

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**FORMAÇÃO DA BARREIRA HEMATO-TESTICULAR EM
Calomys callosus.**

Angelica de Oliveira Gomes

Monografia apresentada à Coordenação do curso de Ciências Biológicas da Universidade federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG

Julho - 2005

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**FORMAÇÃO DA BARREIRA HEMATO-TESTICULAR EM
Calomys callosus.**

Angelica de Oliveira Gomes

Eloisa Amália Vieira Ferro

Monografia apresentada à Coordenação do curso de
Ciências Biológicas da Universidade Federal de
Uberlândia, para a obtenção do grau de bacharel em
Ciências Biológicas

Uberlândia – MG

Julho - 2005

Dedico este trabalho:

Aos meus pais Carlos Roberto Gomes e Veronice de Oliveira Gomes. Obrigada pelo amor, carinho e pelos ensinamentos. Tudo que tenho e que sou, eu devo a vocês que mostraram o caminho e o mais importante, me ensinaram a caminhar... Por isso, dedico-lhes essa vitória, como sinal de gratidão.

Às minhas irmãs Christiane e Carla que sempre estiveram presentes em todos os momentos de minha vida. Compartilho com vocês mais este motivo de felicidade.

Aos meus familiares que sempre acreditaram em mim, me apoiaram e souberam compreender tantos momentos de minha ausência.

Agradecimento Especial

À minha orientadora Eloisa Amália Vieira Ferro, obrigada pela confiança e pela oportunidade de termos trabalhado juntas. Obrigada pelo exemplo de postura, responsabilidade e compromisso. Obrigada pela amizade, pelo carinho... Procurarei sempre me espelhar em seus exemplos!!!

Obrigada por ter participado da concretização de uma etapa tão importante da minha vida e da realização de um sonho.

Agradecimentos:

- A Deus que me deu sabedoria e permitiu-me sentir Sua presença; sempre ao meu lado conduzindo-me e protegendo-me.
- Ao meu co-orientador Marcos Silva por cada ensinamento... Obrigada ainda pelo entusiasmo, pela credibilidade, enfim pela importante participação neste trabalho.
- Aos professores e ex-professores do Laboratório de Histologia e Embriologia: Ana Alice, Camila, Eloisa, Gabriela, Gladstone, Genoveva, Juliana, Marcelo, Marco Aurélio, Marcos Silva, Paula e Zenaide, que deixaram muitos ensinamentos. Ensinamentos de Morfologia, de exemplo de vida, de luta, de trabalho, de dedicação, de coletividade... Tenho certeza que o convívio com cada um de vocês muito me acrescentou... À vocês meu eterno carinho e gratidão.
- Aos colegas de Laboratório Márcio, Bellisa, Lorena, Mariana, Karen, Nayane, Loyane, Idessânia. Obrigada pelos momentos de descontração, pelas trocas de conhecimento, pela amizade.
- Obrigada ao colega Evandro pelo auxílio com a análise de imagens
- Ao técnico Hégio por tantos ensinamento e dicas sobre técnicas de microscopia eletrônica e por ter realizado os corte ultra-finos.
- Aos técnicos Rui e Tiago e à secretária Jucélia pelo carinho, amizade e convívio tão agradável
- Aos professores de graduação pela marca importante que deixaram em minha vida! A vocês minha eterna admiração e gratidão
- Aos colegas de graduação e em especial aos membros do LVVVDC (Luau, Vozes, Violão, Vinho e Discussão Científica) vocês sempre farão parte de minhas doces recordações

- A colega Ana Lúcia pelos anos de convívio, pelos trabalhos em parceria, pela amizade... terei boas recordações de tudo isso
- A cada um dos profissionais da Vigilância da UFU que me acompanharam no caminho de casa todos os dias que precisei ficar até tarde no Laboratório. Sem vocês este trabalho não teria sido o mesmo. Recebam meu carinho e gratidão.
- Ao CNPq pelo apoio financeiro

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

FORMAÇÃO DA BARREIRA HEMATO-TESTICULAR EM
Calomys callosus.

Angelica de Oliveira Gomes

Aprovado Pela Banca Examinadora Em 15/07/05 Nota 100,0

Angelica de Oliveira Gomes
15/07/05

Eloisa Amália Vieira Ferro
Dra Eloisa Amália Vieira Ferro

Marcos Silva
Dr Marcos Silva

Paula Dechichi
Dra Paula Dechichi
PROF. DR. MARCO ANTONIO M. RODRIGUES

Uberlândia, 15 de julho de 2005

Resumo:

O principal objetivo deste estudo foi correlacionar espermatogênese e formação da Barreira Hemato-Testicular (BHT) em *Calomys callosus* por meio de estudo morfológico, morfométrico e ultra-estrutural. O estabelecimento da BHT foi analisado por microscopia eletrônica de transmissão e uso de lantânio. Grupos experimentais contendo 03 animais foram usados nas seguintes idades: 01, 02, 05, 10-20, 25-35 dias. Os resultados mostram que fases iniciais do desenvolvimento são caracterizadas por mitoses responsáveis por organizar a população de células germinativas. O início da formação do lúmen ocorre por volta dos 11 dias e completa-se em animais de 13 dias. A partir dos 25 dias torna-se comum presença de espermátides no epitélio seminífero. Aos 30 dias começa a ocorrer espermatozóides na luz dos túbulos seminíferos. A maturidade sexual ficou estabelecida em animais de 35 dias uma vez que os indivíduos possuíam espermatozóides armazenados na luz do epidídimo. Os parâmetros histomorfométricos analisados apresentaram altos índices de correlação com a idade. A BHT começa a ser formada aos 15 dias uma vez que se formam junções de oclusão entre células de Sertoli. A ocorrência deste processo coincide com o aparecimento de espermátócitos em fase de paquíteno no epitélio seminífero de *C. callosus*. A aquisição da BHT, assim como em outros mamíferos, é requerida antes da formação de espermatozóides e a presença desta é importante para o desenvolvimento do processo de meiose.

Palavras-chave: Barreira Hemato-Testicular, Testículos, *C. callosus*, morfologia, morfometria.

ÍNDICE:

1. INTRODUÇÃO	1
1.1- <i>CALOMYS CALLOSUS</i>	1
1.2- MORFOFISIOLOGIA DE TESTÍCULOS E EPIDÍDIMOS	2
1.3- MORFOMETRIA	4
1.4- DESENVOLVIMENTO GONADAL	5
1.5- ESPERMATOGÊNESE E FORMAÇÃO DA BARREIRA HEMATO-TESTICULAR (BHT)	6
2. JUSTIFICATIVA.....	9
3. OBJETIVOS.....	10
4. MATERIAL E MÉTODOS	11
4.1 - ESPÉCIMES	11
4.2 - COLETA DE MATERIAL	11
4.3 - PROCESSAMENTO PARA MICROSCOPIA DE LUZ	12
4.4 - PROCEDIMENTOS PARA ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	12
4.5 - PROCESSAMENTO PARA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO	13
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
5.1 - ANÁLISE MORFOLÓGICA	15
5.2- ANÁLISE MORFOMÉTRICA.....	22
5.3 FORMAÇÃO DA BARREIRA HEMATO TESTICULAR	26
6. CONCLUSÕES:.....	30
7. TABELAS.....	31
8. DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA.....	36
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1. Introdução

1.1- *Calomys callosus*

O gênero *Calomys* é autóctone da região sul-americana. Cricetideo de porte semelhante ao camundongo e compreende cinco espécies: *C. sorellus*, *C. lepidus*, *C. laucha*, *C. callosus*, *C. musculinus* (MASSOIA & FORNES, 1965).

Apresentam distribuição geográfica ampla, ocorrência destes roedores foi registrada na região plana do norte da Argentina, ao leste dos Andes entre La Paz (Bolívia) e Cordoba (Argentina), no chaco Boliviano e Paraguaio, Centro Oeste, Nordeste e Sul do Brasil (MOOJEN, 1952; MASSOIA & FORNES, 1965; HERSHKOVITZ, 1962; MELLO, 1969; MELLO & MOOJEN, 1979).

Do ponto de vista reprodutivo, em condições laboratoriais, *C. callosus* é um roedor poliestro, com ciclo estral de 06 dias e período gestacional de 22 dias. Um casal fértil produz 08–10 ninhadas por ano (MELLO, 1978).

Os jovens ao nascer pesam 1,3–2,5 g (PETTER *et al.* 1967). O desenvolvimento desses animais baseados em peso e tamanho se dá de forma linear nas 05–06 primeiras semanas. A maturidade sexual em fêmeas é caracterizada pela abertura vaginal que

ocorre aos 40 dias após o nascimento e em machos pela descida dos testículos aos 19 dias de idade (MELLO, 1978).

1.2- Morfofisiologia de Testículos e Epidídimos

Testículos são órgãos pares que se desenvolvem na lâmina gononefrógena do mesoderma. Cada testículo é revestido por tecido conjuntivo fibroso, conhecido como túnica albugínea. Desta túnica estendem septos fibrosos subdividindo os testículos em lóbulos incompletos de forma piramidal, nos quais situam-se os túbulos seminíferos (CORMACK, 1991).

O epitélio dos túbulos consiste de células germinativas que se apresentam em diferentes estágios de desenvolvimento (espermatogônias, espermatócitos primários e secundários, espermátides). Estas células localizam-se dentro de invaginações das células de Sertoli – as células suporte dos túbulos seminíferos (HOLSTEIN *et al.* 2003).

Células de Sertoli caracterizam-se morfológicamente pela presença de um núcleo ovóide ou triangular com reentrâncias, predominantemente eucromático e com nucléolo evidente (ROSS & ROWRELL, 1993). São células cilíndricas cuja base adere à lâmina basal dos túbulos e cujas extremidades apicais terminam no lúmen dos túbulos seminíferos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). Os prolongamentos laterais destas células atuam na formação de junções celulares.

Células de Sertoli atuam como relógio biológico dos testículos indicando o momento da puberdade (Hostein, 1999, citado por HOSTEIN *et al.* 2003). Produzem substâncias endócrinas e parácrinas para regulação da espermatogênese. Desempenham papel de suporte e nutrição e atuam na fagocitose de células germinativas em degeneração e excesso de citoplasma proveniente da espermiogênese (DYM, 1983).

Envolvendo o epitélio dos túbulos seminíferos encontra-se uma lâmina basal. A seguir está a lâmina própria que é constituída por células alongadas disposta em camadas,

conhecidas como células mióide. Estas, ao nível ultra-estrutural, apresentam algumas características de células musculares lisas, tal como, presença de actina, o que lhes confere a propriedade de contração que auxilia na movimentação de espermatozóides e líquido testicular através dos túbulos seminíferos em direção aos ductos (DYM, 1983).

Entre os túbulos seminíferos está presente o estroma intersticial, constituído por células de Leydig, vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e tecido conjuntivo frouxo com seus elementos celulares típicos (RUGH, 1967). As células de Leydig secretam hormônios esteróides que atuam no desenvolvimento do trato reprodutor masculino e no desenvolvimento das características sexuais secundárias (MERCHANT-LARIOS & MORENO-MENDOZA, 2001).

A compartimentalização dos testículos em área tubular e intersticial deixa evidente a dupla função deste órgão. Trata-se, portanto, de um órgão de função endócrina e exócrina. A porção endócrina é representada pelas células de Leydig que são responsáveis pela produção de andrógenos. Já a porção exócrina é uma glândula tubular composta cujos produtos de secreção são os espermatozóides (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2004). Segundo Ortavant e colaboradores (1977) a produção de espermatozóides é o critério utilizado para determinação da puberdade em mamíferos.

Uma vez que os espermatozóides são produzidos, eles se direcionam ao epidídimo. Este órgão apresenta-se como um ducto bastante contorcido, formado por um epitélio pseudo-estratificado circundado por músculo liso, tecido conjuntivo e estruturas de sustentação. Neste órgão ocorrem os estágios finais de diferenciação dos espermatozóides, conferindo a estes uma maior motilidade e capacidade de fertilização (ROSS & ROWRELL, 1993). Estes eventos de diferenciação ocorrem fora da gônada e, portanto, não estão sob o controle genômico das células germinativas. Acredita-se, desta forma, que estes eventos são

dependentes de interações entre as células e o meio em que se encontram, e desta forma, são dependentes de andrógenos e proteínas secretadas pelo epidídimo (DACHEUX *et al.* 2003).

1.3- Morfometria

Estudos atuais que enfocam a análise histológica de testículos mostram a necessidade de análises histomorfométricas que corroborem para a interpretação de dados histológicos. Inúmeras técnicas têm sido empregadas com este objetivo, tais como uso de análise de imagens realizadas com auxílio de programas de computadores. A análise quantitativa de testículos permite a obtenção de dados comparativos do comportamento do epitélio testicular e de seus componentes intersticiais como realizado por Vergouwen *et al.* (1993).

A importância destes estudos pode ser observada em inúmeros trabalhos. Fornecem bases para a compreensão de experimentos que envolvam achados de natureza bioquímica e fisiológica (ROOSEN-RUNGE & GIESEL JR., 1950; WING & CHRISTENSEN, 1982; MIRAGLIA *et al.* 1990). Permitem analisar a existência de normalidade do processo de espermatogênese ou avaliar se algum processo patológico está ocorrendo (AMANN, 1981). Por meio de análises morfométricas é possível avaliar as alterações morfológicas que ocorrem em fases de desenvolvimento puberal. É sabido, por exemplo, que na fase de espermição o volume celular sofre modificações e apenas 2% do valor inicial é mantido (diminuindo de 500 para 10µm) (Russel & França, 1995 citado por FRANÇA *et al.* 2005).

Além disso, a análise morfométrica fornece importantes parâmetros de comparação entre espécies. Tais estudos permitiram saber que a densidade volumétrica das células de Sertoli varia consideravelmente dentro do grupo mamíferos (de ~15% em ratos a ~40% em humanos). Estes dados são capazes de fornecer a eficiência das células de Sertoli, ou seja, fornecem a produção diária de espermatozoides (RUSSEL *et al.* 1990, citado FRANÇA *et al.* 2005).

Alguns autores utilizam a contagem de células para obter informações sobre a espermatogênese (FRANÇA et al., 2005). Conhecimentos precisos do número de gerações de espermatogônias são essenciais para uma melhor compreensão dos mecanismos regulatórios da espermatogênese (De ROOIJ & RUSSEL, 2000). Estes dados são possíveis uma por estarem associados à contagem do número de divisões mitóticas e apoptoses que ocorrem nas gerações celulares, que mais uma vez estão associadas ao suporte das células de Sertoli.

A morfometria permite ainda a caracterização do ciclo do epitélio seminífero como foi feito por França & Godinho, (2003). E ainda, proporciona investigações da atividade espermatogênica, que permitem estabelecer o período de maturidade sexual com base em medidas de diâmetro tubular (ATTAL & COUROT, 1963; GODINHO & CARDOSO, 1979; FRANÇA & CARDOSO, 1998).

1.4- Desenvolvimento gonadal

Em camundongos, durante o período gestacional, é possível reconhecer entre 10 a 100 células primordiais germinativas na parede do saco vitelínico. Estas células sofrem proliferação mitótica e, gradualmente migrando do alantóide via mesentério, chegam até a gônada primordial que se forma juntamente ao mesonefro (RUGH, 1967).

Uma vez na gônada primordial as células continuam a proliferar e localizam-se na região central da mesma. A gônada cresce e as células germinativas agregam-se de forma cordonal, formando os cordões testiculares no interior do tecido intersticial. Posteriormente, estes proeminentes cordões celulares, tornar-se-ão túbulos seminíferos contendo precursores de células espermáticas (gonócito) e de células de Sertoli (RUGH, 1967).

As células de Sertoli são as primeiras células somáticas a se diferenciarem nos testículos. A interação morfológica entre células germinativas, precursores de células de sertoli e mióides resulta na formação dos cordões seminíferos e representa um evento

animais via intravenosa comportavam-se de maneira diferente em túbulos seminíferos adultos e túbulos pré-puberes (ROSS & ROWRELL, 1993).

A partir destes achados e de estudos fisiológicos subseqüentes sobre a composição do fluido testicular, ficou comprovada a atividade da BHT na formação de compartimentos capazes de segregar células haplóides da ação de fatores imunogênicos presentes na circulação sanguínea (ROSS & ROWRELL, 1993). Além disso, com o advento da microscopia eletrônica e o aperfeiçoamento de técnicas que utilizam traçadores eletrondensos, tornaram-se possíveis estudos ultra-estruturais dos componentes da BHT (DYM & FAWCETT, 1970). O método usado indica o tempo no qual a barreira começa a ser efetiva na exclusão de traçadores do lúmen testicular.

Consideráveis evidências indicam que o estabelecimento de uma BHT ou uma barreira hemato-celular germinativa é característica dos animais em geral. Dessa forma uma barreira foi demonstrada em animais que exibem diferentes organizações testiculares tais como mamíferos (CONNELL, 1978), aves (BERGMANN & SCHINDELMEISER, 1987), peixes (SILVA, 1987) e insetos (LANE & SKAER, 1980).

Atualmente, muito se sabe sobre a morfologia e fisiologia desta barreira. Trata-se da atividade de junções de oclusão entre células de Sertoli e junções de aderência entre células de Sertoli e células da linhagem germinativa que são eficientes na formação de compartimentos no epitélio seminífero (DYM & FAWCETT, 1970; GABRIEL et al., 2002). Estas junções de oclusão determinam a existência de um compartimento basal no epitélio germinativo no qual há espermatogônias e espermatócitos em Pré-leptóteno e Leptóteno; acima deste compartimento há o compartimento adluminal que inclui espermatócitos primários em fase adiantadas da meiose, espermatócitos secundários e espermátides (FAWCETT et al., 1970).

A atividade de compartimentalização do epitélio conta ainda com as células de Sertoli para o fornecimento de nutrientes e fatores biológicos da maturação (proteínas e fatores de

crescimento) para as células germinativas que não possuem acesso ao sistema circulatório (CHENG & MRUK, 2002).

Durante a migração de células para compartimentos progressivamente mais luminais as junções de oclusão são dinamicamente abertas e logo em seguida fechadas como um “fecho eclair”. A dinâmica das junções de oclusão do testículo é regulada por diferentes grupos de moléculas e/ou estágios funcionais de proteínas que incluem GTPases, proteases, inibidores de proteases, fosforilação de proteínas, nível de cálcio e cAMP intracelular e citocinas (CHENG & MRUK, 2002).

Até o presente momento, muitos destes mecanismos moleculares e bioquímicos da estrutura e arquitetura das junções de aderência e oclusão permanecem obscuros (CHENG & MRUK, 2002). Entretanto, sabe-se que uma melhor compreensão destes eventos poderá proporcionar aplicações importantes para a área reprodutiva. Acredita-se que diferentes alternativas de contracepção masculina poderiam ser investigados a partir de uma melhor compreensão da dinâmica de junções celulares nos testículos; ou ainda, forneceria um grande passo para o entendimento da espermatogênese, este evento tão complexo e intrigante (CHENG & MRUK, 2002).

2. Justificativa

Intencionou-se neste estudo estabelecer a fase de puberdade de *C. callosus*. Conhecer melhor a biologia reprodutiva destes animais, por meio de pesquisa morfológica e morfométrica sobre o processo de espermatogênese e formação de BHT nestes animais.

A aquisição de tais conhecimentos é de fundamental importância, uma vez que *C. callosus* são animais típicos da América do sul, abundantes no território brasileiro e, apesar de serem amplamente usados em diferentes estudos parasitológicos, imunológicos, histológicos e bioquímicos, não há na literatura a caracterização do início da espermatogênese e surgimento da barreira hemato-testicular nestes animais.

Assim, este trabalho em muito contribuirá para a caracterização da biologia reprodutiva de machos de *C. callosus* que poderão atuar como modelos experimentais para trabalhos de caráter mais aplicado tais como investigações de métodos de contracepção masculina; investigações de respostas testiculares a compostos tóxicos, infertilidade masculina, ação de hormônios, dentre outros.

3. Objetivos

Com este trabalho objetiva-se:

- Definir a fase de maturidade sexual de *C. callosus*
- Descrever a morfologia e a morfometria do testículo de *C. callosus* em períodos pré-púbere e púbere;
- Observar e descrever a ultra-estrutura e o tempo de aquisição da barreira hemato-testicular em *C. callosus*;
- Descrever morfológica e temporalmente o processo de espermatogênese em *C. callosus*

4. Material e métodos

4.1 - Espécimes

Para este estudo foram utilizados testículos de *C. callosus* em períodos que se estendem do nascimento à fase de maturidade sexual. Coletou-se testículos destes animais com 01, 02, 05, 10-21, 25-35 dias de idade, sendo que, para cada idade foram analisados grupos de 03 indivíduos. O dia do nascimento foi considerado como dia 01, sendo que aos 21 dias de idade foi realizado o desmame dos animais, segundo Mello, (1978). Estes animais foram mantidos no biotério do Departamento de Morfologia da UFU sob dieta *ad libitum*, água e ração granulada complementada com semente de girassol e aveia e permaneceram sob ciclos diários de 14 horas de luz e 10 horas de escuro.

4.2 - Coleta de Material

Os animais foram anestesiados por inalação de éter e, em seguida, notificadas as medidas de massa corpórea utilizando-se balança analítica de precisão “Sauter”. Procedeu-se laparotomia e remoção dos testículos e epidídimos. Imediatamente após, o material foi fixado e registrou-se as medidas de peso testicular por meio da técnica supra citada. Ainda foram

tomadas as medidas dos semi-eixos maior e menor de cada testículo com uso de paquímetro. Ambos testículos foram transversalmente seccionados.

4.3 - Processamento para microscopia de luz

Depois de fixados por 24 horas com uso de formol 10% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7.4, os testículos e epidídimos foram desidratados em álcool de concentrações crescentes e incluídos em glicol metacrilato (Historesin, LKB, Bromma, Suécia). A seguir cortes de testículos e epidídimos com 2 µm de espessura foram corados pelo azul de toluidina a 1% (BEHMER; TOLOSA; NETO, 1976) e cortes de testículos com 2.5 µm foram corados pelo PAS.

4.4 - Procedimentos para Análise Morfométrica

O cálculo do volume de cada testículo foi realizado pela fórmula de elipsóide de resolução: $V = 3/4 \cdot \pi \cdot a \cdot b^2$, onde **a** é o semi eixo maior e **b** é o semi-eixo menor.

O volume médio dos testículos de cada idade foi calculado pelas médias das medidas dos semi-eixos maior e menor. Essas médias foram calculadas pelos valores obtidos para cada grupo de 03 animais sendo considerados os valores dos testículos direito e esquerdo.

As lâminas histológicas foram analisadas por imagens digitalizadas em microscópio óptico BX 40 da marca Olympus, com uso de objetiva de 10X e 40X, acoplado a câmera JVC TK-1085U, ligada a um computador PC através de placa digitalizadora "Translation" 3153. O programa HL Image 97⁺⁺ foi então utilizado para mensurações morfométricas.

Para a avaliação de proporções volumétricas as imagens capturadas foram analisadas com o uso do ícone Measurement type. Para isto, uma área do corte histológico de testículo de cada indivíduo foi escolhida aleatoriamente e a imagem foi capturada com o uso do aumento de 10x, que forneceu uma área de estudo igual a 2700904.7 µm². Depois de mensurada a área

total, seguiu-se medida da área de todos os túbulos seminíferos presentes e a partir do somatório da área dos túbulos obteve-se a área de interstício pela subtração da área total amostrada. O mesmo procedimento foi repetido três vezes para o aumento de 40x, que forneceu uma área de estudo amostral equivalente a $16674.3 \mu\text{m}^2$. O resultado para cada idade foi obtido pela média aritmética das 04 amostras de cada um dos 03 indivíduos.

Para calcular o diâmetro dos túbulos foram mensurados 30 cortes transversais de túbulos seminíferos, escolhidos aleatoriamente, para cada indivíduo. Utilizou-se a objetiva de 40x para animais com 01-05 dias de idade e objetiva de 10x para as demais idades. A seguir foi efetuada uma média aritmética entre indivíduos de mesma idade.

Para análise estatística foi realizada por meio do programa BioEstat 3.0. Testou-se a distribuição normal dos dados por meio do teste D'Agostino Pearson quando $n \geq 20$ e teste de Kolmogorov-Smirnov quando $n < 10$. Uma vez verificada a distribuição normal dos dados realizou-se teste de correlação para dados paramétricos por meio da matriz de Correlação de Pearson. Realizou-se ainda um estudo do desenvolvimento testicular por meio de estatística descritiva.

4.5 - Processamento para microscopia eletrônica de transmissão

Para a análise ultra-estrutural, os fragmentos de testículos foram fixados em fixador de Karnovsky (1965) modificado, contendo aldeído glutárico (Ladd Research Ind. Burlington, Vermont E.U.A.) a 2,5%, paraformaldeído (Fluka AG, Buchs, Suíça) a 2% e hidróxido de lantânio 2% preparado em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4. A fixação foi realizada por 4 horas à temperatura ambiente. Os fragmentos foram submetidos a seqüências de desidratação em etanóis crescentes (50 a 100%). Para infiltração, os cortes foram inicialmente submetidos a uma mistura de partes iguais de óxido de propileno e resina Epon por 12 horas. Em seguida, passaram por uma solução Epon e óxido de propileno na proporção 2:1; nesta

etapa foram conservados por 2 horas à temperatura de 37° C. Por último, foram incluídos em resina pura e permaneceram em estufa a 60° C por 72 horas para polimerização.

Cortes semifinos e ultrafinos foram obtidos em ultramicrotomo Reichert-Jung. Telas de cobre contendo os cortes ultrafinos foram contrastados pelo acetato de uranila 2% em água destilada durante 40 minutos a 37°C (WATSON, 1958) e pelo citrato de chumbo 0,5% em água destilada (REYNOLDS, 1963), durante 30 minutos. A seguir, o material foi analisado e fotografado em microscópio eletrônico Zeiss - EM 109 do Centro de Microscopia eletrônica do Setor de Histologia da Universidade Federal de Uberlândia.

5. Resultados e discussão

5.1 - Análise morfológica

A análise morfológica mostra a fase de desenvolvimento dos testículos com base no estágio de diferenciação. A caracterização dos testículos com base na idade foi feita segundo critério de EK WALL (1984) que considera o estágio de diferenciação pela presença da célula germinativa mais diferenciada no epitélio seminífero.

Nesse estudo foi possível perceber que poucos túbulos, por idade, contém o tipo celular mais diferenciado. Este fato pode ser explicado pela atividade cíclica dos túbulos seminíferos. Deste modo, os túbulos não se encontram em um mesmo estágio de diferenciação. Silva e colaboradores (1996) estudaram ciclo do epitélio seminífero em *C. callosus* e demonstraram que é possível reconhecer oito estágios diferentes de formação de espermatozoides em animais adultos.

Quanto às modificações testiculares que ocorrem com a idade é possível perceber a progressão de eventos de maturação dos túbulos até a fase de estabelecimento da puberdade: animais com 01 e 02 dias de idade apresentam semelhanças quanto à fase de desenvolvimento morfológico dos testículos. Estes órgãos estão envoltos por uma túnica

albugínea bastante espessa, rica em vasos sanguíneos. O tecido intersticial apresenta-se em grande quantidade, ocupando importante fração da área testicular. Os túbulos seminíferos estão envoltos por 03 camadas de células mióides bem distintas ao microscópio de eletrônico e de luz (fig 01).

A análise do epitélio seminífero revela túbulos seccionados transversalmente e longitudinalmente. Estes caracterizam-se pela ausência de lúmen e pela presença de três tipos celulares: gonócitos, espermatogônias e células de Sertoli. Os gonócitos ocorrem preferencialmente na região central dos túbulos e caracteriza-se por apresentar núcleo claro, grande e esférico, com 3-4 nucléolos evidentes (fig 01), e por meio de divisões mitóticas, que são freqüentes neste período (fig 02), são responsáveis por formar a população de espermatogônias (CLERMONT, 1972; ORSI; FERREIRA, 1978). As espermatogônias e as células de Sertoli presentes nestas idades apresentam formatos variáveis (fig 03). Ou seja, ainda não adquiriram suas características morfológicas típicas: arredondadas e triangulares respectivamente.

Células de Sertoli imaturas são metabolicamente ativas e atuam no desenvolvimento fisiológico por meio de secreção de hormônios. Isto indica que o estágio imaturo das células de Sertoli não denota a não diferenciação destas, mas sim um simples estágio de diferenciação que muda com a maturação (GONDOS & BERNDSTON, 1993).

Aos 05 dias de idade a túnica albugínea torna-se mais densa em relação à configuração aproximadamente frouxa observada em testículos de 01 e 02 dias de idade. Além disso, já se observa espermatogônias em diversos estágios de divisão mitótica (fig 04). Segundo Mackinnon et al., (1978) o aumento do número de divisões celulares no testículo parece estar relacionado à elevação de níveis de testosterona intratubular. Já a redução de teores hormonais é responsável pela divisão das células de Sertoli (STEINBERGER & STEINBERGER, 1971).

Ainda aos 05 dias de idade, as células de Sertoli e as espermatogônias alcançam uma posição mais basal, e a região central dos túbulos fica preenchida principalmente pelo citoplasma das células que o compõe. A microscopia eletrônica revela que nesta idade é possível diferenciar espermatogônias em 02 subtipos: espermatogônias tipo **A** e **B**.

As espermatogônias do tipo **A** (fig 05) caracterizam-se por possuírem núcleo ovóide e 01-02 nucléolos ligados ao envoltório nuclear. Estas células são consideradas células - tronco, uma vez que a divisão destas resulta na formação de espermatogônias do tipo **B** e ainda novas espermatogônias do tipo **A** responsáveis por manter a população destas células (DYM, 1983).

As espermatogônias do tipo **B** diferem da **A** por apresentarem nucléolo único, desvinculado do envoltório nuclear e presença de cromatina adjacente a este. Além do mais é comum observar que este tipo celular geralmente ocorre aos pares, ligadas por pontes citoplasmáticas (fig 06). Estas pontes, resultantes de citocinese incompleta, indicam que este tipo celular irá prosseguir o processo de divisão celular para finalmente, originar os espermatozóides (DYM, 1983). Acredita-se que tais ligações sejam importantes para sincronizar o desenvolvimento destas células ou para facilitar a obtenção de nutrientes (ROSS & ROWRELL, 1993).

Durante a fase inicial de desenvolvimento (01 – 10 dias) é possível observar grande aumento na dimensão dos túbulos seminíferos. Aos 10 dias de idade o interstício deixa de representar uma proporção importante e adquire aparência típica de testículos adultos, de modo a ocupar pequenas áreas entre a conexão de 03 túbulos, o que confere ao interstício um aspecto triangular. O aumento das dimensões dos túbulos causa modificações da aparência das células peritubulares, de modo que estas deixam de se organizar em três camadas distintas (fig 07), passando a organizarem-se em íntima aposição, aparentemente, uma característica típica para roedores. Modificações na organização de células mióides com a idade também foram observadas por Xie e colaboradores (1996).

Testículos de animais com 11 dias de idade caracterizam-se pela presença de inúmeras células em degeneração, além disso, foi possível observar, em alguns indivíduos de mesma idade, presença de pequenos espaços entre as células, dando a idéia de retração do tecido. Este processo progride de modo que, até 12 dias de idade, estes espaços vão se tornando maiores (fig 08). Isso indica que para estas idades as células de Sertoli já começam a obter a propriedade de secreção do fluido testicular, evento importante para a formação de lúmen tubular.

O epitélio seminífero de animais com 13 dias de idade permitiu observar que grande parte dos túbulos já completou o processo de formação do lúmen (fig 09). Esta formação é um evento importante e parece estar associado a diversos fatores tais como crescimento dos túbulos, secreção de fluido e ainda degeneração de alguns tipos celulares. Nesta idade o número de células mortas se acentua (fig 10). Ekwall et al., (1984); Hagenas et al., (1981) descrevem que é comum encontrar células degenerativas no final da prófase meiótica ou durante tais divisões. Estas células entram em prófase antes ou durante a formação de junções de oclusão entre as células de Sertoli. Desta forma, estes autores propõem que uma possível causa de degradação celular esteja associada à degeneração de células germinativas que iniciaram o processo de meiose, mas que não possuíam a proteção da Barreira Hemato-Testicular.

O processo de degeneração celular foi observado não só na fase em que ocorreram divisões meióticas, mas sim, durante todo o período de desenvolvimento testicular. Outros autores ao fazerem tais observações sugerem associações com a fase do desenvolvimento dos testículos. THOMAS & RAJA (1980), observaram degenerações freqüentes que ocorreram no segundo mês de vida de suínos. Os autores propõem que este fato está associado ao desaparecimento de gonócitos no epitélio seminífero que se dá no mesmo período.

Por meio da análise ultra-estrutural foi possível perceber o tipo celular mais diferenciado no epitélio são os espermatócitos I. Este tipo celular ainda não iniciou o processo de meiose e podem ser diferenciados em 02 tipos. Espermatócitos em fase pré-leptóteno, cuja morfologia assemelha-se a espermatogônias B. E espermatócitos leptóteno que iniciaram o processo de duplicação de cromossomos.

Aos 15 dias o epitélio seminífero adquire uma organização em camadas definidas e os túbulos terminaram o processo de formação do lúmen (fig 11). Além disso, é possível notar que diversos espermatócitos atingiram a fase de prófase da meiose. Três estágios da prófase I puderam ser identificados de acordo com a descrição de Ibarguengoytia e colaboradores (1999): zigóteno, paquíteno e diplóteno. No zigóteno, os núcleos apresentam manchas de cromatina pouco condensada e complexos sinaptonêmicos com arquitetura delicada. Estes complexos definem o processo de pareamento dos cromossomos paternos para que ocorra crossing over. Núcleos de espermatócitos em paquíteno (fig 12a) caracterizam-se por apresentar cromatina um pouco mais condensada e pela presença de complexos sinaptonêmicos (fig 12a e 12b). Núcleos em diplóteno apresentam áreas típicas de cromatina muito condensada. Os cromossomos se separam, ou ainda, permanecem unidos formando estruturas denominadas quiasmas.

As modificações que ocorrem no epitélio até os 21 dias de idade são basicamente variações na proporção deste tipo celular e ocorrência de meiose II. Entretanto, as fases deste evento não puderam ser identificadas.

Os 25 dias de idade marcam o final da segunda divisão meiótica (telófase) das células germinativas devido ao aparecimento de um novo constituinte celular: as espermatídes arredondadas. Estas marcam o início da espermiogênese e caracterizam-se por apresentarem núcleo de cromatina frouxa. Além disso, a visualização destas é possível por meio da técnica de PAS, que gera reação positiva do conteúdo acrossômico destas células (fig. 13). Trata-se,

segundo Dym (1983), de uma pequena vesícula do complexo de Golgi comendo grânulos eletrondensos ricos em carboidratos e enzimas hidrolíticas.

A análise ultra - estrutural mostra que nesta fase estão ocorrendo modificações nucleares e citoplasmáticas drásticas. As células recém formadas, resultantes da telófase II, apresentam núcleos pequenos se comparados aos núcleos dos espermatócitos que são muito grandes. O citoplasma tem aparência clara e caracteriza-se pela presença de ribossomos, retículo endoplasmático, gotículas de gordura e complexo de Golgi na região próxima ao núcleo. Uma característica marcante destas células é a presença de vesículas acrossômicas (fig 14), originada da íntima associação do núcleo com a região do Golgi (COMARCK, 1991). Aos poucos os grânulos da vesícula se aderem a membrana limitante da mesma fazendo com que os grânulos fiquem aderidos ao envelope nuclear. Segue a fase do capuz acrossômico (fig 15). Este deriva da aproximação das membranas interna e externa da vesícula acrossômica encerrando o conteúdo acrossômico: hialuronidase, hidrolases e protease. Todos estes eventos foram descritos por outros autores em diversas espécies (ROSS, ROWRELL, 1993; DYM, 1983).

Modificações de centríolos e mitocôndrias também são característicos desta fase, conhecida como fase Golgi, mas, não foram visualizados nestes cortes.

A partir dos 28 dias de idade é possível perceber a sequência do processo da espermiogênese. Completa-se o processo de diferenciação do acrossoma e condensação da cromatina. Ao mesmo tempo o núcleo vai se achatando e obtendo um aspecto aproximadamente periforme. Ainda nesta idade é possível visualizar alguns túbulos iniciando o processo de espermição. Este processo é caracterizado pela liberação do citoplasma residual das espermatídes (fig 16), que dará origem à formação de espermatozóides. Estes resíduos citoplasmáticos serão posteriormente fagocitados pela atividade das células de Sertoli.

É interessante notar nesta idade que, apesar da presença de alguns túbulos seminíferos contendo espermatozóides, (fig 17) ainda não é possível visualizar espermatozóide na luz dos túbulos epididimários (fig. 18). Isto indica que estes animais ainda não estão reprodutivamente maduros, ou seja, ainda não são capazes de fertilizar a fêmea. Observações semelhantes foram feitas por Miraglia e colaboradores, (1990) em seu estudo com ratos albinos. Nestes animais o processo de espermatogênese se torna completo bem antes da fase em que os espermatozóides alcançam as vias genitais.

Em animais com 30 dias de idade já é possível perceber espermatozóides sendo armazenados na luz do epidídimo (fig 19). Entretanto, esta mesma característica não pode ser observada para todos os animais do mesmo grupo. É possível perceber animais com 34 dias de idade com desenvolvimento retardatário em relação a outros do mesmo grupo de idade (fig. 20).

Aos 35 dias, idade em que se considerou que os animais atingiram a puberdade, todos os membros do grupo já estavam em um estágio cujos túbulos seminíferos estavam armazenando espermatozóides (fig. 21) e estes já alcançaram a região dos ductos epididimários.

Detalhes da espermiogênese podem ser vistos ao ME e seguem a sequência de eventos descritos por Dym (1983). São eles os eventos que seguem a fase do Capuz, conhecidos como: fase do acrossoma e fase de maturação.

Na fase do acrossoma ocorre condensação e alongamento do núcleo da espermatíde (fig 22) enquanto que na fase de maturação ocorre compactação e fagocitose do corpo residual do citoplasma das espermatídes. Finalmente, as células de Sertoli direcionam as espermatozóides para a luz dos túbulos.

Os espermatozóides resultam de uma maior condensação e compactação da massa de cromatina das espermatídes. A cauda é dividida em seguimentos: região conectiva, peça

intermediária, média e final. Inúmeras caudas de espermatozóides puderam ser vistas na luz dos túbulos seminíferos de *C. callosus* com 35 dias (fig 23). Este é um bom indicativo do estabelecimento de maturidade sexual.

O critério de estabelecimento da puberdade a partir da produção e maturação de espermatozóide está de acordo com critérios de Ortavant et al. (1977) que define desta forma a maturidade sexual para mamíferos. Entretanto, estes dados contrapõem-se aos trabalhos de Mello, (1978) que considera que *Calomys callosus* atingem a puberdade aos 19 dias, momento em que se tem a descida dos testículos ao escroto.

5.2- Análise morfométrica

Durante o período analisado pode-se verificar importantes modificações morfométricas. Aos 35 dias o valor da média do peso testicular sofreu um acréscimo equivalente a 68.88 vezes o valor inicial (01 dia). Com relação aos valores de peso corpóreo pode-se averiguar um aumento de 8.44 vezes para o mesmo período observado (tabela 01).

O índice gonadossomático, obtido da relação de peso corporal por peso testicular, decresce com a idade (tabela 01). Isto mostra que em idades iniciais os testículos são muito pequenos em relação ao corpo. O índice gonadossomático é um dado bastante utilizado na comparação entre espécies. Este valor geralmente está associado com a taxa de produção de espermatozóides pelas espécies. Quando estes dados estão associados à idade, é possível perceber que índices menores ocorrem para animais de idades mais avançadas (tabela 01), ou seja, idade em que já iniciou o processo de espermiogênese.

Apesar do aumento do peso dos testículos ocorrer de forma bem mais acentuada que o ganho de massa corpórea (tabela 01), pode-se perceber que existe grande correlação positiva entre estes dados (fig. 24). Esta correlação provavelmente está associada à influência da ação de hormônios esteróides, dado que estes atuam tanto no desenvolvimento dos testículos

quanto do corpo. Esses hormônios controlam tanto a proliferação e diferenciação das células espermatogênicas, como processos anabólicos e catabólicos gerais como crescimento do esqueleto, crescimento da musculatura esquelética, distribuição subcutânea de tecido adiposo, dentre outros (ROSS; ROWRELL, 1993). Com base nesta mesma idéia Ekwall e colaboradores, (1984) sugerem que o peso de testículos, vesículas seminais e até mesmo dos rins pode ser estimado com base nos valores de pesos corporais.

O acréscimo de peso de testículo ocorre de forma aproximadamente linear até os 27 dias de idade. A partir desta idade ocorrem variações bruscas para estes valores (fig. 25). É interessante notar que estes dados estão associados a dados morfológicos. A partir dos 28 dias de idade ocorrem variações, para grupos de mesma idade, quanto ao tipo celular mais desenvolvido. Animais com 28 dias já estão produzindo espermatozóides, enquanto que, para alguns dos animais de 32 dias o tipo celular mais desenvolvido foi a espermatíde.

Ainda com base no ganho de massa testicular com idade, observa-se que o primeiro pico de crescimento ocorre aos 13 dias (fig. 25). Essa idade corresponde à fase de formação da luz dos túbulos. Até os 21 dias o crescimento dos testículos ocorre de forma lenta, acelerando a partir dos 25 dias. Esta idade corresponde ao início da espermiogênese.

Vergouwen, e colaboradores, (1993) em estudos com populações de camundongos também observou variações de crescimento testicular que se deu de forma mais acentuada em fases próximas à puberdade. O autor justifica que o pequeno aumento dos testículos em fases iniciais deve-se ao fato de tratar-se de um período de desenvolvimento de células germinativas. O crescimento acelera com o aumento de divisões celulares, por ação de hormônios.

É importante notar que não somente os valores de peso corporal e massa testicular se encontraram correlacionados significativamente, mas sim todos os demais parâmetros observados (Tabela 04).

Valores de diâmetro de túbulos crescem de forma linear com a idade (gráfico 03). Estes resultados também foram observados por inúmeros outros autores. Miraglia e colaboradores, (1990); Iczkowski e colaboradores (1991) ao estudarem morfometria de testículos em populações de ratos e coelhos, respectivamente, sugeriram que o crescimento dos túbulos seminíferos são os principais responsáveis pelo aumento de volume testicular. O mesmo pode ser descrito para *Calomys callosus*, uma vez o diâmetro e o semi-eixo maior são os parâmetros que apresentam os maiores índices de correlação com volume (Tabela 04).

O volume dos testículos sofre um acréscimo de 913 vezes para o período de 01 a 35 dias (tabela 02). Assim como o diâmetro, os valores de massa testicular estão positivamente correlacionados com o volume (tabela 04). Entretanto, é possível perceber que aos 13 dias há uma variação no pico de crescimento do volume, de maneira oposta ao que ocorreu para valores de peso testicular (fig. 27).

Diferente do que ocorre para valores de diâmetro, peso e volume, o aumento na proporção de túbulos seminíferos em relação ao interstício é mais acentuado em idades iniciais: de 01 a 10 dias de idade (gráfico 05). A partir desta fase os túbulos crescem de forma linear, entretanto, lenta. Estas observações também foram feitas por meio de análise morfológica, na qual foi descrito o crescimento dos túbulos que não foi acompanhado pelo crescimento do interstício em idades iniciais.

Desta forma, fica mais uma vez evidente que o crescimento dos testículos em massa e volume está associado ao crescimento dos túbulos seminíferos durante toda a fase de desenvolvimento. Entretanto, uma pequena variação na proporção de túbulos em relação ao interstício ocorre a partir dos 10 dias de idade. Isto indica que o interstício tende a crescer a partir desta fase, mantendo a proporção entre estes dois parâmetros mais ou menos estáveis com a idade (fig. 28). Assim, a partir desta idade, o interstício torna-se mais um componente importante no crescimento dos testículos.

A análise morfométrica ainda nos permite perceber que indivíduos de mesma idade podem apresentar desenvolvimento testicular diferenciado. Estas variações podem interferir nos resultados de correlação, uma vez que interferem nas médias e são diagnosticados por meio de valores de desvio padrões.

Estes achados também foram descritos por Ekwall e colaboradores, (1984). Segundo o autor tais variações no desenvolvimento testicular tornam-se significantes em trabalhos que envolvam investigações experimentais. Nestes casos, é necessário que se atente ao n amostral. Este autor sugere ainda a obtenção de animais com idades bem definidas e com tendências a valores comuns de peso corporal e testicular.

É importante salientar que aos 35 dias de idade, quando se considerou a puberdade destes animais, todos os indivíduos do grupo apresentavam uma mesma fase de desenvolvimento. Além disso, os parâmetros de peso corporal e testicular para esta idade apresentam um baixo valor de desvio padrão (tabela 01), o que indica que todos os indivíduos realmente estão numa mesma fase do desenvolvimento.

Tudo isto indica que a idade por si só não pode ser considerada como um bom indicativo da fase do desenvolvimento testicular. Ninhadas diferentes têm ritmo de crescimento e diferenciação distintos. Portanto, a idade fornece uma idéia aproximada da fase do desenvolvimento testicular dos animais. É importante que este dado esteja associado a outros, tais como peso corporal e também peso e volume de testículos. Ekwall e colaboradores (1984) descrevem que a melhor maneira de se definir a fase do desenvolvimento de testículos é observando-se qual é a célula mais diferenciada que constitui o epitélio seminífero.

5.5 Formação da Barreira Hemato Testicular

A progressão do lantânio ao longo do epitélio seminífero e o estudo da presença de especializações de membrana permitiu diagnosticar o momento da formação da BHT em *C. callosus*. O lantânio é um excelente indicador de movimento de moléculas biológicas através de canais intercelulares de tecidos (JONES, 1978), cuja molécula possui 0.92 μm de diâmetro (ROBINSON & STOKES, 1970).

Em fases iniciais do desenvolvimento puberal (01-12 dias), o lantânio se comporta de maneira similar de modo a se difundir entre todas as células que compõem o tecido (Fig 29). Até esta fase nenhum tipo de junção de membrana estava evidente no epitélio seminífero de *C. callosus*.

Aos 13 dias de idade foi possível perceber a existência de junções de aderência do tipo desmossomo no epitélio seminífero (Fig 30). Nesta idade o tipo celular mais desenvolvido são os espermátócitos primários em leptóteno.

Os desmossomos fazem parte de um conjunto de especializações de membrana denominadas junções de aderência. Sua função é unir células vizinhas por meio de conexão de elemento do citoesqueleto (ADAMS & NELSON, 1998).

Os resultados indicam que o aparecimento destas junções representa ponto de partida na formação de Barreira. É possível perceber que em locais onde estas junções se encontram ocorre parada do lantânio, ou diminuição da intensidade com que este traçador se propaga por entre as células. É importante salientar que nem sempre o traçador se difunde por entre as células de maneira eficiente e, portanto, estes resultados podem ser causados pela dificuldade de penetração do lantânio, até mesmo em função da atividade de células mióides.

Fawcett e colaboradores, (1970) ao estudarem barreira no corpo animal afirma que as células mióides definem a formação de barreiras incompletas já que, uma vez comprovada a

atividade destas células, alguns traçadores não conseguem atravessar toda a espessura do epitélio seminífero.

É interessante notar que o surgimento destas junções de aderência coincide com a fase em que o lúmen testicular se encontra em um estágio de desenvolvimento bastante avançado. Estes eventos parecem estar fisiologicamente relacionados. Comparando-se a morfologia do epitélio de animais com 13 dias e idades anteriores (11 e 12 dias) percebe-se que tais junções parecem estar atuando no direcionamento de secreções das células de Sertoli para regiões mais apicais.

A aparência de túbulos com 12 dias de idade podem comprovar esta idéia uma vez que espaços entre as células (provenientes da secreção das células de Sertoli) são observadas em toda a extensão do epitélio seminífero.

Tais resultados diferem dos resultados obtidos por Vitale e colaboradores, (1973) e também dos achados por Sun & Gondos, (1986) pela análise do epitélio seminífero de mamíferos. Segundo estes autores a presença de junções oclusivas no epitélio seminífero coincide com a formação de abertura do lúmen nos túbulos seminíferos. Entretanto, para *Calomys* a formação de lúmen precedeu a existência de junções oclusivas coincidido com o surgimento de junções de aderência.

Aos 15 dias de idade são diagnosticadas as primeiras junções oclusivas entre as membranas das células de Sertoli e esta idade coincide com o surgimento de espermatócitos em prófase meiótica compondo o epitélio seminífero. As junções de oclusão passam a ser mais frequentes a partir dos 16 dias de idade. Trata-se do surgimento de junções do tipo "tight". Estas são formadas a partir de um contato íntimo entre membranas opostas de células de Sertoli, capazes de impedir a passagem de traçadores eletro-densos para regiões mais lúmenais. Constituem a base morfológica da BHT ((BERGMANN & DIERICH, 1983; SUN & GONDOS, 1986; SILVA, 1987). Apresentam-se arranjadas em grande quantidade de forma

seriada e é comum encontrar cisternas de retículo endoplasmático rugoso em regiões próximas às áreas de junções oclusivas.

A aparência destes complexos juncionais do tipo “tight” observados para *C. callosus* são semelhantes aos descritos por outros autores para outras espécies de mamíferos (NAKANO & SUZUKI (1976); FLICKINGER & FAWCETT (1967); DYM & CAVICCHIA (1977). Entretanto, o significado da presença de retículo assim como o arranjo seriado destas estruturas não estão bem compreendidos. O traçador é interrompido logo na primeira junção encontrada (SUN & GONDOS, 1986).

O arranjo sequencial destas estruturas pode ser importante para reforçar as teorias que tentam explicar o processo de abertura e fechamento das junções do tipo “tight” para a passagem de espermátócitos em pré-leptóteno ou leptóteno do compartimento basal para o compartimento adluminal.

Segundo a “teoria do zipper”, uma junção se abre, acomoda o espermátócito na fase de pré-leptóteno/leptóteno, que permanece nesta região enquanto estas estruturas juncionais se reorganizam (PELLETIER & BYERS, 1992; PELLETIER et al., 1997). De acordo com a teoria do compartimento intermediário, elaborada por Russell (1977), forma-se um compartimento intermediário ocupado por células germinativas que estão se dirigindo para o compartimento adluminal. Entretanto, nenhuma destas teorias consegue explicar os mecanismos regulatórios envolvidos neste processo, além disso, nenhuma delas poderiam ser validadas se não houvesse sido comprovado que tais junções se organizam em sequência, dado que ambas teorias afirmam que a passagem pelos compartimentos ocorre de modo gradual. Além disso, a presença de retículo endoplasmático nas proximidades das junções podem ser importantes para o recrutamento de proteínas necessárias para a reconstrução das junções oclusivas.

Ainda em animais de 15 dias, foi observado que epitélio seminífero adquire uma organização estruturada de forma lógica. As células germinativas se encontram sempre

envoltas pelo citoplasma das células de Sertoli. As espermatogônias e espermátócitos pré-leptóteno e leptóteno se encontram nas regiões basais do epitélio. Os espermátócitos da fase zigóteno adiante, se encontram em regiões mais próximas a luz (Fig 31 e 32).

Quanto ao comportamento do traçador eletrôn-denso, pode-se observar que a partir dos 15 dias de idade ocorre parada deste traçador que é impedido de atingir a área luminal pela ação de junções de oclusão observadas entre as células de Sertoli (Fig 33, 34 e 35). Assim, pode-se afirmar que aos 15 dias de idade está definido o início da formação da BHT. Esta define a formação de um epitélio compartimentalizado: uma área basal composta por espermatogônias e espermátócitos primários em leptóteno, e uma região adluminal composta por espermátócitos em fases adiantadas da prófase meiótica e espermátócitos secundários. Estes resultados são semelhantes aos descritos em ratos por Levy (1999). Este autor demonstra que, para estes animais, a formação da barreira ocorre entre 16 e 19 dias de idade.

Assim, é possível notar que a formação da BHT é requerida antes que se estabeleça a formação de espermatozóides. Afinal, foi observado que a formação da barreira coincide com o aparecimento de espermátócitos em paquíteno nos túbulos seminíferos. Estes achados foram descritos por inúmeros outros autores (BERGMANN & DIERICH, 1983; SUN & GONDOS, 1986; SILVA, 1987; CHENG & MRUK, 2002). Portanto, a formação da BHT em *Calomys callosus*, assim como em outros mamíferos, está diretamente relacionada ao início do processo de meiose. A relação fisiológica destes eventos está na formação de microambientes eficientes na proteção de células haplóides de fatores imunogênicos presentes na circulação sanguínea. Esta barreira se inicia aos 15 dias de idade para *C. callosus*.

6. Conclusões:

O trabalho permitiu concluir que:

- A maturidade sexual em *C. callosus* ocorre aos 35 dias de idade, quando espermatozóides são produzidos pelos testículos e armazenados pelo epidídimo
- Fica demonstrado que importantes modificações morfológicas e morfométricas ocorrem nos testículos de *C. callosus* permitindo diagnosticar a fase de desenvolvimento puberal destes animais
- A fase de desenvolvimento testicular não pode ser determinada somente a partir da idade. A análise combinada entre parâmetros morfométricos e morfológicos permite uma avaliação mais segura deste desenvolvimento
- A aquisição da BHT ocorre aos 15 dias de idade e se apresenta sob a forma de junções de oclusão. Esta fase antecede o estabelecimento da puberdade em *C. callosus* e coincide com o surgimento de espermatócitos na fase de paquíteno da meiose.
- A espermatogênese em *C. callosus* inicia-se na ausência de uma BHT, entretanto a progressão do processo de meiose só ocorre após a efetivação desta barreira.

7. Tabelas

Tabela 01: Dados morfométricos de *C. callosus* do nascimento aos 35 dias de idade

Idade (dias)	Peso corporal (g)	SD*	Peso testicular (g)	SD*	Índice Gns¹
01	2.424	±0.175	0.001	±0.001	2693.833
02	2.944	±0.644	0.002	±0.001	1549.579
05	3.683	±0.774	0.002	±0.001	1938.211
10	7.226	±0.904	0.005	±0.002	1505.515
11	5.942	±1.256	0.005	±0.001	1188.466
12	6.569	±1.103	0.007	±0.001	925.272
13	8.635	±2.475	0.011	±0.005	792.236
14	8.306	±1.347	0.009	±0.002	883.606
15	9.590	±1.442	0.010	±0.001	978.531
16	11.068	±0.954	0.014	±0.003	773.958
17	10.698	±1.862	0.016	±0.008	652.325
18	11.950	±2.091	0.017	±0.005	690.751
19	12.204	±3.207	0.016	±0.004	772.432
20	12.406	±2.562	0.021	±0.010	587.976
21	13.674	±2.425	0.020	±0.005	687.122
25	16.942	±4.356	0.030	±0.007	564.742
26	17.685	±8.037	0.034	±0.012	524.788
27	17.384	±8.282	0.049	±0.034	356.954
28	24.590	±4.673	0.069	±0.026	355.352
29	19.091	±3.144	0.045	±0.013	428.045
30	17.618	±1.740	0.047	±0.020	373.260
31	17.183	±2.199	0.041	±0.011	418.071
32	17.577	±2.036	0.037	±0.013	471.234
33	20.559	±5.367	0.060	±0.038	343.799
34	23.286	±6.788	0.065	±0.036	356.055
35	20.464	±0.461	0.062	±0.002	332.751

¹ Índice gonadosomático

* Desvio padrão

Tabela 02: Dados histomorfométricos dos testículos de *C. callosus* do nascimento aos 35 dias de idade

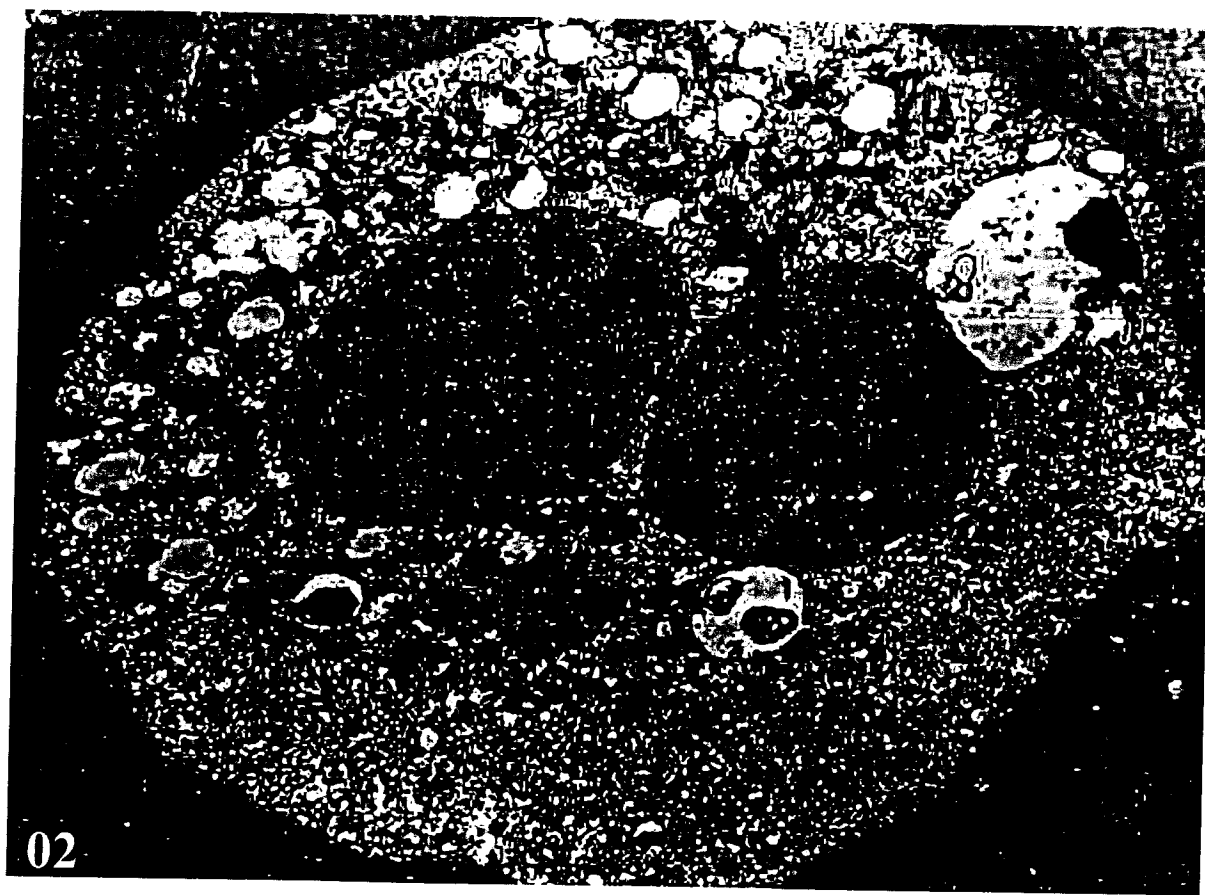
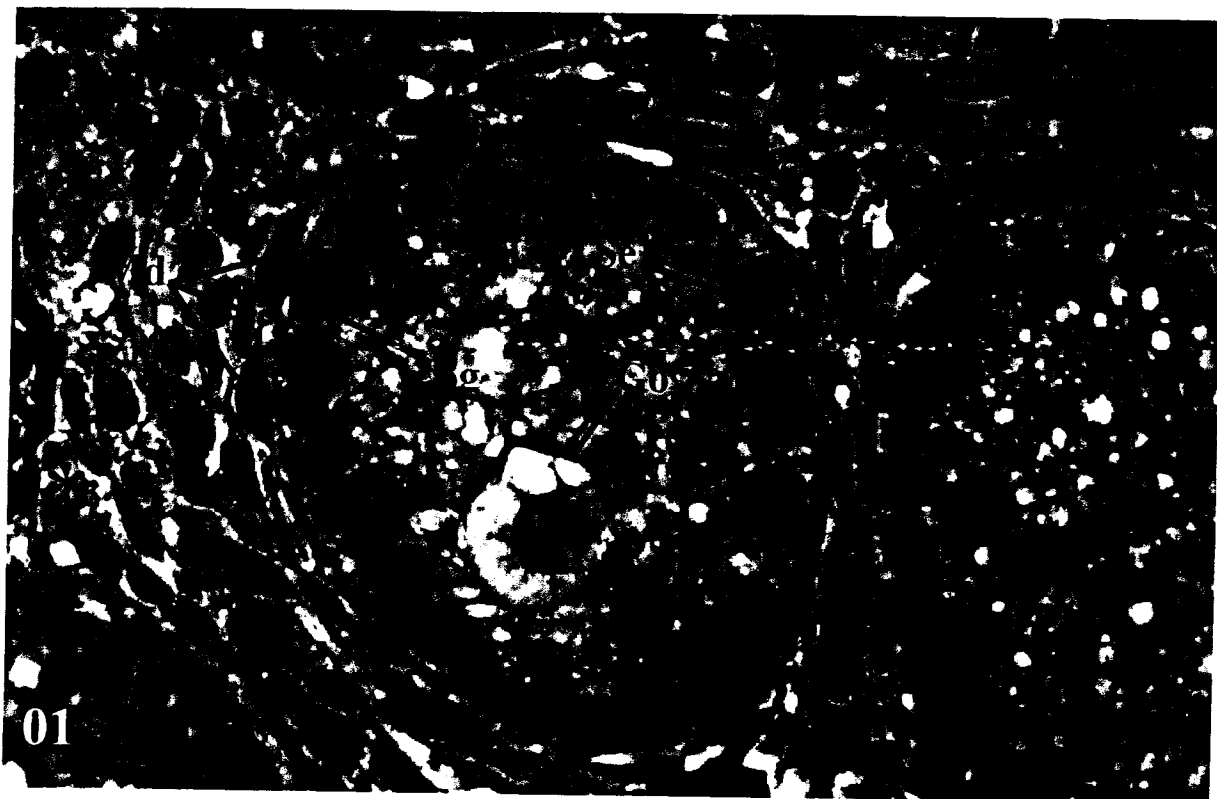
Idade	Eixo maior (cm)	SD	Eixo menor (cm)	SD	Volume (cm³)
01	0.106	±0.005	0.048	±0.005	0.0005
02	0.158	±0.030	0.110	±0.009	0.0045
05	0.160	±0.014	0.123	±0.004	0.0057
10	0.330	±0.000	0.210	±0.000	0.0342
11	0.315	±0.021	0.210	±0.000	0.0327
12	0.340	±0.028	0.195	±0.007	0.0304
13	0.305	±0.007	0.170	±0.042	0.0207
14	0.343	±0.032	0.208	±0.004	0.0349
15	0.370	±0.042	0.185	±0.021	0.0298
16	0.523	±0.060	0.193	±0.011	0.0459
17	0.523	±0.032	0.200	±0.014	0.0492
18	0.615	±0.000	0.205	±0.007	0.0608
19	0.605	±0.007	0.310	±0.014	0.1369
20	0.570	±0.042	0.325	±0.021	0.1418
21	0.520	±0.027	0.309	±0.049	0.1169
25	0.630	±0.028	0.340	±0.042	0.1715
26	0.500	±0.000	0.298	±0.018	0.1046
27	0.511	±0.114	0.281	±0.061	0.0950
28	0.605	±0.000	0.408	±0.004	0.2372
29	0.678	±0.064	0.441	±0.042	0.3106
30	0.615	±0.116	0.420	±0.063	0.2556
31	0.635	±0.051	0.403	±0.031	0.2429
32	0.606	±0.035	0.376	±0.049	0.2018
33	0.766	±0.156	0.456	±0.053	0.3752
34	0.623	±0.058	0.394	±0.033	0.2278
35	0.775	±0.049	0.500	±0.000	0.4565

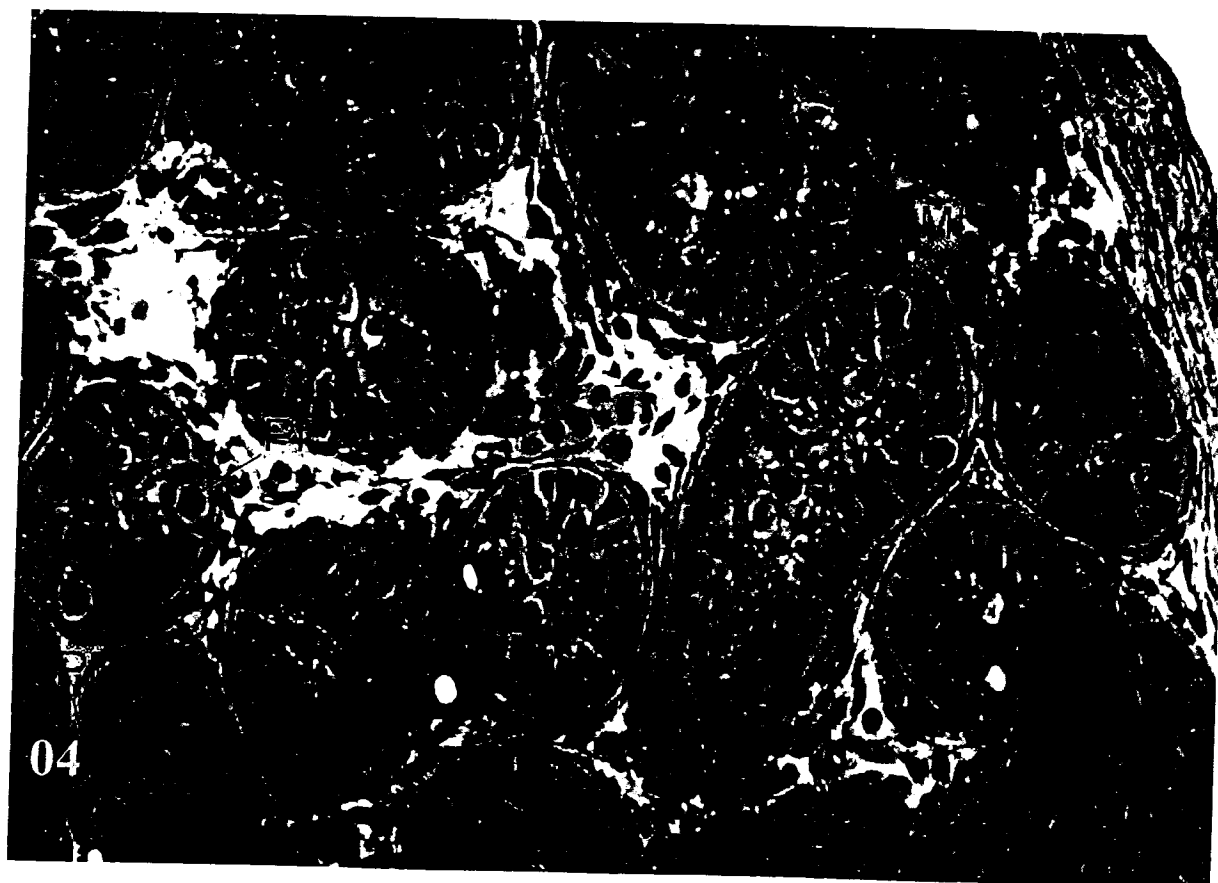
Tabela 04: Coeficiente de correlação (r) entre idade, diâmetro tubular, proporção volumétrica de túbulos seminíferos e interstício, peso corporal e testicular, semi-eixos maior e menor de testículos e volume gonadal de *C. callosus* do nascimento aos 35 dias de idade.

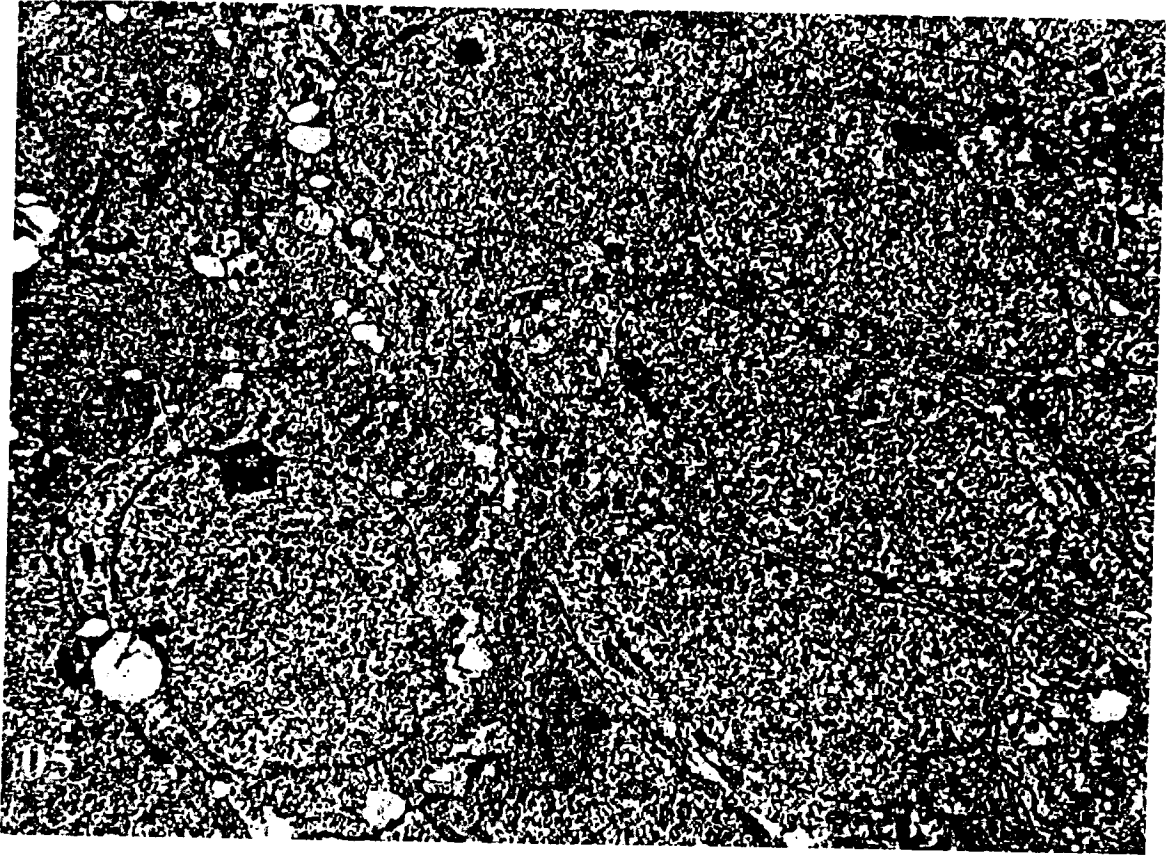
	Idade	Diam tub	Prop vol tub	Prop vol intrs	Peso Corpo	Peso test	S. E. maior	S. E. menor	Volume
Idade	1.000*	---	---	---	---	---	---	---	---
Diam Tub	0.977*	1.000*	---	---	---	---	---	---	---
Prop vol tub	0.796*	0.700*	1.000*	---	---	---	---	---	---
Prop vol intrs	-0.796*	-0.700*	-1.000*	1.000*	---	---	---	---	---
Peso Corpo	0.960*	0.970*	0.725*	-0.7254*	1.000*	---	---	---	---
Peso testículo	0.915*	0.957*	0.593*	-0.5929*	0.9583*	1.000*	---	---	---
S. E. maior	0.918*	0.868*	0.834*	-0.8344*	0.8808*	0.7946*	1.000*	---	---
S. E. menor	0.944*	0.946*	0.727*	-0.7273*	0.9102*	0.8848*	0.9011*	1.000*	---
Volume	0.866*	0.901*	0.547*	-0.5467*	0.831*	0.867*	0.839*	0.945*	1.000*

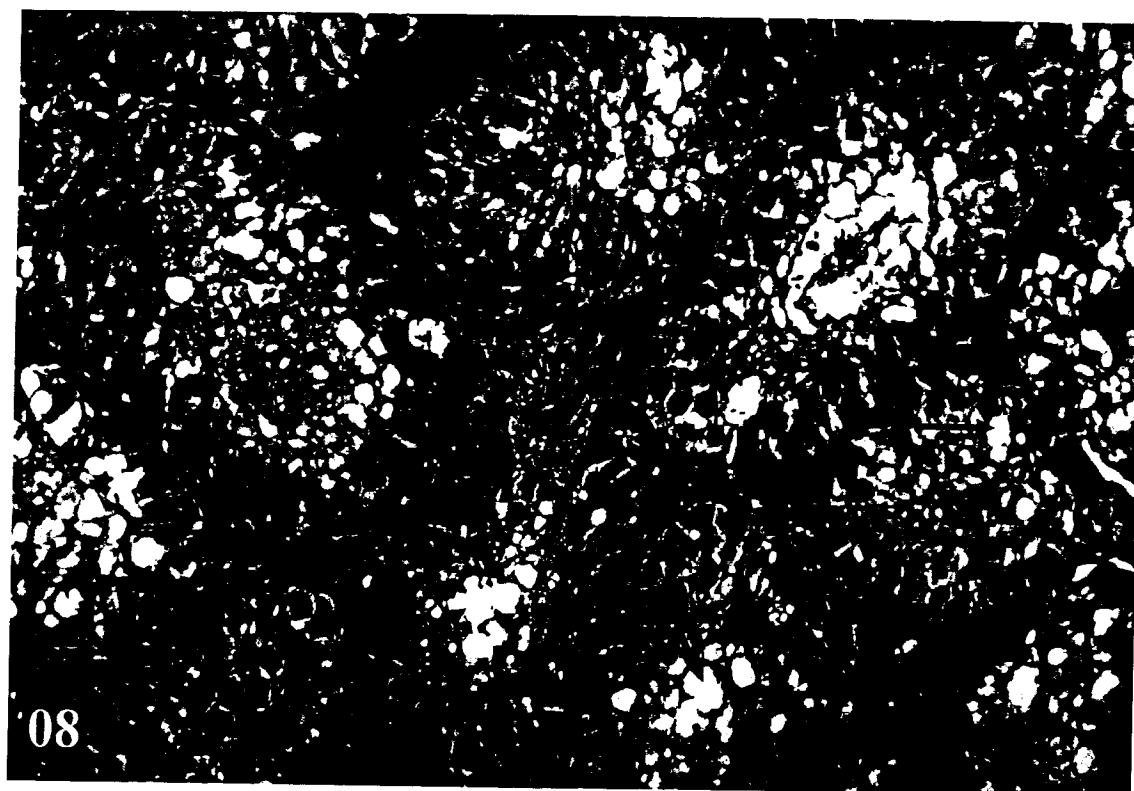
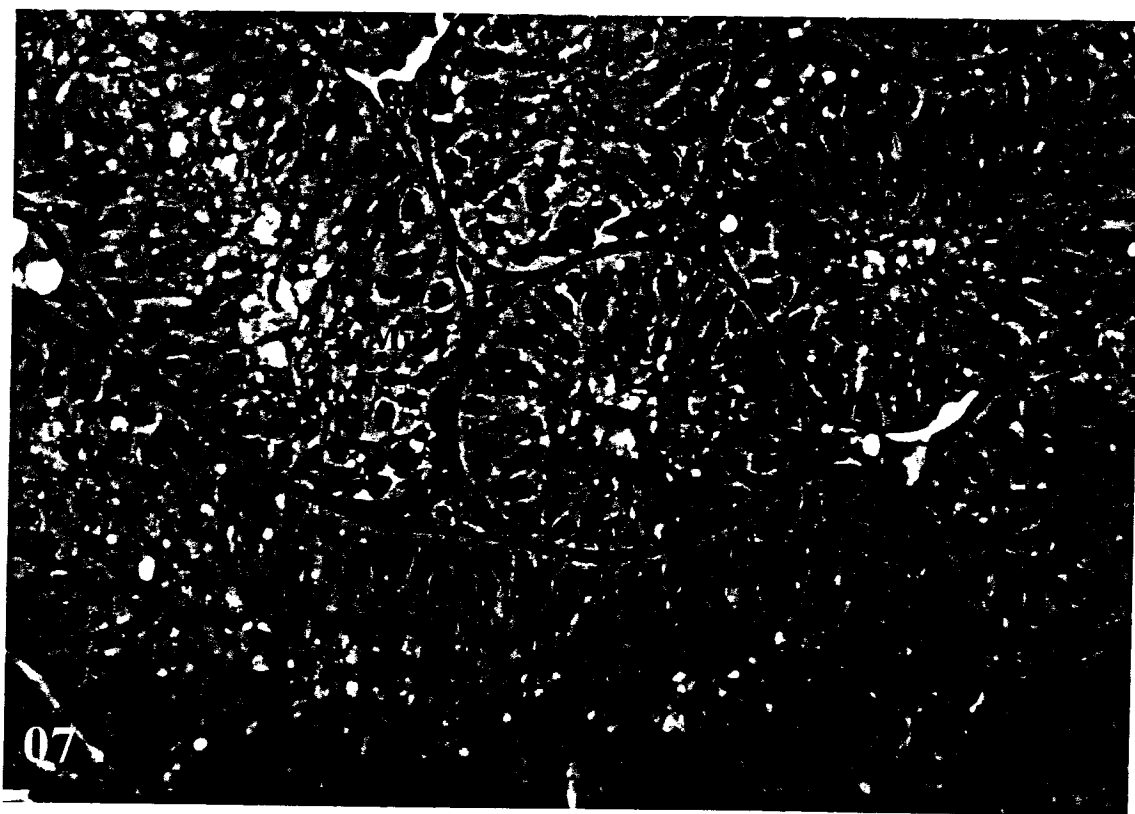
* Significativo: $P < 0.001$

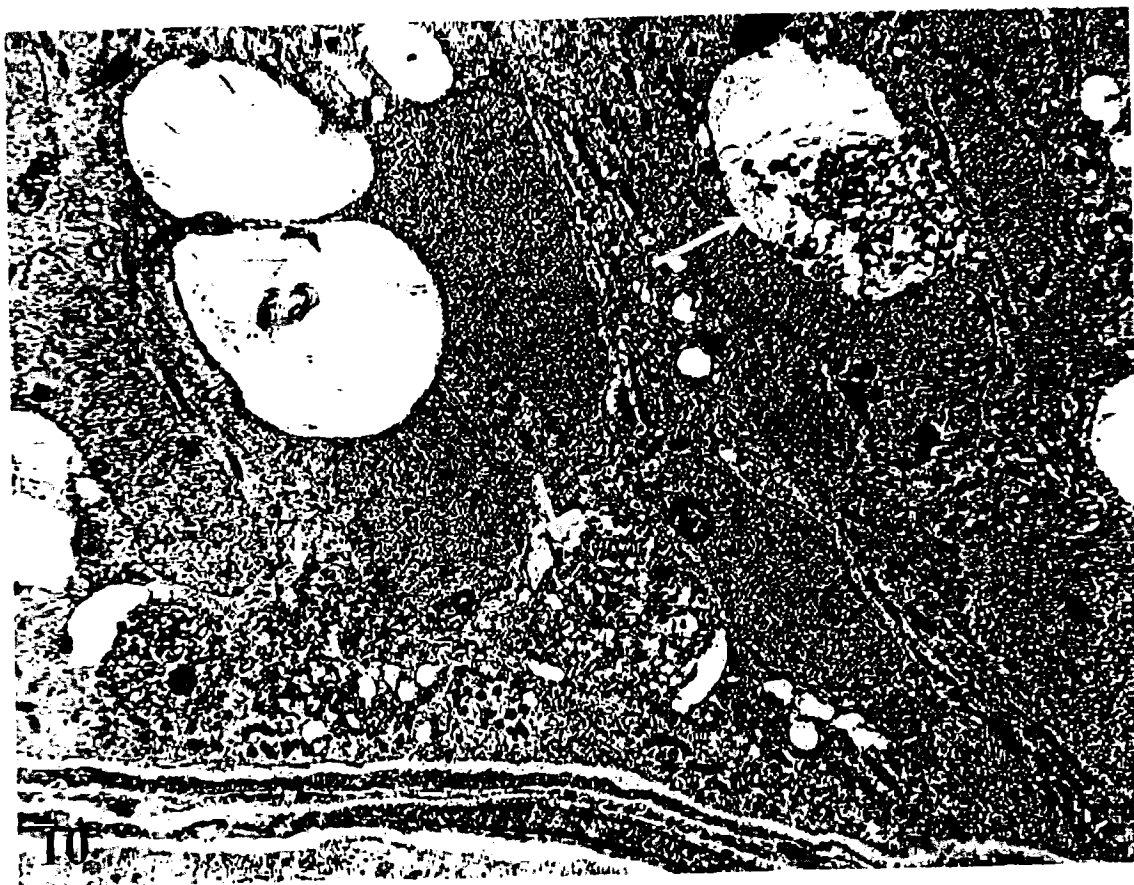
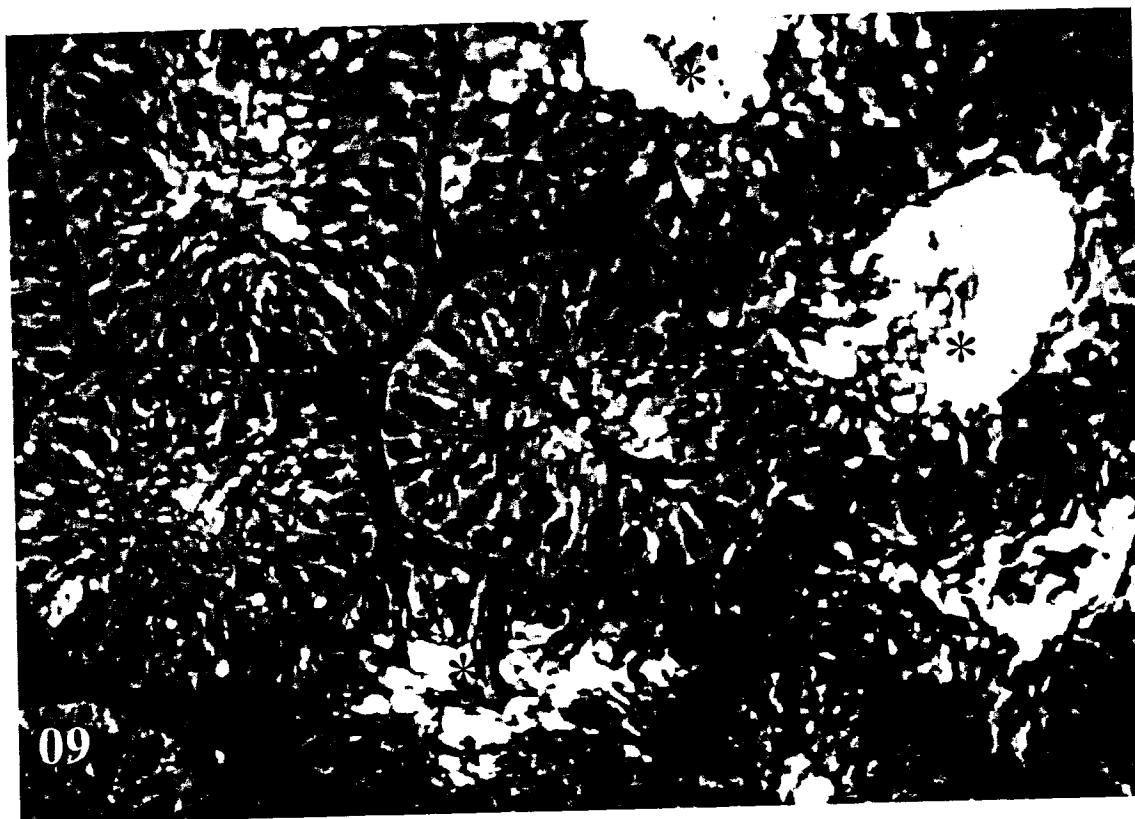
8. Documentação fotográfica

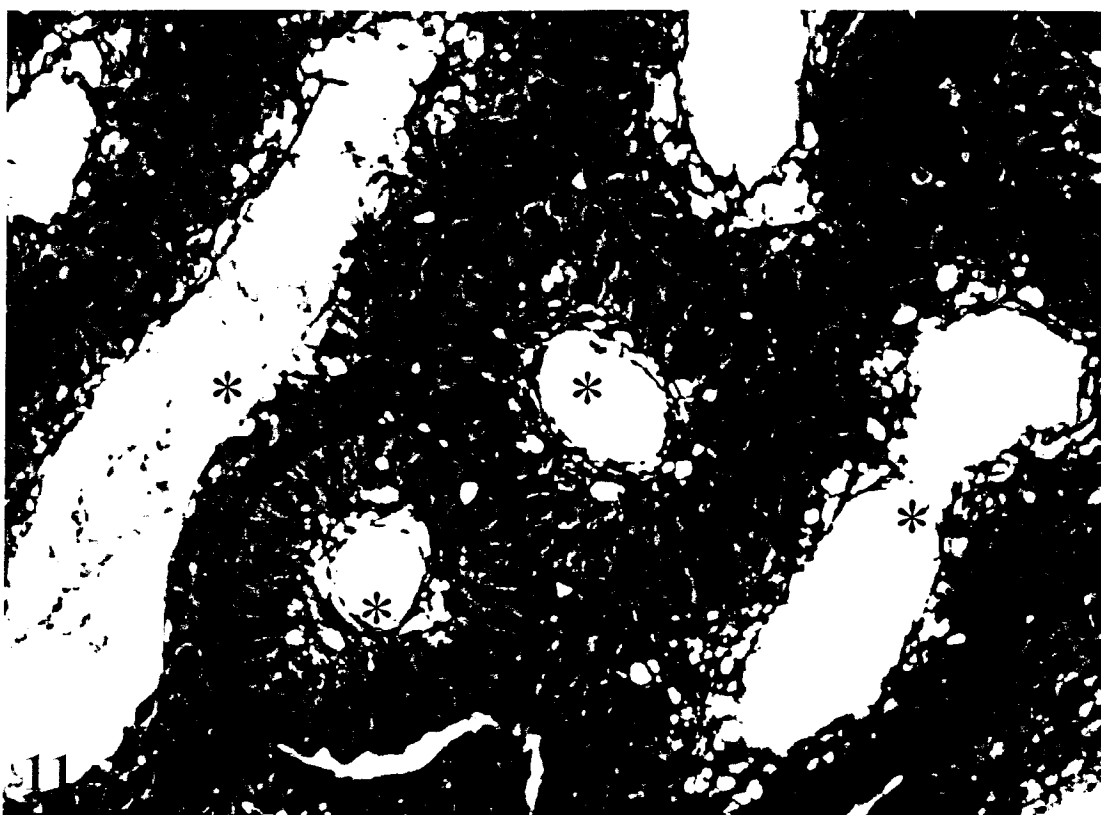


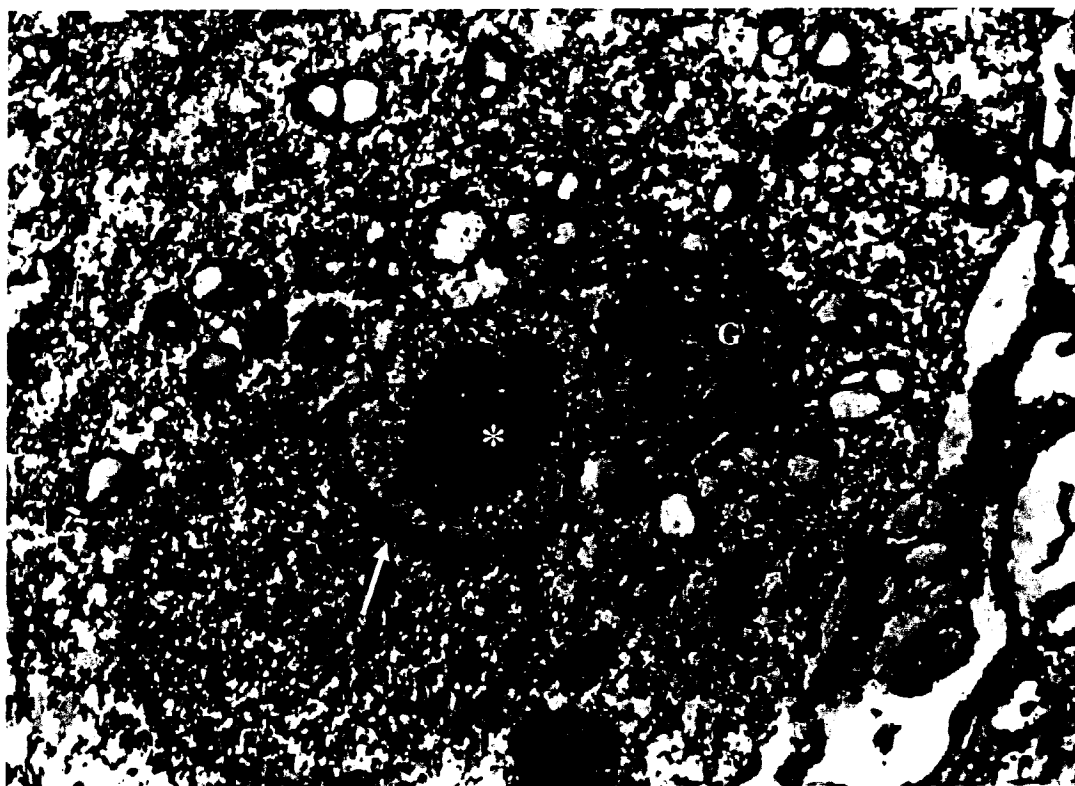
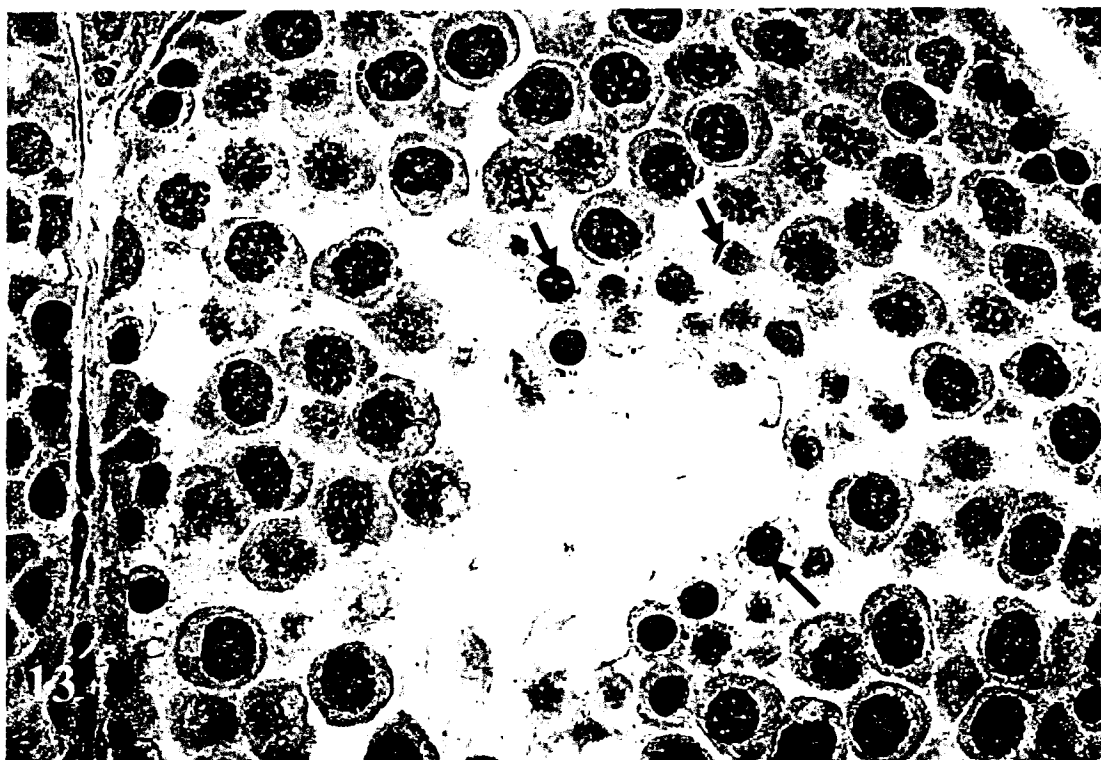


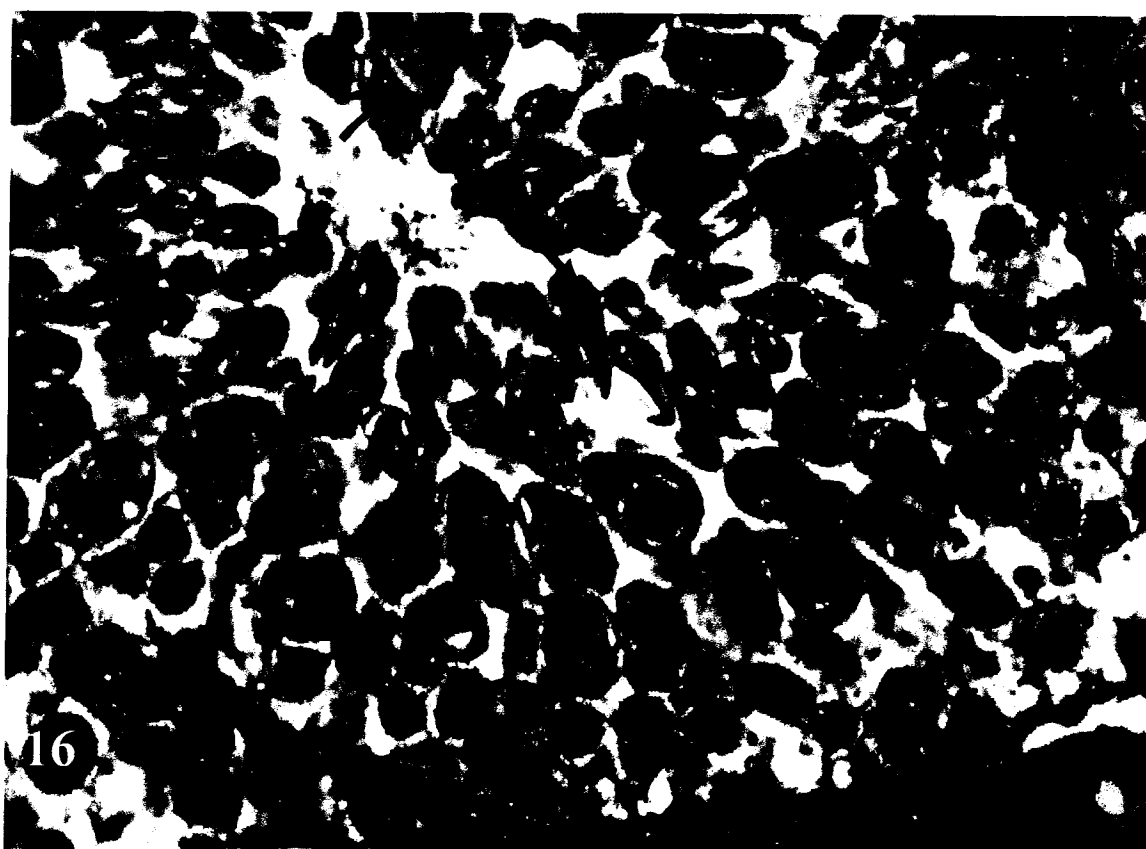
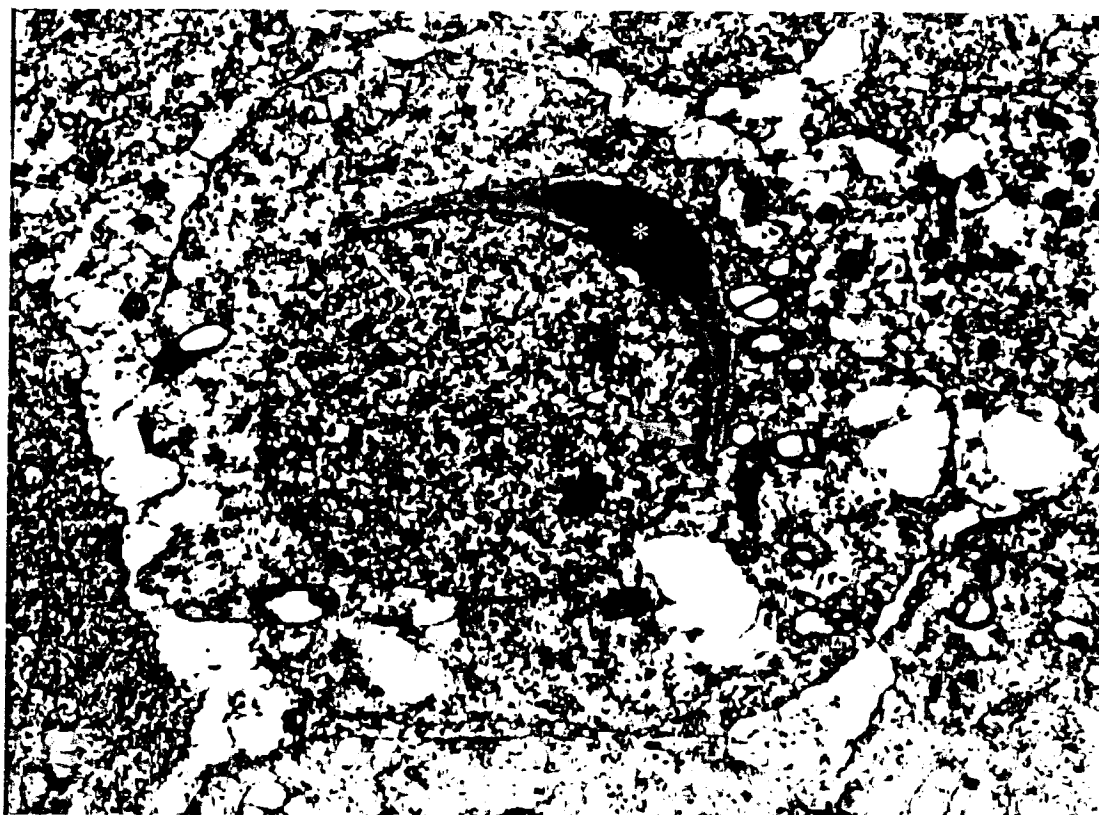


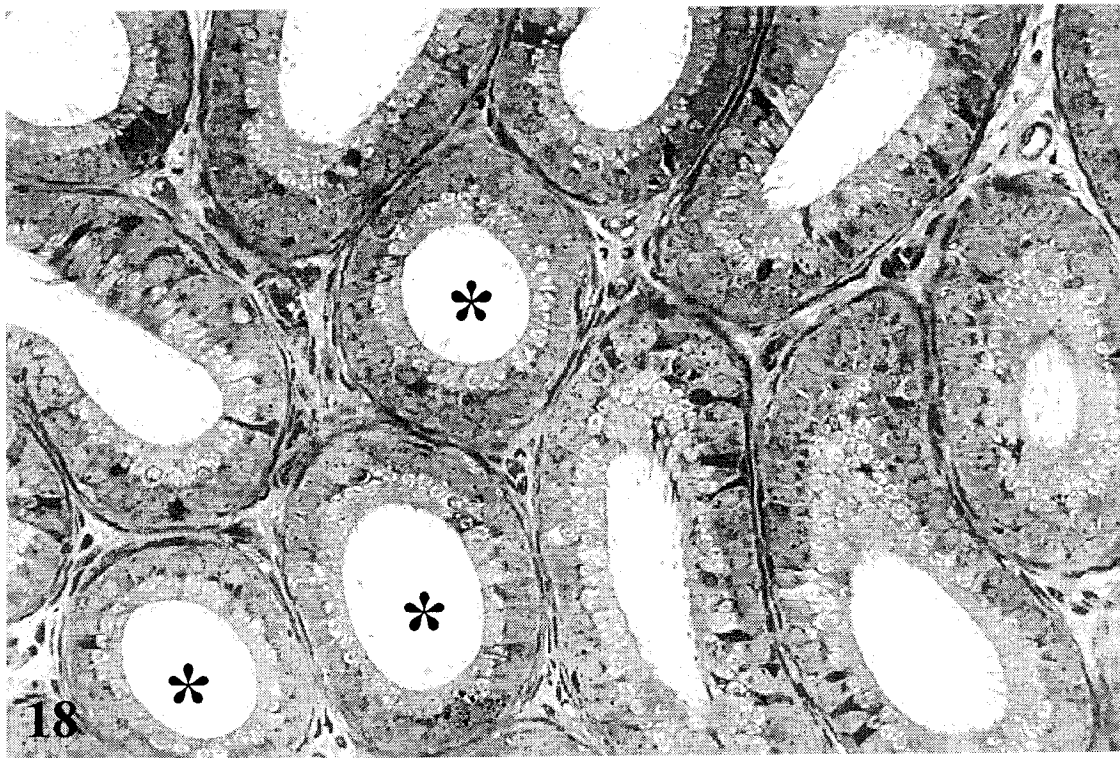
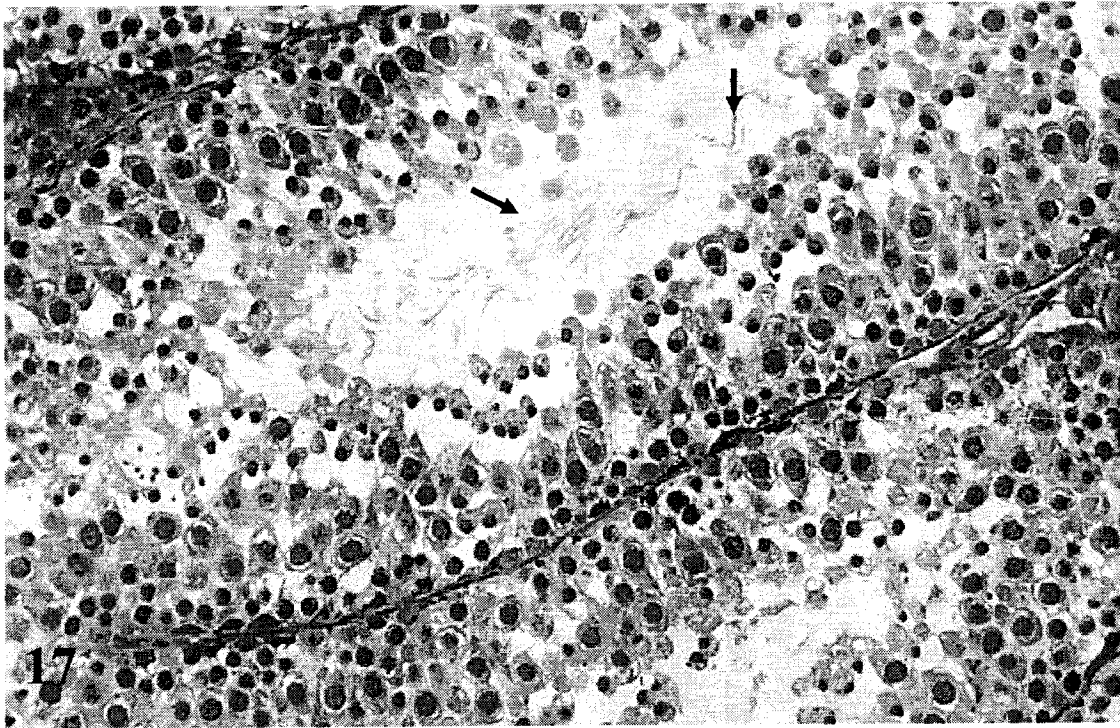


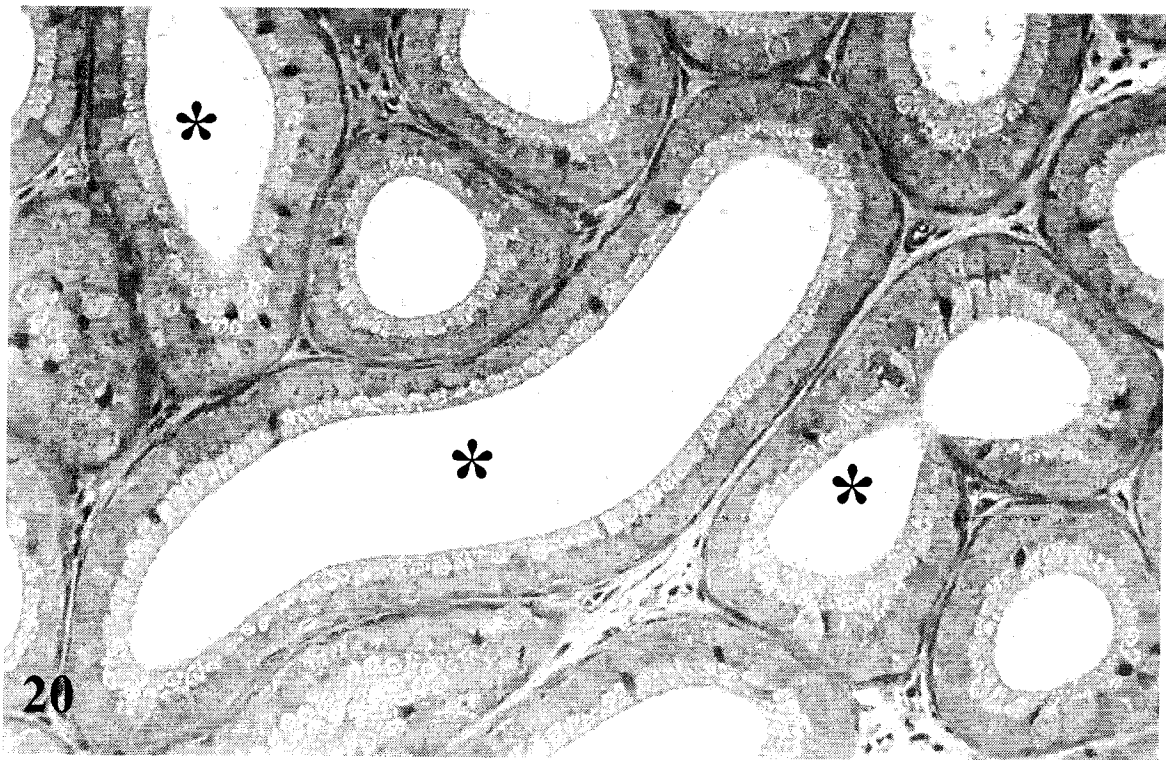
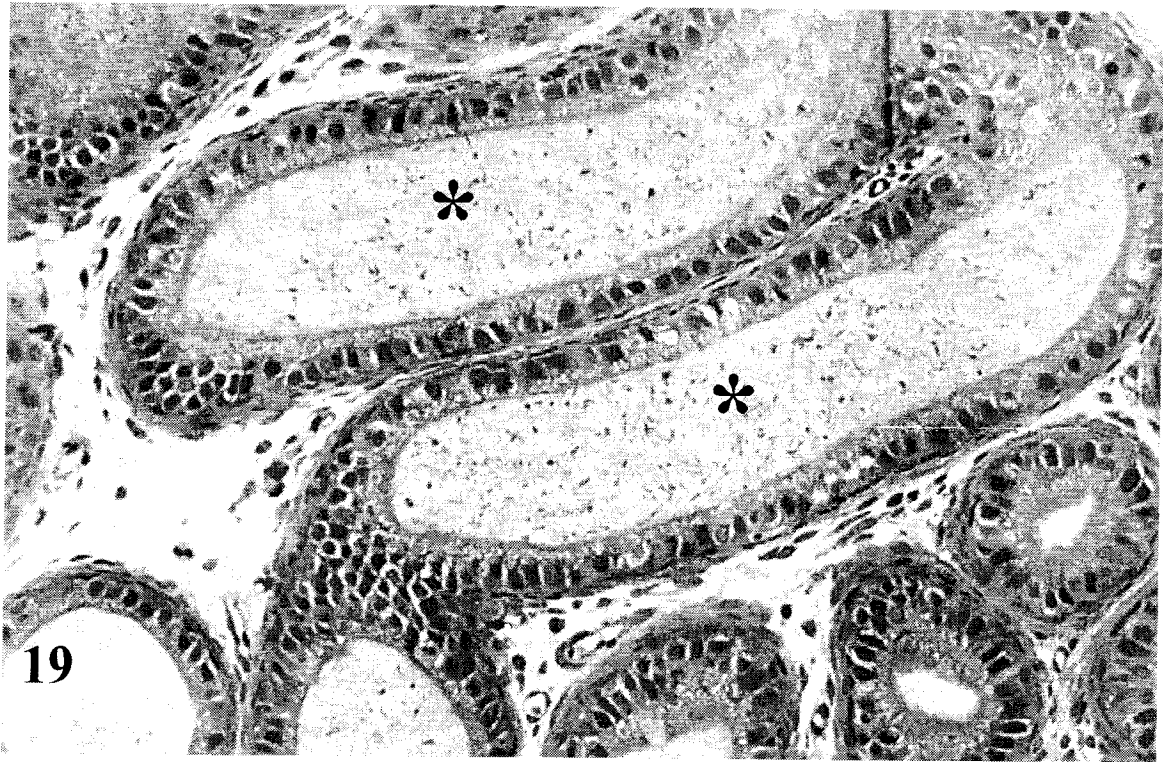


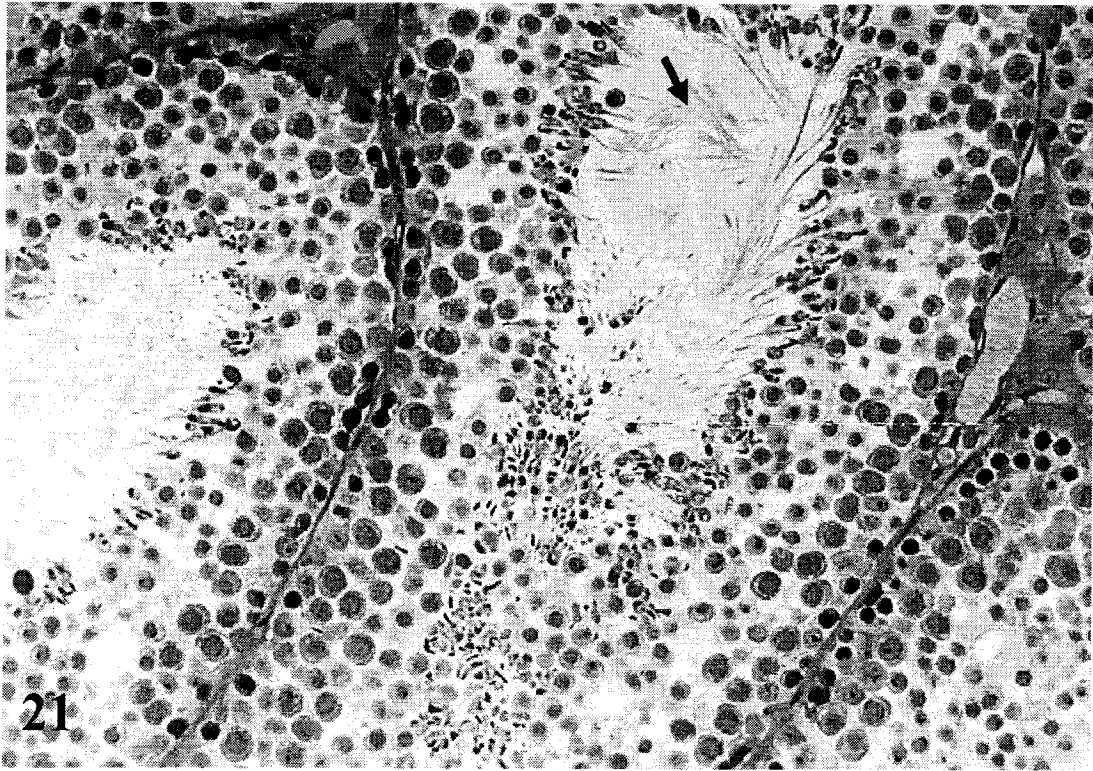














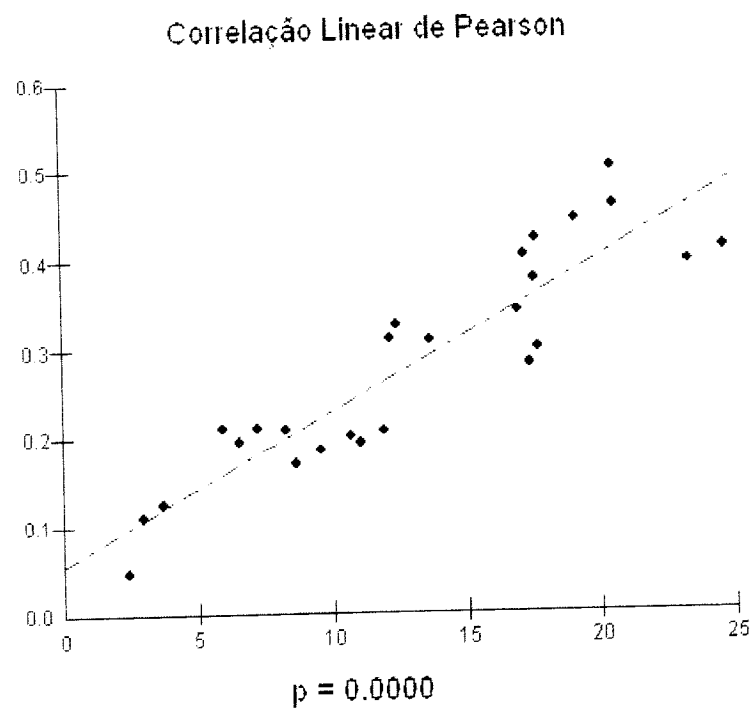


Figura 24: Correlação entre peso testicular e peso corporal em *C. callosus* para diferentes idades

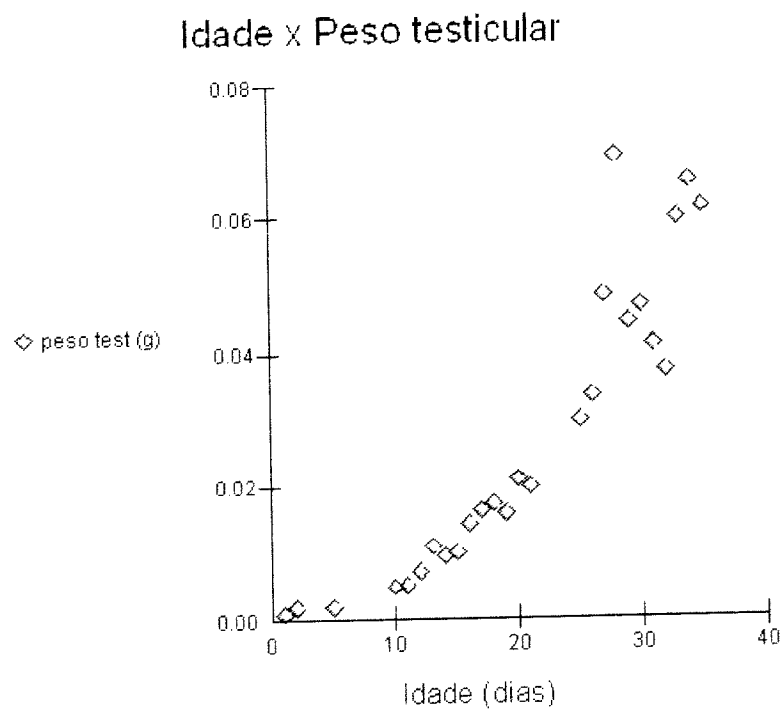


Figura 25: relação de crescimento de peso testicular com a idade em *C. callosus*

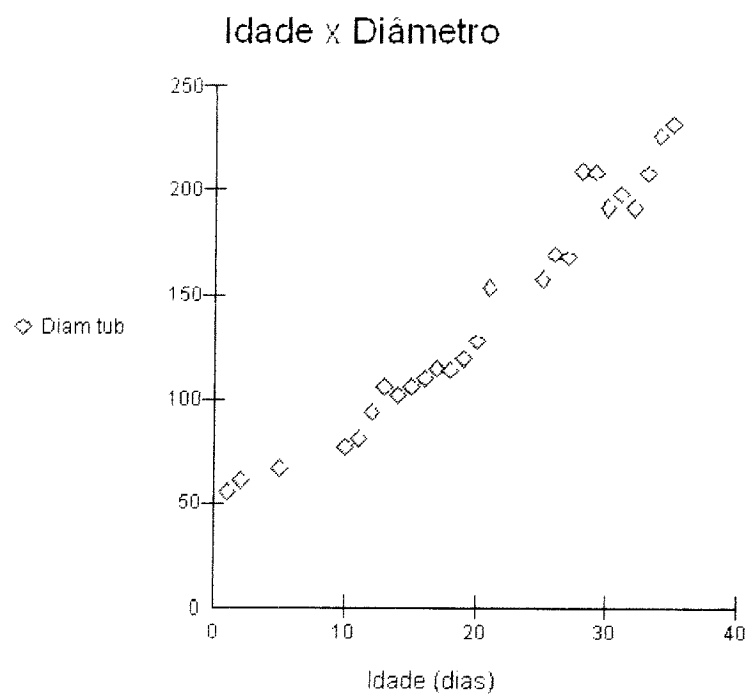


Figura 26: relação entre idade X diâmetro dos túbulos em *C. callosus*.

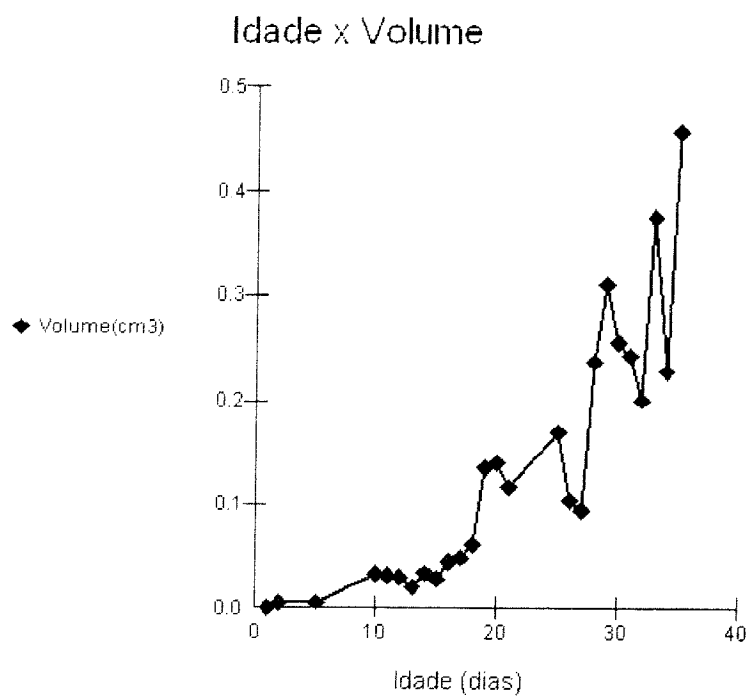


Figura 27: relação de aumento de volume com a idade em *C. callosus*.

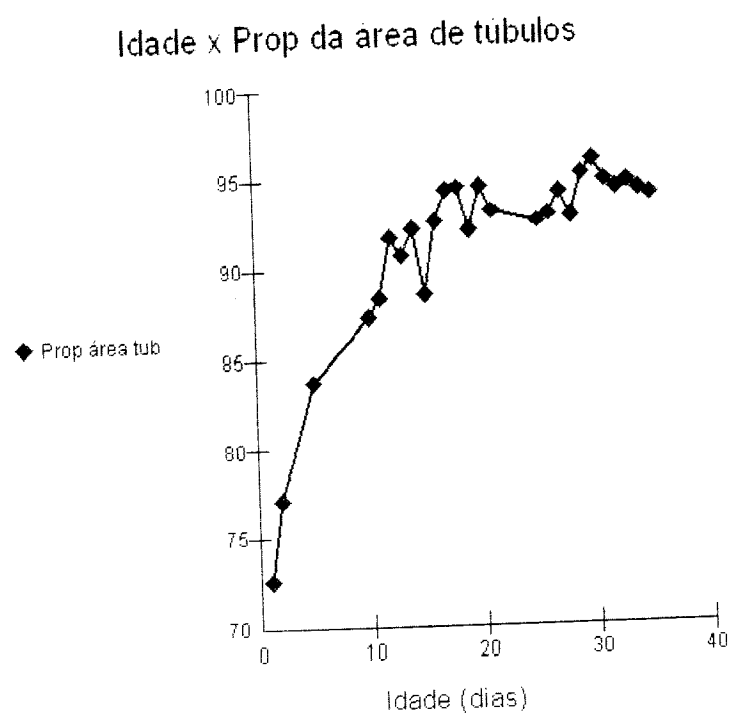
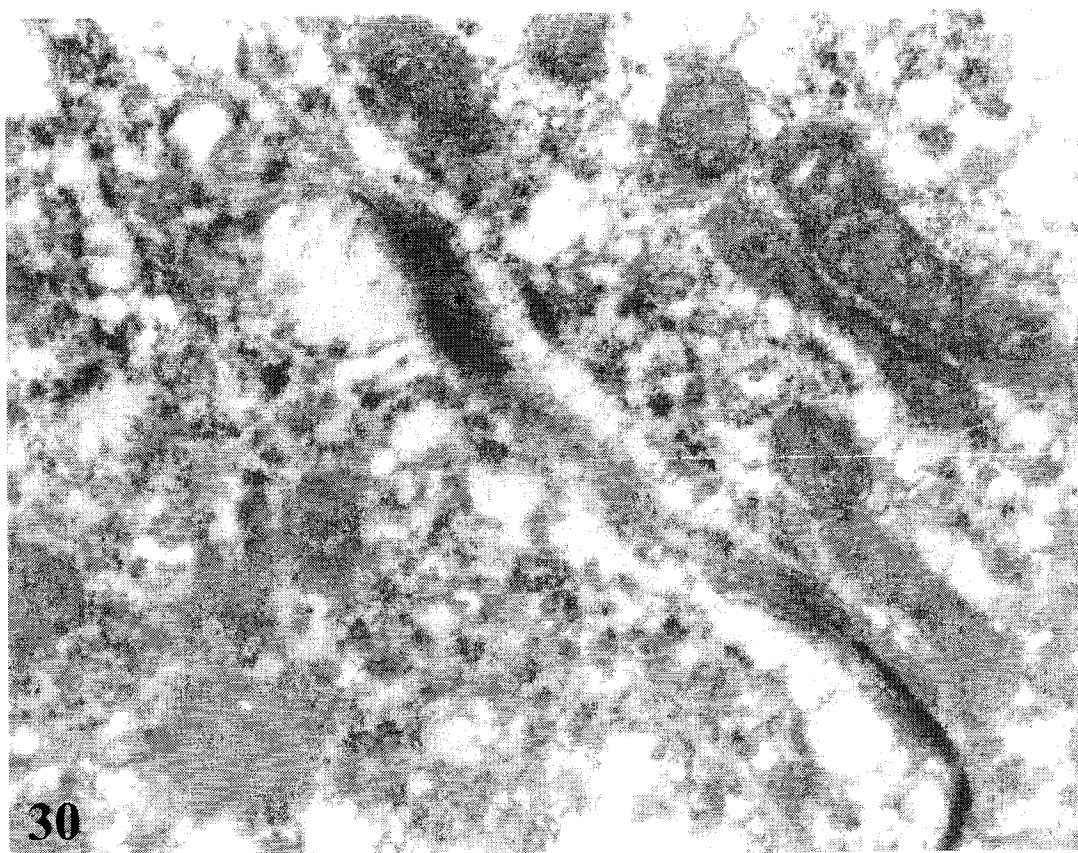
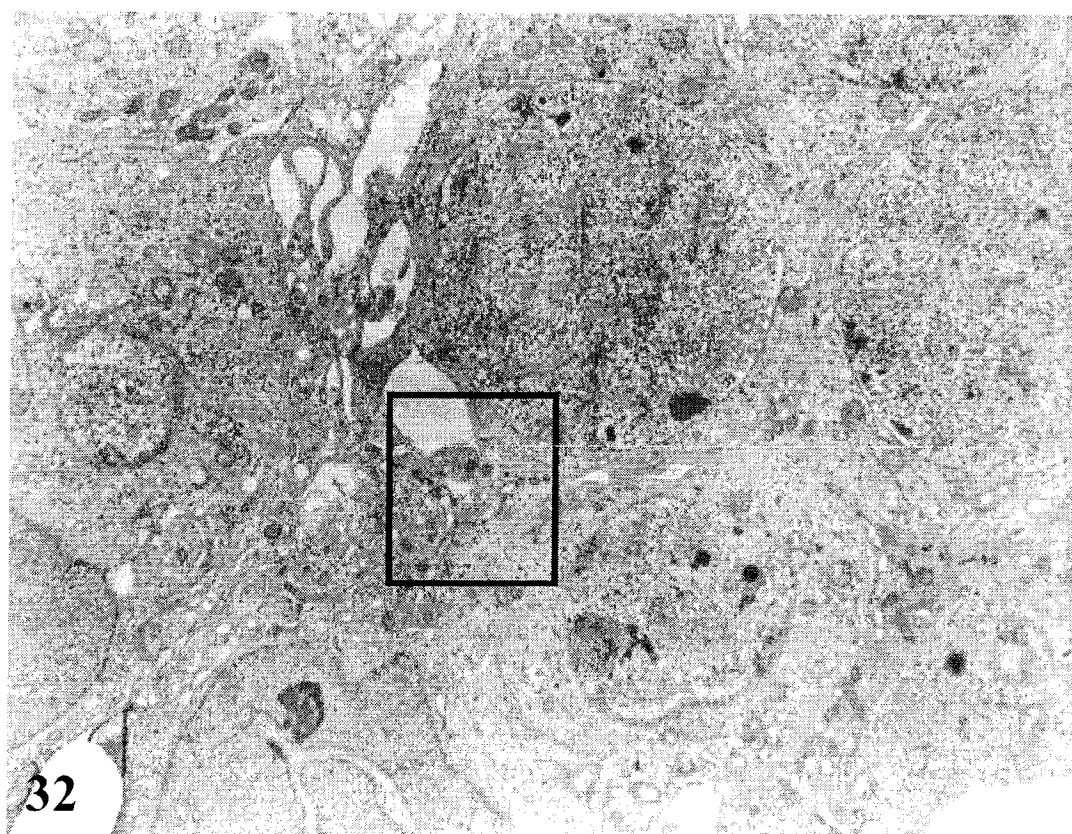
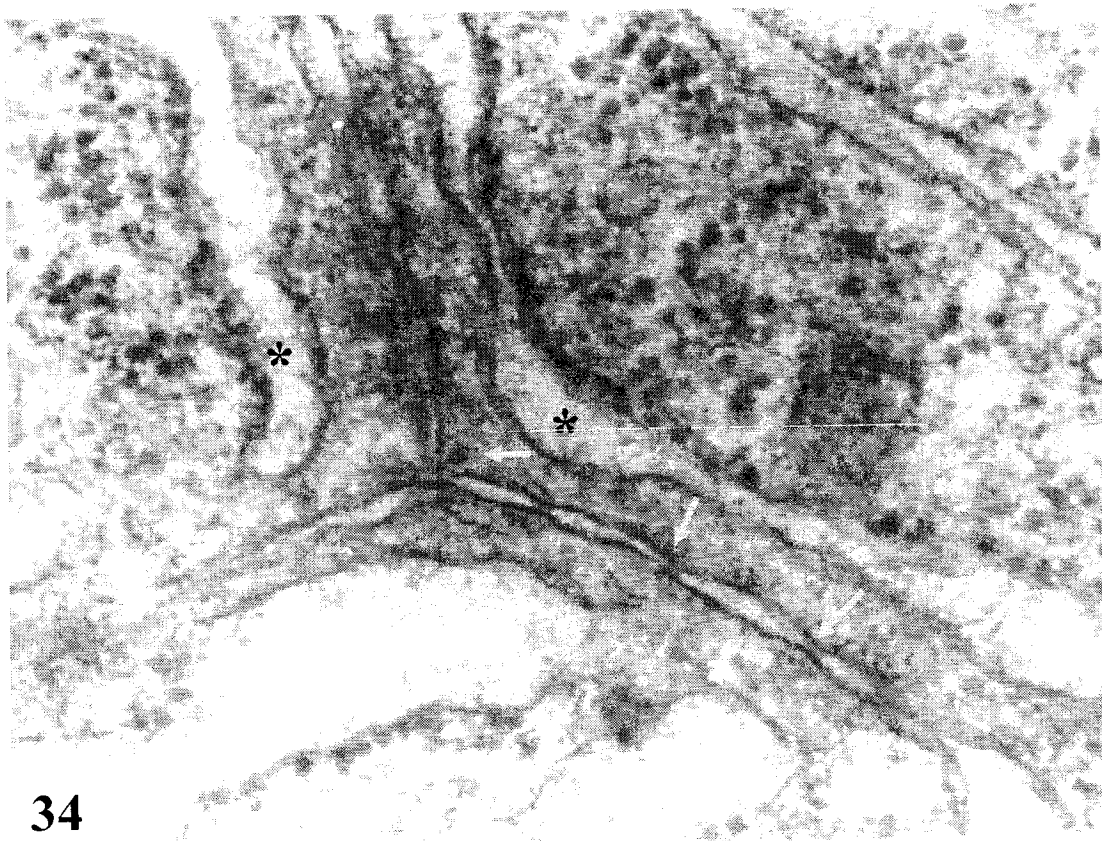
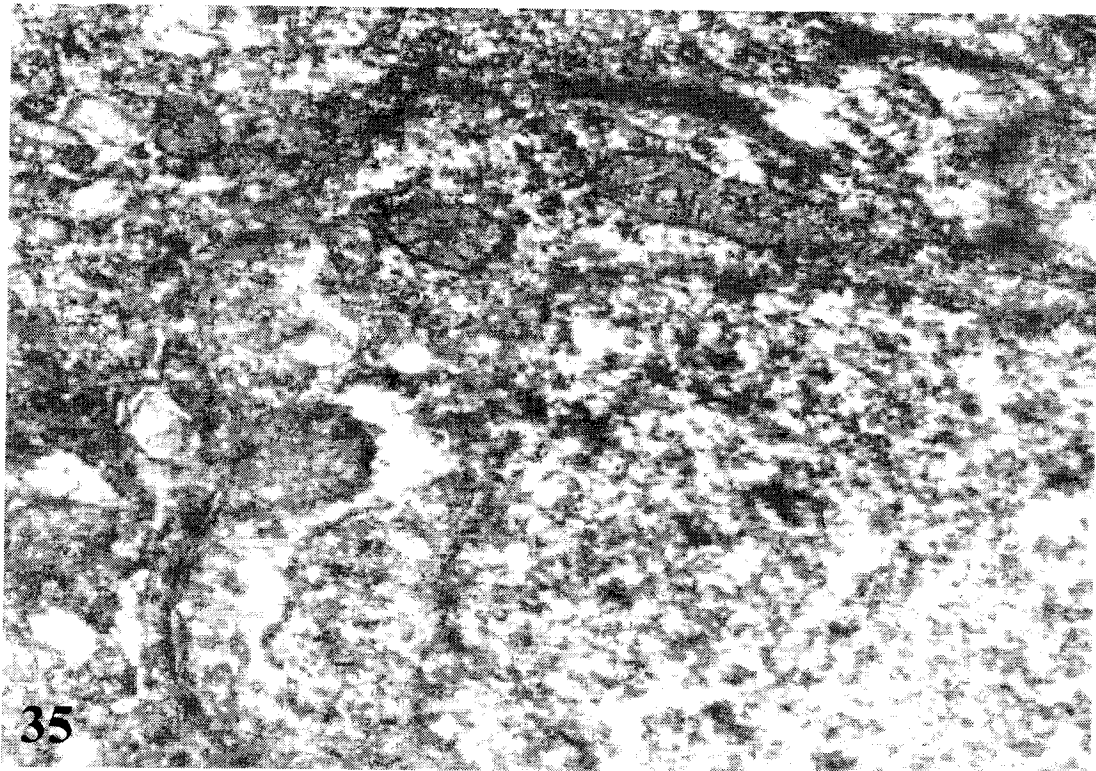


Figura 28: relação da área correspondente aos túbulos seminíferos com a idade em *C. callosus*.









9. Referências Bibliográficas*

ADAMS, C. L.; NELSON, W. J. Cytomechanics of cadherin - mediated cell - cell adhesion. **Curr. Opin. Cell. Biol.**, v. 10, p. 572-577, 1998.

AMANN, P. P. A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristics. **Journal of Andrology**, v. 2, p. 37-58, 1981.

ATTAL, J.; COUROT, M. D. Développement testiculaire et établissement de la spermatogénèse chez le taureau. **Annales De Biologie Animale, Biochimie, Biophysique**, v. 03, p. 219-241, 1963.

BEHNER, O. A.; TOLOSA, E. M.; NETO, A. G. F. **Manual de Técnicas para Histologia normal e patológica**. São Paulo: EDART, p. 239, 1976.

BERGMANN, M.; DIERICH, R. Postnatal Formation of the Blood-Testis Barrier in the Rat with Special Reference to the Initiation of Meiosis. **Anatomic and Embryology**, v. 168, p. 269-275, 1983.

BERGMANN, M.; SCHINDELMEISER, J. Development of the blood testis barrier in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). **International Journal of Andrology**, v. 10 (2), p. 482-488, 1987.

* *Elaborada segundo SILVA, A. M.; PINHEIRO, M. S. F. & FREITAS, N. E.; **Guia para normalização de Trabalhos Técnico-científicos: projetos de pesquisa, monografias, dissertações e teses**. Uberlândia: EDUFU, p. 165, 2002.

CHENG, C. Y.; MRUK, D. D. Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development. **Physiological Reviews**, v. 82 (4), p. 825-874, 2002.

CLERMONT, Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. **Physiological Reviews**, v. 52, p. 198-235, 1972.

CORMACK, D. H. **Ham Histologia**, 9^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 570, 1991.

CONNELL, C. J. Afreeze-fracture and lanthanum tracer study of the complex junction between Sertoli cells of the canine testis. **Journal of Cell Biology**, v. 76, p. 57-75, 1978.

DACHEUX, J. L.; GATTI, J. L.; DACHEUX, F. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. **Microscopic Research and Technique**, v. 61, p. 7-17, 2003.

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.

DYM, M.; CAVICCHIA, J. C. Further observations on the blood-testis barrier in monkeys. **Biology of Reproduction**, v.17, p. 390-403, 1977.

DYM, M. The Male Reproductive System. In: WEISS, L. **Histology: Biology of Reproduction**, 5^a ed. New York: Elsevier Biomedical, p. 1000-1053, 1983.

EKWALL, H.; JANSSON, A.; SJOBERG, P.; PLOEN, L. Differentiation of the rat testis between 20 and 120 days of age. **Archives of Andrology an International journal**, v. 13, p. 27-36, 1984.

FAWCETT, D. W.; LEAK, L. V.; HEIDGER, P. M. Electron microscopic observations on the structural components of the blood-testis barrier. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 10 (Suppl.), p.105-122, 1970.

FLICKINGER, C. J.; FAWCETT, D. W. Functional specializations of the Sertoli cells in the seminiferous epithelium. **Anatomical Records**, v. 158, p. 207-222, 1967.

FRANÇA, L. R.; CARDOSO, F. M. Duration of spermatogenesis and sperm transit time through the epididymis in the piau boar. **Tissue & Cell**, v. 30 (5); p. 573-582, 1998.

FRANÇA, L. R.; GODINHO, C. L. Testis Morphometry, Seminiferous Epithelium Cycle Length, and Daily Sperm Production in Domestic Cats (*Felis catus*). **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 1554-1561, 2003.

FRANÇA, L. R.; AVELAR, G. F.; ALMEIDA, F. F. L. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. **Theriogenology**, v. 63, p. 300-318, 2005.

GABRIEL, M. N.; LU, J. J.; HERMANIS, G.; ZHU, C.; SETCHEL, B. P. Expression of a blood-brain barrier-specific antigen in the reproductive tract of the male rat. **Reproduction-Cambridge**, v.123 (3), p.389-397, 2002.

GODINHO, H. P.; CARDOSO, F. M. Desenvolvimento sexual de porcos Yorkshire. II. Estabelecimento e evolução da espermatogênese. **Arquivos da Escola Superior de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais**, v. 31 (3), p. 351-361, 1979.

GONDOS, B. & KOGAN, S. J. Testicular development during pubert. In: RUSSEL, L. D. & GRISWOLD, M. D. **The Sertoli Cell**. Clearwater: Cache River Press, p. 115-154, 1993.

HERSHKOVITZ, P.; Evolution of neotropical Cricetinae rodents (Muridae) with special reference to the phylotine group. **Fieldiana Zoology**, v. 46, p. 1-524, 1962.

HOLSTEIN, A. F.; SCHULZE, W.; DAVIDOFF, M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1 (107), p.1-16, 2003.

IBARGUENGOYTIA, N.R.; PASTOR, L. M.; PALLARES, J. A light microscopy and ultrastructural study of the testes of tortoise *Testudo graeca* (Testudinidae). **Journal of Submicrosc. Cytol. Pathol.** v.31 (2), p. 221-230, 1999.

ICZKOWSKI, K. A.; SUN, E. L.; GONDOS, B. Morphometric Study of the Prepubertal Rabbit Testis: Germ Cell Numbers and Seminiferous Tubule Dimensions. **The American Journal of Anatomy**, v. 190, p. 266-272, 1991.

JONES, R. T. The blood-germ cell barrier in male *Schistocerca gregaria* the time of its establishment and factors affecting its formation. **Journal of Cell Science**, v. 31, p. 145-163, 1978

JUNQUEIRA, L. C. & CARNEIRO, J.; **Histologia Básica**. 10ª ed. São Paulo: Guanabara Koogan, p.415-431, cap. 21: Aparelho Reprodutor Masculino, 2004.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde – glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 18, p. 208–213, 1963.

KNOBIL, E.; NEILL, J.D. **The physiology of reproduction**, 2^a ed. New York: Raven Press; p. 1363-1434, 1994.

LANE, N. J.; SKAER, H. L. Intercellular junctions in insect tissues. **Advances In Insect Physiology**, v.15, p. 35-213, 1980.

LEVY, S.; SERRE, V.; HERMO, L.; ROBAIRE, B. The effects of aging on the seminiferous epithelium and the blood-testis barrier of the Brown Norway rat. **Journal of Andrology**, v. 20 (30), p. 356–365, 1999.

MACKINNON, P. C. B.; PUIG-DURAN, E.; LAYNES, R. Reflections on the attainment of puberty in the rat: have circadian signals a role to play in its onset? **Journal of Reproduction and Fertility**, v.52, p. 401-12, 1978.

MASSOIA, E.; FORNES, A. Nuevos datos sobre la morfologia, distriduicion geografica y etoecologia de *Calomys callosus* (Rengger) (Rodentia-cricetidae). **Physis**, v. 25, p. 325, 1965.

MELLO, D. A.; Roedores silvestres de alguns municípios do Estado de Pernambuco e suas regiões naturais. **Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas**, v. 2, p. 360-362, 1969.

MELLO, D. A. Biology of *Calomys callosus* (Rengger, 1830) under laboratory conditions (Rodentia, Cricetinae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 38 (4), p. 807–811, 1978.

MELLO, D. A. & MOOJEN, L.; Notas sobre uma coleção de roedores e marsupiais de algumas regiões do cerrado do Brasil Central. **Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas**, v. 12, p. 287-291, 1979.

MOOJEN, F.; Os roedores do Brasil, Instituto Nacional do Livro, **Biblioteca Científica Brasileira, Série A-II**, 1952.

MIRAGLIA, S. M.; HAYASHI, H.; GOLDFEDER, E. M. Histomorfometria dos testículos de retos albino normais em várias idades. **Revista Brasileira de Ciências morfológicas**, v. 07 (1), p. 8-15. 1990.

MERCHANT-LARIOS, H.; MORENO-MENDOZA, N. Onset of sex differentiation: dialog between genes and cells. **Archives of Medical Research**, v: 32, p. 553-558, 2001.

NAGANO, T. SUZUKI, F. Freeze fracture obsercations on the intercellular junctions of Sertoli cells and of Leydig cells in human testis. **Cell and Tissue Research**, v. 166, p. 37-48, 1976.

ORSI, A. M.; FERREIRA, A. L. Reexame dos processos das espermatogêneses em mamíferos, principalmente em rato e gambá. **Ciência e Cultura**; v. 30, p. 65-69, 1978.

ORTAVANT, R. COUROT, M.; HOCHEREAU-DE REVIERS, M. T. Spermatogenesis in domestic mammals. In: COLE, H. H.; CUPPS, P. T. eds. Reproduction in domestic animals. 3ª ed. **New York Academic Press**, cap. 8, p. 203-227, 1977.

PELLETIER, R. M., BYERS, S. W. The blood-testis barrier and Sertoli cells junctions: structural consideratins. **Microscopic Research and Technique**, v. 20, p. 3-33, 1992.

PELLETIER, R. M. OKAWARA, Y., VITALE, M. L., ANDERSON, J. M. Diffferential distributionof the tight junction associated protein ZO-1 $\alpha(+)$ and $\alpha(-)$ isoforms in guinea pig Sertoli cells: a possible association with F-actin an G- actin. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 367-376, 1997.

PETTER, F.; KARIMI, Y.; ALMEIDA, C. R. Un nouveau rongeur de laboratoire, le Cricetidé *Calomys callosus*. **Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De L Academie Des Sciences**, v. 265, p. 1974-1967.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrato at high ph as on electron opaque stain in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 18, p. 208-213, 1963.

ROBINSON, R. A. & STONES, R. H. **Eletrolyte solutions**, 2ª ed. London: Butterworths, 1970.

ROSS, M. H.; ROWRELL, L. J. **Histologia: Texto e Atlas**. São Paulo: Panamericana, p. 779, cap. 21: Sistema Genital Masculino, 1993.

ROOSEN-RUNGE, E. C.; GIESEL Jr., L. O. Quantitative studies on spermatogenesis in the albino rat. **American Journal of Anatomy**, v. 87 (1), p. 1-30, 1950.

RUGH, R. **The Mouse: its Reproduction and Development**. Minneapolis: Burgess Publishing Company, p. 430, 1967.

RUSSELL, L. D. Movement of spermatocytes from the basal to the abluminal compartment of the rat testis. **American Journal of Anatomy**, v. 148, p. 313-328, 1977.

SILVA, M. **Morfologia ultra-estrutural do testículo, cinética da espermatogênese e barreira hemo testicular de Tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (Peixe, Ciclideo) – Belo Horizonte** (Dissertação de doutorado – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de Minas Gerais), 1987.

SILVA, M.; FERRO, E. A. V.; BERBERT-FERREIRA, M. Cycle of the seminiferous epithelium in *Calomys callosus* (Cricetidae, Rodentia). **In: IX Congresso Brasileiro de Biologia Celular**, 1996, Caxambu. MG, v. 1, p. 123-123, 1996.

STEIBERGER, A.; STEIBERGER, E. Replication pattern of Sertoli cells in maturing rat testis in vivo and organ culture. **Biology of Reproduction**, v. 4, p. 84-87, 1971.

SUN, E. L.; GONDOS, B. Formation of the blood-testis barrier in the rabbit. **Cell and Tissue Research**, v. 243, p. 575-578, 1986.

THOMAS, U. P.; RAJA, C. K. S. V. Postnatal development of testis and epididymis of Large White Yorkshire boars. **The Journal of veterinary medical**, v. 11 (2), p. 277-286, 1980.

VERGOUWEN, R. P. F. A.; HUISKAMP, R.; BAS, J. R.; ROEPERS-GAJADIEN, H. L.; DAVIDS, J. A. G.; ROOIJ, D. G. Postnatal development of testicular cell populations in mice. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 99, p. 479-485, 1993.

VITALE, R. D.; FAWCETT, D. W.; DYM, M. The normal development of the blood testis barrier and the effects of chlormiphen and estrogen treatment. **Anatomic Record**, v. 176, p. 333-344, 1973.

XIE, Q.; MACKAY, S.; ULLMANN, S. L.; GILMORE, D. P. PAYNE, A. P. **Journal of Anatomy**, v. 189, p. 393-406, 1996.

WATSON, M. N. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. **Journal Biophysical Biochemical Cytology**, v. 4, p. 475 – 478, 1958.

WING, T. Y.; CHRISTENSEN, A. K. Morfometric studies on rat seminiferous tubules. **American Journal of Anatomy**, v. 165, p. 13-25, 1982.

YAO, H. H.; TILMANN, C.; ZHAO, G.Q; CAPEL, B. The battle of the sexes: opposing pathways in sex determination. **Novartis Found Symp**, v.244, p.187-198, 2002.