

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**ATIVIDADE NUCLEOLAR DURANTE A
ESPERMATOGÊNESE DE BOVINOS (*Bos indicus*)**

**NUCLEOLAR ACTIVITY DURING SPERMATOGENESIS OF
THE CATTLE (*Bos indicus*)**

Daniele Ferraz Biceglia de Oliveira Coelho

**CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL- BRASIL
MARÇO DE 2007**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**ATIVIDADE NUCLEOLAR DURANTE A
ESPERMATOGÊNESE DE BOVINOS (*Bos indicus*)**

**NUCLEOLAR ACTIVITY DURING SPERMATOGENESIS OF
THE CATTLE (*Bos indicus*)**

**Daniele Ferraz Biceglia de Oliveira Coelho
Prof. Dr. Helder Silva e Luna**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal. Área concentração: Produção Animal

**CAMPO GRANDE
MATO GROSSO DO SUL- BRASIL
MARÇO DE 2007**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Coordenadoria de Biblioteca Central – UFMS, Campo Grande, MS, Brasil)

P436c Oliveira-Coelho, Daniele Ferraz Biceglia.
Atividade nucleolar durante a espermatogênese de bovinos (*Bos indicus*) / Daniele Ferraz Biceglia de Oliveira Coelho. -- Campo Grande, MS, 2007.
30 f. ; 30 cm.

Orientador: Helder Silva e Luna.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

1. Bovino – Reprodução. 2. Espermatogênese em animais.
I. Luna, Helder Silva. II. Título.

DEDICATÓRIA

A Deus, sem Ele nada seria. Sem Ele nada conseguiria.

Aos meus pais, Araci Ferraz e Ângelo Soares Biceglia, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e me incentivando, mesmo nos momentos de lutas e tribulações, quando tudo parecia não dar certo.

Ao meu amado esposo, Anderson de Oliveira Coelho, que abdicou os familiares, amigos e cidade natal a fim de estar ao meu lado, me apoiando nos estudos e compreendendo minhas ausências quando precisava viajar para concretização deste trabalho.

Ao meu filho Pedro Henrique Biceglia Coelho, que ainda não nasceu, mas já é tão amado, um presente tão especial, fruto de um milagre de Deus em nossas vidas.

Aos meus familiares e amigos, que sempre estiveram presentes em todos os momentos e que sempre acreditaram que eu conseguiria atingir meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr Helder Silva e Luna que aceitou me orientar e que abraçou com carinho o projeto, durante a realização do Mestrado.

À Profa Dra Maria Tercilia Vilela Azeredo Oliveira, pelo auxílio na execução do projeto, cedendo o seu laboratório bem como nos agraciando com seus conhecimentos sobre o “ciclo nucleolar”.

Ao Prof. Dr Sebastião Roberto Taboga que cedeu gentilmente o laboratório e sempre se demonstrou atencioso comigo e prestativo para a realização do trabalho.

À doutoranda Rita Luiza Peruquetti, pelo carinho e atenção dispensada a mim, pelo auxílio nas interpretações dos resultados e correção da dissertação.

Ao técnico Luiz Roberto Faleiros Jr, pelo acompanhamento nas realizações das técnicas citoquímicas.

Ao Prof Dr Eurípedes Batista Guimarães, MSc Nilton Marques Carvalho e ao técnico Carlos Delafuente Del Pozo pelo acompanhamento do processamento histológico dos fragmentos testiculares.

À Marilete Otano Peixoto Ferencz, secretária do Mestrado em Ciência Animal-UFMS, pela paciência e solicitude durante o curso e defesa da dissertação de mestrado.

Aos membros das bancas de qualificação e defesa, pela disposição ao avaliar os trabalhos como também pela orientação de como melhorá-lo.

SUMÁRIO

	Pág.
Lista de Abreviaturas	vii
Introdução.....	01
Referências Bibliográficas	08
Artigo: Atividade nucleolar na espermatogênese de novilhos e touros <i>Bos indicus</i>	12
Resumo	12
Abstract	13
Introdução	14
Material e Métodos	16
Resultados.....	18
Discussão.....	24
Conclusão.....	27
Referências Bibliográficas	28

LISTA DE ABREVIATURAS

Gn-RH: Hormônio liberador de gonadotrofinas

FSH: Hormônio folículo estimulante

LH: Hormônio luteinizante

ABP: Proteína de ligação de androgênios

RNAr: RNA ribossômico

RON: Regiões Organizadoras Nucleolares

CDK: Quinases dependes de ciclinas

PNB: Corpos pré nucleolares

RNP: Ribonucleoproteína

DNAr: DNA ribossômico

CB: Corpo cromatóide

RNAm: RNA mensageiro

CEC: Concentração Eletrolítica Crítica

AT: Azul de toluidina

HE: Hematoxilina-eosina

HCl: Ácido clorídrico

INTRODUÇÃO

Espermatogênese

A capacidade reprodutiva de um macho é dependente do desenvolvimento espermatogênico normal e funcional. A produção de esperma nos machos envolve os processos de divisão celular e diferenciação, pelos quais os espermatozóides são produzidos nos testículos (JOHNSON et al., 2000).

A espermatogênese em mamíferos é dependente do eixo hipotalâmico-hipofisário-testicular. A produção de espermatozóides requer uma adequada produção do hormônio liberador de gonadotrofinas (Gn-RH) no hipotálamo seguida por ações endócrinas clássicas das gonadotrofinas hipofisárias, o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH), e por mecanismos de *feedback* da testosterona dos testículos. A liberação do LH dura cerca de 10 a 20 minutos e pode ocorrer três ou mais de oito vezes ao dia (AMANN, 1983).

O hormônio do folículo estimulante, também liberado sob a influência do Gn-RH, tem concentrações mais baixas que aquelas do LH, mas a duração dos pulsos é por muito mais tempo devido à secreção relativamente constante de inibina pelo testículo do adulto. O hormônio luteinizante conduz à produção subsequente de testosterona pela ligação aos receptores da membrana nas células de Leydig dos testículos, enquanto o FSH atua através dos receptores na célula de Sertoli. As células de Leydig são células poliédricas grandes que são encontradas em conjuntos e associadas aos capilares linfáticos e sanguíneos no compartimento intersticial dos testículos (SETCHELL, 1980).

A produção de esteróides pelos testículos é correlacionada com a quantidade de retículo endoplasmático liso nas células de Leydig (ZIRKIN et al., 1980). O colesterol é produzido através do acetato, dentro do retículo endoplasmático liso (AMANN & SCHANBACHER, 1983). A clivagem enzimática da cadeia lateral do colesterol pela enzima do citocromo P450 na mitocôndria resulta na formação de pregnenolona (PAYNE et al., 1995). Esta é a etapa limite na produção de testosterona e formação de pregnenolona (AMANN & SCHANBACHER, 1983). A pregnenolona é

rapidamente convertida à testosterona por intermediários no retículo endoplasmático liso (EWING & BROWN, 1977). O aumento da síntese e da secreção pulsátil de testosterona pelas células de Leydig ocorre em 30 minutos após o início de um episódio de LH (AMANN, 1983).

A testosterona é um hormônio que em machos é responsável pelas características sexuais secundárias e espermatogênese (como as características masculinas de comportamento agressivo, bem como pelo crescimento e na produção) (SEIDEMAN et al., 1982; COSGROVE et al., 1996). A produção periódica da testosterona pelas células de Leydig aumenta as concentrações intertesticulares de testosterona 100 a 300 vezes à concentração no sangue periférico (AMANN & GANJAM, 1976). Como resultado dos três a oito episódios diários de testosterona, os túbulos seminíferos são constantemente banhados no fluido que contém alta concentração (SETCHELL, 1980), e esta concentração intratubular elevada da testosterona parece essencial para a espermatogênese (COUROT et al., 1970).

O estradiol está também envolvido na regulação hormonal da espermatogênese. A produção de estradiol nos testículos é primeiramente das células de Leydig, mas a testosterona é também convertida a estradiol pelas células de Sertoli (VAN DER MOLEN et al, 1981). A testosterona e o estradiol produzidos pelas células de Leydig entram na circulação periférica. Estes esteróides no sangue alcançam o hipotálamo e a hipófise, e exercem um efeito negativo na produção de LH e das gonadotrofinas (AMANN, 1983). Conseqüentemente, as altas concentrações séricas de testosterona ou estradiol resulta na supressão do Gn-RH e LH.

A diferenciação das células de Leydig em novilhos ocorre entre 12 e 16 semanas de idade enquanto que a diferenciação das células de Sertoli entre 16 e 28 semanas de idade (ABDEL-RAOUF, 1961; CURTIS & AMANN, 1981; AMANN, 1983). O número de células de Sertoli nos testículos é estabelecido durante a puberdade e se mantém constante nos machos adultos (GILULA et al., 1976).

As células de Sertoli, as únicas células somáticas dentro dos túbulos seminíferos, têm um importante papel na espermatogênese e fornece o micro-ambiente necessário para o desenvolvimento das células germinativas (AMANN & SCHANBACHER, 1983). Os túbulos são divididos em dois compartimentos pelas junções ocludentes (*tight junctions*) entre as células de Sertoli adjacentes (GILULA et al., 1976; RUSSELL & PETERSON, 1984). As junções ocludentes são um dos componentes da barreira hematotesticular, a qual exclui eficazmente as macromoléculas

sélicas de entrarem no compartimento adluminal das células de Sertoli (GRISWOLD, 1995).

Em resposta ao FSH e à disponibilidade da testosterona, as células de Sertoli secretam a proteína de ligação de androgênios (ABP) e a inibina (STEINBERGER, 1981). No epitélio germinativo, a ABP tem a função de diminuir a mudança nas concentrações da testosterona ou ajudar no transporte de testosterona. A ABP também mantém os níveis de testosterona elevados nos túbulos seminíferos. A inibina suprime a liberação do FSH da adeno-hipófise (RITZEN et al., 1971).

A espermatogênese ocorre no túbulo seminífero e é a soma dos diversos eventos que ocorrem nos testículos resultando na produção de espermatozóides (JOHNSON, 2000). Ela consiste em três divisões principais (espermatocitogênese, meiose, e espermiogênese), que envolve a produção de espermatozóides enquanto mantém os estoques espermatogoniais (COUROT et al., 1970), e tem início nos novilhos por volta de 16 a 20 semanas de idade e a produção de espermatozóides com 32 semanas (CURTIS & AMANN, 1981).

Um túbulo seminífero contém reserva de espermatogônias tipo A0 que não participam do *pool* proliferativo das células germinativas (HOCHEREAU-DE REVIERS, 1987). A espermatocitogênese consiste da proliferação das espermatogônias tipo A1 por mitose e na diferenciação das espermatogônias tipo A2 e este grupo se diferencia até a forma de espermatócito primário (AMANN, 1983; AMANN & SCHANBACHER, 1983). O compartimento basal da célula de Sertoli contém todas as espermatogônias, como também os espermatócitos em pré-leptóteno e leptóteno (AMANN, 1983). Os espermatócitos primários passam através das junções ocludentes entre as células de Sertoli para adentrar o compartimento adluminal (DYM & FAWCETT, 1970; SETCHELL, 1980). Dentro do compartimento adluminal, os espermatócitos continuam, através da meiose, a se dividirem até à forma de espermatócitos secundários, e finalmente tornam-se espermátides após da meiose completa (AMANN, 1983).

Em touros, durante a espermatocitogênese, as espermatogônias tipo A1 são submetidas a seis divisões progressivas (espermatogônias tipo A1, tipo A2, tipo A3, intermediária [tipo In], tipo B1 e tipo B2) para a formação dos espermatócitos primários (HOCHEREAU-DE REVIERS et al., 1987). As células tipo A2 se dividem não somente para produzir muitas células germinativas que eventualmente formarão espermatozóides, mas também são submetidas a divisões específicas para substituir a

população de espermatogônias tipo A1 (AMANN & SCHANBACHER, 1983). Nos adultos, o número de espermatogônias tipo A1 é altamente correlacionado com o número de células de Sertoli (SETCHELL, 1980). Os espermatócitos primários duplicam o seu DNA, são submetidos à meiose antes de se dividirem para formar os espermatócitos secundários (AMANN & SCHANBACHER, 1983). Nos novilhos, entre 16 e 28 semanas de idade, o número de túbulos seminíferos com espermatócitos primários e secundários como células germinativas mais maduras começam a aumentar (CURTIS & AMANN, 1981).

Durante a espermiogênese, as espermátides arredondadas se submetem a mudanças morfológicas a fim de se transformarem em espermatozóides alongados. Em novilhos, entre 28 e 32 semanas de idade, os espermatócitos são gradualmente substituídos por espermátides arredondadas e alongadas (CURTIS & AMANN, 1981).

O ciclo do epitélio seminífero é a progressão através dos estágios celulares em uma posição ao longo do túbulo seminífero. Os tipos celulares mais imaturos estão localizados perto da membrana basal enquanto que os tipos celulares mais avançados no compartimento adluminal. O ciclo de produção do túbulo seminífero é espécie-específica e em touros é de 13,5 dias (JOHNSON et al., 2000), e possui 12 estágios (BERNDTSON & DESJARDINS, 1974; BERNDTSON, 1977; CURTIS & AMANN, 1981). Durante a espermatogênese, as células de uma área do epitélio seminífero prosseguem através de 4,5 ciclos do epitélio seminífero (AMANN, 1983). Conseqüentemente, no touro o processo completo de espermatogônia tipo A a espermatozóides inteiramente diferenciados é de 61 dias (JOHNSON et al., 2000). A onda espermatogênica se refere à orientação espacial ao longo do comprimento do túbulo seminífero que muda a todo tempo. Durante a onda, cada estágio do túbulo seminífero se torna um estágio sucessivamente mais avançado. A onda permite um fornecimento relativamente constante de espermatozóides no epidídimo, criando um *pool* constante de esperma para a ejaculação (SENGER, 1997). A caracterização de um bovino como possuindo uma gametogênese normal pode ser realizada através da quantificação de túbulos seminíferos no estágio VIII do epitélio seminífero (AMANN & ALMQUIST, 1962).

O número total de células espermáticas produzidas pelos testículos de bovinos é superior às reservas espermáticas extra-gonadais, sugerindo que há redução na população de espermatozóides ao longo dos ductos eferentes (ALMQUIST & AMANN, 1961). Esta redução está relacionada com a seleção de espermatozóides com

determinados tipos de defeitos, durante sua passagem pelo epidídimo (RAO et al., 1980). Quando estivermos fundamentados nos conhecimentos do processo da espermatogênese e mecanismos de fecundação, poderemos manipular a dose inseminante, para compensar o desequilíbrio que possa existir entre a população de células normais e anormais (FELICIANO-SILVA, 1998).

Ciclo Nucleolar

Muitos aspectos das células espermáticas têm sido estudados em alguns animais. Assis et al. (2002) e Peruquetti et al. (2005) analisaram o nucléolo de células espermáticas em roedores. Porém não há estudos desse tipo em bovinos.

Sabe-se, comprovadamente, que o nucléolo é uma estrutura nuclear comum a todas as células eucarióticas, sendo responsável pela biogênese dos ribossomos. A biogênese ocorre através de uma série de eventos que envolvem a transcrição de genes RNAr, processamento dos pré-RNAs ribossômicos e reunião de partículas pré-ribossomais (SCHEER et al., 1997).

A formação do nucléolo é um processo dinâmico no desenvolvimento da vida da célula sendo denominado nucleologênese. Visto ao microscópio eletrônico, o nucléolo geralmente apresenta três domínios nucleolares maiores que, durante a nucleologênese, desorganizam-se e reorganizam-se no ciclo celular (ZATSEPINA et al., 1997).

Quando as células entram em mitose e cessa-se a transcrição do DNAr na prófase, os nucléolos desintegram-se estruturalmente e a maior parte das proteínas nucleolares migra para o citoplasma, sendo que algumas permanecem associadas às Regiões Organizadoras Nucleolares (RONs) dos cromossomos mitóticos ou ligam-se à periferia cromossômica. A transcrição do DNAr é reativada após a segregação dos cromossomos na anáfase e, então, os nucléolos gradualmente reorganizam-se (OCHS et al., 1985; GONZALEZ-GARCIA & RUFAS, 1995). Os mecanismos que governam a formação e a manutenção dos nucléolos funcionais envolvem atividades de proteínas conhecidas como quinases dependentes de ciclinas (CDKs) que acoplam o ciclo celular à biogênese dos ribossomos (SIRRI et al., 2002).

Mello (1995) utilizando células somáticas de mamíferos e baseando-se no padrão metacromático dessas células, devido à presença de moléculas de RNA, observou que durante as fases de prometáfase e metáfase inicial havia um

“deslocamento” do material nucleolar metacromático para as proximidades dos cromossomos, além da presença de corpos pré-nucleolares metacromáticos que permaneciam nas extremidades da placa cromossômica, ou afastados dos cromossomos. Os corpos pré-nucleolares (PNBs) são estruturas transitórias que servem como blocos de construção para o nucléolo na transição mitose/interfase. A organização dos PNBs e seu trajeto ainda não foi claramente entendido. Contudo, estudos demonstraram que existem diferentes tipos de PNBs cuja translocação para o nucléolo seguem cinéticas ordenadas (FOMPROIX & HERNANDEZ-VERDUN, 1999).

Essa relação entre a estrutura e a função das sub-estruturas nucleolares também foi estudada em células somáticas de embriões de coelhos. Foi verificado que a nucleologênese estendia-se além dos primeiros quatro ciclos celulares e não podia ser sincrônica em cada blastômero. Quando observadas ao microscópio de luz, as proteínas nucleolares exibiam uma mudança no padrão de distribuição durante a nucleologênese. Em estágios iniciais, pequenos pontos e marcações semelhantes a corpos pré-nucleolares (PNBs) eram distribuídos dentro de todo o núcleo. Em algumas células embrionárias, essas proteínas começavam a acumular-se em finas camadas irregulares rodeando os corpos pré-nucleolares em processo de ativação. Os autores consideraram que este processo de reorganização poderia ter uma relação com a redistribuição da cromatina e dos componentes da matriz nuclear/nucleolar, durante a ativação da transcrição do DNA ribossômico (DNAr) localizado na superfície do corpo pré-nucleolar (BARAN et al., 1997).

A presença do nucléolo durante a divisão celular, conhecida como “persistência do material nucleolar”, também já foi observada, em divisões mitóticas, nos dinoflagelados e em células malignas de mamíferos (WACHTLER & STHAL, 1993) e, na meiose, em túbulos seminíferos de insetos hematófagos da família Triatominae (TARTAROTTI & AZEREDO-OLIVEIRA, 1999) e em roedores (ASSIS et al., 2002 e PERUQUETTI et al., 2005).

Na primeira observação sobre a distribuição celular de RNA durante a espermatogênese, realizada com a técnica citoquímica Periodic Acid-Schiff (PAS), as espermatogônias mostraram uma clara reação positiva, indicando que a afinidade do citoplasma ao corante gradualmente decresceu até no começo do paquíteno. Na metade do paquíteno a reação positiva aumentou para ser novamente diminuída, gradualmente, durante o final do paquíteno, no diplóteno, nos espermatócitos secundários e nas espermátides. Nas espermátides jovens um corpúsculo, denominado “corpo cromatóide”

(CB), foi evidentemente corado (CLERMONT & LEBLOND, 1955). O CB é uma estrutura citoplasmática perinuclear em células germinativas masculinas, e que está relacionado a uma parte do processamento do RNA nas células somáticas (KOTAJA et al. , 2006).

Em roedores (*Mus musculus* e *Rattus norvegicus*), a atividade nucleolar persiste até o final da prófase I (diplóteno-diacinese) quando, então, ocorre a fragmentação dessa estrutura em pequenos corpúsculos. Os produtos originados da transcrição nucleolar, isto é, moléculas de RNAr associadas a proteínas ácidas específicas, recém-sintetizadas, agrupam-se em partículas de ribonucleoproteínas (RNPs). Essas partículas de RNP se reúnem formando o “corpo cromatóide”, representando, assim, uma reserva de RNA e proteínas que será utilizada ao longo do processo meiótico. Nas fases iniciais da espermiogênese foi visível nas espermatídes um corpúsculo de RNP, ou, às vezes, dois ou três corpúsculos (ASSIS et al., 2002; PERUQUETTI, 2005). Análises ultraestruturais mostraram um material similar ao CB, próximo ao complexo sinaptonêmico, indicando que este material pode armazenar RNAm, transcrito nesta fase. Nas espermatídes iniciais, o CB foi evidenciado em associação com o complexo de Golgi e vesículas desta organela, indicando que esta estrutura participa na formação do acrossomo. Nas espermatídes tardias, o CB foi evidenciado próximo ao axonema, sugerindo que esta estrutura sustenta a formação da peça intermediária e da cauda dos espermatozóides (PERUQUETTI, 2005).

Na pecuária moderna, tem sido constante a procura pelas causas e soluções para suplantar a baixa taxa de fertilidade. O estabelecimento das características do sêmen no exame de rotina não é suficiente para a predição da fertilidade, pois proporciona o conhecimento de fatores que dão à chance do espermatozóide alcançar o ovócito, porém, não asseguram a habilidade deste se ligar ao mesmo, penetrar, fecundar e desenvolver o embrião. Entretanto, a avaliação do espermograma depende do conhecimento do processo da espermatogênese, das estruturas normais e anormais (FELICIANO-SILVA, 1998).

Acredita-se que a persistência nucleolar é necessária e importante para os eventos característicos que ocorrem durante a espermiogênese, ou seja, o processo de diferenciação de espermatíde a espermatozóide. E quando estivermos fundamentados nos conhecimentos do processo da espermatogênese e dos mecanismos de fecundação, poderemos manipular a dose inseminante, para compensar o desequilíbrio que possa existir entre a população de células normais e anormais.

Contudo, não há relatos sobre o processo de nucleologênese na meiose de bovinos, que possuem grande importância econômica para o país. Apesar dos diferentes enfoques dados a essas estruturas (PNBs) e a todo o processo de nucleologênese, há muito a ser analisado, principalmente durante a divisão celular meiótica das células gaméticas, por seu possível papel com o processo da espermiogênese. Dessa forma, no presente trabalho, foram realizadas análises estruturais descritivas da atividade encontrada nas células dos túbulos seminíferos de bovinos da raça Nelore (novilhos e touros), com ênfase ao ciclo nucleolar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAOUF, M. The proliferation of germ cells in testes of bull calves and young bulls. **Acta Vet. Scand.** n.2, p.22-31, 1961.

ALMQUIST, J.O., AMANN, R.P. Reproductive capacity of dairy bulls. II. Gonadal and extra-gonadal sperm reserves as determined by direct counts and depletion trials; dimensions and weight of genitalia. **J. Dairy Sci.**, n.44, p.1668-78, 1961.

AMANN, R.P. Endocrine changes associated with onset of spermatogenesis in Holstein bulls. **Journal of Dairy Science**, n. 66, p. 2606–22, 1983.

AMANN, R. P.; ALMQUIST, J. O. Reproductive capacity of dairy bull vii; Morphology of epididymal sperm. **J. of Dairy Science**, n.45, p.15-16, 1962.

AMANN, R.P.; GANJAM, V.K. Steroid production by the bovine testis and steroid transfer across the pampiniform plexus. **Biol Reprod.** n.15, v.5, p.695–703, 1976.

AMANN, R. P.; SCHANBACHER, B. D. Physiology of male reproduction. **J. Anim. Sci.** n.57(Suppl. 2), p.380, 1983.

ASSIS, I.M.; SOUZA, R.S.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. **Atividade nucleolar durante a espermatogênese de *Rattus norvegicus***. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOLOGIA CELULAR, XI, Porto Alegre, RS, p.195, n. 350, 2002.

BARAN, V., MERCIER, Y., RENARD, J. P. et al. Nucleolar substructures of rabbit cleaving embryos: An immunocytochemical study. **Molecular Reproduction and Development**, v. 48, n.1, p.34-44, set. 1997.

BERNDSTON, W.E. Methods for quantifying mammalian spermatogenesis: a review. **J. Anim. Sci.**, v.44, p.818-833, 1977.

BERNDSTON, W.E.; DESJARDINS, C. The cycle of the seminiferous epithelium and spermatogenesis in the bovine testis. **American Journal of Anatomy**, v.140, p.167-178, 1974.

CLERMONT, Y., LEBLOND, C.P. Spermiogenesis of man, monkey, ram, and other mammals as shown by the “periodic acid-Schiff” technique. **Amer. J. Anat.** v. 96, p. 229-253, 1955.

COSGROVE, G. P.; KNIGHT, T. W.; LAMBERT, M. G.; DEATH, A. F. Effects of post-pubertal castration and diet on growth rate and meat quality of bulls. **Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.**, v.56, p.390-393, 1996.

COUROT, M.; HOCHEREAU-DE-REVIERS, M.T.; ORTAVANT, R. Spermatogenesis. In: JOHNSON, A.D.; GOMES, W.R.; VANDEMARK, N.L. (Eds.). **The testis**. New York: Academic Press, v.1, cap.6, p.339-432, 1970.

CURTIS, S.K.; AMANN, R.P. Testicular development and establishment of spermatogenesis in Holstein bulls. **Journal of Animal Science**, v.53, n.6, p.1645-1657, 1981.

DYM, M.; FAWCETT, D.W. The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. **Biol Reprod.** Dez n.3, v.3, p.308–326, 1970.

EWING, L.L. & BROWN, B.L. **Testicular steroidogenesis**. In: JOHNSON, A.D. & GOMES, W.R. The testis. v.4. New York, Academic Press, v.4. 239p, 1977.

FELICIANO SILVA, E.D. Reação acrossômica induzida: método indicador de fertilidade de touros. Brasília: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 1998. 38p.

FOMPROIX, N.; HERNANDEZ-VERDUN, D. Effects of Anti-PM-Scl 100 (Rrp6p Exonuclease) Antibodies on Prenucleolar Body Dynamics at the End of Mitosis. **Experimental Cell Research**, n.251, p.452–464, 1999.

GILULA, N.B.; FAWCETT, D.W.; AOKI, A. The Sertoli cell occluding junctions and gap junctions in mature and developing mammalian testis. **Dev Biol.** Mai, v. 50, n.1, p.142–168, 1976.

GONZÁLES-GARCIA, J. M., RUFAS, J. S. Nucleolar cycle and localization of NORs in early embryos of *Parascaris univalens*. **Chromosoma**, v.104, p.287-97, 1995.

GRISWOLD M. D. Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis. **Biol. Reprod.**, n.52, p. 211-216, 1995.

HOCHEREAU-DE RIVIERS, M. T., MONET-KUNTZ, C., COUROT, M. Spermatogenesis and Sertoli cell numbers and function in rams and bulls. **J. Reprod. Fert.**, v. 34, p. 101, 1987.

JOHNSON, L. A. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. **Anim. Reprod. Sci.**, n.60, p.93-107, 2000.

KOTAJA, N.; BHATTACHARYYA, S.N.; JASKIEWICZ, L. et al. The chromatoid body of male germ cells: Similarity with processing bodies and presence of Dicer and microRNA pathway components. **PNAS**, v. 103, n. 8, p. 2647–2652, 2006.

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

OCHS, R. L., LISCHWE, M. A., SHEN, E. et al. Nucleologenesis: Composition and fate of prenucleolar bodies. **Chromosoma**, v.92, n.5, p.330-6, 1985.

PAYNE, C.M.; BERNSTEIN, C.; BERNSTIEN, H. Apoptosis overview emphasizing the role of oxidative stress, DNA damage and signal-transduction pathways. **Leuk Lymphoma**, n.19, p. 43-9, 1995.

PERUQUETTI, R. L.; TABOGA, S. R.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. A study of the nucleolar cycle in the seminiferous epithelium of *Rattus norvegicus*. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v. Suple., p. 25-25, 2005.

RAO, R. A., BANE, A. GUSTAFSSON, B.K. Changes in the morphology of spermatozoa during their passage through the genital tract in dairy bulls with normal and impaired spermatogenesis. **Theriogenology**, n.14, p.1-12, 1980.

RITZEN, E.M.; NAYFEH, S.N.; FRENCH, F.S.; DOBBINS, M.C. Demonstration of androgen-binding components in prostate and other tissues. **Endocrinology**, n.9, p.143-151, 1971.

RUSSELL, L.D.; PETERSON, R.N. Determination of the elongate spermatid-Sertoli cell ratio in various mammals. **J. Reprod. Fertil.**, v.70, p.635-641, 1984.

SCHEER, U., XIA, B., MERKERT, H. *et al.* Looking at Christmas trees in the nucleolus. **Chromosoma**, v.105, n.7-8, p.470-80, 1997.

SEIDEMAN, S. C.; CROSS, H. R.; OLTJEN, R. R. *et al.* Utilization of the intact male for red meat production: a review. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.55, p.826, 1982.

SENGER, P.L. Pathways to Pregnancy and Parturition. **The Mack Printing Group-Science Press**, Ephrata, 272p., 1997.

SETCHELL, B.P.. The Functional significance of the Blood-testis Barrier. **J. Androl.**, n.1, p. 3-10, 1980.

SIRRI, V.; HERNANDEZ-VERDUN, D.; ROUSSEL, P. Cyclin-dependent kinases govern formation and maintenance of the nucleolus. **The Journal of Cell Biology**. v.156, n.6, 2002.

STEINBERGER A. Regulation of inhibin secretion in the testis; In: **Intragonadal regulation of reproduction** (eds) P Franchimont and C P Channing (New York: Academic Press), p.283-298, 1981.

TARTAROTTI, E., AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Patterns of nucleolar activity during spermatogenesis of two triatomines, *Panstrongylus megistus* and *P. herreri*. **Caryologia**, v. 5, n 3-4: 177-184, 1999.

VAN DER MOLEN, H.J.; BRINKMANN, A.O.; DE JONG, F.H.; ROMMERTS, F.F. Testicular oestrogens. **J Endocrinol.**; n.89(suppl), p.33 -46, 1981.

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

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

ZIRKIN, B.R.; EWING, L.L.; KROMANN, N.; COCHRAN, R.C. Testosterone secretion by rat, rabbit, guinea pig, dog, and hamster testes perfused in vitro: correlation with Leydig cell ultrastructure. **Endocrinology**, n.107, p.1867–1874, 1980.

TÍTULO: ATIVIDADE NUCLEOLAR DURANTE A ESPERMATOGÊNESE EM BOVINOS (*Bos indicus*).

RESUMO

A espermatogênese é um processo muito importante para a predição de fertilidade na pecuária moderna. Muitos aspectos desse processo têm sido estudados, inclusive as várias estruturas celulares, como o nucléolo. Sabe-se que, durante a divisão celular, o nucléolo se desorganiza, reorganizando-se apenas no final da telófase. O presente estudo teve como objetivo analisar estruturalmente, por meio de técnicas citoquímicas específicas - Hematoxilina-eosina, Azul de Toluidina, Impregnação por íons prata, Reação de Feulgen e Variante de CEC – a espermatogênese de bovinos, com ênfase no ciclo nucleolar. Foram utilizados fragmentos testiculares de 10 novilhos e 7 touros com aproximadamente 18 e 60 meses, respectivamente. Foi observado que, durante a divisão celular, os nucléolos, após se desestruturarem, se reorganizaram em pequenos corpúsculos, denominados corpúsculos pré-nucleolares. Esses corpúsculos permaneceram com a mesma atividade nucleolar, ou seja, transcrevendo RNAr. Além disso, pode-se observar diferenças qualitativas da espermatogênese bovina, quanto à idade. Tanto nos novilhos quanto nos touros houve a persistência nucleolar, porém, a marcação de proteínas nucleolares nos espermatozóides foi diferencial. Nos touros, a cromatina apresentou-se com menor área, em relação aos espermatozóides dos novilhos. Essas observações verificadas na espermatogênese de bovinos indicam que a persistência nucleolar está presente nos eventos característicos que ocorrem durante a diferenciação de espermátide a espermatozóide. Esses eventos podem estar relacionados com a compactação da cromatina, formação do acrossomo e do flagelo.

Palavras-chave: reprodução; nucleologênese; PNBs; espermiogênese; corpo cromatóide.

TITLE: NUCLEOLAR ACTIVITY IN BOVINE SPERMATOGENESIS (*Bos indicus*).

ABSTRACT

Spermatogenesis is a very important process for the prediction of fertility in the modern cattle. Many aspects of this process have been studied, also the some cellular structures, as nucleolus, for example. It is known that, during the cellular division, the nucleolus disassemble, assembling itself only in the end of telophasis. The present study it had as objective to analyze structurally, by means of specific citochemical techniques - Hematoxylin-eosine, Toluidine blue, silver impregnation, Feulgen reaction and Variant of critical electrolyte concentration (CEC) – the bovine spermatogenesis, with emphasis to nucleolar cycle. Has been used testis fragments of 10 steers and 7 bulls with approximately 18 and 60 months, respectively. It was observed that, during the cellular division, the nucleolus had after assembled in small bodies, called prenucleolar bodies. These small bodies had remained with the same nucleolar activity, or either, transcribing RNAr. Moreover, qualitative differences of the bovine spermatogenesis had been able to be observed, in relation the age. As much in the steers how much in the bulls it had the nucleolar persistence, however, the nucleolar proteins marking in the spermatozoa was distinguishing. In bulls, the chromatin was presented with lesser area, in relation to the spermatozoa of the steers. These comments verified in spermatogenesis of bovines indicate that the nucleolar persistence is present in events that occur during the differentiation of spermatids to the spermatozoon. These events can be related with the compacting of the chromatin, formation of acrosomo and tail.

Keywords: reproduction; nucleologenesi; PNBs; spermiogenesis; chromatoid body.

INTRODUÇÃO

Na pecuária bovina moderna, a fertilidade é um dos mais importantes atributos, pois a transmissão de qualquer característica desejável do indivíduo ou rebanho é dela dependente. O estabelecimento das características do sêmen no exame de rotina é suficiente para a predição da fertilidade do reprodutor em seleção, mas não completo, porque proporciona o conhecimento de fatores que dão à chance do espermatozóide alcançar o ovócito, porém, não asseguram a habilidade deste se ligar ao mesmo, penetrar, fecundar e desenvolver o embrião. Entretanto, a avaliação do espermograma depende do conhecimento prévio do processo da espermição, das estruturas normais e anormais, da relação e das possíveis conseqüências do uso desse sêmen (FELICIANO SILVA et al., 1993). Portanto, quando estivermos fundamentados nos conhecimentos do processo da espermatogênese e dos mecanismos de fecundação, poderemos manipular a dose inseminante, para compensar o desequilíbrio que possa existir entre a população de células normais e anormais.

Nos bovinos, o número total de células espermáticas produzidas pelos testículos é superior às reservas espermáticas extra-gonadais, sugerindo que há redução na população de espermatozóides ao longo dos ductos eferentes. Esta redução está relacionada com a seleção de espermatozóides com determinados tipos de defeitos, durante sua passagem pelo epidídimo (HORN et al., 2002). Alguns aspectos das células espermáticas têm sido estudados em alguns animais. Assis et al. (2002) e Peruquetti et al. (2005) analisaram o ciclo nucleolar de células espermáticas de roedores. Porém não há estudos desse tipo em bovinos.

O nucléolo é uma estrutura nuclear comum a todas as células eucarióticas, sendo responsável pela biogênese dos ribossomos, por meio de uma série de eventos que envolvem a transcrição de genes RNAr, processamento dos pré-RNAs ribossômicos e reunião de partículas pré-ribossomais (SCHEER et al., 1997). A formação do nucléolo é um processo dinâmico no desenvolvimento da vida da célula sendo denominado nucleologênese (ZATSEPINA et al., 1997).

A presença do nucléolo durante a divisão celular, conhecida como “persistência do material nucleolar”, também já foi observada, em divisões mitóticas, nos dinoflagelados e em células malignas de mamíferos (WACHTLER & STAHL, 1993) e, na meiose, em túbulos seminíferos de insetos hematófagos da família

Triatominae (TARTAROTTI & AZEREDO-OLIVEIRA, 1999) e em roedores (ASSIS et al., 2002; PERUQUETTI et al., 2005).

Em análises da meiose de duas espécies de roedores (*Mus musculus* e *Rattus norvegicus*), foi observado que a atividade nucleolar persiste até o final da prófase I quando, então, ocorre a fragmentação dessa estrutura em pequenos corpúsculos. Os produtos originados da transcrição nucleolar, isto é, moléculas de RNAr associadas a proteínas acídicas específicas, recém-sintetizadas, agrupam-se em partículas de ribonucleoproteínas (RNPs). Essas partículas de RNP se reúnem formando o “corpo cromatóide”, que representa, assim, uma reserva de RNA e proteínas que será utilizada ao longo do processo meiótico. Nas fases iniciais da espermiogênese foi visível nas espermátides um corpúsculo de RNP, ou, às vezes, dois ou três corpúsculos (ASSIS et al., 2002; PERUQUETTI et al., 2005).

O corpo cromatóide (CB) é uma estrutura citoplasmática, perinuclear, de células germinativas masculinas. Em estudos recentes, encontrou-se alta concentração de CBs em Dicer, uma enzima envolvida no processamento do RNAr. As Dicer interagem com um componente do CB específico de células germinativas, o RNA helicase, sendo importante para o controle pós-meiótico de células germinativas masculinas em diferenciação (KOTAJA et al., 2006).

Por meio de técnicas de fluorescência, observou-se a interação dos complexos RNA/proteínas. Segundo os autores, a maneira como ocorrem as interações entre proteínas e RNAr no nucléolo indica que os corpos pré nucleolares (PNBs) são plataformas pré-formadas importantes para o processamento do RNAr (ANGELIER et al., 2005). A dinâmica dos PNBs sugere uma estabilidade favorecendo a residência dos fatores de processamento que são, então, liberados de uma maneira tempo-dependente. As análises no intervalo de tempo da transferência de energia da fluorescência demonstrou que o processamento dos complexos ocorrem nos PNBs (HERNANDEZ-VERDUM, 2005).

Portanto, acredita-se que a persistência do material nucleolar durante a espermatogênese seja necessária e importante para os eventos característicos que ocorrem durante a espermiogênese, ou seja, durante a diferenciação de espermátides em espermatozóides. Contudo, os bovinos, que têm grande importância econômica para o país, não possuem relatos sobre o processo de nucleogênese durante a espermatogênese.

Dessa forma, no presente trabalho, foram realizadas análises estruturais das células dos túbulos seminíferos de novilhos e touros da raça Nelore, para observação da nucleogênese.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Biológico

Foram utilizados fragmentos de testículos de 10 novilhos e 7 touros, da raça Nelore, com idades respectivas de, aproximadamente, 18 e 60 meses. As coletas foram realizadas entre os meses de Janeiro e Julho de 2006.

Os testículos dos novilhos foram obtidos numa fazenda com manejo de castração, a 5 km de Aquidauana-MS, e os testículos dos touros foram coletados em um frigorífico localizado na cidade de Anastácio-MS, após o abate e evisceração dos animais.

Tratamento das Amostras Testiculares

Pequenos fragmentos do parênquima testicular foram removidos e fixados em Bouin e Carnoy. Posteriormente, foram realizados os procedimentos rotineiros de histotecnologia, para inclusão em parafina.

Desses fragmentos testiculares incluídos em parafina foram obtidos cortes de 3 µm em micrótomo Leica RM 2155. Esses cortes foram submetidos a algumas técnicas citoquímicas para acompanhar a distribuição do material nucleolar nas células espermatozóides.

Protocolo das Técnicas Histológicas

Hematoxilina-Eosina (RIBEIRO & LIMA, 2000): Coloração de rotina para análise geral da morfologia dos túbulos seminíferos.

Após a fixação, a inclusão em parafina e a microtomia, o material foi submetido ao seguinte protocolo: Desparafinizar; reidratar; mergulhar em Hematoxilina de Harris por

7 minutos; lavar em água corrente por 10 minutos; mergulhar 6 vezes em álcool 80%; mergulhar em Eosina por 30 segundos; desidratar; diafanizar; montar.

Azul de Toluidina pH 4,0 (MELLO & VIDAL, 1980): Análise da cromatina e dos cromossomos das células da linhagem germinativa.

Após a fixação, a inclusão em parafina e a microtomia, o material foi submetido ao seguinte protocolo: Desparafinizar; reidratar; Azul de Toluidina pH 4,0 (15 minutos); lavar em água corrente para tirar o excesso de corante; secar ao ar; diafanizar com Xilol III; montar.

Variante da técnica da Concentração Crítica de Eletrólitos - CEC (VIDAL & MELLO, 1987; TABOGA et al., 1994; MELLO, 1997): Identificação e acompanhamento do nucléolo, dos corpúsculos nucleolares (PNBs) e do RNAr citoplasmático nas células meióticas.

Após a histotecnologia de rotina, o material foi submetido à desparafinização e ao seguinte protocolo: Fixar o material em ácido-etanol acético (3:1), durante 1 minuto; enxaguar em etanol 70%, por 3-5 minutos; secar ao ar; corar com Azul de Toluidina a 0,025%- diluído em tampão McIlvaine pH 4.1, por 15 minutos; mergulhar o material em solução de $MgCl_2$ a 0,05 M, por 15 minutos; lavar rapidamente em água destilada; deixar o material secar ao ar (no mínimo 6 horas); clarificar em xilol e montar em bálsamo do Canadá.

Reação de Feulgen (MELLO & VIDAL, 1980, com modificações): Método específico para DNA, destacando cromatina e cromossomos.

Após a histotecnologia de rotina, o material foi submetido à desparafinização e ao seguinte protocolo: Parte 1- Hidrólise: HCl 4N durante 1h e 5 minutos, com controle do tempo. Parte 2- Reativo de Schiff: Tirar o Schiff da geladeira; colocar as lâminas em cubeta; preparar HCl 0,1 N e deixar na geladeira (tirar somente uns 10 minutos antes de ser utilizado); colocar HCl 4N nas cubetas e deixar por 1 h e 5 minutos. A temperatura ambiente deve ser acompanhada constantemente e estar em torno de 25 °C; tirar o HCl 4N e colocar HCl 0,1 N gelado (somente um banho rápido para parar a hidrólise); adicionar o reativo de Schiff na cubeta e deixar por 40 minutos, e, imediatamente, cobrir com papel alumínio; para finalizar: 3 banhos em água sulfurosa, por 5 minutos cada um (sempre manter coberto com papel alumínio); 3

banhos rápidos em água destilada.; deixar secar (sempre protegido da luz). Para montar as lâminas: banho de xilol por 15 minutos e montagem em Bálsamo do Canadá.

Impregnação pelos íons prata (HOWELL & BLACK, 1980): Identificação das proteínas nucleolares, marcando os nucléolos e Regiões Organizadores Nucleolares (RONs), em diferentes fases celulares da espermatogênese [espermatogônias, espermátocitos (I e II) e espermátides].

Após a histotecnologia de rotina, o material foi submetido à desparafinização e ao seguinte protocolo: Tratar a lâmina contendo o material a ser analisado, com uma gota de solução reveladora (solução de gelatina a 2%, acrescida de ácido fórmico); adicionar sobre essa, duas gotas de solução de Nitrato de Prata a 50% e misturá-las; cobrir com lamínula; colocar as lâminas em placa de Petri contendo papel de filtro umedecido com água deionizada e incubar as lâminas em estufa a 70°C, durante 8 a 12 minutos (acompanhar até a mistura das soluções tornar-se marrom dourada); lavar cada lâmina em água deionizada até que a lamínula se solte; deixar secar ao ar; montar a lâmina com Bálsamo do Canadá.

Fotomicrografias

Todas as lâminas foram analisadas e os resultados documentados por fotomicrografias obtidas em microscópios *Olympus*, modelo BX 41, com sistema fotográfico acoplado (PM-20 AK automático), utilizando-se filmes coloridos (Kodak 100 ASA) que foram revelados e ampliados em laboratórios fotográficos.

RESULTADOS

A técnica de HE foi utilizada para identificar os estádios dos túbulos seminíferos que foram utilizados no presente trabalho, sendo escolhidos os túbulos que possuíam células em todos os estágios de diferenciação. Por meio da utilização desta técnica foi possível diferenciar a estrutura testicular de novilhos (Figura 1A e 1B) e touros (Figura 1C), onde os novilhos apresentaram grande quantidade de túbulos

seminíferos imaturos, ou seja, não apresentando lúmen onde os espermatozóides pudessem ser eliminados.

A utilização dessa técnica permitiu ainda identificar, nos novilhos (Figura 1B) e nos touros (Figura 1C), espermatídes próximas à luz do túbulo e as características citoquímicas das diferentes fases das células espermatogênicas. Foram encontrados todos os tipos celulares de uma espermatogênese normal - espermatogônias, espermatócitos, espermatídes, espermatozóides - e as células de Sertoli, distribuídas de acordo com os achados na literatura (BERNDTSON & DESJARDINS, 1974).

Os túbulos seminíferos de novilhos (Figura 2A e 2B) e touros (Figura 2C) submetidos à técnica de impregnação por íons prata apresentaram marcações nucleolares nas células das diferentes regiões. Próximo à região do lúmen, as espermatídes, em diversas fases de diferenciação, apresentaram impregnações argênticas, onde foi possível observar uma fragmentação do material nucleolar e conseqüente diminuição do volume do nucléolo nesse tipo celular.

Na região próxima ao lúmen do túbulo seminífero foram identificados espermatozóides ainda não liberados, unidos por restos citoplasmáticos, e alguns individualizados, já no lúmen do túbulo. Nesses espermatozóides a impregnação por íons prata foi visualizada na cromatina condensada (cor marrom escura), sendo que a região acrossômica apresentou uma coloração “caramelada”.

A compactação da cromatina pareceu ser menos intensa nos espermatozóides de novilhos (Figura 2B), pois apresentou uma maior área com coloração marrom escuro, enquanto que em touros (Figura 2C) a compactação foi mais intensa, apresentando uma área menor corada em marrom escuro.

A coloração com AT destacou uma intensa metacromasia (coloração: azul a roxo) nas estruturas nucleares (eucromatina, heterocromatina e nucléolo) de todos os tipos celulares dos túbulos seminíferos, em novilhos (Figura 3A) e em touros (Figura 3B). A técnica do AT foi utilizada como controle para a técnica Variante da Concentração Eletrolítica Crítica (CEC).

Os túbulos seminíferos de novilho (Figura 3C) e de touro (Figura 3D) submetidos à técnica variante de CEC apresentaram uma metacromasia diferencial das estruturas celulares. Nas células de Sertoli e espermatogônias a cromatina ficou destacada em verde, o nucléolo apresentou-se fracamente metacromático (azul) e o citoplasma, principalmente das células da região basal, em violeta. Nas espermatídes próximas ao lúmen do túbulo seminífero não houve marcação nucleolar, indicando uma

fragmentação e diminuição do volume dessa estrutura. Os restos citoplasmáticos (corpúsculos residuais) apresentaram-se fortemente metacromáticos.

Os túbulos seminíferos de novilho (Figura 4A) e touro (Figuras 4B e 4C) submetidos à técnica citoquímica específica para DNA (reação de Feulgen) mostraram todos os núcleos das células em cor púrpura, variando em intensidade de acordo com o grau de ploidia e de compactação da cromatina. Dessa forma, as espermatogônias periféricas e as espermatídes próximas à luz do túbulo apresentaram-se fortemente coradas, como também os espermatócitos primários devido à condensação dos cromossomos.

As demais células tiveram a cromatina levemente corada em lilás, sendo possível observar as regiões heterocromáticas destacadas mais fortemente e envoltas por halos claros sugestivos da presença da área nucleolar. A presença de halos claros ligados às regiões heterocromáticas foi mais evidente nas espermatogônias e nos espermatócitos, do que nas espermatídes redondas e em diferenciação, indicando uma diminuição do volume nucleolar nesse tipo celular.

Os “corpúsculos residuais”, provenientes das fases finais da diferenciação das espermatídes (restos citoplasmáticos) não foram destacados pela reação de Feulgen.

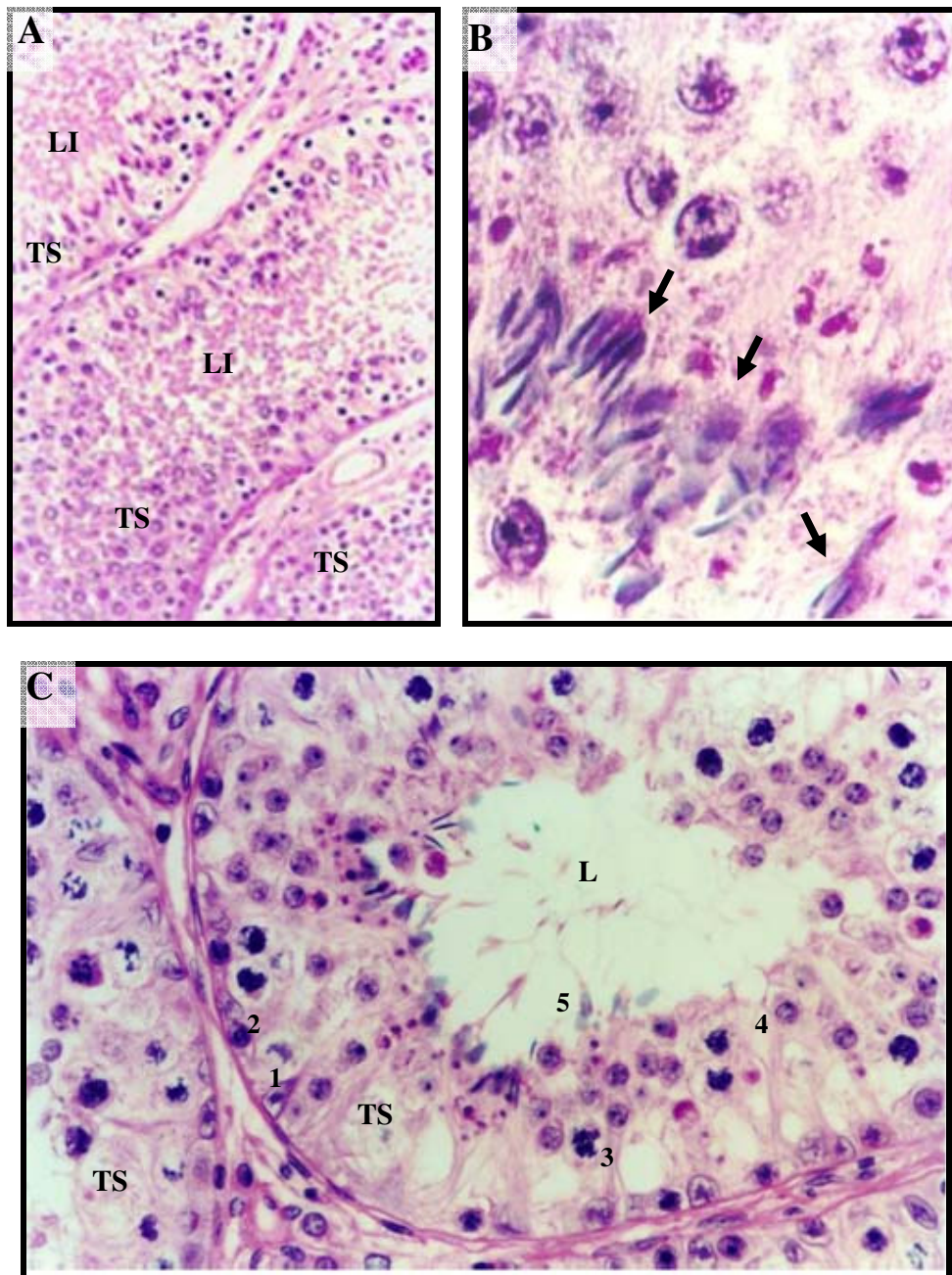


Figura 1: Cortes histológicos do parênquima testicular de novilho (A e B) e touro (C) submetidos à técnica de Hematoxilina-Eosina (HE). Observar os túbulos seminíferos de novilhos, cujo lúmen ainda não está completamente diferenciado (A). Em B, detalhe do túbulo seminífero de novilho, com espermatídes tardias (setas). Em C, notar as diferentes fases das células espermatogênicas e o lúmen completamente diferenciado. L – Lúmen. LI – Lúmen indiferenciado. TS – Túbulo seminífero. (1 – Célula de Sertoli; 2 – Espermatogônia; 3 – Espermatócito; 4- Espermatíde; 5- Espermatozóide). Aumentos: A- 200 X; B- 1000 X e C- 400 X.

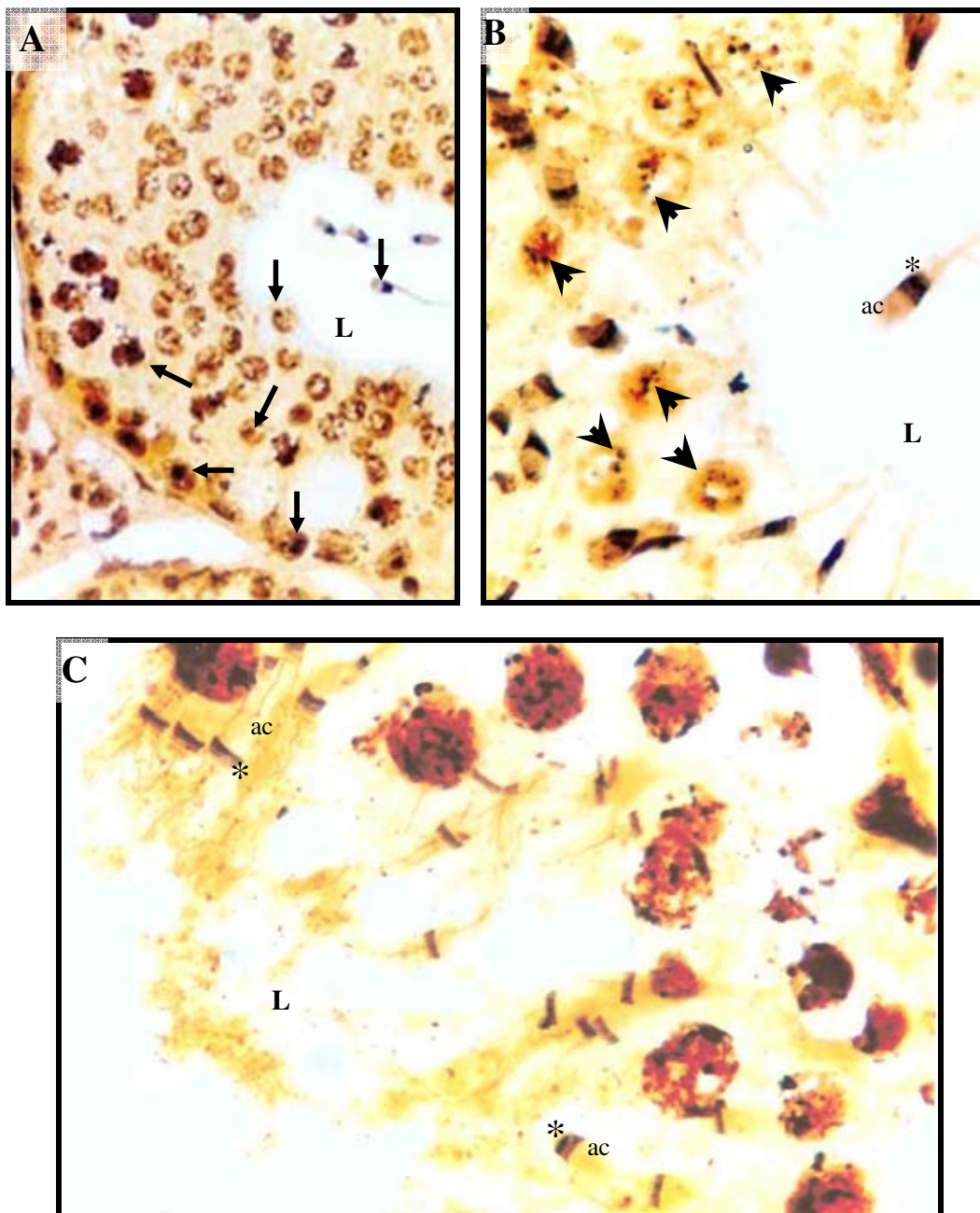


Figura 2: Cortes histológicos do parênquima testicular de novilho (A e B) e touro (C) submetidos à Impregnação por Íons Prata (AgNOR). Em A, observar as marcações nucleolares nas diferentes células do túbulo seminífero (setas) e, em B e C, a fragmentação do material nucleolar nas espermátides (cabeças de setas). A cromatina condensada dos espermatozóides apresenta-se impregnada pela prata (*), diferenciando-se da região acrossômica (ac). Notar a diferença na marcação nucleolar da cromatina nos espermatozóides de novilho (B) e touro (C). Nos touros, a cromatina apresentou-se mais condensada. L – Lúmen. Aumentos: A- 400 X; B e C- 1000 X.

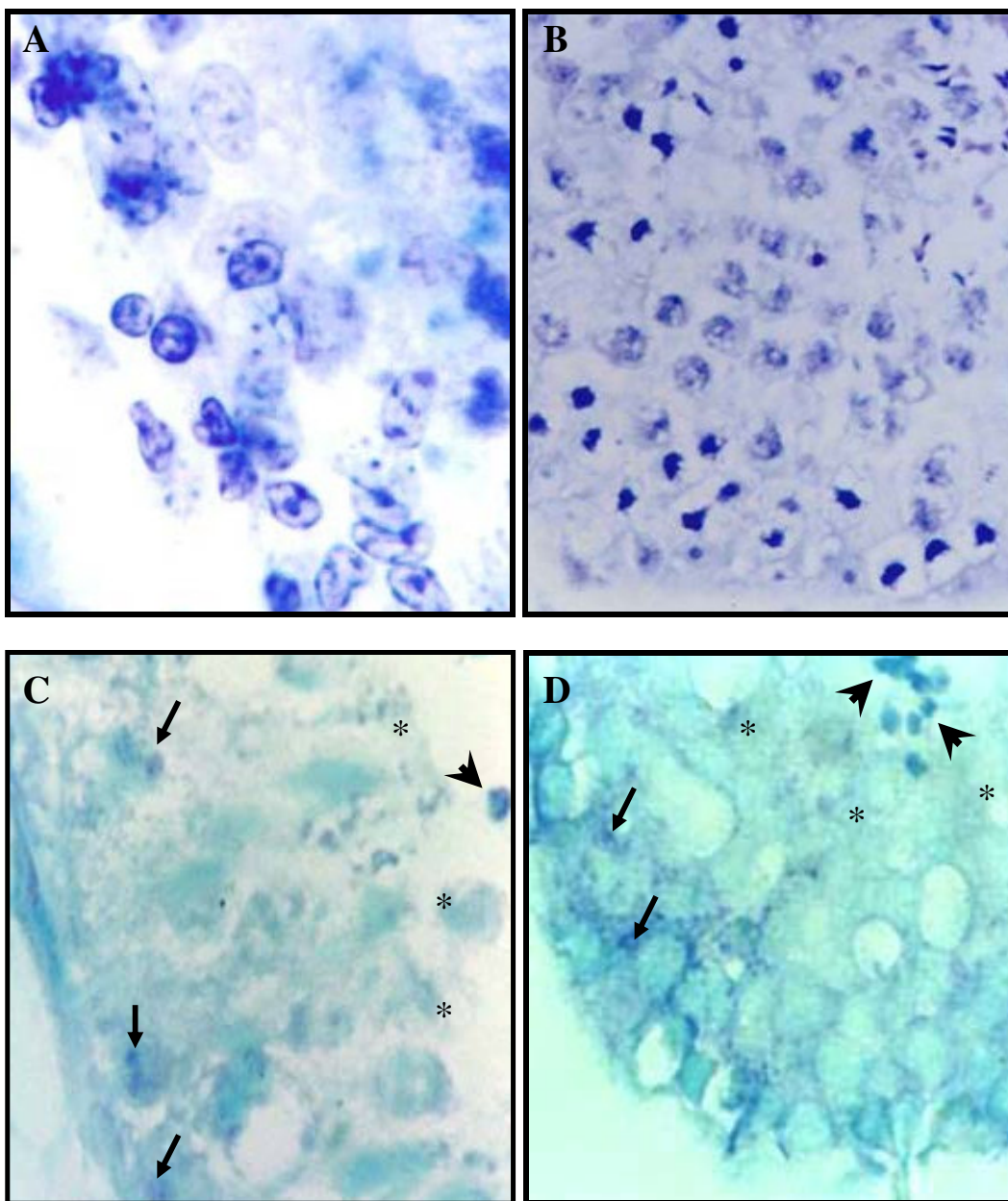


Figura 3: Cortes histológicos do parênquima testicular de novilho (A) e touro (B) submetidos à coloração com Azul de Toluidina em pH 4,0 e cortes histológicos de túbulos seminíferos de novilhos (C) e touros (D) submetidos à técnica Variante da Concentração Eletrolítica Crítica (CEC). Em A e B observar a metacromasia total das estruturas nucleares e dos “corpúsculos residuais”. Em C e D observar a metacromasia diferencial das estruturas nucleares e citoplasmáticas (cromatina: verde; citoplasma: violeta). Observar o nucléolo das células de Sertoli e das espermatogônias fracamente evidenciados (seta) e a ausência da marcação dessa estrutura nas espermatídes (asterisco). Os “corpúsculos residuais” aparecem fortemente metacromáticos (cabeça de setas). Aumentos: A, C e D- 1000 X; B- 400X

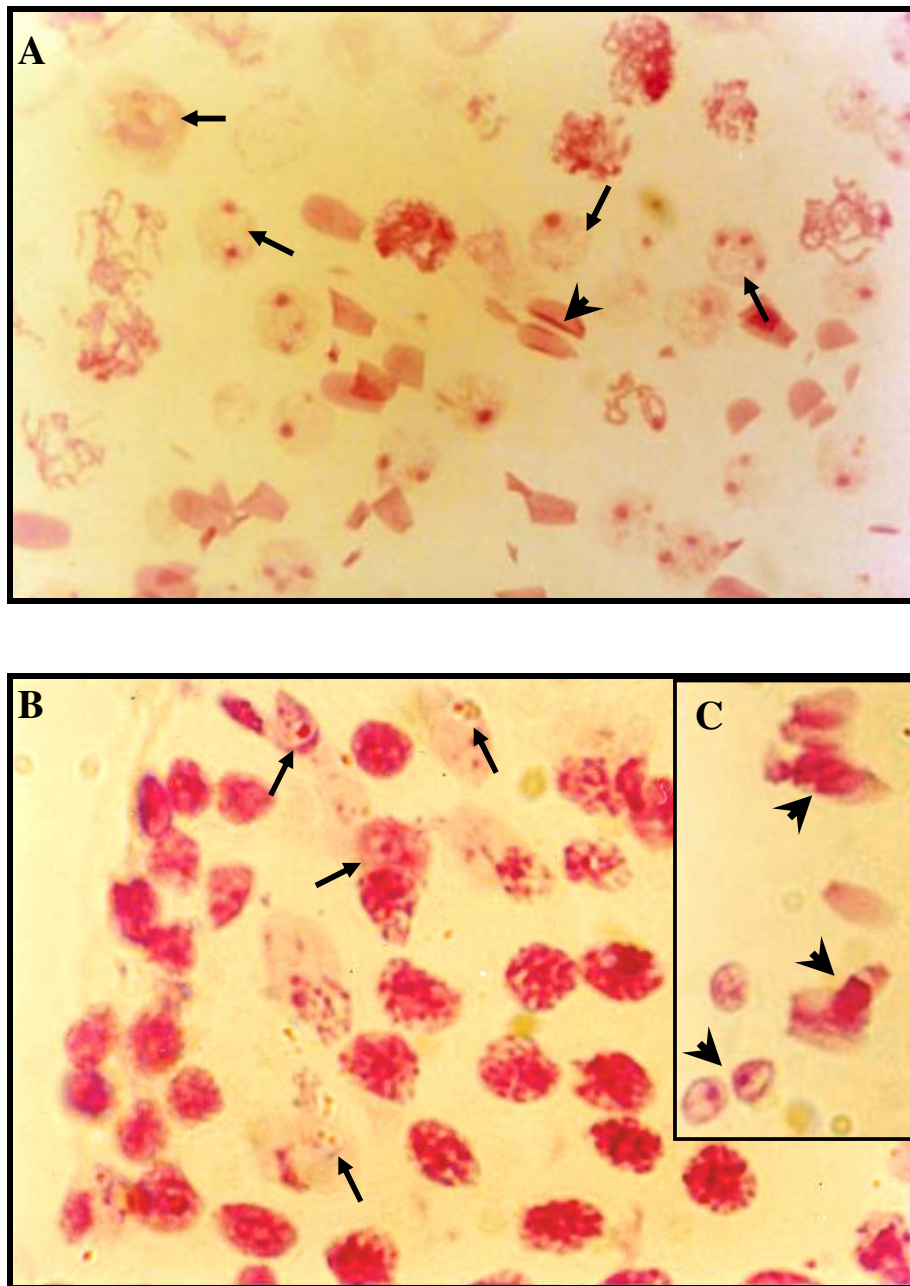


Figura 4: Cortes histológicos do parênquima testicular de novilho (A) e touro (B e C) submetidos à reação de Feulgen. Observar os núcleos das células de Sertoli e das espermatogônias com regiões heterocromáticas evidenciadas, próximas a halos claros sugestivos da presença do nucléolo (setas). Notar os núcleos das espermatídes intensamente corados (cabeça de setas). Os “corpúsculos residuais” não foram evidenciados pela reação de Feulgen. Aumento: 1000 X.

DISCUSSÃO

As análises citológicas dos túbulos seminíferos (célula de Sertoli, espermatogônias, espermátocitos I e II e espermátides), do tecido peritubular (células mióides), do tecido intersticial (células de Leydig e células endoteliais), realizadas em novilhos e touros por meio da utilização da técnica de HE, permitiram a escolha de túbulos seminíferos que possuíam um arranjo tecidual semelhante ao descrito na literatura (BERNDTSON & DESJARDINS, 1974). Os novilhos apresentaram grande quantidade de túbulos seminíferos imaturos, ou seja, os lumens não estavam completamente formados (Figura 1A). De acordo com a literatura, o diâmetro de um túbulo seminífero e de seu lúmen aumenta com idade, onde a taxa de aumento é maior após 25 semanas da idade e a formação do lúmen dos túbulos seminíferos ocorre em torno do mesmo período (CURTIS & AMANN, 1981; EVANS et al., 1996). Os touros demonstram túbulos seminíferos altamente funcionantes, embora ambos apresentassem toda a população de células características desse órgão. As análises realizadas com esta técnica trouxeram informações que corroboraram os conhecimentos sobre essas estruturas, indicando que a manutenção do arranjo morfofuncional é importante para que ocorram todas as fases da espermatogênese (BEDFORD & NICANDER, 1971; PLÖEN, 1971).

As técnicas específicas referentes à atividade nucleolar (Impregnação por íons prata, Azul de Toluidina e variante de CEC) proporcionaram uma interpretação citoquímica revelando que a atividade nucleolar está presente em todo epitélio germinativo, como já sugerido por outros autores (ASSIS et al., 2002; PERUQUETTI et al., 2005).

A clássica técnica de impregnação por íons prata, descrita por Howell & Black (1980), marca proteínas nucleolares acídicas específicas (B23 e C23), denominadas proteínas Ag-NOR, ligadas, preferencialmente, às regiões denominadas centros fibrilares (CF) (WACHTLER & STAHL, 1993). A forte impregnação pelos íons prata verificada na cromatina das espermátides durante a diferenciação pode ser explicada pela afinidade desses íons argênicos às proteínas acídicas nucleolares, complexadas com RNAr (RNA + ribonucleoproteínas), que persistem ao longo da espermiogênese. A fragmentação do material nucleolar observada nas espermátides

(Figuras 2B e 2C) demonstra que esse material fragmentado pode migrar para o citoplasma, através do complexo do poro, e agrupar-se com outras moléculas formando um complexo supra-molecular conhecido como corpo cromatóide (CB), que atua em vários eventos da espermiogênese de mamíferos, como já foi sugerido por outros autores (COMINGS & OKADA, 1976). O CB é uma estrutura citoplasmática características de células germinativas que parece desempenhar funções importantes, como a reserva de RNA e proteínas para serem utilizados durante as fases finais da espermiogênese (SÖDERSTRÖM & PARVINEN, 1976; MOUSSA et al., 1994; OKO et al., 1996; FIGUEROA & BURZIO, 1998). A marcação diferencial pela prata na cromatina da cabeça dos espermatozóides de novilho e touro provavelmente está relacionada ao fato dos espermatozóides de novilho estar imaturos, apresentando assim uma maior área de cromatina, o que indica uma menor compactação do núcleo, enquanto que os espermatozóides de touro já estão mais maduros, possuindo uma menor área de cromatina, devido a uma maior compactação do núcleo (Figuras 2B e 2C).

A técnica variante de CEC, descrita por Mello (1995), destaca as áreas nucleolares, corando-as em azul ou violeta, e o citoplasma fica também com coloração semelhante a essas áreas. A coloração que se observa com essa técnica relaciona-se ao fenômeno da basofilia, definido por Vidal & Mello (1987) como o produto da reação da ligação de uma substância de caráter aniônico (ácida) com um corante de natureza catiônica (básico). No presente estudo o corante catiônico é o Azul de Toluidina (AT) e os grupamentos fosfatos dos ácidos nucléicos (DNA/RNA), representam os componentes aniônicos. A ligação dos componentes catiônicos aos aniônicos representa uma ligação eletrostática. O pH da solução do corante é determinante, pois, os grupos fosfatos livres dos ácidos nucléicos (DNA/RNA), ligam-se mais fortemente ao AT em solução com pH entre 3,0 e 4,0. No entanto, nessa faixa de pH ainda não é possível discriminar o DNA do RNA, pois ambos são igualmente corados (MELLO & VIDAL, 1980).

Dessa forma, a coloração apenas com AT, proporcionou um método controle na análise da atividade nucleolar na espermatogênese, destacando metacromaticamente todas as estruturas nucleares (Figura 3A e 3B). Para verificar uma maior especificidade da região de basofilia, as lâminas com os túbulos seminíferos, já corados pelo AT, foram mergulhadas em solução contendo microcátions (Mg^{++}), cuja carga é semelhante ao corante. Assim, ocorreu uma competição desses cátions inorgânicos pelas cargas negativas do substrato, isto é, os fosfatos livres das moléculas

de DNA. Sobre estas condições, enquanto o DNA ficava menos metacromático, corando-se em verde, o RNA, por estar altamente complexo com as proteínas (ribonucleoproteínas – RNPs), permanecia azul (metacromático). Assim, foi possível discriminar diferencialmente as áreas nucleolares, ricas em RNAr, e acompanhar as moléculas de RNA complexadas às proteínas durante a espermatogênese (MELLO, 1995). Foi observado que, tanto os túbulos seminíferos de novilho como de touro, apresentaram espermatogônias e alguns espermatócitos I com área nucleolar evidenciada em azul, enquanto as espermátides não exibiam a mesma marcação, indicando uma fragmentação do material nucleolar desse tipo celular e uma provável migração desse material para o citoplasma, que se apresentou fortemente metacromático.

A reação de Feulgen, um método altamente específico para DNA, permite a identificação, localização e quantificação. Tem sido responsável pela detecção da quantidade de DNA nos cromossomos haplóides em diferentes espécies animais e vegetais, e o estabelecimento de poliploidia e aneuploidia em tipos celulares particulares. A reação de Feulgen compreende 2 etapas: 1) hidrólise ácida, que induz a depurinação do DNA, deixando os resíduos aldeídicos livres; 2) tratamento com reagente de Schiff, um leucoderivado da fucsina básica, que reagirá com os aldeídos ácidos apurínicos, dando um produto de coloração magenta (MELLO, 1997).

A presença de um halo claro próxima a regiões de heterocromatina, evidenciada pela reação de Feulgen, tanto nas células de Sertoli como nas espermatogônias, sugerem área nucleolar. Essas regiões não foram observadas nas espermátides, o que também indica a ocorrência de fragmentação do material nucleolar e uma possível migração desse material para o citoplasma, onde poderia ter dado origem ao corpo cromatóide (Figuras 4A e 4B).

A análise conjunta das técnicas de impregnação por íons prata, coloração com AT, variante de CEC e reação de Feulgen possibilitou acompanhar a atividade nucleolar, visualizando os corpúsculos e o RNA citoplasmático.

É importante ressaltar que as comparações proporcionadas pelas técnicas citoquímicas, utilizadas no presente estudo, mostraram que, no processo final da diferenciação celular, os restos citoplasmáticos (“corpúsculos residuais”), visualizados próximos ao lúmen dos túbulos seminíferos, apresentavam-se fortemente basófilos, ricos, portanto, em complexos RNPs. Na Reação de Feulgen, como era de se esperar, tais estruturas não foram marcadas. Sugere-se, assim, que os restos citoplasmáticos

fagocitados pela célula de Sertoli durante a espermiogênese e, posteriormente, liberados na luz dos túbulos seminíferos, contém partes dos RNPs excedentes, não totalmente utilizados no processo de diferenciação. As espermatídes, no entanto, até a fase final deste processo, apresentam, ainda, uma pequena reserva de ribonucleoproteínas (RNA+Proteínas), em forma de um pequeno corpúsculo, próximo à região acrossômica. Essa persistência do material nucleolar nas espermatídes em elongação já foi verificada também em *Rattus norvegicus* e em *Mus musculus* (PARVINEN et al., 1986; ASSIS et al., 2002; PERUQUETTI et al., 2005), o que reforça o conceito de conservação dos mecanismos evolutivos que preservam os níveis necessários de síntese protéica nos diferentes estágios da diferenciação celular e indicam que a síntese de RNA na gametogênese deve seguir um padrão universal entre os organismos com reprodução sexuada (ASSIS et al., 2002).

Sugerimos que os eventos descritos no trabalho, relacionados à persistência nucleolar, estejam relacionados à compactação da cromatina, formação do acrosso e formação do flagelo. Porém, novas pesquisas do mesmo gênero seriam interessantes para uma melhor compreensão do papel nucleolar na fertilidade, comparando-se a espermatogênese com ênfase no ciclo nucleolar de animais previamente classificados através de análises seminais como férteis, subférteis e inférteis.

Tendo este conhecimento do comportamento e distribuição nucleolar nas células do epitélio seminífero desses animais, poderia-se fazer junção das análises citoquímicas específicas para RNA e proteínas nucleolares, no epitélio germinativo, e do exame de rotina de sêmen, para melhor predição da fertilidade. Deste modo, o emprego das técnicas citoquímicas específicas para RNA e proteínas nucleolares poderá ser utilizado, no futuro, como mais uma ferramenta para análise da fertilidade animal.

CONCLUSÃO

No presente estudo, as observações verificadas na espermatogênese de novilhos e touros indicaram que, durante a espermatogênese, ocorre a persistência nucleolar (complexos ribonucleoprotéicos), sob a forma de uma estrutura conhecida como corpo cromatóide, a qual acredita-se ser necessária e importante durante a diferenciação de espermátide a espermatozóide.

Além disso, puderam-se observar diferenças qualitativas da espermatogênese bovina, quanto à idade. Tanto nos novilhos quanto nos touros houve a persistência nucleolar, porém, a marcação de proteínas nucleolares nos espermatozóides foi diferencial. Nos touros, a cromatina apresentou-se com menor área, em relação aos espermatozóides dos novilhos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGELIER, N.; TRAMIER, M.; LOUVET, E. et al. Tracking the interactions of rRNA processing proteins during nucleolar assembly in living cells. **Molecular Biology Cell**, v.16, n.6, p.2862-71, 2005.

ASSIS, I.M.; SOUZA, R.S.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V. **Atividade nucleolar durante a espermatogênese de *Rattus norvegicus***. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE BIOLOGIA CELULAR, XI, Porto Alegre, RS, p.195, n. 350, 2002.

BEDFORD, J. M.; NICANDER, L. Ultrastructural changes in the acrosome and spermmembranes during maturation of spermatozoa in the testis and epididymis of the rabbit and the monkey. **J. Anat.**, n.108, p.527-43, 1971.

BERNDTSON, W.E.; DESJARDINS, C. The cycle of the seminiferous epithelium and spermatogenesis in the bovine testis. **American Journal of Anatomy**, v.140, p.167-178, 1974.

COMINGS, D. E.; OKADA, T. A. Nuclear proteins. III. The fibrillar structure of the nuclear matrix. **Expl. Cell Res.**, n.103, p.341-360, 1976.

CURTIS, S.K.; AMANN, R.P. Testicular development and establishment of spermatogenesis in Holstein bulls. **Journal of Animal Science**, v.53, n.6, p.1645-1657, 1981.

EVANS, A.C.O.; PIERSON, R.A.; GARCIA, A. et al. Changes in circulating hormone concentrations, testes histology and testes ultrasonography during sexual maturation in beef bulls. **Theriogenology**, v.46, p.345-357, 1996

FELICIANO SILVA, E.D. Reação acrossômica induzida: método indicador de fertilidade de touros. Brasília: **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, 1998. 38p.

FIGUEROA, J.; BURZIO, L.O. Polysome-like structures in the chromatoid body of rat spermatids. **Cell Tissue Res**, n.291, p.575-579, 1998.

HERNANDEZ-VERDUM, D. Nucleolus: from structure to dynamics. **Hystochemical Cell Biology**, v.125, n.1-2, p.127-37, 2005.

HORN, M.M.; MORAES, J.C.F.; EDELWEISS, M.I.A. Evidência de selecção espermática diferencial no epidídimo de touros de genótipo híbrido com alteração na espermatogênese. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.97, n.344, p.171-174, 2002.

HOWELL, W. M., BLACK, D. A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with protective colloidal developer: I-step method. **Experientia**, v.36, p.104-5, 1980.

KOTAJA, N.; BHATTACHARYYA, S.N.; JASKIEWICZ, L. et al. The chromatoid body of male germ cells: Similarity with processing bodies and resence of Dicer and microRNA pathway components. **PNAS** , v. 103, n. 8, p. 2647–2652, 2006.

MELLO, M. L. S.; VIDAL, B. C. **Práticas de Biologia Celular**. FUNCAMP. Editora Edgard Blücher LTDA, Campinas – SP, 1980, 71p.

MELLO, M. L. S. Cytochemistry of DNA, RNA and nuclear proteins. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 20, n.2, p. 257 – 264, 1997.

MOUSSA, F.; OKO, R.; HERMO, L. The immunolocalization of small nuclear ribonucleoprotein particles in testicular cells during the cycle of the seminiferous epithelium of the adult rat. **Cell Tissue Res**, n.178, p.363–378, 1994.

OKO, R.; KORLEY, R.; MURRAY, M.T.; HECHT, N.B.; HERMO, L. Germ cell-specific DNA and RNA binding proteins p48/52 are expressed at specific stages of male germ cell development and are present in the chromatoid body. **Mol Reprod Dev.**, n.44, p.1–13, 1996.

PARVINEN, M. The chromatoid body in spermatogenesis. **Intern. J. Androl.**, n.28, p.189-201, 2005.

PERUQUETTI, R. L. ; TABOGA, S. R. ; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. . A study of the nucleolar cycle in the seminiferous ephitelium of *Rattus novergicus*. **Brazilian Journal of Morphological Sciences**, v. Suple., p. 25-25, 2005.

PLÖEN, L. A scheme of rabbit spermatogenesis based upon electron microscope observations. **Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.**, n.115, p.553-64, 1971.

RIBEIRO, M. G.; LIMA, S. R. **Iniciação às técnicas de preparação de material para o estudo e pesquisa em morfologia** . SEGRAC Editora e Gráfica Limitda, Belo Horizonte – MG, 2000, 106p.

SCHEER, U., XIA, B., MERKERT, H. *et al.* Looking at Christmas trees in the nucleolus. **Chromosoma**, v.105, n.7-8, p.470-80, 1997.

SÖDERSTRÖM, K-O, PARVINEN, M. Transport of material between the nucleus, the chromatoid body and Golgi complex in the early spermatids of the rat. **Cell Tissue Res.**, n.168, p.335–342, 1976.

TABOGA, S. R. ; FALCO, J. R. P. ; MELLO, M. L. S. ; VIDAL, B. C. . Basofilia e concentração crítica de eletrólitos (CEC) em espermatozóides com diferente composição em proteínas básicas nucleares. **Revista Brasileira de Genetica** (Suplemento), São Paulo, v. 17, n. 3, p. 260-260, 1994.

TARTAROTTI, E., AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V. Patterns of nucleolar activity during spermatogenesis of two triatomines, *Panstrongylus megistus* and *P. herreri*. **Caryologia**, v. 5, n 3-4: 177-184, 1999.

VIDAL, B.C., MELLO, M.L.S. **Biologia celular**. Rio de Janeiro: Atheneu,1987. 347p.

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

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