

ANA LUIZA ALVARENGA DRUMOND

**Ontogenia e cinética espermatogoniais
em camundongos**

Belo Horizonte

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA

**Ontogenia e cinética espermatogoniais
em camundongos**

Mestranda: Ana Luiza Alvarenga Drumond

Orientador: Hélio Chiarini-Garcia

Belo Horizonte

2007

ANA LUIZA ALVARENGA DRUMOND

Ontogenia e cinética espermatogoniais em camundongos

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado
em Biologia Celular da Universidade Federal
de Minas Gerais, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia Celular
Orientador: Hélio Chiarini-Garcia

Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG
2007

Dedico mais essa vitória a Mamãe,
Papai, Tia Dedéia e Vovó, por
sempre terem ajudado a
abrir todas as portas
do meu caminho.

AGRADECIMENTOS:

Agradeço a todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho, em especial:

- A minha Mãe, meu Pai, Tia Dedéia e Vovó Auxiliadora, por tudo que vocês fizeram e ainda fazem por mim, amo vocês;
- À minha linda Clara, pelo carinho e ao Nando, pela paciência que tanto têm comigo desde criança;
- Ao Túlio, meu companheiro de tantas batalhas, estando perto ou longe você estará sempre ao meu lado;
- Ao professor Hélio, pela brilhante orientação e pela maravilhosa convivência durante esses três anos e meio;
- Às professoras Fernanda e Gleydes, pela amizade e carinho que me dedicaram desde que nos conhecemos;
- À Maria Luiza, técnica do Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução (Laber), que desempenhou um papel essencial para que eu conseguisse terminar o meu trabalho;
- À Mara e ao Adriano, técnicos do Laboratório de Biologia Celular (Biocell), que muito me ajudaram durante grande parte do meu projeto;
- Ao Centro de Bioterismo (CEBIO) do ICB/UFMG, em especial ao funcionário Elmo;
- Às funcionárias do Centro de Microscopia Eletrônica (CEMEL) do ICB/UFMG;
- Às funcionárias do Laboratório de Apoio Didático (LAD) do Dep. de Morfologia do ICB/UFMG;
- Aos Laboratórios de Mecanismos Gerais de Infecção Fúngica e de Ecologia e Biotecnologia de Leveduras, pelo empréstimo de aparelhos;
- Aos amigos do Laber, as meninas, Lu, Rê, Carol, Aline e Nadine, e os meninos, Daniel e Felipe pela companhia e por estarem disponíveis sempre que precisei de ajuda, principalmente na reta final;
- Às pessoas queridas que conheci durante meus dois anos de passagem pelo Biocell: Marita, Sasá, Bet's, Amandinha, Carol, Erikinha, Gleidinha, Jaque, Jú Rocha, Dri, Dani, Fê, Gui, Léo, Lu, Rafa (Pezzutti), Rafa (Nóbrega), Matuza e Dr. Ri. Mais do que colegas, posso dizer que tive bons amigos;
- Aos muitos queridos amigos, pela paciência que sempre tiveram comigo durante as minhas ausências, saibam que mesmo distante eu penso em cada um de vocês;
- À minha família, tios e primos, pela torcida, em especial ao meu Tio Marcos, por ter sido sempre um dos meus maiores incentivadores;
- Aos amigos da disciplina de Biologia Celular, pelas muitas tardes de segundas, quartas e sextas feiras que compartilhamos durante todo um semestre;
- Aos professores, funcionários e colegas do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular;
- Aos demais funcionários do Departamento de Morfologia.

Esta dissertação foi desenvolvida no Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução (Liber) do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação do Prof. Hélio Chiarini-Garcia e com o auxílio das seguintes instituições:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)

“De tudo, ficaram três coisas: a certeza de que estava sempre começando,
a certeza de que era preciso continuar e a certeza de que seria interrompido
antes de terminar. Fazer da interrupção um caminho novo.
Fazer da queda um passo de dança, do medo
uma escada, do sono uma ponte,
da procura um encontro.”

(Adaptado de Fernando Sabino)

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|----|
| 1. | RESUMO..... | 1 |
| 2. | INTRODUÇÃO E OBJETIVOS..... | 2 |
| 3. | REVISÃO DE LITERATURA..... | 4 |
| 3.1. | Ontogênese das células germinativas..... | 4 |
| 3.2. | Fase espermatogonial e espermatogônia-tronco..... | 6 |
| 3.3. | Cinética Espermatogonial - número, mitose e apoptose..... | 8 |
| 4. | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 10 |
| 4.1. | Animais..... | 10 |
| 4.2. | Coleta e fixação dos testículos..... | 10 |
| 4.3. | Processamento histológico dos testículos..... | 12 |
| 4.4. | Análise morfológica..... | 12 |
| 4.5. | Análise morfométrica..... | 13 |
| 4.5.1. | Número absoluto de cada tipo espermatogonial..... | 13 |
| 4.5.1.1. | Volume do parênquima testicular..... | 13 |
| 4.5.1.2. | Proporção volumétrica e volume do epitélio seminífero..... | 14 |
| 4.5.1.3. | Proporção volumétrica e volume total ocupado pelos núcleos de cada tipo espermatogonial..... | 15 |
| 4.5.1.4. | Volume nuclear médio de cada tipo espermatogonial..... | 15 |
| 4.5.1.5. | Número absoluto de cada tipo espermatogonial por testículo..... | 16 |
| 4.5.2. | Número relativo de mitoses e apoptoses espermatogoniais..... | 16 |
| 4.5.3. | Análise estatística..... | 18 |
| 5. | RESULTADOS..... | 19 |
| 5.1. | Descrição morfológica e cronologia das células germinativas..... | 19 |
| 5.1.1. | Cordões Seminíferos..... | 19 |
| 5.1.2. | Túbulos Seminíferos..... | 23 |
| 5.2. | Diâmetros nucleares e razões entre volume célula/núcleo..... | 24 |
| 5.3. | Morfometria e cinética espermatogoniais..... | 25 |
| 5.3.1. | Número absoluto de espermatogônias..... | 25 |
| 5.3.2. | Número relativo de mitoses espermatogoniais..... | 26 |
| 5.3.3. | Número relativo de apoptoses espermatogoniais..... | 27 |
| 6. | DISCUSSÃO..... | 28 |
| 7. | CONCLUSÃO..... | 36 |
| 8. | TABELAS..... | 38 |
| 9. | FIGURAS..... | 43 |
| 10. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 61 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------------|--|----|
| Tabela 1 | Dados biométricos dos animais utilizados no trabalho..... | 11 |
| Tabela 2 | Contagem de diferentes números de campos (10, 20 e 30) com objetivo de determinar o número mínimo estatisticamente adequado de campos para se fazer a análise morfométrica da proporção volumétrica de epitélio seminífero no testículo..... | 14 |
| Tabela 3 | Médias dos diâmetros nucleares (média \pm erro padrão) de 10, 20 e 30 células..... | 16 |
| Tabela 4 | Ocorrência das células germinativas (CG) com o avançar das idades em camundongos..... | 39 |
| Tabela 5 | Média dos diâmetros nucleares (média \pm erro padrão) de gonócitos I e II, pré-espermatogônias e espermatogônias ($A_{\text{indiferenciada}}$, A_1 , A_2 , A_3 , A_4 , In e B) nas idades estudadas..... | 40 |
| Tabela 6 | Média da razão dos volumes célula/núcleo (média \pm erro padrão) de gonócitos I e II, pré-espermatogônias e espermatogônias ($A_{\text{indiferenciada}}$, A_1 , A_2 , A_3 , A_4 , In e B) nas idades estudadas..... | 41 |
| Tabela 7 | a) Número total de gonócitos I e II, pré-espermatogônias e espermatogônias, por testículo, presentes em cada uma das idades estudadas..... | 42 |
| | b) Número total de espermatogônias do tipo A, por testículos, presentes em cada uma das idades estudadas..... | 42 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------------|--|----|
| Figura 1 | Detalhes morfológicos, sob microscopia de luz de alta resolução, dos núcleos das diferentes gerações de espermatogônias de golden hamsters..... | 7 |
| Figura 2 | Divisões mitóticas (cabeças-de-seta preta) de cada um dos diferentes tipos espermatogônias da fase proliferativa ou espermatogonial de camundongos..... | 8 |
| Figura 3 | Diagrama mostrando as associações celulares durante os XII estádios do ciclo do epitélio seminífero de camundongos..... | 9 |
| Figura 4 | Mitose de célula germinativa em comparação com a mitose de célula de Sertoli..... | 17 |
| Figura 5 | Apoptoses de espermatogônias..... | 18 |
| Figura 6 | Cordões seminíferos nos dias 1 e 2 <i>p.p.</i> | 44 |
| Figura 7 | Cordões seminíferos aos 3 dias <i>p.p.</i> | 45 |
| Figura 8 | Cordões seminíferos nos dias 4 e 5 <i>p.p.</i> | 46 |
| Figura 9 | Cordões seminíferos nos dias 6 e 7 <i>p.p.</i> | 47 |
| Figura 10 | Cordões seminíferos aos 9 dias <i>p.p.</i> | 48 |
| Figura 11 | Cordões seminíferos aos 11 dias <i>p.p.</i> | 49 |
| Figura 12 | Túbulos seminíferos aos 13 dias <i>p.p.</i> | 50 |
| Figura 13 | Túbulos seminíferos nos 15 e 17 dias <i>p.p.</i> | 51 |
| Figura 14 | Túbulos seminíferos nos 20 e 28 dias <i>p.p.</i> | 52 |
| Figura 15 | Túbulos seminíferos nos 37 e 70 dias <i>p.p.</i> | 53 |
| Figura 16 | Médias dos diâmetros nucleares de gonócitos (Gon) I e II, pré-espermatogônias (PE), espermatogônias A indiferenciadas (A_{ind}) e espermatogônias diferenciadas (A_1, A_2, A_3, A_4, In e B) nas idades estudadas..... | 54 |
| Figura 17 | Razão entre os volumes célula/núcleo de gonócitos (Gon) I e II, pré-espermatogônias (PE), espermatogônias A indiferenciadas (A_{ind}) e espermatogônias diferenciadas ($A_1, A_2, A_3, A_4, in, B$), nas idades estudadas..... | 55 |
| Figura 18 | Número absoluto de gonócitos (Gon) I e II, pré-espermatogônias (PE), sua soma e espermatogônias A indiferenciadas (A_{ind}), por testículo, desde o dia do nascimento (1 dia) até o 5º dia de idade..... | 56 |
| Figura 19 | Número absoluto de gonócitos (Gon) I e II, pré-espermatogônias (PE), espermatogônias A indiferenciadas (A_{ind}) e espermatogônias diferenciadas (A_1, A_2, A_3, A_4, In e B) por testículo, nas idades de 1 a 7 dias..... | 57 |
| Figura 20 | Número absoluto de espermatogônias indiferenciadas A (A_{ind}) e diferenciadas ($A_1, A_2, A_3, A_4, In, B$) por testículo, nas idades de 6 a 70 dias..... | 58 |
| Figura 21 | Número absoluto de espermatogônias por testículo nas idades de 7, 15, 37 e 70 dias..... | 59 |
| Figura 22 | Número relativo de mitoses e apoptoses, calculado em função do número de secções transversais de cordões seminíferos, ou túbulos seminíferos, nas idades estudadas..... | 60 |

LISTA DE ABREVIATURAS

1. CGPs - Células germinativas primordiais;
2. *p.c.* - *post coitum*;
3. *p.p.* - *post partum*;
4. CES - ciclo do epitélio seminífero;
5. ES - epitélio seminífero;
6. A_{ind} - espermatogônia do tipo A indiferenciada;
7. A_{is} - espermatogônia do tipo A isolada;
8. A_{pr} - espermatogônia do tipo A pareada;
9. A_{al} - espermatogônia do tipo A alinhada;
10. A₁ - espermatogônia diferenciada do tipo A₁;
11. A₂ - espermatogônia diferenciada do tipo A₂;
12. A₃ - espermatogônia diferenciada do tipo A₃;
13. A₄ - espermatogônia diferenciada do tipo A₄;
14. In - espermatogônia diferenciada do tipo Intermediária;
15. B - espermatogônia diferenciada do tipo B.

1. RESUMO

O presente trabalho avaliou a ontogênese das células germinativas de camundongos sob a visão da microscopia de luz de alta resolução, que utiliza fixação por perfusão intravascular com glutaraldeído, pós-fixação em ósmio-reduzido, inclusão em resina araldite e cortes semifinos corados com azul de toluidina-borato. Foram utilizados camundongos C57BL6 (n=3-4) das idades de 1 a 7, 9, 11, 13, 15, 17, 20, 28, 37 e 70 dias *post partum*. Em cada uma destas idades avaliou-se a morfologia, a cronologia, o sincronismo, a cinética, o balanço mitose/apoptose e o número absoluto de cada tipo espermatogonial por testículo. Ao nascimento, estão presentes nos testículos as células de Sertoli imaturas e os gonócitos. Durante os dois primeiros dias de vida os gonócitos não se dividem e no terceiro se dividem para formar as espermatogônias A_{ind} . Nos 4º e 5º dias de idades podem ser observadas todas as espermatogônias do tipo A, enquanto nos 6º e 7º dias todas as células da linhagem espermatogonial estão presentes. Aos nove dias de idade, observa-se a presença de espermatócitos primários, e verifica-se que o epitélio seminífero já apresenta associações celulares semelhantes às aquelas observadas nos indivíduos adultos, caracterizando o sincronismo do ciclo do epitélio seminífero. Também aos nove dias constata-se que o número de espermatogônias A_{ind} por testículo é semelhante ao encontrado nos animais adultos. Aos 13 dias pode-se observar a formação do lúmen dos túbulos seminíferos, enquanto aos 37 dias ocorre a puberdade, com o aparecimento dos primeiros espermatozoides. O balanço entre acelerações abruptas e períodos de quiescência da fase espermatogonial, associado com o equilíbrio entre mitoses e apoptoses, mostram que, em camundongos pré-puberes, há redução da duração da primeira onda do processo espermatogênico. Finalmente, calcula-se que camundongos adultos possuam 1,49 milhões de espermatogônias por testículo, sendo 13,4% (0,2 milhões) de espermatogônias A indiferenciadas e 36,2% (0,54 milhões) de espermatogônias A diferenciadas.

2. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Estudos desenvolvidos até o momento, utilizando processamentos convencionais, caracterizaram parcialmente, em cortes histológicos, as diferentes linhagens de espermatogônias de camundongos (Oakberg, 1971; Huckins & Oakberg, 1978; revisto em De Rooij & Russell, 2000). No entanto, os métodos utilizados não possibilitaram visualizar detalhes citológicos que permitissem a identificação, com segurança, dos diferentes tipos de espermatogônias A diferenciadas (A_1 , A_2 , A_3 , A_4) entre si e em relação às espermatogônias do tipo A indiferenciadas (A_{is} , A_{pr} , A_{al}). Trabalhos recentes utilizando a microscopia de luz de alta resolução puderam caracterizar morfológicamente, em camundongos (Chiarini-Garcia & Russell, 2001) e ratos (Chiarini-Garcia et al., 2003) adultos, as espermatogônias A diferenciadas. Esta metodologia também permitiu o desenvolvimento de estudos envolvendo a cinética e a distribuição em nichos dos diferentes tipos espermatogoniais de animais adultos em condições normais (Chiarini-Garcia et al., 2001 e 2003) ou sob condições patológicas (Russell et al., 2002; Alves-Freitas et al., 2007; Bolden-Tiller et al., 2007; Rezende et al., 2007; Zallio et al., 2007). No entanto, nenhum destes trabalhos conseguiu estudar a fundo características que permitissem identificar as células-tronco espermatogoniais (A_{is}).

Estas células-tronco possuem grande importância, uma vez que são responsáveis pela propriedade de auto-renovação e pela manutenção da produção espermática de um indivíduo adulto, saudável. A precisa identificação, o entendimento de como são formadas e a possibilidade de se isolar estas células seriam um grande avanço para o desenvolvimento de estudos funcionais que tivessem como objetivo obter respostas para questões relacionadas ao melhoramento zootécnico e à infertilidade humana.

Apesar de vários trabalhos já terem descrito a ontogênese e caracterizado as células germinativas em animais jovens, nenhum deles foi conclusivo em relação a como as células mais indiferenciadas dos animais jovens dariam origem às espermatogônias-tronco de um animal adulto. Estudos das fases peri-natal e pré-púbere poderiam contribuir para a melhor

compreensão dos eventos ocorridos com as espermatogônias, durante o desenvolvimento dos testículos.

Além disso, dados sobre a morfologia, a cronologia e a cinética espermatogoniais de animais normais, desde o nascimento até a fase adulta (idade na qual o indivíduo alcança, e mantém, o ápice do seu rendimento espermatogênico), poderiam ser utilizados para a comparação em estudos futuros. Estes dados serviriam de controle para situações experimentais ou patológicas, que envolvam alterações das células da linhagem espermatogonial, durante a ontogênese testicular.

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi o de descrever o desenvolvimento das células espermatogoniais de camundongos, desde o nascimento até a idade adulta, através de estudos morfológicos e cinéticos de cada um dos tipos de espermatogônias, utilizando como ferramenta a microscopia de luz de alta resolução.

Objetivo Geral

Descrever a morfologia e avaliar parâmetros morfométricos das espermatogônias de camundongos normais, desde o nascimento até a idade adulta.

Objetivos Específicos

Os objetivos específicos foram os seguintes:

- Descrever a morfologia das células germinativas dos testículos de camundongos, desde o nascimento até a fase adulta, com ênfase para as células da linhagem espermatogonial;
- Determinar a cronologia e o sincronismo das células germinativas, durante o processo ontogenético;
- Estudar a cinética dos diferentes tipos espermatogoniais, em cada uma das idades selecionadas, calculando o número absoluto de cada uma destas células por testículo;
- Avaliar qual o melhor período, durante a fase pré-púbere, para se obter o máximo de espermatogônias-tronco;
- Determinar o diâmetro nuclear das espermatogônias durante o desenvolvimento e calcular a razão entre os volumes célula / núcleo;
- Determinar o número de mitoses e apoptoses espermatogoniais, durante o desenvolvimento testicular.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Ontogênese das células germinativas

O desenvolvimento das gônadas inicia-se com o espessamento do mesotélio situado na superfície ventro-medial do mesonefro. A proliferação desse epitélio e do mesênquima subjacente produz uma saliência que é denominada crista genital. Logo após a formação das cristas, as células germinativas primordiais (CGPs) e as células somáticas (precursoras das células de Sertoli e Leydig) migram para essa região a fim de iniciar a formação dos testículos (Moore & Persaud, 2004).

As CGPs são assim denominadas, pois são as células embrionárias que darão origem às células germinativas (espermatogônias e oogônias). Por possuírem uma alta afinidade por marcação através de fosfatase alcalina (Wilhelm et al., 2007), a origem dessas células pode ser facilmente traçada. Suas células precursoras podem ser visualizadas no epiblasto, na porção final posterior da crista primitiva, próximas ao mesoderma extra-embrionário, aos 7 dias *p.c.* (*post coitum*) em camundongos (Ginsburg et al., 1990).

Em embriões normais, as células precursoras de células germinativas vão migrar desta região para dentro do embrião, utilizando o alantóide como via migratória. Depois de serem coletadas na base do alantóide, evento esse que ocorre em torno do dia 7,5 *p.c.* em camundongos (Chiquoine, 1954), as CGPs migram para o saco vitelínico adjacente. Nesse período, elas se separam em duas populações que irão migrar separadamente, para as cristas genitais do lado esquerdo e do lado direito.

As CGPs então movem-se do saco vitelínico para o intestino primitivo recém formado e, através do mesentério dorsal, se direcionam para dentro das cristas genitais. Enquanto estão migrando, as células proliferam aumentando seu número de aproximadamente 100, no 7º dia *post coitum* (*p.c.*) (Ginsburg et al., 1990) para cerca de 10.000 em cada gônada (Tam & Snow, 1981). Em camundongos, a maioria das CGPs alcançam as gônadas em desenvolvimento em torno do 11º *p.c.*

As células de Sertoli se originam a partir de células somáticas que revestem o celoma e migram para as cristas genitais. A célula de Sertoli é o primeiro tipo celular somático a se diferenciar na gônada primitiva, ocorrendo em torno de 11,5 dias *p.c.* em camundongos (Sapsford, 1962).

Ao chegarem nas cristas genitais, as CGPs são envolvidas pelas células de Sertoli, ocorrendo a formação dos cordões seminíferos. Os cordões recém formados são rapidamente circundados por uma lâmina basal, processo este que leva menos de 24 horas no feto de ratos. Ao mesmo tempo, células mesenquimais se achatam e se associam intimamente à porção basal das células de Sertoli, delimitando nitidamente os cordões seminíferos (Orth, 1993). Com a formação destes cordões, as CGPs se tornam células mitoticamente quiescentes e passam a ser denominadas de gonócitos (Huckins & Clermont, 1968; revisão em Donovan & De Miguel, 2005).

Durante o período fetal, os gonócitos proliferam, e no final desse período, estacionam na fase G_0 do ciclo celular. Em camundongos, acredita-se que os gonócitos proliferam até os 16 dias *p.c.* (Vergouwen et al., 1991), já em ratos esse período se estende até os 18 dias *p.c.* (Huckins & Clermont, 1968).

Logo após o nascimento, os gonócitos retomam sua proliferação (Vergouwen et al., 1991; Kluin & De Rooij, 1981). Nagano et al. (2000) observaram que, em camundongos, os primeiros gonócitos em divisão podem ser detectados no dia 1,5 *p.p.* (*post partum*). Alguns desses gonócitos estão posicionados na membrana basal, aos 18,5 dias *p.c.*, e outros são encontrados no centro dos cordões. Assim, eles sugeriram que a proliferação dos gonócitos não estaria correlacionada com o seu posicionamento, e que esses eventos seriam regulados por mecanismos diferentes. Huckins & Clermont (1968) também verificaram que a maior parte dos gonócitos se divide no centro dos cordões seminíferos, ou próximo a ele. No entanto, ocasionalmente grandes figuras de mitose foram detectadas na periferia, e eles acreditaram que seriam estas as células que dariam origem ao que eles e outros autores chamaram de pré-espermatogônias (Sapsford, 1962; Huckins & Clermont, 1968).

A degeneração de gonócitos foi relatada por muitos autores como um importante fator no início da formação testicular pós-natal. Huckins & Clermont (1968) estipularam que, em ratos, aproximadamente 72% de gonócitos neonatais degeneram nos primeiros dias *post partum* (*p.p.*). Ainda em ratos, Roosen-Runge & Leik (1968) estimaram que aproximadamente um terço dos gonócitos seriam perdidos durante os dias 1 a 4 *p.p.* Essa degeneração continua até os dias 7 e 8 *p.p.* (Clermont & Perey, 1957; Sapsford, 1962).

A transição de gonócitos para espermatogônias ainda não foi bem definida. Alguns autores acreditam que os gonócitos inicialmente se dividem em um tipo de pré-espermatogônia que, em seguida, sofre divisão e dá origem às espermatogônias-tronco dos animais adultos (Huckins & Clermont, 1968; Novi & Saba, 1968). No entanto outros autores

demonstraram que os gonócitos podem dar origem diretamente às espermatogônias-tronco (Kluin & De Rooij, 1981).

Depois de formadas, as espermatogônias-tronco seguem o seu destino que é o de se auto-renovarem ou seguirem o processo meiótico para a diferenciação em espermatozóide, processo esse que ocorre desde a puberdade seguindo por toda a vida de um macho adulto sadio.

Portanto, o processo espermatogênico se inicia com a divisão das espermatogônias-tronco e culmina com a formação dos espermatozoides, evento que ocorre na puberdade. Isto significa que o início dos ciclos espermatogênicos é muito variável entre as diferentes espécies de mamíferos. Por exemplo, enquanto camundongos e ratos entram na puberdade com aproximadamente 37 e 50 dias, respectivamente, o homem demora de 12 a 13 anos.

3.2. Fase espermatogonial e espermatogônia-tronco

A espermatogênese se inicia com a divisão e diferenciação da espermatogônia-tronco e, em camundongos e ratos, animais já bastante estudados, as espermatogônias-filhas passam por uma série de aproximadamente 9 a 11 divisões mitóticas antes de se diferenciarem em espermatócitos. Estes, por sua vez, sofrem divisão meiótica para formar as espermátides. Desta forma, a partir de apenas uma espermatogônia-tronco pode-se formar, teoricamente, até 4096 espermatozoides (Russell et al., 1990). Nos animais sexualmente maduros, as espermatogônias podem ser classificadas em dois grupos: espermatogônias indiferenciadas (imaturas) e diferenciadas (maduras) (De Rooij, 1998; de Rooij & Grootegoed, 1998; De Rooij & Russell, 2000). No primeiro grupo encontram-se as espermatogônias A isoladas (A_{isolada} , A_{is}) que, pelos conhecimentos atuais são as espermatogônias-tronco, as espermatogônias A pareadas (A_{pareada} , A_{pr}) e as espermatogônias A alinhadas (A_{alinhada} , A_{al}). No segundo grupo estão presentes as espermatogônias do tipo A diferenciadas (A_1 - A_4), intermediárias (In) e espermatogônias do tipo B (B). O número de gerações de espermatogônias diferenciadas varia nas diversas espécies de mamíferos. Entretanto, este número geralmente não ultrapassa seis gerações (Russell et al., 1990; De Rooij & Grootegoed, 1998).

É difícil a caracterização morfológica das espermatogônias A. Embora várias investigações (Clermont & Bustos-Obregon, 1968; Oakberg, 1971; Huckins & Oakberg, 1978) tenham procurado caracterizar as espermatogônias do tipo A, principalmente aquelas do tipo A_1 - A_4 , mostrando que as mesmas possuem particularidades, as ilustrações destes tipos celulares são de baixa resolução, não permitindo a diferenciação com precisão destas espermatogônias. No entanto, estudos recentes em camundongos (Chiarini-Garcia &

Russell, 2001), ratos (Chiarini-Garcia et al., 2003), hamsters (Nascimento et al., 2007, Figura 1) e jumentos (Chiarini-Garcia et al., 2007) demonstraram ser possível morfologicamente caracterizar, com relativa segurança, os vários tipos de espermatogônias A, através do uso da técnica de microscopia de luz de alta resolução. Provavelmente, isto só foi possível devido a alta qualidade de fixação e inclusão dos testículos, aliado ainda a pequena espessura (1 μm) das secções histológicas (Chiarini-Garcia & Meistrich, 2007). A capacidade de diferenciar morfologicamente estas células sob microscopia de luz tem permitido o estudo funcional das espermatogônias destas espécies em diversas condições fisiológicas (Chiarini-Garcia et al., 2001 e 2003; Alves-Freitas et al., 2007; Chiarini-Garcia et al., 2007) e experimentais (Russell et al., 2002; Avelar, 2004; Bolden-Tiller et al., 2007; Nascimento et al., 2007).

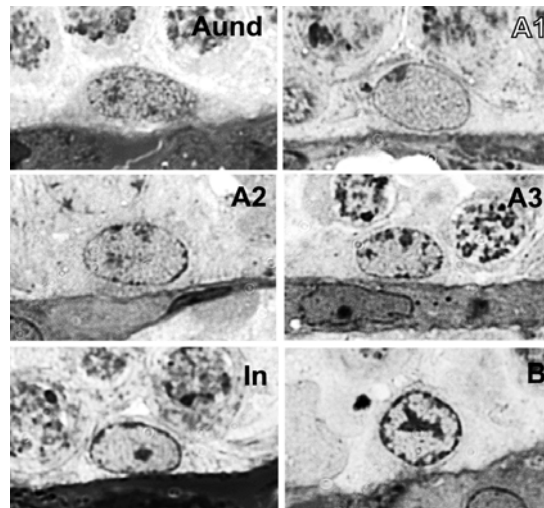


FIGURA 1. Detalhes morfológicos, sob microscopia de luz de alta resolução, dos núcleos das diferentes gerações de espermatogônias de golden hamsters. A_{und} , espermatogônias do tipo A indiferenciadas; A_1 , A_2 e A_3 , espermatogônias do tipo A diferenciadas; In , espermatogônias intermediárias; B, espermatogônias do tipo B. (Nascimento et al., 2007).

Também através de microscopia de luz de alta resolução, Dettin et al., 2003, realizaram um estudo, em camundongos de 6 dias de idade, onde descreveram a existência de três subtipos de espermatogônias que eles acreditam ser do tipo A indiferenciadas. Os autores chamaram estas células de espermatogônias escuras, espermatogônias transicionais e espermatogônias pálidas, estabelecendo uma relação entre a espermatogênese de roedores jovens e a espermatogênese em primatas (Clermont, 1963) que, conhecidamente, apresentam dois tipos de espermatogônias A (A_{escura} e A_{clara}) e espermatogônias B.

3.3. Cinética espermatogonial – número, mitose e apoptose

Com a finalidade de permitir o compartilhamento de substâncias importantes entre células de um clone e o desenvolvimento sincrônico, as células germinativas originadas de uma espermatogônia isolada (A_{is}) estão conectadas umas às outras através de regiões de citoplasma denominadas pontes intercelulares (Russell et al., 1990; De Rooij & Grootegoed, 1998). O esquema a seguir (Figura 2) ilustra a possível constituição de diferentes clones de espermatogônias no camundongo desde a espermatogônia A isolada (A_{is}) até a última geração de espermatogônia, do tipo B (De Rooij & Russell, 2000; De Rooij, 2001).

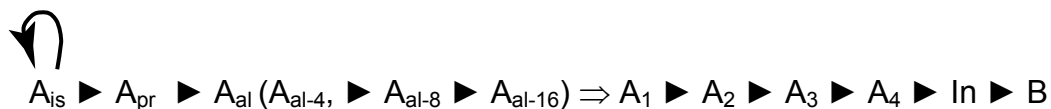


Figura 2. Divisões mitóticas (cabeças-de-seta preta) de cada um dos diferentes tipos espermatogônias da fase proliferativa ou espermatogonial de camundongos. São aproximadamente 9 divisões que vão formar, a partir de uma A_{is} , em torno de 1024 espermatogônias do tipo B. As espermatogônias A_{is} são as células-tronco do processo espermatogênico e, desta forma, têm a capacidade de se auto-renovarem (seta curva). Entre as A_{al} e A_1 (seta clara) não ocorre divisão e sim diferenciação celular.

O uso dos estádios do ciclo do epitélio seminífero (CES) é de grande valia para o estudo da cinética das células germinativas, inclusive das espermatogônias, pois permite investigar dentro de espaços pré-determinados a dinâmica, progressão e expansão destas células em um determinado tempo. Em camundongos, por exemplo, (Figura 3; De Rooij, 1998), as divisões de A_{is} - A_{al} ocorrem em qualquer estágio do CES enquanto na formação de A_1 não ocorre divisão mitótica e sim diferenciação celular das espermatogônias do tipo A_{al} para A_1 , em estágio específico do ciclo espermatogênico. Uma vez que as espermatogônias do tipo A_1 tenham sido formadas, as divisões subseqüentes das mesmas são sincronizadas, ocorrendo em estádios específicos do CES (Figura 3). Por exemplo, as espermatogônias A_1 dividem-se para formar A_2 no estágio IX, estas por sua vez formam as espermatogônias A_3 no estágio XI, sendo finalmente as espermatogônias A_4 formadas no estágio I do próximo ciclo. Estas últimas se dividem em espermatogônias intermediárias (In) nos estádios II-III, dando origem às espermatogônias do tipo B no estágio IV (Figura 3, De Rooij, 1998).

No passado, os diferentes tipos de espermatogônias de camundongos não eram facilmente caracterizados morfológicamente, tampouco existiam marcadores específicos para estas células. No entanto, sabendo que os diferentes tipos de espermatogônias A estavam presentes em estádios específicos, as mesmas podiam ser identificadas de forma indireta. Por exemplo, numa secção transversal de túbulo seminífero de camundongos no estágio XII podem ser observadas as espermatogônias do tipo A_{is} , A_{pr} , A_{al} (presentes em todos os estádios, embora em número pequeno) e as espermatogônias do tipo A_3 (Figura 3). Hoje, com o uso de microscopia de luz de alta resolução, é possível identificar as células

independentes dos estádios onde não existe espermatogênese completa (animais pré-púberes) ou onde os estádios do CES algumas vezes não podem ser identificados, como por exemplo, em animais mutantes (Alves-Freitas et al., 2007; Bolden-Tiller et al., 2007; Rezende et al., 2007; Zallio et al., 2007).

| I | II | III | IV | V | VI | VII | VIII | IX | X | XI | XII | Estádio epitelial |
|------|------|------|------|------|------|------|--------|--------|--------|--------|------------------|---------------------------------|
| 13 | 14 | 14 | 15 | 15 | 15 | 16 | 16 | | | | | Espermátides |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | Espermátides |
| P | P | P | P | P | P | P | P | P | P | D | Divisão Meiótica | Espermatócitos |
| | | | | | preL | preL | preL | L | Z | Z | P | Espermatócitos |
| A4 | In | In | B | B | B | | | | | | | Espermatogônias Diferenciadas |
| A3→m | A4→m | | In→m | | B→m | | | | | | | |
| | | | | | | | A1 | A2 | A2 | A3 | A3 | Espermatogônias Indiferenciadas |
| | | | | | | | A1 | A1→m | | A2→m | | |
| A-al | A-al | A-al | A-al | A-al | A-al | A-al | (A-al) | (A-al) | (A-al) | (A-al) | (A-al) | Espermatogônias Indiferenciadas |
| ↑ | ↑ | ↑ | | | | | | | ↑ | ↑ | ↑ | |
| A-pr | A-pr | A-pr | A-pr | A-pr | A-pr | A-pr | A-pr | A-pr | A-pr | A-pr | A-pr | |
| ↻ | ↻ | ↻ | | | | | | | ↻ | ↻ | ↻ | |
| A-is | A-is | A-is | A-is | A-is | A-is | A-is | A-is | A-is | A-is | A-is | A-is | |

Figura 3. Associações celulares durante os XII estádios do CES de camundongos. As espermatogônias A_{is} isoladas (A_{is}), A_{pr} apareadas (A_{pr}) e A_{al} alinhadas (A_{al}) são aquelas consideradas indiferenciadas, que estão presentes em todos os estádios do ciclo e que se dividem entre os estádios X e III (setas entre as células). As espermatogônias do tipo A diferenciadas (A_1 , A_2 , A_3 e A_4) estão presentes e se dividem (m, mitose) em estádios específicos do ciclo. Os espermatócitos formados vão passar pelas fases da prófase meiótica (preL, preleptoteno; L, leptoteno; Z, zigoteno; P, paquíteno; D, diplóteno) e pelas 16 etapas de diferenciação das espermátides (números arábicos). Os tipos celulares presentes na mesma coluna são sempre encontrados juntos e constituem um estádio do ciclo (modificado de De Rooij, 1998).

A produção espermática de uma determinada espécie depende de vários fatores. A produção diária de espermatozóides é o resultado de um balanço entre produção clonal de espermatogônias (mitoses) e espermátides (meiose) em relação às mortes celulares por apoptoses. Desta forma, para que a produção espermática seja a esperada para uma determinada espécie, é necessário um balanço fisiologicamente controlado entre produção e morte celulares, conhecido como controle da regulação dependente da densidade espermatogonial (De Rooij & Janseen, 1987; De Rooij & Lok, 1987). Este controle é coordenado por genes da família Bcl-2 onde, dentre eles, o gene Bax é conhecidamente pró-apoptótico enquanto o Bcl-x_L é anti-apoptótico. De fato, em camundongos transgênicos com ausência do gene Bax (*Bax-knockout*), as espermatogônias diferenciadas dos tipos A_2 e A_3 não sofrem apoptose, quando deveriam, levando a uma superpopulação destes tipos espermatogoniais. Essa superpopulação no epitélio seminífero vai levar a uma morte celular, independente de Bax, massiva das células germinativas e, conseqüentemente, a uma expressiva atrofia testicular (Russell et al., 2002).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Animais

No presente trabalho foram utilizados camundongos da linhagem C57BL6 (B6), nas idades de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 20, 28, 37 e 70 dias *post partum* (*p.p.*), sendo o dia do nascimento considerado como dia 1.

Os animais de 1 a 15 dias e 28 dias *p.p.* foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) da UFMG, enquanto os animais de 17, 20, 37 e 70 dias *p.p.* procederam do Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA).

Os animais procedentes dos Estados Unidos pertenciam a outro experimento realizado em nosso laboratório e foram re-utilizados a fim de completarem os grupos estabelecidos. Os testículos destes animais foram coletados entre os meses de janeiro e março de 2000, no Laboratory of Structural Biology da Southern Illinois University, Carbondale, IL, USA.

Dos animais foram obtidos os seguintes dados biométricos: o peso corporal (PC), medidas de comprimento corporal (Snout-Rump Length, SRL) e peso dos testículos (Tabela 1); exceto nos animais de 17, 20, 37 e 70 dias dos quais não foram obtidos SRL.

A medida SRL é realizada com o animal deitado em decúbito ventral sobre uma régua, medindo-se desde o ponto onde a ponta do focinho faz uma projeção perpendicular na régua até a raiz da cauda do animal.

Este projeto foi aprovado (protocolo nº 072/05) pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais.

4.2. Coleta e Fixação dos Testículos

Os camundongos de 1 a 15 dias *p.p.* foram anestesiados com Tiopental (pentobarbital sódico) na proporção de 30 mg/kg de peso corporal, via intraperitoneal. Em seguida, os testículos destes animais foram retirados e fixados, por imersão, em

glutaraldeído (EMS, Hatfield, PA – biological grade, cat. #16520) a 5% em tampão cacodilato 0,05M, pH 7,3. Utilizou-se a fixação por imersão devido aos tamanhos corporal e cardíaco dos animais, que não comportavam o procedimento de perfusão intravascular.

Após 30 minutos de fixação, a túnica albugínea foi retirada para que ocorresse melhor penetração do fixador no tecido. O material foi fixado, no mesmo fixador, por um período adicional de 24 horas. Após este período de fixação, os testículos foram pesados, recortados, colocados em tampão cacodilato 0,05M e armazenados em geladeira a 4°C, até o momento da inclusão.

Tabela 1 - Dados biométricos dos animais utilizados no trabalho. (PC, peso corporal; SRL, snout-rump length; TD, peso do testículo direito; TE, peso do testículo esquerdo). Valores expressos em média \pm erro padrão. n, expressa o número de animais utilizados em cada idade.

| Idade | n | PC (g) | SRL (mm) | TD (mg) | TE (mg) |
|-------|---|------------------|---------------|-------------------|-------------------|
| 1 | 4 | 1,35 \pm 0,10 | 31 \pm 0,91 | 0,58 \pm 0,06 | 0,53 \pm 0,04 |
| 2 | 4 | 1,43 \pm 0,03 | 31 \pm 0,67 | 0,64 \pm 0,07 | 0,60 \pm 0,04 |
| 3 | 4 | 1,87 \pm 0,16 | 34 \pm 1,30 | 0,87 \pm 0,11 | 0,83 \pm 0,14 |
| 4 | 4 | 2,48 \pm 0,04 | 36 \pm 0,85 | 1,28 \pm 0,14 | 1,37 \pm 0,10 |
| 5 | 4 | 2,47 \pm 0,13 | 37 \pm 0,43 | 1,42 \pm 0,07 | 1,35 \pm 0,07 |
| 6 | 4 | 3,62 \pm 0,22 | 40 \pm 1,11 | 1,98 \pm 0,18 | 2,00 \pm 0,14 |
| 7 | 4 | 3,51 \pm 0,14 | 43 \pm 0,75 | 2,28 \pm 0,08 | 2,10 \pm 0,14 |
| 9 | 4 | 5,43 \pm 0,21 | 48 \pm 0,91 | 3,73 \pm 0,08 | 3,50 \pm 0,24 |
| 11 | 3 | 5,52 \pm 0,09 | 50 \pm 0,50 | 4,42 \pm 0,18 | 4,36 \pm 0,13 |
| 13 | 4 | 8,13 \pm 0,22 | 58 \pm 0,91 | 8,00 \pm 0,76 | 8,48 \pm 1,04 |
| 15 | 3 | 7,66 \pm 0,53 | 59 \pm 1,44 | 7,38 \pm 0,82 | 7,20 \pm 0,94 |
| 17 | 4 | 5,04 \pm 0,04 | ---- | 9,96 \pm 0,22 | 10,88 \pm 0,47 |
| 20 | 4 | 7,73 \pm 0,36 | ---- | 14,15 \pm 0,38 | 13,68 \pm 0,57 |
| 28 | 4 | 17,09 \pm 1,29 | 80 \pm 2,29 | 48,80 \pm 1,90 | 47,50 \pm 2,06 |
| 37 | 4 | 20,24 \pm 0,35 | ---- | 68,20 \pm 2,31 | 71,40 \pm 3,23 |
| 70 | 4 | 27,83 \pm 0,52 | ---- | 105,50 \pm 1,85 | 103,00 \pm 2,04 |

Os animais de 17, 20, 28, 37 e 70 dias, por sua vez, foram fixados por perfusão intravascular. Aproximadamente 15 minutos antes do procedimento de perfusão intravascular, injetou-se, pela via intra-peritoneal, heparina (Liquemine Roche) na dosagem de 125 UI/kg de peso corporal. Após a anestesia, por meio de injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (30 mg/kg peso corporal), procedeu-se à abertura da cavidade torácica com o objetivo de expor o coração. Um cateter (20G - 1,1mm) foi introduzido no ventrículo esquerdo e o leito vascular lavado com solução salina 0,9%, a uma pressão de aproximadamente 80 mmHg. Após a retirada do sangue com solução salina, que durou entre 5 a 10 minutos, iniciou-se o procedimento de fixação através da perfusão com glutaraldeído a 5% em tampão cacodilato 0,05M (pH 7,3). Após um período de perfusão de aproximadamente 25 minutos, os testículos foram retirados, pesados e recortados em pequenos fragmentos de 1 a 2 mm de espessura. Estes fragmentos foram re-fixados por

imersão no mesmo fixador por mais 12 a 24 horas, a 4° C. Este procedimento baseou-se em método já descrito por Sprando (1990) e Chiarini-Garcia & Meistrich (2007).

Apesar de terem sido utilizados métodos diferentes de fixação dos tecidos (imersão e perfusão), não foram observadas diferenças morfológicas, decorrentes da metodologia de fixação, entre as células estudadas.

4.3. Processamento histológico dos testículos

Os fragmentos de testículo armazenados foram submetidos à fixação secundária em tetróxido de ósmio (EMS, Hatfield, PA – cat. #19110) reduzido (tetróxido de ósmio a 1% em ferrocianeto de potássio a 1,5%) por 90 minutos, e em seguida desidratados em concentrações crescentes de álcool (35°, 50°, 70°, 85°, 2 x 95° e 3 x 100°) e em acetona. Após a desidratação, os fragmentos foram incluídos em resina Araldite 502 (EMS, Hatfield, PA –cat. #13900), segundo fórmula de Luft, técnica utilizada rotineiramente no Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução (Laber) – ICB/UFMG.

Os tecidos incluídos em blocos foram seccionados, com o uso de navalhas de vidro, em cortes histológicos na espessura de 1µm, utilizando micrótomo rotativo Reichert Jung (mod. 1140/autocut). As secções histológicas obtidas foram coradas com azul de toluidina-borato de sódio a 1%, montadas com Entellan (Merck), e analisadas em microscópio de luz Olympus BX-41.

4.4. Análise morfológica

Quanto à análise morfológica dos testículos durante o desenvolvimento, os principais pontos avaliados foram: (1) os tipos de células germinativas mais avançadas presentes em cada uma das idades estudadas e (2) se as associações celulares rígidas do CES, encontradas nos animais adultos, estariam presentes em diferentes idades desde o nascimento.

A partir destes estudos foi construída uma tabela na qual estão representados, de forma semi-quantitativa, todos os tipos de células germinativas encontrados nos animais de cada idade avaliada. Neste sentido, os tipos celulares foram quantificados da seguinte forma: ausentes (-), presentes em pequena quantidade (+), em quantidade intermediária (++) e em grande quantidade (+++).

Também foi estudado, nos animais mais jovens, se as espermatogônias se assemelham morfológicamente ou não à classificação utilizada para espermatogônias em camundongos adultos (Chiarini-Garcia & Russell, 2001). No caso de algumas células que não se pareciam com aquelas dos animais adultos, foi feito um estudo morfológico e/ou

morfométrico destas células com o objetivo de diferenciá-las entre si. Estas células germinativas e os gonócitos, encontrados nos primeiros dias após o nascimento, foram analisados morfológicamente quanto à posição no cordão/túbulo seminífero, morfologia do citoplasma e do núcleo, quantidade e disposição da heterocromatina e morfologia do nucléolo.

4.5. Análise morfométrica

Os estudos morfométricos consistiram na avaliação da cinética espermatogonial nas idades de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 15, 37 e 70 dias sendo que para isso foram obtidos (1) o número absoluto dos diferentes tipos de espermatogônias e (2) o número relativo de apoptoses e mitoses espermatogoniais.

Em relação aos animais originados dos Estados Unidos, optou-se por não utilizar os animais de 17 e 20 dias *p.p.* nos estudos morfométricos. Isto ocorreu pois, apesar de terem apresentado dados importantes para o estudo de morfologia da ontogênese, estes animais possuíam um baixo peso corporal (Tabela 1), e acredita-se (Courout et al., 1970) que o peso corporal de um animal está mais relacionado com o seu amadurecimento sexual do que a idade. Já os animais nas idades de 37 e 70 dias não foram eliminados dos dados morfométricos, uma vez que a puberdade e a idade adulta são períodos bem estabelecidos para camundongos.

4.5.1. Número absoluto de cada tipo espermatogonial

Para se determinar o número absoluto de cada tipo espermatogonial (A_{ind} , A_1 , A_2 , A_3 , A_4 , In, B) presente nos testículos, os seguintes parâmetros morfométricos foram obtidos:

- 4.5.1.1. volume do parênquima testicular - V_T (μm^3)
- 4.5.1.2. proporção volumétrica de epitélio seminífero - Vv_e (%)
- 4.5.1.2. volume de epitélio seminífero - Vt_e (μm^3)
- 4.5.1.3. proporção volumétrica do núcleo de cada tipo espermatogonial - Vv_n (%)
- 4.5.1.3. volume total ocupado pelos núcleos de cada tipo espermatogonial - Vt_n (μm^3)
- 4.5.1.4. volume nuclear médio de cada tipo espermatogonial - Vn (μm^3)
- 4.5.1.5. número absoluto de cada tipo espermatogonial/testículo - NC (10^6 - milhões)

4.5.1.1. Volume do parênquima testicular - V_T (μm^3)

O peso testicular (P_T) obtido durante a coleta do material corresponde ao peso do parênquima testicular acrescido do peso da túnica albugínea (quando essa não tiver sido retirada). Sendo assim, o primeiro passo para se calcular o volume do parênquima testicular consiste em subtrair o correspondente ao peso da túnica albugínea, ou seja, ~3,5% do valor

obtido (Sinha Hikim et al., 1988). Utilizando como exemplo um animal adulto de $P_T = 100\text{mg}$, o peso do parênquima testicular desse animal seria:

$$100 (- 3,5\%) = 96,5\text{mg}$$

A partir do valor do peso do parênquima testicular é necessário realizar uma série de transformações de unidades de medidas com o objetivo de se obter o volume desse parênquima. Como o valor que temos está expresso em miligramas (mg) e desejamos que ele seja expresso em gramas (g), é necessário transformá-lo multiplicando o valor por 10^{-3} . O nosso exemplo ficaria:

$$96,5 \times 10^{-3} \text{ g} = 0,0965\text{g}$$

A partir da literatura temos que a densidade do testículo é muito próxima de 1g/mL (1,03 a 1,04; Sinha Hikim et al., 1988), então para cada grama de testículo teremos o volume correspondente a $10^{12} \mu\text{m}^3$. Para o nosso exemplo o volume do parênquima testicular seria:

$$V_T = 0,0965 \times 10^{12} \mu\text{m}^3$$

4.5.1.2. Proporção volumétrica - Vv_e (%) e volume do epitélio seminífero - Vt_e (μm^3)

A proporção volumétrica do epitélio seminífero no testículo foi estimada utilizando-se retículo com 441 intersecções (pontos) acoplado à ocular de um microscópio Olympus BX-41. Para obtenção desta proporção volumétrica foram contados, com aumento final de 400X (objetiva de 40X), os pontos coincidentes com o epitélio seminífero e aqueles presentes no espaço intersticial e no lúmen. O número de campos a ser contado foi determinado previamente em um estudo (Tabela 2) no qual testou-se, dentre os grupos de 10, 20, e 30 campos contados, qual seria a quantidade mais representativa. Considerando não haver diferença significativa entre os resultados, optou-se por contar o menor número de campos (10 campos) por animal, escolhidos ao acaso, perfazendo-se um total de 4.410 pontos.

Tabela 2 – Contagem de diferentes números de campos (10, 20 e 30) com objetivo de determinar o número mínimo estatisticamente adequado de campos para se fazer a análise morfométrica da proporção volumétrica de epitélio seminífero no testículo. Vv_e (%), porcentagem ocupada pelo epitélio seminífero no testículo. Valores calculados para um animal com peso testicular médio de 101,5 mg.

| | Número de campos | | |
|---|------------------|-------------|-------------|
| | 10 | 20 | 30 |
| Pontos totais contados | 4410 | 8820 | 13230 |
| Pontos no epitélio | 3784 | 7427 | 11179 |
| Pontos no lúmen | 411 | 1393 | 2051 |
| Pontos no interstício | 215 | 586 | 837 |
| Proporção volumétrica de epitélio seminífero (Vv_e - %) | 85,8 | 84,2 | 84,5 |

Em seguida, foi estimado o volume do epitélio seminífero (V_{t_e}) a partir do conhecimento do percentual ocupado pelo mesmo no volume total do testículo (V_T), conforme a fórmula:

$$V_{t_e} = \frac{V_T \cdot V_{v_e}}{100}$$

onde: V_{t_e} = volume do epitélio seminífero (μm^3)
 V_T = volume do parênquima testicular (μm^3)
 V_{v_e} = proporção volumétrica do epitélio seminífero no testículo (%)

4.5.1.3. Proporção volumétrica - V_{v_n} (%) e volume total ocupado pelos núcleos de cada tipo espermatogonial - V_{t_n} (μm^3)

Utilizando o mesmo retículo de 441 pontos, em aumento final de 1000X, foram contados aproximadamente 40 túbulos transversais para cada animal, onde foram determinadas as proporções (V_{v_n}) de cada tipo espermatogonial (A_{ind} , A_1 , A_2 , A_3 , A_4 , I_n e B) dentro do epitélio seminífero. O volume total ocupado pelos núcleos de cada tipo celular (V_{t_n}) foi calculado a partir do volume do epitélio, através da seguinte fórmula:

$$V_{t_n} = \frac{V_{t_e} \cdot V_{v_n}}{100}$$

onde: V_{t_n} = Volume total ocupado pelos núcleos de cada tipo de espermatogônia (μm^3)
 V_{t_e} = volume do epitélio seminífero (μm^3)
 V_{v_n} = porcentagem ocupada pelo núcleo da espermatogônia em avaliação (%)

Observação: para se obter um resultado que represente o testículo como um todo, deve-se selecionar os 40 cortes transversais de túbulos seminíferos no maior número possível de blocos diferentes e evitar a contagem de túbulos seminíferos vizinhos.

4.5.1.4. Volume nuclear médio de cada tipo espermatogonial - V_n (μm^3)

Um dos parâmetros necessários para o cálculo do número de espermatogônias é a mensuração do volume nuclear de cada tipo espermatogonial, que foi calculado aplicando a seguinte fórmula:

$$V_n = \frac{4}{3} \pi R^3$$

onde: V_n = volume nuclear (μm^3)
 $\pi = 3,1416$
 R = raio nuclear (diâmetro nuclear dividido por 2)

O diâmetro nuclear médio representa a média das medidas dos diâmetros de 10 núcleos para cada tipo celular por animal, segundo o padrão de distribuição dos mesmos. Estes diâmetros foram medidos com o auxílio de uma régua micrométrica Olympus,

acoplada a uma ocular, aferida em micrômetros com o auxílio de uma lâmina graduada da Leitz.

Assim como foi feito para o número de campos a serem contados no cálculo de proporção tubular, o número de núcleos que deveriam ser medidos para se obter a média de diâmetros nucleares, foi determinado após a medição de grupos de 10, 20 e 30 núcleos (Tabela 3). Verificou-se que não existe diferença significativa entre os resultados. Sendo assim, novamente optou-se por medir o diâmetro nuclear do menor número de células, isto é, 10 núcleos de cada tipo espermatogonial.

Tabela 3 – Médias dos diâmetros nucleares (média \pm erro padrão) de 10, 20 e 30 células.

| | Diâmetro Nuclear Médio (μm^3) | | |
|--------------------------|--|-----------------|-----------------|
| | 10 | 20 | 30 |
| Célula de Sertoli | 9,90 \pm 0,39 | 9,88 \pm 0,27 | 9,83 \pm 0,19 |
| A indiferenciada | 8,30 \pm 0,20 | 8,04 \pm 0,17 | 7,99 \pm 0,13 |
| A₁ | 9,05 \pm 0,26 | 9,10 \pm 0,17 | 9,02 \pm 0,15 |

4.5.1.5 Número absoluto de cada tipo espermatogonial/testículo – NC (10^6)

Com os dados obtidos anteriormente, foi possível calcular o número de cada tipo espermatogonial por testículo, dividindo o volume total ocupado pelos núcleos de cada tipo celular (V_{t_n}) presente no epitélio seminífero pelo volume nuclear do mesmo tipo celular (V_n), conforme a fórmula a seguir. O número obtido está expresso em milhões ($\times 10^6$).

$$NC = \frac{V_{t_n}}{V_n}$$

onde: NC = número de determinado tipo celular no testículo (milhões)
 V_{t_n} = volume total do mesmo tipo celular no epitélio seminífero (μm^3)
 V_n = volume nuclear do mesmo tipo celular (μm^3)

4.5.2. Número relativo de mitoses e apoptoses espermatogoniais

Os números de espermatogônias em mitose e apoptose foram obtidos pela contagem de aproximadamente 30 cortes transversais de cordões/túbulos seminíferos, nos animais das idades estudadas. O número relativo de mitoses e apoptoses foi calculado como a razão entre o número das mesmas em relação ao número de secções transversais de cordões/túbulos seminíferos contados.

As células foram classificadas em divisão mitótica pela aparência morfológica dos seus cromossomas. O principal detalhe citológico que diferenciou as mitoses de células germinativas de células de Sertoli foi a intensidade de coloração do citoplasma (Figura 4).

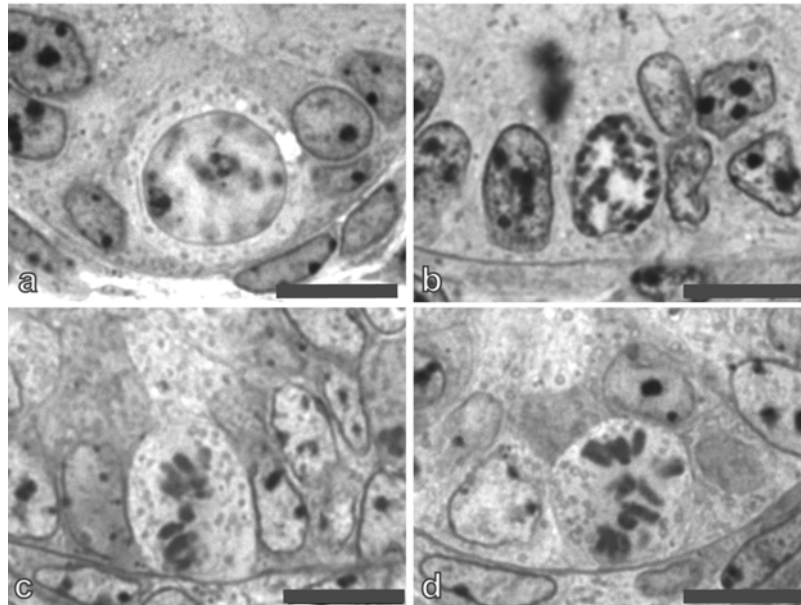


Figura 4. Mitose de célula germinativa (a,c) onde é possível identificar citoplasma pouco corado, em comparação com a mitose de célula de Sertoli (b,d) onde o citoplasma é mais corado e de difícil diferenciação com os das células de Sertoli em intéfase. Barras equivalem a 10 μ m.

O uso do método de microscopia de luz de alta resolução não é suficiente para identificar, com total segurança, qual o tipo de célula está em processo de apoptose. No entanto, pela nossa experiência com este método de estudo, acreditamos ser possível reconhecer aproximadamente 80% dos corpos apoptóticos (Figura 5) como sendo de espermatogônias, considerando os seguintes detalhes citológicos:

1. Em fases mais iniciais do processo apoptótico (Figura 5a), quando o citoplasma ainda é visualizado, pode-se observar sua forma (arredondados/espermatócitos ou alongado/espermatogônias) e se está em contato com a membrana basal, que ocorre principalmente nas espermatogônias.

2. Desde o início até metade do processo apoptótico, o núcleo possui características que tornam possível relativa diferenciação dos tipos celulares, quanto ao formato, tamanho, granulosidade e fragmentação dos cromossomos (grânulos mais finos nas espermatogônias e grumos mais grosseiros nos espermatócitos). Várias apoptoses juntas, dependendo do estágio do CES, não correspondem a espermatogônias; normalmente as apoptoses espermatogoniais aparecem isoladas (Figura 5b).

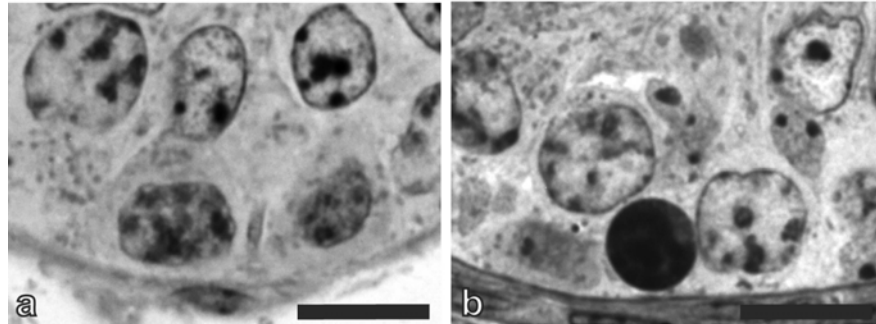


Figura 5. Apoptoses espermatogoniais em estágio inicial (a) e em estágio mais avançado, porém isolada (b). Barras equivalem a 10 μ m.

Uma minoria dos corpos apoptóticos está no final do processo degenerativo e, nesse caso, muitos dos detalhes citados acima não podem ser vistos, de modo que não é possível ter certeza sobre o tipo celular que está morrendo. É importante ressaltar que, o reconhecimento destes detalhes citológicos, só é possível por examinadores bem treinados.

4.5.3. Análise estatística

Os resultados numéricos obtidos neste trabalho foram digitados no programa Microsoft Excel, que calculou as médias, desvios e erros padrões da média. Os dados morfométricos do presente trabalho são expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). As médias entre os grupos estudados foram comparadas através do teste Student Newman-Keuls, enquanto a variabilidade foi analisada por meio de análise de variância (ANOVA). Estes testes estatísticos foram realizados utilizando-se o programa *Statistica for Windows 4.3* (StatSoft, Inc.1993). O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Descrição Morfológica e Cronologia das Células Germinativas

A seguir serão descritas características morfológicas das células germinativas e somáticas dos cordões e túbulos seminíferos de camundongos durante o desenvolvimento dos testículos, desde o nascimento até a idade adulta (Figuras 6-15).

Algumas idades subseqüentes apresentam características morfológicas semelhantes, além de os tipos celulares encontrados serem os mesmos. Sendo assim, suas descrições morfológicas foram agrupadas.

Em cada uma das idades selecionadas, determinou-se também o tipo de célula germinativa mais avançado, como pode ser observado na Tabela 4. Esta tabela além de indicar a ocorrência de cada tipo celular, também exhibe qualitativamente a freqüência destas células.

Os resultados mostram que os gonócitos estão presentes nos testículos até o 5º dia.. Entre o 6º e 7º dias, todas as células da linhagem espermatogonial já são encontradas no testículo embora a quantidade de espermatogônias do tipo B seja pequena. Com 20 dias, foram identificadas as primeiras figuras de metáfase e anáfase, da meiose I e os primeiros espermátócitos secundários. Já com 37 dias, o processo espermatogênico estava completo, indicando ocorrência da puberdade nesta espécie.

5.1.1. Cordões Seminíferos

1º e 2º dias - (Figura 6)

Nos cordões seminíferos de camundongos recém-nascidos, as células de Sertoli e as células germinativas foram nitidamente distinguíveis entre si (Figuras 6a, b). As células de Sertoli nesta idade apresentam núcleo pequeno e de formato irregular, podendo apresentar invaginações na membrana nuclear. Geralmente possuem grumos de heterocromatina distribuídos aleatoriamente pelo nucleoplasma e mais de um nucléolo, que

são pequenos, compactos e distribuídos de forma irregular no núcleo. As células de Sertoli estão geralmente presentes na base dos cordões seminíferos, próximas à membrana basal, mas algumas delas podem ser vistas em posição central.

Dentre as células germinativas presentes ao nascimento, foram identificados os gonócitos, que devido a alterações relativas às fases do ciclo celular apresentaram diferenças morfológicas e, para efeito de estudo, nós dividimos o mesmo tipo celular em três diferentes fases: gonócitos I, gonócitos II e pré-espermatogônias. Os gonócitos I (Figura 6c) são células de citoplasma e núcleo arredondados. O núcleo desta célula é maior que o da célula de Sertoli e apresenta de um a três nucléolos, bem compactados. Encontram-se, em sua maioria, posicionados na região central dos cordões seminíferos. Os gonócitos II (Figura 6d) são também células de citoplasma e núcleo arredondados e grandes. Diferenciam-se dos gonócitos I principalmente por apresentarem seus nucléolos menos compactos, de aspecto ligeiramente difuso. Alguns deles se localizam na região central dos cordões seminíferos, no entanto, a maioria ou aparece com prolongamentos direcionados para a membrana basal, ou já se encontra posicionada junto a ela. As pré-espermatogônias (Figura 6e) são células de citoplasma e núcleo de formas variadas, arredondados, ovalados ou irregulares. Elas apresentam núcleo claro, eucromatina granulosa e pequenos grumos de heterocromatina aderidos à borda interna da membrana nuclear. As características morfológicas das pré-espermatogônias aqui expostas são semelhantes àquelas descritas por Chiarini-Garcia & Russel (2001) para espermatogônias diferenciadas dos tipos A_2 e A_3 . Apesar das semelhanças entre elas, as pré-espermatogônias são maiores que as células A_2 e A_3 (ver adiante). Normalmente estas células se localizam na região basal dos cordões seminíferos, no entanto, algumas poucas foram localizadas na região central dos mesmos.

Alguns gonócitos, nas três diferentes fases (gonócitos I e II e pré-espermatogônias), apresentam, próximo ao núcleo, estrutura semelhante ao complexo de Golgi, formando capuz que envolve vesículas de diferentes tamanhos (Figuras 6f, g). Nestas células, observa-se achatamento do núcleo na região onde esta estrutura está justaposta. Esta deformação do núcleo é mais pronunciada em algumas destas células e menos pronunciada em outras. Estes conjuntos estruturais assemelham-se àqueles que podem ser observados em espermátides arredondadas, na formação das vesículas acrossômicas.

Outra particularidade foi a ocorrência de gonócitos iniciais (do tipo I) multinucleados (Figura 6h). Observou-se a presença de dois até seis núcleos dentro de um mesmo citoplasma. Alguns deles apresentam-se com morfologia de células normais enquanto outros estão em processo de apoptose.

3º dia - (Figura 7)

Nesta idade, os cordões seminíferos se apresentam mais organizados, em relação às células mióides e à lâmina basal, do que nos dos animais de um e dois dias. Já podem ser identificadas espermatogônias semelhantes àquelas descritas em camundongos adultos. As células de Sertoli, de aspecto imaturo, apresentam núcleo com grande variedade de formas e tamanhos e com vários nucléolos compactos (Figura 7a).

Gonócitos nas três diferentes fases foram observados neste idade e mantêm suas características iniciais quanto à morfologia celular, coloração do citoplasma, núcleo e nucléolo (Figura 7b). Também aparecem posicionados nos cordões seminíferos como nas idades anteriores, isto é, os gonócitos I mais centralmente e os gonócitos II e as pré-espermatogônias preferencialmente na base dos cordões seminíferos.

As espermatogônias indiferenciadas (Figuras 7a, c) foram identificadas pela primeira vez aos três dias de idade e apresentam características semelhantes às daquelas células classificadas como espermatogônias indiferenciadas descritas previamente em animais adultos (Chiarini-Garcia & Russel, 2001). São células com núcleo mais corado e menos granuloso que os das células germinativas vistas nas idades de um e dois dias. Em algumas delas foram visualizados vacúolos nucleares (Figura 7c).

Também nesta idade foram identificadas, pela primeira vez e em pequena quantidade, espermatogônias diferenciadas do tipo A₁ (Figura 7d). Elas também possuem as mesmas características daquelas de animais adultos, tais como células com núcleo grande ovalado e claro, com eucromatina homogênea, e raros e pequenos grumos de heterocromatina aderidos à membrana nuclear.

4º e 5º dias - (Figura 8)

Nestas idades os gonócitos na fase I e II não foram mais encontrados nos cordões seminíferos. No entanto, ainda foram observados, aparentemente em menor quantidade, aqueles mais avançados na fase de pré-espermatogônias. As células de Sertoli continuam apresentando características de células imaturas, como núcleo pequeno, com formas variadas e membrana nuclear irregular. (Figura 8a).

Além das espermatogônias indiferenciadas (A_{isoladas}, A_{pareadas} e A_{alinhadas}), é possível identificar nestas idades a série completa de espermatogônias do tipo A diferenciadas (A₁, A₂, A₃ e A₄). Estas espermatogônias A diferenciadas dos tipos A₂ (Figura 8c), A₃ (Figura 8d) e A₄ (Figura 8e), são morfologicamente semelhantes àquelas encontradas nos camundongos adultos (Chiarini-Garcia & Russel, 2001). Ou seja, são células que apresentam núcleo claro, eucromatina granulosa e pequenos grumos de heterocromatina aderidos à borda interna da membrana nuclear. Estes grumos podem estar presentes em diferentes quantidades, dependendo do tipo de espermatogônia A, sendo que a

espermatogônia do tipo A_1 praticamente não tem grumos de heterocromatina e a espermatogônia do tipo A_4 tem de aproximadamente 30 a 70% da sua membrana nuclear recoberta pelos grumos.

Nos animais de quatro dias de idade, pode-se comparar morfológicamente as pré-espermatogônias com as espermatogônias diferenciadas dos tipos A_2 e A_3 (Figura 8a com 8c, d). Nota-se que estas células apresentam características morfológicas semelhantes, apesar de possuírem tamanhos celulares e nucleares significativamente diferentes, como será demonstrado posteriormente.

Também aos quatro dias foi observado, pela primeira vez, um tipo de espermatogônia completamente diferente daqueles descritos por Chiarini-Garcia e Russell (2001) para os animais adultos (Figura 8e). São células que apresentam características morfológicas semelhantes às das espermatogônias do tipo A diferenciadas A_2 e A_3 , mas que se diferenciam delas por apresentarem um vacúolo nuclear igual ao que normalmente é observado em células A indiferenciadas. Essas células foram encontradas até os 15 dias *p.p.*

6º e 7º dias - (Figura 9)

Todos os tipos de células da linhagem espermatogonial de camundongos, desde as espermatogônias A_{ind} até as espermatogônias do tipo B, foram encontradas juntas, e pela primeira vez, nos testículos de camundongos de seis dias de idade (Figura 9a-h). As características morfológicas das espermatogônias do tipo A são semelhantes ao que já foi descrito para as idades de um a cinco dias *p.p.* As espermatogônias dos tipos In e B são semelhantes àquelas encontradas em animais adultos (Chiarini-Garcia & Russel, 2001), ou seja, são células de núcleo arredondado e eucromatina fina. Os grumos de heterocromatina também estão presentes nestas células, sendo que, nas espermatogônias In as bordas de heterocromatina podem ocupar de aproximadamente 70 a 100% da membrana nuclear, e nas espermatogônias B os grumos de heterocromatina são redondos e podem ser encontrados periodicamente ao longo da membrana nuclear.

Os animais de sete dias apresentavam os mesmos tipos celulares que os animais de seis dias, com características morfológicas semelhantes (Figura 9i, j). Parece-nos que entre os dias seis e sete de idade não houve formação de gerações celulares mais avançadas do processo espermatogênico.

9º dia - (Figura 10)

Os cordões seminíferos já se apresentam com epitélio seminífero mais alto, com a população completa de espermatogônias e com os primeiros espermatócitos primários (pré-leptótenos e leptótenos), dando início à fase meiótica do processo espermatogênico (Figura

10a). Com o aparecimento dos primeiros espermátocitos, tornou-se possível verificar o sincronismo do CES nestas idades pré-púberes. De fato, tal como observado no animal adulto, quando em um corte transversal de cordão seminífero foram encontrados os leptótenos, estavam também presentes as espermatogônias diferenciadas do tipo A₃.

Como os cordões seminíferos nesta idade possuem diâmetro pequeno e ainda não estão presentes todas as células germinativas das fases meiótica e espermiogênica, foi comum encontrar nos cordões seminíferos clones de espermatogônias formando fileiras de células em divisão (Figura 10b).

Nesta idade, o núcleo das células de Sertoli começa a se alongar e difere do das espermatogônias por possuir eucromatina mais homogênea e nucléolo arredondado, regular e densamente corado (Figura 10c).

11º dia - (Figura 11)

As células germinativas mais avançadas observadas aos 11 dias de idade foram os espermátocitos primários na fase de zigóteno (Figura 11a). Associadas aos zigótenos foram encontradas as espermatogônias diferenciadas do tipo A₃. As espermatogônias são semelhantes, quanto à morfologia, àquelas das idades anteriores (Figuras 11b, c).

As células de Sertoli continuam progressivamente adquirindo formato mais alongado (Figura 11d).

5.1.2. Túbulos Seminíferos

13º dia - (Figura 12)

Aos 13 dias de idade, os primeiros lumens começam a ser formados e os cordões passam a ser chamados então de túbulos seminíferos (Figuras 12a, b). Os núcleos das células de Sertoli tornam-se maiores que os das idades anteriores e adquirem formato oval. A célula germinativa mais avançada nesta idade é o espermátocito primário na fase de paquíteno (Figuras 12b-d). Estes paquítenos foram vistos associados com pré-leptótenos e espermatogônias B, que se agrupam desta maneira nos estádios V e VI do CES dos camundongos adultos.

15º e 17º dias - (Figura 13)

Nestas idades são encontradas associações de células germinativas de diferentes fases do ciclo do epitélio seminífero (Figuras 13a-d). Aos 15 dias, as células germinativas mais avançadas são os paquítenos em associação com pré-leptótenos e espermatogônias A₂. Nos adultos, esta associação corresponderia aos estádios VIII e IX. Aos 17 dias, as

células mais avançadas são os paquítenos associados a zigótenos (Figura 13d), correspondendo aos estádios X e XI do CES.

20º dia até adulto - (Figuras 14 e 15)

Aos 20 dias de idade, as células germinativas mais avançadas encontram-se na fase de diplóteno (Figura 14a). Algumas poucas figuras de metáfase e anáfase da meiose I e de espermátocitos secundários, foram também observadas nesta idade (Figura 14b).

Aos 28 dias, as células mais avançadas foram as espermátides alongadas que se encontravam na fase 15 da espermiogênese e que são encontradas, no adulto, no estágio IV do CES. De fato, foram encontradas nos túbulos onde estas espermátides estavam presentes as espermátides arredondadas da fase quatro do processo espermiogênico (Figuras 14c, d).

Aos 37 dias de idade os túbulos seminíferos apresentam espermatogênese completa (Figura 15a, c), apesar dos túbulos seminíferos ainda possuírem diâmetro visivelmente menor que os dos animais de 70 dias (Figura 15a, b). Nestas idades, as células germinativas do epitélio seminífero apresentam-se dispostas em XII estádios (Figura 3), tal como descrito por Oakberg (1956), e as espermatogônias possuem morfologia de acordo com o que foi descrito por Chiarini-Garcia & Russel (2001).

5.2. Diâmetros Nucleares e Razões Entre Volumes Célula / Núcleo

A Figura 16 mostra os diâmetros médios dos núcleos de células germinativas, desde os gonócitos até as espermatogônias B, em algumas das idades estudadas. Comparações entre os diâmetros nucleares de algumas destas células demonstram que eles são variáveis entre si. Os gonócitos são células que geralmente apresentam diâmetros nucleares maiores que os das espermatogônias encontradas nos camundongos adultos (Figura 16).

Em todas as idades em que estão presentes, as espermatogônias A_{ind} possuem diâmetros nucleares menores que os das diferenciadas do tipo A (A_1 , A_2 , A_3 , A_4). Dentre todos os tipos espermatogoniais, as espermatogônias A_2 são aquelas que possuem o maior diâmetro nuclear. Já as espermatogônias do tipo B são as que possuem o menor diâmetro (Figura 16).

Em se tratando de um mesmo tipo espermatogonial, constatou-se que o diâmetro nuclear de algumas células altera significativamente nas diferentes idades (Tabela 5). Como exemplo, podemos citar as espermatogônias do tipo A_2 . Enquanto aos 5 dias de idade o diâmetro nuclear médio destas células era de 11,31 μm , aos 37 dias o mesmo tipo celular passa a medir 9,26 μm ($p < 0,05$). Em linhas gerais, constatou-se que com o avançar da idade o diâmetro nuclear de um mesmo tipo celular reduz gradativamente. Estas diferenças

relacionadas com a idade são mais evidentes nas células menos avançadas como as espermatogônias A indiferenciadas e diferenciadas mais iniciais, tais como as A_1 , A_2 e A_3 .

Com o objetivo de verificar qual a relação entre a redução do tamanho do núcleo com o tamanho das células germinativas aqui estudadas, determinou-se os volumes da célula e do núcleo de cada uma e, em seguida, calculou-se a razão entre eles (Figura 17). Os resultados obtidos mostram que, quanto mais diferenciada for a célula (espermatogônias In e B), menor será a razão entre célula/núcleo, e menores serão as diferenças entre as razões destas células nas diferentes idades. Estes resultados mostram ainda que, quanto menor for a razão, menor será o volume do citoplasma em relação ao do núcleo, o que pode ser nitidamente visualizado entre as espermatogônias do tipo B nas diferentes idades (Figura 17).

Quando se comparam as razões célula/núcleo de outros tipos celulares, como por exemplo as espermatogônias A_2 , observa-se que a razão é maior nos animais mais jovens e menor nos animais sexualmente maduros (37 e 70 dias) (Figura 17), mostrando que nos camundongos mais velhos o volume do citoplasma é menor que os dos animais mais jovens, em relação ao núcleo.

5.3. Morfometria e Cinética Espermatogoniais

5.3.1. Número absoluto de espermatogônias

A fim de se calcular o número total de cada um dos tipos celulares estudados, por testículo, nas diferentes idades, foram realizadas avaliações morfométricas, desde os gonócitos até as espermatogônias do tipo B (Figuras 18 a 20).

Ao observarmos os números dos gonócitos classificados como gonócitos I e II e pré-espermatogônias, nas idades em que estas células estão presentes (Figura 18), constatamos que ao nascimento e no 2º dia *p.p.* o número de gonócitos I e II e pré-espermatogônias é praticamente o mesmo. Já no 3º dia, o número de gonócitos I e II reduz abruptamente, enquanto o número de pré-espermatogônias aumenta e podem ser detectadas, pela primeira vez, as espermatogônias A indiferenciadas. Após o terceiro dia de idade, o número de espermatogônias A_{ind} aumenta rapidamente (Figura 18), os gonócitos I e II não são mais encontrados, e o número de pré-espermatogônias diminui um pouco, até desaparecer no 5º dia *p.p.* Ao somarmos os números de gonócitos I e II e pré-espermatogônias (Figura 18), observamos que o número destas três células juntas se mantém constante nos dois primeiros dias e começa a cair a partir do 3º dia, até desaparecerem após o 4º dia de idade.

Aos 6º e 7º dias após o nascimento, o número de espermatogônias A indiferenciadas (A_{is} a A_{al}) por testículo ainda é pequeno, mas do 9º dia em diante, o seu número foi elevado e semelhante ao de animais adultos (Figura 20). Quanto ao número de espermatogônias A diferenciadas (A_1 a A_4), intermediárias (In) e as do tipo B, os seus números aumentaram gradativamente com o avançar da idade.

Quando se compara a Tabela 4 com a Figura 19, constata-se que qualitativamente (Tabela 4) foram encontradas espermatogônias A_4 nos animais de quatro e cinco dias de idade. Mas, quando se fez a contagem percentual de pontos com a grátula de 441 pontos, nenhum ponto coincidiu com as A_4 nos animais de cinco dias, no entanto, coincidiram com as A_4 de animais mais jovens, com quatro dias de idade (Figura 19). Pelos nossos conhecimentos, não acreditamos que este achado tenha significado biológico e sim que seja um erro amostral, uma vez que o número de células nesta idade é pequeno e os campos selecionados para se fazer a contagem de pontos foram escolhidos aleatoriamente.

Finalmente, quando analisamos os números de todos os tipos celulares presentes em cada idade e o número total de espermatogônias presentes nos testículos (Tabela 7), determinamos que um animal adulto possui um total de 1,49 milhões (10^6) espermatogônias por testículo (Tabela 7a). Ainda sobre o número de espermatogônias (Tabela 7b), um animal adulto possui cerca de $0,2 \times 10^6$ espermatogônias A indiferenciadas (A_{is} , A_{pr} e A_{al}) e $0,54 \times 10^6$ espermatogônias A diferenciadas (A_1 , A_2 , A_3 e A_4), totalizando $0,74 \times 10^6$ de espermatogônias do tipo A, por testículo.

Quando avaliamos a cinética das espermatogônias nas diferentes idades (Figura 21), constatamos que nos animais desde a puberdade até a idade adulta, a proliferação celular segue um aumento progressivo do número de espermatogônias de A_1 até B com controle da densidade espermatogonial, por apoptose da espermatogônias A_2 e A_3 . No entanto, nos animais mais jovens, a fase proliferativa não obedece ao mesmo padrão. Observou-se que normalmente as espermatogônias do tipo A diferenciadas (A_1 a A_4) apresentam menor índice de proliferação em relação às outras espermatogônias diferenciadas (In e B). Observamos que a partir dos 15 dias de idade o número de espermatogônias In e B começam a aumentar expressivamente, em relação ao número de espermatogônias A diferenciadas (Figura 21), enquanto nos animais de sete dias, o número de espermatogônias por testículos ainda é constantemente baixo até a última geração espermatogonial.

5.3.2. Número relativo de mitoses espermatogoniais

O número de mitoses espermatogoniais por secções transversais de cordões seminíferos não aumentou uniformemente durante a primeira semana após o nascimento

(Figura 22). Os valores encontrados demonstram a presença de picos e quedas bruscas no número de divisões celulares em algumas idades específicas. Como exemplo, temos aumentos no número de mitoses nos dias três e seis *p.p.* e queda nos dias subsequentes (dias dois e sete).

A partir dos nove dias, o número de mitoses espermatogoniais aumentou gradativamente até a puberdade (37 dias). Nos animais de 70 dias de idade, considerados animais adultos, o número de mitoses diminuiu e manteve-se significativamente igual ao encontrado nos animais de nove dias de idade (Figura 22).

5.3.3. Número relativo de apoptoses espermatogoniais

O número de apoptoses espermatogoniais teve a tendência a declinar progressivamente desde o nascimento até a idade adulta, mas de uma maneira inconstante, com pequenas elevações e declínios de seus números (Figura 22). O período no qual o número de apoptoses de células germinativas pré-espermatogônias ou espermatogoniais foi mais freqüente foi entre os dias um e três após o nascimento, indicando que mortes celulares são freqüentes entre os gonócitos.

6. DISCUSSÃO

O desenvolvimento inicial do processo espermatogênico, envolvendo os eventos que ocorrem com os gonócitos e com as células deles originadas, é até hoje um assunto bastante controverso. A polêmica gira principalmente em torno da cinética dos gonócitos, isto é, se eles dividem, como se dividem e quantas células eles poderiam formar antes de dar origem às células-tronco espermatogoniais adultas (espermatogônias A_{is}). Enfim, o início do processo espermatogênico ainda não é um evento bem compreendido.

Ao estudar as células germinativas presentes nos camundongos recém nascidos (um dia *p.p.*), verificamos, já ao nascimento, a presença de gonócitos que podem apresentar características morfológicas diferentes, dependendo da etapa do ciclo celular em que estão. Estas diferenças morfológicas nos levaram a separar os gonócitos em três diferentes tipos morfológicos: gonócitos I, gonócitos II e pré-espermatogônias com o objetivo de tentar entender melhor a cinética desta célula durante o ciclo celular. Visto que coletamos apenas animais *post partum*, não foi possível, no presente trabalho, detectar a cinética destes três tipos morfológicos no período pré-parto. Tem sido demonstrado que mesmo antes do nascimento, os gonócitos de camundongos proliferam e se reposicionam nos cordões seminíferos (Nagano et al., 2000). Os dados morfométricos obtidos no presente trabalho durante o período *post partum*, nos sugerem que os gonócitos não se dividem ou dividem muito pouco nos dois primeiros dias. Tem sido descrito por outros autores que no primeiro dia de idade o número de mitoses de gonócitos é muito pequeno, mas que aumenta significativamente nos dias dois e três de idade (Vergouwen et al., 1991), o que corrobora os nossos achados.

Quando se compara a quantidade de gonócitos com morfologia de gonócitos I e II e pré-espermatogônias nos recém nascidos de um e dois dias de idade, constata-se que os seus números por testículo não são significativamente alterados (Figuras 18 e 19) e que as poucas mitoses de gonócitos que foram encontradas nestas idades devem ter sido compensadas pelas apoptoses, também presentes nestes cordões seminíferos (Figura 22).

Em ratos, tem sido observado também que os gonócitos permanecem não-mitóticos por alguns dias após o nascimento (Hilscher et al., 1974) e que neste período de quiescência ocorre degeneração expressiva de gonócitos (Byskov, 1986; Desjardins & Ewing, 1993). Huckins & Clermont (1968) demonstraram que, nestes animais, entre os dias três e sete após o nascimento (os gonócitos são encontrados até o 8º dia nos ratos) há degeneração de aproximadamente 72% dos gonócitos presentes nos cordões seminíferos. O fato do número relativo de apoptoses ser maior logo após o nascimento indica que elas são freqüentes entre os gonócitos. Nossos achados em relação às apoptoses espermatogoniais em camundongos são similares aos achados em ratos. Considerando que os gonócitos foram encontrados até o 5º dia em camundongos, detectamos nos cordões seminíferos entre os dias um e dois desta espécie, número aumentado de apoptoses e logo em seguida, nos dias três e cinco, detectou-se de fato uma redução significativa do número de gonócitos. Mas é importante ressaltar que a redução do número de gonócitos aos cinco dias de idade, além de estar relacionada com perda por apoptoses, pode estar também relacionada com redução de seu número por estarem dividindo e formando as espermatogônias A indiferenciadas.

Durante todo o processo de desenvolvimento das células germinativas, desde o nascimento até a idade adulta, verificamos que o número de apoptoses reduziu gradativamente desde o nascimento até os 70 dias de idade. O fato do número relativo de apoptoses ser maior logo após o nascimento indica que elas são freqüentes entre os gonócitos. De fato, tem sido descrito grande número de apoptoses de gonócitos nos primeiros dias de idade (Roosen-Runge & Leik, 1968). Estas mortes celulares têm como objetivo estabilizar o número de células germinativas visando o desenvolvimento adequado do processo espermatogênico. Nos animais adultos, por sua vez, o número de apoptoses é relativamente menor, pois o processo espermatogênico e a fase espermatogonial estão ocorrendo com os objetivos de se auto-renovarem e de manterem espermatogênese em seu funcionamento normal.

Ainda considerando os dados sobre apoptose, a temperatura seria um importante fator relacionado com a quantidade de apoptoses encontrada em animais mais jovens, uma vez que existem relatos na literatura (Meistrich et al., 1973; Van Demark & Free, 1970) mostrando que o aumento de temperatura pode induzir a apoptose das células germinativas. Considerando que encontramos os testículos de animais até os 15 dias *p.p.* na cavidade abdominal, que apresenta uma temperatura maior que a da bolsa escrotal, podemos concluir que os testículos de animais jovens possuem mais apoptoses do que os de animais maduros justamente por estarem submetidos a um ambiente de temperatura mais elevada.

Antes dos gonócitos formarem as espermatogônias-tronco adultas, alguns autores descrevem a existência de um tipo celular intermediário que denominaram de pré-

espermatogônias (Huckins & Clermont, 1968). Alguns acreditam que estas células teriam origem dos gonócitos por divisão mitótica que por sua vez também se dividiriam por mitose uma ou mais vezes para formar as células-tronco espermatogoniais adultas (Novi & Saba, 1968). Através da avaliação da cinética destas células germinativas, verificamos, no presente trabalho, que os gonócitos não dividem-se mitoticamente em pré-espermatogônias, mas sim dividem-se para formar as espermatogônias A indiferenciadas. Através de estudo morfológico minucioso sob a microscopia de luz de alta resolução, observamos que todos os tipos de gonócitos são diferentes das espermatogônias A indiferenciadas.

Quanto ao aparecimento dos diferentes tipos espermatogoniais, nossos achados mostram que de forma geral, principalmente nos animais mais velhos, não foram identificadas diferenças em relação ao que já foi descrito na literatura, utilizando método para estudo sob microscopia de luz de alta resolução. Assim sendo, a fase meiótica do processo espermatogênico inicia-se aos nove dias, as primeiras figuras de metáfase, anáfase e telófase da meiose I e os primeiros espermatócitos secundários foram vistos aos 20 dias de idade e a puberdade foi confirmada aos 37 dias.

Considerando os achados da primeira semana de idade, acreditamos que alguns pontos merecem discussão. No 3º dia de idade foram identificadas as primeiras espermatogônias do tipo A indiferenciadas que se assemelhavam morfológicamente às dos animais adultos. Surpreendentemente, num intervalo de apenas 24 horas, do 3º para o 4º dia, podem ser observadas, e pela primeira vez, todas as espermatogônias do tipo A diferenciadas, de A_1 até A_4 . Se em camundongos adultos calcularmos a duração, em dias, desde a diferenciação das espermatogônias A_{ad} para A_1 até o início da formação das espermatogônias A_4 (Clermont & Trott, 1969; Russell et al., 1990), verificaremos que o processo espermatogênico levaria, neste percurso, intervalo de tempo de aproximadamente cinco dias. Através de estudos utilizando timidina triciada, Kluin et al. (1982) observaram que em camundongos imaturos a espermatogênese desenvolve-se mais rapidamente que nos adultos. Determinaram ainda que a duração do CES no intervalo de 10 a 30 dias pós-parto era de 7,51 dias, menor do que o de animais adultos que é 8,61. No presente trabalho, confirmamos que há realmente aceleração do processo e que ela ocorre entre os dias três e quatro *p.p.*, logo que as espermatogônias A_{ind} são formadas. Acelerações semelhantes foram também encontradas em hamsters e ratos (Van Haaster & De Rooij, 1993).

No 5º dia, não há progressão do processo espermatogênico, apenas aumento do número destas células pré-existentes. Este achado é corroborado pelo aumento da quantidade de mitose entre as idades de dois a quatro dias. Entre o 6º e o 7º dias mais uma vez foi observado período de quiescência do processo espermatogênico. Nestas duas idades as células mais avançadas foram as espermatogônias B e os números encontrados foram praticamente os mesmos. De fato do 5º para o 6º dia foi observado pico expressivo de

mitoses confirmando a elevação do número celular e do avanço até espermatogônia B. Mas, logo em seguida observa-se expressiva queda no número de mitoses. Diferentes dados estereológicos em conjunto, como número celular e mitoses espermatogoniais, indicam que neste período de cinco para seis dias, as mitoses estão formando espermatogônias A_{ind} , pois foi no 6º dia que o seu número aumentou significativamente em relação ao dos animais mais jovens. Por fim, se considerarmos a aceleração abrupta da espermatogênese, do 3º para o 4º dia e dois períodos curtos de quiescência entre os dias quatro/cinco e cinco/seis, o balanço final ainda é de uma pequena aceleração, tal como observado por Kluin et al. (1982). Essa aceleração provavelmente é decorrente da maior temperatura a que estão submetidos os testículos dos animais jovens, que se encontram na cavidade abdominal. Meistrich et al. (1973) e Van Demark et al. (1970) encontraram que existem uma aceleração na cinética das células germinativas quando estas são submetidas a uma temperatura maior que a da bolsa escrotal.

A partir dos sete dias de idade, há aumento progressivo do número de mitoses espermatogoniais até a puberdade, aos 37 dias. No entanto, em animais adultos, com 70 dias, há queda do número de mitoses. Estes achados demonstram que com o crescimento dos túbulos seminíferos, há necessidade de maior número de células germinativas e, desta forma, o número de divisões celulares é maior. No entanto, como no testículo adulto as mitoses espermatogoniais têm como objetivos a sua auto-renovação, para manter a espermatogênese nos seus patamares normais, o número de divisões espermatogoniais diminui em relação ao de um testículo em crescimento.

O cálculo do número de espermatogônias A_{ind} por testículo aponta para o aumento expressivo ($p < 0,05$) deste tipo celular entre os dias sete e nove após o nascimento. Interessantemente, mesmo sendo um animal tão jovem, o número destas células em animais de nove dias de idade já é semelhante àquele encontrado nos animais adultos. Desta forma, animais desta idade parecem bastante adequados para se isolar células-tronco espermatogoniais, visando o transplante de espermatogônias ou a formação de um banco de células-tronco. Isto se deve ao fato de nesta idade as células germinativas mais avançadas serem os leptótenos, estando ausentes todos os espermatócitos mais avançados e as espermátides arredondadas e alongadas. Deste testículo, seria mais fácil o processo de digestão e isolamento das espermatogônias A indiferenciadas, aumentando a probabilidade de se ter um *pool* mais rico em espermatogônias-tronco. De fato, animais mais jovens já têm sido empregados como doadores ou receptores para o transplante de espermatogônias (Shinohara & Brinster, 2000; Honaramooz et al., 2002).

Vários estudos foram realizados a fim de determinar o número de células presentes nos testículos de animais adultos. Dois trabalhos de destaque calcularam o número de espermatogônias em testículos de camundongos, através do método disector. Vergouwen et

al. (1993) descreveram que existem em torno de $0,65 \times 10^6$ espermatogônias do tipo A e Tegelenbosh & De Rooij (1993) encontraram $0,33 \times 10^6$ espermatogônias A indiferenciadas e $2,5 \times 10^6$ espermatogônias A diferenciadas, totalizando $2,83 \times 10^6$ espermatogônias por testículo de um animal adulto. Os achados desses autores são muito próximos dos dados obtidos no presente trabalho. Calculamos que aproximadamente $0,74 \times 10^6$ espermatogônias A, sendo $0,2 \times 10^6$ espermatogônias do tipo A indiferenciadas e $0,54 \times 10^6$ espermatogônias A diferenciadas. Finalmente calculamos que existem $1,49 \times 10^6$ espermatogônias em cada testículo de um animal adulto.

É sabido que o desenvolvimento da espermatogênese em adultos segue padrão cíclico no qual alguns tipos celulares estão repetidamente associados. Em camundongos foram identificadas 12 associações que são chamadas de estádios e que constituem o ciclo do epitélio seminífero para esta espécie (Oakberg, 1956; Russell et al., 1990). Estas associações se repetem em relação a todos os tipos germinativos, desde os espermatócitos e espermatídes até as espermatogônias, que são vistas em estádios específicos do ciclo do epitélio seminífero (De Rooij, 1998). Constatamos que aos nove dias de idade, havia espermatócitos primários nos cordões seminíferos, e que estes estavam sincronizados com os respectivos tipos espermatogoniais, tal como observado no animal adulto. Este achado sugere que o desenvolvimento das células germinativas já está sob efeito de sincronismo mesmo antes da maturação completa das células de Sertoli. Sabe-se que as células de Sertoli tornam-se maduras em torno do 15º dia em camundongos (Vergouwen et al., 1991; Joyce et al., 1993) e que estas células são responsáveis por controlar o processo espermatogênico, inclusive o sincronismo celular (Parvinen, 1993; revisão em França & Chiarini-Garcia, 2005). Desta forma, ou o sincronismo do epitélio seminífero em estádios não é dependente apenas do controle das células de Sertoli ou estas células desde antes de sua completa maturação já produzem fatores que controlam o sincronismo do ciclo do epitélio seminífero.

A divisão espermatogonial segue um padrão de divisão celular que, em primeira instância, visa a formação de número duplicado de células entre aquelas que se dividem em relação às suas sucessoras. Portanto, estas divisões de modo sucessivo, desde as espermatogônias A_{ind} até as espermatogônias B, seguem uma tendência geométrica de divisão. Por exemplo, em camundongos as divisões a partir de uma única espermatogônia-tronco ($A_{isolada}$) pode levar, teoricamente, à formação de clones de aproximadamente 1024 espermatócitos primários (Huckins & Oakberg, 1978; Russell et al., 1990). Este número só não é aquele encontrado no final do processo devido a mortes celulares que ocorrem e reduzem o número destas células (De Rooij & Russell, 2000). Estas mortes são geneticamente programadas e já foi visto que, se elas não ocorrerem, o testículo sofre falência pelo acúmulo de células germinativas (Russell et al., 2002).

Especificamente em relação ao desenvolvimento da linhagem espermatogonial, constatamos, no presente trabalho, que nos animais da puberdade à idade adulta a proliferação celular segue o mesmo padrão descrito anteriormente para esta espécie (Bolden-Tiller et al., 2007), isto é, há um aumento progressivo do número de espermatogônias de A_1 até B com controle da densidade espermatogonial, por apoptose da espermatogônias A_2 e A_3 (De Rooij & Janssen, 1987; De Rooij & Lok, 1987). Já nos animais mais jovens, o desenvolvimento não seguiu o mesmo padrão em todas as células da linhagem espermatogonial. Observou-se que normalmente as espermatogônias do tipo A diferenciadas (A_1 a A_4) apresentam menor índice de proliferação em relação às outras espermatogônias diferenciadas (In e B). A partir de 15 dias de idade o número de espermatogônias In e B começam a se multiplicar, em relação ao número de espermatogônias A diferenciadas. Naqueles animais de sete dias, o número de espermatogônias por testículos foi constantemente baixo até a última geração espermatogonial. O fato do desenvolvimento da linhagem espermatogonial ter seu início mais expressivamente em torno do 15º dia pode estar relacionado com o período final de formação do número definitivo de células de Sertoli no testículo (Vergouwen et al., 1991; Joyce et al., 1993). Considerando que nesta idade o número de células de Sertoli já seria o mesmo daquele encontrado nos adultos, o epitélio seminífero teria nichos disponíveis para serem ocupados. Desta forma, o processo espermatogonial estaria livre para povoar o testículo respeitando, a partir de agora, o espaço cedido pelo desenvolvimento do parênquima testicular e a capacidade de suporte das células de Sertoli.

Independente das idades avaliadas, quando se comparam os diâmetros nucleares desde as espermatogônias A_{ind} até as espermatogônias B, a cinética foi praticamente a mesma. O diâmetro das A_{ind} foi pequeno, aumentou progressivamente até as A_2 e depois reduziu até as espermatogônias B, achado este que já havia sido descrito em camundongos adultos por Chiarini-Garcia & Russell (2002). No entanto, quando se comparam os diâmetros dos mesmos tipos celulares em relação às idades, os valores encontrados foram, em vários casos, significativamente diferentes. O fato do diâmetro nuclear de uma determinada espermatogônia ser menor nos animais de 37 e 70 dias e progressivamente maior quanto mais jovem for o animal, pode estar relacionado com a disponibilidade de espaço dentro do testículo. Como nos animais mais jovens o número de células germinativas no epitélio seminífero é pequeno e as células de Sertoli ainda são imaturas, as espermatogônias não estão comprimidas no compartimento basal dos túbulos seminíferos. Durante o desenvolvimento, o número das células germinativas vai aumentando progressivamente e os espaços no epitélio vão diminuindo, assim as células, por ficarem comprimidas, apresentam menor diâmetro nuclear. Outro fator que poderia contribuir para o menor diâmetro das espermatogônias em animais maduros seria a formação, a partir dos 15

dias, da chamada barreira de célula de Sertoli, que divide o epitélio seminífero em dois compartimentos (basal e adluminal). Ao serem mantidas pelas células de Sertoli no compartimento basal, as espermatogônias poderiam estar sendo submetidas a uma pressão que contribuiria para os seus menores diâmetros celular e nuclear.

A presença de vacúolos tem sido comumente descrita no núcleo de espermatogônias de camundongos pré-puberes (Vergouwen et al., 1991) e adultos (Chiarini-Garcia & Russell, 2001). Entretanto, o seu possível significado funcional ainda não foi descrito. No presente trabalho, detectamos a presença de espermatogônias indiferenciadas com vacúolos nos cordões seminíferos de animais bastante jovens, desde os 3 dias de idade. Além disto, detectou-se, em pequeno número, a presença destes vacúolos nos núcleos de espermatogônias com morfologia semelhante às diferenciadas do tipo A_2 e A_3 . Células semelhantes a estas foram também encontradas nos túbulos seminíferos de camundongos mutantes *jsd* (Bolden-Tiller et al., 2007; Zallio et al., 2007) e *TEX14* (Rezende et al., 2007) e foram consideradas espermatogônias anormais. Com os métodos que utilizamos no presente trabalho, não foi possível explicar o significado deste achado. No entanto, pretendemos desenvolver novos métodos de estudo com o intuito de verificar até que idade estas células do tipo A_2 e A_3 apresentam vacúolos nucleares e se a presença destes vacúolos estaria relacionada com algum evento fisiológico.

A fase meiótica do processo espermatogênico em camundongos inicia aos nove dias de idade e aos 20 dias são observadas as primeiras figuras de metáfase e anáfase, da meiose I. As divisões da meiose originam as espermátides arredondadas, iniciando-se, assim, a fase espermiogênica do processo espermatogênico (Russell, et al., 1990). Nesta fase ocorre a diferenciação das espermátides arredondadas, visando formar os espermatozoides, em um dos processos de transformação celular mais drásticos já descritos. Uma das etapas desta transformação celular consiste na formação do acrossôma. Esta estrutura se origina de pequenas vesículas, formadas pelo complexo de Golgi, que se coalescem e formam o grânulo acrossômico que, por sua vez, se achata e se espalha sobre um dos pólos do núcleo formando o que se conhece como capuz acrossômico. Surpreendentemente, visualizamos nos gonócitos I e II e nas pré-espermatogônias estruturas que lembram a formação das vesículas acrossômicas das espermátides arredondadas. No entanto, nas espermatogônias A_{ind} , formadas logo em seguida, estas estruturas não foram mais vistas. As imagens morfológicas que obtivemos, com a técnica por nós empregada, não possuem resolução suficiente para nos fornecer detalhes citológicos suficientes para confirmar a origem destes achados. Desta forma, estudos complementares fazem-se necessários, dentre eles avaliações ultra-estruturais.

Foram encontrados, nos cordões seminíferos de camundongos, um número pequeno de gonócitos jovens (gonócitos I) multinucleados. Consultando a literatura, verifica-se que a

ocorrência de gonócitos multinucleados está, em vários casos, relacionada com alterações provocadas por fitalatos (Gaido et al., 2007). A relação entre este fenômeno e algumas drogas é tão direta que dependendo do tipo de exposição o número de núcleos dentro de um mesmo gonócito pode ser aumentado. Isto indica relação direta entre toxicidade e a presença de gonócitos multinucleados (Gaido et al., 2007). No presente trabalho os animais são normais, mas este tipo de gonócito foi encontrado, alguns inclusive com núcleos em apoptose. Portanto, este achado sugere que mesmo em condições normais, gonócitos multinucleados podem ser encontrados em pequeno número.

7. CONCLUSÃO

As ponderações, em conjunto, dos vários parâmetros estudados permitiram-nos chegar às seguintes conclusões:

1. Ao nascimento, estão presentes nos cordões seminíferos as células de Sertoli imaturas e os gonócitos, em diferentes fases do ciclo celular, que não sofrem mitose até o segundo dia de idade.
2. Aos três dias de idade os gonócitos entram em mitose e iniciam a formação das espermatogônias do tipo A indiferenciadas.
3. Aos quatro dias de idades estão presentes nos cordões seminíferos todos os tipos de espermatogônias A indiferenciadas (A_{is} , A_{pr} e A_{al}) e diferenciadas (A_1 , A_2 , A_3 e A_4) e aos seis dias estão presentes todos os tipos de espermatogônias conhecidos (as do tipo A, In e B).
4. A morfologia da grande maioria das espermatogônias durante a ontogênese testicular é semelhante à das espermatogônias dos animais adultos à exceção de alguns tipos espermatogônias que apresentam particularidades na morfologia do núcleo.
5. As células com aspecto anormais assemelham-se às espermatogônias do tipo A_2 e A_3 , possuindo vacúolos nucleares.
6. O ciclo do epitélio seminífero não depende obrigatoriamente da maturação das células de Sertoli uma vez que aos nove dias de idade, quando as células de Sertoli ainda são imaturas, verificaram-se associações celulares semelhantes às aquelas observadas nos indivíduos adultos.
7. Acelerações abruptas intercaladas com períodos de quiescência da proliferação espermatogonial mostram que em camundongos pré-puberes há redução da duração da primeira onda do processo espermatogênico.
8. Devido ao fato de possuírem um número semelhante de espermatogônias A_{ind} ao do animal adulto, os camundongos de nove a onze dias de idade parecem-nos

adequados para a obtenção de um *pool* de espermatogônias-tronco com alto grau de pureza, visto que o isolamento seria facilitado por não possuírem espermatócitos avançados e espermátides.

9. O número de mitoses espermatogoniais é maior nos animais onde o testículo está em desenvolvimento do que em relação aos animais adultos visto que, com o crescimento dos túbulos seminíferos, além da auto-renovação, estas mitoses objetivam a ocupação dos nichos recém formados.
10. Gonócitos multinucleados foram encontrados e estão possivelmente relacionados com o controle do número destas células através do processo de apoptose.
11. O número de espermatogônias, por testículo, de camundongos C57BL6 adultos foi de 1,49 milhões sendo deste valor 0,2 milhões (13,4%) de espermatogônias A indiferenciadas e 0,54 milhões (36,2%) de espermatogônias A diferenciadas.

8. TABELAS

Tabela 4 - Ocorrência das células germinativas (CG) com o avançar das idades em camundongos. (--- Ausência de CG; + poucas CG; ++ quantidade intermediária de CG; +++ grande quantidade de CG).

| DIAS | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 9 | 11 | 13 ¹ | 15 ² | 17 ³ | 20 | 28 ⁴ | 37 | 70 |
|---------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----------------|-----------------|-----------------|-----|-----------------|-----|-----|
| GONÓCITOS I | +++ | +++ | + | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| GONÓCITOS II | +++ | +++ | ++ | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| PRÉ-ESPERMATOGÔNIAS | ++ | ++ | +++ | ++ | + | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| ESPERMATOGÔNIAS INDIFERENCIADAS | --- | --- | + | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ | ++ |
| ESPERMATOGÔNIAS A1 | --- | --- | + | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| A2 | --- | --- | --- | ++ | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| A3 | --- | --- | --- | ++ | ++ | +++ | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| A4 | --- | --- | --- | + | + | ++ | + | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| IN | --- | --- | --- | --- | --- | + | + | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| B | --- | --- | --- | --- | --- | + | + | ++ | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| PRÉ - LEPTÓTENOS | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | + | ++ | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| LEPTÓTENOS | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | + | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| ZIGÓTENOS | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | + | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| PAQUÍTENOS INICIAIS | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| PAQUÍTENOS INTERMEDIÁRIOS | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| PAQUÍTENOS FINAIS | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | ++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| DIPLÓTENOS | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | ++ | +++ | +++ | +++ |
| MEIOSE ? | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | + | +++ | +++ | +++ |
| ESPERMÁTIDES ARREDONDADAS | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | +++ | +++ | +++ |
| ESPERMÁTIDES ALONGADAS | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | + | +++ | +++ |

¹ - Os paquítenos mais avançados estão associados com pré-leptótenos e espermatogônias B

² - Os paquítenos mais avançados estão associados com pré-leptótenos e espermatogônias A2

³ - Os paquítenos mais avançados estão associados com zigótenos

⁴ - A espermátide alongada mais avançada está na fase 15

Tabela 5 - Média dos diâmetros nucleares (média \pm erro padrão) de gonócitos I e II, pré-espermatogônias e espermatogônias ($A_{\text{indiferenciada}}$, A_1 , A_2 , A_3 , A_4 , In e B) nas diferentes idades estudadas. Valor expresso em micrômetros. Diferentes letras (a,b,c) indicam diferenças significativas nos diâmetros nucleares de um mesmo tipo celular, entre diferentes idades ($p < 0,05$).

| Idade (dias) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 15 | 37 | 70 |
|---------------------------|----------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| Gonócito I | 10,33 ^a $\pm 0,27$ | 10,44 ^a $\pm 0,12$ | 9,81 ^a $\pm 0,08$ | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- |
| Gonócito II | 11,95 ^a $\pm 0,89$ | 11,21 ^a $\pm 0,25$ | 10,70 ^a $\pm 0,06$ | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- |
| Pré-espermatogônia | 10,81 ^a $\pm 0,45$ | 10,91 ^a $\pm 0,14$ | 11,58 ^{a,b} $\pm 0,16$ | 12,41 ^b $\pm 0,30$ | 12,06 ^b $\pm 0,03$ | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- |
| A indiferenciada | ---- | ---- | 9,56 ^a $\pm 0,22$ | 9,92 ^a $\pm 0,16$ | 9,98 ^a $\pm 0,12$ | 9,51 ^{a,b} $\pm 0,18$ | 9,94 ^a $\pm 0,13$ | 9,13 ^b $\pm 0,05$ | 8,19 ^c $\pm 0,04$ | 8,19 ^c $\pm 0,05$ |
| A1 | ---- | ---- | ---- | 10,56 ^a $\pm 0,13$ | 10,85 ^a $\pm 0,20$ | 9,92 ^b $\pm 0,17$ | 10,97 ^a $\pm 0,11$ | 10,08 ^{a,b} $\pm 0,12$ | 9,39 ^c $\pm 0,22$ | 9,06 ^c $\pm 0,22$ |
| A2 | ---- | ---- | ---- | 11,17 ^a $\pm 0,10$ | 11,31 ^a $\pm 0,14$ | 10,48 ^b $\pm 0,24$ | 11,22 ^{a,b} $\pm 0,11$ | 10,36 ^b $\pm 0,11$ | 9,26 ^c $\pm 0,20$ | 9,75 ^c $\pm 0,12$ |
| A3 | ---- | ---- | ---- | 11,15 ^a $\pm 0,16$ | 10,74 ^a $\pm 0,11$ | 10,26 ^b $\pm 0,15$ | 10,97 ^a $\pm 0,07$ | 10,16 ^b $\pm 0,08$ | 9,46 ^c $\pm 0,09$ | 9,63 ^c $\pm 0,19$ |
| A4 | ---- | ---- | ---- | 10,46 ^a $\pm 0,04$ | 11,25 ^a $\pm 0,50$ | 10,09 ^a $\pm 0,04$ | 10,54 ^a $\pm 0,06$ | 9,80 ^a $\pm 0,17$ | 9,41 ^a $\pm 0,06$ | 9,54 ^a $\pm 0,17$ |
| In | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | 9,65 ^a $\pm 0,10$ | 9,89 ^a $\pm 0,13$ | 8,93 ^a $\pm 0,07$ | 8,53 ^a $\pm 0,11$ | 9,06 ^a $\pm 0,22$ |
| B | ---- | ---- | ---- | ---- | ---- | 8,17 ^a $\pm 0,12$ | 9,23 ^b $\pm 0,08$ | 8,74 ^{a,b} $\pm 0,16$ | 8,06 ^b $\pm 0,10$ | 8,24 ^{a,b} $\pm 0,10$ |

Tabela 6 – Média da razão dos volumes célula/núcleo (média \pm erro padrão) de gonócitos I e II, pré-espermatogônias e espermatogônias (A_{indiferenciada}, A₁, A₂, A₃, A₄, In e B) nas diferentes idades estudadas. Valor expresso em micrômetros. Diferentes letras (a,b,c) indicam diferenças significativas nos diâmetros nucleares de um mesmo tipo celular, entre diferentes idades ($p < 0,05$).

| Idade (dias) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 9 | 11 | 15 | 37 | 70 |
|---------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Gonócito I | 3,43 ^a $\pm 0,16$ | 3,68 ^a $\pm 0,16$ | 2,89 ^a $\pm 0,98$ | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| Gonócito II | 3,11 ^a $\pm 0,37$ | 3,53 ^a $\pm 0,10$ | 3,70 ^a $\pm 0,12$ | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| Pré-espermatogônia | 3,52 ^a $\pm 0,26$ | 3,43 ^a $\pm 0,14$ | 3,19 ^a $\pm 0,13$ | 2,80 ^a $\pm 0,13$ | 3,13 ^a $\pm 0,16$ | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| A indiferenciada | ----- | ----- | 2,98 ^a $\pm 0,09$ | 2,92 ^a $\pm 0,13$ | 2,72 ^a $\pm 0,06$ | 2,62 ^a $\pm 0,10$ | 2,62 ^a $\pm 0,11$ | 2,88 ^a $\pm 0,13$ | 2,71 ^a $\pm 0,28$ | 2,61 ^a $\pm 0,32$ | 3,24 ^{a,b} $\pm 0,33$ | 3,90 ^b $\pm 0,44$ |
| A1 | ----- | ----- | ----- | 2,73 ^{a,b} $\pm 0,12$ | 2,87 ^{a,b} $\pm 0,17$ | 2,89 ^{a,b} $\pm 0,17$ | 2,40 ^a $\pm 0,05$ | 2,70 ^{a,b} $\pm 0,07$ | 2,58 ^{a,b} $\pm 0,17$ | 2,63 ^{a,b} $\pm 0,13$ | 3,49 ^{b,c} $\pm 0,22$ | 3,09 ^c $\pm 0,16$ |
| A2 | ----- | ----- | ----- | 2,70 ^a $\pm 0,12$ | 2,84 ^a $\pm 0,17$ | 2,61 ^a $\pm 0,04$ | 2,39 ^a $\pm 0,04$ | 2,56 ^a $\pm 0,13$ | 2,39 ^a $\pm 0,13$ | 2,56 ^a $\pm 0,10$ | 3,62 ^b $\pm 0,17$ | 3,47 ^b $\pm 0,20$ |
| A3 | ----- | ----- | ----- | 2,73 ^{a,b} $\pm 0,18$ | 2,85 ^{a,b} $\pm 0,09$ | 2,56 ^a $\pm 0,07$ | 2,66 ^{a,b} $\pm 0,17$ | 2,53 ^a $\pm 0,04$ | 2,48 ^a $\pm 0,11$ | 2,41 ^a $\pm 0,13$ | 3,09 ^b $\pm 0,10$ | 3,12 ^b $\pm 0,17$ |
| A4 | ----- | ----- | ----- | 2,63 ^{a,b} $\pm 0,07$ | 2,76 ^{a,b} $\pm 0,24$ | 2,46 ^{a,b} $\pm 0,12$ | 2,47 ^{a,b} $\pm 0,06$ | 2,47 ^{a,b} $\pm 0,09$ | 2,21 ^a $\pm 0,07$ | 2,31 ^a $\pm 0,02$ | 2,62 ^{a,b} $\pm 0,03$ | 3,05 ^b $\pm 0,32$ |
| In | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 2,22 ^a $\pm 0,39$ | 2,36 ^{a,b} $\pm 0,03$ | 2,26 ^a $\pm 0,03$ | 2,31 ^{a,b} $\pm 0,02$ | 2,20 ^a $\pm 0,05$ | 2,66 ^b $\pm 0,10$ | 2,44 ^{a,b} $\pm 0,08$ |
| B | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | 2,53 ^a $\pm 0,33$ | 2,33 ^a $\pm 0,08$ | 2,20 ^a $\pm 0,08$ | 2,31 ^a $\pm 0,05$ | 2,19 ^a $\pm 0,05$ | 2,21 ^a $\pm 0,07$ | 2,19 ^a $\pm 0,08$ |

Tabela 7 - a) Número total de gonócitos I e II, pré-espermatogônias e espermatogônias, por testículo, presentes em cada uma das idades (dias) estudadas. b) Número total de espermatogônias A, por testículo, presentes nos animais, em cada uma das idades (dias) estudadas.

a)

| Dias | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 9 | 11 | 15 | 37 | 70 |
|-------------------------------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Gon I | 0,005 | 0,006 | 0,0006 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Gon II | 0,006 | 0,008 | 0,0023 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| PE | 0,005 | 0,004 | 0,0077 | 0,010 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| A _{ind} | --- | --- | 0,0064 | 0,020 | 0,020 | 0,060 | 0,080 | 0,190 | 0,220 | 0,210 | 0,220 | 0,200 |
| A1 | --- | --- | 0,0003 | 0,010 | 0,010 | 0,010 | 0,0100 | 0,030 | 0,040 | 0,040 | 0,060 | 0,080 |
| A2 | --- | --- | --- | 0,010 | 0,010 | 0,010 | 0,020 | 0,030 | 0,050 | 0,060 | 0,090 | 0,130 |
| A3 | --- | --- | --- | 0,010 | 0,010 | 0,020 | 0,020 | 0,030 | 0,060 | 0,070 | 0,110 | 0,150 |
| A4 | --- | --- | --- | --- | --- | 0,000 | 0,010 | 0,040 | 0,050 | 0,070 | 0,160 | 0,180 |
| In | --- | --- | --- | --- | --- | 0,010 | 0,020 | 0,030 | 0,070 | 0,140 | 0,270 | 0,280 |
| B | --- | --- | --- | --- | --- | 0,010 | 0,010 | 0,090 | 0,080 | 0,190 | 0,410 | 0,470 |
| Total (10⁶) | 0,016 | 0,018 | 0,0173 | 0,060 | 0,050 | 0,120 | 0,170 | 0,440 | 0,570 | 0,780 | 1,320 | 1,490 |

b)

| Dias | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 9 | 11 | 15 | 37 | 70 |
|------------------------------------|---|---|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| A ₁ | | | 0,0003 | 0,010 | 0,010 | 0,010 | 0,0100 | 0,030 | 0,040 | 0,040 | 0,060 | 0,080 |
| A ₂ | | | | 0,010 | 0,010 | 0,010 | 0,020 | 0,030 | 0,050 | 0,060 | 0,090 | 0,130 |
| A ₃ | | | | 0,010 | 0,010 | 0,020 | 0,020 | 0,030 | 0,060 | 0,070 | 0,110 | 0,150 |
| A ₄ | | | | | | 0,000 | 0,010 | 0,040 | 0,050 | 0,070 | 0,160 | 0,180 |
| Total A_{dif} | | | 0,0003 | 0,030 | 0,030 | 0,040 | 0,060 | 0,130 | 0,200 | 0,240 | 0,420 | 0,540 |
| Total A_{ind} | | | 0,0064 | 0,020 | 0,020 | 0,060 | 0,080 | 0,190 | 0,220 | 0,210 | 0,220 | 0,200 |
| Total de A (10⁶) | | | 0,0067 | 0,050 | 0,050 | 0,100 | 0,140 | 0,320 | 0,420 | 0,450 | 0,640 | 0,740 |

9. FIGURAS

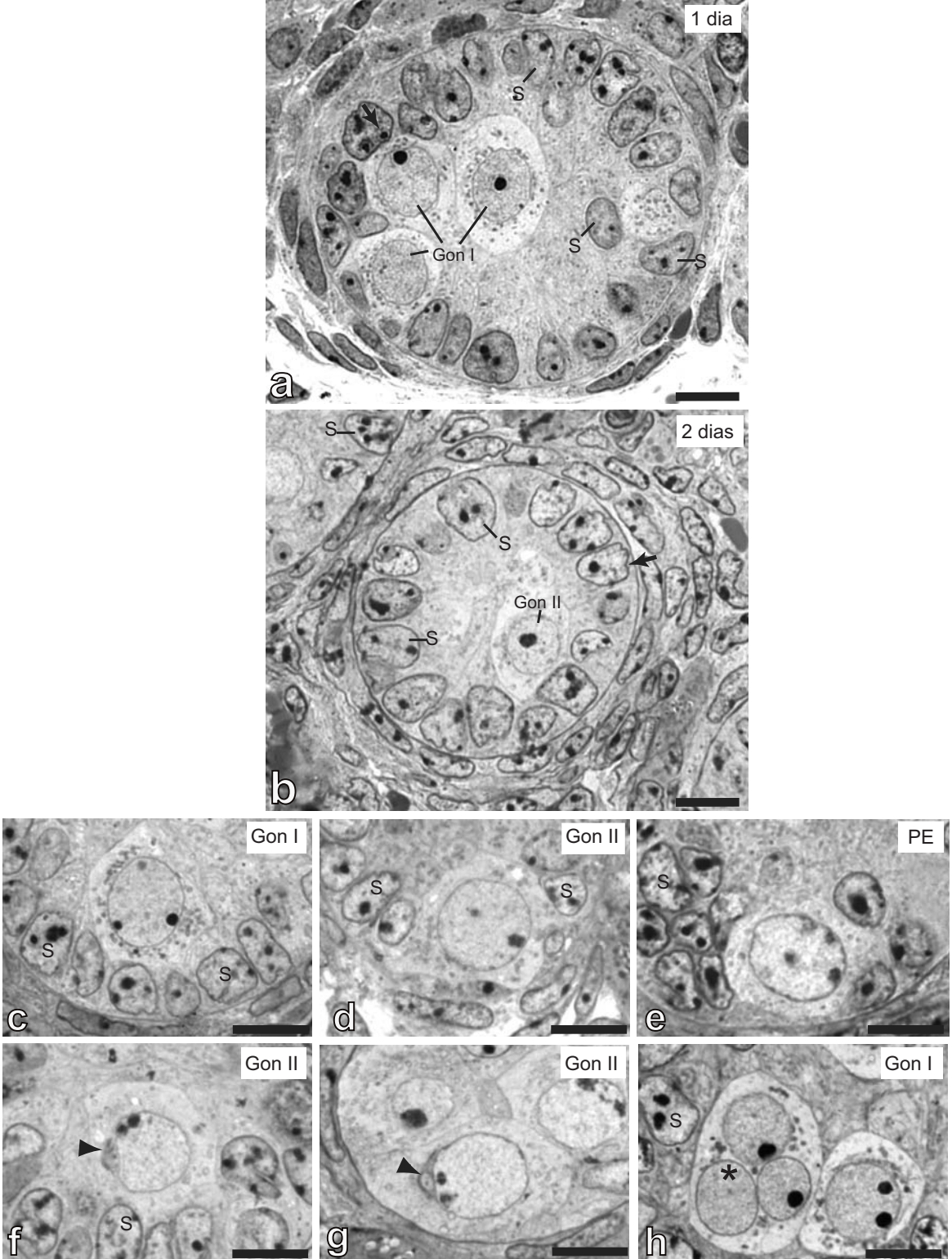


Figura 6 - Cordões seminíferos nos dias 1 e 2 *p.p.* As células germinativas presentes nestas idades são os gonócitos I (Gon I) (a,c) e II (Gon II) (b,d) e a pré-espermatogônia (PE) (e). Também podem ser vistas algumas particularidades nestas células como a presença de complexo de Golgi bem desenvolvido, (f,g) envolvendo grânulos (cabeça de seta), além de gonócitos multinucleados (h, asterisco). O núcleo das células de Sertoli (S) se apresenta com morfologia característica de célula imatura (seta). Barras equivalem a 10 μ m.

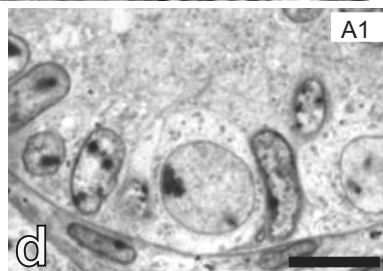
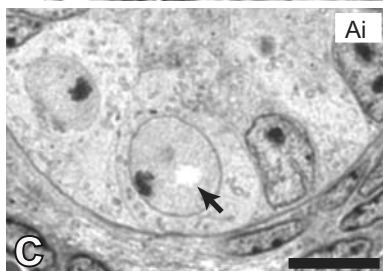
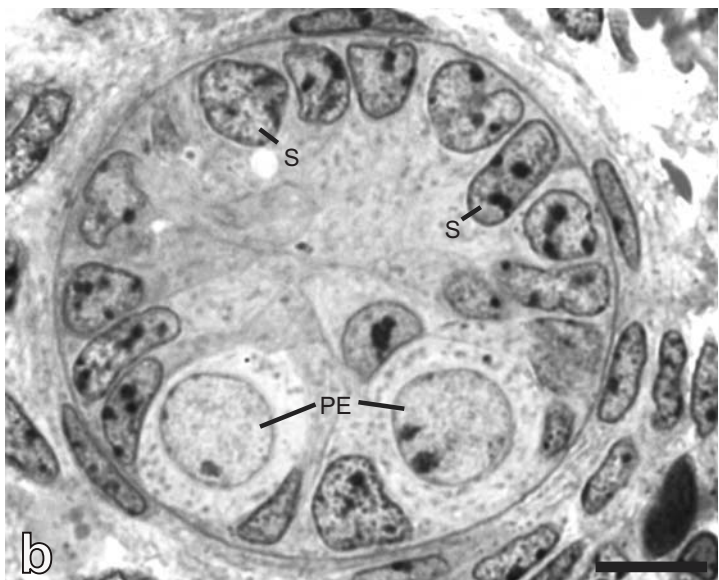
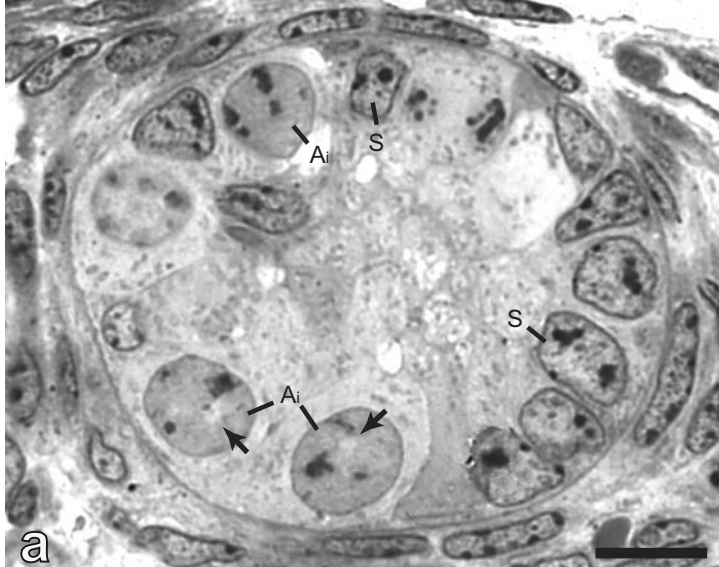


Figura 7 - Cordões seminíferos aos 3 dias *p.p.* (a,b) com células mais jovens como as pré-espermatogônias (PE) (b) e com células mais avançadas como as espermatogônias A indiferenciadas (Ai) (a,c) com vacúolo nucleares (seta). Em destaque, as células mais avançadas desta idade, espermatogônia Ai (c) e espermatogônia A1 (d). (S) células de Sertoli. Barras equivalem a 10 μ m.

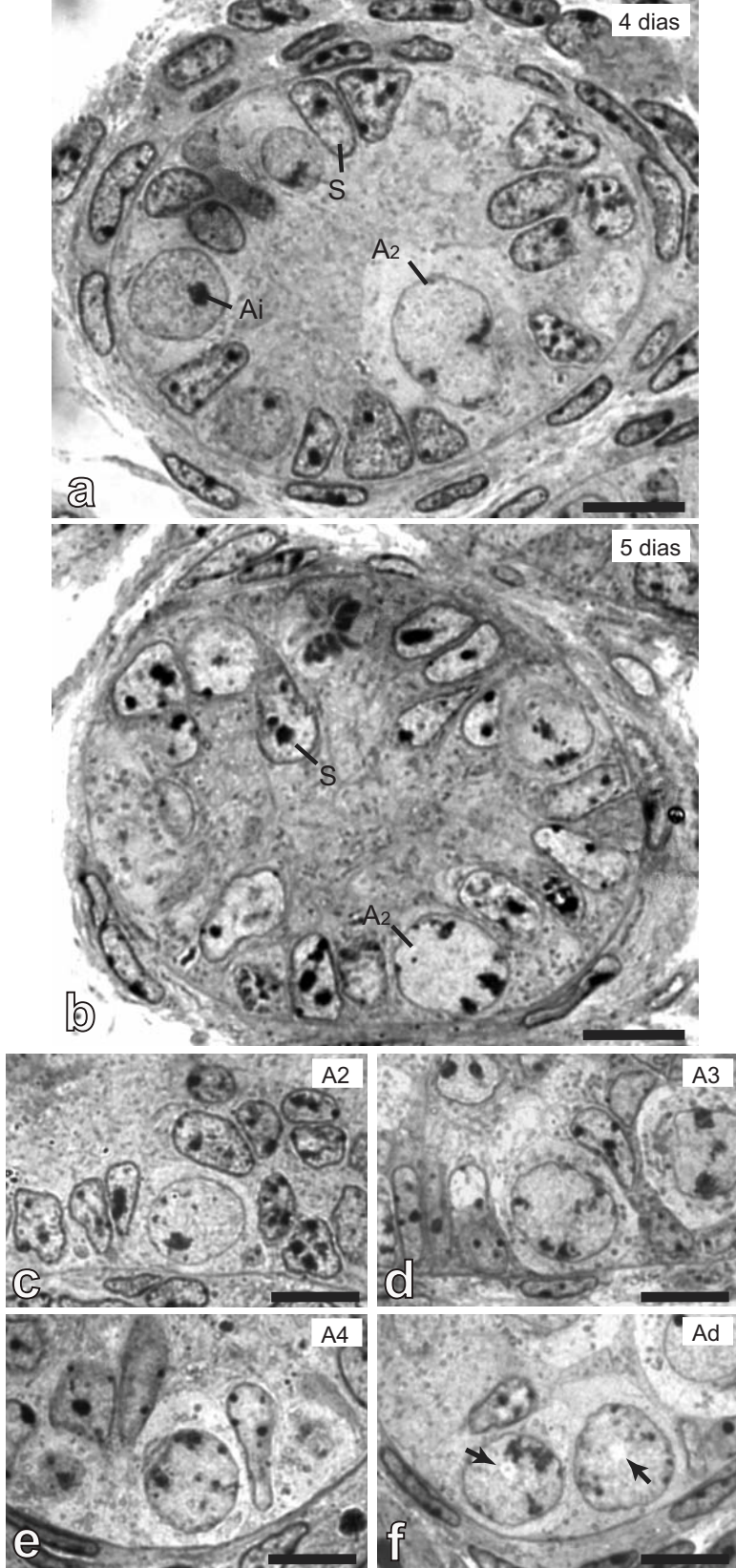


Figura 8 - Cordões seminíferos nos dias 4 (a) e 5 (b) *p.p.* Detalhes das espermatogônias A diferenciadas encontradas nestas idades, espermatogônias A2 (a, b, c), A3 (d) e A4 (e), e as espermatogônias diferenciadas com vacúolos (f, seta). (S) células de Sertoli; (Ai) espermatogônias A indiferenciadas. Barras equivalem a 10 μ m.

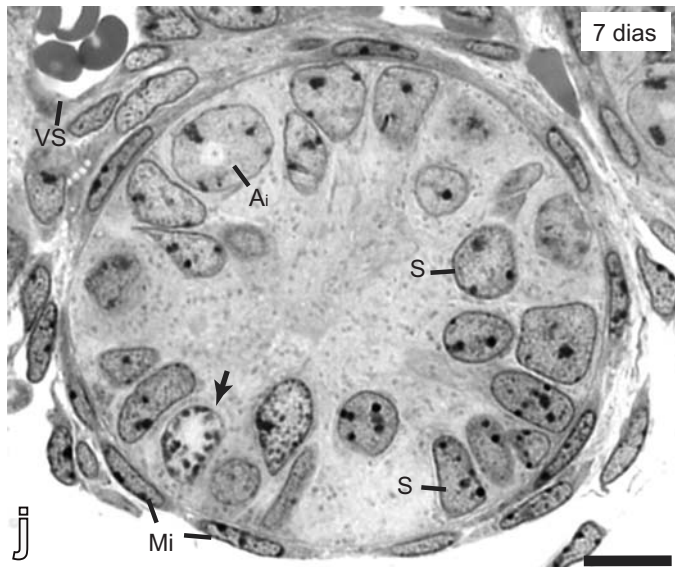
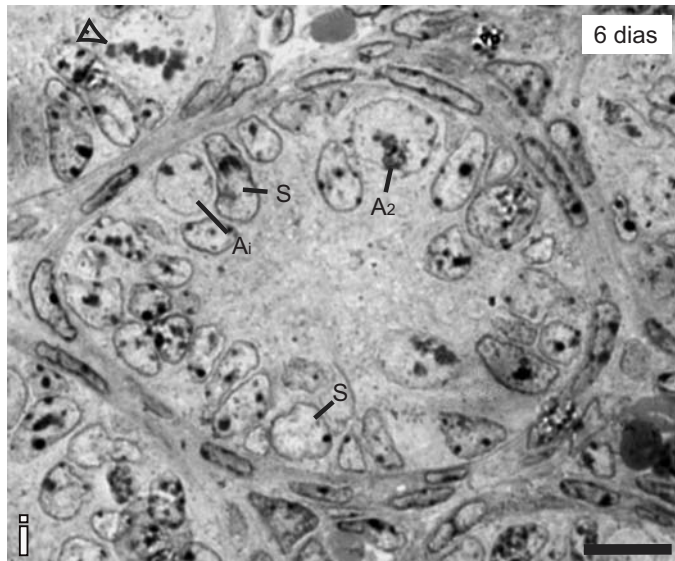
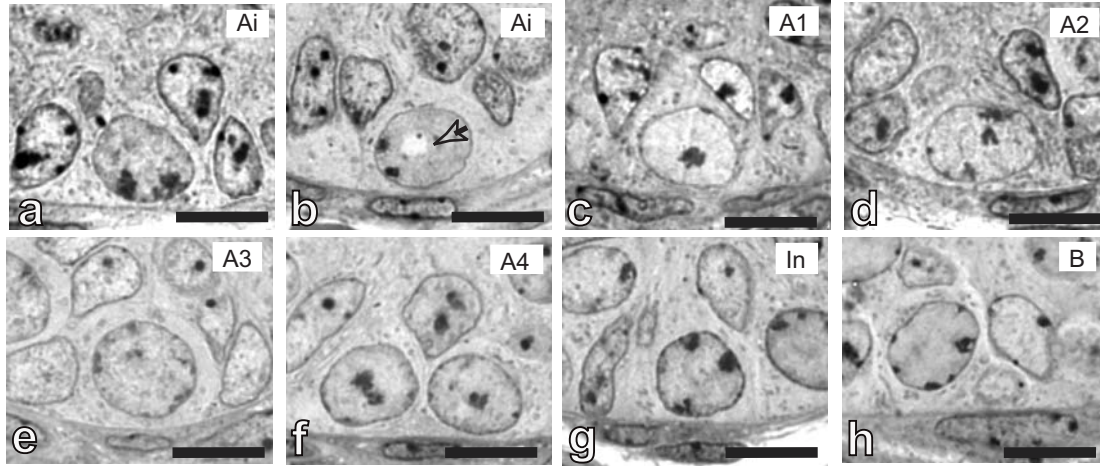


Figura 9 - Nos animais de 6 e 7 dias *p.p.* estão presentes espermatogônias *A* indiferenciada sem (a) e com (b) vacúolo nuclear (seta clara) e espermatogônias diferenciadas A1 (c), A2 (d), A3 (e), A4 (f), In (g) e B (h). As figuras i e j mostram panorâmicas de cordões seminíferos nestas idades, onde podem ser observadas divisões mitóticas de células germinativas (cabeça de seta) (i) e de células de Sertoli (seta preta) (j). (VS) vasos sanguíneos; (Mi) células mióides; (S) células de Sertoli. Barras equivalem a 10 μ m.

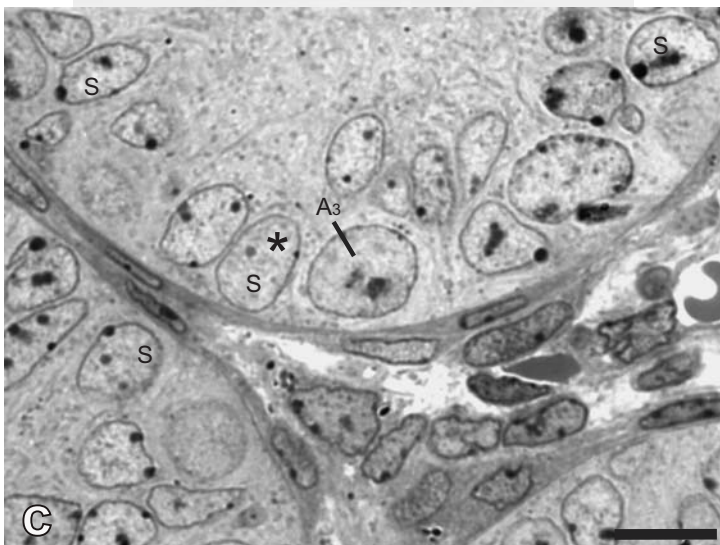
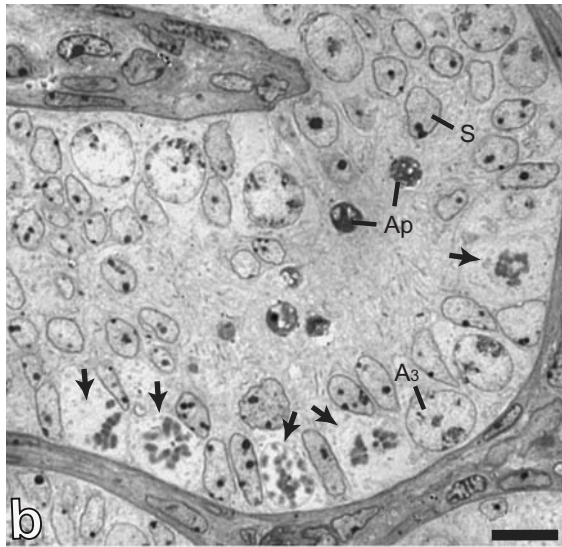
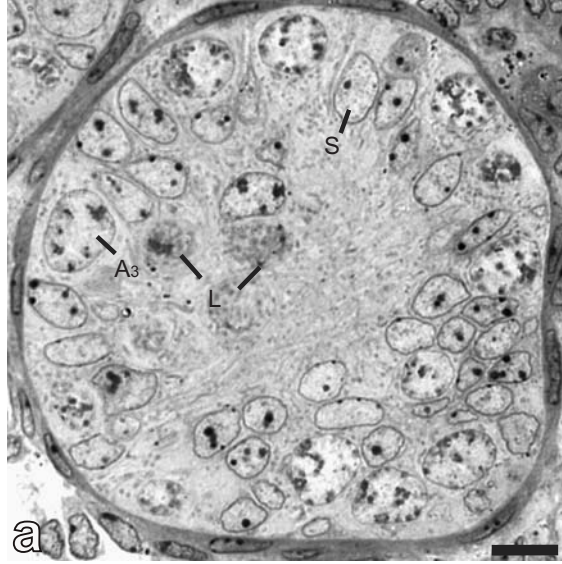


Figura 10 - Cordões seminíferos aos 9 dias *p.p.* (a). Nesta idade, as células mais avançadas são os espermatócitos primários na fase de leptóteno (L). (b) Também é possível ver nesses animais clones de espermatogônias em divisão celular (seta) (c). Observe que algumas células de Sertoli (S) ainda estão na fase imatura enquanto outras estão em diferenciação (asterisco). Ainda podem ser observadas na figura (b) figuras de apoptose (Ap) nos cordões seminíferos. Barras equivalem a 10 μ m.

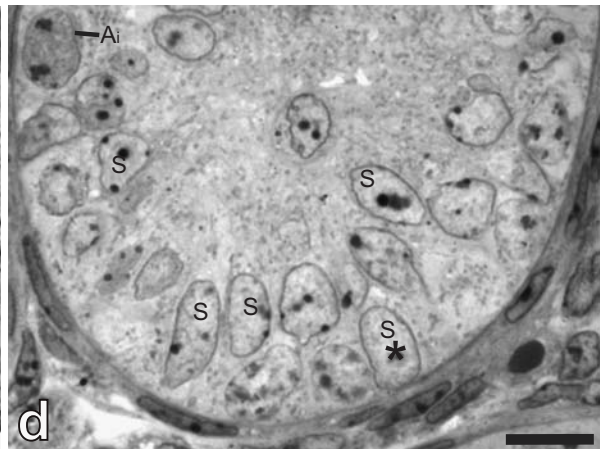
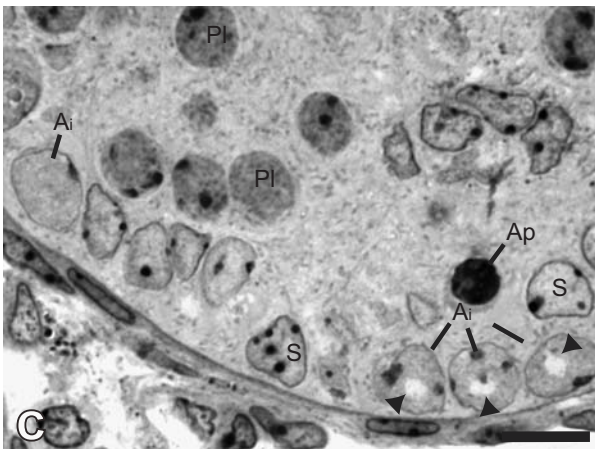
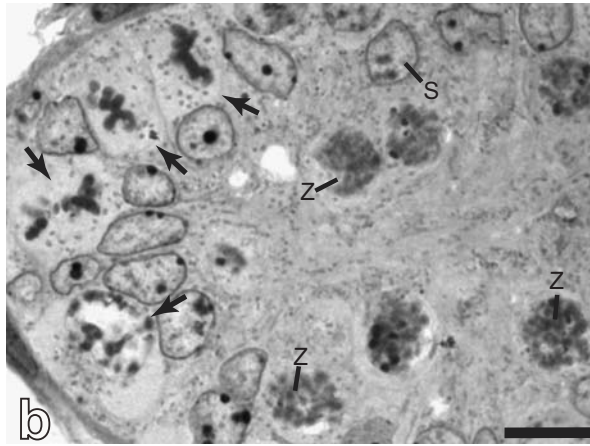
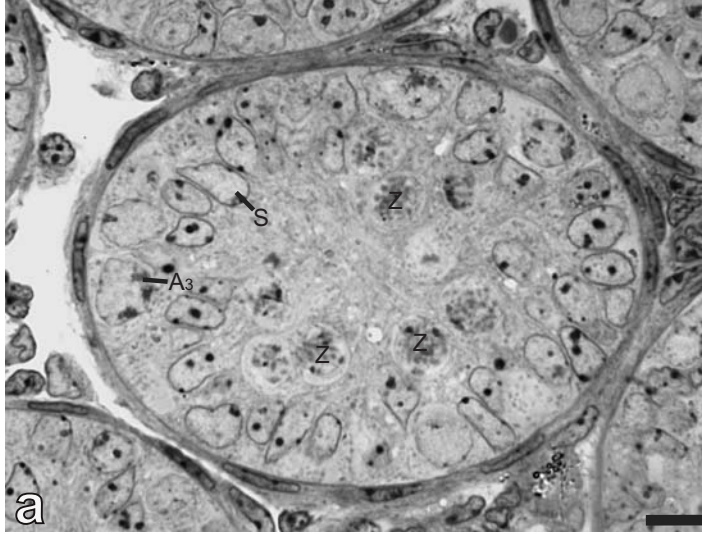


Figura 11 - Cordões seminíferos aos 11 dias *p.p.* (a,b) Nesta idade as células mais avançadas são os espermatócitos primários na fase de zigóteno (Z). (b) Também nesta idade é possível ver clones de espermatogônias em divisão (seta) e (c,d) células de Sertoli (S) imaturas e em maturação (asterisco). Uma série de espermatogônias indiferenciadas (Ai) podem ser vistas na figura c, sendo que algumas delas têm vacúolos (cabeça de seta). Espermatócitos primários em fase de pré-leptótenos (PI) e figuras apoptóticas (Ap) também estão presentes (c). Barras equivalem a 10 μ m.

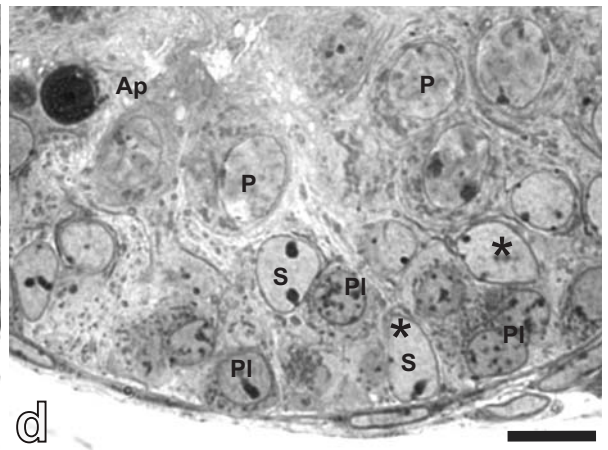
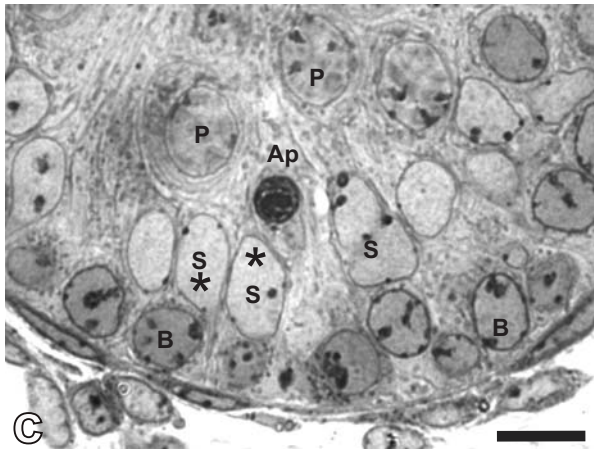
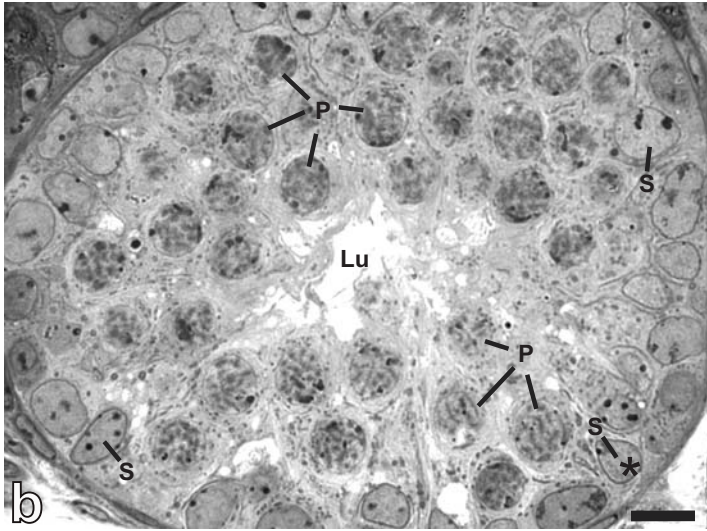
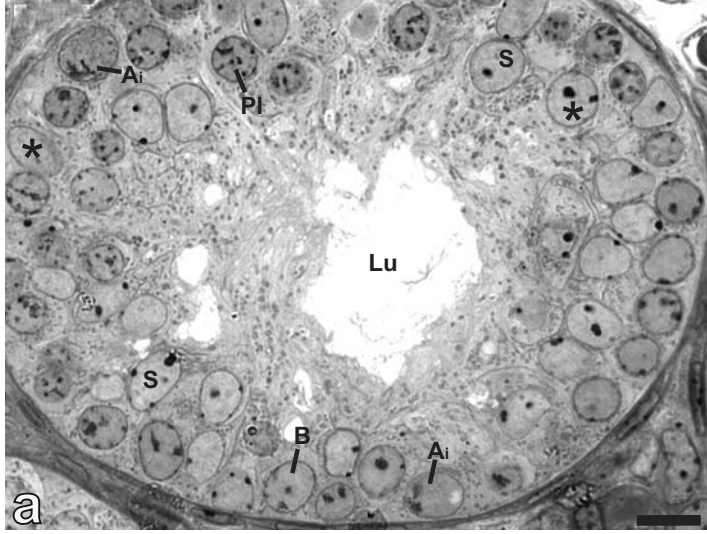


Figura 12 - (a,b) Aos 13 dias *p.p.* o lúmen é visto pela primeira vez **(c,d)** As células mais avançadas nesta idade são os espermatócitos primários em paquíteno (P) em associação com espermatogônias B (B) e com espermatócitos primários em pré-leptóteno (Pl). Também são observadas nestes túbulos espermatogônias A indiferenciadas (Ai), células de Sertoli (S) com características de amadurecimento (asterisco) e figuras apoptóticas (Ap). Barras equivalem a 10 μ m.

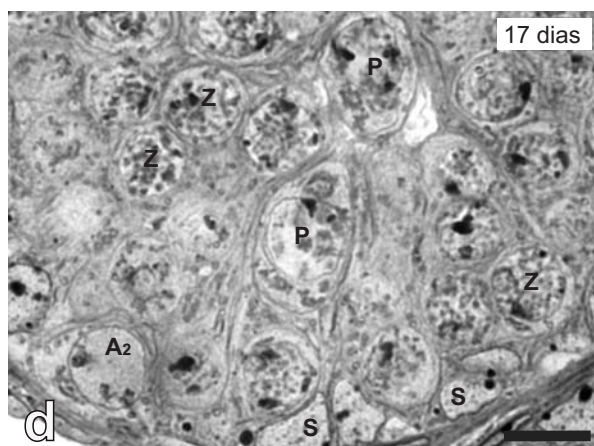
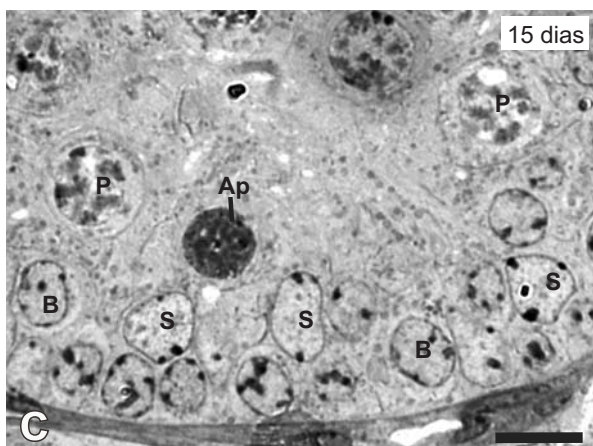
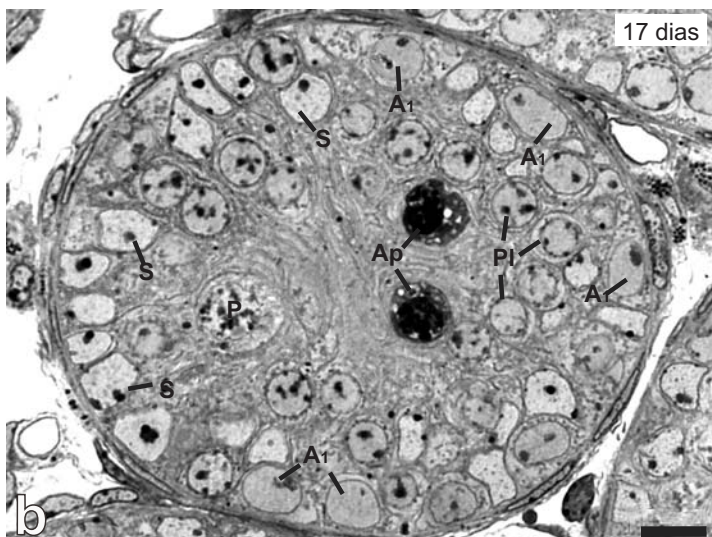
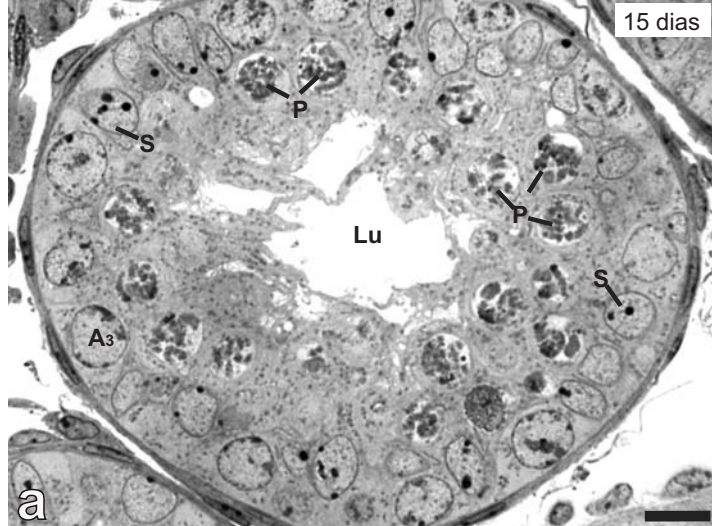


Figura 13 - Túbulos seminíferos em camundongos de 15 (a) e 17 (b) dias *p.p.* As células germinativas mais avançadas aos 15 dias são paquítenos (P), com espermatogônias B (B) e pré-leptótenos (Pl) (a,c), e aos 17 dias os paquítenos estão associados com zigótenos (Z) (d). Pode-se observar nesses túbulos espermatogônias diferenciadas (A₁, A₂ e A₃) e algumas figuras apoptóticas (Ap). Ainda podem ser observados nesses túbulos células de Sertoli (S) em maturação. (Lu) lumen do túbulo seminífero. Barras equivalem a 10 µm.

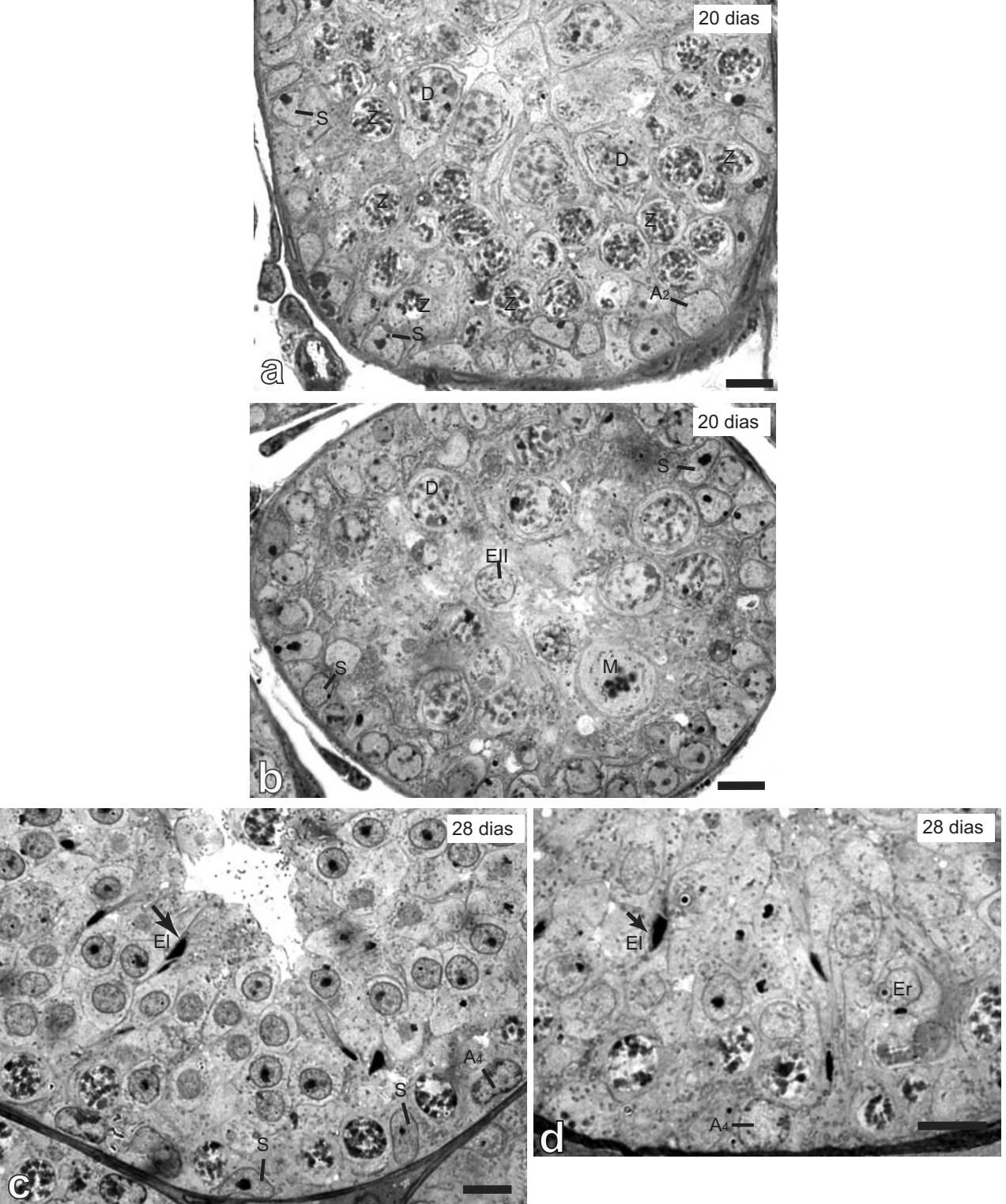


Figura 14 - Túbulos seminíferos de camundongos com 20 e 28 dias *p.p.* Aos 20 dias de idade (a,b) pode-se observar espermatócitos primários na fase de diplóteno (D), associados com espermatócitos primários em zigóteno (Z), figuras de meiose (M) e espermatócitos secundários (EII), sendo estes o tipo celular mais avançado. Já aos 28 dias (c,d) é possível observar espermatídes alongadas (EI) na fase da espermiogênese 15 (seta), associadas com espermatídes arredondadas (Er) na fase 4. Ainda podem ser observadas nestas idades espermatogônias diferenciadas (A2 e A4) e células de Sertoli (S) semelhantes às dos animais adultos. Barras equivalem a 10 μ m.

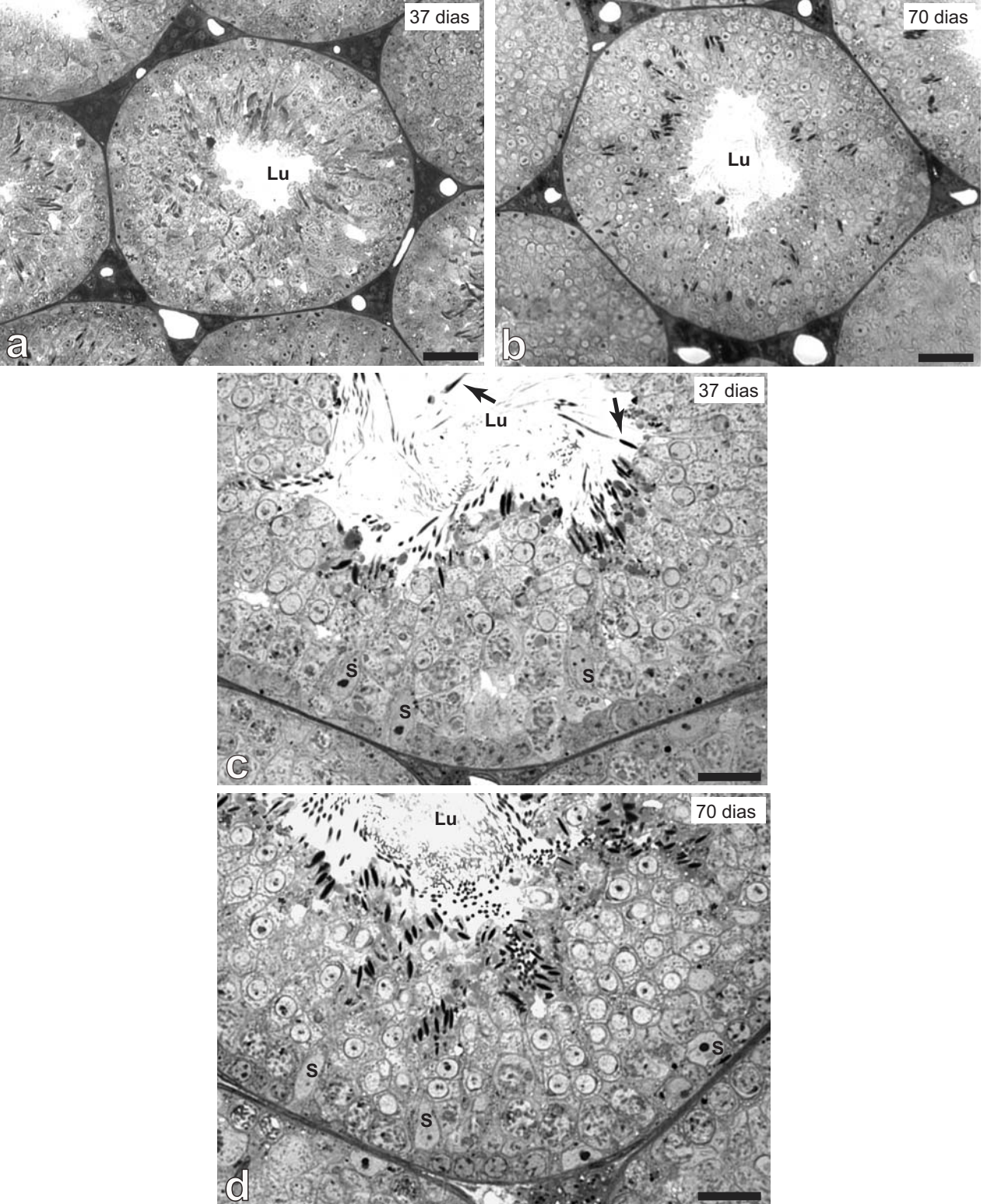


Figura 15 - Túbulos seminíferos de camundongos com 37 (**a,c**) e 70 (**b,d**) dias *p.p.* Nas figuras **a** e **b** pode-se observar imagens panorâmicas dos túbulos seminíferos, mostrando que o diâmetro tubular de um animal na puberdade (**a**) é menor do que o de um animal adulto (**b**). Aos 37 dias já podem ser vistos espermatozóides no lúmen (Lu) dos túbulos seminíferos (seta). (S) células de Sertoli. Barras em **a** e **b** equivalem a 40 μm , e em **c** e **d** a 20 μm .

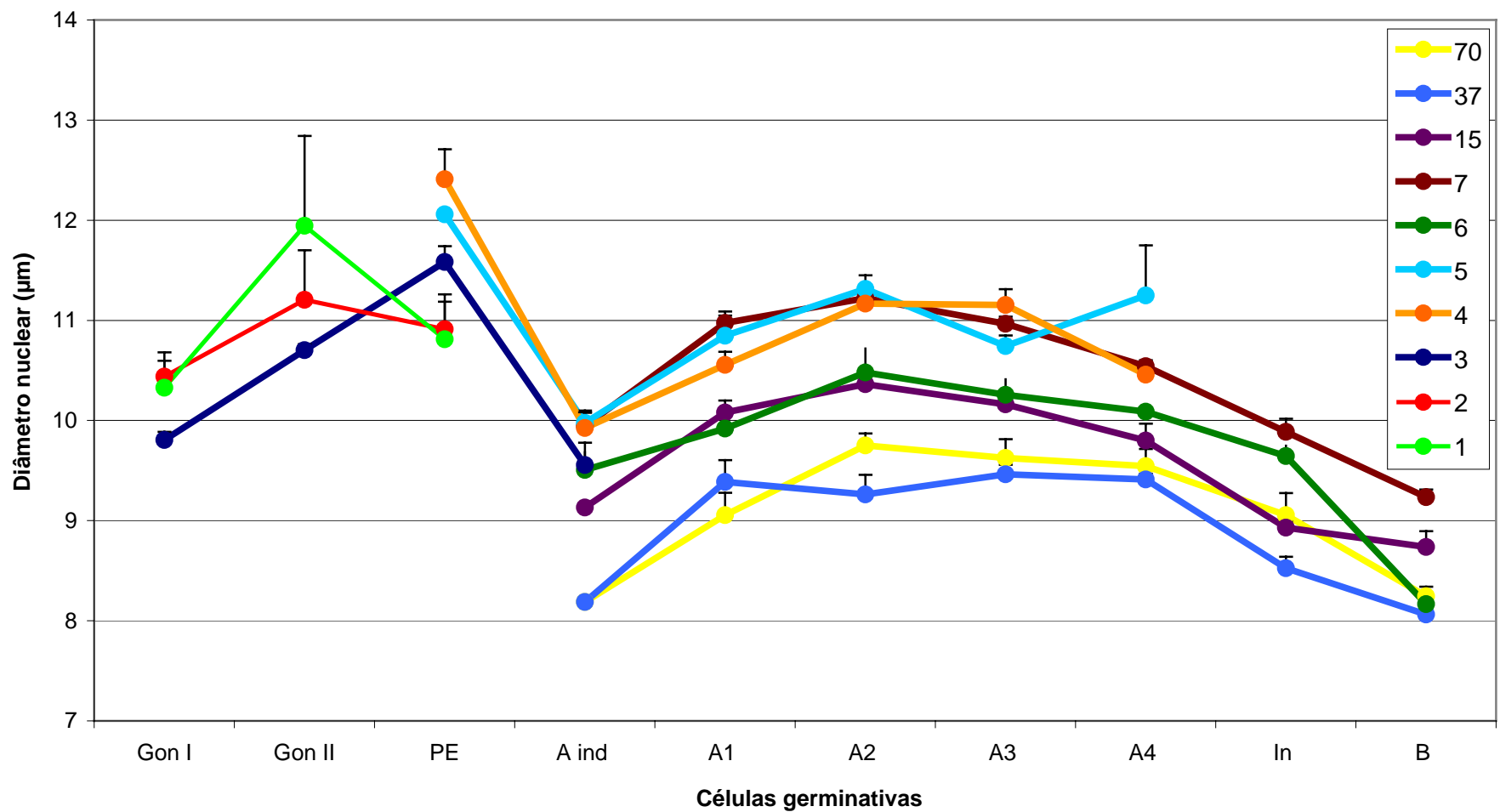


Figura 16 - Médias dos diâmetros nucleares de gonócitos (Gon) I e II, pré-espermatogônias (PE), espermatogônias A indiferenciadas (A_{ind}) e espermatogônias diferenciadas (A_1 , A_2 , A_3 , A_4 , In e B) nas idades (dias) estudadas.

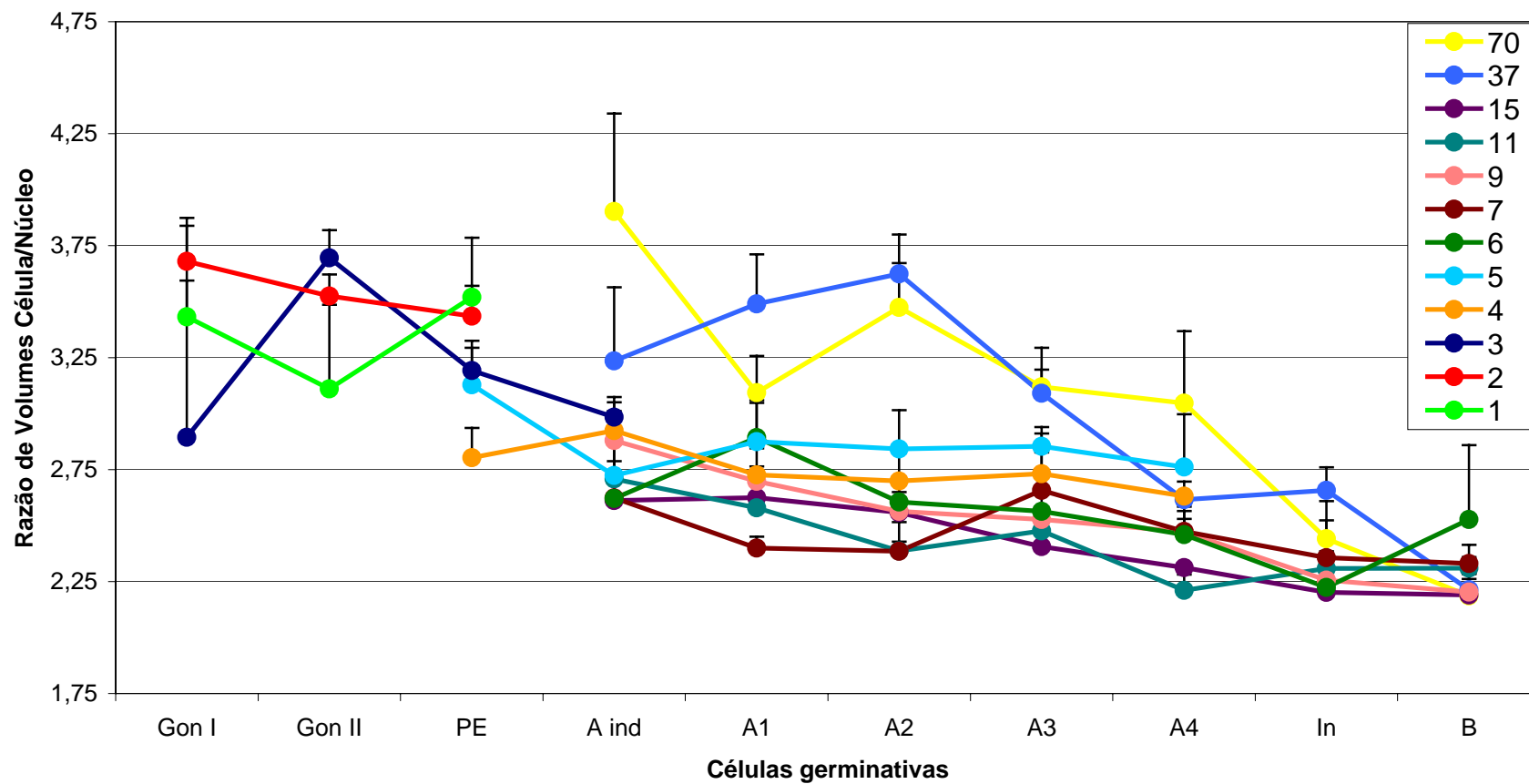


Figura 17 - Razão entre os volumes célula/núcleo de gonócitos (Gon) I e II, pré-espermatogônias (PE), espermatogônias A indiferenciadas (A_{ind}) e espermatogônias diferenciadas (A_1 , A_2 , A_3 , A_4 , In, B), nas idades (dias) estudadas.

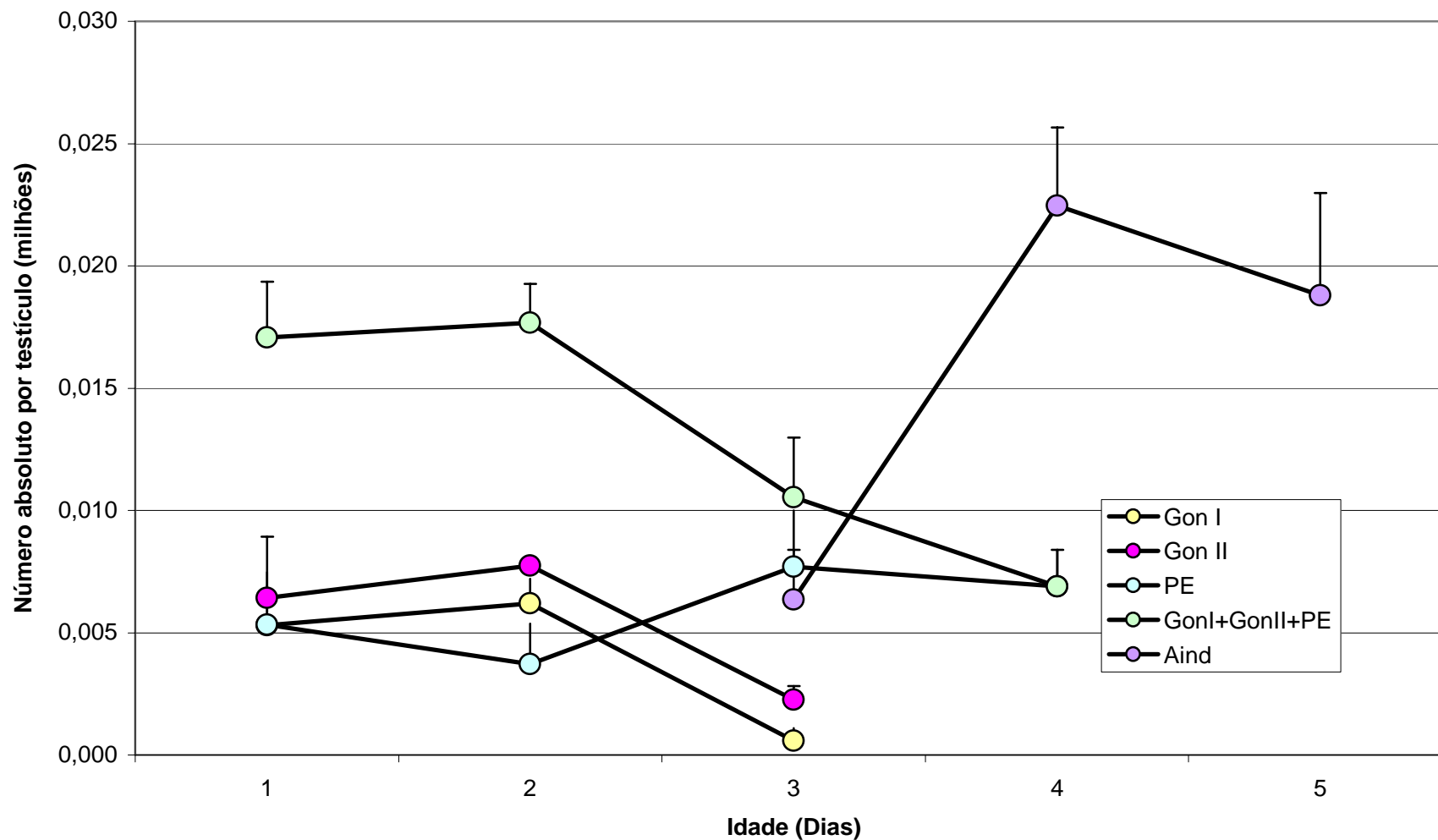


Figura 18 – Número absoluto de gonócitos (Gon) I e II, pré-espermatogônias (PE), sua soma e espermatogônias A indiferenciadas (A_{ind}), por testículo, desde o dia do nascimento (1 dia) até o 5º dia de idade. Asteriscos indicam diferença significativa ($p < 0,05$) no número de um mesmo tipo celular, entre as idades (comparação horizontal).

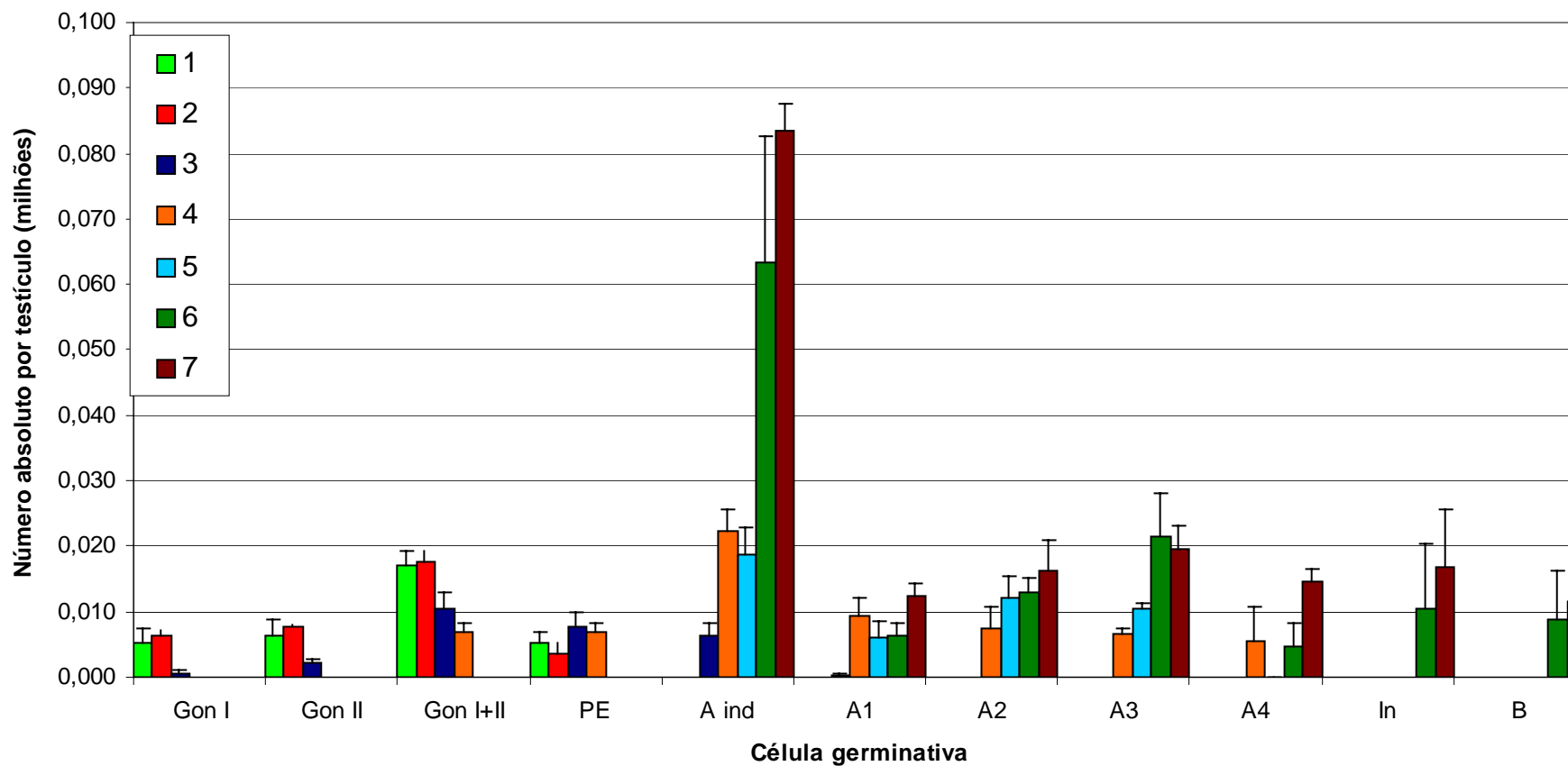


Figura 19 - Número absoluto de gonócitos (Gon) I e II, pré-espermatogônias (PE), espermatogônias A indiferenciadas (A_{ind}) e espermatogônias diferenciadas (A_1 , A_2 , A_3 , A_4 , In e B) por testículo, nas idades de um a sete dias. Diferentes letras (a,b), em um mesmo tipo celular, representam diferenças significativas entre as idades ($p < 0,05$).

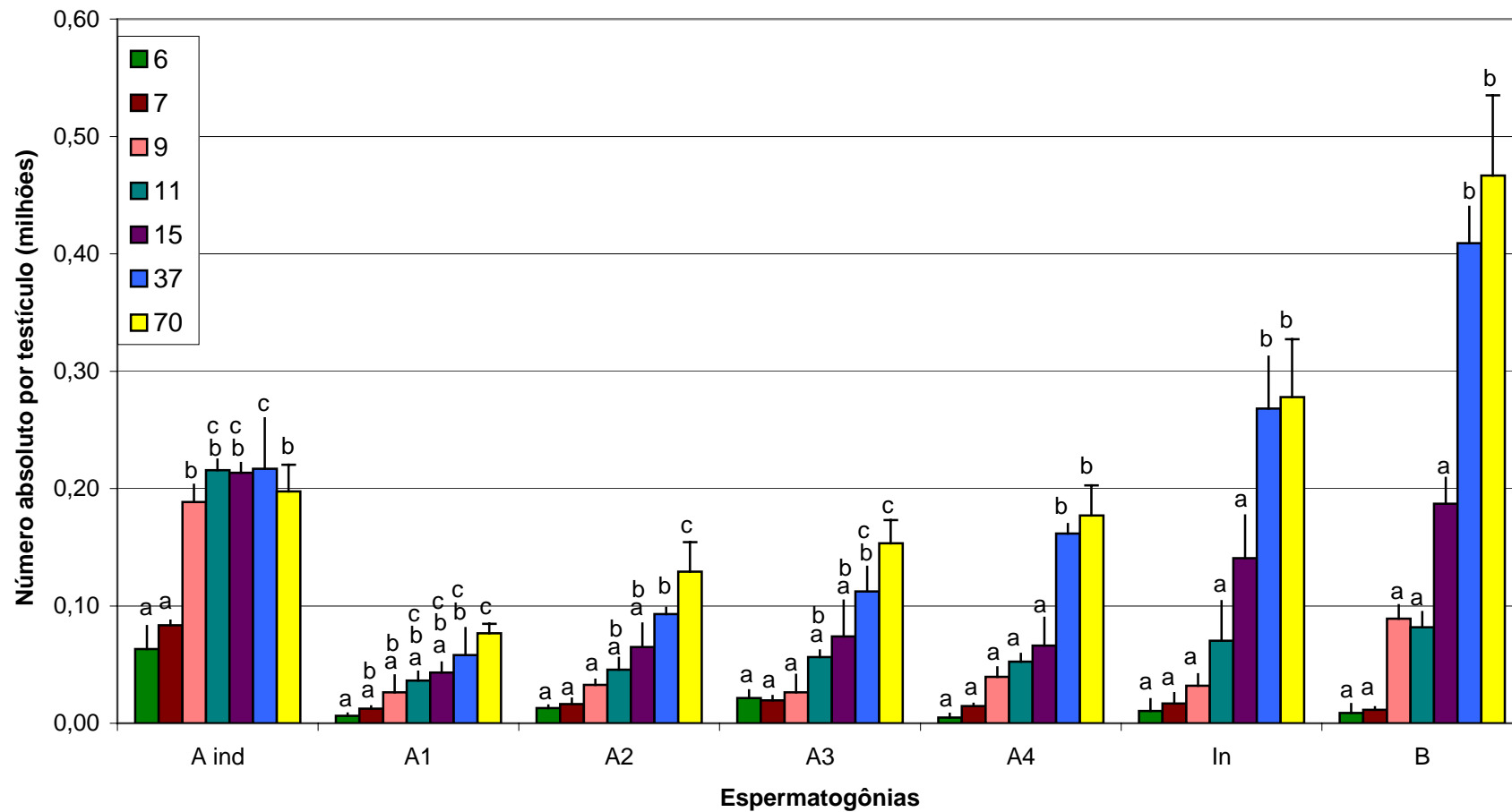


Figura 20 - Número absoluto de espermatogônias indiferenciadas A (A_{ind}) e diferenciadas (A_1 , A_2 , A_3 , A_4 , In, B) por testículo, nas idades de seis a 70 dias. Diferentes letras (a,b,c), em um mesmo tipo celular, representam diferenças significativas entre as idades ($p < 0,05$).

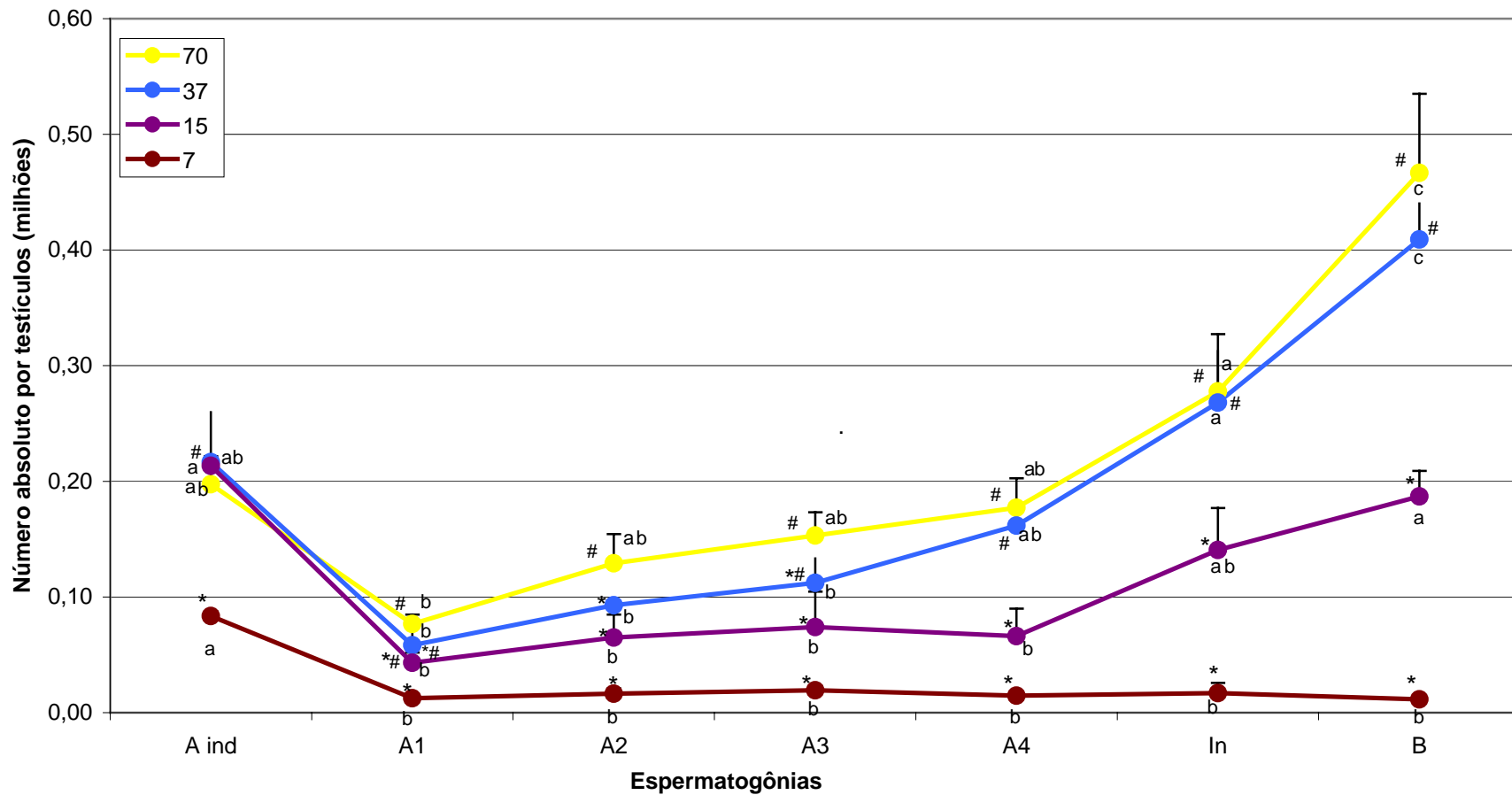


Figura 21 - Número absoluto de espermatogônias por testículo nas idades de 7, 15, 37 e 70 dias. Letras diferentes (a,b,c) indicam diferença significativa entre os números de diferentes tipos espermatogoniais, dentro de uma mesma idade (comparação horizontal). Símbolos diferentes (# e *), em um mesmo tipo celular, indicam diferença significativa entre as idades (comparação vertical). Para ambos $p < 0,05$.

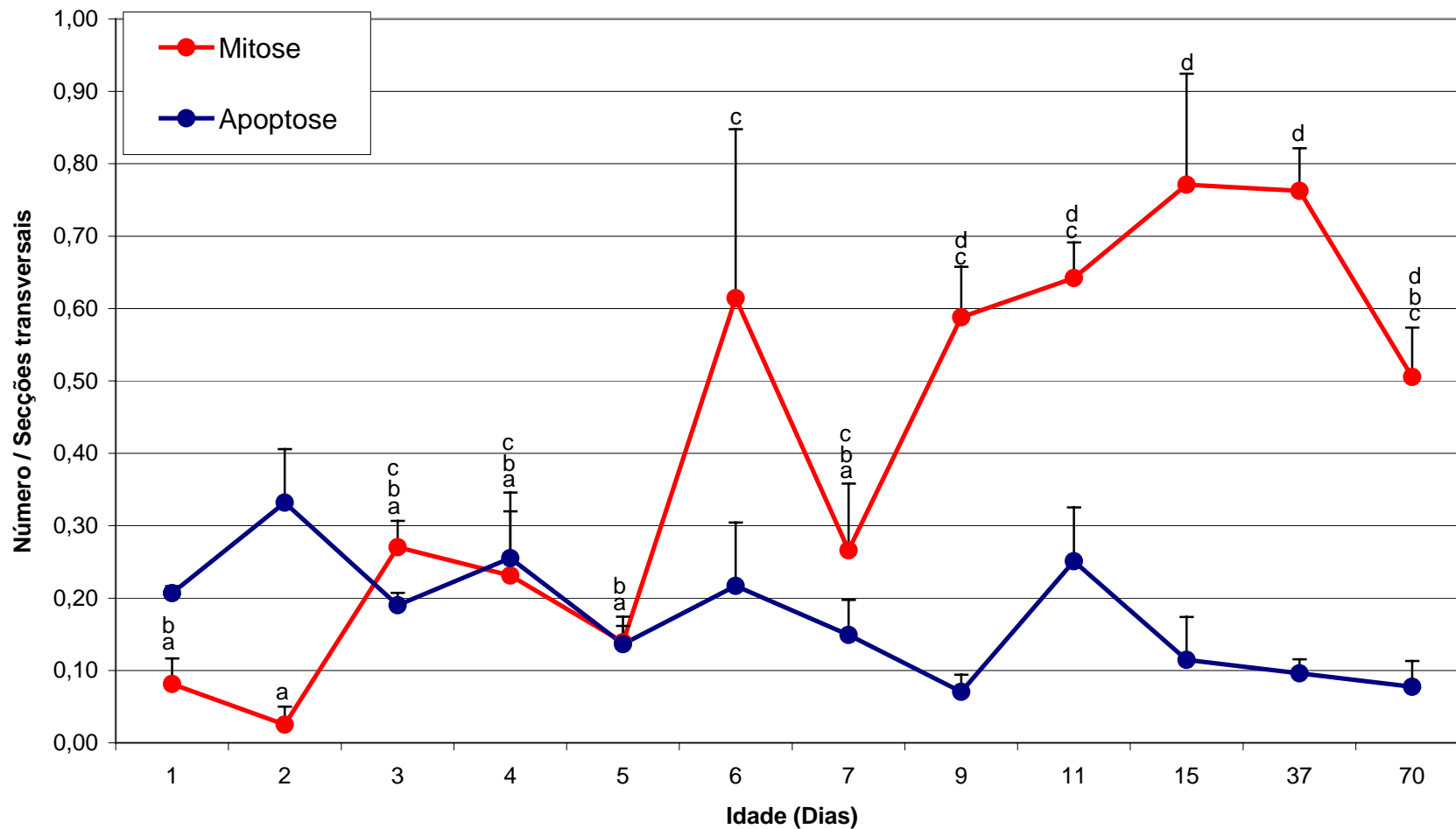


Figura 22 - Número relativo de mitoses e apoptoses, calculado em função do número de secções transversais de cordões seminíferos, ou túbulos seminíferos, nas idades estudadas. Para mitoses, letras diferentes (a,b,c,d) indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as diferentes idades. Não houve diferença significativa entre os números de apoptoses.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES-FREITAS, D.; MEISTRICH, M. L.; BOLDEN-TILLER, O.U.; SHETTY, G.; WENG, C.C.; CHIARINI-GARCIA, H. Abnormal spermatogonial differentiation in juvenile spermatogonial depletion ($Utp14b^{jsd}/Utp14b^{jsd}$) mutant mice from different strains. In XXI Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, Búzios, Rio de Janeiro, Brazil, 2007.
- AVELAR, G. F. Efeito da testosterona sobre o epitélio seminífero de ratos adultos após a destruição seletiva das células de Leydig pelo etano dimetano sulfonato (EDS). Dissertação (Mestrado), Belo Horizonte, UFMG – Instituto de Ciências Biológicas, 2004. 95p.
- BOLDEN-TILLER, O.U.; CHIARINI-GARCIA, H.; POIRIER, C.; ALVES-FREITAS, D.; WENG, C.C.; SHETTY, G.; MEISTRICH, M.L. Genetic factors contributing to defective spermatogonial differentiation in juvenile spermatogonial depletion ($Utp14b/jsd$) mice. *Biology of Reproduction*, v.77, p.237-246, 2007.
- BYSKOV, A.G. Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Physiological Reviews*, v.66, p.71-117, 1986.
- CHIARINI-GARCIA, H.; ALVES-FREITAS, D.; BARBOSA, I.S.; FRANÇA, L.R. Spermatogonial kinetics and niches in donkeys (*Equus asinus*). 2007 (em preparação).
- CHIARINI-GARCIA, H.; HORNICK, J. R; GRISWOLD, M. D.; RUSSELL, L. D. The distribution of type A spermatogonia in the mouse is not random. *Biology of Reproduction*, v.65, p.1179-1185, 2001.
- CHIARINI-GARCIA, H.; MEISTRICH, M.L. High resolution light microscopic characterization of spermatogonia. In: *Germ Line Stem Cell Protocols*. (ed. Hou S, Totowa NJ) Humana Press: USA. 2007 (in press).

- CHIARINI-GARCIA, H.; RAYMER, A.M.; RUSSELL, L.D. Non-random distribution of spermatogonia in rats: evidence of niches in the seminiferous tubules. *Reproduction*, v.126, p.669-680, 2003.
- CHIARINI-GARCIA, H.; RUSSEL, L.D. High resolution light microscopic characterization of mouse spermatogonia. *Byology of Reproduction*, v.65, p.1170-1178, 2001.
- CHIARINI-GARCIA, H.; RUSSELL, L.D. Characterization of mouse spermatogonial types by electron microscopy. *Reproduction*, v.123, p.567-577, 2002.
- CHIUQUINE, A.D. The identification, origin, and migration of the primordial germ cell in the mouse embryo. *Anatomical Records*. V.118, p.135-146, 1954.
- CLERMONT, Y. The cycle of the seminiferous epithelium in man. *American Journal of Anatomy*, v.112, p.35-51, 1963.
- CLERMONT, Y.; BUSTOS-OBREGON, E. Re-examination of spermatogonial renewal in the rat by means of seminiferous tubules mounted "in toto". *American Journal of Anatomy*, v.122, p.237-248, 1968.
- CLERMONT, Y. ; PEREY B. Quantitative study of the cell population of the seminiferous tubules of immature rats. *American Journal of Anatomy*. v.100, p.241-268, 1957.
- CLERMONT, Y. ; TROTT, M. Duration of the cicle of the seminiferous epithelium in the mouse and hamster determined by means of ³H-thimidine and radioautography. *Fertility and Sterility*. v.20, p.805-817, 1969.
- COUROUT, M.; HOCHEREAU-DE REVIERS, M.T.; ORTAVANT, T.R. Spermatogenesis. *In: The testis*. Ed. Johnson, A.D., Gomes & Van Denmark. Academic Press: New York, USA. 1970. 339-431p.
- DE ROOIJ, D.G. Stem cells in the testis. *International Journal of Experimental Pathology*, v.79, p.67-80, 1998.
- DE ROOIJ, D.G. Proliferation and differentiation of spermatogonial stem cells. *Reproduction*, v.121, p.347-354, 2001.
- DE ROOIJ, D.G.; GROOTEGOED, J.A. Spermatogonial stem cell. *Current Opinion in Cell Biology*, v.10, p.694-701, 1998.

- DE ROOIJ, D.G. ;JANSSEN J.M. Regulation of the density of spermatogonia in the seminiferous epythelium of the Chinese hamster : I. Undifferentiated spermatogonia. *Anatomical Record*, v.217, p.124-130, 1987.
- DE ROOIJ, D.G. ; LOK, D. Regulation of the density of spermatogonia in the seminiferous epythelium of the Chinese hamster : II. Differentiating spermatogonia. *Anatomical Record*, v.217, p.131-136, 1987.
- DE ROOIJ, D.G.; RUSSEL, L.D. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *Journal of Andrology*, v.21, p.776-798, 2000.
- DESJARDINS, C.; EWING, L.L. *Cell and Molecular Biology of the Testis*. 1ªed. Oxford University Press: New York. 1993. 512p.
- DETTIN, L.; RAVINDRANATH, N.; HOFMANN, M-C.; DYM, M. Morphological characterization of the spermatogonial subtypes in the neonatal mouse testis. *Biology of Reproduction*, v.69, p.1565-1571, 2003.
- DONOVAN P. J.; DE MIGUEL M. P. Gonocyte development and differentiation. *In: Sertoli Cell Biology*. Ed. Skinner M. K. & Griswold M. D. Elsevier: New York, USA. 2005. 417-435p.
- FRANÇA, L.R.; CHIARINI-GARCIA, H. Célula de Sertoli. *In: Células – Uma abordagem multidisciplinar*. Ed. Carvalho, H.F. & Collares-Buzato, C.B. Manole:Barueri, Brasil. 2005. 302-324p.
- GAIDO, K.W.; HENSLEY, J.B.; LIU, D.; WALLACE, D.C.; BORGHOFF, S.; JOHNSON, K.J.; HALL, S.J.; BOEKELHEIDE, K. Fetal Mouse Phthalate Exposure Shows that Gonocyte Multinucleation is Not Associated with Decreased Testicular Testosterone. *Toxicologic Sciences*, v.97, p.491-503, 2007.
- GINSBURG, M.; SNOW, M.H.L.; MCLAREN, A. Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development*, v.110, p.521-528, 1990.
- HONARAMOOZ, A.; SNEDAKER, A.; BOIANI, M.; SCHOLER, H.; DOBRINSKI, I.; SCHLATT, S. Sperm from neonatal mammalian testes grafted in mice. *Nature*, v. 418, p. 778-781, 2002.
- HUCKINS, C.; CLERMONT, Y. Evolution of gonocytes in the rat testis during late embryonic and post-natal life. *Archives D'anatomie, D'histologie et D'embryologie*, v.51, p.343-354, 1968.

- HUCKINS, C.; OAKBERG, E.F. Morphological and quantitative analysis of spermatogonia in mouse testes using whole mounted seminiferous tubules, I. The normal testes. *Anatomical Record*, v.192, p.519-528, 1978.
- JOYCE, K.L.; PORCELLI, J.; COOKE, P. Neonatal goitrogen treatment increases adult testis size and sperm production in the mouse. *Journal of Andrology*, v. 14, p.448-455, 1993.
- KLUIN, P.M.; DE ROOIJ, D.G. A comparison between the morphology and cells kinetics of gonocytes and adult type differentiated spermatogonia in the mouse. *International Journal of Andrology*, v.4, p.475-493, 1981.
- KLUIN, P.M.; KRAMER, M.F.; DE ROOIJ, D.G. Spermatogenesis in the immature mouse proceeds faster than in the adult. *International Journal of Andrology*, v.5, p.282-294, 1982.
- MEISTRICH, M.L.; ENG, V.W.S.; LOIR, M. Temperature effects on the kinetics of spermatogenesis in the mouse. *Cell Tissue Kinetics*, v.6, p.379-393, 1973.
- MOORE, K. L.; PERSAUD, T.V.N. *Embriologia Clínica*. 7ªed. Elsevier: Rio de Janeiro, Brasil. 2004. 543p.
- NAGANO, R.; TABATA, S.; NAKANISHI Y.; OHSAKO S.; KUROHMARU M.; HAYASHI Y. Reproliferation and Relocation of Mouse Male Germ Cells (Gonocytes) During Prespermatogenesis. *The Anatomical Record*, v.258, p.210-220, 2000.
- NASCIMENTO, H.F.; DRUMOND, A.L.; FRANÇA, L.R.; CHIARINI-GARCIA, H. Morphology, kinetics and spermatogonial niches in golden hamsters exposed to short- and long-photoperiod. *Reproduction*. 2007(submetido).
- NOVI, A.M.; SABA, P. An electron microscopic study of the development of rat testis in the first 10 postnatal days. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, v.86, p.313-326, 1968.
- OAKBERG, E.F. A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *American Journal of Anatomy*, v.99, p.391-414, 1956.
- OAKBERG, E.F. Spermatogonial stem-cell renewal in the mouse. *Anatomical Record*, v.169, p.515-532, 1971.
- ORTH, J.M. Cell biology of testicular development in the fetus and neonate. *Cell and Molecular Biology of The Testis*. New York, USA, Oxford University Press, p.3-42, 1993.

- PARVINEN, M. Cyclic function of Sertoli cells. *In: The Sertoli cell*. Ed. Russell, L. Cache River Press: Clearwater, USA. 1993. 331-347p.
- REZENDE, C.A.; MEISTRICH, M.L.; MATZUK, M.M.; DRUMOND, A.L.; SHETTY, G.; WENG, C.C.; CHIARINI-GARCIA, H. Germ cell loss in *TEX14* mutant mice with disrupted intercellular bridges. In XXI Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, Búzios, Rio de Janeiro, Brasil, 2007.
- ROOSEN-RUNGE, E.C.; LEIK, J. Gonocyte degeneration in the postnatal male rat. *American Journal of Anatomy*, v.122, p.275-300, 1968.
- RUSSELL, L.D.; ETTLIN, R.A.; SINHA HIKIM, A. P.; CLEGG, E.D. *Histological and histopathological evaluation of the testis*. 1ªed. Cache River Press: Vienna, USA. 1990. 280p.
- RUSSELL, L.D.; CHIARINI-GARCIA, H.; KORSMEYER, S.J.; KNUDSON, C.M. Bax dependent spermatogonia apoptosis is required for testicular development and spermatogenesis. *Biology of Reproduction*, v.66, p.950-958, 2002.
- SAPSFORD, C.S. Changes of the cells of the sex cords and seminiferous tubules during development of the testis of the rat and mouse. *Australian Journal of Zoology*, v.10, p.178-192, 1962.
- SINHA HIKIM, A.P.; BARTKE, A.; RUSSELL, L.D. Morphometric studies on hamster testes in gonadally active and inactive states: light microscope findings. *Biology of Reproduction*. v.39, p.1225-1237, 1988.
- SHINOHARA, T.; BRINSTER, R.L. Enrichment and transplantation of spermatogonial stem cells. *International Journal of Andrology* v.2, p.89-91, 2000.
- SPRANDO, R.L. Perfusion of the rat testis through the heart using heparin. *In: Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. (ed. Russell LD, Ettlín RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED). Cache River Press: Vienna, USA. 1990. 277-280p.
- TAM, P.; SNOW, M.H.L. Proliferation and migration of primordial germ cells during the compensatory growth in the mouse embryo. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*. v.64, p.133-147, 1981.
- TEGELENBOSH, R. A. J.; DE Rooij, D.G. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F₁ hybrid mice. *Mutation Research*, v.290, p.193-200, 1993.

- VAND DEMARK, N.L.; FREE, M.L. Temperature effects. *The testis*. (ed. Johnson AD, Gomes WR, Van Demark, NL). Academic Press: New York, USA. 1970. 233p.
- VAN HAASTER, L.H.; DE ROOIJ, D.G. Spermatogenesis is accelerated in the immature Djungarian and Chinese hamster and rat. *Biology of Reproduction*, v.49, p.1229-1235, 1993.
- VERGOUWEN, R.P.F.A.; JACOBS, S.G.P.; HUISKAMP, R.; DAVIDS, J.A.G.; DE ROOIJ, D.G. Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.93, p.233-243, 1991.
- VERGOUWEN, R.P.F.A.; HUISKAMP, R.; BAS, R.J.; ROEPERS-GAJADIEN, H.L.; DAVIDS, J.A.G.; DE ROOIJ, D.G. Postnatal development of testicular cell populations in mice. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.99, p.479-485, 1993.
- WILHELM, D.; PALMER, S.; KOOPMAN, P. Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiology Review*, v.87, p.1-28, 2007.
- ZALLIO, R.C.; MEISTRICH, M. L.; ALVES-FREITAS, D.; SHETTY, G.; WENG, C.C.; CHIARINI-GARCIA, H. Effects of temperature on different spermatogonial subtypes, after cryptorchidism. In XXI Congresso da Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise, Búzios, Rio de Janeiro, Brasil, 2007.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)