléolo central organizado, geralmente com um grande volume (Figura 4A). Espermatócitos primários em zigóteno (Figuras 4B) apresentaram material nucleolar fragmentado distribuído no interior do núcleo e, também, na periferia nuclear ao redor dos cromossomos. Já os espermatócitos primários em paquíteno (Figuras 4C) apresentaram corpúsculos nucleolares distribuídos, preferencialmente, pela periferia da região nuclear. Durante a metáfase I (Figura 4D) não foi detectada a presença de material nucleolar organizado, no entanto foi possível observar alguns pontos de maior

impregnação pela prata em alguns cromossomos provavelmente nas posições onde estão localizadas as regiões organizadoras nucleolar (RONs). Espermátides iniciais (redondas) e espermátides em alongamento foram observadas apresentando vários corpúsculos nucleolares (Figuras 4E e 4F), sendo os corpúsculos distribuídos com maior frequência pela periferia do núcleo. Os espermatozóides maduros (Figura 4G) apresentaram uma forte impregnação pela prata na região da formação da peça intermediária e da cauda dos espermatozóides.

Análise ultra-estrutural – Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A análise ultra-estrutural foi empregada para acompanhar a fragmentação do material nucleolar e a formação do corpo cromatóide (CB), no epitélio germinativo da espécie utilizada no presente estudo. Foram observadas espermatogônias com nucléolo, do tipo reticulado, organizado e não houve evidências de acúmulo de material ribonucleoproteico no citoplasma desse tipo celular (Figura 5A). Nos espermatócitos primários em paquíteno não foi detectada a presença de nucléolo organizado, e o início da formação do CB pode ser observado, por meio de um material ribonucleoproteico que se acumulou em algumas regiões do citoplasma celular. Esse material foi observado isolado (Figura 5B) ou associado com aglomerados de mitocôndrias (Figuras 5C e 5D). Nas espermátides iniciais o nucléolo apresentou-se reorganizado (Figuras 5E e 6A) e um CB, geralmente único e com uma grande área, pode ser observado em associação com aglomerados de mitocôndrias, em regiões próximas ao local de formação do sistema acrossomal (Figuras 5E, 5F, 6A e 6B). Nas espermátides em alongamento o nucléolo também apresentou-se organizado, e o CB ainda apresentando uma grande área, e em associação com mitocôndrias, apresentou-se migrando para a região posterior do núcleo (Figuras 6C, 6D e 6F). Não foi possível observar a presença de material proveniente do CB em nenhuma região celular das espermátides finais e espermatozóides maduros (Figura 6F).

4. Discussão

O objetivo do presente estudo foi verificar a relação existente entre o ciclo nucleolar, ou seja, a desorganização, fragmentação e distribuição do material nucleolar, durante a espermatogênese de *Oryctolagus cuniculus*, com a formação do corpo cromatóide (CB).

O CB é uma organela citoplasmática característica de células germinativas e, provavelmente, possui uma função de “reserva” ou “estoque” de RNA e proteínas para a diferenciação final dos espermatozóides (Söderström e Parvinen, 1976; Saunders et al., 1992). A ação dessa estrutura parece ser muito importante para o processo de

espermatogênese, pois, a presença de mutações na proteína TDR1/MTR-1 e no antígeno de histocompatibilidade OX3, presentes no CB, causam esterilidade em ratos (Head e Kresge, 1985; Chuma et al., 2006). Porém, apesar da importância dessa estrutura para o processo espermatogênese, sua origem ainda permanece incerta. Existem várias teorias que tentam explicar a origem do CB. Uma dessas teorias diz que o CB é proveniente de algum produto nuclear, que atravessa o complexo de poro em direção ao citoplasma das células (Parvinen e Parvinen, 1979; Parvinen et al., 1997). Uma outra teoria afirma que o CB se origina a partir do acúmulo de um material inter-mitochondrial no citoplasma das espermátides (Fawcett et al., 1970) ou de alguns produtos mitocondriais que são liberados para o citoplasma celular (Reunov et al., 2000). Finalmente, existe uma indicação de que o CB se origine a partir da fragmentação e migração de material nucleolar, do núcleo para o citoplasma das células germinativas masculinas (Comings e Okada, 1972; Andersen, 1978; Andonov, 1990; Peruquetti et al., 2008 a,b).

O nucléolo é um domínio territorial 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 a principal função atribuída ao nucléolo é o seu papel na biogênese de ribossomos (Gerbi et al., 2003; Boisvert et al., 2007; Sirri et al., 2008). Embora o nucléolo seja preliminarmente associado com a biogênese de ribossomos, várias linhas de pesquisa têm demonstrado que ele possui funções adicionais. Algumas dessas funções são: regulação da mitose, progressão do ciclo celular e da proliferação celular, muitas formas de resposta ao estresse celular, biogênese de muitas partículas de ribonucleoproteínas e relação com algumas doenças humanas como o câncer, infecções virais e doenças degenerativas (Boisvert et al. 2007). O tamanho do nucléolo sofre variação em células em crescimento e células em ponto de restrição, e ele se organiza e se desorganiza a cada ciclo celular mitótico ou meiótico (Pikaard, 2002; Teruel et al., 2007). Além disso, o próprio nucléolo abriga as proteínas Pch2 e Sir2 que são responsáveis pelo *checkpoint* do paquíteno, reprimindo a recombinação nas regiões de DNAr (Garcia e Pillus, 1999; San-Segundo e Roeder, 1999).

Para verificar se existe relação entre o ciclo nucleolar na espermatogênese e a formação do CB analisamos, primeiramente, a fragmentação e a distribuição do material nucleolar durante a divisão meiótica que ocorre no epitélio germinativo da espécie utilizada no presente estudo. O ciclo nucleolar foi analisado por meio de análises citoquímicas qualitativas, aplicadas em cortes histológicos e em preparações citogenéticas dos túbulos seminíferos e, também, por meio de análises quantitativas. Nas análises qualitativas do ciclo nucleolar foi detectado que em espermatogônias são observados de 1 a 4 corpúsculos nucleolares organizados, geralmente na região central do núcleo. Já nos espermátócitos primários ocorre uma completa fragmentação do

nucléolo, após o estágio de paquíteno da prófase I. Nesse estágio, os fragmentos nucleolares são observados distribuídos, preferencialmente, pela periferia do núcleo celular. Posteriormente, nas espermátides iniciais, ocorre a reorganização da estrutura nucleolar, podendo novamente ser observado de 1 a 4 corpúsculos nucleolares organizados, após o final da segunda divisão meiótica, sendo que esses corpúsculos também apresentavam-se distribuídos pela periferia do núcleo. Duas características importantes puderam ser observadas nessa análise: a fragmentação do material nucleolar, que ocorre nos espermátocitos primários e a distribuição dos corpúsculos nucleolares, preferencialmente, pela periferia do núcleo.

O fenômeno da fragmentação nucleolar durante a prófase I e, posterior reorganização desses nucléolos nas espermátides iniciais, já foi amplamente descrito em vários trabalhos (por exemplo, Takeuchi e Takeuchi, 1990; Morielle-Souza e Azeredo-Oliveira, 2008; Peruquetti et al. 2008a,b). Também já foi observada a diminuição da quantidade das proteínas C23 e B23, presentes no CF e CFD e que são responsáveis, respectivamente, pela transcrição de RNAr e clivagem dos pré-RNAr, no nucléolo de espermátocitos e espermátides de camundongo (Biggiogera et al., 1991). Todos esses dados indicam a ocorrência de fragmentação nucleolar na prófase meiótica e, sua posterior reorganização no núcleo de espermátides iniciais. Os dados obtidos no presente estudo corroboram com a descrição feita em alguns cordados, onde foi demonstrada a presença de uma vigorosa atividade nucleolar na prófase I, com atividade máxima em paquíteno (Hofgärtner et al, 1979; Schmid et al., 1982; Wachtler e Stahl, 1993; Teruel et al, 2007). Já em humanos, a fragmentação nucleolar vista nas espermátogônias B, indica que a interrupção da transcrição de DNAr ocorre no pré-leptóteno. (Hartung et al., 1990), havendo, portanto, a fragmentação em estágios anteriores da prófase I. Nas espermátides finais e espermatozoides maduros os nucléolos desorganizam-se novamente, e não foram mais observados. A presença do nucléolo no espermatozoide não é necessária, uma vez que após a fecundação os nucléolos dos pró-núcleos masculino e feminino são, ambos, de origem materna. Trabalhos recentes demonstraram que o nucléolo materno, junto com demais elementos nucleoplasmáticos, são essenciais para o desenvolvimento embrionário (Lefrève, 2008).

A presença de nucléolos distribuídos pela periferia do núcleo também já foi detectada em outros trabalhos. Berríos et al. (2004), observaram a presença de nucléolo periférico nos espermátocitos primários de algumas espécies, incluindo humano, e atribuíram o fato à presença de RONS terminais. Em outras espécies, analisadas pelos mesmos autores, e que possuíam regiões organizadoras nucleolar (RONS) intercaladas, esse tipo de posição das RONS deu origem a um nucléolo central. Portanto, esses autores afirmam que a posição do nucléolo dentro do espermátocito primário é principalmente dependente de: 1) posição da RON no complexo sinaptonêmico (CS)

bivalente nucleolar; 2) padrão nuclear do complexo sinaptonêmico (CS) bivalente nucleolar, sendo ambos teloméricos e ligados ao envelope nuclear; 3) associação dos bivalentes nucleolares por meio de seus domínios RONS que ocupam o mesmo espaço nuclear. Sendo assim, pode-se concluir que a distribuição do nucléolo dentro do espaço nuclear de espermatócitos é não-randômico, sendo consistente com a existência de arquitetura nucleolar meiótica espécie-específica (Berríos et al., 2004).

As análises quantitativas do ciclo nucleolar foram aplicadas para avaliar o número de nucléolos presentes nas espermatogônias e nas espermátides iniciais e, também, para determinar as áreas dos núcleos e dos nucléolos dos mesmos tipos celulares. Em relação ao número de nucléolos, foi detectada uma diferença entre os dois tipos celulares analisados, sendo que, espermátides iniciais com apenas 1 nucléolo foram mais freqüentes, em relação às espermatogônias com um único nucléolo. Esses resultados demonstram que houve um aumento no número de células com 1 nucléolo, após a divisão meiótica. É bem conhecido que o número de nucléolos de uma célula germinativa está relacionado com o número de RONS que ela possui (Guo et al., 1996; Teruel et al., 2007). Sendo assim, nas espermatogônias diplóides seria esperado encontrar o dobro de nucléolos do que o encontrado nas espermátides iniciais haplóides. Portanto, os resultados obtidos no presente trabalho, corroboram com os dados existentes na literatura. Já, em relação às áreas nuclear e nucleolar das espermatogônias e das espermátides iniciais, foi encontrado que essas áreas nas espermatogônias foram significativamente maiores quando comparadas às mesmas áreas das espermátides iniciais, indicando que ocorre uma redução do tamanho do nucléolo de um tipo celular para outro. Tem sido demonstrado que o tamanho do nucléolo é proporcional à quantidade de síntese de RNAr (Caspersson, 1950), o tamanho da RON (número de cístrons de RNAr) é, em geral, correlacionado com seu nível de expressão (Shubert e Künzel, 1990), que a hipertrofia do nucléolo é um estado em que a síntese de RNAr e ribossomos está aumentada (Nakamoto et al., 2001) e que um nucléolo grande pode estar correlacionado com atividade de divisão celular e com estágios que possuem uma alta demanda de proteína (Mosgoeller, 2004). Todos esses fatos podem ser usados para explicar a redução da área nucleolar das espermátides, porém essa redução da área nucleolar das espermátides iniciais também pode estar relacionada com a fragmentação do material nucleolar, no início da prófase I, e migração de parte desse material para o citoplasma das células germinativas, onde esse material participaria na formação do CB.

Para a análise ultra-estrutural do ciclo nucleolar e da formação do CB, no presente trabalho, foi empregada a técnica convencional de microscopia eletrônica de transmissão (MET). Foi observado que as espermatogônias possuem nucléolo organizado e não houve evidências do acúmulo de material ribonucleoprotéico em seu citoplasma, material este que posteriormente se unirá e dará origem ao CB. O CB inicia

o seu processo de formação no citoplasma dos espermátocitos primários, após a fase de paquíteno, exatamente no momento em que o nucléolo inicia o seu processo de desorganização. Muitos trabalhos, utilizando outras espécies de animais, tanto vertebrados quanto invertebrados, têm proposto que o CB realmente origina-se no citoplasma dos espermátocitos primários (Kotaja e Sassone-Corsi, 2007; Peruquetti et al., 2008a,b). Esse processo de formação do CB inicia-se por meio do acúmulo de pequenas “nuages”, um material ribonucleoproteico, no citoplasma dos espermátocitos primários. Esse material ribonucleoproteico, aos poucos, vai se coalescendo e, finalmente, dá origem a um único CB. Esse tipo de origem para o CB já foi proposto em outros trabalhos (Paniagua et al., 1986; Peruquetti et al., 2008a,b). No citoplasma dos espermátocitos primários, o CB foi observado isolado ou em associação com aglomerados de mitocôndrias. A associação com mitocôndrias já foi descrita em vários trabalhos, sendo que alguns autores sugerem que essa associação deve-se ao fato do CB ser formado, totalmente ou parcialmente, por produtos mitocondriais (Reunov et al., 2000) ou por material inter-mitocondrial (Fawcett et al., 1970). Existe, ainda, uma indicação de que a ligação entre CB e mitocôndrias esteja relacionada com a participação do CB na síntese e no transporte de apocitocromos c_r , uma isoforma do citocromo c somente expressa nos testículos (Hess et al., 1993). Para corroborar com essa sugestão, foi detectada a presença da citocromo c oxidase (COXI), codificada pelo genoma mitocondrial, no CB (Haraguchi et al., 2005). Alguns autores sugerem que a relação de aglomerados de mitocôndrias e o descobrimento de componentes mitocondriais, como RNA mitocondrial (RNAmtr) e citocromos, nos CBs e estruturas relacionadas, podem confirmar que ambas estruturas estão relacionadas com mecanismos simbióticos de interação entre mitocôndrias e genoma nuclear transmitidos para a próxima geração (Noce, 2001). Outros autores, bem como os dados do presente estudos, sugerem que a associação entre CB e mitocôndrias pode estar relacionada com a função, que provavelmente o CB desempenha, de direcionar as mitocôndrias, através do citoplasma das espermátides, para a região posterior do núcleo onde haverá a formação da cauda e da bainha mitocondrial dos espermatozóides (Soley, 1994; Peruquetti et al., 2008a,b; Peruquetti, 2009).

Nas espermátides iniciais, fase onde o nucléolo já se encontra reorganizado, o CB atinge sua maior área e pode ser observado em associação com mitocôndrias ou isolado, em regiões próximas ao local onde está havendo a formação do sistema acrossomal das espermátides. Já foi sugerido que o CB participaria da formação do sistema acrossômico das espermátides iniciais, devido a associação do CB com o complexo de Golgi (Söderström e Parvinen, 1976; Tang et al., 1982; Peruquetti et al., 2008a,b). Esses autores sugerem que a 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. Nas espermátides em alongamento, um CB com uma grande área e associado com aglomerados de mitocôndrias, foi observado em deslocamento para a região posterior do núcleo. Nessa região, posteriormente, irá ocorrer a formação da cauda e da bainha mitocondrial dos espermatozóides maduros. Devido à observação da presença do CB em várias posições do citoplasma de algumas células germinativas, podemos concluir que o CB é uma organela extremamente móvel no citoplasma dessas células. A presença de actina (Walt e Armbruster, 1984; Aumüller e Seitz, 1988) e de cálcio (Andonov e Chaldakov, 1989) pode estar relacionada com a alta mobilidade da organela. A alta mobilidade da organela também foi confirmada por Parvinen et al. (1997) onde o CB foi observado em rápida mudança de posição em relação ao envelope nuclear, complexo de Golgi e áreas de cromatina clara nuclear em espermátides iniciais vivas de rato. Em espermátides finais não foi observada a presença de material do CB em nenhum compartimento celular, sugerindo que esse material pode ter sido disperso nos corpos residuais e, possivelmente, degradado ao final da espermiogênese (Sud, 1961; Yokota, 2008).

Portanto, pode-se concluir que, em *O. cuniculus* o ciclo nucleolar pode estar relacionado com a formação do CB, pois essa organela citoplasmática começa a se formar no citoplasma dos espermatócitos primários, exatamente no momento em que o nucléolo inicia o seu processo de desorganização e, a reorganização nucleolar, que ocorre no núcleo das espermátides iniciais, demonstra o nucléolo com uma área reduzida em relação à área do nucléolo das espermatogônias, o que sugere que o nucléolo possa ter perdido parte do seu material. Também sugerimos que o CB tem um papel fundamental na espermatogênese de *O. cuniculus*, podendo estar relacionado com eventos como a formação do sistema acrossomal das espermátides iniciais e com a formação da bainha mitocondrial e da cauda dos espermatozóides maduros.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem ao MSc. Tiago da Silveira Vasconcelos (Laboratório de Herpetologia – UNESP/IB) e à MSc. Thaís Billalba Carvalho (Laboratório de Comportamento de Peixes – UNESP/IBILCE) pelo auxílio nas análises estatísticas. Agradecimentos especiais ao Sr. Luis Roberto Faleiros Jr (Laboratório de Microscopia e Microanálise – UNESP/IBILCE) e à MSc. Rosana Silistino de Souza (Laboratório de Morfologia – UNESP/IBILCE) por seu auxílio com as técnicas de laboratório. Agradecemos também a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro e pela bolsa de estudo, respectivamente.

6. Referências Bibliográficas

- Andersen K, 1978: Fine structure of spermatogonia and spermatocytes in the blue fox (*Alopex lagopus*). *Acta Veter. Scandi. (Denmark)*. 19 (2) 229-42.
- Andonov M, 1990: Further study of the chromatoid body in rat spermatocytes and spermatids. *Z. Mikrosk. Anat.* 104 46-54.
- Andonov MD, Chaldakov GN, 1989: Morphological evidence for calcium storage in the chromatoid body of rat spermatids. *Experientia*. 45 377-378.
- Aumüller G, Seitz J, 1988: Immunocytochemical localization of actin and tubulin in rat testis and spermatozoa. *Histochemistry* 39 261-267.
- Berríos S, Fernández-Donoso R, Pincheira J, Page J, Manterola M, Cerda MC, 2004: Number and nuclear localisation of nucleoli in mammalian spermatocytes. *Genetica* 121 219-228.
- Bertolo LAC, 1978: Estudos citogenéticos no gênero *Hoplias* Gill, 1903 (Pisces, Erytrinae). Tese de Doutorado. Departamento de Matemática Aplicada à Biologia. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brasil.
- Biggiogera M, Kaufmann SH, Shaper JH, Gas N, Amalric F, Fakan S, 1991: Distribution of nucleolar proteins B23 and nucleolin during mouse spermatogenesis. *Chromosoma*. 100 162-172.
- Boisvert FM, van Koningsbruggen S, Navascués J, Lammond AI, 2007: The multifunctional nucleolus. *Nature Reviews: Mol. Cell Biol.* 8 574-585.
- Carmo-Fonseca M, Mendes-Soares L, Campos I, 2000: To be or not to be in the nucleolus. *Nat. Cell Biol.* 2 E107-E112.
- Caspersson T, 1950: Cell growth and cell function, a cytochemical study. WW Norton, New York, New York, USA,.
- Chuma S, Hosokawa M, Kitamura K, Kasai S, Fujioka M, Hiyoshi M, Takamune K, Noce T, Nakatsuji N, 2006: Tdrd1/Mtr-1, a tudor-related gene, is essential for male germ-cell differentiation and nuage/germinal granule formation in mice. *PNAS* 103 15894-15899.
- Clermont Y, 1972: Kinetics of spermatogenesis in mammals seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol. Rev.* 52, 198-236.
- Comings DE, Okada TA, 1972: The chromatoid body in mouse spermatogenesis: Evidence that it may be formed by the extrusion of nucleolar components. *J. Ultrastr. Res.* 39 (1) 15-23.
- Costa Y, Speed RM, Gautier P, Semple CA, Maratou K, Turner JMA, Cooke HJ, 2006: Mouse MAELSTROM: the link between meiotic silencing of unsynapsed chromatin and microRNA pathway? *Hum. Mol. Gen.* 15(15) 2324-2334.

Fawcett DW, Eddy EM, Phillips DM, 1970: Observations on the fine structure and relationships of the chromatoid body in mammalian spermatogenesis. *Biol. Reprod.* 2 (1) 129-153.

Garcia SN, Pillus L, 1999: Net results of nucleolar dynamics. *Cell* 97 825-828.

Gerbi SA, Borovjagin AV, Lange TS, 2003: The nucleolus: a site of ribonucleoprotein maturation. *Curr. Op. Cell Biol.* 15 318-325.

Guo M, Davis D, Birchler JA, 1996: Dosage effects on gene expression in a maize ploidy series. *Genetics* 142 1349-1355.

Ha RR, Ha JC, 2007: Integrative statistics for behavioral science. Pearson Custom Publishing, Boston, Washington, USA.

Haraguchi CM, Mabuchi T, Hirata S, Shoda T, Hoshi K, Akasaki K, Yokota S, 2005: Chromatoid bodies: aggresome-like characteristics and degradation sites for organelles of spermiogenic cells. *J. Histochem. Cytochem.* 53(4) 455-465.

Hartung M, Wachtler F, Lanversin A, Fouet C, Schwarzacher HG, Stahl A, 1990: Sequential changes in the nucleoli of human spermatogonia with special reference to rDNA location and transcription. *Tissue Cell* 22(1) 25-36.

Head JR, Kresge CK, 1985: Reaction of the chromatoid body with a monoclonal antibody to a rat histocompatibility antigen. *Biol. Reprod.* 33 1001-1008.

Hernandez-Verdun D, 1991: The nucleolus today. *J. Cell Scie.* 99 465-471.

Hess RA, Miller LA, Kirby JD, Margoliash E, Goldberg E, 1993: Immunoelectron microscopic localization of testicular and somatic cytochromes *c* in the seminiferous epithelium of the rat. *Biol. Reprod.* 48 1299-1308.

Hess RA, 1999: Spermatogenesis, Overview. In: *Encyclopedia of Reproduction*, Volume 4. Academic Press, New York, New York, USA.

Hofgärtner FJ, Schmid M, Krone W, Zenzes MT, Engel W, 1979: Pattern of activity of nucleolus organizers during spermatogenesis in mammals as analyzed by silver-staining. *Chromosoma* 71 197-216.

Howell WM, Black DA, 1980: Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: I-step method. *Experientia.* 36 104-105.

Kligerman AD, Bloom SE, 1977: Distribution of F-bodies, heterochromatin and nuclear organizers in the genome of the central mudminnow, *Umbra limi*. *Cytogenet. Cell Genet.* 18 182-196.

Korstanjea R, O'Brien PCM, Yangc F, Rensc W, Bosmab AA, van Litha HA, van Zutphen LFM, Ferguson-Smithc MA, 1999: Complete homology maps of the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and human by reciprocal chromosome painting. *Cytogenet Cell Genet* 86(3-4) 317-322.

Kotaja N, Bhattacharyya SN, Jaskiewicz L, Kimmins S, Parvinen M, Filipowicz W, Sassone-Corsi P, 2006a: The chromatoid body of male germ cells: Similarity with

processing bodies and presence of Dicer and microRNA pathway components. *PNAS*. *103*(8) 2647-2652.

Kotaja N, Lin H, Parvinen M, Sassone-Corsi P, 2006b: Interplay of PIWI/Argonaute protein MIWI and kinesin KIF17b in chromatoid bodies of male germ cells. *J. Cell Scie.* *119*(13) 2819-2825.

Kotaja N, Sassone-Corsi P, 2007: The chromatoid body: a germ-cellspecific RNA-processing centre. *Mol. Cell Biol.* *8* 85-90.

Leblond CP, Clermont Y, 1952: Spermatogenesis of rat, mouse, hamster and guinea pig as revealed by the "periodic acid-fuchsin-sulfurous acid" technique. *Am. J. Anat.* *90* 167-216.

Lefèvre B, 2008: The nucleolus of the maternal gamete is essential for life. *BioEssays* *30* 613-616.

Mello MLS, Vidal BC, Dantas MN, Monteiro ACP, 1993: Discrimination of the nucleolus by a critical electrolyte concentration method. *Acta Histochem. Cytochem.* *26* 1-3.

Mello MLS, Vidal BC, 1980: *Práticas de Biologia Celular*. FUNCAMP Editora Edgard Blücher LTDA, Campinas, São Paulo, Brasil.

Montanaro L, Treré D, Derenzini M, 2007: Nucleolus, ribosomes, and câncer. *Am. J. Pathol.* *173*(2) 301-310.

Morielle-Souza A, Azeredo-Oliveira MTV, 2008: Study of the nucleolar cycle and ribosomal RNA distribution during meiosis in triatomines (Triatominae, Heteroptera). *Micron* *39* 1020-1026.

Mosgoeller W, 2004: Nucleolar ultrastructure in vertebrates. In: Olson MOJ (ed) *The nucleolus*. Kluwer, New York, New York, USA.

Nakamoto K, Ito A, Watabe K et al, 2001: Increased expression of a nucleolar Nop5/Sik family member in metastatic melanoma cells: evidence for its role in nucleolar sizing and function. *Am. J. Pathol.* *159* 1363-1374.

Noce T, Okamoto-Ito S, Tsunekawa N, 2001: Vasa homolog genes in mammalian germ cell development. *Cell Struct.Funct.* *26* 131-136.

Paniagua R, Nistal M, Amat P, Rodriguez MC, 1986: Ultrastructural observations on nucleoli and related structures during human spermatogenesis. *Anat. Embryol.* *174* 301-306.

Parvinen M, Parvinen L, 1979: Active movements of the chromatoid body: A possible transport mechanism for haploid gene products. *J. Cell Biol.* *80* 621-628.

Parvinen M, Salo J, Toivonen M, Nevalainen O, Soini E, Pelliniemi L, 1997: Computer analysis of living cells: movements of the chromatoid body in early

spermatids compared with its ultrastructure in snap-frozen preparations. *Histochem. Cell Biol.* 108 77-81.

Pederson T, 2002: Proteomics of the nucleolus: more proteins, more functions? *Trends Biochem. Sci.* 27(3) 111-112.

Peruquetti RL, Assis IM, Taboga SR, Azeredo-Oliveira MTV, 2008a: Meiotic nucleolar cycle and chromatoid body formation during the rat (*Rattus norvegicus*) and mouse (*Mus musculus*) spermiogenesis. *Micron* 39 419-425.

Peruquetti RL, Taboga SR, Azeredo-Oliveira MTV, 2008b: Characterization of Mongolian gerbil chromatoid bodies and their correlation with nucleolar cycle during spermatogenesis. *Reprod. Dom. Anim.* doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01204.x.

Peruquetti RL, 2009: Caracterização do ciclo nucleolar e da formação do corpo cromatóide na espermatogênese de algumas espécies de vertebrados. Tese (Doutorado em Genética) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas UNESP/IBILCE, São José do Rio Preto.

Pikaard CS, 2002: Transcription and tyranny in the nucleolus: the organization, activation, dominance and repression of ribosomal RNA genes. In: Somerville CR, Meyerowitz EM (eds) *The Arabidopsis Book*. Rockville: American Society of Plant Biologists.

Raz E, 2000: The function and regulation of vasa-like genes in germ-cell development. *Genome Biol.* 1(3) 1-6.

Reunov A, Isaeva V, Au D, Wu R, 2000: Nuage constituents arising from mitochondria: Is it possible? *Develop. Growth Differ.* 42 139-143.

Ribeiro MG, Lima SR, 2000: Iniciação às técnicas de preparação de material para estudo e pesquisa em morfologia, SEGRAC Editora e Gráfica Limitada, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

San-Segundo PA, Roeder GS, 1999: Pch2 links chromatin silencing to meiotic checkpoint control. *Cell* 97 313-324.

Saunders PTK, Millar MR, Maguire SM, Sharpe RM, 1992: 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. *Mol. Reprod. Develop.* 33 385-391.

Schmid M, Löser C, Schmidtke J, Engel W, 1982: Evolutionary conservation of a common pattern of activity of nucleolus organizers during spermatogenesis in vertebrates. *Chromosoma* 86 149-179.

Shou W, Seol JH, Shevchenko A, Baskerville C, Moazed D, Chen ZW, Jang J, Shevchenko A, Charbonneau H, Deshaies RJ, 1999: Exit from mitosis is triggered by

tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex. *Cell* 97 233-244.

Shubert I, Künzel G, 1990: Position dependent NOR activity in barley. *Chromosoma* 99 352-359.

Sirri V, Urcuqui-Inchima S, Roussel P, Hernandez-Verdun D, 2008: Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochem. Cell Biol.* 129 13-31.

Söderström K, Parvinen M, 1976: Transport of material between the nucleus, the chromatoid body and the Golgi complex in the early spermatids of the rat. *Cell Tissue Res.* 168 335-342.

Soley JT, 1994: Centriole development and formation of the flagellum during spermiogenesis in the ostrich (*Struthio camelus*). *J. Anat.* 185 301-313.

Straight AF, Shou W, Dowd GJ, Turck CW, Deshaies RH, Johnson AD, Moazed D, 1999: Net1, a Sir2-associated nucleolar protein required for rDNA silencing and nucleolar integrity. *Cell* 97 245-256.

Sud B, 1961: Morphological and histochemical studies of the chromatoid body and related elements in the spermatogenesis of rat. *Q. J. Microsc. Sci.* 102 273-292.

Takeuchi IK, Takeuchi YK, 1990: Ethanol-phosphotungstic acid and bismuth staining of spermatid nucleoli in mouse spermiogenesis. *J. Struct. Biol.* 103 104-112.

Tang XM, Lalli MF, Clermont Y, 1982: A cytochemical study of the Golgi apparatus of the spermatid during spermiogenesis in the rat. *Am. J. Anat.* 163 283-294.

Teruel M, Cabrero J, Perfectti F, Camacho JPM, 2007: Nucleolus size variation during meiosis and NOR activity of a B chromosome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosome Res.* 15 755-765.

Venable JH, Coggeshall RA, 1965: A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 25 407-408.

Visitin R, Hwang ES, Arnon A, 1999: Cfi1 prevents premature exit from mitosis by anchoring Cdc14 phosphatase in the nucleolus. *Nature* 398 818-823.

Wachtler F, Stahl A, 1993: The nucleolus: a structural and functional interpretation. *Micron* 24 473-505.

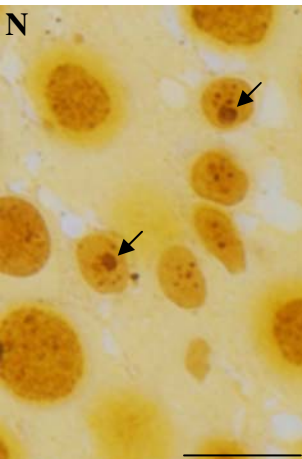
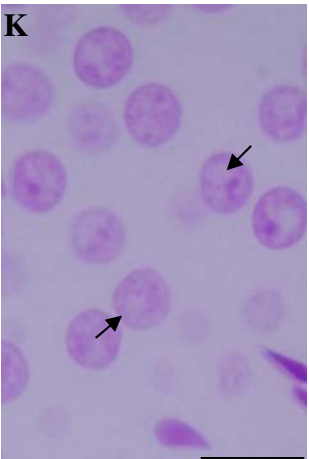
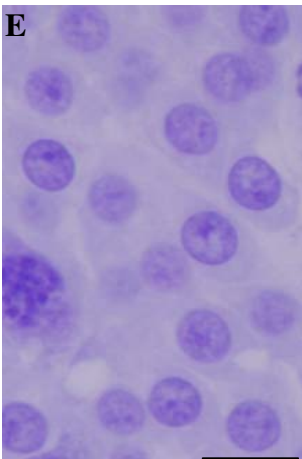
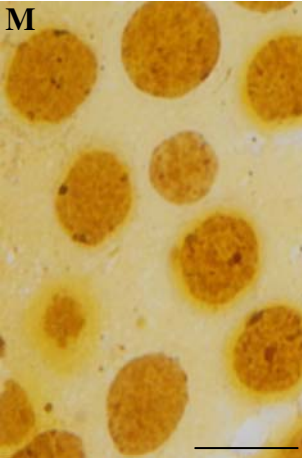
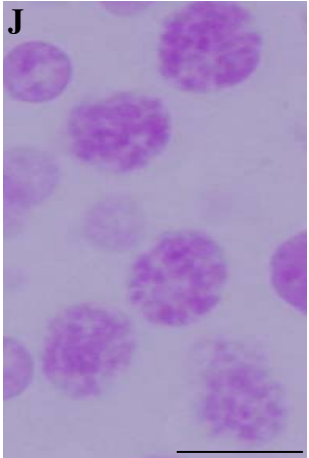
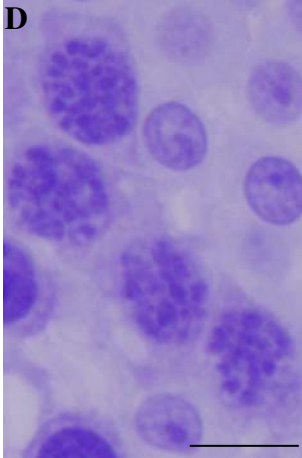
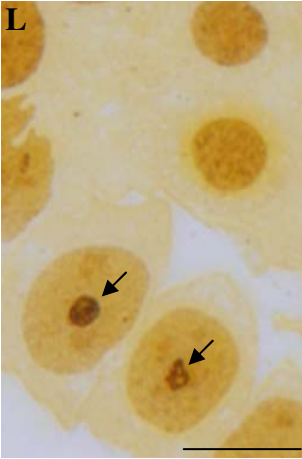
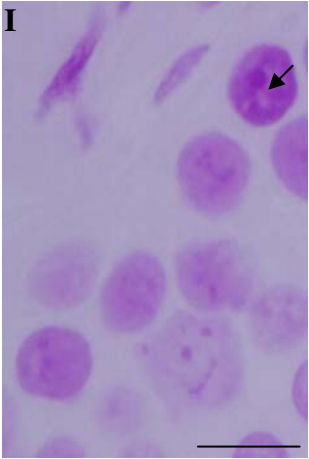
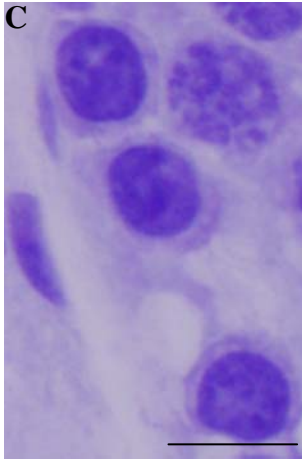
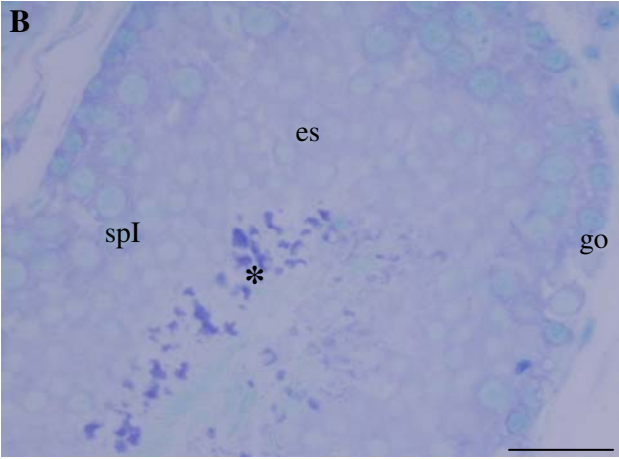
Walt H, Armbruster BL, 1984: Actin and RNA are components of the chromatoid bodies in spermatids of the rat. *Cell Tissue Res.* 236 487-490.

Watson ML, 1958: Staining tissue section of electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4 475-478.

Yokota S, 2008: Historical survey on chromatoid body research. *Acta Histochem. Cytochem.* 41(4) 65-82.

Zar JH, 1999: *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, New Jersey, USA.

Figura 1: Análise citoquímica de túbulos seminíferos de *Oryctolagus cuniculus*. A: Hematoxilina-eosina (HE); C-E: Azul de toluidina (AT); B, F-H: Variante da concentração eletrolítica crítica (CEC); I-K: Reação de Feulgen; L-N: Impregnação por íons prata. A e B: s (células de Sertoli); go (espermatogônias); spI (espermátocitos primários); es (espermátides iniciais); stz (espermátides finais); * (corpúsculos residuais). F, I, K, L e N: setas (marcações nucleolares). Barras: A e B: 50µm; C-N: 20µm.



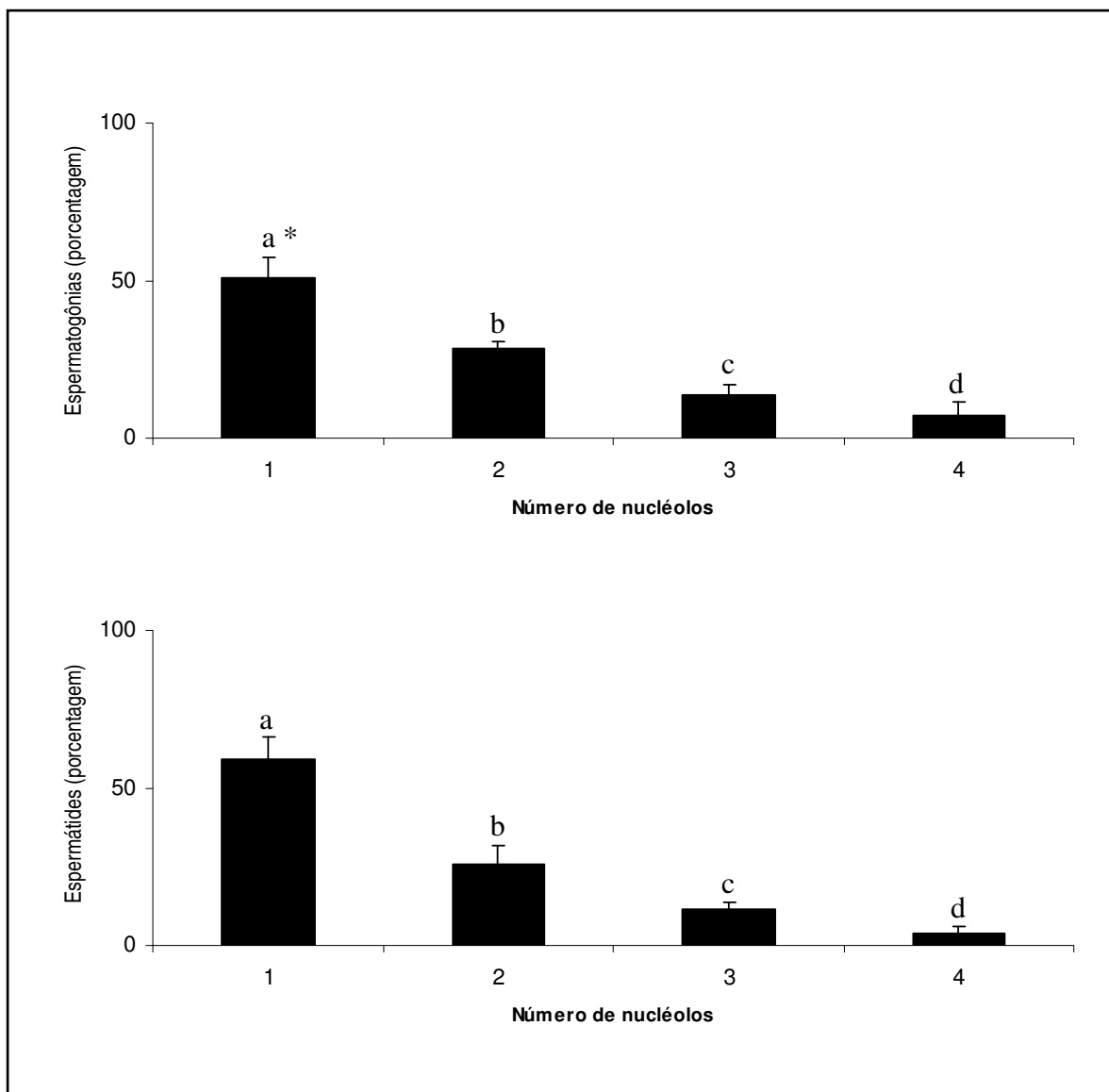


Figura 2: Porcentagem de células germinativas (espermatogônias e espermatídes iniciais) de *Oryctolagus cuniculus* que apresentaram de 1 a 4 nucléolos. As letras indicam diferença significativa no número de nucléolos em cada tipo celular e o asterisco indica diferença significativa entre os tipos celular (LSD, $p < 0,05$).

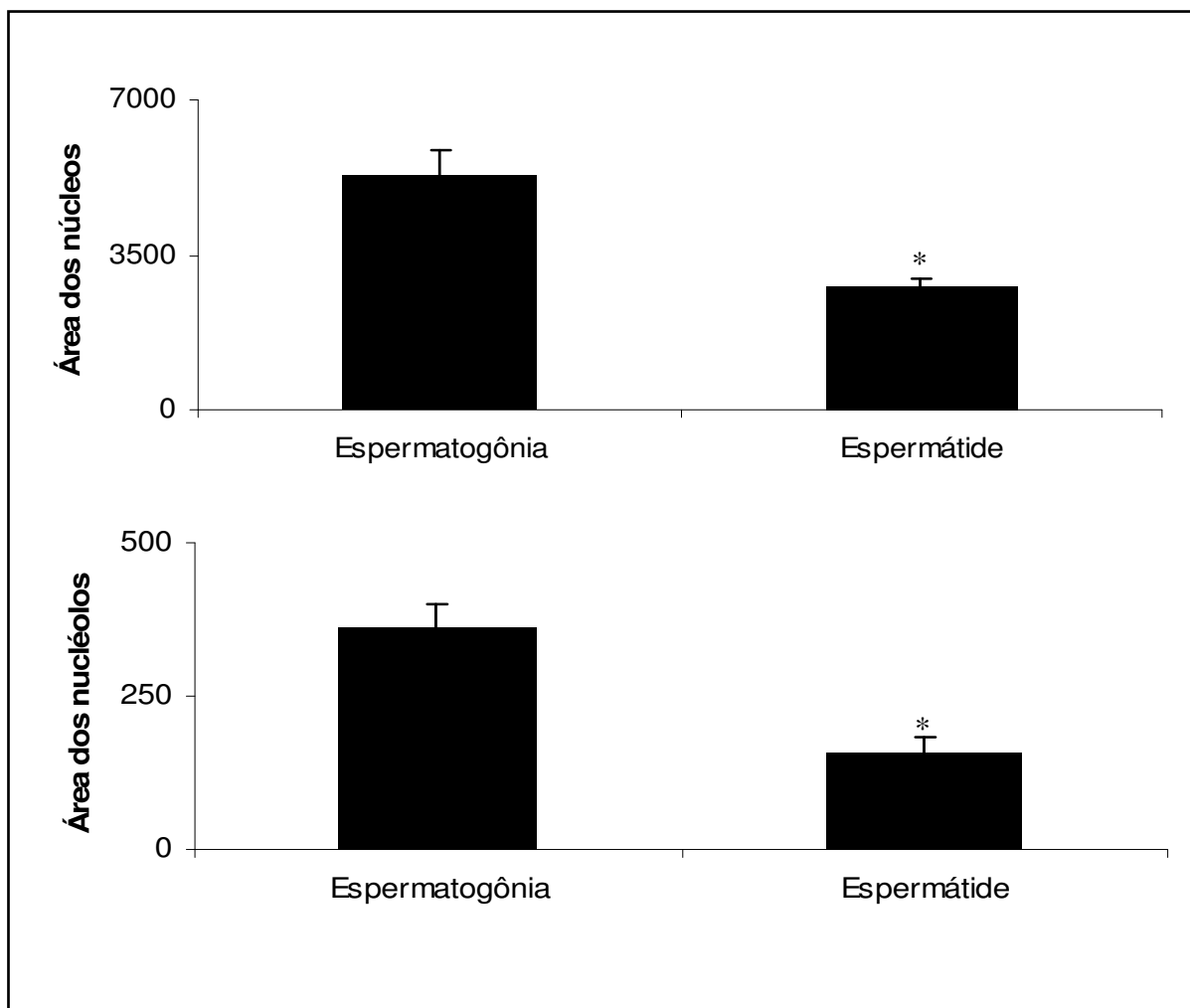


Figura 3: Área (nm²) do núcleo e do nucléolo de espermatogônias e de espermátides iniciais de *Oryctolagus cuniculus*. O asterisco indica diferença significativa entre os tipos celulares (teste t independente, p<0,05).

Figura 4: Células germinativas de *Oryctolagus cuniculus*. A: Espermatogônia em intérfase com nucléolo organizado (seta). B: Espermatócitos primários em zigóteno apresentando marcações nucleolares centrais e periféricas (setas). C: Espermatócitos primários em paquíteno com marcações nucleolares, preferencialmente periféricas (setas). D: Metáfase I. E: Visão geral de espermátides redondas (iniciais), em alongamento e alongadas. F: Espermátides em alongamento apresentando marcação nucleolar periférica (setas). G: Espermatozóides apresentando uma forte marcação pela prata na base da cabeça, no local da ligação com a peça intermediária. Barras = A, B, C, D, F e G: 5 μ m; E: 20 μ m.

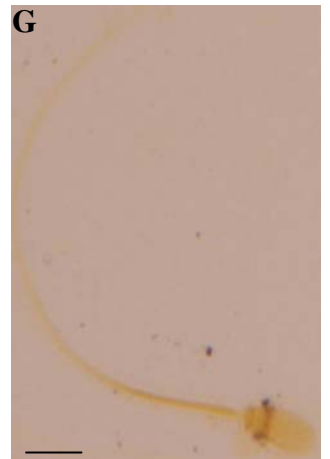
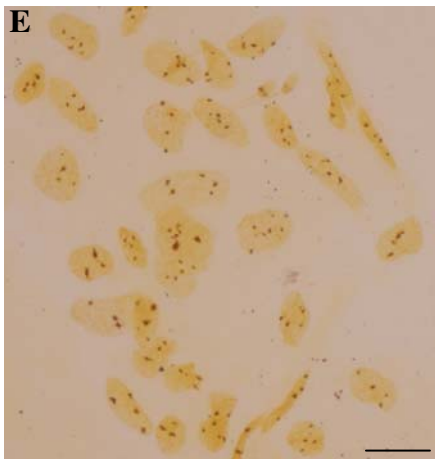
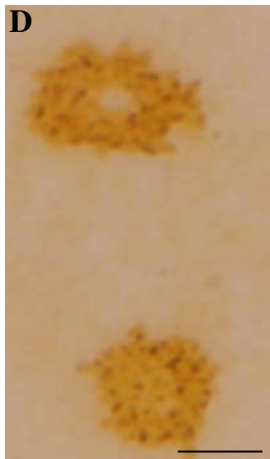
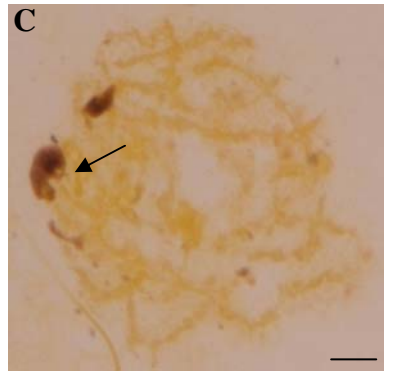
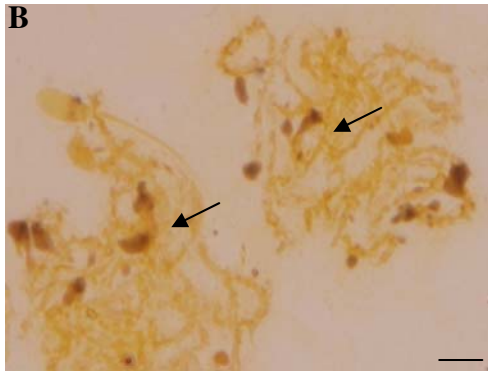
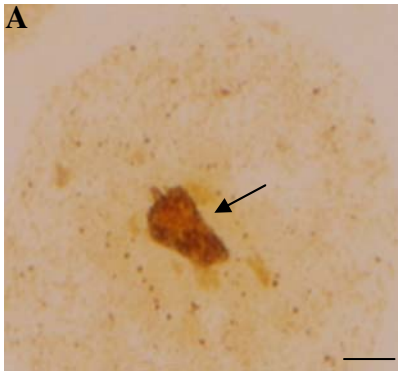


Figura 5: Análise ultra-estrutural de túbulos seminíferos de *Oryctolagus cuniculus*. A: Espermatogônia com nucléolo (nu) do tipo reticulado organizado. B, C e D: Espermatócitos primário em paquíteno, apresentando complexo sinaptonêmico e sem a presença de nucléolo organizado e, com início de acúmulo de material ribonucleoproteico no citoplasma (*). Esse material se reúne e forma o CB que, posteriormente, pode ser observado em associação com aglomerados de mitocôndrias (m) ou isolado. E e F: Espermátide inicial apresentando nucléolo reorganizado (nu) e CB (*) em associação com aglomerados de mitocôndrias (m), próximo à região de formação da vesícula acrossomal (a). (n – núcleo; nu – nucléolo; m – mitocôndrias; * - corpo cromatóide; a – vesícula acrossomal). Barras = 10µm.

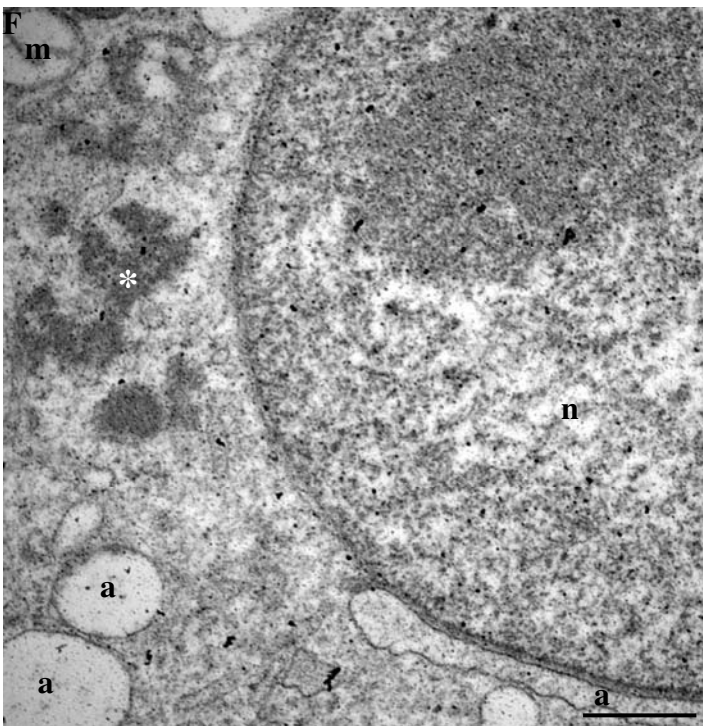
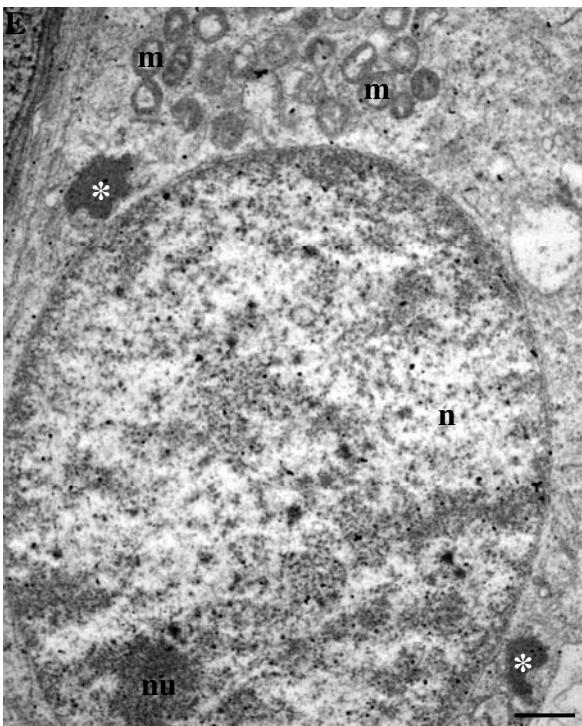
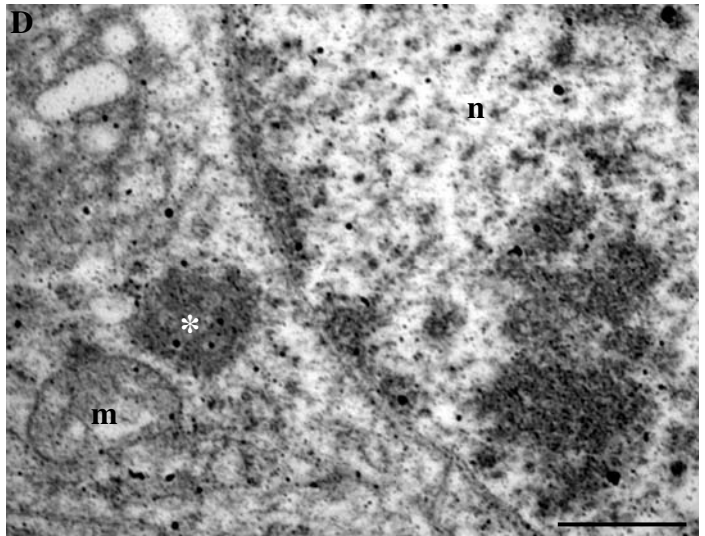
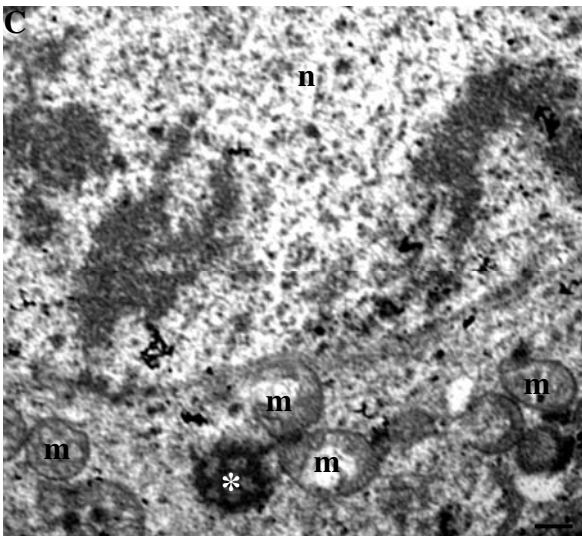
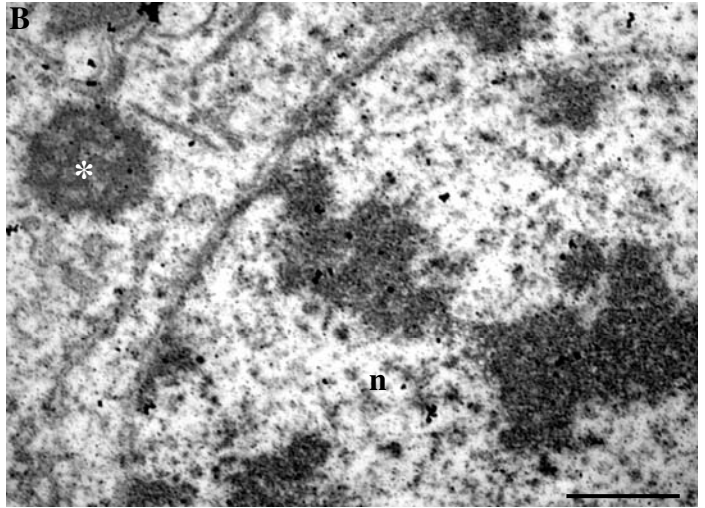
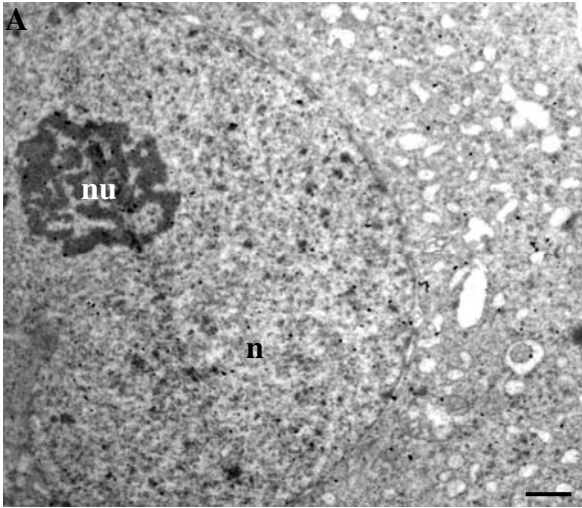
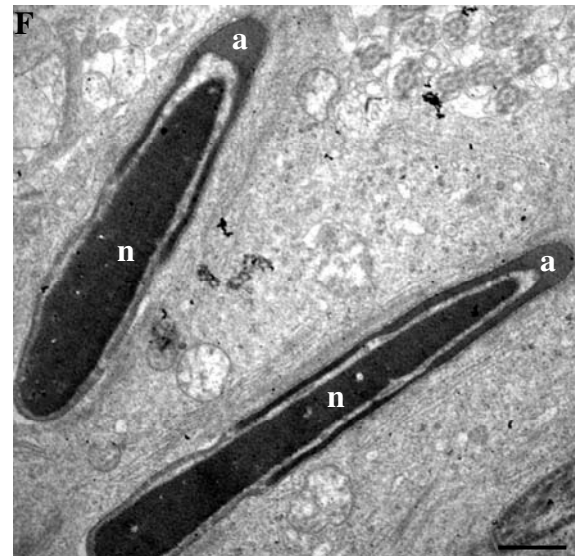
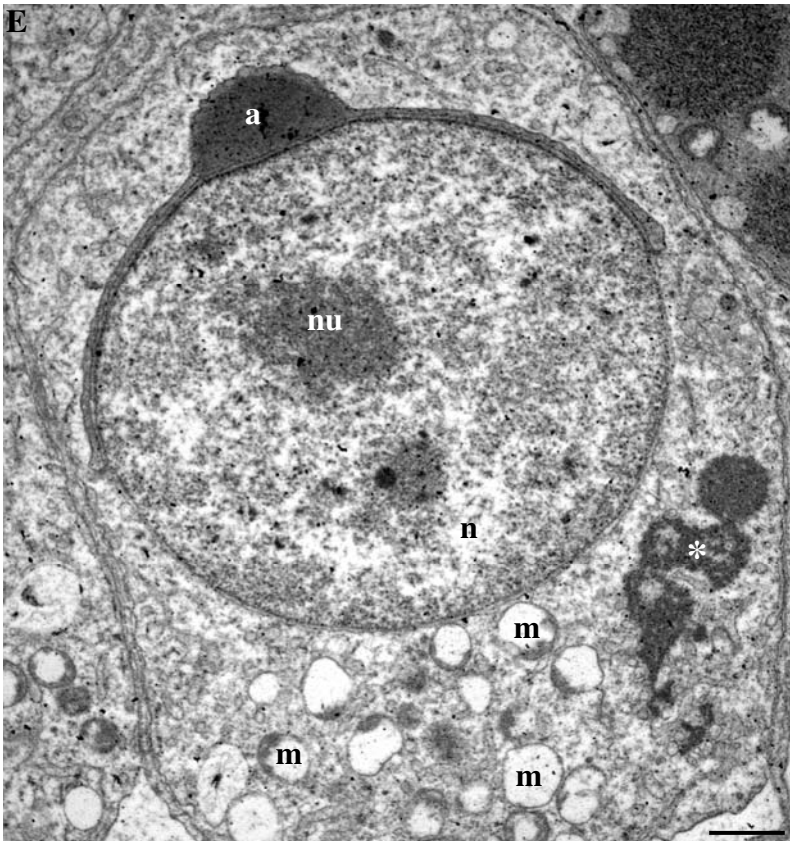
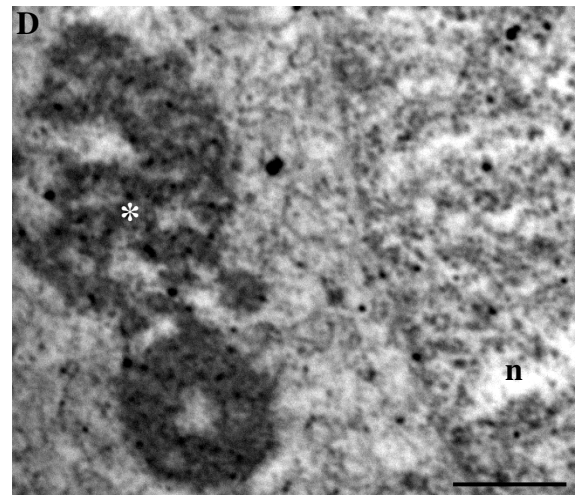
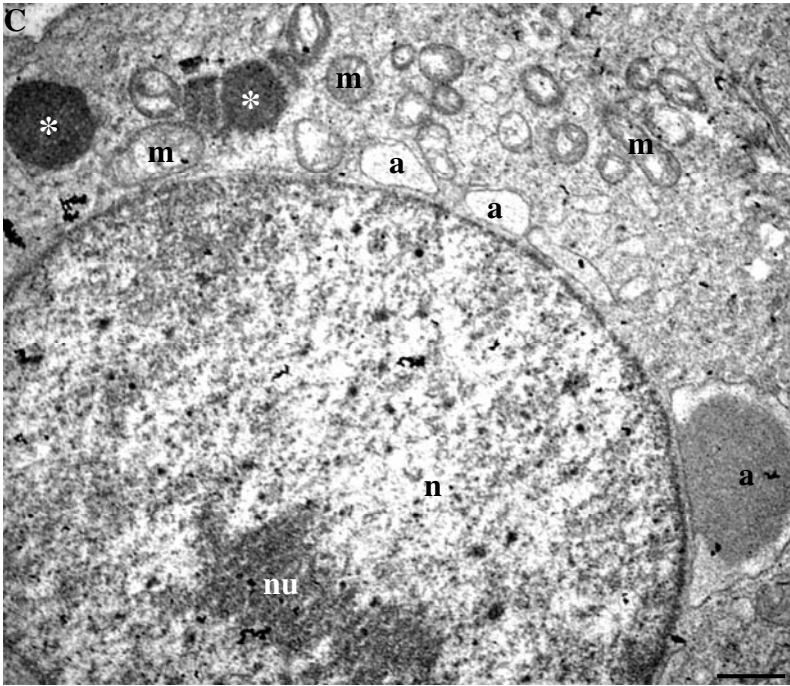
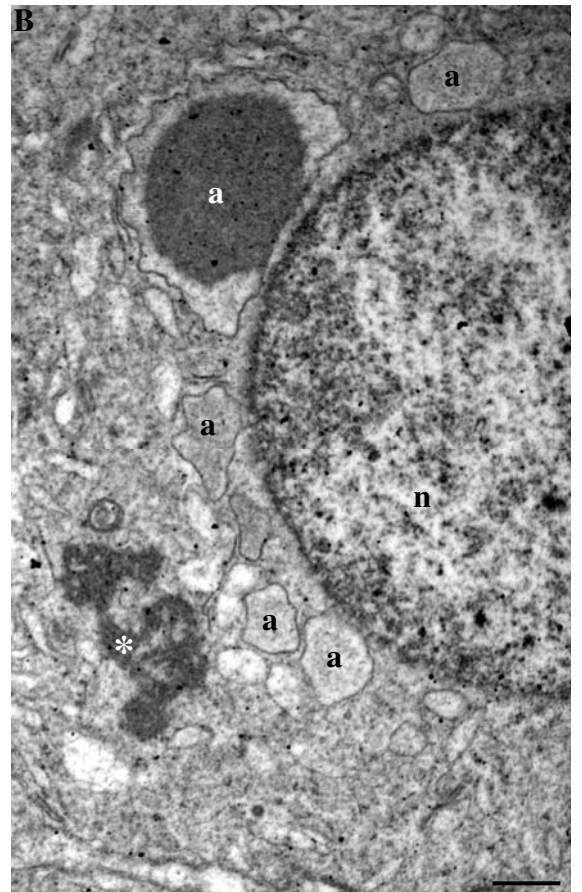
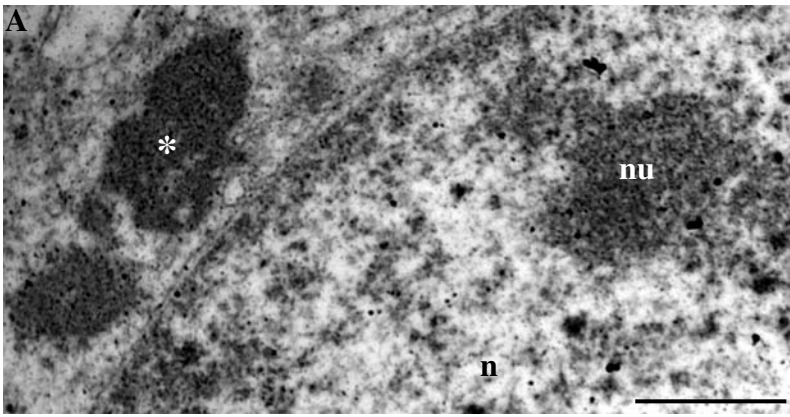


Figura 6: Análise ultra-estrutural de túbulos seminíferos de *Oryctolagus cuniculus*. A: Espermátide inicial apresentando nucléolo reorganizado (nu) e CB com uma grande área (*). B: Espermátides inicial apresentando nucléolo reorganizado (nu) e CB (*) próximo à região de formação da vesícula acrossomal (a). C, D e E: Espermátides em alongamento, com nucléolo reorganizado (nu), apresentando o CB (*) com uma grande área e em associação com aglomerados de mitocôndrias (m), em deslocamento para a região posterior do núcleo (n), onde haverá a formação da bainha mitocondrial e cauda dos espermatozóides maduros. F: Espermatozóides em maturação onde não é possível observar a presença de material proveniente do CB em nenhum compartimento celular. (n – núcleo; nu – nucléolo; * - corpo cromatóide; m – mitocôndrias; a – vesícula acrossomal). Barras = 10µm.



CONSIDERAÇÕES FINAIS

5. Considerações finais

Os dados do presente trabalho permitiram chegar às considerações finais citadas abaixo, sendo que, um resumo dos principais resultados obtidos pode ser encontrado na Tabela 1:

- Em todas as espécies analisadas ocorre fragmentação do material nucleolar na prófase I, porém em *Tilapia rendali* essa fragmentação ocorre no estágio de leptóteno e nas demais espécies a fragmentação ocorre após o estágio de paquíteno.
- Todas as espécies analisadas apresentaram espermatogônias e espermátides iniciais possuindo entre 1 e 4 nucléolos. Em *Phrynos geoffroanus* e em *Oryctolagus cuniculus* houve uma interação entre o tipo celular analisado e o número de nucléolos que elas continham, sendo que em *P. geoffroanus* as espermatogônias com apenas 1 nucléolo foram mais frequentes, em relação às espermátides iniciais com um único nucléolo. Porém as espermátides iniciais com 2 nucléolos foram encontradas com maior frequência, quando comparadas com as espermatogônias com o mesmo número de nucléolos, indicando um aumento no número de nucléolos após a divisão meiótica. Em *O. cuniculus* as espermátides iniciais com apenas 1 nucléolo foram mais frequentes, em relação às espermatogônias com um único nucléolo, indicando uma diminuição do número de nucléolos após a meiose. Nas demais espécies, *T. rendalli* e *Dendropsophus minutus*, a maioria das espermatogônias e das espermátides iniciais apresentaram somente um nucléolo.
- Ocorre uma reorganização do nucléolo no núcleo das espermátides iniciais, porém em todas as espécies analisadas as áreas nuclear e nucleolar das espermatogônias foram significativamente maiores quando comparadas às mesmas áreas das espermátides iniciais, indicando que ocorre uma redução do tamanho do nucléolo de um tipo celular para outro. Esse menor tamanho do nucléolo nas espermátides iniciais pode ser atribuído a fatores como: a) Mudança no estado fisiológico da célula; b) Diminuição do número de regiões organizadoras nucleolar (RONs) nas espermátides; c) Migração de parte do material nucleolar para o citoplasma da célula, passando a fazer parte da constituição química do corpo cromatóide (CB).
- Não foi observada a presença de nucléolo organizado no núcleo de espermátides finais e espermatozóides maduros, nas espécies utilizadas no presente estudo.
- Em *T. rendalli* e em *D. minutus* o CB inicia o seu processo de formação no citoplasma das espermatogônias, tipo celular que ainda possui nucléolo organizado. Já em *P. geoffroanus* e em *O. cuniculus* o CB forma-se no citoplasma dos espermátocitos primários, fase onde está havendo uma desorganização do material nucleolar. Em todas as espécies analisadas o CB atinge sua maior área no citoplasma dos espermátocitos primários, após a fragmentação do material nucleolar.

- Em todas as espécies analisadas o CB foi observado em associação com aglomerados de mitocôndrias no citoplasma de espermatócitos primários, espermátides iniciais e espermátides em alongamento, indicando que essa estrutura pode estar relacionada com o direcionamento das mitocôndrias para a região da formação da bainha mitocondrial dos espermatozóides.
- Em *D. minutus*, *P. geoffroanus* e *O. cuniculus* o CB foi observado nas proximidades da região de formação do sistema acrossomal das espermátides iniciais, indicando que essa estrutura pode desempenhar alguma função nesse processo. Além do mais, em *P. geoffroanus*, foi observada uma associação entre o CB e o complexo de Golgi, no citoplasma de espermatócitos primários.
- Em *P. geoffroanus* o CB foi observado em associação com vesículas de lipídios, muito comum nas células germinativas dessa espécie, indicando que se deve investigar a participação desse complexo macromolecular no metabolismo de hormônios esteróides, durante a espermiogênese.
- Nas espermátides finais, de todas as espécies analisadas, não foi observada a presença de material do CB nos compartimentos celulares, sugerindo que esse material pode ter sido disperso nos corpos residuais e, possivelmente, degradado ao final da espermiogênese.
- Apesar de algumas diferenças no processo de formação e na interação existente entre o CB e outras estruturas celulares das células germinativas, o CB parece ter papel relevante durante a espermatogênese de todas as espécies de vertebrados estudadas.

Características	Espécies			
	<i>Tilapia rendalli</i>	<i>Dendropsophus minutus</i>	<i>Phrynosops geoffroanus</i>	<i>Oryzotolagus cuniculus</i>
Área (nm) Núcleo Espermatogônia (m±dp)	2264.1420 ± 287.2167 ^(*)	3275.0900 ± 676.9832 ^(*)	4592.156 ± 509.3007 ^(*)	5316.0000 ± 566.0213 ^(*)
Área (nm) Núcleo Espermatíde (m±dp)	1338.5660 ± 35.9166	1130.1360 ± 239.9611	1726.7220 ± 137.7930	2782.5160 ± 156.6577
Área Nucléolo (nm) Espermatogônia (m±dp)	142.6000 ± 19.3791 ^(*)	125.8760 ± 12.1991 ^(*)	259.1620 ± 32.0250 ^(*)	362.3020 ± 36.2001 ^(*)
Área (nm) Nucléolo Espermatíde (m±dp)	33.5160 ± 3.4033	27.8640 ± 3.5542	50.2920 ± 5.7039	157.9240 ± 26.8374
Número de espermatogônias com 1 nucléolo (%)	489 (74.8) ^(a)	484 (88.2) ^(a)	583 (95.1) ^(a,*)	367 (50.9) ^(a,*)
Número de espermatogônias com 2 nucléolos (%)	142 (21.7) ^(b)	61 (11.1) ^(b)	27 (4.4) ^(b,*)	205 (28.2) ^(b)
Número de espermatogônias com 3 nucléolos (%)	17 (2.6) ^(c)	4 (0.7) ^(c)	2 (0.3) ^(b)	99 (13.7) ^(c)
Número de espermatogônias com 4 nucléolos (%)	6 (0.9) ^(c)	0 (0.0) ^(c)	1 (0.2) ^(b)	52 (7.2) ^(d)
Momento da fragmentação do nucléolo n a prófase I	Leptóteno	Paquíteno	-	Paquíteno
Posição dos fragmentos nucleolares durante a prófase I	Central	Central	-	Periférica
Número de espermatídes com 1 nucléolo (%)	564 (77.6) ^(a)	599 (89.9) ^(a)	577 (83.6) ^(a)	498 (58.9) ^(a)
Número de espermatídes com 2 nucléolos (%)	144 (19.7) ^(b)	56 (8.4) ^(b)	92 (13.3) ^(b)	217 (25.6) ^(b)
Número de espermatídes com 3 nucléolos (%)	19 (2.4) ^(c)	10 (1.5) ^(c)	15 (2.2) ^(c)	97 (11.5) ^(c)
Número de espermatídes com 4 nucléolos (%)	3 (0.3) ^(c)	1 (0.2) ^(c)	6 (0.9) ^(c)	34 (4.0) ^(d)
Posição do nucléolo reorganizado na espermatíde	Central	Central	-	Periférica
Tipo celular onde ocorre a formação do CB	Espermatogônia	Espermatogônia	Espermatócito I	Espermatócito I
Tipo de nucléolo das espermatogônias	Camadas concêntricas	Compacto	Compacto	Reticulado
Tamanho do CB	Grande	Pequeno	Pequeno	Grande
CB associado com mitocôndrias	Sim	Sim	Sim	Sim
CB associado com complexo de Golgi	Não	Não	Sim	Não
CB associado com grânulos de lipídios	Não	Não	Sim	Não
CB atravessando pontes citoplasmáticas entre espermatídes	Não	Não	Não	Não
CB presente na região da cauda do espermatozóide	Sim	Não	Sim	Sim
CB eliminado nos corpos residuais	Não	Não	Sim	Não

APÊNDICES



Universidade Estadual Paulista
Instituto de Biociências
*CEEA – COMISSÃO DE ÉTICA NA
EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL*

Caixa Postal 510 - 18.618-000 - Botucatu, SP fone (014) 38116013 fax (014)38113744

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 057 /06-CEEA, sobre “*Caracterização funcional e molecular do corpo cromatóide na espermatogênese de vertebrados*”, sob a responsabilidade de MARIA TERCÍLIA VILELA DE AZEREDO OLIVEIRA, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL* (CEEA), em reunião de 29/11/06.

Botucatu, 29 de novembro de 2006.

Prof. Dr. FRANCISCO DE ASSIS GANEO DE MELLO
Presidente - CEEA

NADIA JOVÊNCIO COTRIM
Secretária - CEEA