

CAMILA MARIANGELA PACHECO

EFEITO DO HIPOTIREOIDISMO TRANSITÓRIO INDUZIDO PELO 6-N-PROPIL-2-TIOURACIL (PTU) SOBRE O TESTÍCULO DE RÃ-TOURO (*LITHOBATES CATESBEIANUS*)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

P116e
2013 Pacheco, Camila Mariangela, 1986-
Efeito do hipotireoidismo transitório induzido pelo
6-n-propil-2-tiouracil (PTU) sobre o testículo de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) / Camila Mariangela Pacheco. –
Viçosa, MG, 2013.

xi, 59 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Sergio Luis Pinto da Matta.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Rã-touro. 2. Hipotireodismo. 3. Sertoli, Células de.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Biologia
Geral. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal.
II. Título.

CDD 22. ed. 597.892

CAMILA MARIANGELA PACHECO

EFEITO DO HIPOTIREOIDISMO TRANSITÓRIO INDUZIDO PELO 6-N-PROPIL-2-TIOURACIL (PTU) SOBRE O TESTÍCULO DE RÃ-TOURO (*LITHOBATES CATESBEIANUS*)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Aprovada: 27 de setembro de 2013.

Ita de Oliveira e Silva

Ana Paula de Lima Florentino Matta

Sérgio Luis Pintoda Matta
(Orientador)

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos
não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”*

Madre Teresa de Calcutá

*“É melhor tentar e falhar, a preocupar-se e ver a vida passar.
É melhor tentar ainda que em vão, a sentar-se nada fazendo até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar, do que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver”*

Martin Luther King

Dedico esse trabalho à base da minha vida:

aos meus pais, Hildon e Irma;

aos meus irmãos, Willian e Marina;

ao meu namorado, Samuel.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho não seria possível, se não pela ajuda de muitas pessoas das quais sou imensamente grata.

Agradeço a Deus por sempre me abençoar, traçando um lindo caminho para mim, me permitindo alcançar meus objetivos.

Agradeço aqueles que plantam alegria em meu coração: meus pais, Hildon e Irma; meus irmãos, Willian e Marina; e ao meu namorado, Samuel. Eles que me fazem muito feliz, que me apoiam, que transformaram essa etapa em um momento menos denso. A eles agradeço por sempre e incondicionalmente acreditarem em mim. Portanto,

Agradeço aos meus pais, Hildon e Irma, pela essência da vida, o amor. Agradeço por sonharem junto comigo, pelo abraço apertado e sorriso evidente. Agradeço por segurarem a minha mão, por me indicarem o caminho e dizerem “vai em frente” quando era difícil de acreditar que era aquela a direção a seguir. A vocês, agradeço pela IMENSA dedicação, pelo que sou, pelo amor. Os ensinamentos de vocês foram uma condição para eu seguir a diante com o sorriso no rosto!

Agradeço aos meus irmãos, Willian e Marina, pelo carinho constante, pelos sorrisos iluminados, pela alegria dividida, pelo incentivo durante essa caminhada. Agradeço por sempre terem cuidado de mim e me deixado forte para alcançar mais essa conquista.

Agradeço ao Samuel por alimentar a minha fé, por me apontar pra Deus a todo o instante, por esse amor tão constante, por ser um grande companheiro. Agradeço por colocar combustível em meus planos, por me apoiar, cuidar, incentivar e acreditar em mim em todos os momentos. Você torna as coisas tão mais simples e bela. Enfim, obrigada por me fazer muito feliz!

Agradeço aqueles que promovem a emancipação dos homens: os professores.

Agradeço ao meu orientador, Sérgio da Matta, por todo conhecimento transmitido, pela paciência com minhas ansiedades, pela confiança em mim depositada, pela credibilidade na realização desse projeto e pela persistência. Obrigada por me acolher tão bem e ajudar a superar minhas dificuldades. Você é um símbolo de sabedoria! Sou imensamente grata por toda ajuda e ensinamentos!

Agradeço à professora Mariana pelo acolhimento, pelo carinho, pelo companheirismo, pelo conhecimento transmitido e pelos estímulos nas atividades acadêmicas. Muito obrigada!

Agradeço aos professores constituintes do Laboratório de Biologia Estrutural, Adilson, Isabel, Juliana, Mariana e Sérgio, pelo apoio e disponibilidade em ensinar. Agradeço ao técnico do Laboratório desse laboratório, Matheus, pela disponibilidade e colaboração.

Aos professores do Departamento de Biologia Geral Animal, pelo conhecimento transmitido.

Aos amigos, parece redundante, agradeço pela amizade! Agradeço por se doarem, pelos ensinamentos, pelo carinho, pela lealdade, pelos sorrisos. Já foi dito que *“Quem caminha sozinho pode até chegar mais rápido, mas aquele que vai acompanhado dos amigos, com certeza vai mais longe”*. Tenho certeza que a finalização dessa etapa foi possível devido a vocês. Portanto, agradeço:

À Dayane, Nádia, Sarah e Talitha por terem corações tão receptivos, pelo carinho, pelas palavras doces e também pelas palavras de ensinamento, pela troca de experiência, por constituirmos essa relação tão fraternal. Adoro vocês!

À Susana por apostar em mim, por me inserir no Laboratório de Biologia Estrutural, pelas horas de aprendizado, pela convivência e pelo carinho!

À Gilda, Graziela, Mayra, Natália e Tatiana por me acolherem estruturalmente nessa fase final. Mas principalmente, por estabelecermos essa amizade tão verdadeira que me proporciona dias de alegria, momentos de compreensão e aprendizado. Com vocês construí uma aliança contra as dificuldades e quero guardar no meu coração! Adoro vocês!

Agradeço aos amigos do laboratório Ana Carolina, Graziela, Kyvia, Marli, Tatiana, Viviane e Susana pelos ensinamentos, paciência e colaboração no meu desenvolvimento e no desenvolvimento desse trabalho. Muito obrigada!

Agradeço às inúmeras pessoas que me ajudaram nesse trabalho; sem vocês seria muito difícil realizar um trabalho de tamanha extensão. Portanto, agradeço:

Ao Prof. Oswaldo por fornecer estrutura física para execução desse trabalho e conhecimento transmitido.

Aos técnicos do Ranário Experimental da UFV por toda colaboração para realização desse trabalho! Especialmente ao técnico José Antônio que tomou esse trabalho com “seu”. Este profissional colaborou desde a instalação elétrica para o experimento até a eutanásia das rãs, mesmo quando seu problema de coluna o dificultava a nos auxiliar. José Antônio você foi essencial para esse trabalho!!! Muito obrigada!

Ao Laboratório de Biologia Estrutural pelo suporte técnico na produção das lâminas, mas também pelos conhecimentos que os professores desse laboratório me passaram.

Àqueles que me ajudaram durante o período experimental no Ranário, principalmente durante a fase de manipulação dos girinos, Ana Carolina (Carol), Caio, Elizabeth, Isaac, José Antônio e Susana. Sem vocês esse trabalho não teria começado. Agradeço pela imensa disponibilidade!

À equipe da realização da eutanásia dos animais, Ana Carolina (Carol), Anna Carolina (Anninha), Kyvia, Lidiane, Marcela, Stéphanie, Susana e Tatiana. Obrigada pela colaboração.

Aqueles que colaboraram durante o processamento histológico Anna Carolina (Anninha), Elizabeth, Rose e Susana, por auxiliarem na elaboração do material permanente desse trabalho.

Agradeço as professoras Dr. Ana Paula de Lima Florentino Matta e Dr. Ita de Oliveira e Silva por participarem da banca examinadora, por todas as sugestões que foram fundamentais para a complementação deste trabalho.

Agradeço a Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade de realização do curso proporcionando crescimento profissional e pessoal.

Agradeço a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior) pela concessão de bolsa de estudos.

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1. Anfíbios.....	2
2.2. Rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>)	3
2.3. Testículos de Anuros	5
2.4. Espermatogênese em Anuros	6
2.5. Células de Seroli: mamíferos x anuros	7
2.6. Células de Leydig: mamíferos x anuros	8
2.7. Controle endócrino da espermatogênese.....	9
2.8. Hormônios tireoidianos em vertebrados	10
3. JUSTIFICATIVA	12
4. OBJETIVOS	13
4.1. Objetivos Gerais	13
4.2. Objetivos Específicos	13
5. REFERÊNCIAS.....	13
ARTIGO	27
Efeito do hipotireoidismo transitório induzido pelo 6-n-propil-2-tiouracil (PTU) sobre o testículo e células de Sertoli de rã-touro (<i>Lithobates catesbeianus</i>)	
1. INTRODUÇÃO	27
2. MATERIAIS E MÉTODOS	28
2.1. Animais	28
2.2. Verificação do desenvolvimento gonadal	29
2.3. Confirmação da indução ao hipotireoidismo	29
2.4. Duração do Experimento	30
2.5. Manejo Geral	30
2.6. Coleta, processamento e fixação do material	31
2.6.1. Fatores bióticos e abióticos.....	31
2.6.2. Eutanásia e Análise biométrica	31
2.6.3. Análises histológicas	31
2.6.3.1. <i>Proporções volumétricas (%) do parênquima testicular</i>	32
2.6.3.2. <i>Contagem de células germinativas e de células de Sertoli nos cistos espermatogênicos</i>	33
2.6.3.3. <i>Razão entre tipos celulares no testículo</i>	35
2.6.3.4. <i>Determinação da área do túbulo e dos diferentes cistos de células germinativas</i>	35
2.6.3.5. <i>Morfologia das células de Leydig</i>	35
2.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	36
3. RESULTADOS	36
3.1. Características biométricas	36
3.1.1. Biometria em girinos	36
3.1.2. Biometria em rãs	36

3.2. Análises histológicas	37
3.2.1. Desenvolvimento gonadal	37
3.2.2. Proporção volumétrica dos constituintes da glândula tireoide em girinos de rãs-touro no sexagésimo dia de tratamento	37
3.2.3. Proporções volumétrica dos compartimentos tubular e intertubular.....	40
3.2.4. Frequência dos cistos germinativos.....	41
3.2.5. Número de células germinativas e células de Sertoli	42
3.2.6. Área dos túbulos seminíferos e de cistos de células germinativas envolvidos na divisão meiótica	45
3.2.7. Proporção volumétrica entre os elementos do compartimento intertubular.....	45
4. DISCUSSÃO	47
4.1. Características biométricas dos girinos no sexagésimo dia de tratamento com PTU em duas concentrações diferentes	48
4.2. Características da glândula tireoide de girinos no sexagésimo dia de tratamento com PTU em duas concentrações diferentes	49
4.3. Dados biométricos e histológicos das gônadas de rãs-touro adulta após indução ao hipotireoidismo transitório na fase larval	50
5. CONCLUSÕES	51
6. PERSPECTIVAS	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

RESUMO

PACHECO, Camila Mariangela, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2013. **Efeito do hipotireoidismo transitório induzido pelo 6-n-propil-2-tiouracil (PTU) sobre o testículo de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*)**. Orientador: Sérgio Luis Pinto da Matta.

Nos últimos 20 anos vários estudos associaram a ação dos hormônios tireoidianos sobre os testículos, demonstrando que a proliferação das células de Sertoli, assim como a função esteroidogênica e gametogênica do testículo, são reguladas, direta ou indiretamente, por esses hormônios durante a fase neonatal. Este estudo analisou as características testiculares de rãs-touro adulta quando submetidas ao hipotireoidismo transitório induzido pelo PTU durante a fase larval. Para tanto, três grupos de 80 girinos na fase 34 de Gosner foram organizados, sendo G1 o grupo controle e G2 e G3 os grupos mantidos, durante 60 dias, em soluções de PTU na concentração de 75 e 150 ppm, respectivamente. O hipotireoidismo foi confirmado em girinos eutanasiados no sexagésimo dia de tratamento através da observação e avaliação morfométrica da tireoide, sendo observado aumento significativo da vascularização e redução do diâmetro e área do lume folicular, além da redução do tamanho e peso de girinos. Para analisar a ação do hipotireoidismo transitório em testículos adultos, as rãs foram eutanasiadas sete meses após o término do tratamento, sendo feitas análises de biometria corporal, peso e comprimento rostro-cloacal. Na morfometria testicular foram analisados, a proporção do parênquima testicular, o número de células germinativas e de Sertoli, a razão entre os tipos de células germinativas, frequência dos cistos germinativos, área tubular e cística e o diâmetro e volume da célula de Leydig. A única diferença observada com relação ao testículo foi o aumento da razão entre o número de espermátocitos secundário e número de células de Sertoli por cisto. Nos parâmetros restantes não foram observadas diferenças significativas. Entende-se que os efeitos do hipotireoidismo larval são reversíveis em anuros, pois os girinos do grupo G2 e G3, que mostraram menor peso e alterações na tireoide recuperaram o peso e o tamanho na fase adulta.

ABSTRACT

PACHECO, Camila Mariangela, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2013. **Effect of transient hypothyroidism induced by 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) on the testis of the bullfrog (*Lithobates catesbeianus*)**. Adviser: Sérgio Luis Pinto da Matta.

Over the past 20 years, several studies have associated the action of thyroid hormones in the testes, demonstrating that the proliferation of Sertoli cells, as well as function and steroidogenic gametogênica testis are regulated directly or indirectly by these hormones during the neonatal period. This study examined the characteristics of testicular adult bullfrogs when subjected to transient hypothyroidism induced by PTU during the larval stage. Therefore three groups of 80 tadpoles in stage 34 of Gosner were organized: the control group G1, G2 and G3 groups held for 60 days in solutions of PTU in the concentration of 75 and 150 ppm, respectively. Hypothyroidism was confirmed in tadpoles killed on the sixtieth day of treatment by observation and morphometric evaluation of the thyroid, with a significant increase in vascularization and reduced the diameter and area of the follicular lumen, while reducing the size and weight of tadpoles. To analyze the action of transient hypothyroidism in adult testes, the frogs were euthanized seven months after the end of treatment, being made analyzes biometrics body weight and snout-vent length. In testicular morphology were analyzed, the proportion of testicular parenchyma, the number of germ cells and Sertoli cells, the ratio of the germ cell types, frequency of cysts germ, cystic tubular area and diameter and volume of the Leydig cell. The only difference observed was with respect to the testis increase the ratio of the number of secondary spermatocytes and number of cysts by Sertoli cells. In the remaining parameters were not significant differences. It is understood that the effects of hypothyroidism are reversible in larval frogs, tadpoles because the G2 and G3, which showed smaller changes in thyroid weight and regained weight and size in adulthood.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Durante muito tempo, o testículo foi considerado indiferente à ação dos hormônios tireoidianos, uma vez que os estudos neste sentido eram realizados com indivíduos adultos (Andò et al., 2001). No entanto, Maqsood (1950) afirmou que drogas antitireoidianas são capazes de alterar a massa gonadal e o processo espermatogênico, mas essa alteração varia de acordo com a idade do animal, com a dose e duração do tratamento.

Nos últimos 20 anos vários estudos associaram a ação dos hormônios tireoidianos sobre os testículos, demonstrando que a proliferação das células de Sertoli, assim como a função esteroideogênica e gametogênica do testículo, são reguladas direta ou indiretamente por esses hormônios (Pudney, 1993; Cooke, 1991). Além disso, Palmero et al. (1988), ao analisarem a disponibilidade de receptores de hormônios tireoidianos em testículos de ratos, observaram que esses receptores são expressos em grande quantidade durante o final da fase fetal e nas três primeiras semanas de desenvolvimento testicular pós-natal, predominantemente na célula de Sertoli. Assim, os hormônios tireoidianos agem, principalmente, na célula de Sertoli de indivíduos jovens. Dentre as funções da célula de Sertoli estão a determinação do tamanho do testículo, de acordo com número de células de Sertoli existente e a produção espermática, já que a célula de Sertoli tem capacidade de suportar um número fixo de células germinativas durante a espermatogênese. Esse número é estabelecido quando essa célula finaliza o período de multiplicação (Orth, 1993; Hess et al., 1993).

Em mamíferos, os hormônios tireoidianos induzem a maturação das células de Sertoli, cessando sua multiplicação (Cooke et al., 1994; Cooke, 1996). Nesse sentido, o hipertireoidismo neonatal cessa precocemente a proliferação dessa célula e estimula a diferenciação funcional, resultando em testículos menores e na conseqüente diminuição da produção espermática diária. Por outro lado, o hipotireoidismo neonatal prolonga a proliferação das células de Sertoli aumentando a população dessa célula o que aumenta o tamanho dos testículos e produção espermática diária em animais adultos (Van Haaster et al., 1992; Joyce et al., 1993; Cooke et al., 1994). Cooke et al. (1994) ressaltam a viabilidade do modelo de hipotireoidismo transitório em espécies economicamente importantes, uma vez que ele aumenta a produção espermática, logo a reprodução, sem alterar os custos fixos da produção animal.

A rã-touro, *Lithobates catesbeianus*, foi introduzida no Brasil em 1935 com a finalidade de abastecer o mercado de carnes exóticas, mas somente na década de 1980 houve maior atividade de produção de rãs no país. Desde então, a demanda potencial de carne de rã no Brasil supera a oferta, indicando um quadro otimista dessa atividade no país (Feix et al., 2006; EMATER, 2013). Sabendo da potencialidade do mercado de carne de rã, assim como a necessidade de metodologias que aumentem a produção desse animal, o modelo de hipotireoidismo transitório durante a fase neonatal torna-se interessante para esse contexto, uma vez que vários estudos têm demonstrado excelentes resultados em roedores (Cooke et al., 1993; Jannini et al., 1995; Holsberger e Cooke, 2005) e tilápias-nilóticas (Matta et al., 2002). Além disso, é importante verificar como hipotireoidismo transitório, induzido por 6-n-propil-2-tiouracil (PTU), afeta a organização testicular de anuros quando retornam ao estado de eutireoidismo.

Sendo assim, este estudo representa uma oportunidade de compreender as características testiculares quando submetidas ao hipotireoidismo transitório induzido pelo PTU, e a partir desse entendimento inferir sobre a aplicação da metodologia para aumento da produção espermática da rã-touro, enquanto espécie economicamente importante.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Anfíbios

Os anfíbios representam a classe de vertebrados terrestre mais basal, sendo esses animais os intermediários entre a forma de vida totalmente aquática, os peixes, e os amniotas terrestres (Lofts, 1984; Duellman e Trueb, 1986).

Os anfíbios são distinguidos em três ordens: Gymnophiona (cecílias), Urodelos (salamandras) e Anuros (sapos, rãs e pererecas). São caracterizados pela alta permeabilidade na pele que os permitem absorver água com grande facilidade, o que também os tornam vulneráveis à perda de água. Além disso, seus ovos, por serem constituídos por cápsula gelatinosa, são desprovidos de proteção para o ambiente terrestre. Essas características exigem que os anfíbios dependam de ambientes relativamente úmidos, ou até mesmo do ambiente aquático em alguma fase da vida (Duellman e Trueb, 1986). Esse histórico de vida bifásico, parte no ambiente aquático e outra no ambiente terrestre, caracteriza o nome da classe anfíbia, mas há exceção

quanto a essa característica em algumas espécies da classe, cujos representantes são essencialmente aquáticos.

Para sair da água e alcançar o ambiente terrestre, vários anfíbios precisam sofrer uma série de mudanças pós-embriônica envolvendo transformações estruturais, fisiológicas, bioquímicas e comportamentais (Duellman e Trueb, 1986) que compreendem verdadeira metamorfose. Em anuros são destacados três modificações básicas durante a metamorfose: 1) regressão das estruturas e funções essencialmente larvais; 2) transformações das estruturas larvais em uma forma sustentável para o uso adulto; 3) desenvolvimento de novas estruturas e funções fundamentalmente para o uso adulto (Duellman e Trueb, 1986). Já no início do século passado Etkin (1932) distinguiu o processo metamórfico em três etapas: 1) pré-metamórfica, caracterizada por considerado aumento das estruturas larvais, sendo esta fase única para anuros; 2) pró-metamórfica, período que continua o crescimento, especialmente dos membros, mas iniciam pequenas modificações metamórficas; 3) clímax metamórfico, momento de radical mudança que culmina com a ausência de muitas características larvais. Todas as fases da metamorfose são controladas por hormônios, dentre os quais se destacam os hormônios tireoidianos, considerados como os maiores estimuladores da metamorfose, enquanto a prolactina age como antimetamórfico e estimula o crescimento durante a fase larval (Denver, 1996).

2.2. Rã-touro (*Lithobates catesbeianus*, Shaw, 1802)

Lithobates catesbeianus pertence à família Ranidae que tem como característica distintiva a presença de membranas interdigitais nos membros posteriores (Pauly et al., 2009). Uma característica marcante dessa espécie é a forte vocalização dos machos, que se assemelha ao mugido de um touro, denominando popularmente a espécie, de rã-touro (Vieira, 1993).

A rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) é uma espécie de anuro nativa da América do Norte, que foi introduzida em diversas regiões do mundo para o uso comercial em razão da grande demanda de sua carne na culinária e também para obtenção de subprodutos como couro (Fontanello et al., 1984; Culley Jr., 1981). No Brasil, a rã-touro foi introduzida no início da década de 1930 e encontrou condições climáticas favoráveis para o desenvolvimento e reprodução, apresentando melhora no desempenho metabólico com o aumento da temperatura ambiente (Braga e Lima,

2001). A alta flexibilidade adaptativa permitiu a essa espécie reduzir seu tempo de metamorfose, que normalmente encontra-se em torno de dois anos (Bury e Whelan, 1984), para até seis meses (Braga e Lima, 2001). Além disso, a facilidade para manter a rã-touro em condições laboratoriais tem permitido a sua utilização como modelo experimental em pesquisas bioquímicas (Li e Bern, 1976; Ji et al., 2007; Rahman e Yamauchi, 2010) e reprodutivas (Sprando e Russell, 1988; Sasso-Cerri et al., 2004; Gomes et al., 2012).

A rã-touro apresenta reprodução sexuada e dimorfismo sexual, que se torna mais evidenciado pelos caracteres sexuais secundários, durante o período reprodutivo. Destacam-se, como características para a identificação de indivíduos machos, a membrana timpânica, com diâmetro duas a três vezes maior que o dos olhos, o polegar (ou pólex) dilatado com coloração escura no período da reprodução, o papo amarelado e a emissão de sons típicos (canto), cuja finalidade é atrair a fêmea para o acasalamento (Sadleir, 1973; Lima e Agostinho, 1988).

Em ambiente natural o período reprodutivo para rã-touro, nos Estados Unidos e Canadá, é progressivamente tardio, do sul em direção ao norte, sendo a estação de desova mais duradoura nas regiões sulinas (Willis et al., 1956). Em ranários brasileiros esta espécie apresenta dois períodos reprodutivos, sendo o primeiro de setembro a janeiro, e o segundo, de fevereiro a abril e atingem a maturidade reprodutiva em menos de um ano (Fontanello et al., 1984; Vizotto, 1986).

Estudos com espermatogênese de anuros, especialmente de rã-touro, têm crescido na última década. Assim, Sasso-Cerri et al. (2006) avaliaram a ocorrência de apoptoses durante o ciclo reprodutivo da rã-touro visando estabelecer diferenças sazonais no processo reprodutivo desses animais. Em relação à duração total do processo espermatogênico em rãs-touro, Segatelli et al. (2009) estimaram que esse processo leva em torno de 40 dias para ser completado (de espermatogônia até espermatozoide) e as fases espermatogonial, espermatocitária e espermiogênica representam respectivamente 18(45%), 14 (35%) e 8 (20%) dias desta duração. Carlos e Matta (2009) descreveram detalhadamente dos parâmetros morfométricos testiculares de machos adultos de rãs-touro mantidos em cativeiro. A ocorrência de sazonalidade na espermatogênese de rãs-touro foi analisada por Gomes et al. (2012) através da quantificação de populações de células germinativas durante o ano. Segundo os autores, a reprodução dessa espécie está diretamente relacionada a

fatores ambientais, principalmente, às variações de temperatura e umidade no verão e inverno.

2.3. Testículos de Anuros

Os anuros possuem um par de testículos ovoides, maciços e simétricos, localizados na base do corpo gorduroso e anterior aos rins. Os túbulos seminíferos estão ligados aos elementos néfricos por um conjunto de ductos eferentes que se encontram apoiados em uma membrana, o mesórquio (Lofts, 1984; Duellman e Trueb, 1986; Piprek et al., 2010). Ao atingir os rins, os ductos eferentes transportam os espermatozoides para os ductos coletores, que por sua vez, irão conduzir os espermatozoides para o ducto de Wolff. Este ducto funciona como via de condução da urina e dos espermatozoides em direção à cloaca (Sprando e Russell, 1988; Vieira, 1993; Pierantoni, 1998).

O testículo é envolvido por uma camada de tecido conjuntivo rico em fibra colágena, conhecida como albugínea. O testículo é dividido em dois compartimentos: o tubular e o intertubular. O primeiro é formado por uma membrana basal acelular associada a células mioídes, e agrupamentos de células germinativas, os cistos, em contato com células de Sertoli (Pudney, 1993; Santos et al., 2008; 2011). O segundo compartimento, também chamado de intersticial, é formado por tecido conjuntivo, células de Leydig, mastócito, macrófago, vasos sanguíneos e linfáticos, além de possuir um sistema de ductos para a condução de espermatozoides. Portanto, à semelhança dos demais vertebrados, os testículos exercem as funções de produção de gametas (espermatogênica) e endócrina (esteroidogênica) (Pierantoni, 1998; Koulis et al., 2002).

2.4. Espermatogênese em Anuros

A espermatogênese é um processo organizado e sincronizado que envolve a transformação de uma célula espermatogonial diploide em um espermatozoide haploide (Hesse-França, 2007; Segatelli et al., 2009; Nicholls et al., 2011). Em anuros, o processo espermatogênico ocorre de forma cística, com células em desenvolvimento sincronizado no mesmo cisto. Esta organização surge a partir de uma única espermatogônia primária tronco que se associa à célula de Sertoli (Schulz et al., 2009). As espermatogônias sofrem mitoses e originam duas espermatogônias secundárias

que proliferam por mitose, permanecendo no mesmo cisto. Em rã-touro, após oito divisões mitóticas (Carlos e Matta, 2009), as espermatogônias secundárias tornam-se espermatócitos primários que iniciam a meiose I. No final da meiose I os espermatócitos secundários são formados. Essas células originam as espermatídes, que passam por marcantes alterações morfológicas até se diferenciarem em espermatozoides através de um processo chamado espermiogênese (Pierantoni, 1998; Nicholls et al., 2011). Durante a espermiogênese ocorre grande compactação nuclear, volumosa redução de citoplasma, formação da peça intermediária e flagelo, estruturas essenciais para alcançar e fertilizar os ovócitos. Nessa fase as células germinativas se organizam em feixes e cada feixe torna-se associado a uma única célula de Sertoli. Estes feixes tornam-se, então, orientados perpendicularmente às células de Sertoli (Pudney, 1993).

De acordo com características morfológicas a espermatogênese pode ser dividida em três fases: (1) proliferativa ou espermatogonial, no qual ocorrem sucessivas divisões mitóticas; (2) meiótica ou espermatocitária, que envolve a duplicação de DNA e recombinação genética; e (3) diferenciação ou espermiogênica em que a espermatíde redonda sofre grandes transformações morfológicas para formar espermatozoide (Segatelli et al., 2009).

2.5. Célula de Sertoli: Mamífero x Anuro

Em mamíferos, as células de Sertoli são colunares e estão orientadas radialmente dentro dos túbulos seminíferos, que apresentam perfil arredondado. As células de Sertoli se estendem desde a lâmina basal até a parte central do túbulo seminífero onde, juntamente com as células espermatogênicas, delimitam o lúmen tubular (Russell, 1993). O núcleo das células de Sertoli é geralmente ovoide ou piramidal com endentações na sua superfície o que aumenta a área de interação com o citoplasma. Apresenta nucléolo central, basófilo e bastante refringente o que facilita a sua identificação nos túbulos seminíferos quando analisadas em microscopia de luz (Schulz e Holstein, 1993; Griswold, 1998; Murta et al., 2013).

As células de Sertoli apresentam recessos laterais e apicais ocupados por células germinativas em diferentes fases de desenvolvimento. Em mamíferos, as células de Sertoli apresentam-se como suporte mecânico para as células germinativas devido à formação de junções oclusivas, desenvolvendo uma barreira que divide o

túbulo em ambientes basal e adluminal, que proporcionam um meio bioquímico e hormonal propício para o desenvolvimento das células germinativas até o fim do processo espermatogênico, assim como a proteção dessas. A célula de Sertoli também desempenha um papel ativo na liberação das espermatídes. Além disso, essa célula somática é responsável por fagocitar o excesso de citoplasma proveniente da espermição e células germinativas apoptóticas (França e Russell, 1998; Griswold, 1998). Sendo assim, a célula de Sertoli é essencial para organização testicular e desenvolvimento da espermatogênese, sendo necessária para a progressão da célula germinativa até espermatozoide via contato direto e controle do ambiente dentro do túbulo seminífero.

Em mamíferos, é considerado que a célula de Sertoli não mais se divide após a puberdade (França e Russell, 1998). O fator mais importante para a proliferação da célula de Sertoli é a ação do hormônio folículo estimulante (FSH) (Orth, 1993; Meachem et al., 1996; Johnston, 2004; Nicholls et al., 2011), enquanto os hormônios tireoidianos (HT) são responsáveis pela sua maturação (Cooke et al., 1994; Sirianni et al., 2001; Holsberger e Cooke, 2005). Para anuros é aceito que a cada ciclo reprodutivo as células de Sertoli perdem sua porção apical durante a espermição, mas a porção basal remanescente, que permanece intacta, é responsável pela regeneração da célula (Callard e Callard, 1998).

Poucas espécies de anuros têm sido adequadamente estudadas quanto às características citológicas das células de Sertoli e ao seu papel no tamanho final do testículo. Em rãs-touro, o amadurecimento da célula de Sertoli inicia após a divisão meiótica, prolongando até o final da espermiogênese (Assim, 2011). Há estudos que afirmam que as células de Sertoli de anuros guardam certa semelhança com aquelas encontradas em muitas espécies de peixes, onde é possível a observação do núcleo com formato ovoide e nucléolo proeminente (Ferrari, 1981; Silva, 1987; Teles, 1986; Andrade, 1990; Carlos e Matta, 2009). Enquanto outros estudos ampliam a semelhança das células de Sertoli, assim como as demais células somáticas testiculares de anfíbios e teleosteos ao funcionamento e a morfologia das células de Sertoli em mamíferos (Billard, 1990; Grier, 1993; Schulz et al., 2005; Schulz et al., 2009 – Assis 2011). No entanto, diferente dos mamíferos, as células de Sertoli dos anuros formam a parede de cistos que contêm no seu interior células germinativas sincrônicas quanto à fase de desenvolvimento (Pudney, 1993; Carlos e Matta, 2009; Santos et al., 2011).

A eficiência das funções desempenhadas pelas células de Sertoli está limitada a um determinado número de células germinativas. O número máximo de células germinativas por célula de Sertoli pode variar entre espécies, mas é constante dentro da mesma espécie. Dessa forma, o tamanho do testículo e a produção espermática são manipulados pela mudança do número de célula de Sertoli (Orth et al., 1988). Nesse sentido, Carlos e Matta (2009) encontraram que a célula de Sertoli de rã-touro tem a capacidade de suportar 5,82 espermatócitos primários, 7,50 espermatócitos secundários e 13,8 espermatozoides.

2.6. Células de Leydig: Mamíferos x Anuros

As células de Leydig de mamíferos são mononucleadas, possuindo núcleo esférico com um a três nucléolos (Setchell, 1991) e grumos de heterocromatina regularmente distribuídos ao longo do envoltório nuclear. A semelhança na morfologia e função das células de Leydig em todos os vertebrados já é conhecida. No entanto, em anuros é observada grande variação sazonal na morfologia devido às flutuações cíclicas da sua atividade secretora (Payne et al., 1996).

Em vertebrados, as células de Leydig podem ser encontradas em grupos ou isoladas em regiões perivascularares e peritubulares (Haider, 2004). Estas células são bastante conhecidas por sua marcante produção de andrógenos (Bardin, 1996) estimulados por meio do hormônio luteinizante (LH). Dentre os andrógenos sintetizados pelas células de Leydig estão a testosterona e a diidrotestosterona, que são responsáveis pela diferenciação do trato genital masculino e da genitália externa na fase fetal (Pelleniemi et al., 1996). Além disso, são responsáveis pelo aparecimento de caracteres sexuais secundários e manutenção quantitativa da espermatogênese durante a puberdade (Sharpe, 1994; Zirkin et al., 1994). Adicionalmente, foi demonstrado que o FSH também participa na manutenção da espermatogênese em animais sexualmente maduros (Russell et al., 1993; França et al., 1994; Huhtaniemi e Toppari, 1998; Meachem et al., 1999; Johnston, 2004; O'Shaughnessy et al., 2010). A diidrotestosterona é responsável pela manutenção funcional das glândulas sexuais acessórias (Luke e Coffey, 1994; Fan e Robaire, 1998; Goyal et al., 1999).

Os hormônios tireoideanos desempenham importante papel na proliferação e diferenciação das células de Leydig durante o desenvolvimento testicular, influenciando indiretamente a população desse tipo celular, durante o período pré-

natal até ao pré-púbere (Hardy et al., 1996; Antony et al., 1995; França et al., 1995, Mendis-Hadagama et al., 1998; Teerds et al., 1998).

2.7. Controle Endócrino da Espermatogênese

O controle da espermatogênese em anuros é mantido pela interação entre ritmo endógeno e fatores externos (Paniagua et al., 1990). Dentre os fatores externos ambientais mais conhecidos no controle do ciclo reprodutivo sazonal em anfíbios estão a temperatura, a umidade e o fotoperíodo (Paniagua et al., 1990; Figueiredo et al., 2001; Parua et al., 2011).

Esses fatores estimulam o hipotálamo a sintetizar e secretar o hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), que estimula as células gonadotrópicas da hipófise a sintetizar e secretar o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH), conhecidos por promover a espermatogênese (Aires, 2008).

O LH tem efeito indireto na espermatogênese estimulando a célula de Leydig a produzir e liberar testosterona, que no testículo atua principalmente sobre a célula de Sertoli. A testosterona, por sua vez, é fundamental para diferenciação sexual, amadurecimento sexual, fertilidade masculina e características sexuais secundárias (Aires, 2008). Nesse sentido, Roser (2008) destacou a funcionalidade da testosterona na qualidade da espermatogênese pela inibição da apoptose de células germinativas, enquanto Callard et al. (1978) também destacaram a necessidade desse hormônio para finalizar o processo espermatogênico agindo durante a espermiogênese.

O FSH tem efeito direto sobre a espermatogênese atuando sobre as células Sertoli que, em resposta, secretam fatores de crescimento e de diferenciação das células germinativas, otimizando a espermatogênese (Russell et al., 1990; Pierantoni et al., 2002; Aires, 2008; Zohar, 2010).

Em anuros, o FSH, estimula a proliferação e diferenciação de espermatogônias, sendo considerado importante na iniciação da espermatogênese (Minucci et al., 1997; Johnston, 2004), enquanto a testosterona favorece a segunda divisão meiótica e atua sobre a espermiogênese (Rastogi e Iela, 1980; Di Matteo et al., 1988; Pozzi e Ceballos, 2000; Rosembli et al., 2006). Russell et al. (1993) afirmaram que o FSH é pré-requisito para ação da testosterona durante o desenvolvimento espermático em humanos.

2.8. Hormônios Tireoidianos em Vertebrados

Segundo Norris (1999), a organização da glândula tireoide dos anuros é semelhante aos demais tetrápodes, sendo encontrada de forma bilobada sob a cartilagem hioide. A tireoide é a primeira glândula a desenvolver-se em anuros, sendo observada progressiva modificação da sua arquitetura ao longo da metamorfose, para adaptar-se às necessidades fisiológicas (Dodd et al., 1976). Sendo assim, em estudos que analisam a morfologia e morfometria histológica dessa glândula é necessário comparar girinos tratados e controles exatamente na mesma fase de desenvolvimento.

A glândula tireoide sintetiza os hormônios tireoidianos (HTs) tiroxina (T4) e 3,5,3'-L-triiodotironina (T3) que exercem papel importante no desenvolvimento, crescimento e metabolismo dos vertebrados através de múltiplas ações fisiológicas (Tata, 2006). É conhecido que amostras de sangue em girinos é de difícil obtenção, limitando assim a capacidade de detectar alterações nos níveis plasmáticos de T4, T3 e TSH (Opitz et al., 2006). Devido a isso, a histologia da glândula tireoide tem sido amplamente utilizada para detectar suas variações funcionais dessa glândula em girinos (Miranda et al., 1996; Capen, 1994; Tietge et al., 2005).

Ação dos HTs em anuros já foi estabelecida principalmente durante a metamorfose, participando na a) reestruturação, crescimento, proliferação e diferenciação celular; b) diferenciação funcional do fígado; c) mudança de posição dos olhos; d) modificação cutânea com formação de glândulas; e) remodelação óssea; f) formação dos membros; g) modificação e crescimento dos músculos e nervos; h) absorção das brânquias e cauda; e i) remodelação do intestino e pâncreas (Tata, 1998; Shi, 1999).

Os HTs são importantes na regulação do crescimento e do desenvolvimento gonadal de mamíferos e teleósteos, mas pouco se conhece sobre os efeitos desses hormônios em embriões, larvas e adultos de anuros, estando as pesquisas nesse assunto, muito atrasadas se compararmos com o que é realizado em outros vertebrados. Em mamíferos os HTs estão envolvidos na proliferação e maturação das células de Sertoli e, principalmente, no aumento do tamanho testicular e da produção espermática (Cooke, 1991). Diversos estudos têm mostrado que o número de células de Sertoli por testículo, estabelecido em janelas específicas de proliferação, é o principal fator na determinação da produção espermática e do tamanho do testículo

(Orth et al., 1988, Cooke et al., 1992; Gondos e Berndtson, 1993). Nesse contexto, alguns estudos relataram que os hormônios tireoidianos controlam a proliferação e diferenciação de células de Sertoli em testículo neonatal, sendo o hipotireoidismo associado com o atraso na maturação e desenvolvimento gonadal (Jannini et al., 1995; Matta et al., 2002; Holsberger e Cooke, 2005).

Embora existam diversas metodologias que visem elevar a produção espermática, o hipotireoidismo transitório é, atualmente, o modelo experimental que tem demonstrado excelentes resultados em diversas espécies (Cooke et al., 1993; Jannini et al., 1995; Matta et al., 2002; Holsberger e Cooke, 2005). O 6-n-propil-2-tiouracil (PTU) é uma droga antitireoidiana que inibe a captação de iodo e a síntese de T4 pela tireoide e também a deiodinização periférica do hormônio T4 em T3 (Aires, 2008). A utilização dessa droga de forma transitória visa aumentar a produção espermática, sendo testados em animais de laboratório como rato, camundongo e hamster, na fase de aleitamento (Cooke e Meisami, 1991; Cooke et al., 1993). O tratamento com PTU provoca redução na concentração dos HTs o que torna mais lenta a diferenciação, resultando no prolongamento da fase mitogênica e no aumento da população das células de Sertoli (Cooke et al., 1994). Com a interrupção do tratamento, os animais retornam ao estado de eutireoidismo possibilitando a maturação completa das células de Sertoli. A população aumentada destas células interage com a população de células espermatogoniais, causando aumento do tamanho dos testículos e aumento da produção espermática. Estas evidências sugerem que os HTs agem nas células de Sertoli durante o período neonatal, levando as mesmas a se diferenciarem, de seu estado inicial mitogênico, para células secretoras características de animais maduros (Hess et al., 1993; Cooke et al., 1994; Matta et al., 2002).

Um fator crítico na tentativa de se aplicar o modelo-PTU em outras espécies é saber se estas espécies apresentam, nas células de Sertoli, receptores para os HTs durante a fase neonatal do desenvolvimento testicular, como ocorre em rato, camundongo, hamster, ovinos, suínos jovens e em tilápias-nilóticas (Palmero et al., 1988; Bunick et al., 1994; Cooke et al., 1994; Matta et al., 2002) e se caso apresentarem, quando ocorre a maior concentração desses receptores. Outra questão é verificar se as drogas utilizadas prolongam a mitogênese neonatal das células de Sertoli em outras espécies, o que torna atraente a ideia de se trabalhar com anuros.

Cooke et al. (1994) indicam que o tratamento com PTU deve ser mais efetivo nas espécies com intervalos mais curtos para a fase proliferativa das células de Sertoli especialmente se, nesta fase, o índice mitótico for inicialmente alto e diminuir bruscamente. Por outro lado, o tratamento pode ser menos eficiente em espécies que apresentem índice máximo de proliferação das células de Sertoli baixo e fase mitótica extensa. O hipotireoidismo neonatal, apesar de ser um modelo bastante interessante e com potencial uso prático em animais domésticos de interesse econômico, tem ainda um vasto campo a ser pesquisado, principalmente no que concerne às particularidades de cada espécie (França, 1995).

Dentro desse contexto, deve-se considerar a potencial aplicação prática do uso do PTU no aumento do tamanho testicular e da eficiência reprodutiva de rãs-touro (*Lithobates catesbeianus*) que, por apresentarem testículos pequenos, servirão como modelo no presente estudo.

3. JUSTIFICATIVA

A rã-touro é a espécie de anuro mais utilizada nos ranários brasileiros (Lima et al., 1988; EMATER, 2013), devido não somente à grande apreciação da sua carne na culinária, mas também pela alta adaptação às condições de criação. Essa adaptação também permite que a rã-touro seja reconhecida como bom modelo experimental, sendo utilizada em pesquisas bioquímicas e reprodutivas (Sprando e Russell, 1988; Li e Bern, 1976; Rahman e Yamauchi, 2010). Diante disso, essa espécie é considerada de interesse econômico, no qual o mercado consumidor é maior que o fornecedor (EMATER, 2013), sendo necessária a elaboração de técnicas que visam aumentar a produção espermática.

Nesse sentido, pesquisas realizadas em animais de laboratório como rato, camundongo e hamster, na fase de aleitamento, apontam que a utilização de droga antitireoidianas, de forma transitória, aumenta a produção espermática devido ao aumento da fase de proliferação das células de Sertoli (Cooke e Meisami, 1991; Cooke et al., 1993). No entanto, há carência de estudos que verifiquem como a ausência temporária de HTs podem influenciar a organização e funcionamento testicular de anuros.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivos Gerais

Verificar os efeitos do tratamento transitório pelo 6-n-propil-2-tiouracil (PTU) sobre o desenvolvimento testicular e espermatogênese em rãs-touro adultos.

4.2. Objetivos Específicos

Analisar os efeitos do tratamento com PTU sobre a tireoide de girinos de rãs-touro no sexagésimo dia de tratamento nos seguintes aspectos:

- a. Proporção volumétrica dos constituintes tireoidianos;
- b. Diâmetro e área do lume folicular.

Investigar os efeitos do tratamento transitório com PTU em duas concentrações diferentes sobre os seguintes parâmetros:

- a. Peso testicular;
- b. Desenvolvimento testicular de rã-touro, através de análises histológicas, da diferenciação gonadal até a idade adulta;
- c. Proporção volumétrica dos elementos componentes do parênquima testicular e dos elementos intersticiais;
- d. Número de células germinativas (espermatócitos primários, secundários e espermatídes) por cisto;
- e. Área dos diferentes cistos de células germinativas (espermatócitos primários, secundários e espermatídes);
- f. Frequência dos diferentes tipos de cistos nos túbulos seminíferos;
- g. Morfologia das células espermatogênicas e das células de Sertoli bem como as relações quantitativas entre elas;
- h. Número de células de Sertoli nos diferentes cistos (espermatócitos primários, secundários e espermatídes).
- i. Morfometria das células de Leydig: relação nucleoplasmática e volume celular;
- j. Índice gonadossomático dos machos adultos;

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRES, M.M. (2008). Fisiologia. 3ª ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

- ANDÒ, S.; SIRIANNI, R.; FORASTIERI, P., CASABURI, I.; LANZINO, M.; RAGO, V.; GIORDANO, F.; GIORDANO, C.; CARPINO, A.; PEZZI, V. (2001). Aromatase expression in prepuberal Sertoli cells: effect of thyroid hormone. *Mol. Cell. Endocrinol.* 178: 11–21.
- ANDRADE, D.R. (1990). *Biologia reprodutiva da manjuba Curimatella lepidura Eigenmann and Eigenmann, 1889 (Pisces, Curimatidae) da Represa de Três Marias, Rio São Francisco, MG. Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.*
- ANTONY, F.F.; ARULHAS, M.M.; UDAY AKUMAR, R.C.R.; MARAM, R.R.M.; GOVINDARAJULU, P. (1995). Inhibition of Leydig activity in vivo and in vitro in hypothyroids rats. *J. Endocrinology*, 144: 293-300.
- BARDIN, C.W. (1996). Androgens: early attempts to evaluate Leydig cell function in man. In: PAYNE, A.H., HARDY, M.P., RUSSELL, L.D. *The Leydig cell.* (Eds.). Viena: Cache River Press, 2: 31-42.
- BRAGA, L.G.T.; LIMA, S.L. (2001). Influência da temperatura ambiente no desempenho da rã-touro, *Rana catesbeiana* (Shaw, 1802) na fase de recria. *Rev. Bras. Zootec.*, 30(6): 1659-1663.
- BUNICK, D.; KIRBY, J.D.; HESS, R.A.; COOKE, P.S. (1994). Developmental expression of testis messenger ribonucleic acids in the rat following propylthiouracil induced neonatal hypothyroidism. *Biol. Reprod.*, 51: 706-713.
- BURY, B.R.; WHELAN, J.A. (1984). Ecology and management of the bullfrog. *U.S. Fish and Wildlife Service Resour. Publ.*, 155: 23 pp.
- CALLARD, I.P.; CALLARD, G.V.; LANCE, V.; BOLAFFI, J.F.; ROSSET, J.S. (1978). Testicular Regulation in Nonmammalian Vertebrates. *Bio. Reprod.*, 18: 16-43.

- CALLARD, G. V.; CALLARD, I. P. (1998). Spermatogenesis in Nonmammals. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. Encyclopedia of Reproduction. San Diego: Academic Press., 563-570.
- CAPEN, C.C. 1994. Mechanisms of chemical injury of thyroidgland. Prog. Clin. Biol. Res.,387:173–191.
- CARLOS, J.; MATTA, S.L.P. (2009). Microscopic morphology and testis morphometry of captivity-bred adult bullfrogs (*Lithobates catesbeianus* Shaw, 1802). Braz. Arch. Biol. Technol., 52(6): 1461-1472.
- COOKE, P.S. (1991). Thyroid hormones and testis development: A model system for increasing testis growth and sperm production. Ann. N.Y. Acad. Sci., 637: 122-132.
- COOKE, P.S.; MEISAMI, E. (1991). Early postnatal hypothyroidism causes increased adult size of testis and other reproductive organs but does not increase testosterone levels. Endocrinology, 129: 237-243.
- COOKE, P.S.; PORCELLI, J.; HESS, R.A. (1992). Induction of increased testis growth and sperm production in adult rats by neonatal administration of the goitrogen propylthiouracil (PTU): the critical period. Biol. Reprod., 46:146-154.
- COOKE, P.S.; KIRBY, J.D.; PORCELLI, J. (1993). Increased testis growth and sperm production in adult rats following transient neonatal goitrogen treatment: Optimization of the propylthiouracil dose and effects of methimazole. J. Reprod. Fertil., 97(2): 493-499.
- COOKE, P.S.; HESS, R.A.; KIRBY, J.D. (1994). A model system for increasing testis size and sperm production: Potential application to animal science. J. Anim. Sci., 72: 43-54.

- COOKE, P.S. (1996). Thyroid hormone and regulation of testicular development. *Anim. Reprod. Sci.*, 42: 3333-341.
- COSTA, C.L.S. (1992). Desenvolvimento do aparelho reprodutor e fatores associados ao ciclo reprodutivo da rã-touro no sistema anfigranja. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil, 98 p.
- CULLEY JUNIOR, D.D. (1981). Have we turned the corner on bullfrog culture? *Aquacul. Manage.*, 7(3): 20-24.
- DENVER, R.J. (1996). Neuroendocrine Control of Amphibian Metamorphosis. In: GILBERT, L.I.; TATA, J.R.; BURR, G.A. *Metamorphosis postembryonic Reprogramming of gene expression in amphibian and insect cells*. (Eds.) San Diego, California, 12:434-457.
- DI MATTEO, L., MINUCCI, S., FASANO, S., PIERANTONI, R., VARRIALE, B., CHIEFFI, G. (1988). GnRH antagonist decreases androgen production and spermatogonial multiplication in frog (*Rana esculenta*): indirect evidence for the existence of GnRH or GnRH-like material receptor in the hypophysis and testis. *Endocrinology*, 122: 62–67.
- DODD, M.H.I.; DODD, J.M.; LOFTS, B. (1976). The Biology of Metamorphosis. In: *Physiology of Amphibia*. Academic Press, New York, 467–599.
- DUELLMAN, W.E.; TRUEB, L. (1986). *Biologia de Anfíbios*. Johns Hopkins University Press. (1º Ed.) 669 pp.
- EMATER (Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural). Ranicultura volta a crescer. Disponível em <http://www.emater.gov.gov.br/noticias>. Acessado em 13 de agosto de 2013.
- FAN, X.; ROBAIRE, B. (1998). Orchidectomy induces a wave of apoptotic cell death in the epididymis. *Endocrinology*, 139: 2128-2136.

- FEIX, R.D.; ABDALLAH, P.R.; FIGUEIREDO, M.R.C. (2006). Resultado econômico da criação de rã em regiões de clima temperado, Brasil. *Inform. Econ.*, 36(3): 70-80.
- FERRARI, O. (1981). Variação sazonal da espermatogênese em traíra (*Hoplias malabaricus* Bloch, 1974), Peixe teleósteo. Tese de Mestrado, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.
- FIGUEIREDO, M.R.C.; LIMA, S.L.; AGOSTINHO, C.A.; BAÊTA, F.C. (2001). Efeito da Temperatura e do Fotoperíodo sobre o Desenvolvimento do Aparelho Reprodutor de Rã-Touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802). *Rev. Bras. Zootec.*, 30(3): 916-923.
- FONTANELLO, D.; SOARES, H.A.; MANDELLI, J.R.J.; SANTOS, L.E.; PENTEADO, L.A.; CAMPOS, B.E.S; REIS, J.M. (1984). Estação de reprodução de *Rana catesbeiana* (Shaw, 1802), criados em ranário comercial e influência de fatores climáticos sobre o número de desovas. *Boletim do Instituto de Pesca*, 11: 123-130.
- FRANÇA, L.R. (1995). Hipotireoidismo neonatal: modelo para aumentar o tamanho do testículo e da produção espermática. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 19: 141-151.
- FRANÇA, L.R.; HESS, R.A.; COOKE, P.S.; RUSSELL, L.D. (1995). Neonatal hypothyroidism causes delayed Sertoli cell maturation in rats treated with propylthiouracil: Evidence that the Sertoli cell controls testis growth. *Anat. Rec.*, 242:57.
- FRANÇA, L.R.; JACKSON, A.; RUSSELL, L.D (1994). Hormone sensitive of germ cells in stage XIV and in stage I of rat spermatogenic cycle. *Tissue Cell*, 26: 375-383.
- FRANÇA, L.R.; RUSSELL, L.D. (1998). The testis of domestic mammals. In: *Male reproduction; a multidisciplinary overview*. Ed. Madrid: Churchill Communications Europe Espana, 16: 198-219.

- GOMES, M.L.M.; MATTA, S.L.P.; RIBEIRO-FILHO, O.P.; MONTEIRO, J.C. (2012). Stereological analyses of the annual variation of captive bullfrog adult testis (*Lithobates catesbeianus*, Shaw 1802). *J. Morphol. Sci.*, 29(3): 182-186.
- GONDOS, B.; BERNDTSON, W.E. (1993). Postnatal and pubertal development. In: RUSSELL, L.D.; GRISWOLD, M.D. *The Sertoli Cell*. (Ed.) Cache River Press, Clearwater, FL, 115-154.
- GOSNER, K.L. (1960). A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16:183-190.
- GOYAL, H.O.; WILLIAMS, C.S.; KHALIL, M.L.; VIG, M.M.; MALONEY, M.A. (1999). Postnatal differentiation of ductus deferens, tail of the epididymis, and distal body of epididymis in goats occurs independently of rete testis fluid. *Anat. Rec.*, 254: 508-520.
- GRISWOLD, M.D. (1998). The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Cell Dev. Bio.*, 9: 411-416.
- HAIDER, S.G. (2004). Cell biology of Leydig cells in the testis. *Int. Rev. Cytol.* 223: 181-241.
- HARDY, M.P.; SARMA, R.S.; ARAMPEBOLA, N.K.; SOTTAS, C.M.; RUSSELL, L.D.; BUNICK, D.; HESS, R.A.; COOKE, P.S. (1996). Increased proliferation of Leydig cells induced by neonatal hypothyroidism in the rat. *J. Androl.*, 17: 231-238.
- HESS, R.A.; COOKE, P.S.; BUNICK, D.; KIRBY, J.D. (1993). Adult testicular enlargement induced by neonatal hypothyroidism is accompanied by increased Sertoli and germ cell numbers. *Endocrinology*, 132: 2607-2613.
- HESS, R.A.; FRANÇA, L.R. (2007). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: CHENG, C.Y. *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis*. N.Y.: Landes Bioscience, 636: 1-15.

- HOLSBERGER, D.R.; COOKE, P.S. (2005). Understanding the role of thyroid hormone in Sertoli cell development: a mechanistic hypothesis. *Cell Tissue Res.*, 322:133-140.
- HUHTANIEMI, I.; TOPPARI, J. (1998). Hormonal regulation of testis. In: *Male reproduction; a multidisciplinary overview*. Ed. Spain: Churchill Communications Europe Espana, 7: 67-80.
- JANNINI, E.A.; ULISSE, S.; D'ARMIENTO, M. (1995). Thyroid hormone and male gonadal function. *Endoc. Rev.*, 16(4): 443-459.
- JI, L.; DOMANSKI, D.; SKIRROW, R.C.; HELBING, C.C. (2007). Genistein prevents thyroid hormone-dependent tail regression of *Rana catesbeiana* tadpoles by targeting protein kinase c and thyroid hormone receptor α . *Develop. Dynamics*, 236: 777-790.
- JOHNSTON, H.; BAKER, P.J.; ABEL, M.; CHARLTON, H.M.; JACKSON, G.; FLEMING, L.; KUMAR, T.R.; O'SHAUGHNESSY, P.J. (2004). Regulation of Sertoli cell number and activity by follicle-stimulating hormone and androgen during postnatal development in the mouse. *Endocrinology*, 145(1): 318–329.
- JOYCE, K.L.; PORCELLI, J.; COOKE, P.S. (1993). Neonatal goitrogen treatment increases adult testis size and sperm production in the mouse. *J. Androl.*, 14(6):448-55.
- KOULISH,S.; KRAMER, C.R.; GRIER, H.J. (2002). Organization of the male gonad in a protogynous fish, *Thalassoma bifasciatum* (Teleostei: Labridae). *J. Morphol.*, 254: 292-311.
- LI, C.W.; BERN, H.A. (1976). Effects of hormones on tail regeneration and regression in *Rana catesbeiana* tadpole. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 29: 376-382.
- LIMA, S. L; AGOSTINHO, C.A. (1988). A criação de rãs. Ed.Globo, Rio de Janeiro, 47-51.

- LOFTS, B. (1984). Amphibians. In.: LAMMINI, G.E. Marshall's physiology of reproduction. (4^a Ed). Hong Kong: Sheck Wah Tong Printing Press, 1: 127-205.
- LUKE, M.C.; COFFEY, D.S. (1994). The male sex accessory tissue: structure, androgen action and physiology. In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. The Physiology of Reproduction. (2^a Ed). Raven Press, NY., 1435-1488.
- MAQSOOD, M. (1950). Thyroid functions in relation to reproduction of mammals and birds. Biol. Rev.,27: 281-319.
- MATTA, S.L.P.; VILELA, D.A.R.; GODINHO, H.P.; FRANÇA, L.R. (2002). The goitrogen 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) given during testis development increases Sertoli and germ cells numbers per cyst in fish: the tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. Endocrinology, 143: 970-978.
- MEACHEM, S.J.; MCLACHLAN, R.I.; KRETZER, D.M.; ROBERTSON, D.M.; WREFORD, N.G. (1996). Neonatal exposure of rats to recombinant follicle stimulating hormone increases adult Sertoli and spermatogenic cell numbers. Bio. Reprod., 54: 36-44.
- MEACHEM, S.J.; MCLACHLAN,R.I.; STANTON, P.G.; ROBERTSON, D.M.; WREFORD, N.G. (1999). FSH immunoneutralization acutely impairs spermatogonial development in normal adult rats. J. Androl., 20:756-762.
- MENDIS-HANDAGAMA, S.M.L.C.; ARIYANTE, H.B.S.; TEUNISSEN, K.R.; HAUPT, L.R. (1998). Differentiation of adult Leydig cell in the neonatal rat testis is arrested by hypothyroidism. Biol. Reprod., 59: 351-357.
- MINUCCI, S.; DI MATTEO, L.; CHIEFFI, P.; PIERANTONI, R.; FASANO, S. (1997). 17 β -estradiol effects on mast cell number and spermatogonial mitotic index in the testis of the frog, *Rana esculenta*. J. Exp. Zool. 278: 93–100.

- MIRANDA, L.A.; PISANO, A.; CASCO, V. (1996). Ultrastructural study on thyroid glands of *Bufo arenarum* larvae kept in potassium perchlorate solution. *Biocell*,20:147–153.
- MURTA, D.V.F.; GOMES, V.C.L.; MARTINEZ, L.C.R. (2013). A organização celular dos testículos de mamíferos. *Rev. Cie. Elet. Med. Vet.*, 20.
- NICHOLLS, P.K.; HARRISON, C.A.; WALTON, K.L.; MCLACHLAN, R.I.; O'DONNELL, L.; STANTON, P.G. (2011). Hormonal Regulation of Sertoli Cell Micro-RNAs at Spermiation. *Endocrinology*, 152: 1670–1683.
- NORRIS, D.O. (1999). Thyroid hormone in Subavian Vertebrates. . In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. *Encyclopedia of Reproduction*. San Diego: Academic Press., 4: 807-812.
- OPITZ, R.; HARTMANN, S.; BLANK, T.; BRAUNBECK,T.; LUTZ, I.; KLOAS, W. (2006). Evaluation of histological and molecular endpoints for enhanced detection of thyroid system disruption in *Xenopus laevis* tadpoles. *Toxicol.Sci.*, 90(2): 337–348.
- ORTH, J.M.; GUNSALUS, G.L.; LAMPERTI, A.A. (1988). Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology*, 122(3): 787-794.
- ORTH, J.M. (1993). Cell Biology of Testicular Development in fetus and neonate. In: DESJARDINS, C.; EWING, L.L. *Cell and molecular biology of the testis*. New York: Oxford University Press, 1: 3-42.
- O'SHAUGHNESSY, P.J.; VERHOEVEN, G.; DE GENDT, K.; MONTEIRO, A.; ABEL, M.H. (2010). Direct action through the Sertoli cells is essential for androgen stimulation of spermatogenesis. *Endocrinology*, 151(5): 2343–2348.
- PALMERO, S.; MARCHIS, M.; GALLO, G.; FUGASSA, E. (1988). Thyroid hormone affects the development of Sertoli cell function in the rat. *J. Endocrinol.*, 123: 105-111.

- PANIAGUA, R; FRAILE, B.; SAEZ, F.J. (1990). Effects of photoperiod and temperature on testicular functions in amphibians. *Hist.Histopatol.*, 5(3): 365-378.
- PARUA, S.; DEBNATH, J.M.; GHOSH, D. (2011). Effect of an increase in environmental temperature on testicular androgens and spermatogenesis in toads (*Bufo melanostictus*) during hibernating season. *Zoo. Biol.*, 30: 681-688.
- PAULY GB, HILLIS DM, CANNATELLA DC. (2009). Taxonomic freedom and the role of official lists of species names. *Herpetologica*, 65(2): 115-128.
- PAYNE, A.H., HARDY, M.P., RUSSELL, L.D. (1996). The Leydig cell. (Eds.). Vienna: Cache River Press, 2: 31-42.
- PELLENIEMI, L.J.; KUOPIO, T.; FROJDMAN, K. (1996). The cell biology and function of the fetal Leydig cell. In: PAYNE, A.H.; HARDY, M.P.; RUSSELL, L.D. The Leydig cell. (Eds.). Viena: Cache River Press, 5: 143-157.
- PIERANTONI, R. (1998). Male reproductive system, amphibians. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. *Encyclopedia of Reproduction*. San Diego: Academic Press., 10-15.
- PIERANTONI, R.; COBELLIS, G.; MECCARIELLO, R.; PALMIERO, C.; FIENGA, G.; MINUCCI, S.; FASANO, S. (2002). The amphibian testis as model to study germ cell progression during spermatogenesis. *Comp. Biochem. Physiol.*, 132: 131-139.
- PIPREK, R.P.; PECIO, A.; SZUMURA, J.M. (2010). Differentiation and development of gonads in the yellow-bellied toad, *Bombina variegata* L., 1758 (Amphibia: Anura: Bombinatoridae). *Zool. Sci.*, 27: 47-55.
- POZZI, .A.G.; CEBALLOS, N.R. (2000). Human chorionic gonadotropin-induced spermiation in *Bufo arenarum* is not mediated by steroid biosynthesis. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 119: 164-171.

- PUDNEY, J. (1993). Comparative cytology of the non-mammalian vertebrate Sertoli cell. In: RUSSELL, L.D.; GRISWOLD, M.D. (Ed.) The Sertoli Cell. Cache River Press, Clearwater, FL., 612-657.
- RAHMAN, F.B.; YAMAUCHI, K. (2010). Characterization of iodothyronine sulfotransferase activity in the cytosol of *Rana catesbeiana* tadpole tissues. Gen. Comp. Endocrinol., 166: 396-403.
- RASTOGI, R.K., IELA, L. (1980). Steroidogenesis and spermatogenesis in anuran amphibia: a brief survey. In: DELRIO, G., BRACHET, J. Steroids and Their Mechanism of Action in Non-mammalian Vertebrates. Raven Press, New York. 131–146.
- ROSEMBLIT, C.; POZZI, A.G.; CEBALLOS, N.R. (2006). Relationship between steroidogenesis and spermiation in *Rana catesbeiana* and *Leptodactylis ocellatus*. J. Comp. Physiol., 176: 559-566.
- ROSER, J.F. (2008). Regulation of testicular function in the stallion: An intricate network of endocrine, paracrine and autocrine systems. Anim. Reprod. Sci., 107: 179–196.
- RUSSELL, L.D.; ETTLIN, R.A.; SINHA-HIKIM, A.P.; CLEGG, E.D. (1990). Mammalian spermatogenesis. In: RUSSELL, L.D.; ETTLIN, R.A.; SINHA-HIKIM, A.P.; CLEGG, E.D. (eds). Histological and histopathological evaluation of the testis. Clearwater: Cache River Press., 1-40.
- RUSSELL, L.D. (1993). Postnatal and pubertal development. In: RUSSELL, L.D.; GRISWOLD, M.D. (Ed.). The Sertoli Cell. Cache River Press, Clearwater, 115-153.
- RUSSELL, L.D. CORBIN, T.J.; BORG, K.E.; FRANÇA, L.R.; GRASSO, P. BARTKE, A. (1993). Recombinant human follicle-stimulating hormone is capable of exerting a biological effect in the adult hypophysectomized rat by reducing the numbers of degenerating germ cells. Endocrinology, 133: 2062-2070.

- SADLEIR, R.M.F.S. (1973). Amphibians. In: The reproduction of vertebrates. Academic Press, New York, 36-52.
- SANTOS, L.R.S; OLIVEIRA, C. (2008). Histological aspects and structural characteristics of the testes of *Dendropsophus minutus* (Anura, Hylidae). *Micron*, 3: 1266–1270.
- SANTOS, L.R.S; FRAANCO-BELUSSI, L.; OLIVEIRA, C. (2011). Germ cell dynamics during the annual reproductive cycle of *Dendropsophus minutus* (Anura: Hylidae). *Zoo. Sci.*, 28: 840-844
- SASSO-CERRI, E.; De FARIA, F.P.; FREYMULLER, E.; MIRAGLIA, S.M. (2004). Testicular morphological changes during the seasonal reproductive cycle in the bullfrog *Rana catesbeiana*. *J. Exp. Zool.*, 301(A): 249-260.
- SASSO-CERRI, E., CERRI, O.S.; FREYMULLER, E.; MIRAGLIA, S.M. (2006). Apoptosis during the seasonal spermatogenic cycle of *Rana catesbeiana*. *J. Anat.*, 209: 21-9.
- SCHULZ, W.; HOLSTEIN, A.F. (1993). Postnatal and pubertal development. In: RUSSELL, L.D.; GRISWOLD, M.D. *The Sertoli Cell*. Cache River Press, Clearwater, FL., 115 - 153.
- SCHULZ, R.W.; FRANÇA, L.R.; LAREYRE, J.J.; LE GAC, F., CHIARINI-GARCIA H., NOBREGA, R.H.; MIURA, T. (2009). Spermatogenesis in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 165(3): 390-411.
- SEGATELLI, T.M.; BATLOUNI, S.R.; FRANÇA, L.R. (2009). Duration of spermatogenesis in the bullfrog (*Lithobates catesbeianus*). *Theriogenology*, 72: 894–901.

- SETCHELL, B.P. (1991). Male reproductive organs and semen. In: CUPPS, P.T. Reproduction in Domestic Animals. (4^a Ed.) San Diego: Academic Press, 221-250.
- SHARPE, R.M. (1994). Regulation of spermatogenesis. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. The Physiology of Reproduction. (2^a Ed). Raven Press, NY., 1363 p.
- SHI, Y-B. (1999). Amphibian metamorphosis. Morphology to Molecular Biology. John Wiley, New York. 304 p.
- SILVA, M. (1987). Morfologia ultraestrutural do testículo, cinético da espermatogênese e barreira hemo-testicular da tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (Peixe, Cicídeo). Tese de Doutorado Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, 164 p.
- SIRIANNI, S.A.R.; FORASTIERI, P.; CASABURI, I.; LANZINO, M.; RAGO, V.; GIORDANO, F.; GIORDANO, C.; CARPINO, A.; PEZZI, V. (2001). Aromatase expression in prepuberal Sertoli cells: effect of thyroid hormone. Mol. Cell. Endocr., 178: 11–21.
- SPRANDO, R.L.; RUSSELL, L.D. (1988). Spermiogenesis in the bullfrog (*Rana catesbeiana*): A study of cytoplasmic events including cell volume changes and cytoplasmic elimination. J. Morphol., 198: 303-319.
- TATA, J.R. (1998). Hormonal signaling and postembryonic development. Springer, Berlin. 240 p.
- TATA, J.R. (2006). Amphibian metamorphosis as a model for the developmental actions of thyroid hormone. Mol. Cell. Endocrinol., 246: 10-20.
- TEERDS, K.J.; ROOIJ, D.G. JOMG, F.H. VAN HAASTER, L.H. (1998). Development of the adult-type Leydig cell population in the rat is affected by neonatal thyroid hormone-levels. Biol. Reprod., 59: 344-350.

- TELES, M.E.O. (1986). Biologia reprodutiva da pirambeba *Serrasalmus brandtii* Reinhardt, 1874 (Pisces, Characidae) da represa de Três Marias, rio São Francisco, MG. Tese Mestrado Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, 110 p.
- TIETGE, J. E.; HOLCOMBE, G.W.; FLYNN, K. M.; KOSIAN, P.A.; KORTE, J.J.; ANDERSON, L. E.; WOLF, D.C.; DEGITZ, S.J. (2005). Metamorphic inhibition of *Xenopus laevis* by sodium perchlorate: effects on development and thyroid histology. *Environ. Toxicol. Chem.*, 24(4): 926–933.
- VAN HAASTER, L.H.; DE JONG, F.H.; DOCTER, R.; DE ROOIJ, D.G. (1992). The effect of hypothyroidism on Sertoli cell proliferation and differentiation and hormone levels during testicular development in the rat. *Endocrinology*, 131(3): 1574-1576.
- VIEIRA MI. (1993). Rã-touro gigante: características e reprodução. São Paulo, INFOTEC. Ed. Nobel, 80 p.
- VIZOTTO, L.D. (1986). Ranicultura brasileira. *Bol. Assoc. Nac. Ran.*, v. 4.
- ZIRKIN, B.R.; AWONIYI, C. GRISWOLD, M.D.; RUSSELL, L.D. SHARPE, R (1994). Is FSH required for adult spermatogenesis? *J. Androl.*, 15: 273-276.
- ZOHAR, Y.; MUNOZ-CUETO, J.A.; ELIZUR, A.; KAH, O. (2010). Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol*, 165: 438-455.
- WILLIS, Y.L.; MOYLE, D. L.; BASKETT, T.S. (1956). Emergence, breeding, hibernation, movements and transformation of the bullfrog, *Rana catesbeiana*, in Missouri. *Copeia*, 1: 30-41.

EFEITO DO HIPOTIREOIDISMO TRANSITÓRIO INDUZIDO PELO 6-N-PROPIL-2-TIOURACIL
(PTU) SOBRE O TESTÍCULO DE RÃ-TOURO (*LITHOBATES CATESBEIANUS*)

1. INTRODUÇÃO

Durante muito tempo, o testículo foi considerado indiferente à ação dos hormônios tireoidianos, uma vez que os estudos neste sentido eram realizados com indivíduos adultos (Andò et al., 2001). No entanto, Maqsood (1950) afirmou que drogas antitireoidianas são capazes de alterar a massa gonadal e o processo espermatogênico, mas essa alteração varia de acordo com a idade do animal, com a dose e duração do tratamento.

Nos últimos 20 anos vários estudos associaram a ação dos hormônios tireoidianos sobre os testículos, principalmente em mamíferos, demonstrando que a proliferação das células de Sertoli, assim como a função esteroidogênica e gametogênica do testículo, são reguladas direta ou indiretamente por esses hormônios (Pudney, 1993; Cooke, 1991; Segatelli et al., 2009). Além disso, Palmero et al. (1988), ao analisarem a disponibilidade de receptores de hormônios tireoidianos em testículos de ratos, observaram que esses receptores são expressos em grande quantidade durante o final da fase fetal e nas três primeiras semanas de desenvolvimento testicular pós-natal, predominantemente na célula de Sertoli. Assim, os hormônios tireoidianos agem, principalmente, na célula de Sertoli de indivíduos jovens. Dentre as funções da célula de Sertoli estão a determinação do tamanho do testículo, de acordo com número de células de Sertoli existente e a produção espermática, já que a célula de Sertoli tem capacidade de suportar um número fixo de células germinativas durante a espermatogênese. Esse número é estabelecido quando essa célula finaliza o seu período de multiplicação (Orth, 1993; Hess et al., 1993).

Os hormônios tireoidianos induzem a maturação das células de Sertoli, cessando sua multiplicação (Cooke et al., 1994; Cooke, 1996). Nesse sentido, o hipertireoidismo neonatal cessa precocemente a proliferação dessa célula e estimula a diferenciação funcional, resultando em testículos menores e na consequente diminuição da produção espermática diária. Por outro lado, o hipotireoidismo neonatal prolonga a proliferação das células de Sertoli aumentando a população dessa célula o que aumenta o tamanho dos testículos e produção espermática diária em animais adultos

(Van Haaster et al., 1992; Matta et al., 2002). Cooke et al. (1994) ressaltam a viabilidade do modelo de hipotireoidismo transitório em espécies economicamente importantes, uma vez que ele aumenta a produção espermática, logo a reprodução, sem alterar os custos fixos da produção animal.

A rã-touro, *Lithobates catesbeianus*, foi introduzida no Brasil em 1935 com a finalidade de abastecer o mercado de carnes exóticas, mas somente na década de 1980 houve maior atividade de produção de rãs no país. Desde então, a demanda potencial de carne de rã no Brasil supera a oferta, indicando um quadro otimista dessa atividade no país (Feix et al., 2006; EMATER,2013). Sabendo da potencialidade do mercado de carne de rã, assim como a necessidade de metodologias que aumentem a produção desse animal, o modelo de hipotireoidismo transitório durante a fase neonatal torna-se interessante para esse contexto, uma vez que vários estudos têm demonstrado excelentes resultados com outras espécies (Cooke et al., 1993; Jannini et al., 1995; Matta et al., 2002; Holsberger e Cooke, 2005). Além disso, é importante verificar como hipotireoidismo transitório, induzido por 6-n-propil-2-tiouracil (PTU), afeta a organização testicular de anuros quando retornam ao estado de eutireoidismo.

Sendo assim, este estudo representa uma oportunidade de compreender as características testiculares quando os girinos são submetidos ao hipotireoidismo transitório induzido pelo PTU, e a partir desse entendimento inferir sobre a aplicação da metodologia para aumento da produção espermática da rã-touro, enquanto espécie economicamente importante.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Animais

Foram utilizados 240 girinos de rã-touro na fase 34 de Gosner (1960), provenientes do Ranário Experimental da Universidade Federal de Viçosa (REUFV). Essa fase de desenvolvimento é caracterizada pela ausência dos membros posteriores, enquanto os membros anteriores tornam-se conspícuos, com leve distinção entre o segundo e o terceiro artelhos. Na fase 34 de Gosner as células de Sertoli não estão diferenciadas, qualidade importante para aplicar o modelo de hipotireoidismo transitório.

Os girinos foram divididos em três grupos de 80 animais, em densidade de um animal por litro em caixas de polipropileno, sendo mantidos em condições

laboratoriais (temperatura $29,5^{\circ} \text{ C} \pm 1,5^{\circ} \text{ C}$ e fotoperíodo de 12 claro/12 escuro). O grupo um (G1) representou os animais controle; o grupo dois (G2), os animais tratados com solução de 6-n-propil-2-tiouracil (PTU) na concentração de 75 ppm e o grupo três (G3) continha os animais submetidos a 150 ppm de PTU previamente diluído em água. Após trinta dias de aclimação os grupos G2 e G3 iniciaram o tratamento, sendo mantidos em suas respectivas soluções antitireoidianas durante 60 dias. Passado esse período, os animais foram mantidos em água, na mesma densidade de animal por litro até o clímax da metamorfose.

O experimento foi conduzido de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e aprovado pelo CEUA/UFV (Comitê de Ética em Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa) cujo protocolo de aprovação é 55/2012.

2.2. Verificação do Desenvolvimento Gonadal

Com a finalidade de verificar o desenvolvimento gonadal, foram eutanasiados dez animais por grupo em três momentos distintos: antes da inserção das respectivas soluções antitireoidianas, no trigésimo e no sexagésimo dia (último dia) de tratamento.

Todos os animais eutanasiados foram medidos e pesados a fim de analisar a biometria durante o tratamento.

2.3. Confirmação da Indução ao Hipotireoidismo em Girinos

Para confirmar o hipotireoidismo nos girinos foram retirados o maxilar inferior juntamente com a glândula tireoide dos animais eutanasiados no sexagésimo dia de tratamento. Este material foi fixado durante 24 horas em paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,4), seguido pelo protocolo de inclusão em glicol metacrilato realizado no laboratório de Biologia Celular e Estrutural da UFV.

As proporções volumétricas dos elementos tireoidianos foram estimadas a partir de 1000 intersecções por animal, utilizando-se retículo com 266 intersecções (pontos), projetadas sobre imagens obtidas em objetiva de 20x em fotomicroscópio Olympus BX-50 (Olympus, Tokyo). Foi estimada a proporção volumétrica do epitélio folicular, do lume folicular, do tecido conjuntivo, do vaso sanguíneo e dos pigmentos interfoliculares.

Foi mensurado o diâmetro médios dos dez maiores lumes foliculares, os mais circulares possíveis, por animal em imagens obtidas com objetivas de 20x. A partir

dessas medidas foi calculada a área do lume folicular através da fórmula: $AL = \pi \cdot R^2$, onde R é igual a raio.

2.4. Duração do Experimento

O experimento teve duração de dez meses divididos nas seguintes etapas: durante um mês os espécimes foram mantidos em condições laboratoriais para adaptação; dois meses de experimentação, quando os girinos foram submetidos aos respectivos tratamentos com PTU (G2 e G3) ou mantidos em condições semelhantes aos grupos tratados, mas sem intervenção da solução antitireoidiana (G1); sete meses sem tratamento, quando os animais retornaram ao estado de eutireoidismo e estavam aptos a reproduzir. Os animais destes grupos foram eutanasiados conforme cronograma previamente estabelecido sendo então coletados os órgãos eleitos para a pesquisa.

2.5. Manejo Geral

Enquanto os animais estavam na fase de girinos a limpeza foi realizada em intervalos regulares de dois dias. Durante a fase experimental foi realizada a sucção do fundo das caixas retirando matéria orgânica decantada e dez litros da solução antitireoidiana (G2 e G3) ou água (G1). Após a limpeza era adicionada a quantidade de água retirada em G1 e a mesma quantidade de solução antitireoidiana nas respectivas concentrações já previamente diluída para G2 (75 ppm de PTU) e G3 (150 ppm de PTU).

Ao fim dos 60 dias experimentais, toda água (G1) e solução antitireoidiana (G2 e G3) foram eliminadas das caixas, sendo realizada a limpeza, seguida da adição da mesma quantidade de água para todos os grupos. Os girinos permaneceram neste local até o clímax da metamorfose. Após a metamorfose todos os animais foram transferidos para as baias de crescimento climatizadas (temperatura $29,5^{\circ}\text{C} \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h claro/12 h escuro) com dimensão de 1m de altura, 1,2m de largura e 0,9m de comprimento com canaleta de 64l, onde permaneceram até próximo a idade reprodutiva, momento no qual as rãs foram eutanasiadas.

Em todas as fases foi oferecida ração *ad libitum* com 42% de proteína bruta, três vezes ao dia. Durante a fase larval foi ofertada ração moída, enquanto na juvenil e

adulta foi disponibilizada ração com granulometria de 3-4 mm juntamente com larva de mosca doméstica.

2.6. Coleta, Processamento e Fixação do Material

2.6.1. Fatores bióticos e abióticos

Foram mensurados regularmente a temperatura da água e do ar, bem como o pH da água e a quantidade de compostos nitrogenados presentes no ambiente de desenvolvimento dos animais.

2.6.2. Eutanásia e Análise Biométricas

Foram realizadas três coletas na fase larval para verificação do desenvolvimento gonadal: antes da inserção do tratamento antitireoidiano, no trigésimo e no sexagésimo dia de tratamento. Foram eutanasiados dez girinos por tratamento a cada coleta. Outra coleta foi realizada quando as rãs estavam próximas a idade reprodutiva, aos sete meses após a retirada do tratamento. Sendo eutanasiados cinco, quatro e seis rãs respectivamente no grupo G1, G2 e G3.

A eutanásia dos animais foi decorrente de overdose de anestésico (hidroclorato de benzocaína), seguida pela realização de um corte longitudinal na região ventral para remoção dos testículos. Em todas as coletas as gônadas foram pesadas, fixadas durante 24 horas em paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,4), seguido pela conservação em álcool 70%.

Também foram mensurados o comprimento rostro-cloacal (CRC) e peso corporal (PC). Este último foi realizado para calcular o índice gonadossomático (IGS) obtido pela relação entre o peso da gônada (PG) e peso corporal (PC), sendo $IGS = PG/PC \times 100$.

2.6.3. Análises Histológicas

Para as análises em microscopia de luz, fragmentos testiculares foram desidratados em série etanólica crescente, seguido pela infiltração e inclusão em glicol metacrilato (Historesin[®], Leica). Os cortes seriados de 3 µm, obtidos em micrótomo rotativo (Reichert-Jung; Alemanha) com navalha de vidro, foram coletados sequencialmente, corados com azul de toluidina 0,5%/borato de sódio 1%. As

preparações foram montada com Entellan[®] (Merck, Frankfurt, Alemanha) e utilizadas para análise da morfologia testicular.

As imagens de microscopia de luz foram capturadas usando fotomicroscópio Olympus BX-50 (Olympus, Tokyo). A histometria foi realizada utilizando o programa de análise de imagens *Image Pro Plus 4.5*[®] (Media Cybernetics, USA), de acordo com metodologia aplicada por Matta et al. (2002) para tilápia nilótica e Carlos e Matta (2009) e Gomes et al. (2012) para rã-touro.

2.6.3.1. Proporções Volumétricas (%) do Parênquima Testicular.

As proporções volumétricas de túbulo e intertúbulo (Fig.1), constituintes do parênquima testicular, foram estimadas a partir de 2660 intersecções por animal projetadas sobre imagens obtidas com objetiva de 20x. Utilizando-se retículo com 266 intersecções (pontos) (Fig.2) foi realizada a contagem de dez campos aleatórios por animal. Foram registrados pontos sobre o compartimento intertubular e tubular, sendo este último distinguido quanto ao lume, lâmina própria e epitélio. Os pontos sobre o epitélio distinguiram os tipos de cistos de células germinativas (espermatogônia A, espermatogônia B, espermatócito primário, espermatócito secundário e espermatíde inicial).

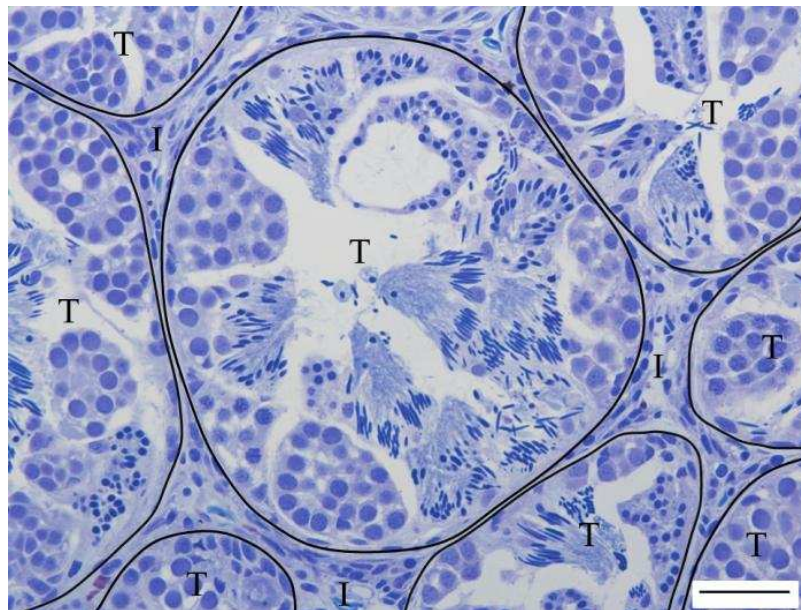


Figura 1. Histologia testicular de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) em idade reprodutiva. Azul de toluidina e borato de sódio 1%. Compartimento Tubular (T) e Compartimento Intertubular (I). Barra= 50 μ m.

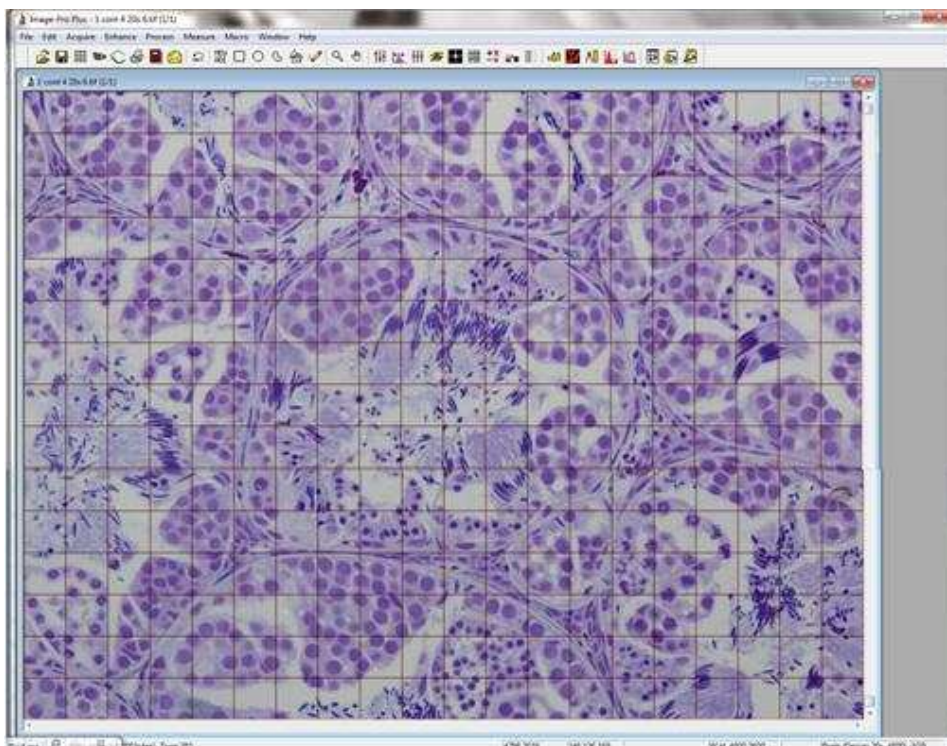


Figura 2: Retículo aplicado sobre imagens capturadas de cortes histológicos dos testículos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) em idade reprodutiva.

2.6.3.2. Contagem de Células Germinativas e de Células de Sertoli nos Cistos Espermatogênicos

A contagem dos espermatócitos primários, espermatócitos secundários, espermátides na fase inicial da espermiogênese e célula de Sertoli foram realizadas em secções histológicas seriadas com 3 μm de espessura (Figuras 3A e B). Foi contada a população de célula germinativa e de Sertoli em cinco cistos de cada tipo celular mencionado acima totalizando quinze cistos por animal. As contagens foram feitas inicialmente nos cistos localizados nas secções intermediárias, seguindo-os nas secções crescentes e decrescentes até que o cisto em questão não fosse mais observado. Nestas análises, foram determinados os diâmetros nucleares médios das células mencionadas.

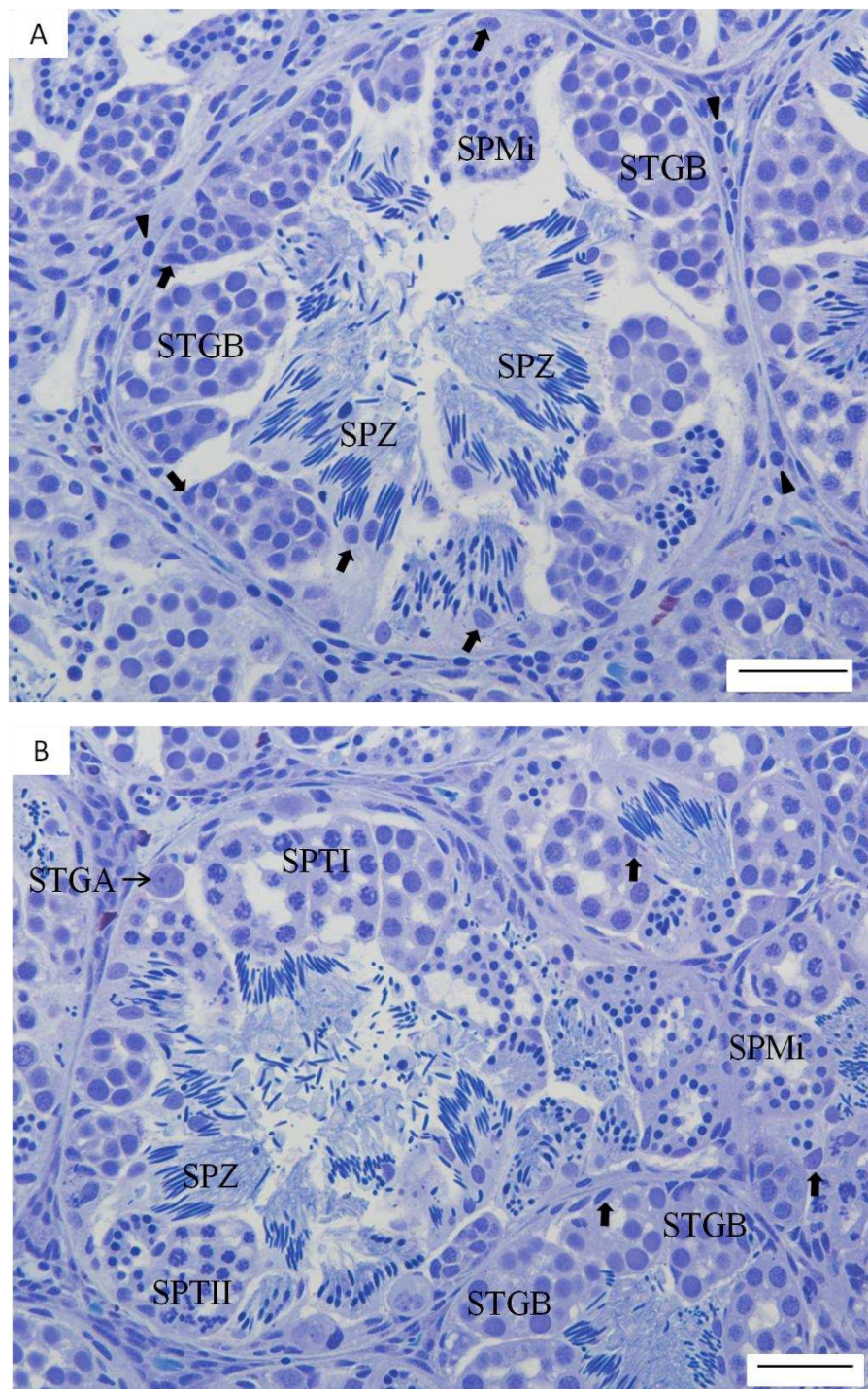


Figura 3 A e B: Características histológicas dos cistos germinativos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) durante o desenvolvimento do processo espermatogênico. Coloração em azul de toluidina e borato de sódio. Espermatogônia A (STGA); Espermatogônia B (STGB); Espermatócito primário (SPTI); Espermatócito secundário (SPTII); Espermátide durante o início da espermiogênese (SPMi); Espermatozoide (SPZ); Célula de Sertoli (▴); Célula de Leydig (◻); barra = 50 µm.

2.6.3.3. Razões Entre Tipos Celulares no Testículo.

Para avaliar a perda durante processo espermatogênico e a capacidade de suporte da célula de Sertoli nos grupos tratados e controle, foram estimadas as seguintes razões:

- espermatócito primário : espermatogônia B esperado;
- espermátides iniciais : espermatócitos primários;
- espermatócitos primários : célula de Sertoli;
- espermatócitos secundários : célula de Sertoli;
- espermátides iniciais : células de Sertoli.

O índice mitótico foi calculado a partir da razão entre o número de espermatogônias esperada no fim de oito gerações espermatogoniais, 256 células, estabelecido por Carlos e Matta (2009) para rã-touro, e o número obtido de espermatócitos primários por cisto; enquanto o índice meiótico foi calculado a partir da razão entre espermátides iniciais e espermatócito primário.

2.6.3.4. Determinação da Área do Túbulo e dos Diferentes Cistos de Células Germinativas

As áreas tubular e dos cistos, referentes aos tipos celulares contados, foram obtidas a partir da mensuração de cinco secções transversais do túbulo seminífero e dos cistos que apresentavam o contorno o mais circular possível.

2.6.3.5. Morfometria das Células de Leydig

Para morfometria da célula de Leydig foram medidos o diâmetro nuclear médio da célula em imagens capturadas com objetiva de 40x. Cinco núcleos de células de Leydig foram medidos por animal, sendo realizada a mensuração sobre os núcleos que apresentavam o contorno mais circular possível. A partir desses dados foram calculados o volume nuclear, o volume do citoplasma e, conseqüentemente, o volume de cada célula de Leydig por animal em μm^3 , conforme segue:

- Volume nuclear = $4/3\pi R^3$ onde, R = raio nuclear
- Volume citoplasmático = % citoplasma x volume nuclear / % núcleo
- Volume celular = volume nuclear + volume citoplasmático

2.7. Análises Estatísticas

Os valores médios obtidos para os grupos investigados foram expressos como média ± erro padrão, sendo analisados através da análise de variância (ANOVA), utilizando-se o teste *Student Newman-Keuls* (SNK) do programa Statistica 3.11 para Windows (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, 1995). O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1. Características Biométricas

3.1.1. Biometria em Girinos

A biometria dos girinos após 60 dias de tratamento com PTU está presente na Tabela 1. O peso corporal e o comprimento total dos girinos apresentaram diferença significativa entre o grupo controle (G1) e grupos tratados (G2 e G3). Animais do grupo G2 mostraram redução de 29% do peso corporal em relação ao G1, enquanto o mesmo parâmetro em G3 apresentou redução de 25% em relação ao G1. Os girinos dos grupos tratados (G2 e G3) foram menores que os controles, sendo observada redução de 12% de G2 para G1 e 13% de G3 para G1 ($p < 0,05$).

Tabela 1- Biometria corporal de girinos de rã-touro no sexagésimo dia de tratamento com 6-n-propil-2-tiouracil (PTU) em duas concentrações.

Parâmetros	G1	G2	G3
Peso corporal (g)	2,42 ± 0,74 ^a	1,73 ± 0,37 ^b	1,82 ± 0,55 ^b
		(29%)	(25%)
Comprimento total (mm)	66,37 ± 6,20 ^a	58,58 ± 4,70 ^b	57,82 ± 5,31 ^b
		(12%)	(13%)

Resultados expressos em média ± desvio padrão. G1: controle; G2: PTU75 ppm; G3: PTU 150 ppm. Número entre parênteses representa a percentagem de redução dos grupos tratados em relação ao grupo controle. Letras iguais nas colunas indicam semelhança estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

3.1.2. Biometrias em Rãs

Os parâmetros biométricos das rãs, sete meses após a indução ao hipotireoidismo, estão dispostos na Tabela 2. Não houve diferença significativa entre

os grupos tratados e controle em relação ao comprimento rostro-cloacal (CRC), massa corporal, massa testicular e índice gonadossomático (IGS) ($p > 0,05$).

Tabela 2- Dados biométricos de rãs-touro em idade reprodutiva sete meses após a submissão ao hipotireoidismo transitório com 6-n-propil-2-tiouracil (PTU) em duas concentrações.

Parâmetros	G1 (n=5)	G2 (n=4)	G3 (n=6)
CRC (mm)	114,31 ± 7,21	113,76 ± 8,16	120,46 ± 6,49
PC (g)	159,67 ± 78,68	141,50 ± 30,77	163,19 ± 32,04
PT (g)	0,11 ± 0,064	0,07 ± 0,31	0,13 ± 0,07
IGS (%)	0,07 ± 0,02	0,05 ± 0,02	0,07 ± 0,03

Resultados expressos em média ± desvio padrão. G1: controle; G2: PTU 75 ppm; G3: PTU 150 ppm. Comprimento rostro-cloacal (CRC); Peso corporal (PC); Peso dos testículos (PT); Índice gonadossomático (IGS); n: número de rãs.

3.2. Análises Histológicas

3.2.1. Desenvolvimento Gonadal

Em todas as coletas realizadas durante o período experimental, a fim de avaliar o desenvolvimento gonadal, notou-se que somente as fêmeas poderiam ser distinguidas, devido à diferenciação gonadal já evidente. Os animais cujas gônadas não estavam totalmente diferenciadas foram considerados machos. Nestes animais foram observadas somente células somáticas e poucas células germinativas iniciais (espermatogônias).

3.2.2. Proporção Volumétrica dos Constituintes da Glândula Tireoide em Girinos de rã-touro no sexagésimo dia de tratamento

Nas Tabelas 3 e 4 observam-se os parâmetros analisados na tireoide dos girinos eutanasiados no sexagésimo dia de tratamento. A proporção volumétrica do lume folicular, dos vasos sanguíneos e do tecido conjuntivo (Tabela 3) e o diâmetro e a área do lume folicular (Tabela 4) foram significativamente diferentes entre o grupo controle e os tratados ($p < 0,05$). A proporção volumétrica do lume folicular reduziu 24% de G2 para G1 e 37% de G3 para G1. Houve redução do diâmetro do lume folicular nos grupos G2 (33%) e G3 (37%) em relação ao G1. Quanto à área do lume folicular houve

redução de 54% em G2 e de 60% em G3, comparados G1. A redução do lume folicular foi associada com a quantidade de coloide disponível, uma vez que todos os lumes mensurados estavam repletos de coloide. Assim, a quantidade de coloide nos animais tratados reduziu em relação ao grupo controle, como já é esperado em animais com hipotireoidismo.

O tecido conjuntivo reduziu 57% de G2 para G1 e 54% de G3 para G1 enquanto os vasos sanguíneos, de ambos os grupos tratados (G2 e G3), tiveram aumento de 620% em relação ao controle (Tabela 3 e Figura 4).

Observa-se que a tireoide dos animais do grupo G1 possui pouco tecido conjuntivo, pobremente vascularizado, proporcionando que os folículos estejam adjacentes uns aos outros (Figuras A e D). Ao observar os animais dos grupos G2 e G3 nota-se que os folículos estão menores e mais dispersos sendo envolvidos por vasos sanguíneos em abundância (Figuras 4 B e E; C e F). Na tireoide do grupo G3 foram registrados folículos irregulares (Figuras 4 C e F).

Tabela 3 - Proporção volumétrica (%) dos constituintes da glândula tireoide de girinos rã-touro no sexagésimo dia de tratamento com 6-n-propil-2-tiouracil (PTU) em duas concentrações.

Parâmetro	G1	G2	G3
Ep	18 ^a	16 ^a	20 ^a
Col	46 ^a	35 ^b	29 ^b
		(24%)	(37%)
VS	5 ^a	36 ^b	36 ^b
		(620%)	(620%)
TC	28 ^a	12 ^b	13 ^b
		(57%)	(54%)
Pg	2 ^a	1 ^a	1 ^a

Resultados expressos em média. G1: controle; G2: PTU 75 ppm; G3: PTU 150 ppm. Epitélio folicular (EP); Coloide (Col); Vaso sanguíneo (VS); Tecido conjuntivo (TC); Pigmento interfolicular (Pg). Valores entre parênteses representam percentual de alteração dos grupos tratados em relação ao grupo controle. Letras iguais nas linhas indicam semelhança estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

Tabela 4 - Diâmetro (μm) e a área do lume folicular (μm^2) da tireoide de girinos de rã-touro no sexagésimo dia de tratamento com 6-n-propil-2-tiouracil (PTU) em duas concentrações.

Parâmetro	G1	G2	G3
DF	97,17 \pm 5,72 ^a	65,36 \pm 8,08 ^b (33%)	61,18 \pm 2,47 ^b (37%)
ALF	7432,49 \pm 868,49 ^a	3394,07 \pm 821,66 ^b (54%)	2941,95 \pm 236,44 ^b (60%)

Resultados expressos em média \pm desvio padrão. G1: controle; G2: PTU 75 ppm; G3: PTU 150 ppm. Diâmetro folicular expresso em μm (DF); Área do lume folicular (ALF). Valores entre parênteses representam percentual de alteração dos grupos tratados em relação ao grupo controle. Letras iguais nas linhas indicam semelhança estatística entre os grupos ($p > 0,05$).

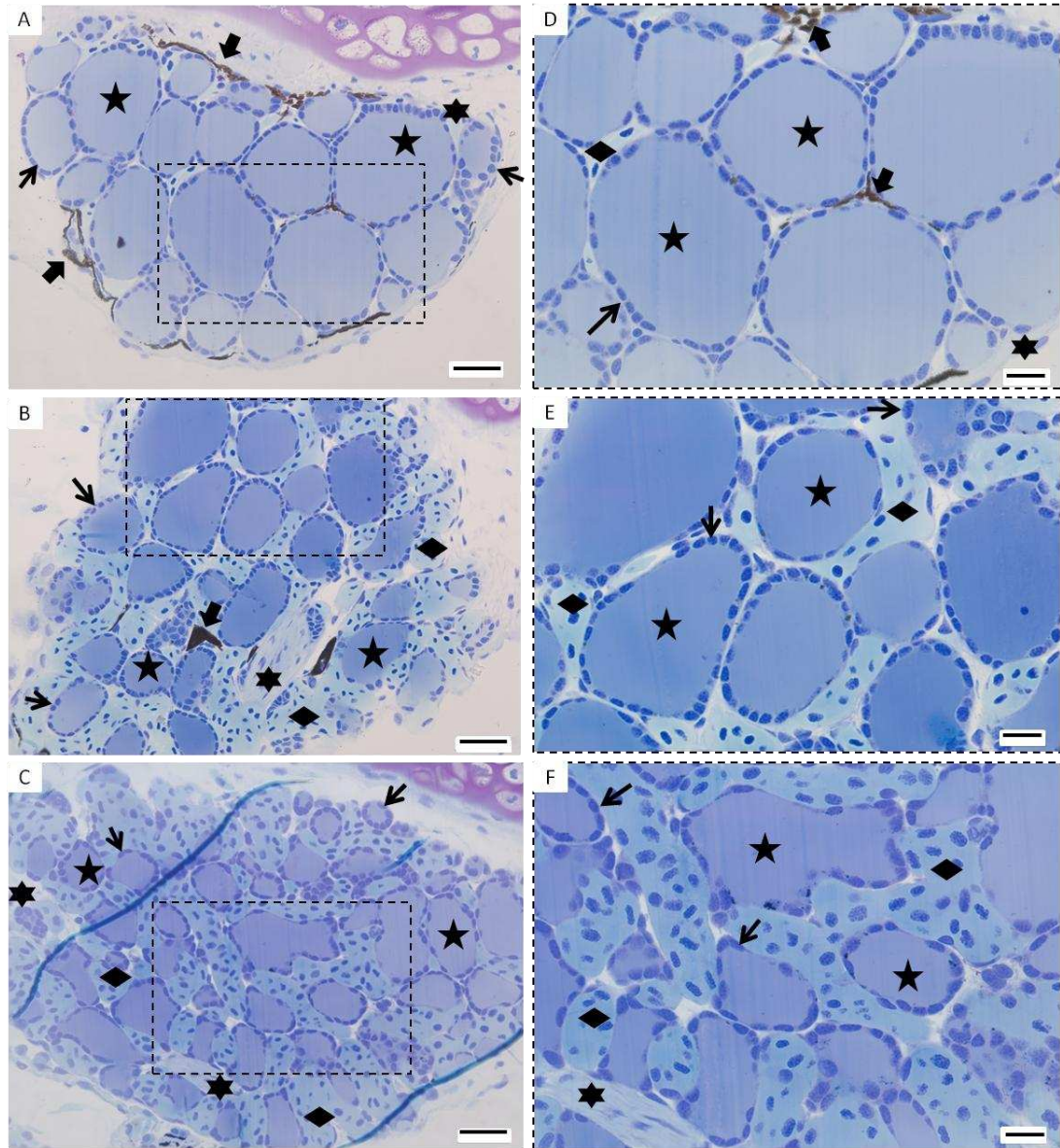


Figura 4: Características histológicas da glândula tireoide de girinos de rã-touro (*Lithobates catesbeianus*) no sexagésimo dia de tratamento com 6-n-propil-2-tiouracil. (A e D) grupo controle (G1); (B e E) grupo tratado com PTU 75 ppm (G2); (C e F) grupo tratado com PTU 150 ppm (G3). Coloração em azul de toluidina e borato de sódio. Pigmento interfollicular (▸); Epitélio folicular (→); Lume folicular (★); Vaso sanguíneo (◆); Tecido conjuntivo (■). Barra: A, B, C= 20 μ m; D, E, F= 50 μ m.

3.2.3. Proporção Volumétrica dos Compartimentos Tubular e Intertubular

As proporções volumétricas do parênquima testicular estão disponíveis na Tabela 5. Não houve alterações significativas na proporção volumétrica do compartimento tubular e intertubular entre os animais tratados e controle ($p > 0,05$), assim como não houve diferença na proporção dos constituintes tubulares como lume, epitélio e túnica própria.

Tabela 5- Proporção volumétrica (%) entre os diferentes componentes testiculares sete meses após a submissão ao hipotireoidismo transitório com 6-n-propil-2-tiouracil (PTU) em duas concentrações.

Parâmetros	G1 (n=5)	G2 (n=4)	G3 (n=6)
Compartimento Tubular	85,29	85,86	86,62
Epitélio (cisto)	50,94	54,68	51,82
Túnica própria	5,70	4,60	5,35
Lume	28,66	26,59	29,44
Compartimento intertubular	14,71	14,14	13,38

Resultados expressos em média. G1: controle; G2: PTU75 ppm; G3: PTU 150 ppm. n: número de rãs.

3.2.4. Frequência dos Cistos Germinativos

A frequência de cada tipo de cisto germinativo está apresentada na Figura 5. O cisto mais frequente em G1 foi de espermatogônia B, seguido do cisto de espermatócito primário, espermatíde inicial, espermatogônia A e espermatócito secundário. Nos grupos tratados o cisto mais frequente também foi de espermatogônia B, porém seguido por cistos de espermatíde inicial, espermatócito primário, espermatogônia A e espermatócito secundário. Em G1 e G3 a frequência de cistos na fase espermatogonial foi maior que a da fase espermatocitária, a qual, por sua vez, apresentou frequência superior a dos cistos na fase espermiogênica. Em G2 as fases de cistos mais frequentes foram: espermatogonial, seguido pela fase espermiogênica e espermatocitária. Em todos os grupos a frequência dos cistos da fase espermatocitária e espermiogênica foi encontrada em proporções semelhantes. Dentre os cistos espermatogoniais, aqueles contendo espermatogônia B foram mais frequentes em todos os grupos. Nesse sentido, durante a fase espermatocitária o espermatócito primário foi o cisto mais encontrado em todos os grupos. No entanto, não houve diferença significativa em relação à frequência de cistos germinativos entre os grupos tratados e controle.

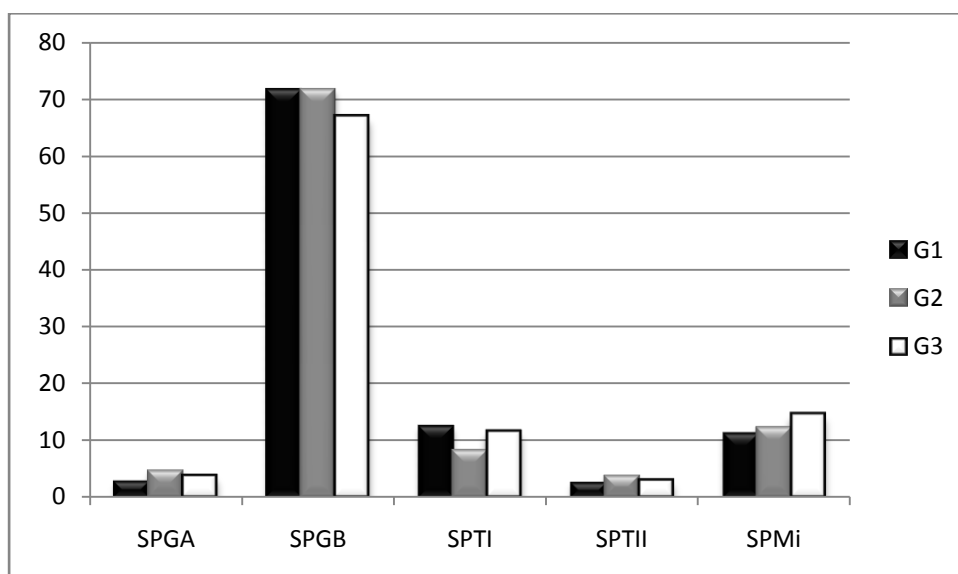


Figura 5: Frequência de cada tipo de cisto germinativo no túbulo seminífero de rãs-touro adultas sete meses após a submissão ao hipotireoidismo transitório com PTU em duas concentrações. Espermatogônia A: SPGA; Espermatogônia B: SPGB; Espermatócito primário: SPTI; Espermatócito secundário: SPTII; Espermátide inicial: SPMi.

3.2.5. Número de Células Germinativas e Células de Sertoli

As populações celulares presentes nos cistos de espermatócitos primários, espermatócitos secundários e espermátides iniciais foram quantificadas sete meses após o término do tratamento transitório com PTU, período em que as rãs estavam aptas a reproduzir. Estes valores estão presentes na Tabela 6. Não houve diferença significativa nas populações de células germinativas entre os grupos tratados e o controle. Como já era esperado, a população de célula germinativa cresceu gradativamente desde os cistos de espermatócitos primários até os cistos de espermátides iniciais.

O número de células de Sertoli contadas nos cistos de células germinativas da fase espermatocitária e espermiogênica inicial está descrito na Tabela 7. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre o número de células de Sertoli presente nos diferentes tipos de cistos de células germinativas analisados, assim como também não foram encontradas alterações relevantes quanto ao número de células de Sertoli entre o mesmo tipo de cisto germinativo, entre os grupos tratados e controle.

Tabela 6- Número de célula germinativa por diferentes tipos de cistos em rã-touro sete meses após a submissão ao hipotireoidismo transitório com 6-n-propil-2-tiouracil (PTU) em duas concentrações.

Parâmetros	G1 (n=5)	G2 (n=4)	G3 (n=6)
SPT I	95,32 ± 17,67	101,75 ± 8,25	109,83 ± 29,42
SPT II	150,40 ± 18,83	161,60 ± 16,05	165,63 ± 39,10
SPM _i	248,72 ± 42,38	279,10 ± 26,37	279,47 ± 34,83

Resultados expressos em média ± desvio padrão. G1: controle; G2: PTU 75 ppm; G3: PTU 150 ppm. n: número de rãs. SPT I: espermatócito primário; SPT II: espermatócito secundário; SPM_i, espermatíde inicial.

Tabela 7- Número de células de Sertoli por cistos de diferentes tipos de células germinativas, da fase espermatocitária e espermiogênica inicial, em rã-touro sete meses após a submissão ao hipotireoidismo transitório com 6-n-propil-2-tiouracil (PTU) em duas concentrações.

Parâmetros	G1 (n=5)	G2 (n=4)	G3 (n=6)
SPT I	14,20 ± 3,37	12,70 ± 1,99	13,40 ± 2,82
SPT II	13,40 ± 2,81	11,15 ± 2,14	13,30 ± 3,15
SPM _i	14,32 ± 2,30	14,30 ± 1,46	14,43 ± 2,41

Resultados expressos em média ± desvio padrão. G1: controle; G2: PTU 75 ppm; G3: PTU 150 ppm. n: número de rãs. SPT I: espermatócito primário; SPT II: espermatócito secundário; SPM_i, espermatíde inicial.

A razão entre o número de células germinativas e número de células de Sertoli está descrita na Tabela 8. Houve aumento no número de espermatócitos secundários por célula de Sertoli, demonstrando diferença significativa positiva de 28% na capacidade de suporte da célula de Sertoli comparando G2 em relação a G1 ($p < 0,05$). No entanto, quando analisada a capacidade de suporte da célula de Sertoli em cistos semelhantes entre os outros grupos (G1 e G3; G2 e G3) não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$).

Tabela 8- Razão entre o número de células germinativas da fase espermatocitária e espermiogênica inicial e número de células de Sertoli por cisto em rã-touro sete meses após a submissão ao hipotireoidismo transitório com 6-n-propil-2-tiouracil (PTU) em duas concentrações.

Parâmetros	G1 (n=5)	G2 (n=4)	G3 (n=6)
SPT I	6,71 ± 1,92 ^a	8,01 ± 0,87 ^a	8,20 ± 1,10 ^a
SPT II	11,22 ± 2,02 ^a	14,49 ± 2,58 ^b	12,45 ± 0,82 ^{ab}
SPM _i	17,37 ± 3,34 ^a	19,52 ± 3,21 ^a	19,36 ± 1,31 ^a

Resultados expressos em média ± desvio padrão. G1: controle; G2: PTU 75 ppm; G3: PTU 150 ppm. n: número de rãs. SPT I: espermatócito primário; SPT II: espermatócito secundário; SPM_i, espermátide inicial. Letras iguais nas colunas indicam semelhança estatística entre os grupos (p>0,05).

Os índices mitóticos e meióticos podem ser vistos na Tabela 9. Os valores encontrados para os dois índices demonstram que a maior perda celular ocorre durante a fase espermatogonial, alcançando 60% das células esperadas. A razão entre espermátide inicial por espermatócito primário, houve redução de 34%. Não foi encontrada diferença significativa dos índices mitóticos e meióticos entre os grupos tratados e controle.

Tabela 9- Índices Mitótico e Meiótico em rã-touro sete meses após submissão ao hipotireoidismo transitório com 6-n-propil-2-tiouracil (PTU) em duas concentrações.

Parâmetros	G1 (n=5)	G2 (n=4)	G3 (n=6)
Índice Mitótico			
SPG: SPT I	2,69 (62%)	2,52 (60%)	2,33 (57%)
Índice Meiótico			
SPM _i : SPT I	2,61 (34 %)	2,74 (31%)	2,54 (36%)

Resultados expressos em média. G1: controle; G2: PTU 75 ppm; G3: PTU 150 ppm. n: número de rãs; SPG: espermatogônia; SPT I: espermatócito primário; SPM_i, espermátide inicial. Número entre parênteses representa a percentagem de perda celular em relação ao valor teórico esperado.

3.2.6. Área dos Túbulos Seminíferos e de Cistos de Células Germinativas Envolvidas na Divisão Meiótica

Os resultados referentes às áreas dos túbulos seminíferos e dos cistos de células germinativas estão presentes na Tabela 10. A área do túbulo seminífero em G1 foi de $43.277 \mu\text{m}^2$, não sendo observada diferença significativa entre os grupos. Em relação à área de diferentes cistos germinativos, o cisto de espermatócito primário foi o que obteve maior valor em todos os grupos, enquanto que a menor área cística mensurada foi de espermatócito inicial, exceto em G3 que foi representado pelo cisto de espermatócito secundário. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e controle.

Tabela 10- Área do túbulo seminífero (mm^2) e dos cistos (μm^2) da fase espermatocitária e espermiogênica inicial em rã-touro sete meses após a submissão ao hipotireoidismo transitório com 6-n-propil-2-tiouracil (PTU) em duas concentrações.

Parâmetros	G1 (n=5)	G2 (n=4)	G3 (n=6)
Túbulo	$0,043 \pm 0,013$	$0,040 \pm 0,007$	$0,037 \pm 0,007$
SPT I	$3406,43 \pm 478$	$3196,70 \pm 196$	$3145,96 \pm 204$
SPT II	$2346,85 \pm 341$	$2679,21 \pm 292$	$2364,93 \pm 448$
SPM _i	$2147,24 \pm 439$	$2402,86 \pm 162$	$2445,63 \pm 446$

Resultados expressos em média \pm desvio padrão. G1: controle; G2: PTU 75 ppm; G3: PTU 150 ppm. n: número de rãs. SPT I: espermatócito primário; SPT II: espermatócito secundário; SPM_i, espermatócito inicial.

3.2.7. Proporção Volumétrica entre os diferentes elementos do compartimento intertubular

Os dados referentes às proporções volumétricas dos elementos do intertúbulo são mostrados na Tabela 11. Dentre todos os elementos do intertúbulo, o tecido conjuntivo é o mais abundante, ocupando em torno de 70% desse compartimento em G1, G2 e G3. O componente menos encontrado foi o mastócito, representando em torno de 1% do total do intertúbulo. Não houve diferença significativa dos elementos do intertúbulo entre os grupos tratados e o grupo controle.

Os dados relacionados à histometria das células de Leydig são mostrados na Tabela 12. Como já mencionada na Tabela 11, o percentual de células de Leydig no compartimento intertubular não sofreu alteração entre os grupos analisados. Foi observado aumento de 44 e 59% do volume da célula de Leydig em G2 e G3, respectivamente, quando comparado ao G1. No entanto, apesar de ter ocorrido progressivo aumento do diâmetro nuclear e do volume da célula de Leydig desde o grupo controle (G1) até o grupo tratado com 150 ppm PTU (G3) não foi observada diferença estatisticamente significativa, assim como também não foi observada diferença estatística nos outros parâmetros analisados.

Tabela 11- Proporção volumétrica (%) dos diferentes componentes do compartimento intertubular em rã-touro sete meses após a submissão ao hipotireoidismo transitório com 6-n-propil-2-tiouracil (PTU) em duas concentrações.

Parâmetro (%)	G1 (n=5)	G2 (n=4)	G3 (n=6)
Vaso sanguíneo	9	8	6
Vaso linfático	3	2	3
Ducto Espermático	11	10	10
Célula de Leydig	12	8	10
Núcleo de Leydig	4	2	3
Citoplasma de Leydig	8	6	7
Tecido conjuntivo	66	71	71
Mastócito	1	1	1

Resultados expressos em média. G1: controle; G2: PTU75 ppm; G3: PTU 150 ppm. n: número de rãs.

Tabela 12- Histometria da célula de Leydig em rã-touro sete meses após a submissão ao hipotireoidismo transitório com 6-n-propil-2-tiouracil (PTU) em duas concentrações.

Parâmetros	G1 (n=5)	G2 (n=4)	G3 (n=6)
Percentual no parênquima	12	8	10
Diâmetro nuclear (μm)	5,48 \pm 0,32	5,82 \pm 0,32	6,16 \pm 0,49
Volume celular (μm^3)	253 \pm 59,03	365,83 \pm 39,42	403,18 \pm 88,08
Volume citoplasmático	164,30 \pm 44,3	259,09 \pm 29,7	292,93 \pm 85,46
Volume nuclear	88,77 \pm 15,28	106,75 \pm 16,41	110,26 \pm 11,60

Resultados expressos em média \pm desvio padrão. G1: controle; G2: PTU 75 ppm; G3: PTU 150 ppm. n: número de rãs.

4. DISCUSSÃO

Em anuros, os hormônios tireoidianos (HTs) têm sido objeto de estudo principalmente durante a metamorfose, na qual a ação desses hormônios já foi avaliada na reabsorção da cauda (Wang e Brown, 1993), no desenvolvimento dos membros (Buckbindere Brown, 1992) e neural (Denver et al., 1997), na remodelação intestinal (Shi e Brown, 1993) e na modificação da pele (Schreiber e Brown, 2003). Já no início do século passado, Gudernatsch (1912) observou que girinos expostos ao extrato da glândula tireoide metamorfoseavam rapidamente, enquanto Allen (1918), ao remover a mesma glândula em girinos, bloqueou a metamorfose. Dados semelhantes foram encontrados em estudos mais recentes, nos quais girinos tratados com drogas antitireoideanas (perclorato e metimazol) ou antagonistas dos receptores dos hormônios tireoidianos (NH-3) retardaram o desenvolvimento metamórfico ou até o bloquearam completamente (Goleman et al., 2002; Lim et al., 2002; Tietge et al., 2005). Por outro lado, a exposição dos girinos pré-metamórfica baixas concentrações de T4 e T3, ou à agonistas dos receptores dos hormônios tireoidianos (GC-1) induz precocemente à metamorfose (Shi, 1999; Furlow et al., 2004; Opitz et al., 2006a).

Embora haja diversos estudos que avaliam a ação dos hormônios tireoidianos em anuros este é o primeiro trabalho que avalia morfometricamente a interferência dos HTs de forma transitória em testículos de rãs. Há pesquisas demonstrando que a ausência temporária dos HTs na fase neonatal causou aumento significativo no tamanho do testículo e na produção espermática quando os animais tornaram-se

adultos e eutireoideos(roedores - Cooke et al., 1991, 1994; Palmero et al., 1992; tilápia - Matta et al., 2002).

4.1. Características Biométricas dos Girinos no Sexagésimo Dia de Tratamento com PTU em Duas Concentrações Diferentes

No presente estudo, o PTU inibiu o crescimento dos girinos, observando-se os animais tratados menores que os do grupo controle. A utilização de compostos antitireoidianos em anuros causa aumento da taxa de crescimento sem afetar a diferenciação, sendo encontrados animais tratados com tamanhos maiores que o grupo controle, mas sem desenvolvimento/modificações metamórficas (Goleman et al., 2002; Lim et al., 2002). Iwasawa (1956) observou que girinos imersos em soluções de tioureia durante dois a três meses tiveram o desenvolvimento metamórfico inibido, porém o bloqueio do crescimento corporal dependeu da fase em que o tratamento iniciou e da concentração de tioureia. Opitz et al. (2006b) encontraram resultados semelhantes aos do presente estudo em girinos de *Xenopus laevis* tratados PTU, sugerindo que esse achado pode ser devido à ação extratireoidiana tóxica que essa droga apresenta, o que foi já discutido por Bandyopadhyay et al. (2002) com relação aos efeitos colaterais do PTU. Assim, pelos resultados obtidos sugere-se que cada droga antitireoidiana possui ação específica, podendo encontrar alterações diferentes conforme o composto utilizado. Além disso, a fase larval na qual o tratamento foi iniciado pode ter contribuído para a redução do tamanho e do peso dos girinos tratados.

Neste trabalho não foram observados testículos definidos durante a fase larval, tanto no grupo controle como nos animais tratados com diferentes dosagens de PTU, indicando que a diferenciação gonadal deve ocorrer em estágios mais avançados do desenvolvimento. Para determinar se os HTs seriam capazes de afetar inervação da laringe, a diferenciação gonadal e ação de andrógenos na laringe de girinos de *Xenopus laevis*, Robertson e Kelley (1996) observaram que, ao contrário da maioria dos tecidos, a diferenciação gonadal é pouco afetada pelo bloqueio da tireoide, mesmo após um ano de tratamento com PTU 0,01%. Estes autores verificaram que as gônadas de animais controle e tratados se desenvolveram com grande semelhança. Resultado semelhante foi observado por Allen (1918), após um ano da remoção da tireoide de girinos de *Rana pipiens*, o que impediu as transformações metamórficas. Porém, nos

mesmos animais as gônadas se desenvolveram normalmente, observando-se espécimes com características larvais e testículos maduros. Essa emancipação do desenvolvimento gonadal da regulação dos HTs, sugere um mecanismo de neotenia, um fenômeno visto em Urodelos nos quais indivíduos com características larvais tornam-se reprodutivamente maduros (Allen, 1918; Robertson e Kelley, 1996). Não entendemos que este mecanismo aconteça em rã-touro, pois não houve desenvolvimento testicular em qualquer indivíduo na fase larval, seja controle, seja tratado.

4.2. Características da Glândula Tireoide de Girinos de Rã-touro no Sexagésimo Dia de Tratamento com PTU em Duas Concentrações Diferentes

No presente estudo, os girinos tratados com PTU apresentaram redução na proporção de folículos e de tecido conjuntivo, redução folicular em diâmetro e área e aumento significativo da vascularização.

O padrão histológico clássico da tireoide em animais tratados com indutores antitireoidianos inclui o aumento da glândula, distensão do folículo, assim como a hipertrofia e hiperplasia das células foliculares (Opitz et al., 2006b). No entanto, Degitz et al. (2005) demonstraram que a morfologia da tireoide de girinos pode ser encontrada de diferentes formas quando tratada com drogas antitireoidianas, sendo essas alterações dependentes da fase de início do tratamento e concentração do composto utilizado.

Assim como observado por Opitz et al. (2009), ao tratar girinos de *Xenopus laevis* durante 12 dias com perclorato de sódio, foi observado no presente estudo a redução do diâmetro dos folículos e o aumento na vascularização, porém com maior intensidade.

Acreditamos que as alterações histológicas encontradas na tireoide no presente estudo se devem ao período em que a solução antitireoidiana foi inserida, considerado por nós, após detalhadas análises, como precoce. Assim, respostas diferentes daquelas observadas em outros trabalhos possivelmente são resultados de uma combinação de fatores, incluindo os diferentes modos de ação dos produtos químicos (no corpo, na tireoide e em cada fase de desenvolvimento do girino), o tempo em que a solução antitireoidiana é efetiva, aliado à duração do tratamento. Desse modo, a diminuição folicular, a redução da quantidade de coloide, o aumento da proporção volumétrica de

vasos sanguíneos e o fato dos girinos tratados apresentarem peso e tamanho menores que o controle durante o período de tratamento confirmam a indução ao hipotireoidismo dos animais submetidos ao PTU, em ambas as dosagens.

4.3. Dados Biométricos e Histológicos das Gônadas de Rãs-touro Adultas após Indução ao Hipotireoidismo Transitório Durante a Fase Larval

Apesar de não terem sido determinados os níveis plasmáticos de T3, T4 e TSH, vários parâmetros analisados indicam que ambas as dosagens de PTU foram eficientes na indução ao hipotireoidismo.

Após sete meses do término tratamento todos os animais haviam retornando ao estado de eutireoidismo. Não foi observada diferença no peso e comprimento rostro-cloacal entre os indivíduos tratados e controle, apesar dos girinos submetidos ao hipotireoidismo terem apresentado tamanho menor durante o tratamento. Resultado mais próximo ao nosso foi encontrado por Tarn et al. (1998) em porcos, observando que animais tratados com PTU durante 91 dias apresentaram redução no peso corporal de até 42% em relação ao controle durante o tratamento, mas quando adultos, os indivíduos tratados e controle apresentaram pesos semelhantes. A semelhança no peso corporal de animais controle e tratados na fase adulta pode justificar a ausência de efeitos duradouros do hipotireoidismo em rã-touro e porco.

Neste estudo não foi encontrado efeito do hipotireoidismo transitório em testículos adultos, exceto para a razão entre espermátócito secundário e células de Sertoli. Porém, como foi um dado isolado e não modificou os eventos posteriores à sua ocorrência não foi levado em consideração. Resultados contrários aos obtidos neste trabalho foram registrados para roedores e tilápia-nilótica (Cooke et al., 1991, 1994; Palmero et al., 1992; Matta et al., 2002). Em roedores, o término do tratamento com PTU provocou aumento do número de células de Sertoli, elevando a proliferação das células germinativas causando aumento de 80% do testículo e 140% da produção espermática em adultos (Cooke et al., 1992). Em tilápia-nilótica o número de células germinativas dobrou, causando aumento correspondente no tamanho do testículo adulto (Matta et al., 2002). Por outro lado, porcos induzidos ao hipotireoidismo neonatal durante 20 semanas com PTU 0,1% não sofreram alterações no testículo, assim como não houve o aumento esperado da produção espermática ao fim do tratamento (Klobucar et al., 2003). Klobucar et al. (2003) sugeriram que a ausência de

diferença nos testículos, entre os animais dos grupos tratados e controle, se deve à indução tardia ao hipotireoidismo (terceira semana), apesar da proliferação neonatal da célula de Sertoli em porcos duram, em média, quatro meses. Kawahara et al. (1991), avaliando a disponibilidade de receptores para hormônios tireoidianos durante a metamorfose de *Xenopus laevis*, concluíram que, diferentes dos outros tecidos, as gônadas apresentam aumento progressivo da quantidade desses receptores ao longo do processo de metamorfose. Nesse sentido, a ausência de diferença entre os testículos de rãs tratadas e controle, no presente estudo, pode ter ocorrido devido à precocidade da submissão ao tratamento antitireoidiano. Serão necessários estudos que avaliem o efeito do hipotireoidismo em rãs em fases mais próximas ao clímax metamórfico, ou durante o próprio clímax, períodos em que esses animais devem apresentar maior disponibilidade de receptores para hormônios tireoidianos no testículo.

Associando o estudo que avaliou a disponibilidade de receptores para hormônios tireoidianos durante a metamorfose de *Xenopus laevis* (Kawara et al. 1991) e a independência do desenvolvimento gonadal dos HTs (Allen, 1918; Robertson e Kelley, 1996) evidencia uma questão que precisa ser avaliada para justificar a independência do desenvolvimento gonadal dos HTs, focando na disponibilidade de receptores de hormônios tireoidianos nas células de Sertoli de rãs-touro, uma vez que ausência desses receptores nos testículos, e principalmente nessas células, não afetaria a produção espermáticas desses animais.

Contudo, as particularidades de cada espécie são aspectos importantes na determinação dos efeitos do hipotireoidismo durante o desenvolvimento do testículo. São, portanto, necessários estudos complementares que avaliem a disponibilidade de receptores tireoidianos nos testículos, assim como o período de proliferação da célula de Sertoli e os fatores que influenciam a sua divisão e, diante dessas informações, inferir sobre a eficiência do modelo de hipotireoidismo transitório durante a metamorfose para aumentar a produção espermática em rãs-touro.

5. CONCLUSÕES

As alterações morfométricas na tireoide e redução no peso e tamanho de girinos no sexagésimo dia de tratamento com PTU indicam que o hipotireoidismo foi

induzido pela droga. Animais adultos mostraram semelhanças em peso e tamanho indicando que os efeitos do PTU são reversíveis.

A semelhança entre rãs-touro adultas de todos os grupos, nos parâmetros testiculares analisados, indica que a indução ao hipotireoidismo na fase 34 de Gosner não foi eficiente para modificar as características histológicas, não afetando a quantidade de células germinativas e de Sertoli, conseqüentemente mantendo o tamanho testicular e a produção espermática.

6. PERSPECTIVAS

- Aplicar a droga antitireoideana em outras fases do desenvolvimento.
- Análises bioquímicas hormonais de testosterona testicular.
- Analisar a ação de diferentes durações do tratamento antitireoideano nos testículos desses animais.
- Incluir análises imunohistoquímicas para observar a disponibilidade de receptores de hormônios tireoideanos no testículo.
- Utilizar microscopia eletrônica a fim de detectar alterações ultraestruturais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, B.M. (1918). The results of thyroid removal in the larvae of *Rana pipiens*. J. Exper. Zoo., 24(3): 499-519.

ANDÒ, S.; SIRIANNI, R.; FORASTIERI, P.; CASABURI, I.; LANZINO, M.; RAGO, V.; GIORDANO, F.; GIORDANO, C.; CARPINO, A.; PEZZI, V. (2001). Aromatase expression in prepuberal Sertoli cells: effect of thyroid hormone. Mol. Cell. Endocrinol., 178: 11–21.

BANDYOPADHYAY, U.; BISWAS, K.; BANERJEE, R.K. (2002). Extrathyroidal actions of antithyroid thionamides. Toxicol. Lett., 128:117–127.

- BUCKBINDER, L.; BROWN, D.D. (1992). Thyroid hormone-induced gene expression changes in the developing frog limb. *J. Biol. Chem.*, 267: 25786–25791.
- CARLOS, J.; MATTA, S.L.P. (2009). Microscopic morphology and testis morphometry of captivity-bred adult bullfrogs (*Lithobates catesbeianus* Shaw, 1802). *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 52(6): 1461-1472.
- COOKE, P.S. (1991). Thyroid hormones and testis development: A model system for increasing testis growth and sperm production. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 637: 122-132.
- COOKE, P.S.; HESS, R.A.; KIRBY, J.D. (1994). A model system for increasing testis size and sperm production: Potential application to animal science. *J. Anim. Sci.*, 72: 43-54.
- COOKE, P.S. (1996). Thyroid hormone and regulation of testicular development. *Anim. Reprod. Sci.*, 42: 3333-341.
- COOKE, P.S.; HESS, R.A.; PORCELLI, J.; MEISAMI, E. (1991). Increased sperm production in adult rats after transient neonatal hypothyroidism. *Endocrinology*, 129: 244-248.
- COOKE, P.S.; KIRBY, J.D.; PORCELLI, J. (1993). Increased testis growth and sperm production in adult rats following transient neonatal goitrogen treatment: Optimization of the propylthiouracil dose and effects of methimazole. *J. Reprod. Fertil.*, 97(2): 493-499.

- COOKE, P.S.; PORCELLI, J.; HESS, R.A. (1992). Induction of increased testis growth and sperm production in adult rats by neonatal administration of the goitrogen propylthiouracil (PTU): the critical period. *Biol. Reprod.*, 46:146-154.
- DEGITZ, S. J.; HOLCOMBE, G.W.; FLYNN, K.M.; KOSIAN, P.A.; KORTE, J.J.; TIETGE, J.E. (2005). Progress towards development of an amphibianbased thyroid screening assay using *Xenopus laevis*. Organismal and thyroidal responses to the model compounds 6-Propylthiouracil, Methimazole, and Thyroxine. *Toxicol. Sci.*, 87(2): 353–364.
- DENVER, R.J.; PAVGI, S.; SHI, Y-B. (1997). Thyroid hormone-dependent gene expression program for *Xenopus* neural development. *J. Biol. Chem.*, 272: 8179–8188.
- FEIX, R.D.; ABDALLAH, P.R.; FIGUEIREDO, M.R.C. (2006). Resultado econômico da criação de rã em regiões de clima temperado, Brasil. *Inform. Econ.*, 36 (3): 70-80.
- FURLOW, J. D.; YANG, H.; HSU, M.; LIM, W.; ERMIO, D. J.; CHIellini, G.; SCANLAN, T. S. (2004). Induction of larval tissue resorption in *Xenopus laevis* tadpoles by the thyroid hormone receptor agonist GC-1. *J. Biol. Chem.*, 279: 26555–26562.
- GOLEMAN, W. L.; URQUIDI, L. J.; ANDERSON, T. A.; SMITH, E. E.; KENDALL, R. J; CARR, J. A. (2002). Environmentally relevant concentrations of ammonium perchlorate inhibit development and metamorphosis in *Xenopus laevis*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 21: 424–430.

- GOMES, M.L.M.; MATTA, S.L.P.; RIBEIRO-FILHO, O.P.; MONTEIRO, J.C. (2012). Stereological analyses of the annual variation of captive bullfrog adult testis (*Lithobates catesbeianus*, Shaw 1802). *J. Morphol. Sci.*, 29(3): 182-186.
- GOSNER, K.L. (1960). A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16:183-190.
- GUDERNATSCH, J.F. (1912). Feeding experiments on tadpoles: The influence of specific organs given as food on growth and differentiation. A contribution to the knowledge of organs with internal secretion. *Wilhelm Roux Arch. Entwicklungsmech. Organismen.*, 35: 457–483.
- HESS, R.A.; COOKE, P.S.; BUNICK, D.; KIRBY, J.D. (1993). Adult testicular enlargement induced by neonatal hypothyroidism is accompanied by increased Sertoli and germ cell numbers. *Endocrinology*, 132: 2607-2613.
- HOLSBERGER, D.R.; COOKE, P.S. (2005). Understanding the role of thyroid hormone in Sertoli cell development: a mechanistic hypothesis. *Cell Tissue Res.*, 322:133-140.
- IWASAWA, H. (1956). Effects of thiourea upon the development of anuran larvae. *Endocrinol. Japon.*, 3(3): 169-75.
- JANNINI, E.A.; ULISSE, S.; D'ARMIENTO, M. (1995). Thyroid hormone and male gonadal function. *Endoc. Rev.*, 16(4): 443-459.

KAWAHARA, A; BAKER, B.S.; TATA, J.R. (1991). Developmental and regional expression of thyroid hormone receptor genes during *Xenopus* metamorphosis. *Development*, 112: 933-943.

KLOBUCAR, I; KOSEC, M.; CEBULJ-KADUNC, N.; MAJDIC, G. (2003). Postnatal hypothyroidism does not affect prepubertal testis development in boars. *Reprod. Dom. Anim.*, 38: 193-198.

LIM, W.; NGUYEN, N.-H.; YANG, H. Y.; SCANLAN, T. S; FURLOW, J. D. (2002). A thyroid hormone antagonist that inhibits thyroid hormone action in vivo. *J. Biol. Chem.*, 277: 35664–35670.

MAQSOOD, M. (1950). Thyroid functions in relation to reproduction of mammals and birds. *Biol. Rev.* 27: 281-319.

MATTA, S.L.P.; VILELA, D.A.R.; GODINHO, H.P.; FRANÇA, L.R. (2002). The goitrogen 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) given during testis development increases Sertoli and germ cells numbers per cyst in fish: the tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. *Endocrinology*, 143: 970-978.

^aOPITZ, R.; LUTZ, I.; NGUYEN, N. H.; SCANLAN, T. S.; KLOAS, W. (2006). Analysis of thyroid hormone receptor α mRNA expression in *Xenopus laevis* tadpoles as a means to detect agonism and antagonism of thyroid hormone action. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 212: 1-12.

^bOPITZ, R.; HARTMANN, S.; BLANK, T.; BRAUNBECK, T.; LUTZ, I.; KLOAS, W. (2006). Evaluation of histological and molecular endpoints for enhanced detection of

thyroid system disruption in *Xenopus laevis* tadpoles. *Toxicol.Sci.*, 90(2): 337–348.

OPITZ, R.; SCHMIDT, F.; BRAUNBECK, T.; WUERTZ, S.; KLOAS, W. (2009). Perchlorate and ethylenethiourea induce different histological and molecular alterations in a non-mammalian vertebrate model of thyroid goitrogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 298: 101–114

ORTH, J.M. (1993). Cell Biology of Testicular Development in fetus and neonate. In: DESJARDINS, C.; EWING, L.L. *Cell and molecular biology of the testis*. New York: Oxford University Press, 1: 3-42.

PALMERO, S.; BENAHMED, M.; MORERA, A.M.; TRUCCHI, P.; FUGASSA, E. (1992). Identification of nuclear tri-iodothyronine receptors in Sertoli cells from immature piglet testis. *J. Mol. Endocrinol.*, 9:55–59

PALMERO, S.; MARCHIS, M.; GALLO, G.; FUGASSA, E. (1988). Thyroid hormone affects the development of Sertoli cell function in the rat. *J. Endocrinol.*, 123: 105-111.

PUDNEY, J. (1993). Comparative cytology of the non-mammalian vertebrate Sertoli cell. In: RUSSELL, L.D.; GRISWOLD, M.D. (Ed.) *The Sertoli Cell*. Cache River Press, Clearwater, FL. 612-657.

ROBERTSON, J.C.; KELLEY, D.B. (1996). Thyroid hormone controls the onset of androgen sensitivity in the developing larynx of *Xenopus laevis*. *Develop.Biol.*, 176: 108–123.

- SCHREIBER, A.M., BROWN, D.D. (2003). Tadpole skin dies autonomously in response to thyroid hormone at metamorphosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 1769–1774
- SEGATELLI, T.M.; BATLOUNI, S.R.; FRANÇA, L.R. (2009). Duration of spermatogenesis in the bullfrog (*Lithobates catesbeianus*). *Theriogenology*, 72: 894–901.
- SHI, Y.-B.; BROWN, D.D. (1993). The earliest changes in gene expression in tadpole intestine induced by thyroid hormone. *J. Biol. Chem.*, 268: 20312–20317.
- SHI, Y.-B. (1999). *Amphibian Metamorphosis. From Morphology to Molecular Biology.* Wiley, New York.
- TARN, C.Y.; ROSENKRANS, C.F. JR.; APPLE, J.K.; KIRBY, J.D. (1998). Effects of 6-*N*-propyl-2-thiouracil on growth, hormonal profiles, carcass and reproductive traits of boars. *Reprod. Anim. Sci.*, 50 (1): 81-94.
- TIETGE, J. E.; HOLCOMBE, G. W.; FLYNN, K. M.; KOSIAN, P. A.; KORTE, J. J.; ANDERSON, L. E.; WOLF, D. C.; DEGITZ, S. J. (2005). Metamorphic inhibition of *Xenopus laevis* by sodium perchlorate: Effects on development and thyroid histology. *Environ. Toxicol. Chem.*, 24: 926–933.
- VAN HAASTER, L.H.; DE JONG, F.H.; DOCTER, R.; DE ROOIJ, D.G. (1992). The effect of hypothyroidism on Sertoli cell proliferation and differentiation and hormone levels during testicular development in the rat. *Endocrinology*, 131(3): 1574-1576.

WANG, Z.; BROWN, D.D. (1993). The thyroid hormone-induced gene expression program for amphibian tail resorption. *J. Biol. Chem.*, 268: 16270–16278.