

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS
SÃO JOSÉ DO RIO PRETO - SP

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

RODRIGO ZIERI

Sistema Pigmentar Extracutâneo e Morfologia

Testicular em Anuro

(*Physalaemus nattereri* e *Physalaemus fuscomaculatus*)

ORIENTADOR: PROF. DR. CLASSIUS DE OLIVEIRA

**Dissertação apresentada ao Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas,
Universidade Estadual Paulista, para
obtenção do título de mestre em Biologia
Animal.**

Zieri, Rodrigo.

Sistema pigmentar extracutâneo e morfologia testicular em anuro
(*Physalaemus nattereri* e *Physalaemus fuscomaculatus*) / Rodrigo Zieri.

– São José do Rio Preto : [s.n.], 2004

85 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Classius de Oliveira

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

1. Morfologia (Animais). 2. Anuro - Morfologia. 3. Leptodactylidae.
4. Melanócito. 5. Espermiogênese. 6. *Physalaemus nattereri*. 7.
Physalaemus fuscomaculatus. I. Oliveira, Classius. II. Universidade
Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III.
Título.

CDU – 597.8

Data da Defesa: 17/12/2004

Banca Examinadora

Titulares:

Prof. Dr. Classius de Oliveira _____
(Orientador) Assinatura

Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga _____
Assinatura

Prof. Dr. John Campbell McNamara _____
Assinatura

Suplentes:

Profa. Dra. Rejane Maira Góes _____
Assinatura

Prof. Dr. Alan Peres Ferraz de Mello _____
Assinatura

***Dedico esta dissertação, com amor
e gratidão, aos meus pais
Maria e Alécio***

AGRADECIMENTOS

Aqui demonstro minha sincera gratidão à todos que, de alguma forma, colaboraram comigo durante a realização deste trabalho:

- Ao Prof. Dr. Classius de Oliveira, pela orientação profissional, confiança e amizade. Meu exemplo de profissionalismo e ética.
- Ao Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga, pelas ricas sugestões e conselhos apresentados durante o desenvolvimento do projeto.
- Ao Dr. Elias Francisco Lopes de Freitas, pelas sugestões durante a qualificação.
- Aos Laboratórios de Microscopia e Microanálise e de Ecologia Animal, pelos inestimáveis auxílios durante os procedimentos práticos.
- Aos membros do corpo docente da Pós-graduação, que contribuíram direta ou indiretamente na minha formação.
- Aos caros amigos da Pós-graduação, pelo companheirismo.
- Ao técnico Luiz Roberto Falleiros Júnior, pelo auxílio e amizade.
- Colegas e amigos do laboratório: Lia, Paula, Wagner, Rodrigo e Adelina pela amizade e apoio.
- À Aline, pelo companheirismo durante a dissertação.
- Aos irmãos, membros da república “Toca do Largato”, Luiz Fernando, Mário, Gabriel, Bruno, Fernando e Alexandre, meus fiéis e eternos companheiros.
- Aos grandes amigos da Graduação, pelos momentos de alegria e pelas noites de estudos.
- Aos meus irmãos Adriano e Alessandra e minha adorável sobrinha Júlia... amo vocês!
- À FAPESP (processo nº . 02/08016-9) e à CAPES, pelo apoio financeiro destinado ao trabalho.
 - À Deus, pela oportunidade.

ÍNDICE

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1.INTRODUÇÃO.....	3
1.1. Panorama geral dos Anfíbios.....	3
1.2. A família Leptodactylidae	4
1.3. Aparelho Reprodutor Masculino	6
1.4. Sistema Pigmentar Extracutâneo	8
1.5. Objetivos	11
1.6. Referências Bibliográficas	12
 2. TRABALHOS	
PIGMENTAÇÃO TESTICULAR NO ANFÍBIO <i>Physalaemus nattereri</i> (ANURA): OBSERVAÇÕES ANATÔMICAS SOBRE O SISTEMA PIGMENTAR EXTRACUTÂNEO, submetido à Revista Brasileira de Zoologia.....	20
 MELANÓCITOS NOS TESTÍCULOS DE <i>Physalaemus nattereri</i> E <i>Physalaemus fuscomaculatus</i> (ANURA, LEPTODACTYLIDAE): ASPECTOS HISTOLÓGICO E ULTRA-ESTRUTURAL.....	36
 Espemiogênese em <i>Physalaemus nattereri</i> (Anura, Leptodactylidae): Estudo Ultra-estrutural.....	53
 3.CONCLUSÕES GERAIS	81

RESUMO

O presente estudo analisa as características estruturais e ultra-estruturais dos testículos, bem como as características do sistema pigmentar extracutâneo e sua relação com as outras estruturas, nos anuros *Physalaemus nattereri* (Steindachner, 1963) e *P. fuscomaculatus* (Steindachner, 1964). Dez machos adultos de cada espécie foram coletados em Nova Itapirema, distrito de Nova Aliança - SP e processados para análises em microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão. Os testículos apresentaram numerosas células contendo pigmentos, aleatoriamente distribuídas na túnica albugínea e interstício, dando ao órgão uma coloração marrom escura. Essas células são estruturalmente semelhantes a melanócitos, e se caracterizam pela enorme quantidade de pigmentos melânicos no interior de corpúsculos elétron-densos contendo melanina, os melanossomos. Durante a espermiogênese ocorre condensação da cromatina e alongamento nuclear, além da perda de material citoplasmático. As células de Sertoli apresentam em seu citoplasma grande quantidade de microtúbulos e grânulos de glicogênio. O espermatozóide é fusiforme, contém uma capa acrossômica e perforatorium na região anterior do núcleo e a peça intermediária contém uma bainha citoplasmática com mitocôndrias. O flagelo apresenta o axonema, fibra justaxonemal e membrana ondulante, e bastão axial ausente. Esta organização é semelhante à encontrada em outros anfíbios como *P. biligonigerus*, *P. gracilis* e *P. fuscomaculatus*.

ABSTRACT

This paper was analyses the structural and ultra-structural characteristics of the testis, and the extracutaneous pigmentary system characteristics and the relationship with other structures, in the anurans *Physalaemus nattereri* (Steindachner, 1963) and *P. fuscomaculatus* (Steindachner, 1964). Ten males adults of each species were collected in Nova Itapirema, district of Nova Aliança - SP and processed for analyses in light and transmission electron microscopy. The testis presented numerous pigment-containing cells, randomly distributed in the albuginea tunic and interstitium, giving the organ a dark brown coloration. The intense pigmentation observed in the testis is due to great amount of cellular types containing granules of brown coloration and long cytoplasmic processes, characterized by the synthesis and accumulation of great amount of melanin pigment inside of melanosomes. Spermiogenesis in the anuran *P. nattereri* involves chromatin condensation and nuclear elongation, with visible cytoplasmic eliminations. In this stage it can also be seen inside Sertoli cell cytoplasm, surrounding each spermatid, a great amount of microtubules and glycogen. The anterior region of the nucleus presented an acrosome and perforatorium. A mitochondrial sleeve is found around the proximal portion of the tail. The tail presents an axonema with a 9+2 axoneme pattern, a justaxonemal fiber, undulating membrane and absence of axial rod. This organization is similar to that found in other amphibians such as *P. biligonigerus*, *P. gracilis* and *P. fuscomaculatus*.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Panorama geral dos Anfíbios

A classe Amphibia (Linnaeus, 1758) foi o primeiro grupo de vertebrados a conquistar o ambiente terrestre, há cerca de 350-400 milhões de anos, no período Devoniano e está dividida em três subclasses: Labyrinthodontia, Lepospondyli e Lissamphibia (LINZEY, 2001; POUGH *et al.*, 2003).

As subclasses Labyrinthodontia e Lepospondyli foram as pioneiras sobre a face da Terra, tendo se extinguido após 200 milhões de anos. Os Amphibia ainda existentes, ou Lissamphibia, apareceram no período Jurássico da era Mesozóica, há cerca de 150 milhões de anos (LINZEY, 2001).

Os anfíbios são considerados um dos mais interessantes grupos do reino animal, pois apresentam, na maioria das espécies, uma forma larval aquática e um adulto terrestre (POUGH *et al.*, 1999), além de possuírem a pele bastante permeável, podendo secretar uma grande variedade de substâncias químicas (FEIO *et al.*, 1998). Também se observa neste grupo uma das maiores diversidades de estratégias reprodutivas entre os vertebrados, seja no comportamento de atração sexual, seja nos tipos e nos locais de postura e nos cuidados com as crias (FEIO *et al.*, 1998; POUGH *et al.*, 1999).

Atualmente são conhecidos três grupos de anfíbios: as salamandras (Caudata), com 502 espécies, amplamente distribuídas, principalmente no hemisfério norte; as cobras-cegas (Gymnophiona), com 165 espécies, caracterizadas pela ausência de membros; e os anuros (Anura), com 4.873 espécies, conhecidas como sapos, rãs e pererecas, que constituem o principal grupo de anfíbios encontrados no Brasil (BASTOS *et al.*, 2003).

A anfíbiofauna da América do Sul é a mais rica do planeta, com aproximadamente 1.740 espécies distribuídas por 140 gêneros e 16 famílias (DUELLMAN, 1999). No Brasil, atualmente são conhecidas 600 espécies de anfíbios (LEWINSOHN e PRADO, 2004), sendo o país que

possui a maior diversidade; 60% destas espécies são endêmicas, ou seja, ocorrem única e exclusivamente no Brasil (FEIO *et al.*, 1998).

A ordem Anura, também conhecida como Salientia, compreende anfíbios sem cauda e que possui os membros posteriores modificados para o salto (ORR, 1986). Ocorre em todos os continentes, com exceção da Antártica, com a proporção de 77% das suas famílias com centro de distribuição tropical, 14% em áreas subtropicais do hemisfério norte e 9% distribuídas pelo restante do globo (POUGH *et al.*, 1999).

Como os anuros apresentam pele permeável, a maioria das espécies apresenta reprodução à noite, nos meses mais quentes e chuvosos do ano (POMBAL e MADUREIRA, 1997; ETEROVICK e SAZIMA, 2000; BERTOLUCI e RODRIGUES, 2002). Todavia o período reprodutivo pode ocorrer também na estação seca, se houver chuvas esporádicas capazes de encharcar suficientemente o ambiente, ou em ambientes com corpos d'água permanentes, como riachos (BASTOS *et al.*, 2003). Na época reprodutiva de muitas espécies de anuros, centenas de indivíduos agregam-se em determinadas áreas à noite, formando coros (BASTOS e HADDAD 1996 e 1999) nos quais os machos vocalizam (coaxam) para a atração de fêmeas para o acasalamento (HADDAD e CARDOSO, 1992), e também para defesa territorial e outros recursos (BASTOS e HADDAD, 2002; MARTINS *et al.*, 1998).

1.2. A família Leptodactylidae

Os Leptodactylidae ocorrem na América do Sul e sul da América do Norte, tendo as florestas temperadas do Chile, sul do Brasil e região da Patagônia como maior centro de distribuição geográfica (DUELLMAN e TRUEB, 1994). Apresentam 49 gêneros contendo 712 espécies, sendo 37 do gênero *Physalaemus* (DUELLMAN, 1999).

Lynch (1970) definiu quatro grupos dentro do gênero *Physalaemus*: grupo *cuvieri*, grupo *pustulosus*, grupo *signiferus* e grupo *biligonigerus*, este último com quatro espécies: *P. biligonigerus*, *P. santafecinus*, *P. nattereri* e *P. fuscomaculatus*.

As espécies *Physalaemus nattereri* (Steindachner, 1863) e *Physalaemus fuscomaculatus* (Steindachner, 1864) (Fig.1A e B) apresentam cerca de 4,5 a 5,0 cm de comprimento rostro cloacal, cabeça larga, focinho curto, coloração geral do dorso marrom escura com faixas mais claras. Apresentam comportamento de escavação (CEI, 1980), permanecendo enterrados em períodos de estiagem. A reprodução é prolongada, durante a qual os machos agregam-se em arenas, principalmente no início da estação chuvosa. O amplexo é axilar e os ovos são depositados em ninhos de espumas, sobre a água. Para a produção do ninho, o macho bate com as patas traseiras o muco que é liberado com os ovos durante a desova, enquanto está em amplexo com a fêmea (BASTOS *et al.*, 2003).



Figura 1: A) *Physalaemus nattereri*; B) *Physalaemus fuscomaculatus*

1.3. Aparelho Reprodutor Masculino

Nos vertebrados, de modo geral, os aparelhos reprodutor e urinário se originam a partir da região mesodérmica intermediária. Esse cordão de células mesodérmicas se desenvolve em túbulos pronéfricos, que são os precursores dos rins e ductos genitais (GILBERT, 2002). As gônadas, sobre influência de fatores predeterminados geneticamente bem como de fatores ambientais, se desenvolvem em testículos ou ovários e também seus sistemas tubulares vetores de gametas (ROMER e PARSONS, 1985; DUELLMAN e TRUEB, 1994).

Quanto ao aparelho reprodutor masculino, são poucos os trabalhos que relatam a morfologia nos anuros, restringindo-se àqueles animais cujos habitats são regiões tropicais e subtropicais. Situação oposta aos estudos dos anuros das regiões temperadas (OLIVEIRA, 1996). O aparelho reprodutor possui um par de testículos ligados diretamente aos ductos arquinéfricos, que por sua vez abrem-se na cloaca transportando apenas o esperma, ou então através dos túbulos renais (mesonéfricos) e destes aos ductos arquinéfricos e cloaca, transportando urina e esperma, mantendo em ambos os casos uma estreita relação com o aparelho urinário (ROMER e PARSONS, 1985 e ORR, 1986).

Nos anuros, anatomicamente os testículos são arredondados, compactos, de cor geralmente esbranquiçada e podem apresentar variações anatômicas de forma e peso de acordo com o período reprodutivo (DUELLMAN e TRUEB, 1994), além de outras alterações morfofuncionais associadas à sazonalidade da reprodução (LOFTS, 1974) ou espécie-específicas (OLIVEIRA *et al.*, 2002), como descrito para algumas espécies (MONTERO e PISANÓ, 1990 e 1992; HUANG *et al.*, 1997; OLIVEIRA e VICENTINI, 1998). As gônadas estão localizadas na cavidade corporal, aderidas à parede dorsal pelo mesórquio, através do qual transitam dúctulos eferentes que ganham os ductos arquinéfricos (LOFTS, 1974). Na margem anterior dos testículos se encontram os corpos adiposos abdominais, de coloração amarelada e com muitos prolongamentos delgados. Estes corpos adiposos constituem uma característica

estrutural comum a todos os anfíbios (DUELLMAN e TRUEB, 1994) e servem como uma reserva nutricional para as gônadas (FITZPATRICK, 1976).

Histologicamente os testículos são revestidos por uma delgada cápsula de tecido conjuntivo, a túnica albugínea, pela qual percorrem vasos sangüíneos destinados ao estroma e, especialmente ao parênquima testicular. Este apresenta um tecido germinativo arranjado em lóculos seminíferos delimitados por tecido conjuntivo frouxo, porém não ocorre a formação de septos intratesticulares (OLIVEIRA e VICENTINI, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2002).

Nos vertebrados, o tecido germinativo está organizado em estruturas ocas, como os túbulos seminíferos nos amniotas, ampolas seminíferas em ciclostomados e urodelos ou como estruturas intermediárias em alguns animais (HILDEBRAND, 1995). Segundo Romer e Parsons (1985) a organização deste tecido, em peixes e anfíbios, define estruturas mais ou menos esféricas, as ampolas seminíferas. Em anfíbios, a terminologia utilizada para descrição desses compartimentos germinativos é variável (GRIER, 1992; OLIVEIRA e VICENTINI, 1998), porém, como característica geral da arquitetura histológica dos elementos seminíferos nos anfíbios, o epitélio germinativo organiza-se em lóculos seminíferos nos Apoda (WAKE, 1969) e Anura (DUELLMAN e TRUEB, 1994; OLIVEIRA e VICENTINI, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2002) ou em ampolas seminíferas nos Urodela (HILDEBRAND, 1995).

No epitélio germinativo de anfíbios, as células da linhagem germinativa se agrupam em torno de células de sustentação, ou de Sertoli, e assim constituem cistos espermatogênicos ou espermatocistos. Cada cisto agrupa células no mesmo estágio de diferenciação, ou seja, estabelecendo uma sincronia de desenvolvimento, uma característica comum dos anfíbios (WAKE, 1969; LOFTS, 1974; FRANCHI *et al.*, 1982; UCCI, 1982; CAVICCHIA e MOVIGLIA, 1983; RASTOGI *et al.*, 1988; BÁO *et al.*, 1991 e OLIVEIRA *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2003a e 2003b), bem como em outros anamniotas (GRIER, 1992).

No parênquima testicular o tecido germinativo apresenta espermatogônias localizadas na base do epitélio e, na sequência da citodiferenciação, espermatócitos, espermatídes e espermatozóides, estes últimos geralmente são encontrados próximos ao lume.

Sobre a morfologia dos lóculos seminíferos e o arranjo cístico do epitélio germinativo destacamos algumas contribuições na família *Leptodactylidae* – *Physalaemus fuscomaculatus* (AOKI *et al.*, 1969); *Caudiverbera caudiverbera* (HERMOSILLA *et al.*, 1983); *Odontophrynus cultripes* (BÁO *et al.*, 1991); *Bombina bombina* (GOLLMANN *et al.*, 1993); genus *Physalaemus* (AMARAL *et al.*, 1999a e 1999b) e *Physalaemus cuvieri* (OLIVEIRA *et al.*, 2002).

1.4. Sistema Pigmentar Extracutâneo

Nos vertebrados ectotérmicos os pigmentos melânicos são encontrados, além da cutis, em diversos outros locais constituindo um sistema pigmentar extracutâneo (GALLONE *et al.*, 2002). No anuro *Xenopus laevis*, células contendo melanina foram identificadas nos pulmões, baço, fígado e tecido conjuntivo dos vasos sangüíneos (ZUASTI *et al.*, 1998).

Nos répteis e anfíbios, células contendo melanina podem ser encontradas em diversas vísceras (GEREMIA *et al.*, 1984) como fígado, rim, baço, peritônio, orelha interna, encéfalo, ao redor de nervos e vasos sangüíneos, com diferentes ocorrências, tipos e quantidade em diferentes espécies (AOKI *et al.*, 1969; CICERO *et al.*, 1989; PEDERZOLI e TREVISAN, 1990; TREVISAN *et al.*, 1991; ZAGAL'SKAIA, 1994; SICHEL *et al.*, 1997; AKULENKO, 1998; ZUASTI *et al.*, 1998; CHRISTIANSEN *et al.*, 1996; RUND *et al.*, 1998; JHONSON *et al.*, 1999). Em alguns desses órgãos essas células são capazes de sintetizar melanina, enquanto em outros, é uma consequência da fagocitose (ZUASTI *et al.*, 1990 e 1998).

A incidência de melanina extracutânea pode ser expressão de uma grande capacidade migratória de melanoblastos e outras células pigmentadas derivadas da crista neural (ZUASTI *et al.*, 1990) e também de células tronco hematopoéticas (SICHEL *et al.*, 1997).

Zuast (1989) caracteriza a melanina como um polímero complexo capaz de absorver e neutralizar radicais livres, cátions e outros agentes potencialmente tóxicos, derivados da degradação de material celular fagocitado. Esse polímero é capaz de atuar em baixas temperaturas agindo na defesa contra agentes patológicos (WOLKE, 1985).

Associados ao aparelho reprodutor, têm sido descritas células semelhantes à melanócitos que produzem e armazenam melanina no interior de estruturas esféricas ou ovóides denominadas melanossomos (AGIUS e ROBERTS, 2003), juntamente com tipos celulares especiais, caracterizados por atividade fagocítica, denominados melanomacrófagos (MMs). Os MMs são ultra-estruturalmente semelhantes à macrófagos (AGIUS, 1981), com diferentes tipos de grânulos contidos no citoplasma, os quais podem indicar substâncias químicas diversificadas, como melanina, hemosiderina e lipofuscina (AGIUS e AGBEDE, 1984; HERRAEZ e ZAPATA, 1991).

Os MMs são freqüentemente descritos como células características de certos tecidos de peixes, encontradas principalmente no fígado (peixes cartilaginosos e peixes ósseos mais primitivos) e, mais abundante, nos órgãos hematopoéticos (peixes ósseos superiores), como o baço e o rim (AGIUS, 1980; AGIUS e AGBEDE, 1984). Nos salmonídeos e nos peixes cartilaginosos, os MMs também estão distribuídos casualmente pelos tecidos (AGIUS, 1980).

Os MMs também são observados nas gônadas de peixes, em geral na cápsula (ELLIS *et al.*, 1976), ao redor dos vasos sangüíneos, no interstício ou próximos às células germinativas femininas, especialmente ovócitos em degeneração (RAVAGLIA e MEGGESE, 1995).

No anuro *Physalaemus fuscomaculatus*, uma peculiar característica é a intensa pigmentação na cápsula e no interstício testicular, com a presença de melanóforos repletos de grânulos de melanina (AOKI *et al.*, 1969), como também relatado para a intensa pigmentação de determinados tipos celulares em *P. cuvieri* (OLIVEIRA *et al.*, 2002 e 2003b).

Um aglomerado celular comumente descrito nesses diversos animais, são os centros de melanomacrófagos (MMCs - *melanomacrophage centres*), de localização diversa. Estas

estruturas parecem de natureza linfóide, contendo linfócitos e macrófagos, e poderiam representar um análogo primitivo de centros germinativos de aves e mamíferos (ELLIS *et al.*, 1976; ZAPATA e COOPER, 1990; MATUSHIMA, 1995; AGIUS e ROBERTS, 2003).

Os MMCs são agregados macrofágicos descritos como acúmulos de macrófagos pigmentados, característicos dos tecidos de peixes, principalmente, baço, rim, fígado e ovário (AGIUS, 1980; HERRÁEZ e ZAPATA, 1991; WOLKE, 1992; FOURNIER-BETZ *et al.*, 2000), mas também são observados em anfíbios e répteis (ZAPATA *et al.*, 1996). Sugere-se constituírem locais de acúmulo de material não metabolizado (WOLKE, 1992; MANERA *et al.*, 2000). Essas estruturas são agregados de MMs contendo inclusões heterogêneas, dentre as quais freqüentemente observa-se pigmentos semelhantes aos dos MMs (AGIUS e AGBEDE, 1984).

Nos peixes teleósteos, os MMCs apresentam pronunciado aumento no tamanho e na freqüência em decorrência da idade (AGIUS, 1981), privação alimentar (AGIUS e ROBERTS, 1981; MICALE e PERDICHIZZI, 1990), presença de patologias e até mesmo sobre condições de estresse ambiental, podendo ser considerados bioindicadores da qualidade da água (MACCHI *et al.*, 1992; AGIUS e ROBERTS, 2003).

A função básica descrita para os MMCs é a de remover, por fagocitose, partículas estranhas ou produtos resultantes de degradação celular (ELLIS *et al.*, 1976; TSUJII e SENO, 1990; MACCHI *et al.*, 1992). Estas estruturas foram relatadas nas gônadas de espécies de alguns peixes (BESSEAU e FALIEUX, 1994; GRIER e TAYLOR, 1998).

Para os demais vertebrados ectotérmicos, os estudos relativos ao sistema pigmentar extracutâneo são mais recentes e se referem à poucas espécies de anfíbios (AOKI, 1969, CICERO *et al.*, 1989; PEDERZOLI e TREVISAN, 1990; TREVISAN *et al.*, 1991; ZAGAL'SKAIA, 1994; SICHEL *et al.*, 1997; AKULENKO, 1998; ZUASTI *et al.*, 1998) e de répteis (GOPALAKRISHNAKONE, 1986; CHRISTIANSEN *et al.*, 1996; RUND *et al.*, 1998; JHONSON *et al.*, 1999).

Uma questão biológica que merece especial atenção é o papel dos MMs que, nos ectotérmicos, ainda não foi determinado de maneira satisfatória, além do fato que em aves e mamíferos, estas células não mais ocorrem. Dentre os anamniotas, especialmente os anuros, poucos trabalhos descrevem o aparelho reprodutor e ainda menos são as pesquisas desse sistema pigmentar extracutâneo associado. Outro aspecto que pode ser considerado é que algumas espécies filogeneticamente muito próximas podem apresentar diferenças significativas quanto as suas estruturas morfológicas e assim, essa constatação proveria subsídios para melhor compreender a filogenia e taxonomia do grupo.

1.5. OBJETIVOS

Perante a escassez de estudos morfológicos relacionados ao aparelho reprodutor de anuros e devido a observações prévias na atípica pigmentação testicular verificadas em alguns organismos, foram realizados 3 trabalhos, cujos objetivos foram:

- 1) Descrever os aspectos anatômicos e histológicos do testículo de *P. nattereri*, especialmente do tecido intersticial testicular, que contém as células pigmentares desse sistema melanogênico, especificamente o sistema pigmentar extracutâneo.
- 2) Analisar histológica e ultra-estruturalmente os testículos de *P. nattereri* e *P. fuscomaculatus* enfatizando o sistema pigmentar extracutâneo presente na região intersticial.
- 3) Descrever as modificações ultra-estruturais que ocorrem durante a espermiogênese e a ultra-estrutura do espermatozóide de *Physalaemus nattereri*.

1.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGIUS, C. 1980. Phylogenetic development of melano-macrophage centres in fish. **Journal of Zoology**. v.191, p.11-31.
- AGIUS, C. 1981. Preliminary studies on the ontogeny of the melanomacrophages of teleost hematopoietic tissues and age-related changes. **Developmental and Comparative Immunology**. v.5, p.597-606.
- AGIUS, C.; ROBERTS, R. J. 1981. Effects of starvation on the melano-macrophage centres of fish. **Journal of Fish Biology**. v.19, p.161-169.
- AGIUS, C.; AGBEDE, S.A. 1984. An electron microscopical study on the genesis of lipofuscin, melanin and haemosiderin in the haemopoietic tissues of fish. **Journal of Fish Biology**. v.24, n.4, p.471-488.
- AGIUS, C.; ROBERTS, R. J. 2003. Review: Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. **Journal of Fish Biology**. v.26, p.499-509.
- AKULENKO, N.M. 1998. Topography and structure of the pigment cell aggregation in the liver of the frog (*Rana ridibunda*). **Vestnik Zoologii**. v.32, n.3, p.49-53.
- AMARAL, M.J.L.V.; FERNANDES, A.P.; BAO, S.N.; RECCO-PIMENTEL, S.M. 1999(a). An ultrastructural study of spermiogenesis in three species of *Physalaemus* (Anura, Leptodactylidae). **Biocell**. v.23, n.3, p.211-221.
- AMARAL, M.J.L.V.; RECCO-PIMENTEL, S.M.; CARDOSO, A.J. 1999(b). A comparison of the sperm nucleoprotein composition in the genus *Physalaemus* (Amphibia, Anura). **Cytobios**. v.100, p.147-157.
- AOKI, A.; VITALE-CALPE, R.; PISANO, A. 1969. The testicular interstitial tissue of the amphibian *Physalaemus fuscomaculatus*. **Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie**. v.98, n.1, p.9-16.

- BÁO, S.N.; DALTON, G.C.; OLIVEIRA, S.F. 1991. Spermiogenesis in *Odontophrynus cultripes* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae): ultrastructural and cytochemical studies of proteins using E-PTA. **Journal of Morphology**. v.207, n.3, p.303-314.
- BASTOS, R.P.; HADDAD, C.F.B. 1996. Breeding activity of Neotropical treefrog *Hyla elegans* (Anura, Hylidae). **Journal of Herpetology**. v.30, p.355-360.
- BASTOS, R.P.; HADDAD, C.F.B. 1999. Atividade reprodutiva de *Scinax rizibilis* (Bokermann) (Anura, Hylidae) na Floresta Atlântica, sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**. v.16, p.409-421.
- BASTOS, R.P.; HADDAD, C.F.B. 2002. Acoustic and aggressive interactions in *Scinax rizibilis* (Anura, Hylidae) during the reproductive activity in southeastern Brazil. **Amphibia-Reptilia**, v.23, p.97-104.
- BASTOS, R.P.; MOTTA, J.A.O.; LIMA, L.P., GUIMARÃES, L.D. 2003. **Anfíbios da floresta nacional de Silvânia, Estado de Goiás**. Stylo. Goiânia. 82p.
- BERTOLUCI, J.; RODRIGUES, M.T. 2002. Seasonal patterns of breeding activity of Atlantic Rainforest anurans at Boracéia, southeastern Brazil. **Amphibia-Reptilia**. v.23, p.161-167.
- BESSEAU, L.; FALIEUX, E. 1994. Resorption of unemitted gametes in *Lithognathus mormyrus* (Sparidae, Teleostei): a possible synergic action of somatic and immune cells. **Cell Tissue Research**. v.276, n.1, p.123-132.
- CAVICCHIA, J.C., MOVIGLIA, G.A. 1983. The blood-testis barrier in the toad (*Bufo arenarum* Hensel): a freeze-fracture and lanthanum tracer study. **Anatomical Record**. v.205, n.4, p.387-396.
- CEI, J.M. 1980. **Amphibians of Argentina**. Monitore Zool. ital. (ns.) Monograf. 2: XII + 609p.
- CHRISTIANSEN, J.L., GRZYBOWSKI, J.M., KODAMA, R.M. 1996. Melanomacrophage aggregations and their age relationships in the yellow mud turtle, *Kinosternon flavescens* (Kinosternidae). **Pigment Cell Research**. v.9, n.4, p.185-190.

- CICERO, R., MALLARDI, A., MAIDA, I., GALLONE, A., PINTUCCI, G. 1989. Melanogenesis in the pigment cells of *Rana esculenta* L. liver: evidence for tyrosinase like activity in the melanosome protein fraction. **Pigment Cell Research**. v.2, p.100-108.
- DUELLMAN, W.E., TRUEB, L. 1994. **Biology of Amphibia**. McGraw-Hill Book Company, New York. 670p.
- DUELLMAN, W.E. (ed.). 1999. **Patterns of distribution of amphibians: a global perspective**. Johns Hopkins, Baltimore. 633p.
- ELLIS, A.E.; MUNROE, A.L.S.; ROBERTS, R.J. 1976. Defence mechanisms in fish. I. A study of the phagocytic system and the fate of intraperitoneally injected particulate material in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.). **Journal of Fish Biology**. v.8, p.67-78.
- ETEROVICK, P.; SAZIMA, I. 2000. Structure of an anuran community in a montane meadow in southeastern Brazil: Effects of seasonality, habitat and predation. **Amphibia-Reptilia**. v.21, p.439-461.
- FEIO, R.N.; BRAGA, U.M.L.; WIEDERHECKER, H.; SANTOS, P. S. 1998. **Anfíbios do Parque Estadual do Rio Doce (Minas Gerais)**. Viçosa: UFV, IEF, 32p.
- FITZPATRICK, L.C. 1976. Life history patterns of storage and utilization of lipids for energy in amphibians. **American Zoologist**. v.16, p.725-732.
- FOURNIER-BETZ, V., QUENTEL, C., LAMOUR, F., LEVEN, A. 2000. Immunocytochemical detection of Ig-positive cells in blood, lymphoid organs and the gut associated lymphoid tissue of the turbot (*Scophthalmus maximus*). **Fish Shellfish Immunology**. v.10, n.2, p.187-202.
- FRANCHI, E., CAMATINI, M., DE CURTIS, I. 1982. Morphological evidence of a permeability barrier in urodele testis. **Journal of Ultrastructure Research**. v.80, p.253-263.
- GALLONE, A; GUIDA, G.; MAIDA, I.; CÍCERO, R. 2002. Spleen and liver pigmented macrophages of *Rana esculenta* L. A new melanogenic system? **Pigment Cell Research**. v.15, p.32-40.

- GEREMIA, E., CORSARO, C., BONOMO, R., GIARDINELLI, R., PAPPALARDO, P., VANELLA, A., SICHEL, G. 1984. Eumelanins as free radicals trap and superoxide dismutase activities in Amphibia. **Comparative biochemistry and physiology b-biochemistry & molecular biology**. v.79B, n.1, p.67-69.
- GILBERT, S.F. 2002. **Biologia do desenvolvimento**. FUNPEC. Ribeirão Preto. 563p.
- GOLLMANN, G., BORKIN, L. J., ROTH, P. 1993. Genic and morphological variation in the fire-bellied toad, *Bombina bombina* (Anura, Discoglossidae). **Zoologische Jahrbuecher Abteillung Fuer Systematik Oekologie und Geographie Der Tiere**. v. 120, p.129-136.
- GOPALAKRISHNAKONE, P. 1986. The structure of the pigment cells in the turtle *Trionyx sinensis*. **Archivum Histologicum Japonicum**. v.49, p.421-435.
- GRIER, H.J. 1992. Chordate testis: the extracellular matrix hypothesis. **Journal of Experimental Zoology**. v.261, n.2, p.151-160.
- GRIER, H.J., TAYLOR, R.G. 1998. Testicular maturation and regression in the common snook. **Journal of Fish Biology**. v.53, p.521-542.
- HADDAD, C.F.B.; CARDOSO, A.J. 1992. Elección del macho por la hembra de *Hyla minuta* (Amphibia, Anura). **Acta Zoologica Lilloana**. v.41, p.81-91.
- HERMOSILLA, I.B., URBINA, A.P., CABRERA, J.C.P. 1983. Espermatogenesis en la rana Chilena Caudiverbera caudiverbera (Linne, 1758) (Anura, Leptodactylidae). **Bolletim de la. Sociedad de Biologia de Concepción**. Concepción. v.54, p.103-115.
- HERRÁEZ, M.P., ZAPATA, A.G. 1991. Structural characterization of the melanomacrophage centres (MMC) of goldfish *Carassius aurata*. **European Journal of Morphology**. v.29, p.89-102.
- HILDEBRAND, M. 1995. **Análise da estrutura dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu. 700p.
- HUANG, W.S., LIN, J.Y., YU, J.Y.L. 1997. Male reproductive cycle of the toad Bufo melanostictus in Taiwan. **Zoological Science**. v.14, n.3, p.497-503.

- JOHNSON, J.C., SCHWIESOW, T., EKWALL, A.K., CHRISTIANSEN, J.L. 1999. Reptilian melanomacrophages function under conditions of hypothermia: Observations on phagocytic behavior. **Pigment Cell Research**. v.12, n.6, p.376-382.
- LEWINSHN, T.M.; PRADO, P.I. 2004. Biodiversidade Brasileira, síntese do estado atual do conhecimento. 2ª ed. **Contexto**, São Paulo. 176p.
- LINZEY, D. 2001. **Vertebrate Biology**. McGraw-Hill, New York. 1ª ed. 596p.
- LOFTS, B. 1974. Reproduction. In: Physiology of the amphibia. **Academic Press**. New York. v.2, p.107-218.
- LYNCH, J.D. 1970. Systematic Status of the American leptodactylid frog genera *Engystomops*, *Eupemphix* and *Physalaemus*. **Copéia**. p.488-496.
- MACCHI, G.J., ROMANO, L.A., CHRISTIANSEN, H.E. 1992. Melano-macrophage centres in whitemouth croaker, *Micropogonias furnieri*, as biological indicators of environmental changes. **Journal of Fish Biology**. v.40, n.6, p.971-973.
- MANERA, M., SERRA, R., ISANI, G., CARPENÉ, E. 2000. Macrophage aggregates in gilthead sea bream fed copper, iron and zinc enriched diets. **Journal of Fish Biology**. v.57, p.457-465.
- MARTINS, M.; POMBAL Jr., J.P.; HADDAD, C.F.B. 1998. Escalated aggressive behaviour and facultative parental care in the net building gladiator frog *Hyla faber*. **Amphibia-Reptilia**. v.19, p.65-73.
- MATUSHIMA, E.R. 1995. Sistema Linfóide em Peixes. In: Semana sobre Histologia de Peixes, **FCAVJ-UNESP**. Jaboticabal: FUNEP, 2ª ed. p.44-45.
- MICALE, V., PERDICHIZZI, F. 1990. A quantitative and histochemical study on melano-macrophage centres in the spleen of the teleost fish *Diplodus annularis* L. **Journal of Fish Biology**. v.37, n.2, p.191-197.
- MONTERO, R.; PISANÓ, A. 1990. Ciclo espermatoogénico de los especies de *Telmatobius* del noroeste argentino. **Amphibia-Reptilia**. v.11, p.97-110.

- MONTERO, R., PISANÓ, Y.A. 1992. El ciclo espermatogénico anual de *Hyla pulchella andina*: un análisis numérico. **Acta Zoologica Lilloana**. v.41, p.173-180.
- OLIVEIRA, C. 1996. *Estudo morfológico do testículo de Scinax fuscovaria* (Amphibia, Anura, Hylidae). (Doutorado) - Botucatu: Universidade Estadual Paulista (UNESP). 131p.
- OLIVEIRA, C., VICENTINI, C.A. 1998. Descrição anatômica dos testículos e corpos adiposos de *Scinax fuscovarius* (Anura, Hylidae). **Biociências**. v.6, n.1, p.79-88.
- OLIVEIRA, C., ZANETONI, C., ZIERI, R. 2002. Morphological observations on the testes of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia, Anura). **Revista Chilena de Anatomia**. v.20, n.3, p.263-268.
- OLIVEIRA, C., VICENTINI, C.A., TABOGA, S.R.. 2003(a). Structural characterization of nuclear phenotypes during *Scinax fuscovarius* spermatogenesis (Anura, Hylidae). **Caryologia**. v.56, n.1, p.75-83.
- OLIVEIRA, C.; SANT'ANNA, A. C.; OMENA, P. M.; SANTOS L. R. S.; ZIERI, R. 2003(b). Morphological considerations on the seminiferous structures and testes of anuran amphibians: *Bufo crucifer*, *Physalaemus cuvieri* and *Scinax fuscovarius*. **Biociências**, Porto Alegre. v.11, n.1, p.39-46.
- ORR, R.T. 1986. **Biologia dos vertebrados**. 5ª ed. São Paulo: Roca. 508p.
- PEDERZOLI, A., TREVISAN, P. 1990. Pigmentary system of the adult alpine *Salamander atra aurorae*. **Pigment Cell Research**. v.3, p.80-89.
- POMBAL Jr, J.P.; MADUREIRA, C. 1997. A new species of *Physalaemus* (Anura, Leptodactylidae) from the Atlantic rain northeastern Brazil. **Alytes**. v.15, n.3, p.9-16.
- POUGH, F.H.; HEISER, J.B.; MCFARLAND, W.N. 1999. **A vida dos vertebrados**. 2ª ed. Atheneu, São Paulo. 798p.
- POUGH, F.H.; CHRISTINE, M.J.; HEISER J.B. 2003. **A vida dos vertebrados**. 3ª ed. Atheneu, São Paulo. 699p.

- RASTOGI, R.K., BAGNARA, J.T., IELA, L., KRASOVICH, M.A. 1988. Reproduction in the mexican leaf frog, *Pachymedusa dacnicolor*. IV. Spermatogenesis: a light and ultrasonic study. **Journal of Morphology**. v.197, n.3, p.277-302.
- RAVAGLIA, M.A., MAGGESE, M.C. 1995. Melano-macrophage centres in the gonads of swamp eel, *Synbranchus marmoratus* Bloch 1795 (Pisces, Synbranchidae): histological and histochemical characterization. **Journal of Fish Disease**. v.18, p.117-125.
- ROMER, A.S., PARSONS, T.S. 1985. **Anatomia comparada dos vertebrados**. São Paulo: Atheneu. 559p.
- RUND, C.R., CHRISTIANSEN, J.L., JOHNSON, J.C. 1998. In vitro culture of melanomacrophages from the spleen and liver of turtles: Comments on melanomacrophage morphology. **Pigment Cell Research**. v.11, n.2, p.114-119.
- SICHEL, G., SCALIA, M., MONDIO, F., CORSARO C. 1997. The amphibian Kupffer cells build and demolish melanosomes: an ultrastructural point of view. **Pigment Cell Research**. v.10, p.271-287.
- TREVISAN, P., PEDERZOLI, A., BAROZZI, G. 1991. Pigmentary system of the adults alpine salamander *Salamandra atra atra*. **Pigment Cell Research**. v.4, p.151-157.
- TSUJII, T.; SENO, S. 1990. Melano-macrophage centres in the aglomerular kidney of the sea horse (teleosts): morphologic studies on its formation and possible function. **The Anatomical Record**. v.226, p.460-470.
- UCCI, A.A. 1982. A fine-structural study of interstitial cell changes in the testes of *Necturus maculosus* during a portion of the annual cycle, and possible evidence for local feedback control by seminiferous epithelium. **American Journal of Anatomy**. v.165, n.1, p.27-38.
- WAKE, M.H. 1969. Evolutionary morphology of the caecilian urogenital system. I. The gonads and the fat bodies. **Journal of Morphology**. v. 126, n. 3, p. 291-331.

- WOLKE, R.E.; MURCHELANO, R.A.; DICKSTEIN, C.D.; GEORGE, C.J. 1985. Preliminary evaluation of the use of macrophage aggregates (MA) as fish health monitors. **Bulletin of environmental Contamination and Toxicology**. v.35, p.222-227.
- WOLKE, R.E. 1992. Piscine macrophage aggregates: A review. **Annual Review of Fish Diseases**. v.2, p.91-108.
- ZAGAL'SKAIA, E.O. 1994. The vascular melanocytes of the pia mater and mesentery of the small intestine in the frog: structure and functions. **Tsitologia**. v.36, p.796-801.
- ZAPATA, A.G., COOPER, E.L. 1990. **The Immune System: Comparative Histophysiology**. John Wiley & Sons. 334 pp
- ZAPATA, A.G., TORROBA, M., SACEDÓN, R., VARAS, A., VICENTE, A. 1996. Structure of the lymphoid organs of elasmobranchs. **Journal of Experimental Zoology**. v.275, p.125-143.
- ZUASTI, A.; JARRA, J.R.; FERRER, C.; SOLANO, F. 1989. Occurrence of melanin granules and melanossynthesis in the kidney of *Sparus auratus*. **Pigment Cell Research**. v.2, p.93-100.
- ZUASTI, A.; FERRER, C.; AROCA, P.; SOLANO, F. 1990. Distribution of extracutaneous melanin pigment in *Sparus auratus*, *Mugil cephalus* and *Dicetrachus labrax* (Pisces, Teleostei). **Pigment Cell Research**. v.3, p.126-131.
- ZUASTI, A., JIMÉNEZ-CERVANTES, C., GARCÍA-BORRÓN, J.C, FERRER, C. 1998. The melanogenic system of *Xenopus laevis*. **Archives Histology Cytology**. v.61, p.4, p.305-316.

2. TRABALHOS

Capítulo I

- **PIGMENTAÇÃO TESTICULAR NO ANFÍBIO *Physalaemus nattereri* (ANURA): OBSERVAÇÕES ANATÔMICAS SOBRE O SISTEMA PIGMENTAR EXTRACUTÂNEO**, submetido à Revista Brasileira de Zoologia.

CLASSIUS DE OLIVEIRA¹, RODRIGO ZIERI²

¹ Departamento de Biologia – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – UNESP, São José do Rio Preto – São Paulo, Brasil.

² Mestrando do Programa de Pós-graduação em Biologia Animal da UNESP – SJRP.

Palavras-chave: *Physalaemus nattereri*, Melanina, Melanócitos, Pigmento, Testículo.

Endereço para correspondência:

Departamento de Biologia – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – UNESP.

CEP: 15.040-000, São José do Rio Preto – São Paulo, Brasil.

Fax: (55-17) 221-2390.

E-mail: classius@bio.ibilce.unesp.br

RESUMO. O presente estudo foi realizado com o intuito de relatar a ocorrência e morfologia de células pigmentares viscerais constituintes do “sistema pigmentar extracutâneo” em *Physalaemus nattereri* (Steindachner, 1863) (Leptodactylidae). Foram utilizados dez exemplares machos para a análise macroscópica e obtenção de fragmentos testiculares incluídos em resina e corados com H/E. Os anuros, dentre outros animais exotérmicos, possuem células especiais, os melanócitos, que se caracteriza por intensa pigmentação e sintetiza melanina, além de melanomacrófagos, que se caracteriza por atividade fagocítica e muitas vezes apresentam intensa pigmentação. A nomenclatura destas células não é consensual e, por isso, várias denominações são apresentadas, principalmente nos seguintes órgãos: fígado (como sinônimo de células de Kupffer), rins, baço e menos freqüentemente em outras localizações, com os termos - células pigmentares, células pigmentares extracutâneas, macrófagos pigmentados, melanomacrófagos, melanófagos, melanóforos e melanócitos. Para os anuros os estudos são recentes e relatam células pigmentares em poucas espécies. Em *Physalaemus nattereri* e alguns anuros, os pigmentos melânicos são encontrados, além da cútis, em outros órgãos constituindo um sistema pigmentar extracutâneo, com diferentes ocorrências, tipos e quantidade em distintas espécies. Associados ao aparelho reprodutor de *P. nattereri*, os melanócitos foram observados nas gônadas, na albugínea e no interstício, especialmente associado com vasos sangüíneos. A notória presença de numerosas células com pigmento distribuídas no testículo confere uma coloração que varia do preto mesclado com branco ao preto intenso. Trata-se de uma rara peculiaridade e não há informações sobre seu significado funcional ou valor biológico.

PALAVRAS CHAVE. Leptodactylidae, Melanina, Melanócitos, Pigmento, Testículo.

ABSTRACT. Testicular pigmentation in *Physalaemus nattereri* (Steindachner) (Amphibia, Anura) with anatomical observations on the extracutaneous pigmentary system. The testes in the anurans are paired ovoid organs constituted by seminiferous structures surrounded by the fibrous connective tissue, commonly unprovided of pigments. This study tried to analyze the morphological characteristics of rare and conspicuous pigment-containing cells and their relationship with other structures. The pigment cells are variously and indistinctly also termed Kupffer cells in the liver, pigment cells, extracutaneous pigment cells, pigmented macrophages, melanomacrophages, melanophage, melanophores and melanocytes in the liver, spleen and kidney and other visceral structures of exothermic vertebrates. Ten male samples of *Physalaemus nattereri* (Steindachner, 1863) (Leptodactylidae) were used. After macroscopic analyses, the testicular fragments were submitted to the histological routine, fixed with karnovisky, embedded Historesin and coloration with Haematoxylin/Eosin. A rare peculiarity was the presence of numerous pigment-containing cells (melanocytes) randomly distributed in the albuginea tunic and testicular interstitium, giving the testes a dark brown coloration. This unusual characteristic has been rarely described and in other lower vertebrates, the pigment cells can be found in different organs, constituting an extracutaneous pigmentary system of unknown function. Further, it was identified a conspicuous variation, as to presence and distribution pattern due to possible species-specific aspects. However, histologically there is no difference in the germ epithelium arrangement. Between the seminiferous locules, there is an inter-locular tissue composed by Leydig interstitial cells, fibroblasts, efferent ductules, melanocytes and blood vessels. This inter-locular tissue is relatively scarce, presenting melanocytes in all specimens analyzed intimate associated with blood vessels. They are irregular cells with numerous melanosomes and long cytoplasmic processes.

KEY WORDS. Leptodactylidae, Melanin, Melanocytes, Pigment, Testis.

INTRODUÇÃO

Nos anfíbios anuros, os testículos são órgãos ovóides pares geralmente esbranquiçados ou branco-leitosos constituídos por estruturas seminíferas circundadas pelo estroma de sustentação com distintas células somáticas e, externamente, por tecido conjuntivo fibroso constituindo a túnica albugínea. Quanto à arquitetura histológica dos elementos seminíferos, de modo geral, para os anfíbios o epitélio germinativo pode se organizar em lóculos seminíferos nos Apoda (WAKE, 1969) e Anura (DUELLMAN & TRUEB, 1994) ou em ampolas seminíferas ou lóbulos testiculares nos Urodela.

Existem poucos trabalhos sobre os órgãos e estruturas do aparelho reprodutor masculino dos anuros, especialmente nos animais de regiões neotropicais como o Brasil. Além disso, mesmo não havendo um número elevado de anfíbios, neste táxon ocorrem estratégias reprodutivas muito diversificadas (DUELLMAN & TRUEB, 1994), o que poderia estar relacionado com variações morfológicas ou funcionais nos órgãos reprodutivos ainda desconhecidas.

Segundo alguns autores, células pigmentares contendo melanina são encontradas, além da cutis, em diversas vísceras de répteis e anfíbios como no fígado, rins, baço, peritônio, orelha, encéfalo, ao redor de nervos e vasos sangüíneos, com diferentes ocorrências, tipos e quantidade em diferentes espécies (AOKI *et al.*, 1969; GEREMIA *et al.*, 1984; GOPALAKRISHNAKONE, 1986; CICERO *et al.*, 1989; PEDERZOLI & TREVISAN, 1990; TREVISAN *et al.*, 1991; ZAGAL'SKAIA, 1994; SICHEL *et al.*, 1997; AKULENKO, 1998; ZUASTI *et al.*, 1998; CHRISTIANSEN *et al.*, 1996; RUND *et al.*, 1998; JHONSON *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.* 2002 e 2003). Estas células podem ser agrupadas constituindo um sistema melanogênico cuja função não está devidamente esclarecida (ZUASTI *et al.*, 1998). Outro aspecto contraditório refere-se à nomenclatura destas células, que não é consensual e, por isso, várias denominações são apresentadas, principalmente nos órgãos: fígado (como sinônimo das células de Kupffer), rins, baço e menos frequentemente em algumas outras localizações, com os termos - células

pigmentares, células pigmentares extracutâneas, células pigmentadas tipo macrófagos, macrófagos pigmentados, melanomacrófagos, melanóforos e melanócitos.

Para os anfíbios, os estudos relativos aos melanócitos viscerais e melanomacrófagos são mais recentes, escassos e referentes a poucas espécies (*Physalaemus fuscomaculatus* - AOKI, 1969, *Rana esculenta* - CICERO *et al.*, 1989; *Salamander atra aurorae* - PEDERZOLI & TREVISAN, 1990; *Salamandra atra atra* - TREVISAN *et al.*, 1991; *Rana ridibunda* - AKULENKO, 1998; *Xenopus laevis* - ZUASTI *et al.*, 1998; *Physalaemus cuvieri* - OLIVEIRA *et al.* 2002 e 2003).

Assim, neste estudo foi proposta a análise desta incomum característica morfológica dos testículos do anuro *Physalaemus nattereri* (Steindachner, 1863) descrevendo aspectos anatômicos e histológicos do testículo, especialmente do tecido intersticial testicular, que contém as células pigmentares desse sistema melanogênico, especificamente o sistema pigmentar extracutâneo.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados dez machos adultos de *Physalaemus nattereri* (Anura, Leptodactylidae), coletados em lagoas temporárias (21° 04'40"S; 49° 32'23"W) na cidade de Nova Itapirema, distrito de Nova Aliança (São Paulo, Brasil), capturados quando estavam em época de atividade reprodutiva. Os indivíduos foram anestesiados com éter e submetidos aos procedimentos para estudos morfológicos. Os animais foram abertos através de incisão mediana desde a cloaca até a altura da cintura dos membros dianteiros, expondo os órgãos reprodutores para as análises macroscópicas e fotodocumentação em microscópio estereoscópico acoplado com sistema de captura de imagens. Após a redução do testículo a pequenos fragmentos, o material foi imediatamente fixado por 24 h em solução de karnovsky (paraformaldeído 4% e glutaraldeído 2% em tampão fosfato Sorensen 0.1M, pH 7.3). Em seguida, o material foi encaminhado à rotina histológica (RIBEIRO & LIMA 2000) para ser desidratado em álcool, diafanizado em xilol e incluído em resina. Cortes de 2 µm foram corados

com Hematoxilina/Eosina e destinados à análise histológica. Para montagem total do peritônio visceral, um simples recorte da camada foi estendido sob a lâmina contendo solução fisiológica e fixador, analisado ao microscópio de luz.

Cinco exemplares de cada uma das espécies *Hyla nana* (Boulenger, 1889), *H. sanborni* (Schmidt, 1944), *Scinax similis* (Cochran, 1952) e *S. fuscovarius* (Lutz, 1925) e *Physalaemus fuscomaculatus*, provenientes do mesmo local, também foram submetidos à dissecação anatômica para análise da presença e distribuição dos melanócitos viscerais. Desse material foi obtida uma caracterização preliminar que forneceu importantes dados apropriadamente explorados na discussão. A descrição dessas novas informações será aprofundada nos estudos em andamento e então complementada com o objetivo de propiciar a comparação detalhada entre cada espécie e estes gêneros *Hyla* (Laurent 1768), *Scinax* (Wagler, 1830) e *Physalaemus* (Fitzinger, 1826).

RESULTADOS

Referente ao aspecto macroscópico das gônadas de *Physalaemus nattereri* e dos corpos adiposos abdominais à elas associados, no que concerne à cor, forma e tamanho, observa-se conspícuas variações anatômicas. Os testículos, direito e esquerdo, apresentam pequenas assimetrias que são nítidas e se manifestam na localização, dispostos ventralmente aos rins em alturas diferentes, e no tamanho, geralmente uma das gônadas é maior que a outra (Figura 1A). Os corpos adiposos abdominais podem estar extraordinariamente reduzidos (Figura 1B) ou muito desenvolvidos (Figura 1E) refletindo uma alteração anatômica que varia de acordo com o estado funcional de acúmulo lipídico.

O que é notório e foi especialmente abordado nessa descrição é a marcante presença da pigmentação visceral, principalmente àquela associada aos órgãos do aparelho reprodutor, mas que também ocorre em várias outras vísceras e estruturas como a face dorsal dos rins (Figura 1A), corpos adiposos abdominais e mesórquio (Figura 1B), peritônio e vasos

sangüíneos parietais (Figura 1C), baço (Figura 1D), mesentério e vasos sangüíneos urogenitais (Figuras 1D e 1E), dentre vários outros locais.

Revestindo o testículo encontra-se uma fina cápsula de tecido conjuntivo, a túnica albugínea, e por transparência desta, observa-se a pigmentação testicular conferindo distintos padrões de coloração quando diferentes indivíduos são analisados (dois exemplares foram comparados nas Figuras 1D e 1E). Um indivíduo apresenta o testículo com o parênquima de cor branco-leitosa nos lóculos seminíferos, estes por sua vez, são muito bem delimitados pelo tecido pigmentar que o circunda na área inter-locular, conferindo o padrão preto mesclado com branco (Figura 1D). Os corpos adiposos associados às gônadas se apresentaram muito reduzidos, de cor amarela intensa, mas muito hialinos. Em outro indivíduo, as características anatômicas são essencialmente opostas, com os testículos intensamente pigmentados, aparentemente com maior quantidade de melanócitos, mas com os lóculos hialinos. Os corpos adiposos estão muito desenvolvidos e de cor amarela relativamente opaca (Figura 1E). Os vasos sangüíneos que transitam pela cápsula testicular, após curto trajeto, penetram o órgão e estabelecem a vascularização do tecido inter-locular e do parênquima, no qual estão respectivamente o interstício pigmentado e o epitélio germinativo.

Delimitados por tecido conjuntivo frouxo, os lóculos constituem unidades morfológicas, ou seja, os elementos seminíferos das gônadas. Histologicamente não foram observadas possíveis diferenças quanto ao arranjo do epitélio germinativo ao analisar diferentes indivíduos com distintos padrões de coloração testicular (Figuras 2A e 2B). Em *Physalaemus nattereri*, o tecido inter-locular é relativamente escasso e apresenta uma intensa pigmentação, que também ocorre na túnica albugínea, o que confere aos testículos colorações variando do preto intenso ao preto mesclado com branco.

Os pigmentos que estão presentes nessas células pigmentares possivelmente são de natureza melânica e a nomenclatura adotada, ao menos a que parece mais apropriada, é melanócito, sendo suas inclusões de melanina armazenadas em melanossomos. Esses

melanócitos têm aspecto dendrítico e os pigmentos são observados nos prolongamentos, dispersos ou agregados, como se nota na célula do mesentério gonadal repleta de melanossomos dispersos (Figura 2C).

Entre as unidades seminíferas, está o tecido interloocular formado por células intersticiais de Leydig, fibroblastos, alguns ductulos eferentes e inúmeros melanócitos contendo pigmentos intimamente associados aos vasos sangüíneos, estes últimos foram bem observados em microscopia de contraste de fase (Figuras 2D e 2E). A morfologia da célula, identificada em preparados de montagem total do mesentério e em cortes histológicos observados no microscópio em contraste de fase, permite caracterizá-la como uma célula muito grande e irregular, apresentando longos prolongamentos citoplasmáticos repletos de grânulos de melanina, formando os melanossomos, que conferem a coloração dos testículos bem como a típica pigmentação de várias outras estruturas.

DISCUSSÃO

A pigmentação marrom escura do testículo de *Physalaemus nattereri* é uma peculiaridade que ocorre devido à presença de numerosas células pigmentadas, que podem ser denominadas de melanócitos. Esta incomum característica pigmentar foi descrita apenas nas espécies: *Physalaemus fuscomaculatus* (AOKI *et al.*, 1969), *Bombina bombina* (GOLLMANN *et al.*, 1993), *Xenopus laevis* (ZUASTI *et al.*, 1998) e *Physalaemus cuvieri* (OLIVEIRA *et al.*, 2002 e 2003). Na espécie *X. laevis* (ZUASTI *et al.*, 1998) as células pigmentadas também podem ser observadas em outros órgãos constituindo um sistema pigmentar.

Histologicamente, os testículos são constituídos por uma rede de estruturas seminíferas convolutas circundadas externamente pela túnica albugínea. Entre os elementos seminíferos está presente o tecido intersticial com vasos, nervos, células de Leydig e outros elementos do tecido conjuntivo (LOFTS, 1974; ROMER & PARSONS, 1985; DUELLMAN & TRUEB, 1994; HILDEBRAND, 1995).

De modo geral não se constata a descrição de células pigmentares nesses órgãos, mas neste estudo constatou-se uma íntima relação dos melanócitos com o sistema vascular de diversos órgãos, incluindo as gônadas. Estas células são constituintes do próprio tecido conjuntivo do órgão (cápsula e interstício) ou de tecidos associados aos mesmos (túnicas adventícias ou membranas serosas).

De modo similar em algumas espécies pertencentes a outros grupos taxonômicos os melanócitos podem se associar ao aparelho reprodutor, sendo observados nas gônadas, em geral na cápsula (ELLIS *et al.*, 1976), ao redor dos vasos sangüíneos, no interstício ou próximos às células germinativas femininas, especialmente ovócitos em degeneração (RAVAGLIA & MEGGESE, 1995). Embora em alguns estudos se afirme que estas últimas são células características dos tecidos de peixes, vários pesquisadores já demonstram que estas também ocorrem, e abundantemente, em diversos órgãos e tecidos de muitos anfíbios e répteis.

A presença, a distribuição e a quantidade dos tipos celulares viscerais contendo pigmentos são muito variáveis e estão associados com diversos órgãos e estruturas manifestando evidentes variações anatômicas interespecíficas e interindividuais. De qualquer modo foi constatado que os melanócitos contendo pigmentos melânicos são encontrados, além da cutis, em outros órgãos constituindo o Sistema Pigmentar Extracutâneo que juntamente com outros tipos celulares constituem o Sistema Melanogênico, terminologia considerada apropriada para abranger estas células e tecidos formados pela aglomeração de células pigmentares. Os melanócitos são células grandes e irregulares, com citoplasma abundante e intensamente pigmentado. Também são comumente descritos como “células pigmentadas tipo macrófagos” (MICALE & PERDICHIZZI, 1990) ou “macrófagos pigmentados” (MANERA *et al.*, 2000).

Simultaneamente em outras espécies analisadas, *Hyla nana* e *H. sanborni*, verificou-se que há pouquíssimos melanócitos nas estruturas urogenitais (face dorsal dos rins, mesórquio, corpos adiposos e na cápsula testicular) e quando presentes, a quantidade destas células é muito baixa e de fácil enumeração embora ocorram em maior quantidade em outros sistemas

orgânicos. Em *Scinax similis* e *S. fuscovarius* também estão presentes em vários órgãos e membranas da cavidade abdominotorácica de todos os sistemas orgânicos, sendo a população celular também variável entre as estruturas. No aparelho urogenital, as células pigmentares estão presentes no mesórquio e na periferia da veia renal que transita na face dorsal dos rins, mas não foram encontradas nos testículos ou nos corpos adiposos. Em todos estes Hilídeos a presença dessas células é muito menor ao compará-los com as duas espécies do gênero *Physalaemus* em estudo (Leptodactilídeos). Nos exemplares de *P. nattereri* e *P. fuscomaculatus*, detectou-se grande número de melanócitos na maioria das estruturas. Em *P. nattereri* a distribuição das células ocorre de forma homogênea, variando em quantidade entre os indivíduos. Em *P. fuscomaculatus* foi observado a ocorrência de pequenas áreas e até mesmo a metade anterior de algumas gônadas desprovidas de pigmentação. Apesar da variação na distribuição e quantidade dos melanócitos, há indícios de que seria possível estabelecer um padrão do sistema pigmentar extracutâneo para ambas as espécies que também possibilitaria identificá-las com relativa segurança.

Em vários locais estas células apresentam aspecto dendrítico e são facilmente observadas, *in situ* a olho desarmado, o que é possível devido à presença dos muitos prolongamentos citoplasmáticos repletos de pigmentos. Às vezes se apresentam com aspecto puntiforme quando não se observa esses prolongamentos devido ao deslocamento dos pigmentos, assim o centro da célula torna-se com coloração mais intensa. Isso confere aos melanócitos uma semelhança morfológica com os melanóforos da cútis, mas funcionalmente não há qualquer evidência.

Uma aparente relação que pode ser atribuída é quanto à quantidade de melanócitos que aumenta proporcionalmente naquelas espécies que também apresentam a cútis com mais cromatóforos, assim aumentam os melanócitos nas espécies analisadas pertencentes aos gêneros *Hyla*, *Scinax* e *Physalaemus*, nessa sequência. Os melanócitos, ainda podem se reunir com outros tipos celulares formando acúmulos conspícuos, de coloração ainda mais variada por

apresentarem outros pigmentos que os tornam iridescentes. Essas propriedades e características estruturais serão abordadas em estudos posteriores.

AGRADECIMENTOS

A FAPESP pelo auxílio à pesquisa - processo nº . 02/08016-9.

A CAPES pela concessão da bolsa de Mestrado para Rodrigo Zieri.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKULENKO, N.M. 1998. Topography and structure of the pigment cell aggregation in the liver of the frog (*Rana ridibunda*). **Vestnik Zoologii**, Moscow, **32** (3): 49-53.
- AOKI, A.; R. VITALE-CALPE & A. PISANO. 1969. The testicular interstitial tissue of the amphibian *Physalaemus fuscomaculatus*. **Zeitschrift fur Zellforschung und Mikroskopische Anatomie**, New York, **98**: 9-16.
- CHRISTIANSEN, J.L.; J.M. GRZYBOWSKI & R.M. KODAMA. 1996. Melanomacrophage aggregations and their age relationships in the yellow mud turtle, *Kinosternon flavescens* (Kinosternidae). **Pigment Cell Research**, Copenhagen, **9** (4): 185-190.
- CICERO, R.; A. MALLARDI; I. MAIDA; A. GALLONE & G. PINTUCCI. 1989. Melanogenesis in the pigment cells of *Rana esculenta* L. liver: evidence for tyrosinase like activity in the melanosome protein fraction. **Pigment Cell Research**, Copenhagen, **2**: 100-108.
- DUELLMAN, W.E. & L. TRUEB. 1994. **Biology of amphibians**. New York, McGraw-Hill, 670p.
- ELLIS, A.E.; A.L.S. MUNROE & R.J. ROBERTS. 1976. Defence mechanisms in fish. I. A study of the phagocytic system and the fate of intraperitoneally injected particulate material in the plaice (*Pleuronectes platessa* L.). **Journal of Fish Biology**, London, **8**: 67-78.
- GEREMIA, E.; C. CORSARO; R. BONOMO; R. GIARDINELLI; P. PAPPALARDO; A. VANELLA & G. SICHEL. 1984. Eumelanins as free radicals trap and superoxide dismutase activities in

- Amphibia. **Comparative biochemistry and physiology b-biochemistry & molecular biology**, Oxford, **79** (1): 67-69.
- GOLLMANN, G.; L.J. BORKIN & P. ROTH. 1993. Genic and morphological variation in the fire-bellied toad, *Bombina bombina* (Anura, Discoglossidae). **Zoologische Jahrbuecher Abteilung Fuer Systematik Oekologie und Geographie Der Tiere**, Jena, **120**: 129-136.
- GOPALAKRISHNAKONE, P. 1986. The structure of the pigment cells in the turtle *Trionyx sinensis*. **Archivum Histologicum Japonicum**, Niigata, **49**: 421-435.
- HILDEBRAND, M. 1995. **Análise da estrutura dos vertebrados**. São Paulo, Atheneu, 700p.
- JOHNSON, J.C.; T. SCHWIESOW; A.K. EKWALL & J.L. CHRISTIANSEN. 1999. Reptilian melanomacrophages function under conditions of hypothermia: Observations on phagocytic behavior. **Pigment Cell Research**, Copenhagen, **12** (6): 376-382.
- LOFTS, B. 1974. Reproduction, p.107-218. *In*: B. LOFTS (Ed). **Physiology of the amphibians**. New York, Academic Press.
- MANERA, M.; R. SERRA; G. ISANI & E. CARPENÉ. 2000. Macrophage aggregates in gilthead sea bream fed copper, iron and zinc enriched diets. **Journal of Fish Biology**, London, **57**: 457-465.
- MICALE, V. & F. PERDICHIZZI. 1990. A quantitative and histochemical study on melanomacrophage centres in the spleen of the teleost fish *Diplodus annularis* L. **Journal of Fish Biology**, London, **37** (2): 191-197.
- OLIVEIRA, C.; C. ZANETONI & R. ZIERI. 2002. Morphological observations on the testes of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia, Anura). **Revista Chilena de Anatomia**, Temuco, **20** (3): 263-268.
- OLIVEIRA, C.; A.C. SANT'ANNA; P.M. OMENA; L.R.S. SANTOS & R. ZIERI. 2003. Morphological considerations on the seminiferous structures and testes of anuran amphibians: *Bufo crucifer*, *Physalaemus cuvieri* e *Scinax fuscovarius*. **Biociências**, Porto Alegre, **11** (1): 39-46.

- PEDERZOLI, A. & P. TREVISAN. 1990. Pigmentary system of the adult alpine *Salamander atra aurorae*. **Pigment Cell Research**, Copenhagen, **3**: 80-89.
- RAVAGLIA, M.A. & M.C. MAGGESE. 1995. Melano-macrophage centres in the gonads of swamp eel, *Synbranchus marmoratus* Bloch 1795 (Pisces, Synbranchidae): histological and histochemical characterization. **Journal of Fish Diseases**, Oxford, **18**: 117-125.
- RIBEIRO, M.G. & S.R. LIMA. 2000. **Iniciação às técnicas de preparação de material para estudo e pesquisa em morfologia**. Belo Horizonte, Segrac Editora, 89p.
- ROMER, A.S. & T.S. PARSONS. 1985. **Anatomia comparada dos vertebrados**. São Paulo, Atheneu, 559p.
- RUND, C.R.; J.L. CHRISTIANSEN & J.C. JOHNSON. 1998. In vitro culture of melanomacrophages from the spleen and liver of turtles: Comments on melanomacrophage morphology. **Pigment Cell Research**, Copenhagen, **11** (2): 114-119.
- SICHEL, G.; M. SCALIA; F. MONDIO & C. CORSARO. 1997. The amphibian Kupffer cells build and demolish melanosomes: an ultrastructural point of view. **Pigment Cell Research**, Copenhagen, **10**: 271-287.
- TREVISAN, P.; A. PEDERZOLI & G. BAROZZI. 1991. Pigmentary system of the adults alpine salamander *Salamandra atra atra*. **Pigment Cell Research**, Copenhagen, **4**: 151-157.
- WAKE, M.H. 1969. Evolutionary morphology of the caecilian urogenital system. I. The gonads and the fat bodies. **Journal of Morphology**, New York, **126**: 291-331.
- ZAGAL'SKAIA, E.O. 1994. The vascular melanocytes of the pia mater and mesentery of the small intestine in the frog: structure and functions. **Tsitologiya**, Moscow, **36** (B): 796-801.
- ZUASTI, A.; C. JIMÉNEZ-CERVANTES, J.C. GARCÍA-BORRÓN & C. FERRER. 1998. The melanogenic system of *Xenopus laevis*. **Archives of Histology and Cytology**, Niigata, **61**: 305-316.

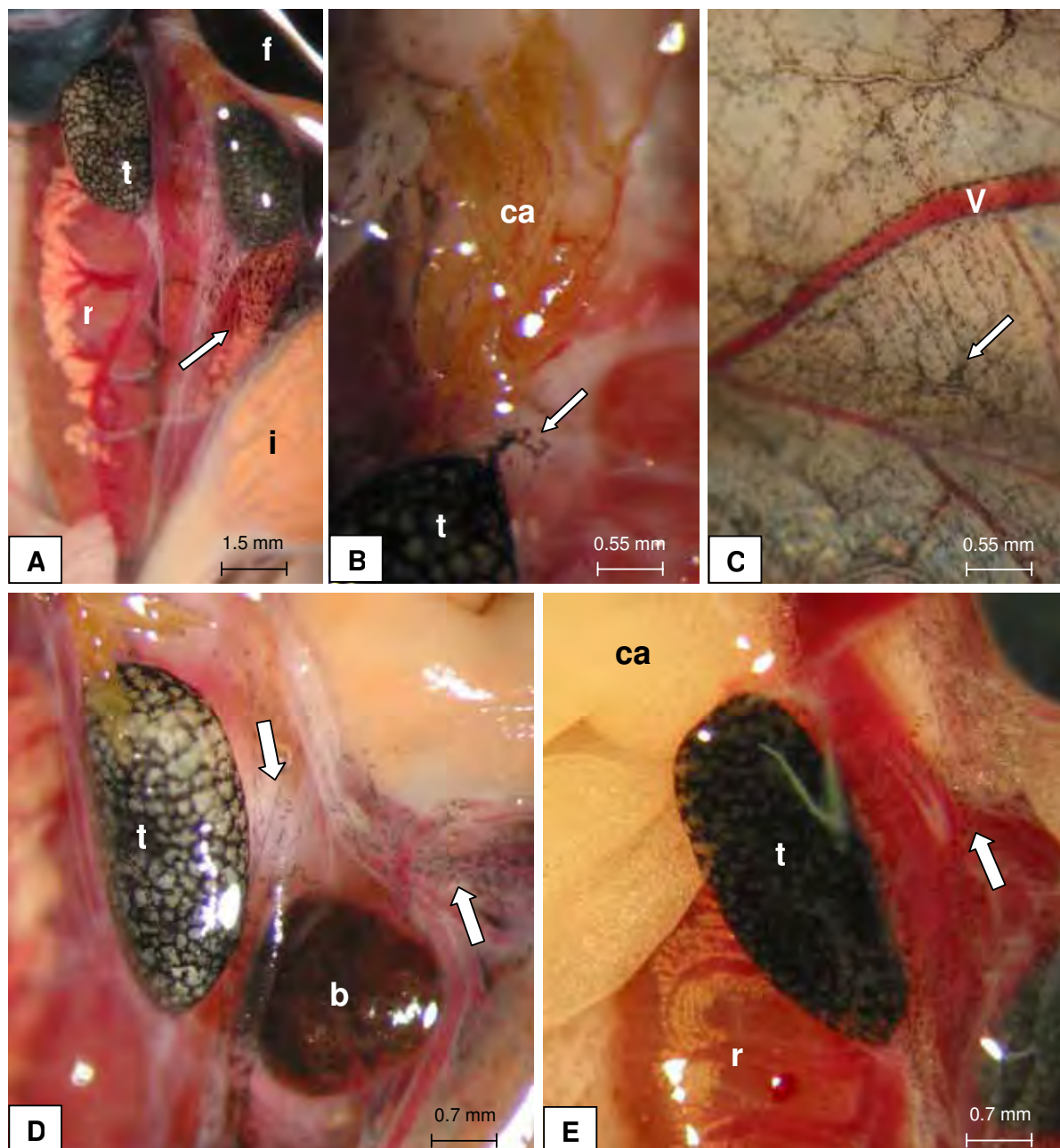


Figura 1. Indicações - melanócitos (setas); b (baço); ca (corpos adiposos); e (estômago); f (fígado); i (intestino); r (rim); t (testículo); v (vaso sanguíneo). A - Vista geral dos testículos de *Physalaemus nattereri* evidenciando variações anatômicas testiculares intraindividuais. B - Detalhe dos corpos adiposos abdominais pouco desenvolvidos. C - Peritônio parietal com intensa quantidade de melanócitos e vasos sanguíneos. D e E - Aparelho reprodutor de dois animais evidenciando diferenças inter-individuais na pigmentação testicular e nos corpos adiposos.

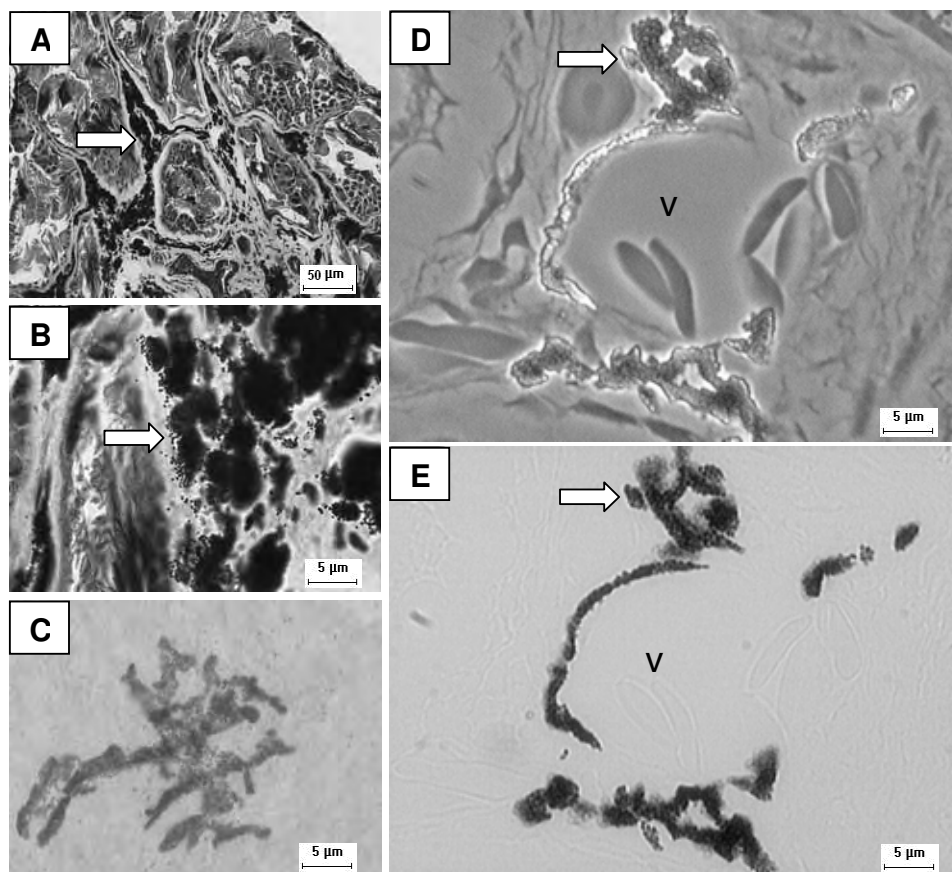


Figura 2. A e B - Secção histológica do testículo de *Physalaemus nattereri*, H/E: células pigmentares repletas de grânulos, na área Interocular (seta). C - Montagem total em peritônio: prolongamentos celulares repletos de pigmentos citoplasmáticos. D e E - Contraste de fase destacando as células (seta) intimamente associadas com vaso sanguíneo (v) na área interocular.

Capítulo II

- **MELANÓCITOS NOS TESTÍCULOS DE *Physalaemus nattereri* E *Physalaemus fuscomaculatus* (ANURA, LEPTODACTYLIDAE): ASPECTOS HISTOLÓGICO E ULTRA-ESTRUTURAL**

RODRIGO ZIERI¹ e CLASSIUS DE OLIVEIRA²

¹ Mestrando do Programa de Pós-graduação em Biologia Animal da UNESP – Universidade Estadual Paulista – São José do Rio Preto.

² Departamento de Biologia – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – UNESP - , Universidade Estadual Paulista – São José do Rio Preto – São Paulo, Brasil.

Palavras-chave: *Physalaemus nattereri*, *Physalaemus fuscomaculatus*, Melanócitos, Pigmento.

Endereço para correspondência:

Departamento de Biologia – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – UNESP.

CEP: 15.040-000, São José do Rio Preto – São Paulo, Brasil.

Fax: (55-17) 221-2390.

E-mail: classius@ibilce.unesp.br

RESUMO. Os vertebrados ectotérmicos apresentam um desenvolvido sistema de células com pigmentos melânicos em seu citoplasma, localizadas em diversos órgãos (fígado, baço, pulmões, coração, timo e gônadas) e tecidos (tecido conjuntivo ao redor dos vasos sanguíneos e meninges), formando assim um sistema pigmentar extracutâneo. Apresentou-se neste estudo uma descrição histológica e ultra-estrutural das células pigmentadas no testículo dos anuros *Physalaemus nattereri* e *P. fuscumaculatus*. Foram utilizados dez machos adultos de cada espécie, coletados em Nova Itapirema, distrito de Nova Aliança – SP, e processados para análises em microscopia de luz e microscopia eletrônica de transmissão. A intensa pigmentação exibida nos testículos é conferida pela grande quantidade de tipos celulares de grande magnitude, contendo inúmeros grânulos de coloração marrom e longos processos citoplasmáticos. Essas células são estruturalmente semelhantes aos melanócitos, as quais se caracterizam pela síntese e acúmulo de grande quantidade de pigmentos melânicos no interior de corpúsculos elétron-densos contendo melanina, os melanossomos. Anatomicamente não há qualquer indício de que exista diferença entre os melanócitos testiculares com àqueles encontrados em várias outras membranas conjuntivas associadas as demais vísceras e estruturas. Pelas características estruturais destas células, não foi possível estabelecer um protocolo preciso para quantificar e assim estabelecer possíveis diferenças entre as duas espécies. Aparentemente a presença e distribuição são semelhantes, o que pode estar relacionado ao íntimo grau de afinidade filogenética entre estas espécies.

ABSTRACT. MELANOCYTES IN THE TESTES OF *Physalaemus nattereri* E *Physalaemus fuscomaculatus* (ANURA, LEPTODACTYLIDAE): HISTOLOGICAL AND ULTRASTRUCTURAL ASPECTS.

The ectothermic vertebrates have a developed system of melanin-containing cells, localized in several organs (liver, spleen, lungs, heart, thymus and gonads) and tissues (meninges and conjunctive tissue surrounding blood vessels), thus forming an extracutaneous pigmentary system. The present study was undertaken to describe the structure and ultrastructure of pigmented cells of anurans *Physalaemus nattereri* and *P. fuscomaculatus* testis. Ten males adults of each species were used. The animals were collected in Nova Itapirema, district of Nova Aliança - SP, and processed for analyses in light and transmission electron microscopy. The intense pigmentation observed in the testis is due to great amount of cellular types containing granules of brown coloration and long cytoplasmic processes. These cells are structurally similar to melanocytes, which are characterized by the synthesis and accumulation of great amount of melanin pigment inside of melanosomes. Structurally, there no indication that difference exists among melanocytes in the testis with those found in other organs. For the structural characteristics of these cells, it was not possible to establish a protocol to quantify and establish possible differences between these species. Seemingly the presence and distribution are similar, and can be related to the high degree of filogenetic proximity between these species.

INTRODUÇÃO

Os vertebrados ectotérmicos apresentam um desenvolvido sistema de células com pigmentos melânicos em seu citoplasma, localizadas em diversos órgãos (fígado, baço, pulmões, coração, timo e gônadas) e estruturas (tecido conjuntivo ao redor dos vasos sanguíneos e meninges), formando assim um sistema pigmentar extracutâneo (GALLONE *et al.*, 2002).

Nesses animais têm sido descritas microscopicamente, na epiderme e em diversos órgãos, células semelhantes à melanócitos (AGIUS e AGBEDE, 1984; ZUAST, 1998), provenientes da crista neural ectodérmica (SICHEL *et al.*, 1997) que produzem e armazenam melanina no interior de estruturas esféricas ou ovóides denominadas melanossomos (AGIUS e ROBERTS, 2003), juntamente com tipos celulares, caracterizados por uma atividade fagocítica, ultra-estruturalmente semelhantes aos macrófagos (AGIUS, 1980), originados de células tronco hematopoéticas (SICHEL, 1997), que freqüentemente se agregam formando distintos nódulos pigmentados denominados centro de melanomacrófagos (AGIUS, 1981).

Os centros de melanomacrófagos são encontrados freqüentemente em órgãos hematopoéticos de vertebrados “inferiores” (AGIUS, 1980; AGIUS e AGBEDE, 1984) e apresentam diferentes tipos de grânulos contidos no citoplasma, os quais podem indicar substâncias químicas diversificadas, como melanina, hemosiderina e lipofuscina, derivados da degradação de material celular fagocitado (AGIUS e AGBEDE, 1984; HERRAEZ e ZAPATA, 1991).

Em anfíbios, células pigmentadas aparecem no tegumento e nos pulmões como melanócitos típicos e, no baço e fígado como centro de melanomacrófagos (ZUAST *et al.*, 1998). Os melanomacrófagos residentes no fígado de anfíbios também são conhecidos como células de Kupffer (SICHEL *et al.*, 1997; ZUAST, 1998; PRELOVSEK e BULOG, 2003).

Em *Physalaemus fuscomaculatus* (AOKI, 1969) *P. cuvieri* (OLIVEIRA *et al.*, 2002 e 2003) e *P. nattereri* (ZIERI e OLIVEIRA, 2005) foi constatado um grande número de células

pigmentadas semelhantes à melanócitos no interstício testicular. Estes trabalhos relatam a ocorrência e apresentam uma sucinta descrição morfológica destes tipos celulares.

Devido à escassez de estudos referentes ao sistema pigmentar extracutâneo de anfíbios (*Physalaemus fuscomaculatus* - AOKI, 1969; *Rana esculenta* - CICERO *et al.*, 1989; *Salamander atra aurorae* - PEDERZOLI e TREVISAN, 1990; *Salamandra atra atra* - TREVISAN *et al.*, 1991; *Rana ridibunda* - AKULENKO, 1998; *Xenopus laevis* - ZUASTI *et al.*, 1998; *Physalaemus cuvieri* - OLIVEIRA *et al.* 2002 e 2003 e *P. nattereri* - ZIERI e OLIVEIRA, 2005), apresentou-se neste estudo uma descrição histológica e ultra-estrutural do melanócito no testículo dos anuros *Physalaemus nattereri* (Steindachner, 1963) e *P. fuscomaculatus* (Steindachner, 1964).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados dez machos adultos de *Physalaemus nattereri* e dez de *P. fuscomaculatus* (Anura, Leptodactylidae), coletados em lagoas temporárias (21° 04' 40" S; 49° 32' 23" W) na cidade de Nova Itapirema, distrito de Nova Aliança, Estado de São Paulo, Brasil. As coletas foram realizadas no início da estação chuvosa entre os meses de setembro e outubro de 2003. Os espécimes fixados e mantidos em formalina serão depositados na coleção DZSJRP, Departamento de Zoologia e Botânica, Universidade Estadual Paulista, Estado de São Paulo, Brasil.

Microscopia de Luz

Os espécimes foram anestesiados com éter etílico e tiveram suas gônadas removidas por meio de incisão mediana na parede ventral. Os testículos foram imersos em solução fixadora Karnovsky (paraformaldeído a 5% e gluralardeído a 2,5% em tampão fostato Sörensen 0,1M, pH 7,2), desidratados em uma série alcoólica e incluídos em historresina (Leica-historesin

embedding kit). Secções de 2 µm de espessura foram coradas com azul de toluidina 1% e observadas no microscópio Olympus BX60.

Microscopia Eletrônica de Transmissão

As amostras foram fixadas em solução de glutaraldeído 3% e ácido tânico 0,25% em tampão Milloning, pH 7,3, durante 2 horas à temperatura ambiente, e lavados em tampão. Os fragmentos foram pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio a 1%, no mesmo tampão, por 1 hora, lavados brevemente em solução tamponada, desidratados em acetona e incluídos em araldite (COTTA-PEREIRA *et al.*, 1976).

Secções ultrafinas foram contrastadas pelo acetato de uranila a 2%, durante 20 minutos (WATSON, 1958) e pelo citrato de chumbo a 2% em solução de hidróxido de sódio 1N (VENABLE e COGGESHALL, 1965), durante 8 minutos, e analisadas no Microscópio Eletrônico de Transmissão Zeiss EM-900.

RESULTADOS

Os testículos de *P. nattereri* e *P. fuscomaculatus* são órgãos pares, ovóides medindo cerca de $4,82 \pm 0,78$ mm e $3,44 \pm 0,35$ mm de comprimento respectivamente. Uma característica marcante é a intensa pigmentação que ocorre nesta cápsula (Figs. 1A - B) e ao redor dos lóculos seminíferos, em íntima associação com as células intersticiais (Figs. 1C - D) e vasos sangüíneos (Fig. 1E) conferindo às gônadas uma coloração marrom escura em ambas as espécies.

A intensa pigmentação exibida nos testículos é conferida pela grande quantidade destes tipos celulares de grande magnitude, contendo inúmeros grânulos de coloração marrom e longos processos citoplasmáticos (Figs. 1D - E). Histologicamente não foi possível reconhecer

os limites de cada célula, uma vez que, estas são irregulares e apresentam uma extraordinária variação na forma.

A célula pigmentada quando analisada ao microscópio eletrônico, apresenta núcleo irregular e inúmeros prolongamentos citoplasmáticos com organelas pouco desenvolvidas. Nos estágios iniciais de maturação das suas inclusões de pigmento, a célula apresenta cromatina dispersa no núcleo, nucléolo evidente e pequena quantidade de vesículas contendo pigmento (Fig. 2A). A célula com inclusões bem definidas apresenta núcleo grande e irregular com a cromatina condensada na região periférica e citoplasma preenchido quase que em sua totalidade, por vacúolos de alta elétron-densidade (Fig. 2B). Estas células e seus prolongamentos, podem estar em íntimo contato com o mesmo tipo celular (Fig. 2B) ou próximas à fibroblastos (Figs. 2B, 2C e 2E), células de Leydig (Fig. 2C), células mióides e fibras colágenas (Fig. 2D). Eventualmente também se observa o íntimo contato (adesão focal) entre fibroblastos, próximos às células pigmentadas (Fig. 2E).

Os tipos celulares pigmentados são estruturalmente semelhantes aos melanócitos, os quais se caracterizam pela enorme quantidade de pigmentos melânicos, no interior de corpúsculos elétron-densos contendo melanina, os melanossomos, espalhados por todo o citoplasma celular.

Os melanossomos apresentam forma arredondada ou ovóide, variando o tamanho e o grau de melanização de acordo com a quantidade de pigmentos em seu interior, indicando estágios de diferenciação. No primeiro estágio, os premelanossomos apresentam estrutura fibrilar e baixa elétron-densidade (Fig. 2F). Posteriormente, os premelanossomos apresentam a região cortical com estruturas vesiculares elétron-lúcidas e a região central mais elétron-densa indicando processo de melanização (Figs. 2G-I), até alcançarem uma homogeneidade, no último estágio, com a organela repleta de melanina formando em grão maduro e muito bem definido (Fig. 2J).

DISCUSSÃO

Os ectotérmicos apresentam células com o citoplasma pigmentado, encontradas em diversos órgãos, constituindo o sistema pigmentar extracutâneo, de funções ainda pouco esclarecidas (ZUASTI *et al.*, 1998).

Essas células pigmentadas recebem várias denominações como melanóforos, melanócitos, melanomacrófagos, fagócito mononuclear contendo melanina, melanófago e em anfíbios (SICHEL *et al.*, 1997, ZUAST *et al.*, 1998 e PRELOVISEK e BULOG 2003) e répteis (CHRISTIANSEN *et al.*, 1996; RUND *et al.*, 1998; JOHNSON *et al.*, 1999) esses tipos celulares também são denominados células de Kupffer.

Morfologicamente essas células são semelhantes aos melanócitos (AGIUS, 1980; ZUASTI, 1990 e 1998) e aos macrófagos. Os macrófagos dos animais ectotérmicos apresentam o citoplasma repleto de melanina, sendo assim chamados melanomacrófagos (AGIUS, 1980 e 1984; MACCHI, 1992; MICALE e PATTI, 1993; MESSEGUER *et al.*, 1994). Os melanócitos são originados da crista neural e os melanomacrófagos são derivados de células tronco hematopoéticas (SICHEL *et al.*, 1997). Pelas características morfológicas utilizamos a denominação melanócito.

A intensa pigmentação testicular em *P. nattereri* e *P. fuscomaculatus* é evidenciada por tipos celulares que ultra-estruturalmente são semelhantes aos melanócitos, que estão presentes, além da pele (TREVISAN *et al.*, 1991) e diversas vísceras (GEREMIA *et al.*, 1984), na cápsula testicular e no tecido interocular em íntimo contato com as células intersticiais, como descrito em *P. fuscomaculatus* (AOKI *et al.*, 1969), *B. bombina* (GOLLMANN *et al.*, 1993), *P. cuvieri* (OLIVEIRA *et al.*, 2002 e 2003) e *P. nattereri* (ZIERI e OLIVEIRA, 2005).

Os melanócitos são células grandes e irregulares, com organelas pouco desenvolvidas, numerosos melanossomos e longos processos dendríticos (AOKI *et al.*, 1969). Nos testículos de *P. nattereri* e *P. fuscomaculatus*, os melanócitos contêm melanossomos de diferentes

tamanhos e graus de melanização, sugerindo que atividade melanogênica ocorre neste local, como descrito por Sichel *et al.* (1997) e Gallone *et al.* (2002) em *Rana esculenta*.

Em peixes, o processo melanossintético não é observado nos melanomacrófagos, indicando que a melanina contida no interior dessas células, é simplesmente derivada da fagocitose de melanossomos provenientes dos melanócitos (AGIUS e AGBEDE, 1984; HERRAEZ e ZAPATA, 1991; TSUJII e SENO, 1990; ZUASTI *et al.*, 1990). No entanto, melanossíntese tem sido observada nas células de Kupffer no fígado de anfíbios (CÍCERO *et al.*, 1989; SICHEL *et al.*, 1997) evidenciados pelos premelanossomos em vários estágios de diferenciação e pela atividade positiva da dopa-oxidase em *R. esculenta* (GALLONE *et al.*, 2002) e *Proteus anguinos* (PRELOVSEK e BULOG, 2003).

Em teleósteos, Besseau e Faliex (1994) e Grier e Taylor (1998) descrevem a presença de melanomacrófagos nas estruturas testiculares, os quais podem estar envolvidos com o processo de regressão gonadal após a fase de maturação das células germinativas. No entanto, em *P. nattereri* e *P. fuscomaculatus*, as análises não revelaram a ocorrência de melanomacrófagos no interstício testicular, o que não descarta a presença dessas células, uma vez que podem apresentar baixa densidade populacional ou poderiam ser observadas no órgão apenas em alguma fase do ciclo reprodutivo ou ainda mediante resposta a processos infecciosos, quando então poderiam ser identificadas. Em anuros essas células estão bem evidenciadas em órgãos hematopoéticos tais como fígado (CÍCERO *et al.*, 1989; ZUASTI *et al.*, 1990; SICHEL *et al.*, 1997), rim (ZUASTI *et al.*, 1989) e baço (ZUASTI *et al.*, 1990).

Quanto às funções, tem sido sugerido que a melanina contida nas células pigmentadas apresenta um importante papel na absorção e neutralização de radicais livres, cátions e outros agentes potencialmente tóxicos, derivados da degradação de material celular fagocitado (ZUASTI *et al.*, 1989), e na termorregulação de répteis (GOLAPAKRISHNAKONE, 1986). Barni *et al.* (1999) relata que a ocorrência de células melânicas no fígado de *R. esculenta* aumenta durante o inverno.

Pelas características estruturais destas células, não foi possível o estabelecimento de um protocolo preciso para quantificar e assim estabelecer se pode existir diferenças entre as duas espécies. Aparentemente a presença e distribuição é semelhante, o que pode estar relacionado ao íntimo grau de afinidade filogenética entre estas espécies, as quais juntamente com *P. biligonigerus* e *P. santafecinos* estão incluídas no grupo *biligonigerus* (LYNCH, 1970).

Apesar da variação na distribuição e quantidade dos melanócitos extracutâneos, há indícios de que é possível estabelecer um padrão do sistema pigmentar extracutâneo para diferenciar ambas espécies desse gênero de outras espécies pertencentes a mesma categoria taxonômica mas de outras famílias.

Estruturalmente não há qualquer indício de que exista diferença entre os melanócitos testiculares com àqueles encontrados em outras vísceras. Porém este estudo preliminar enumerou vários aspectos e dúvidas que poderão ser analisadas e esclarecidas em análises posteriores. O objetivo foi prover algumas informações morfológicas para que vários estudos com outras abordagens (fisiológicas, filogenéticas, adaptativa, etc...) sejam desenvolvidos.

AGRADECIMENTOS

A FAPESP pelo auxílio à pesquisa - processo nº . 02/08016-9.

A CAPES pela concessão da bolsa de Mestrado para Rodrigo Zieri.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGIUS, C. 1980. Phylogenetic development of melano-macrophage centres in fish. **Journal of Zoology**. v.191, p.11-31.

AGIUS, C. 1981. Preliminary studies on the ontogeny of the melanomacrophages of teleost hematopoietic tissues and age-related changes. **Developmental and Comparative Immunology**. v.5, p.597-606.

- AGIUS, C.; AGBEDE, S.A. 1984. An electron microscopical study on the genesis of lipofuscin, melanin and haemosiderin in the haemopoietic tissues of fish. **Journal of Fish Biology**. v.24, n.4, p.471-488.
- AGIUS, C.; ROBERTS, R. J. 2003. Review: Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. **Journal of Fish Biology**. v.26, p.499-509.
- AKULENKO, N.M. 1998. Topography and structure of the pigment cell aggregation in the liver of the frog (*Rana ridibunda*). **Vestnik Zoologii**. v.32, n.3, p.49-53.
- AOKI, A.; VITALE-CALPE, R.; PISANO, A. 1969. The testicular interstitial tissue of the amphibian *Physalaemus fuscomaculatus*. **Zeitschrift fur Zellforschung und Mikroskopische Anatomie**. v.98, n.1, p.9-16.
- BARNI, S.; BERTONE, V.; CROCE, A.C.; BOTTIROLI, G.; BERNINI, F.; GERZELI, G. 1999. Increase in liver pigmentation during natural hibernation in some amphibians. **Journal of Anatomy**. v.195, p.19-25.
- BESSEAU, L.; FALIEUX, E. 1994. Resorption of unemitted gametes in *Lithognathus mormyrus* (Sparidae, Teleostei): a possible synergic action of somatic and immune cells. **Cell Tissue Research**. v.276, n.1, p.123-132.
- CICERO, R.; MALLARDI, A.; MAIDA, I.; GALLONE, A.; PINTUCCI, G. 1989. Melanogenesis in the pigment cells of *Rana esculenta* L. liver: evidence for tyrosinase like activity in the melanosome protein fraction. **Pigment Cell Research**. v.2, p.100-108.
- COTTA-PEREIRA, G.; RODRIGO, F.G.; DAVID-FERREIRA, J.F. 1976. The use of tannic acid-glutaraldehyde in the study of elastic related fibers. **Stain Technology**. v.51, p.7-11.
- CHRISTIANSEN, J.L.; GRZYBOWSKI, J.M.; KODAMA, R.M. 1996. Melanomacrophage aggregations and their age relationships in the yellow mud turtle, *Kinosternon flavescens* (Kinosternidae). **Pigment Cell Research**. v.9, n.4, p.185-190.

- GALLONE, A.; GUIDA, G.; MAIDA, I.; CÍCERO, R. 2002. Spleen and liver pigmented macrophages of *Rana esculenta* L. A new melanogenic system? **Pigment Cell Research**. v.15, p.32-40.
- GEREMIA, E.; CORSARO, C.; BONOMO, R.; GIARDINELLI, R.; PAPPALARDO, P.; VANELLA, A.; SICHEL, G. 1984. Eumelanins as free radicals trap and superoxide dismutase activities in Amphibia. **Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology**. v.79B, n.1, p.67-69.
- GOPALAKRISHNAKONE, P. 1986. The structure of the pigment cells in the turtle *Trionyx sinensis*. **Archivum Histologicum Japonicum**. v.49, p.421-435.
- GOLLMANN, G.; BORKIN, L. J.; ROTH, P. 1993. Genic and morphological variation in the fire-bellied toad, *Bombina bombina* (Anura, Discoglossidae). **Zoologische Jahrbuecher Abteillung Fuer Systematik Oekologie und Geographie Der Tiere**. v. 120, p. 129-136.
- GRIER, H.J., TAYLOR, R.G. 1998. Testicular maturation and regression in the common snook. **Journal of Fish Biology**. v.53, p.521-542.
- HERRÁEZ, M.P.; ZAPATA, A.G. 1991. Structural characterization of the melanomacrophage centres (MMC) of goldfish *Carassius aurata*. **European Journal of Morphology**. v.29, p.89-102.
- JOHNSON, J.C.; SCHWIESOW, T.; EKWALL, A.K.; CHRISTIANSEN, J.L. 1999. Reptilian melanomacrophages function under conditions of hypothermia: Observations on phagocytic behavior. **Pigment Cell Research**. v.12, n.6, p.376-382.
- LYNCH, J.D. 1970. Systematic Status of the American leptodactylid frog genera *Engystomops*, *Eupemphix* and *Physalaemus*. **Copéia**. p.488-496.
- MACCHI, G.J.; ROMANO, L.A.; CHRISTIANSEN, H.E. 1992. Melano-macrophage centres in whitemouth croaker, *Micropogonias furnieri*, as biological indicators of environmental changes. **Journal of Fish Biology**. v.40, n.6, p.971-973.

- MESSEGUER, J.; LÓPEZ-RUIZ, A.; ESTEBAN, M.A. 1994. Melano-macrophages of the seawater teleosts, sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*): morphology, formation and possible function. **Cell Tissue Research**. v.277, p.1-10.
- MICALE, V.; PATTI, F. 1993. Melanomacrophage centres in the spleen of seabass, *Dicentrarchus labrax* L., and gilthead seabream, *Sparus aurata* L., during their reproductive cycle. **European Archives of Biology**. v.104, p.93-98.
- OLIVEIRA, C., ZANETONI, C., ZIERI, R. 2002. Morphological observations on the testes of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia, Anura). **Revista Chilena de Anatomia**. v.20, n.3, p.263 – 268.
- OLIVEIRA, C.; SANT'ANNA, A.C.; OMENA, P. M.; SANTOS, L.R.S.; ZIERI, R. 2003. Morphological considerations on the seminiferous structures and testes of anuran amphibians: *Bufo crucifer*, *Physalaemus cuvieri* and *Scinax fuscovarius*. **Biociências**, Porto Alegre. v.11, n.1, p.39-46.
- PEDERZOLI, A.; TREVISAN, P. 1990. Pigmentary system of the adult alpine *Salamander atra aurorae*. **Pigment Cell Research**. v.3, p.80-89.
- PRELOVISEK, P.; BULOG, B. 2003. Biogenesis of melanosomes in kupffer cells of *Proteus anguinus* (Urodela, Amphibia). **Pigment Cell Research**. v.16, p.345-350.
- RUND, C.R.; CHRISTIANSEN, J.L.; JOHNSON, J.C. 1998. In vitro culture of melanomacrophages from the spleen and liver of turtles: Comments on melanomacrophage morphology. **Pigment Cell Research**. v.11, n.2, p.114-119.
- SICHEL, G.; SCALIA, M.; MONDIO, F.; CORSARO C. 1997. The amphibian Kupffer cells build and demolish melanosomes: an ultrastructural point of view. **Pigment Cell Research**. v.10, p.271-287.
- TREVISAN, P.; PEDERZOLI, A.; BAROZZI, G. 1991. Pigmentary system of the adults alpine salamander *Salamandra atra atra*. **Pigment Cell Research**. v.4, p.151-157.

- TSUJII, T.; SENO, S. 1990. Melano-macrophage centres in the aglomerular kidney of the sea horse (teleosts): morphologic studies on its formation and possible function. **The Anatomical Record**. v.226, p.460-470.
- VENABLE, J.H.; COGGESHALL, R. 1965. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**. v.25, p.407-408.
- WATSON, M.L. 1958. Staining tissue sections of electron microscopy with heavy metals. **Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**. v.4 p.475-478.
- ZIERI, R.; OLIVEIRA, C. 2005. Pigmentação testicular no anfíbio *Physalaemus nattereri* (Anura): observações anatômicas sobre o sistema pigmentar extracutâneo. **Revista Brasileira de Zoologia**.
- ZUASTI, A.; JARRA, J.R.; FERRER, C.; SOLANO, F. 1989. Occurrence of melanin granules and melanossynthesis in the kidney of *Sparus auratus*. **Pigment Cell Research**. v.2. p.93-100.
- ZUASTI, A.; FERRER, C.; AROCA, P.; SOLANO, F. 1990. Distribution of extracutaneous melanin pigment in *Sparus auratus*, *Mugil cephalus* and *Dicetrachus labrax* (Pisces, Teleostei). **Pigment Cell Research**. v.3, p.126-131.
- ZUASTI, A.; JIMÉNEZ-CERVANTES, C.; GARCÍA-BORRÓN, J.C; FERRER, C. 1998. The melanogenic system of *Xenopus laevis*. **Archives Histology Cytology**, v.61, p.4, p.305-316.

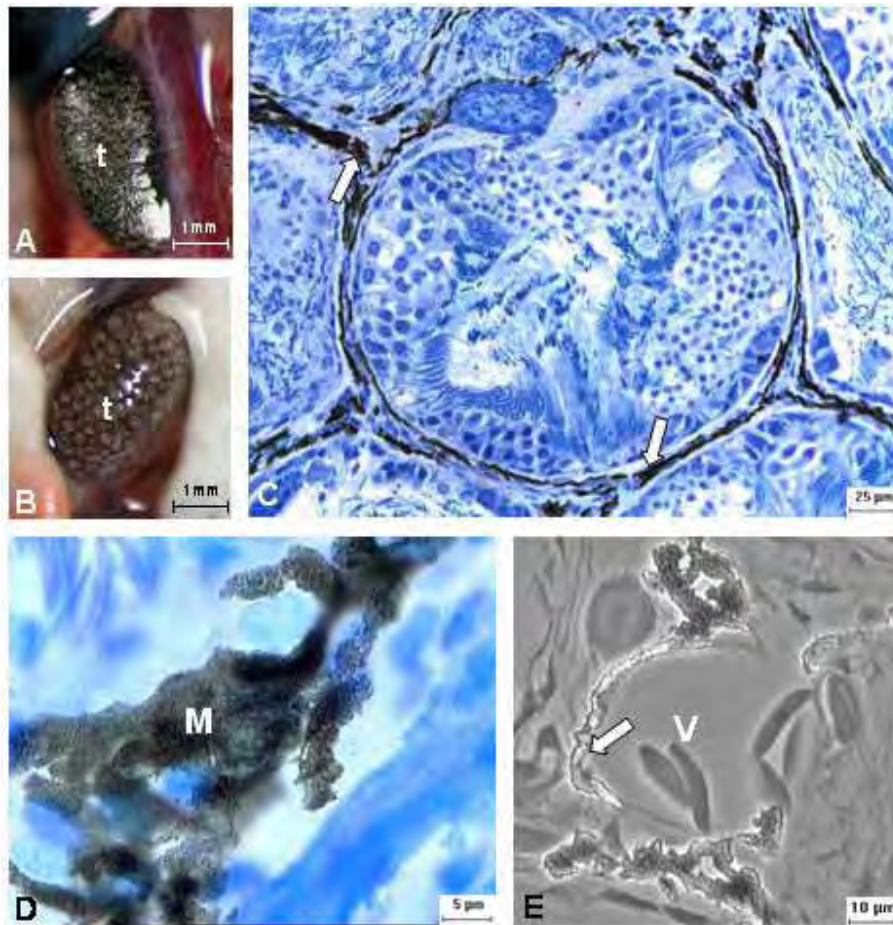


Figura 1. Vista geral do testículo de *P. nattereri* (1A) e *P. fuscomaculatus* (1B) evidenciando a intensa pigmentação na cápsula testicular e por transparência desta, também no interstício. C – Melanócitos (setas) no interstício testicular e ao redor dos lóculos seminíferos de *P. fuscomaculatus*. D – Aspecto dendrítico do melanócito com o citoplasma repleto de grânulos em *P. fuscomaculatus*. E – Contraste de fase evidenciando um vaso sanguíneo contornado por melanócitos (seta) em *P. nattereri*. Indicações: (t) testículo, (M) melanócito e (v) vaso sanguíneo.

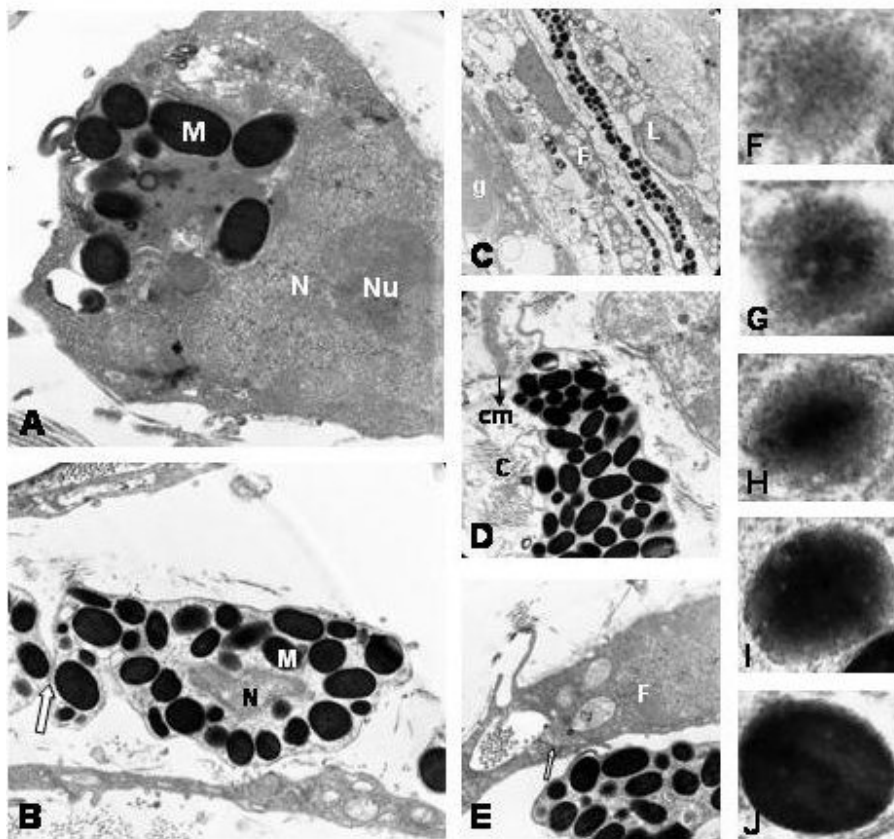


Figura 2. Melanócito em *P. nattereri*. A – Melanócito com pouca quantidade de melanossomos no citoplasma, apresentando núcleo grande com a cromatina descondensada e nucléolo evidente. 24800x. B – Melanócito apresentando grãos maduros, com o citoplasma repleto de melanossomos de diferentes formas, tamanhos e elétrôn-densidades. Proximidade com fibroblasto e junção com a membrana plasmática (seta) de outro melanócito. 14220x. C – Prolongamento citoplasmático de um melanócito entremeado às células intersticiais. 2800x. D – Melanócito intimamente associado à célula mióide e colágeno em suas adjacências. 11700x. E – Adesão focal entre fibroblastos (seta). 12000x. F – Aspecto fibrilar de premelanossomo. G, H, I – Região central do premelanossomo mais elétrôn-densa indicando processo de melanização e região cortical com vesículas elétrôn-lúcidas (setas). J – Melanossomo repleto de melanina. Indicações: (N) núcleo, (Nu) nucléolo, (M) melanossomo, (g) espermatogônia, (cm) célula mióide, (c) colágeno, (F) fibroblasto. F – J 64600x.

Capítulo III

- **ESPERMIOGÊNESE EM *Physalaemus nattereri* (ANURA, LEPTODACTYLIDAE): ESTUDO ULTRA-ESTRUTURAL.**

RODRIGO ZIERI¹ e CLASSIUS DE OLIVEIRA²

¹ Mestrando do Programa de Pós-graduação em Biologia Animal da UNESP – SJRP.

² Departamento de Biologia – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – UNESP, São José do Rio Preto – São Paulo, Brasil.

Palavras-chave: *Physalaemus nattereri*, Melanócitos, Espermiogênese; Espermatozóide.

Endereço para correspondência:

Departamento de Biologia – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – UNESP.

CEP: 15.040-000, São José do Rio Preto – São Paulo, Brasil.

Fax: (55-17) 221-2390.

E-mail: classius@ibilce.unesp.br

RESUMO. A formação dos espermatozóides envolve um extenso e complexo processo que inicia-se com a proliferação e diferenciação de células tronco, as espermatogônias, passa pela meiose e termina com a espermiogênese. Este último evento envolve alterações morfológicas e bioquímicas que transforma espermatídes em espermatozóides. Aspectos ultra-estruturais da espermiogênese e espermatozóide testicular do anuro *Physalaemus nattereri* foram analisados através de microscopia eletrônica de transmissão. Durante a espermiogênese ocorre compactação da cromatina e alongamento nuclear, com visíveis perdas de material citoplasmático. Neste estágio também podem ser vistos no citoplasma da célula de Sertoli, envolvendo cada espermatíde, uma grande quantidade de microtúbulos e grânulos de glicogênio. O espermatozóide é fusiforme, com uma capa acrossomal na região anterior do núcleo. Na bainha citoplasmática que envolve a região de implantação do flagelo estão presentes mitocôndrias. A cauda apresenta o axonema (9+2), uma fibra justaxonemal e uma membrana ondulante, estando ausente o bastão axial. Esta organização é similar à de outros anfíbios do mesmo gênero como *P. biligonigerus*, *P. gracilis* e *P. fuscomaculatus*.

ABSTRACT. Spermiogenesis in *Physalaemus nattereri* (Anuran, Leptodactylidae):

Ultrastructural Aspects. The spermatozoon formation involves an extend and complex process that begins with the proliferation and differentiation of stem cells spermatogonia, proceeds through meiosis, and terminates with spermiogenesis. The later event involves morphological and biochemical changes to transform spermatids into spermatozoa. Ultrastructural aspects of the spermiogenesis and testicular spermatozoa of the anuran *Physalaemus nattereri* were analyzed through transmission electron microscopy. Spermiogenesis in the anuran *P. nattereri* involves chromatin condensation and nuclear elongation, with visible cytoplasmic eliminations. In this stage it can also be seen inside Sertoli cell cytoplasm, surrounding each spermatid, a great amount of microtubules and glycogen. The acrosome forms a cap in the anterior region of the nucleus. A mitochondrial sleeve is found around the proximal portion of the tail. The tail presents an axonema with a 9+2 axoneme pattern, a justaxonemal fiber, undulating membrane and absence of axial rod. This organization is similar to other amphibians such as *P. biligonigerus*, *P. gracilis* and *P. fuscomaculatus*.

INTRODUÇÃO

A formação dos espermatozóides envolve um extenso e complexo processo que inicia-se com a proliferação e diferenciação de células tronco, as espermatogônias, passa pela meiose e termina com a espermiogênese (RASTOGI *et al.*, 1988). Este último evento envolve alterações morfológicas e bioquímicas que transformam espermátides em espermatozóides (PHILIPS, 1974).

Os espermatozóides dos anfíbios são geralmente células alongadas e lineares, especialmente modificadas para nadar. A morfologia básica dos espermatozóides consiste das seguintes estruturas: cabeça contendo capa acrossomal e núcleo, e calda com peça intermediária e principal (DUELLMAN e TRUEB, 1994).

A gametogênese e a morfologia do espermatozóide de alguns anuros têm sido estudadas em condições particulares de fertilização (WAGGENER e CARROL, 1998) e na caracterização taxonômica e filogenética, devido à grande variação morfológica e morfométrica na estrutura do acrosso, perfuratório e filamento caudal (FOUQUETTE e DELAHOUSSE, 1977; GARRIDO *et al.*, 1989; LEE e JAMIESON, 1992 e 1993; JAMIESON *et al.*, 1993; KWON e LEE, 1995; MEYER *et al.*, 1997; JAMIESON e SCHELTINGA, 1997; SCHELTINGA *et al.*, 2002).

Aspectos morfológicos e funcionais da espermiogênese têm sido descritos em vários estudos com anuros, especialmente no que concerne aos complexos eventos envolvendo formação do acrosso (SPRANDO e RUSSELL, 1988; RASTOGI *et al.*, 1988), compactação cromatínica e alongamento nuclear (REED e STANLEY, 1972; CAVICCHIA e MOVIGLIA, 1983; BÃO *et al.*, 1991; LEE e JAMIESON, 1992 e 1993; LEE e KWON, 1992; TABOGA e DOLDER, 1998) e formação do flagelo (TABOGA e DOLDER, 1993).

Para o gênero *Physalaemus*, trabalhos baseados em questões da biologia reprodutiva são raros (RYAN *et al.*, 1983 e RYAN 1990; BARRETO e ANDRADE, 1995; WOGEL *et al.*, 2002), principalmente no que se refere aos aspectos morfológicos dos tipos celulares do

aparelho reprodutor masculino de *P. cuvieri* (OLIVEIRA *et al.*, 2002 e 2003b) e à caracterização estrutural de espermatozoides de *P. biligonigerus*, *P. fuscomaculatus* e *P. centralis* (AMARAL *et al.*, 1999). Este estudo descreve as modificações ultra-estruturais que ocorrem durante a espermiogênese bem como a ultra-estrutura do espermatozoide do anuro *P. nattereri*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados dez machos adultos de *Physalaemus nattereri* (Anura, Leptodactylidae), coletados em lagoas temporárias (21° 04'40"S; 49° 32'23"W) na cidade de Nova Itapirema, distrito de Nova Aliança, Estado de São Paulo, Brasil. As coletas foram realizadas no início da estação chuvosa entre os meses de setembro e outubro de 2003. Os espécimes foram fixados e mantidos em formalina e, depositados na coleção DZSJRP, Departamento de Zoologia e Botânica, Universidade Estadual Paulista, Estado de São Paulo, Brasil.

Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os espécimes foram anestesiados com éter etílico e tiveram suas gônadas removidas por meio de incisão mediana na região ventral. As amostras foram fixadas em solução de glutraldeído 3% e ácido tânico 0,25% em tampão Milloning, pH 7,3, durante 2 horas à temperatura ambiente, e lavados em tampão. Os fragmentos foram pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio a 1%, no mesmo tampão, por 1 hora, lavados brevemente em solução tamponada, desidratados em acetona e incluídos em araldite (COTTA-PEREIRA *et al.*, 1976).

Secções ultrafinas foram contrastadas pelo acetato de uranila a 2%, durante 20 minutos (WATSON, 1958) e pelo citrato de chumbo a 2% em solução de hidróxido de sódio 1N (VENABLE e COGGESHALL, 1965), durante 8 minutos, e analisadas no Microscópio Eletrônico de Transmissão Zeiss EM-900.

RESULTADOS

Durante a espermiogênese as células passam por um fundamental processo de diferenciação que envolve alongamento e redução do volume nuclear, compactação da cromatina, formação do acrosso, desenvolvimento do flagelo e redução do volume citoplasmático.

No início da diferenciação as espermatídes apresentam o núcleo arredondado, bastante pronunciado e a cromatina com aspecto frouxo. No citoplasma identificam-se organelas como mitocôndrias, complexo de Golgi, centríolos e retículo endoplasmático liso (Fig. 1). A partir do complexo de Golgi ocorre a formação da membrana acrossômica (Fig. 2), e o centríolo distal origina o filamento caudal (Figs. 3 e 4). Nessa fase, o núcleo com a cromatina ainda frouxa apresenta forma oval.

Os estádios intermediários são caracterizados pela compactação da cromatina e alongamento nuclear, e no citoplasma estão presentes organelas como lamelas aneladas, retículo endoplasmático liso e mitocôndrias (Fig. 5), além de material vacuolizado sob a forma de vesículas (Figs. 6 e 7). Neste estágio também podem ser vistos no citoplasma da célula de Sertoli, envolvendo cada espermatíde, uma grande quantidade de microtúbulos arranjados helicoidalmente e paralelamente ao sentido do alongamento nuclear, bem como uma grande quantidade de grânulos de glicogênio (Figs. 8 e 9).

O material cromatínico apresenta-se com pequenos grumos uniformemente distribuídos (Figs. 7, 8 e 9), até atingir um alto grau de compactação cromatínica, verificado pela conspícua eletrodensidade nuclear e grande redução do material citoplasmático na região nuclear (Fig. 10).

As espermatídes tardias estão organizadas em feixes e ficam entremeadas pela porção anterior, no citoplasma da célula de Sertoli, em direção ao núcleo que é bem evidente e possui cromatina finamente distribuída (Fig. 11). Essas espermatídes tardias e os espermatozóides apresentam três partes principais distintas: cabeça, peça intermediária e cauda.

Revestindo a porção anterior do núcleo está o complexo acrossômico, formado pelo acrossomo alongado e cônico, o perforatorium e o espaço subacrossomal (Fig. 12). O núcleo bastante compacto e alongado possui cromatina condensada, e em sua região posterior, uma pequena quantidade de material citoplasmático contendo mitocôndrias (Fig. 13).

A peça intermediária apresenta dois centríolos perpendiculares embebidos no material pericentriolar, o centríolo proximal, localizado mais próximo ao núcleo (Fig. 13), e o centríolo distal, responsável pelo desenvolvimento do flagelo, este pode ser ultra-estruturalmente subdividido em três regiões: et (estrias transversais), cd (centríolo distal) e ax (axonema) (Fig. 4). Uma bainha citoplasmática, contendo mitocôndrias e lamelas aneladas, envolve o axonema e a fibra justaxonemal na porção inicial do flagelo, ainda na peça intermediária (Fig. 14), e se torna delgada (Fig. 15) até desaparecer completamente.

A cauda consiste de um axonema, constituído pelo arranjo convencional de microtúbulos (9+2), uma fibra justaxonemal e na região mediana da cauda também se encontra uma extensa membrana ondulante (Fig. 16). O axonema e a fibra justaxonemal são rodeados por uma membrana citoplasmática comum e à medida que vão se aproximando da região terminal da cauda ocorre uma redução da fibra justaxonemal e ausência da membrana ondulante (Fig. 17).

A análise dos cortes transversais e longitudinais das várias porções das espermátides tardias e dos espermatozóides nos permitiu a construção de um esquema mostrando as diferentes porções do espermatozóide (Fig. 18).

DISCUSSÃO

O processo espermatogenético ocorre em estruturas denominadas lóculos seminíferos, em que o epitélio germinativo é organizado em espermatocistos, de uma maneira muito similar ao descrito para outros anuros (HERMOSILLA *et al.*, 1983; RASTOGI *et al.*, 1988; TABOGA, 1990; OLIVEIRA *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2003a e 2003b). À medida que se formam as

espermátides alongadas, o arranjo cístico se desfaz para que estas células se organizem em feixes compactos (SPRANDO e RUSSEL, 1988; TABOGA, 1990; OLIVEIRA, 1996).

Como verificado em *Hyla ranki* (TABOGA e DOLDER, 1991), as espermátides de *P. nattereri* também sofrem um processo de diferenciação que envolve várias alterações núcleo-citoplasmáticas: alongamento nuclear, condensação do material cromatínico, formação do acrossomo, desenvolvimento da cauda e perda do material citoplasmático.

O núcleo das espermátides de *P. nattereri* sofre gradual condensação e aumento de elétron-densidade, com descrito para *Megophrys montana* (ASA e PHILLIPS, 1988) e para *P. biligonigerus*, *P. fuscomaculatus* e *P. gracilis* (AMARAL *et al.*, 1999). O processo de alongamento celular é auxiliado por uma grande quantidade de microtúbulos no citoplasma da célula de Sertoli que entremeia as espermátides (TABOGA, 1990; OLIVEIRA, 1996) e uma menor quantidade na região perinucleolar (RASTOGI *et al.*, 1988; BÁO *et al.*, 1991; AMARAL *et al.*, 1999). Em *Hyla ranki* (TABOGA e DOLDER, 1994), o mecanismo de condensação cromatínica também está associado a um fenômeno de substituição das histonas somáticas por proteínas semelhantes à protamina ou da agregação destas com as histonas somáticas.

Além dos microtúbulos, também se observa no citoplasma da célula de Sertoli de *P. nattereri* uma grande quantidade de grânulos de glicogênio, como observado em *Rana catesbeiana* (SPRANDO e RUSSEL, 1988) e *Pachymedusa dacnicolor* (RASTOGI *et al.*, 1988), fato que pode estar associado à grande quantidade de alimento encontrado durante o período de reprodução e que coincide com o início da estação chuvosa, servindo como possível fonte de nutrientes para as células spermatogênicas.

Uma outra característica das espermátides, observadas em *P. nattereri* é a grande redução do volume citoplasmático, através da perda de prolongamentos sob a forma de vesículas, que serão fusionadas e reabsorvidas pelas células de Sertoli (TABOGA, 1990) ou degradadas no epitélio do ducto de Wolff (SPRANDO e RUSSEL, 1988).

Nas etapas finais da espermiogênese, o acrossomo apresenta uma capa de forma cônica na região anterior do núcleo como em outros anfíbios (NICANDER, 1970; RASTOGI *et al.*, 1988; BÃO *et al.*, 1991; AMARAL *et al.*, 1999) e o perforatorium localizado entre o acrossomo e o núcleo. Esta estrutura contém filamentos de actina e desempenha um papel importante durante a penetração no óvulo (BACCETI *et al.*, 1980).

Entre os vertebrados, os anfíbios apresentam uma enorme diversidade em suas estratégias reprodutivas e locais de fertilização (DUELLMAN e TRUEB, 1994), isso reflete em uma grande diferenciação e variabilidade no filamento caudal, tendo em vista os anexos protéicos e peças membranosas que esta região pode apresentar em gametas de diferentes anfíbios já estudados (TABOGA, 1990). O filamento caudal apresenta um axonema típico (9+2) sem nenhum anexo caudal em *R. pipiens* e *R. clamitans* (POIRIER e SPINK, 1971) e alguns Microhilídeos (SCHELTINGA *et al.*, 2002), ou com 2 axonemas em *Megophrys Montana* (ASA e PHILLIPS, 1988) e *Lepidobatrachus laevis* (WAGGENER e CARROL Jr, 1998). O filamento caudal com axonema, membrana ondulante e bastão axial está presente em *Pachymedusa dacnicolor* (RASTOGI *et al.*, 1988), *Bufo bufo gargarizans* (KWON e LEE, 1995). A cauda de *Hyla japonica* consiste de um axonema e um bastão axial, mas não possui uma membrana ondulante (KWON e LEE, 1995). O anuro *P. nattereri* possui o filamento caudal constituído por axonema, membrana ondulante, fibra justaxonemal e ausência do bastão axial, semelhante ao descrito por Amaral *et al.* (1999) para três espécies de *Physalaemus*.

As espécies do gênero *Physalaemus*, de maneira geral, apresentam atividade reprodutiva (deposição e fertilização dos óvulos) em águas lânticas, geralmente em açudes e banhados ou em corpos d'água temporários, como pequenas lagoas, poças e valas (KWET e DI-BERNARDO, 1999; RAMOS e GASPARINI, 2004). Essa característica pode estar relacionada à ausência do bastão axial nestas espécies, pois em ambientes de água parada, há uma menor exigência quanto à agilidade natatória do espermatozóide rumo ao óvulo.

A descrição do gameta de *Physalaemus nattereri* confere uma característica morfológica que reforça a proximidade filogenética entre as demais espécies do grupo *biligonigerus* (LYNCH, 1970).

AGRADECIMENTOS

A FAPESP pelo auxílio à pesquisa - processo nº . 02/08016-9.

A CAPES pela concessão da bolsa de Mestrado para Rodrigo Zieri.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, M.J.L.V.; FERNANDES, A.P.; BAO, S.N.; RECCO-PIMENTEL, S.M. 1999. An ultrastructural study of spermiogenesis in three species of *Physalaemus* (Anura, Leptodactylidae). **Biocell**. v.23, n.3, p.211-221.
- ASA, C.S.; PHILLIPS, D.M. 1988. Nuclear shaping in spermatids of the Thai leaf frog *Megophrys Montana*. **Anatomical Record**. v.220, n.3, p.287-290.
- BACCETTI, B.; BIGLIARDI, E.; BURRINI, A.G. 1980. A morphogenesis of the vertebrate perforatorim. **Journal of Ultrastructure Research**. v.71, p.272-287.
- BÁO, S.N.; DALTON, G.C., OLIVEIRA, S.F. 1991. Spermiogenesis in *Odontophrynus cultripes* (Amphibia, Anura, Leptodactylidae): ultrastructural and cytochemical studies of proteins using E-PTA. **Journal of Morphology**. v.207, n.3, p.303-314.
- BARRETO, L.; ANDRADE, G.V. 1995. Aspects of the reproductive biology of *Physalaemus cuvieri* (Anura: Leptodactylidae) in northeastern Brazil. **Amphibia-Reptilia**. v.16, p.67-76.
- CAVICCHIA, J.C.; MOVIGLIA, G.A. 1983. The blood-testis barrier in the toad (*Bufo arenarum*, Hensel): a freeze-fracture and lanthanum tracer study. **The Anatomical Record**. v.205, n.4, p.387-396.
- COTTA-PEREIRA, G.; RODRIGO, F.G.; DAVID-FERREIRA, J.F. 1976. The use of tannic acid-glutaraldehyde um the study of elastic related fibers. **Stain Technology**. v.51, p.7-11.

- DUELLMAN, W.E., TRUEB, L. 1994. **Biology of Amphibia**. McGraw-Hill Book Company, New York. 670p.
- FEIO, R.N.; POMBAL, J.P.Jr.; CARAMASCHI, U. 1999. New *Physalaemus* (Anura: Leptodactylidae) from the Atlantic Forest of Minas Gerais, Brasil. **Copéia**. v.1, p.141-145.
- FOUQUETTE, M.J.Jr. ; DELAHOUSSE, A.J. 1977. Sperm morphology in the *Hyla rubra* (Amphibia, Anura, Hylidae), and its bearing on generic status. **Journal of Herpetology**. v.11, n.4. p.387-396.
- GARRIDO, O.; PUGIN, E.; JORQUERA, B. 1989. Sperm morphology of *Batrachyla* (Anura: Leptodactylidae). **Amphibia-Reptilia**. v.10, p.141-149.
- HERMOSILLA, I.B., URBINA, A.P., CABRERA, J.C.P. 1983. Espermatozoos en la rana Chilena *Caudiverbera caudiverbera* (Linne, 1758) (Anura, Leptodactylidae). **Bolletim de la Sociedad de Biología de Concepción**. v. 54, p. 103-115.
- JAMIESON, B.G.M.; LEE, M.S.Y.; LONG, K. 1993. Ultrastructure of the spermatozoon of the internally fertilizing frog *Ascaphus truei* (Ascaphidae: Anura: Amphibia) with phylogenetic applications. **Herpetologica**. v.49, p.52-65.
- JAMIESON, B.G.M.; SCHELTINGA, D.M. 1997. Sperm ultrastructure of six Australian hylid frogs from two genera (*Litoria* and *Cyclorana*): phylogenetic implications. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**. v.29, n.4, p.443-451.
- KWET, A.; DI-BERNARDO, M. 1999. **Pró-Mata – Anfíbios. Amphibien. Amphibians**. EDIPUCRS, Porto Alegre, Brasil. 107p.
- KWON, A.S.; LEE, Y.H. 1995. Comparative spermatology of anurans with special references to phylogeny. In: Advances in Spermatozoal Phylogeny and Taxonomy. **Memoirs du Museum National d'Histoire Naturelle**. v.166, p.321-332.
- LEE, M.S.Y.; JAMIESON, B.G.M. 1992. The ultrastructure of the spermatozoa of three species of Myobatrachid frogs (Anura, Amphibia) with phylogenetic considerations. **Acta Zoologica**. v.73, p.213-222.

- LEE, M.S.Y.; JAMIESON, B.G.M. 1993. The ultrastructure of the spermatozoa of bufonid and hylid frogs (Anura, Amphibia): implications for phylogeny and fertilization biology. **Zoologica Scripta**. v.22, p.309-323.
- LEE, M.S.Y.; KWON, A.S. 1992. Ultrastructure of spermiogenesis in *Hyla japonica* (Anura, Amphibia). **Acta Zoologica**. v.73, p.49-55.
- MEYER, E.; JAMIESON, B.G.M.; SCHELTINGA, D.M. 1997. Sperm ultrastructure of six Australian hylid frogs from two genera (*Litoria* and *Cyclorhina*) phylogenetic implications. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**. v.29, p.433-451.
- LYNCH, J.D. 1970. Systematic Status of the American leptodactylid frog genera *Engystomops*, *Eupemphix* and *Physalaemus*. **Copéia**. p.488-496.
- NICANDER, L. 1970. Comparative studies on the fine structure of vertebrate spermatozoa. In: Comparative Spermatology. B. Baccetti. **Academic Press**, New York. p.47-62.
- OLIVEIRA, C. 1996. **Estudo morfológico do testículo de *Scinax fuscovaria* (Amphibia, Anura, Hylidae)**. (Doutorado) – Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu. 131p.
- OLIVEIRA, C.; ZANETONI, C.; ZIERI, R. 2002. Morphological observations on the testes of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia, Anura). **Revista Chilena de Anatomia**. v.20, n.3, p.263 – 268.
- OLIVEIRA, C.; SANT'ANNA, A.C.; OMENA, P.M.; SANTOS, L.R.S.; ZIERI, R. 2003a. Morphological considerations on the seminiferous structures and testes of anuran amphibians: *Bufo crucifer*, *Physalaemus cuvieri* and *Scinax fuscovarius*. **Biociências**, Porto Alegre. v.11, n.1, p.39-46.
- OLIVEIRA, C.; VICENTINI, C.A.; TABOGA, S.R. 2003b. Structural characterization of nuclear phenotypes during *Scinax fuscovarius* spermatogenesis (Anura, Hylidae). **Caryologia**. v. 56, n. 1, p. 75 – 83.
- PHILLIPS, D.M. 1974. **Spermiogenesis**. Academic Press, New York & London. p.1-68.

- POIRIER, G.R.; SPINK, G.E. 1971. The ultrastructure of testicular spermatozoa in two species of *Rana*. **Journal of Ultrastructure Research**. v.36, p.455-465.
- RAMOS, A.D.; GASPARINI, J.L. 2004. **Anfíbios de Goiapaba-açu**, Fundão, Estado do Espírito Santo. Bios editora. 75p.
- RASTOGI, R.K.; BAGNARA, J.T.; IELA, L.; KRASOVICH M.A. 1988. Reproduction in the Mexican leaf frog, *Pachymedusa dacnicolor*. IV. Spermatogenesis: a light and ultrasonic study. **Journal of Morphology**. v.197, p. 277-302.
- REED, S.C.; STANLEY, H.P. 1972. Fine structure of spermatogenesis in the South African clawed toad *Xenopus laevis* Daudin. **Journal of Ultrastructure Research**. . v.41, p.277-295.
- RYAN, M.J.; BARTHOLOMEU, G.A.; RAND, A.S.1983. Energetics of reproduction in a Neotropical frog, *Physalaemus pustulosus*. **Ecology**. v.64, n.6, p.1457-1462.
- RYAN, M.J.; 1990. Vocal morphology of the *Physalaemus pustulosus* species group (Leptodactylidae): morphological response to sexual selection for complex calls. **Biological Journal of the Linnean Society**. Texas. v.40, p.37-52.
- SCHELTINGA, D.M.; JAMIESON, B.G.M.; BICKFORD, D.P.; GARDA, A.A.; BÁO, S.N.; MCDONALD, K.R. 2002. Morphology of the spermatozoa of the Microhylidae (Anura, Amphibia). **Acta Zoologica**. v. 83, p.263-275.
- SPRANDO, R.L.; RUSSEL, L.D. 1988. Spermiogenesis in the bull frog (*Rana catesbeiana*): a study of cytoplasmic events including cell volume changes and cytoplasmic elimination. **Journal of Morphology**. v.198, p.303-319.
- TABOGA, S.R. 1990. **Estudo estrutural, ultra-estrutural e citoquímico da espermatogênese, com ênfase na espermiogênese de *Hyla ranki* (Amphibia, Anura, Hylidae)**. (Mestrado) – Instituto de Biologia, UNICAMP. 172p.
- TABOGA, S.R.; DOLDER, M.A. H. 1991. Análise histológica da espermatogênese de *Hyla ranki* (Amphibia, Anura, Hylidae). **Revista Brasileira de Ciências Morfológicas**. v.2, p.66-71.

- TABOGA, S.R.; DOLDER, H. 1993. Ultrastructural analysis of the *Hyla ranki* spermatozoan tail (Amphibia, Anura, Hylidae). **Cytobios.** v.75, p.85-92.
- TABOGA, S.R.; DOLDER, M.A. H. 1994. Basic nuclear protein substitution during spermiogenesis in *Hyla ranki* (Amphibia, Anura, Hylidae). **Ciência e Cultura.** v.46, n.3, p.161-163.
- TABOGA, S.R.; DOLDER, H. 1998. Spermiogenesis of *Scinax ranki* (Amphibia, Anura, Hylidae): nuclear compactation and associated cytoplasmic events. **Brazilian Journal of Morphological Science.** v.15, p.157-163.
- VENABLE, J.H.; COGGESHALL, R. 1965. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology.** v.25, p.407-408.
- WAGGENER, W.L.; CARROL JR, E.J. 1998. Spermatozoon structure and motility in the anuran *Lepidobatrachus laevis*. **Development Growth & Differentiation.** v.40, p.27-34.
- WATSON, M.L. 1958. Staining tissue sections of electron microscopy with heavy metals. **Journal of Biophysical and Biochemical Cytology.** v.4 p.475-478.
- WOGEL, H.; ABRUNHOSA, P.A.; POMBAL, J.P.Jr. 2002. Atividade reprodutiva de *Physalaemus signifer* (Anura, Leptodactylidae) em ambiente temporário. **Lheringia.** v.92, n.2, p.57-70.

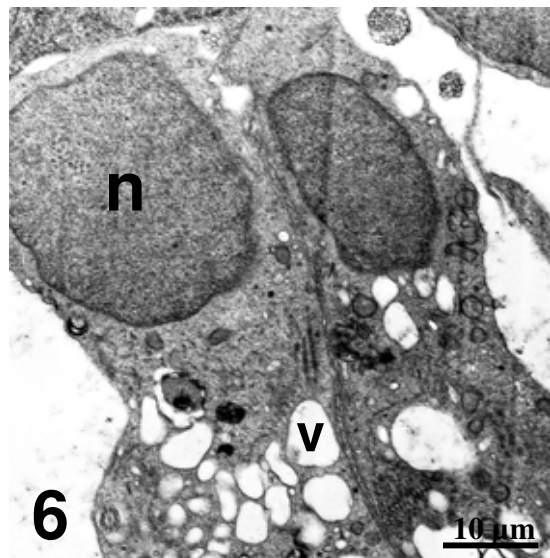
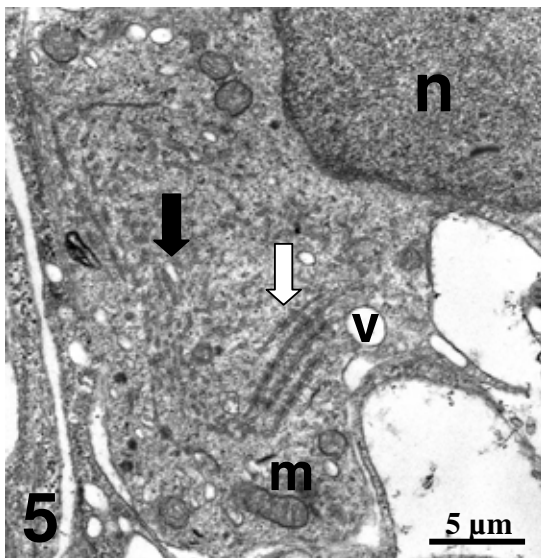
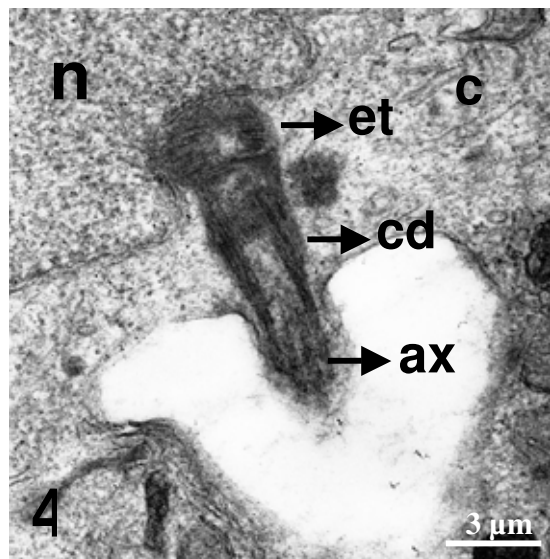
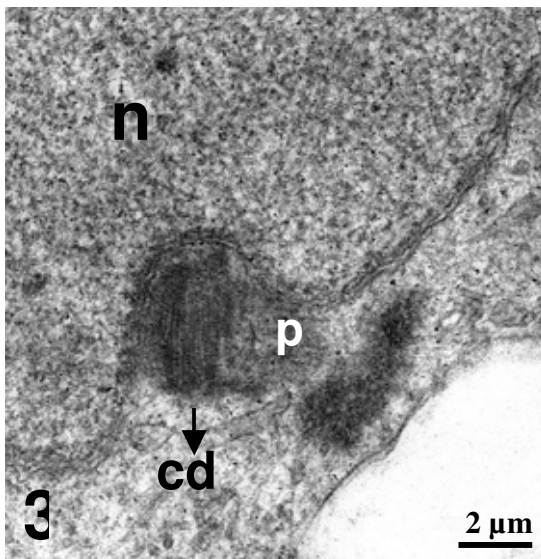
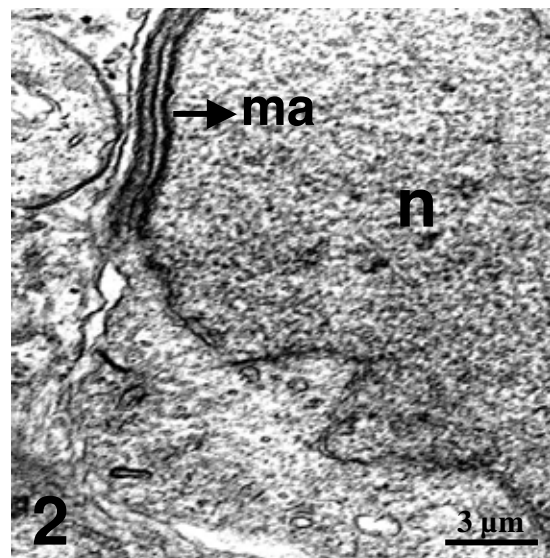
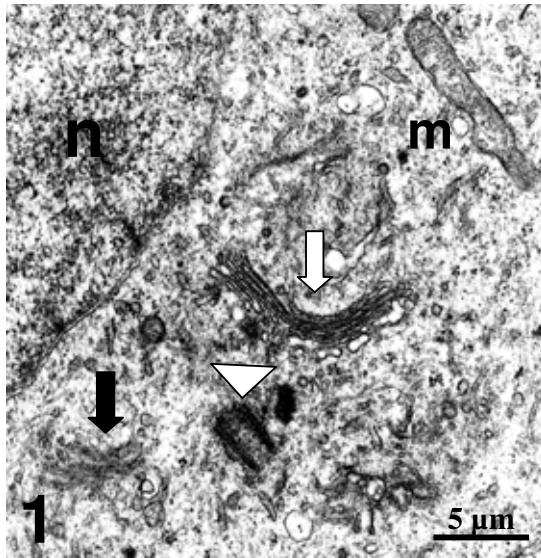


Figura 1. Espermátide inicial com um desenvolvido complexo de Golgi (seta), que dará origem à membrana acrossômica, e o par de centríolos (cabeça de seta), mitocôndrias (m), retículo endoplasmático liso (estrela) e núcleo com a cromatina dispersa (n). 34500x.

Figura 2. Espermátide inicial mostrando a membrana acrossômica (MA) associada à porção anterior do núcleo. 55600x

Figura 3. Secção longitudinal de espermátide em fase inicial do desenvolvimento do flagelo. Núcleo (n) e citoplasma. Note o centríolo distal (cd) situado na fossa nuclear e a presença de material pericentriolar (p). 83400x.

Figura 4. Secção longitudinal de espermátide, evidenciando a orientação perpendicular do centríolo distal com a membrana plasmática, a presença de microtúbulos no axonema em formação e a associação de mitocôndrias na futura região da peça intermediária. Núcleo (n), estriações transversais (et), centríolo distal (cd), axonema (ax) e citoplasma (c). 69500x.

Figuras 5 e 6. Espemátides com núcleo (n) ovóide e resíduo citoplasmático volumoso contendo mitocôndrias (m), lamela anelada (seta), vesículas (v) e retículo endoplasmático liso (estrela). 5 – 20700x, 6 – 11625x.

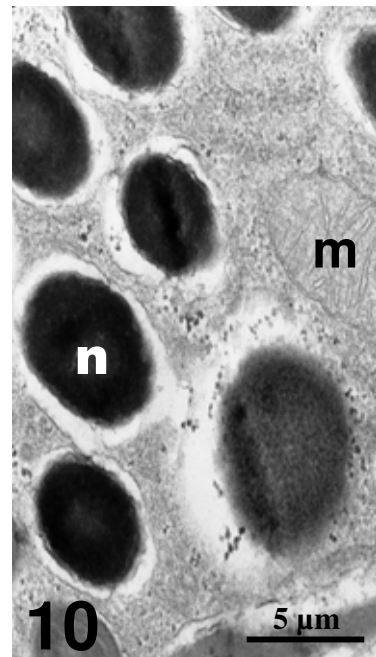
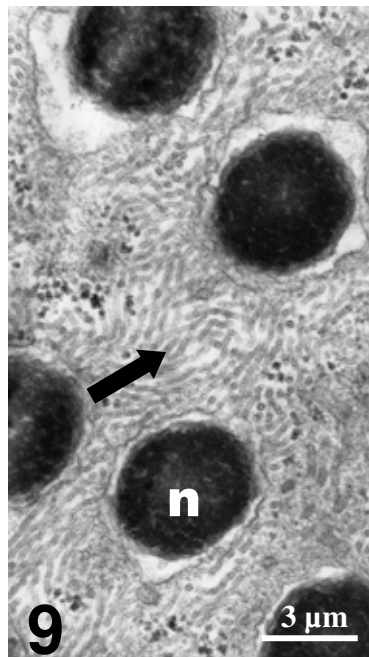
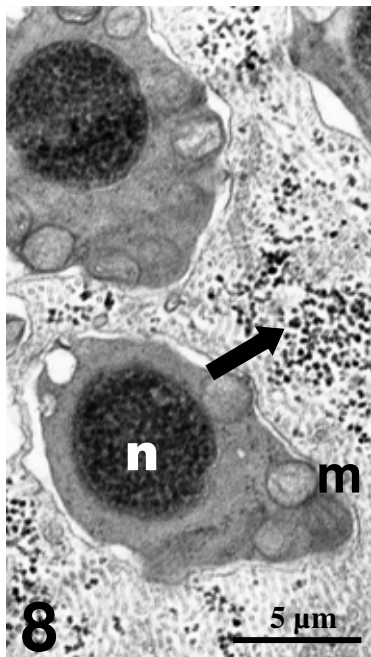
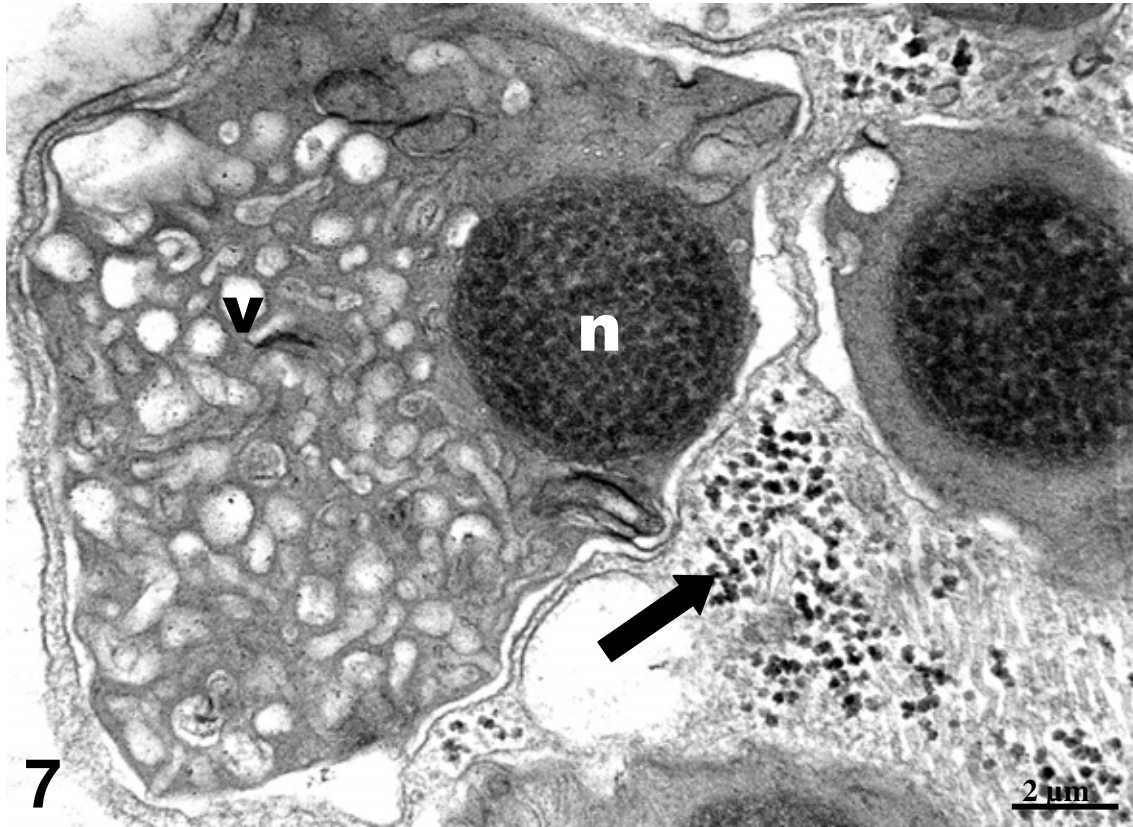


Figura 7 e 8. Espermatídes em secção transversal de *P. nattereri* com o padrão de compactação da cromatina em grumos densos (n), citoplasma com uma grande quantidade de vesículas (v) e mitocôndrias (m). O citoplasma da célula de Sertoli está repleto de grânulos de glicogênio (seta). 71950x; 44480x;

Figuras 9. Espermatídes em secção transversal mostrando o núcleo (n) e citoplasma da célula de Sertoli repleto de microtúbulos (seta). 57550x.

Figura 10. Secção transversal com adiantado grau de compactação nuclear (n). Célula de Sertoli contendo mitocôndrias (m). 34500x.

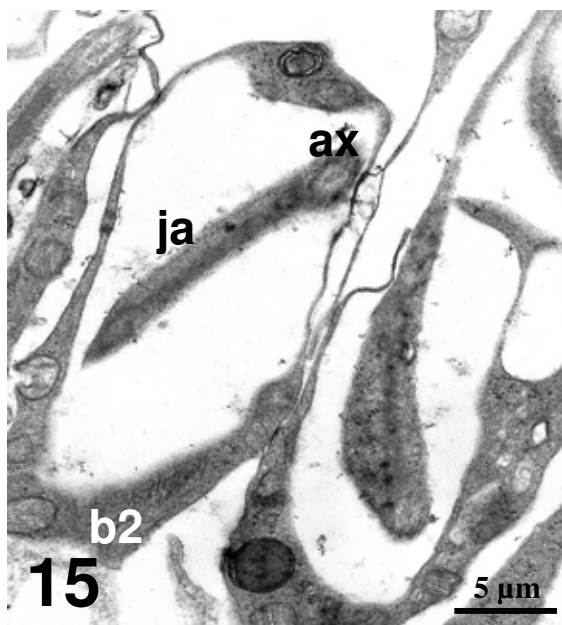
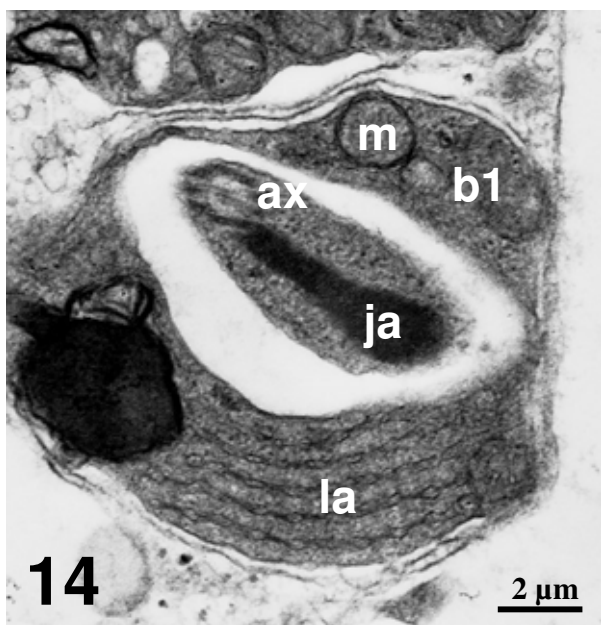
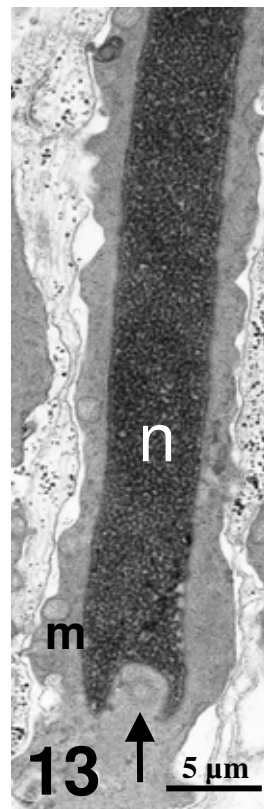
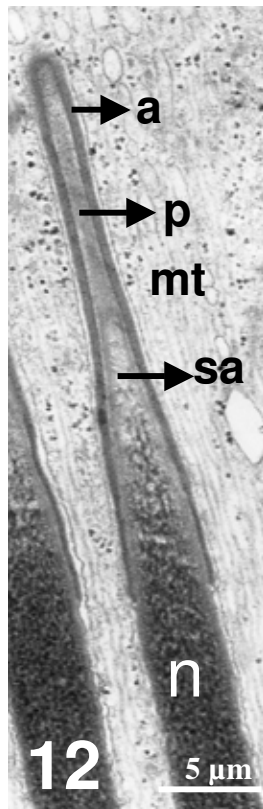
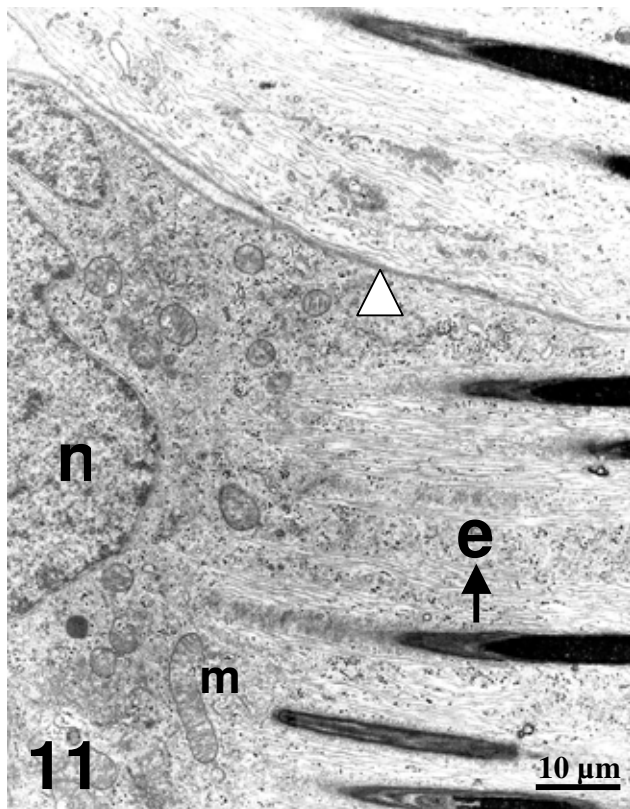


Figura 11. Secção longitudinal em feixe de espermatídes (e) de *P. nattereri* no interior da célula de Sertoli. A célula de Sertoli apresenta núcleo (n) com cromatina frouxa, e no citoplasma observa-se mitocôndrias (m), inúmeros microtúbulos e grânulos de glicogênio ao redor das espermatídes. 12000x.

Figura 12. Secção longitudinal de espermatídes entremeadas pelo citoplasma da célula de Sertoli. Acrossomo (a), perforatorium (p), espaço subacrossomal (sa), núcleo (n) e microtúbulos. (mt) rodeando a espermatíde. 26720x.

Figura 13. Secção longitudinal de espermatíde tardia. Núcleo (n), mitocôndria (m) e centríolo proximal (seta). 29200x.

Figuras 14 e 15. Secção transversal em diferentes alturas na região proximal da cauda, envolta pela bainha citoplasmática. Quanto mais próxima da peça intermediária, a bainha é mais espessa (b1), contendo mitocôndria (m) e lamela anelada (la). À medida que se distancia desta porção, a bainha (b2) torna-se mais delgada. O filamento caudal está representado pelo axonema (ax) e pela fibra justaxonemal (ja). 14 – 55600x, 15 – 26720x.

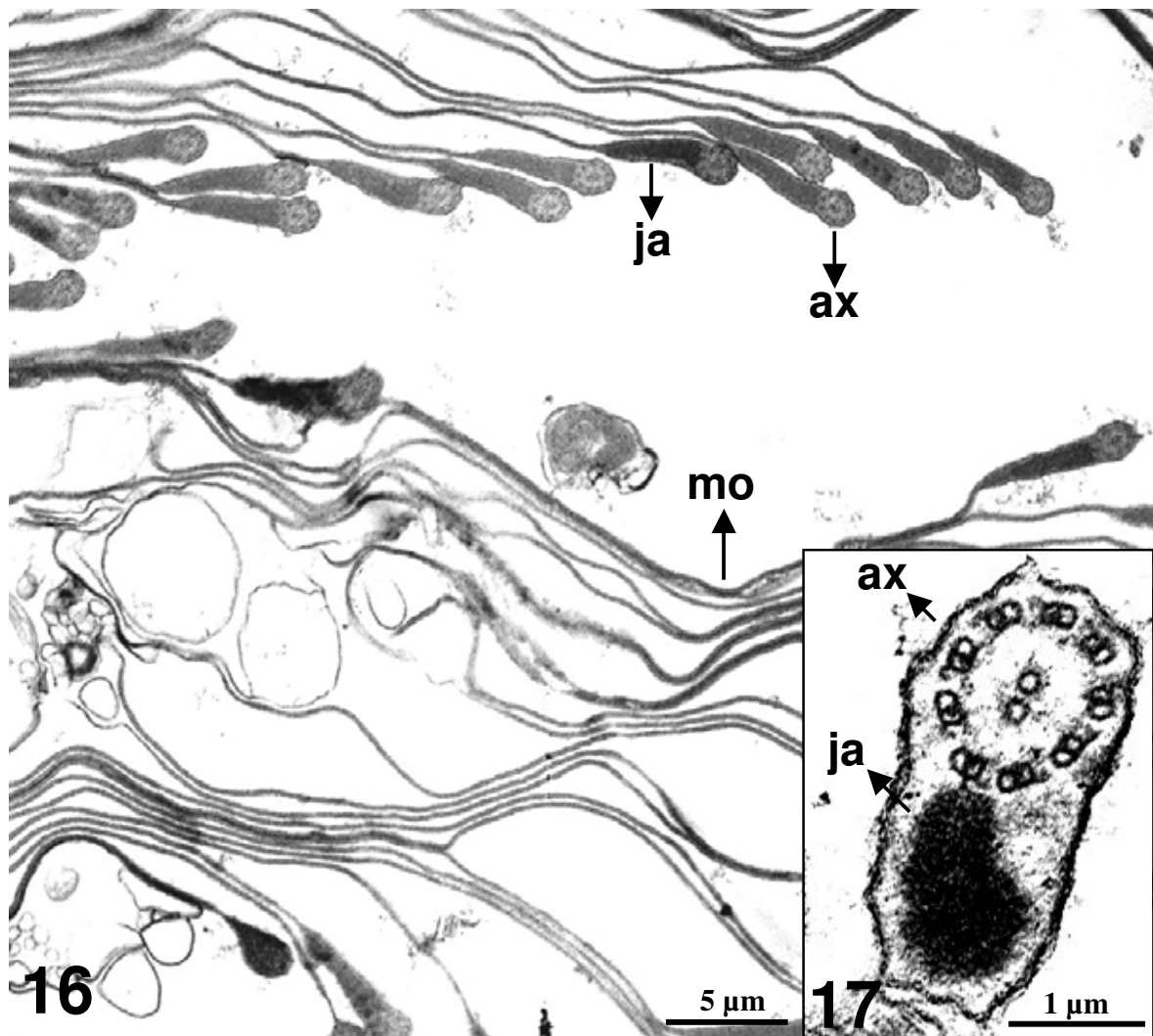


Figura 16 – 17. Secção transversal da porção mediana da cauda de *P. nattereri*. (16) - Axonema (ax), fibra juxtaxonemal (ja) e membrana ondulante (mo); (17) Secção transversal (canto inferior direito) da porção final da cauda.

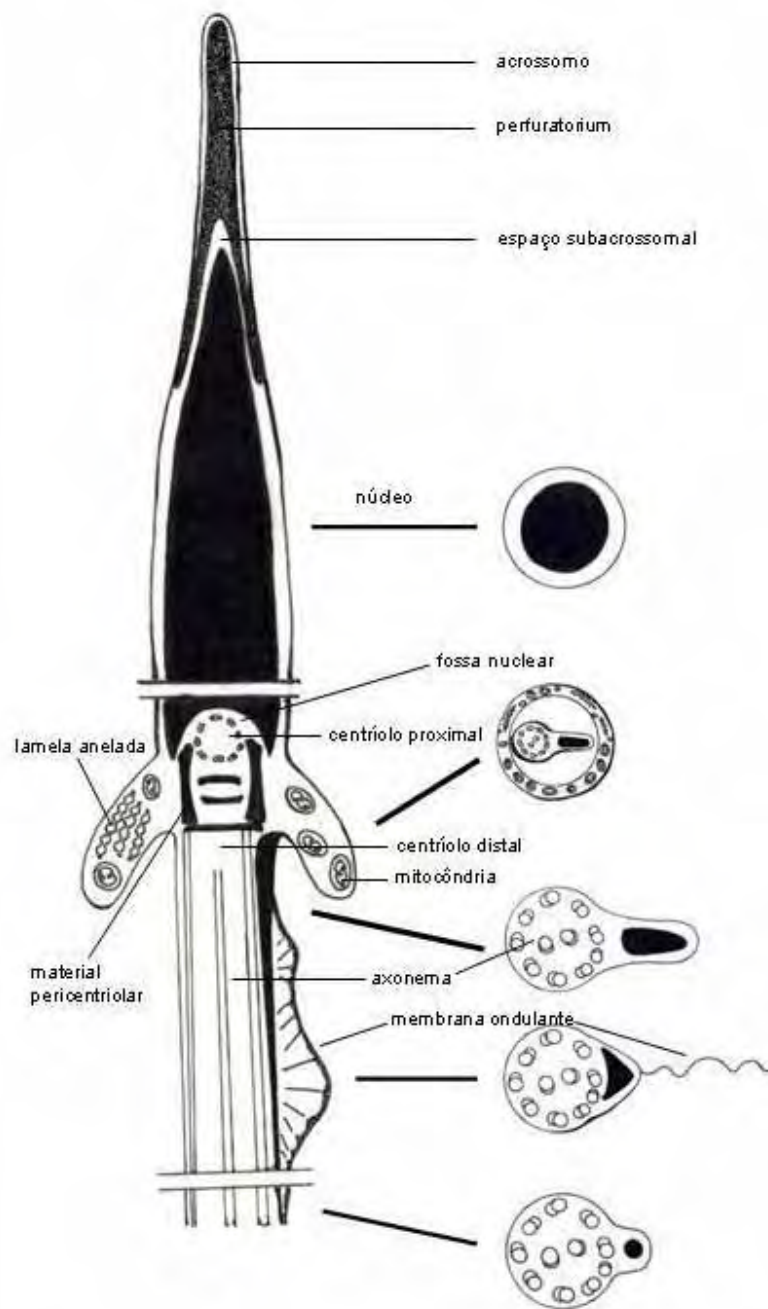


Figura 18. Representação esquemática do espermatozóide de *P. nattereri*.

3. CONCLUSÕES GERAIS

1. As células pigmentares compreendem melanócitos viscerais e melanomacrófagos, estes localizados principalmente nos órgãos hematopoéticos tais como fígado e baço. A este agrupamento denominamos sistema pigmentar extracutâneo. Anatomicamente não há qualquer indício de que exista diferença entre os melanócitos testiculares com àqueles encontrados em várias outras membranas conjuntivas associadas as demais vísceras e estruturas.

2. Em *P. nattereri* e *P. fuscomaculatus*, as análises não revelaram a ocorrência de melanomacrófagos no interstício testicular, o que não descarta a presença dessas células, uma vez que podem apresentar baixa densidade populacional ou poderiam ser observadas no órgão apenas em alguma fase do ciclo reprodutivo ou ainda mediante resposta a processos infecciosos, quando então poderiam ser identificadas.

3. Nas duas espécies a presença, o modo de ocorrência e a quantidade dos tipos celulares viscerais contendo pigmentos são muito variáveis e estão associados com diversos órgãos e estruturas manifestando ampla variação anatômica interindividual. Assim, não foi possível estabelecer padrões para diferenciação interespecíficas.

4. Apesar da variação na distribuição e quantidade dos melanócitos extracutâneo, há indícios de que é possível estabelecer um padrão do sistema pigmentar extracutâneo para diferenciar ambas espécies desse gênero de outras espécies pertencentes a mesma categoria taxonômica mas de outras famílias.

5. A pigmentação marrom escura do testículo de *Physalaemus nattereri* e *P. fuscomaculatus* é uma peculiaridade que ocorre devido à presença dos inúmeros melanócitos que em função de sua citoarquitetura não foi possível o estabelecimento de um protocolo de quantificação. Estas

características morfológicas reforçam a proximidade filogenética entre as duas espécies desse grupo *biligonigerus*.

6. A análise ultra-estrutural destas células nos testículos de *P. nattereri* e *P. fuscomaculatus*, confirma que são melanócitos, pois contém melanosomos de diferentes tamanhos e graus de melanização, sugerindo que a atividade melanogênica ocorre neste local.

7. Embora não se observe características marcantes em ambas as espécies, tanto no aspecto histológico quanto na gametogênese, que acrescente outras informações morfológicas, estes dados corroboram as principais características que já foram descritas para as espécies do gênero. O processo espermatogênético ocorre em lóculos seminíferos, em que o epitélio germinativo é organizado em espermatocistos, muito similar ao descrito para outros anuros.

8. No citoplasma da célula de Sertoli de *P. nattereri* encontra-se uma grande quantidade de glicogênio. Tal fato pode estar associado à grande disponibilidade de alimento encontrado durante o período de reprodução e que coincide com o início da estação chuvosa, servindo como possível fonte de nutrientes para as células espermatogênicas. Essa incomum quantidade de glicogênio ainda não foi relatada para esses tipos celulares em anuros.

9. Na espermiogênese o núcleo das espermatídes de *P. nattereri* sofre gradual condensação e aumento de elétrons-densidade e o processo de alongamento celular é auxiliado por uma grande quantidade de microtúbulos no citoplasma da célula de Sertoli que entremeia as espermatídes. Ao final, o espermatozóide será constituído por uma delgada capa acrossômica revestindo a cabeça afilada, com breve região da peça intermediária, cauda simples provida de membrana ondulante.

10. Os gametas de ambas as espécies possuem o filamento caudal constituído por axonema, membrana ondulante, fibra justaxonemal. O que diferencia de muitos outros anuros é a ausência do bastão axial. Esta ausência pode estar relacionada à deposição e fertilização dos óvulos em águas paradas comum nos Leptodactílídeos.

11. As descrições do gameta de *Physalaemus nattereri* e *P. fuscomaculatus* é outra característica morfológica que reforça a proximidade filogenética entre as duas espécies do grupo *biligonigerus*.